



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

METODOLOGÍAS ANALÍTICAS RESPETUOSAS CON
EL MEDIO AMBIENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE
MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS EN AGUAS

Luciana Costa dos Reis Cruz



Tesis

Doctorales

www.eltallerdigital.com

UNIVERSIDAD de ALICANTE



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

E INSTITUTO UNIVERITARIO DE MATERIALES

FACULTAD DE CIENCIAS

METODOLOGÍAS ANALÍTICAS
RESPETUOSAS CON EL MEDIO
AMBIENTE PARA LA
DETERMINACIÓN DE
MICROCONTAMINANTES ORGÁNICOS
EN AGUAS

Luciana Costa dos Reis Cruz

Tesis presentada para aspirar al grado de
DOCTORA POR LA UNIVERSIDAD DE ALICANTE

Programa de Doctorado en Ciencia de Materiales

Dirigida por:

Dña. Lorena Vidal Martínez

D. Antonio Canals Hernández



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Los profesores Dra. Dña. LORENA VIDAL MARTÍNEZ y Dr. D. ANTONIO CANALS HERNÁNDEZ del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante, en calidad de Directores de la Tesis Doctoral presentada por Dña. LUCIANA COSTA DOS REIS CRUZ, con el título **“Metodologías analíticas respetuosas con el medio ambiente para la determinación de microcontaminantes orgánicos en aguas”**

Certifican que:

La citada Tesis Doctoral se ha realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Alicante, y que, a su juicio, reúne los requisitos necesarios exigidos en este tipo de trabajos.

Alicante, septiembre de 2018

Fdo. Dra. Dña. Lorena Vidal Martínez

Fdo. Dr. D. Antonio Canals Hernández

Agradecimientos

Querido leitor/estimado lector:

Sinto-me muito feliz em poder compartilhar este trabalho realizado durante quatro anos de Doutorado Pleno na Universidade de Alicante, Espanha.

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado tantas oportunidades na vida para estudar, crescer como pessoa e profissional e, hoje, concluir este árduo trabalho de pesquisa científica, plasmado nesta tese de doutorado.

À minha família, principalmente meus pais, Maria Goretti e Sérgio Souto, por me apoiaram em meus estudos realizados no Brasil, México e Espanha.

A mi amigo y compañero, Jorge García, agradezco todo el apoyo durante mi estancia en España.

A mis directores de tesis, Lorena Vidal y Antonio Canals, por el apoyo y dedicación.

A la doctora Carol Cortada, por haberme inspirado a seguir el camino de la investigación y creer en mi capacidad.

A los doctores Angel Linares Solano y Emilia Morallón por sus enseñanzas en el área de Ciencia de Materiales. Y a la doctora Vera Homem por su contribución sobre el tema de los siloxanos.

A mis compañeros de trabajo del grupo de investigación “Espectroscopía Atómica-Masas y Química Analítica en Condiciones Extremas”, por la compañía y enseñanzas. I would like to thanks to my foreign partners Anne Vuorema and Renata Ušiak for the opportunity they gave me to like the English language.

A todas las personas del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología.

A la Universidad de Alicante por la oportunidad que brinda a los alumnos extranjeros de estudiar en una de las mejores universidades de España.

Agradeço à Fundação Capes do Ministério da Educação do Brasil pela bolsa concedida. Mais que um apoio financeiro, Capes concedeu-me a oportunidade de adquirir novos conhecimentos que serão aplicados nas áreas de química e ciência de materiais, em prol da Ciência e Tecnologia do Brasil.

ÍNDICES



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ÍNDICE GENERAL

1	RESUMEN	3
2	ABSTRACT	9
3	OBJETO	15
4	INTRODUCCIÓN GENERAL	19
4.1	<i>Preparación de la muestra</i>	19
4.2	<i>Técnicas de extracción – evolución histórica</i>	22
4.2.1	Extracción en fase líquida	22
4.2.2	Microextracción en fase líquida	26
4.2.3	Extracción en fase sólida	41
4.2.4	Microextracción en fase sólida	45
4.2.5	Extracción por sorción en barra agitadora	49
4.2.6	Extracción en fase sólida magnética	51
4.2.7	Otras técnicas de microextracción en fase sólida	55
4.3	<i>Materiales carbonosos avanzados como adsorbentes</i>	59
4.3.1	Fullerenos	60
4.3.2	Nanotubos de carbono	61
4.3.3	Grafeno	62
4.3.4	Óxido de grafeno	65
4.4	<i>Grafeno y óxido de grafeno como adsorbentes para técnicas de extracción</i>	69
4.4.1	Nanocomposites magnéticos de grafeno y óxido de grafeno	72
4.4.1.1	<i>Propiedades magnéticas</i>	72
4.4.1.2	<i>Aplicaciones de los nanocomposites magnéticos de grafeno y óxido de grafeno</i>	75
4.4.2	Tipos de interacción entre los nanocomposites magnéticos de grafeno y óxido de grafeno y las especies químicas	76
4.4.3	Métodos de síntesis de composites magnéticos basados en grafeno	77
4.4.4	Nanocomposites magnéticos y no magnéticos basados en grafeno para la determinación de contaminantes orgánicos	81
5	TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN UTILIZADAS EN LA PRESENTE MEMORIA – ASPECTOS IMPORTANTES Y APLICACIONES ACTUALES	87
5.1	<i>Microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos</i>	87
5.2	<i>Extracción en fase sólida magnética</i>	92
6	DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS	99
6.1	<i>Diseño factorial</i>	102
6.2	<i>Diseño factorial fraccionado</i>	103
6.2.1	Definición general	103
6.2.2	Diseño de Plackett-Burman	105
6.3	<i>Diseño central compuesto</i>	107

7	ANALITOS OBJETO DE ESTUDIO	113
7.1	<i>Siloxanos</i>	113
7.2	<i>2,4,6 - Trinitrotolueno</i>	120
8	REFERENCIAS	123
9	PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIONES	141
	<i>9.1 Determination of cyclic and linear siloxanes in wastewater samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry</i>	141
	<i>9.2 Graphene oxide/Fe₃O₄ as sorbent for magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography to determine 2,4,6-trinitrotoluene in water samples</i>	167
	<i>9.3 Determination of siloxanes in water samples employing graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite as sorbent for magnetic solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry</i>	193
10	DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS	223
	<i>10.1 Aspectos generales</i>	223
	<i>10.2 Elementos comunes y no comunes</i>	224
11	CONCLUSIONES GENERALES	237
12	PERSPECTIVAS FUTURAS	241

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 4

Figura 4.1 Esquema del proceso analítico total para la determinación de contaminantes orgánicos [Fuente: adaptado de la referencia 1].	20
Figura 4.2 Extracción líquido-líquido mediante agitación en embudo de decantación [Fuente: adaptado de la referencia 7].	23
Figura 4.3 Esquema del primer método de microextracción basado en una gota [Fuente: referencia 9].	26
Figura 4.4 Sistemas de microextracción en gota diseñados por (a) Liu y Dasgupta; y (b) Jeannot y Cantwell [Fuente: referencias 10 y 11].	27
Figura 4.5 Técnica convencional para la microextracción en gota con inmersión directa.	28
Figura 4.6 Diagrama esquemático del sistema de microextracción líquido-líquido-líquido [Fuente: adaptada de la referencia 13].	29
Figura 4.7 Esquemas de la técnica de microextracción en fibra hueca. Modalidades de (a) dos fases y (b) tres fases [Fuente: adaptada de la referencia 14].	31
Figura 4.8 Sistema de microextracción en flujo continuo [Fuente: adaptada de la referencia 15].	32
Figura 4.9 Esquema de la técnica de microextracción en gota, en la modalidad de espacio de cabeza.	33
Figura 4.10 Representación de la técnica extracción con disolvente asistida por membrana.	34
Figura 4.11 Microextracción en barra con disolvente [Fuente: adaptada de la referencia 19].	35
Figura 4.12 Diagrama esquemático de la extracción con electromembrana [Fuente: adaptada de la referencia 20].	35
Figura 4.13 Fotografías de los diferentes pasos de la DLLME: (a) muestra acuosa antes de la inyección de la mezcla de disolvente dispersante (acetona) y disolvente extractante (C_2Cl_4), (b) inicio de introducción de la mezcla en muestra, (c) introducción, (d) imagen de microscopía óptica ($\times 1000$) donde se aprecia el disolvente C_2Cl_4 formando multitud de microgotas, (e) después de la centrifugación y (f) ampliación de la imagen del disolvente extractante conteniendo los analitos depositado en el fondo del tubo [Fuente: referencia 21].	37
Figura 4.14 Esquema del procedimiento de microextracción en gota directamente suspendida.	38
Figura 4.15 Etapas de una SPE general empleando cartuchos [Fuente: referencia 26].	42
Figura 4.16 Dispositivo utilizado para realizar la microextracción en fase sólida en fibra [Fuente: adaptada de la referencia 31].	46
Figura 4.17 Modos de SPME [Fuente: adaptada de la referencia 1].	47
Figura 4.18 Modalidades de microextracción en fase sólida en tubo: (a) modo flujo continuo o dinámico, y; (b) modo ciclo aspirar/expulsar o pasivo [Fuente: adaptada de la referencia 33].	49
Figura 4.19 Barra agitadora magnética utilizada en la técnica de extracción por sorción en barra agitadora [Fuente: adaptada de la referencia 38].	50
Figura 4.20 Representación de la técnica de extracción en fase sólida magnética [Fuente: adaptada de la referencia 55].	53
Figura 4.21 Nanopartículas magnéticas funcionalizadas utilizadas en la extracción en fase sólida magnética [Fuente: referencia: 57].	54
Figura 4.22 Dispositivo de microextracción en película delgada [Fuente: referencia 64].	56
Figura 4.23 El grafeno como base de las formas estructurales de los materiales de carbono con hibridación sp^2 [Fuente: referencia 74].	60
Figura 4.24 Fullerenos modificados superficialmente con carbohidratos [Fuente: referencia 76].	61

Figura 4.25 Nanotubo de carbono modificado superficialmente con ácido acético y anilina [Fuente: referencia 78].	62
Figura 4.26 Imagen obtenida por microscopía de efecto túnel (STM) de la estructura laminar del grafeno [Fuente: referencia 80].	63
Figura 4.27 Mecanismos de adsorción de pesticidas polares y no-polares sobre láminas de grafeno funcionalizadas [Fuente: referencia 59].	64
Figura 4.28 Esquema de la estructura hexagonal del grafeno formada por los enlaces covalentes tipo σ entre los átomos de carbono.	65
Figura 4.29 Posibles interacciones de compuestos aromáticos sobre la superficie del GO [Fuente: adaptada de la referencia 96].	66
Figura 4.30 Método Hummers-Offeman para la producción de grafeno y GO [Fuente: referencia 101].	68
Figura 4.31 Funcionalización del grafeno con biomoléculas de dopamina y la interacción específica entre el grupo catecol de la dopamina y el grupo amino de una molécula de melamina (composite rGO-DA) [Fuente: referencia 113].	71
Figura 4.32 Esquema del ordenamiento ferrimagnético: los dipolos magnéticos elementales están ordenados en sentidos opuestos y las intensidades de los dipolos de las columnas impares no compensan los de las columnas pares [Fuente: referencia 118].	73
Figura 4.33 Curvas de magnetización para los principales comportamientos de los materiales magnéticos [Fuente: referencia 119].	75
Figura 4.34 Métodos de síntesis de composites magnéticos basados en grafeno [Fuente: referencia 125].	78

Capítulo 5

Figura 5.1 Representación de una onda sonora y del crecimiento > colapso de una burbuja de cavitación [Fuente: referencia 153]. 92

Capítulo 6

Figura 6.1 Esquema general de un proceso o sistema [Fuente: referencia 162]. 99
Figura 6.2 Superficie de respuesta tridimensional. 108

Capítulo 7

Figura 7.1 Trimetilsilanol (TMS). 115
Figura 7.2 Hexametildisiloxano (L2). 115
Figura 7.3 Octametiltrisiloxano (L3). 116
Figura 7.4 Decametiltetrasiloxano (L4). 116
Figura 7.5 Dodecametilpentasiloxano (L5). 117
Figura 7.6 Hexametilciclotrisiloxano (D3). 117
Figura 7.7 Octametilciclotetrasiloxano (D4). 117
Figura 7.8 Decametilciclopentasiloxano (D5). 118
Figura 7.9 Dodecametilciclohexasiloxano (D6). 118
Figura 7.10 Fórmula del explosivo 2,4,6-trinitrotolueno. 120

Capítulo 9

9.1 Determination of cyclic and linear siloxanes in wastewater samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry

Figure 1.1(A) Chromatogram of a blank solution subjected to the optimized USA-DLLME-GC-MS method; (B) chromatogram of a standard solution ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) subjected to the developed method. TMS, trimethylsilanol; L2, hexamethyldisiloxane; D3, hexamethylcyclotrisiloxane; D4, octamethylcyclo tetrasiloxane; L4, decamethyltetrasiloxane; D5, decamethylcyclopentasiloxane; L5, dodecamethylpentasiloxane; D6, dodecamethylcyclohexasiloxane. 149
Figure 1.2 Response of the organic solvents tested. Deionized water samples spiked at 10 mg L^{-1} concentration level. Error bars correspond to standard deviation. 151
Figure 1.3 Pareto charts of the main effects obtained from the Plackett-Burman design..... 153
Figure 1.4 Pareto chart of the main effects obtained from the circumscribed central composite design. 156

9.2 Graphene oxide/ Fe_3O_4 as sorbent for magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography to determine 2,4,6-trinitrotoluene in water samples

Figure 2.1 MSPE of TNT using the GO/ Fe_3O_4 nanocomposite. 174

Figure 2.2. Chromatogram obtained after MSPE of a drinking water sample non-spiked (blue line) and spiked at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ level with target analyte (red line). Retention time of the TNT is 9.6 min.	175
Figure 2.3 TEM analysis of (a) GO, (b) Fe_3O_4 nanoparticles, and (c) $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposite.	178
Figure 2.4 XPS spectra of (a) $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$, (b) $\text{Fe}2\text{p}$, (c) $\text{O}1\text{s}$, (d) $\text{C}1\text{s}$	179
Figure 2.5 Pareto chart of the Plackett-Burman design.	182
Figure 2.6 Effect of the amount of nanocomposite in MSPE. Error bars represent the standard deviation of three replicated analysis.	183

Supplementary material

Figure 2.S1 The magnetization hysteresis loops of (A) Fe_3O_4 and (B) $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$. Inset shows a photograph showing the magnetic attraction between $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ composite and neodymium magnet.	173
Figure 2.S2 Effect of type of stirring on the synthesis of nanocomposite. Synthesis conditions: $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ ratio (w/w) 1/5 and pH unmodified (0.6). Extraction conditions: 20 mg of nanocomposite, 20 mL standard solution of 1 mg L^{-1} of TNT, vortex stirring for 5 min, elution with 1 mL of ACN and 3 min in ultrasonic bath. Error bars represent the standard deviation of three replicated analysis.	176
Figure 2.S3 Effect of pH on the synthesis of nanocomposite. Synthesis conditions: $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ ratio (w/w) 1:5 and magnetic stir plate. Extraction conditions: 20 mg of nanocomposite, 20 mL standard solution of 1 mg L^{-1} of TNT, vortex stirring for 5 min, elution with 1 mL of ACN and 3 min in ultrasonic bath. Error bars represent the standard deviation of three replicated analysis.	177
Figure 2.S4 Nanocomposite synthesized under different pH: (a) 0.6; (b) 2; (c) 4; and, (d) 6. ...	177
Figure 2.S5 XRD pattern of $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$	181

9.3 Determination of siloxanes in water samples employing graphene oxide/ Fe_3O_4 nanocomposite as sorbent for magnetic solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry

Figure 3.1 Chromatogram of a blank solution (black line) and chromatogram of a standard solution (blue line) containing all siloxanes ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ each) both subjected to the developed method (MSPE/GC-MS). MSPE conditions: amount of nanocomposite, 20 mg; extraction time, 10 min; 0.5 mL of acetonitrile for elution; elution time, 2.5 min; sample volume, 20 mL.	200
--	-----

Supplementary material

Figure 3.S1 TEM image of the $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposite.	202
Figure 3.S2 Effect of elution solvent on MSPE procedure carried out with standard solutions at 10 mg L^{-1} of each siloxane. MSPE conditions: amount of nanocomposite, 20 mg; extraction time, 10 min; 0.5 mL of solvent for elution; elution time, 2.5 min; sample volume, 20 mL.	203
Figure 3.S3 Pareto charts of the Plackett-Burman design obtained for: (a) L3; (b) D4; (c) L4; (d) D5; (e) L5, and (f) D6.	207
Figure 3.S4 Reusability study of the $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$ nanocomposite for the proposed methodology using a 10 mg L^{-1} solution for each siloxane. MSPE conditions: amount of nanocomposite, 20 mg; extraction time, 10 min; 0.5 mL of acetonitrile for elution; elution time, 2.5 min; sample volume, 20 mL.	209

Capítulo 10

Figura 10.1 Esquema que relaciona los principales elementos comunes y no comunes entre las tres metodologías propuestas. 231



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 4

Tabla 4.1 Resumen cronológico de las principales técnicas de microextracción en fase líquida.	40
Tabla 4.2 Modos de operación de la técnica SPE y ejemplos de aplicaciones [Fuente: referencia 29].	44
Tabla 4.3 Cronología de las principales técnicas miniaturizadas de extracción en fase sólida. .	58

Capítulo 6

Tabla 6.1 Matriz de experimentos del diseño factorial fraccionado de Plackett-Burman para estudiar k=11 factores en N=12 experimentos.	106
---	-----

Capítulo 9

9.1 Determination of cyclic and linear siloxanes in wastewater samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry

Table 1.1 Quantification and confirmation ions selected for the GC-MS analysis	148
Table 1.2 Experimental factors and levels studied on the Plackett-Burman design.....	152
Table 1.3 Experimental factors and levels studied on the circumscribed central composite design (CCCD).....	155
Table 1.4 Performance parameters of the developed USA-DLLME-GC-MS method for the determination of siloxanes in water samples.	158
Table 1.5 Enrichment factors of the optimized USA-DLLME-GC-MS method for the determination of siloxanes in water samples.	159
Table 1.6 Comparison of different methods developed for the determination of siloxanes in wastewater samples.....	160
Table 1.7 Analysis of wastewater samples collected at different points in two treatment plants using the proposed USA-DLLME-GC-MS method.....	162
Table 1.8 Relative recoveries and CV values of the siloxanes studied in wastewater samples.	163
Table 1.9 Relative recoveries and CV values of the siloxanes studied in wastewater samples.	164

9.2 Graphene oxide/Fe₃O₄ as sorbent for magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography to determine 2,4,6-trinitrotoluene in water samples

Table 2. 1 Factors and levels of Plackett-Burman design.....	182
Table 2.2 Chromatographic methods for the determination of TNT.....	185

Table 2.3 The penalty points (PP) to assess the greenness of the new MSPE-LC-UV-Vis method for TNT determination in water samples.	187
---	-----

9.3 Determination of siloxanes in water samples employing graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite as sorbent for magnetic solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry

Table 3.1 The main analytical figures of merit of the developed MSPE/GC-MS method.	210
Table 3.2 Relative recoveries and RSD values of the six siloxanes studied in real-world water samples.	213

Supplementary material

Table 3.S1 Factors and levels of the Plackett-Burman design.	204
Table 3.S2 Comparison of different methods developed for the determination of siloxanes in water samples.	212
Table 3.S3 Penalty points (PP) calculated to assess the greenness of the MSPE/GC-MS method for six siloxanes determination in water samples.	215

Capítulo 10

Tabla 10.1 Características representativas de las metodologías analíticas propuestas en la presente memoria.	225
Tabla 10.2 Principales parámetros analíticos de las metodologías propuestas en esta memoria.	227
Tabla 10.3 Recuperaciones relativas obtenidas en la aplicación de las metodologías propuestas al análisis de muestras reales de aguas.	229

GLOSARIO DE TÉRMINOS Y ACRÓNIMOS

carboxen-PDMS	<i>Carboxen-polydimethylsiloxane</i> Carboxen-polidimetilsiloxano
CCCD	<i>Circumscribed central composite design</i> Diseño central compuesto circunscrito
CCD	<i>Central composite design</i> Diseño central compuesto
CFME	<i>Continuous-flow microextraction</i> Microextracción líquido-líquido en flujo continuo
CNT	<i>Carbon nanotube</i> Nanotubos de carbono
CV	<i>Coefficient of variation</i> Coeficiente de variación
CW-DVB	<i>Carbowax-divinylbenzene</i> Carbowax-divinilbenceno
CW-TPR	<i>Carbowax-template resin</i> Carbowax-resina templada
D3	<i>Hexamethylcyclotrisiloxane</i> Hexametilciclotrisiloxano

D4	<i>Octamethylcyclotetrasiloxane</i> Octametilciclotetrasiloxano
D5	<i>Decamethylcyclopentasiloxane</i> Decametilciclopentasiloxano
D6	<i>Dodecamethylcyclohexasiloxane</i> Dodecametilciclohexasiloxano
DI-SDME	<i>Direct immersion single-drop microextraction</i> Microextracción en gota en modo de inmersión directa
DLLME	<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i> Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMS	<i>Dimethylsilanol</i> Dimetilsilanol
DSDME	<i>Directly suspended droplet microextraction</i> Microextracción en gota directamente suspendida
d-SPE	<i>Dispersive solid-phase extraction</i> Extracción en fase sólida dispersiva
DSPME	<i>Dispersive solid-phase microextraction</i> Microextracción en fase sólida dispersiva

DVB-carboxen- PDMS	<i>Divinylbenzene-carboxen-polydimethylsiloxane</i> Divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano
EF	<i>Enrichment factor</i> Factor de enriquecimiento
EME	<i>Electromembrane extraction</i> Extracción con electromembrana
GC	<i>Gas chromatography</i> Cromatografía de gases
GC-MS	<i>Gas chromatography-mass spectrometry</i> Cromatografía de gases-espectrometría de masas
GO	<i>Graphene oxide</i> Óxido de grafeno
GO/Fe ₃ O ₄	<i>Graphene oxide/iron oxide</i> Óxido de grafeno/óxido de hierro
HF-LPME	<i>Hollow fiber liquid-phase microextraction</i> Microextracción en fibra hueca

HFM-SPME	<i>Hollow fiber membrane-protected micro-solid-phase extraction</i> Microextracci3n en fase s3lida con membrana de fibra hueca protectora
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> Cromatograf3a l3quida de alta eficiencia
HS-SDME	<i>Headspace single-drop microextraction</i> Microextracci3n en gota en modo de espacio de cabeza
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i> Espectrometr3a de masas con plasma acoplado inductivamente
ICP-OES	<i>Inductively coupled plasma optical emission spectrometry</i> Espectroscop3a de emisi3n por plasma de acoplamiento inductivo
IL	<i>Ionic liquid</i> L3quido i3nico
ISPE	<i>Immuno-sorbent</i> Inmunoadsorbente
K _d	<i>Distribution coefficient</i> Coeficiente/constante de distribuci3n, coeficiente de reparto
L2	<i>Hexamethyldisiloxane</i> Hexametildisiloxano

L3	<i>Octamethyltrisiloxane</i> Octametiltrisiloxano
L4	<i>Decamethyltetrasiloxane</i> Decametiltetrasiloxano
L5	<i>Dodecamethylpentasiloxane</i> Dodecametilpentasiloxano
LC	<i>Liquid chromatography</i> Cromatografía de líquidos
LC-UV-Vis	<i>Liquid chromatography-UV-Vis</i> Cromatografía líquida-ultravioleta visible
LDPE	<i>Low density polyethylene</i> Membrana de polietileno de baja densidad
LLE	<i>Liquid-liquid extraction</i> Extracción líquido-líquido
LLLME	<i>Liquid-liquid-liquid microextraction</i> Microextracción líquido-líquido-líquido
LLME	<i>Liquid-liquid microextraction</i> Microextracción líquido-líquido

LOD	<i>Limit of detection</i> Límite de detección
LOQ	<i>Limit of quantification</i> Límite de cuantificación
LPME	<i>Liquid-phase microextraction</i> Microextracción en fase líquida
M_s	<i>Specific saturation magnetization</i> Magnetización de saturación
Mag-HSAE	<i>Magnetic headspace adsorptive extraction</i> Extracción adsorptiva magnética en espacio de cabeza
MASE	<i>Membrane-assisted solvent extraction</i> Extracción con disolvente asistida por membrana
M-CNTs	<i>Magnetic carbon nanotubes</i> Nanotubos de carbono magnéticos
MDSPE	<i>Magnetic dispersive solid-phase extraction</i> Extracción en fase sólida magnética dispersiva
MDSPME	<i>Magnetic dispersive solid-phase microextraction</i> Microextracción en fase sólida magnética dispersiva

MEPS	<i>Microextraction in a packed syringe</i> Microextracción en jeringa empaquetada
MGC	<i>Magnetic graphene composites</i> Composites magnéticos a base de grafeno
MGO	<i>Magnetic graphene oxide</i> Óxido de grafeno magnético
MIL	<i>Magnetic ionic liquid</i> Líquido iónico magnético
MIP	<i>Molecular imprinted polymer</i> Polímero de impresión molecular
MNP	<i>Magnetic nanoparticle</i> Nanopartícula magnética
MOFs	<i>Metal-organic frameworks</i> Redes metal-orgánico
MS	<i>Mass spectrometry</i> Espectrometría de masas
MSPE	<i>Magnetic solid-phase extraction</i> Extracción en fase sólida magnética

PA	Polyacrylate Poliacrilato
PAHs	<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i> Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PAR	<i>4-(2-pyridylazo) resorcinol</i> 4-(2-piridilazo) resorcinol
PDMS	<i>Polydimethylsiloxane</i> Polidimetilsiloxano
PDMS-DVB	<i>Polydimethylsiloxane-divinylbenzene</i> Polidimetilsiloxano-divinilbenceno
PEEK	<i>Polyether ether ketone</i> Polieteretercetona
PF	<i>Preconcentration factor</i> Factor de preconcentración
G.A.C.	<i>Green Analytical Chemistry</i> Química Analítica Verde
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i>

rGO	<i>Reduced graphene oxide</i> Óxido de grafeno reducido
RSD	<i>Relative standard deviation</i> Desviación estándar relativa
RR	<i>Relative recovery</i> Recuperación relativa
SBME	<i>Solvent bar microextraction</i> Microextracción en barra con disolvente
SBSE	<i>Stir bar sorptive extraction</i> Extracción sobre barra agitadora
SFODME	<i>Solidification of the floating organic drop microextraction</i> Solidificación de la gota orgánica flotante
SLM	<i>Supported liquid membrane</i> Membrana líquida soportada
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> Extracción en fase sólida

SPME *Solid-phase microextraction*
Microextracción en fase sólida

STM *Scanning tunneling microscope*
Microscopía de efecto túnel

TAP *Total analytical process*
Proceso analítico total

TFME *Thin-film microextraction*
Microextracción en película delgada

TMS Trimethylsilanol
Trimetilsilanol

TNT *2,4,6-trinitrotoluene*
2,4,6-trinitrotolueno

USA-DLLME *Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction*
Microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos

UA-MSPE *Ultrasound assisted magnetic solid-phase extraction*
Extracción en fase sólida magnética asistida por ultrasonidos

USAEME *Ultrasound-assisted emulsification-microextraction*

Microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos

VMS *Volatile methylsiloxane*

Metilsiloxano volátil

Vortex-assisted RP-DLLME *Vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction*

Microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa asistida por vórtex

WWTP *Wastewater treatment plant*

Estación depuradora de aguas residuales

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

“El químico que no haga un juramento garantizando la autenticidad, además de la exactitud de su trabajo, no debería nunca publicar sus resultados, ya que si lo hiciera ese resultado iría en perjuicio, no solamente suyo, sino de toda la ciencia.” (Ferenc Szabadváry, History of Analytical Chemistry, 1966).



“Lo más hermoso que podemos experimentar es lo misterioso. Es la fuente de todo arte verdadero y la ciencia”. (Albert Einstein, 1932).

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

“Simplemente comparta la belleza y la magia con quien sea capaz de valorarla y apreciar las cosas simples de la vida, que son siempre las más importantes”. (Dulce María Espinosa Saviñón)

RESUMEN



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

1 RESUMEN

El Proceso Analítico Total (*Total Analytical Process*, TAP) es la metodología general utilizada en todos los laboratorios analíticos para la determinación de compuestos químicos y bioquímicos y está formado, además de otras, por dos etapas fundamentales: (i) la preparación de la muestra, y (ii) la separación/detección. Cuando se ha de seleccionar un método para la realización de un determinado análisis se ha de considerar, entre otros, la matriz de la muestra, así como el nivel de concentración de los analitos.

Con el objetivo de solucionar problemas analíticos encontrados en las metodologías actuales y/o determinar concentraciones cada vez más bajas de los analitos de interés en matrices cada vez más complejas, resulta de gran importancia el desarrollo de nuevas metodologías analíticas capaces de conseguir resultados satisfactorios.

La etapa de extracción y concentración de los analitos de interés en una muestra, también conocida como preparación de la muestra, ha sido objeto de numerosos estudios, en muchos casos, con tendencia a disminuir el tiempo empleado así como el consumo de disolventes y aumentar la automatización del proceso. Para la elección de la técnica de extracción necesaria en una metodología analítica hay que tener en cuenta las características físicas de la muestra, y las características químicas de los analitos que se pretenden separar y de la matriz en la que se encuentran. Por otro lado, se deben considerar los parámetros de calidad del análisis (e.g., sensibilidad, resolución, tiempo de análisis, necesidad de una detección específica, etc...).

Actualmente, la contaminación del medioambiente es una de las principales preocupaciones globales y por eso la identificación y cuantificación de (micro)contaminantes (i.e., compuestos tóxicos a concentraciones del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1}) es uno de los problemas analíticos que más incentiva el desarrollo de nuevas metodologías analíticas. Concretamente, para el análisis de microcontaminantes orgánicos es necesario, además de una etapa de extracción, una etapa de separación/detección que, en la mayoría de las ocasiones, es la cromatografía de líquidos o gases acoplada a un sistema de detección (i.e., sistema de identificación y cuantificación del analito de interés).

Un importante avance en la química analítica actual ha sido la miniaturización de las técnicas de extracción utilizadas para la preparación de la muestra, aportando una mayor rapidez en los análisis, sencillez, un menor coste y una disminución de los daños ambientales. Tales mejoras aportan a las técnicas de extracción miniaturizadas características que se ajustan a los requisitos de la química analítica verde, además de resolver una serie de deficiencias presentadas por las técnicas de extracción clásicas.

De esta forma, en esta memoria se presentan tres nuevas metodologías analíticas en las cuales la preparación de la muestra ha sido miniaturizada, en mayor o menor grado, para la determinación de microcontaminantes orgánicos en aguas. En primer lugar, se presentan en cuatro capítulos (4, 5, 6 y 7), una visión amplia pero suficientemente profunda de las técnicas de extracción, las herramientas quimiométricas y los analitos modelo estudiados. A continuación, se presenta un capítulo que incluye tres secciones, una para cada metodología analítica desarrollada, con sus respectivos resultados y discusiones; y otro capítulo en el que se discuten los resultados obtenidos en las tres metodologías mostrando los aspectos comunes y no comunes de las mismas como una visión crítica de los resultados. Finalmente, se resumen, en los capítulos de conclusiones generales y perspectivas futuras, las ventajas observadas en las metodologías desarrolladas frente a las metodologías existentes, prestando una especial atención a los avances que pueden ser aportados al desarrollo futuro de metodologías novedosas y ecológicas para determinación de microcontaminantes orgánicos en aguas.

En las metodologías propuestas se incluyen técnicas de extracción miniaturizadas para la determinación en aguas de algunos de los microcontaminantes orgánicos de interés actual: siloxanos lineales y cíclicos, y el explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT).

Sección 9.1: en esta sección se presenta una metodología de análisis de ocho siloxanos en muestras de aguas residuales que incluye una técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos (USA-DLLME) rápida, simple y ecológica, como etapa de pretratamiento previa a la

técnica de separación/detección como la cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS).

Sección 9.2: se propone una segunda metodología rápida, simple, económica y respetuosa con el medio ambiente basada en la extracción en fase sólida magnética (MSPE). Para tal fin se utiliza el adsorbente óxido de grafeno/óxido de hierro (GO/Fe₃O₄) para la preconcentración del explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) en muestras de agua antes de su determinación por cromatografía líquida-ultravioleta visible (LC-UV-Vis). Este trabajo fue precedido por un estudio sobre la optimización de la síntesis del nanocomposite magnético GO/Fe₃O₄ a fin de obtener un material adsorbente con excelente capacidad de adsorción/desorción.

Sección 9.3: en la tercera sección se muestra una metodología analítica empleando la misma técnica de extracción que la utilizada en la sección 9.2, MSPE con GO/Fe₃O₄ como adsorbente. Sin embargo, esta metodología también puede ser considerada novedosa por los avances y soluciones aportados para solventar los problemas analíticos encontrados en metodologías desarrolladas anteriormente para la determinación de siloxanos lineales y cíclicos en muestras de agua. El sistema de separación/detección utilizado fue la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS). La MSPE/GC-MS propuesta para el análisis de siloxanos en aguas es rápida, sencilla y respetuosa con el medio ambiente.

ABSTRACT



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

2 ABSTRACT

The Total Analytical Process (TAP) is the general methodology used in all analytical laboratories for the determination of chemical and biochemical compounds and it is composed, among others, by two fundamental stages: (i) the preparation of the sample, and (ii) separation/detection. When selecting a method for carrying out a specific analysis, the sample matrix as well as the concentration level of the analytes must be considered.

With the aim of solving analytical problems found in current methodologies and/or determining decrease lower concentrations of analytes of interest in increasingly complex matrices, the development of new analytical methodologies able to achieve satisfactory results is of great importance.

The stage of extraction and concentration of the analytes of interest in a sample, also known as sample preparation, has been the subject of numerous studies, in many cases, focused on reducing not only the time spent but also the consumption of solvents and on increasing the automation of process. For the choice of an extraction technique necessary in an analytical methodology, it is necessary to take into account the physical characteristics of the sample, and the chemical characteristics of the analytes and the matrix in which they are found. On the other hand, the quality parameters of the analysis must be considered (e.g., sensitivity, resolution, analysis time, need of a specific detection system, etc...).

Currently, pollution of the environment is one of the main global concerns and therefore the identification and quantification of (micro)pollutants (i.e., toxic compounds at concentrations of the order of $\mu\text{g L}^{-1}$ or ng L^{-1} level) is one of the analytical problems that encourage the most the development of new analytical methodologies. Specifically, for the analysis of organic micropollutants, it is necessary, in addition to an extraction stage, a separation/detection stage, which, in most cases, is a liquid or gas chromatography coupled to a detection system (i.e., identification and quantification system of the target analytes).

An important advance in the current analytical chemistry has been the miniaturization of the extraction techniques used for sample preparation, providing faster analysis, simplicity, lower cost and a reduction in environmental

impact. Such improvements provide miniaturized extraction techniques with characteristics that meet the requirements of green analytical chemistry, also as solving a series of deficiencies presented by classical extraction techniques.

Thus, this report presents three new analytical methodologies in which the preparation of the sample has been miniaturized, to a greater or lesser degree, for the determination of organic micropollutants in water. Firstly, a broad but deep vision of the extraction techniques, the chemometric tools and the target analytes studied are presented in four chapters. Next, there is a chapter that includes three sections, one for each analytical methodology developed, with its respective results and discussions; and another chapter in which the results obtained in the three methodologies are discussed, showing the common and non-common aspects of them with a critical view of the results. Finally, in the chapters of general conclusions and future perspectives, the advantages observed in the methodologies developed in relation to existing methodologies are summarized, paying special attention to the advances that could be employed in the future development of novel and environmentally friendly methodologies for the determination of organic micropollutants in waters.

The proposed methodologies include miniaturized extraction techniques for the determination in water of some of the organic micropollutants of current interest: linear and cyclic siloxanes, and the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT).

Section 9.1: This section presents a methodology for the analysis of eight siloxanes in wastewater samples that includes a fast, simple and ecological ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction technique (USA-DLLME), as a pretreatment stage for the separation/detection technique gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

Section 9.2: It is proposed a second methodology that is fast, simple, economic and environmentally friendly based on magnetic solid-phase extraction (MSPE). For this purpose, the adsorbent graphene oxide/iron oxide (GO/Fe₃O₄) is used for the preconcentration of the explosive 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) in water samples before its determination by liquid chromatography-UV-Vis (LC-UV-Vis). This work was preceded by a study of synthesis optimization of the

magnetic nanocomposite GO/Fe₃O₄ in order to obtain an adsorbent material with excellent adsorption/desorption capacity.

Section 9.3: The third section shows an analytical methodology with the same extraction technique used in the section 9.2, MSPE with GO/Fe₃O₄ as sorbent. However, this methodology can also be considered novel due to the advances and solutions provided to solve the analytical problems found in previously developed methodologies for the determination of linear and cyclic siloxanes in water samples. The separation/detection system used was gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The MSPE/GC-MS methodology proposed for the analysis of siloxanes in water is fast, simple and environmentally friendly.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

OBJETO



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

3 OBJETO

La necesidad de extraer compuestos orgánicos de matrices acuosas es uno de los aspectos más importantes de la química analítica. Debido a que los compuestos orgánicos vienen normalmente acompañados de una matriz que puede presentar interferencias, la preparación de la muestra es cada vez más importante para su análisis. En la mayoría de los casos, alguno o algunos de los componentes de la matriz tienen características muy similares a las de los analitos buscados o simplemente perturban en la medición (efectos de matriz), y en otros casos la concentración del analito es muy baja (análisis de trazas). En este último caso, la aplicación directa de la técnica analítica de detección bien no origina señal o ésta está por debajo del límite de detección de la misma. En todos estos casos es necesario utilizar un proceso de preparación de la muestra para eliminar interferentes y/o realizar una preconcentración del analito a determinar.

Existen diversas técnicas para la preparación de muestras, entre ellas se encuentran las técnicas de separación. Éstas son utilizadas en el proceso analítico, entre otros, para mejorar dos aspectos fundamentales del mismo: la selectividad y la sensibilidad. Cuando los métodos analíticos no poseen un nivel adecuado de estos parámetros para la resolución de problemas analíticos concretos, las técnicas de separación pueden ayudar a mejorarlos. Un lugar especialmente destacado lo ocupan las técnicas de extracción dentro de las técnicas de separación.

Las técnicas de extracción clásicas más utilizadas para el análisis de compuestos orgánicos son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). A pesar de proporcionar muy buenos resultados, en los últimos años se está tendiendo a reemplazarlas por técnicas de extracción miniaturizadas, más rápidas, simples, fáciles de manejar y ecológicas, en las que se utilizan pequeños volúmenes de disolventes orgánicos (pudiendo incluso llegar a eliminarlos) o pequeñas cantidades de nuevos materiales sorbentes, además de menores cantidades de muestra.

Por lo tanto, en el presente trabajo de tesis doctoral, se proponen avances en técnicas de microextracción que palien las limitaciones que presentan las técnicas actualmente disponibles. La propuesta consiste en utilizar dos modalidades miniaturizadas sensibles, rápidas, sencillas, económicas y ecológicas para la extracción de compuestos orgánicos en aguas: (i) la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos (USA-DLLME), y; (ii) la extracción en fase sólida magnética (MSPE). Son clasificadas como modalidades miniaturizadas de la LLE y SPE, respectivamente. Ambas permiten reducir el consumo de muestra y reactivos, los tiempos de análisis, costes y riesgos ambientales sin comprometer los parámetros de calidad analíticos. Actualmente, se considera necesario realizar avances en las técnicas de extracción existentes o proponer otras técnicas que sean novedosas y permitan determinar contaminantes orgánicos a concentraciones traza (microcontaminantes) en muestras de agua, auxiliando a los laboratorios analíticos de empresas e instituciones a monitorear las aguas y cumplir normativas cada vez más exigentes.

Tres metodologías analíticas han sido propuestas; una utilizando la técnica de microextracción USA-DLLME y dos utilizando la MSPE con $\text{GO/Fe}_3\text{O}_4$ como adsorbente. Las técnicas de extracción han sido optimizadas mediante diseño estadístico de experimentos y los métodos (técnica de extracción + sistema de separación/detección) han sido validados y aplicados al análisis de siloxanos y TNT en muestras reales de aguas.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

4 INTRODUCCIÓN GENERAL

4.1 Preparación de la muestra

La etapa de preparación de la muestra tiene una gran importancia dentro del Proceso Analítico Total (*Total Analytical Process*, TAP) (Figura 4.1) [1]. En la preparación de la muestra se consigue dar a la muestra el estado físico adecuado para la técnica de análisis seleccionada, eliminar posibles interferencias, concentrar o diluir el analito, etc. Es evidente que el mejor método de análisis estaría basado en la medida directa de la muestra sin que ésta necesitara ser tratada. Sin embargo, la mayoría de las técnicas instrumentales utilizadas actualmente, la existencia de matrices complejas y la necesidad de alcanzar límites de detección cada vez más bajos hacen que la etapa de preparación de la muestra siga siendo prácticamente imprescindible.

Debido a que la mayoría de los compuestos orgánicos de interés medioambiental presentan una mayor o menor toxicidad a niveles muy bajos de concentración es muy importante desarrollar metodologías de análisis suficientemente sensibles que permitan abarcar la amplia variedad de estos compuestos. Sin embargo, además de la baja concentración, en muchos casos, se observan efectos de matriz. Todo esto hace necesario la utilización de técnicas de extracción para la preparación de la muestra como etapa previa a la identificación y/o cuantificación de los analitos.

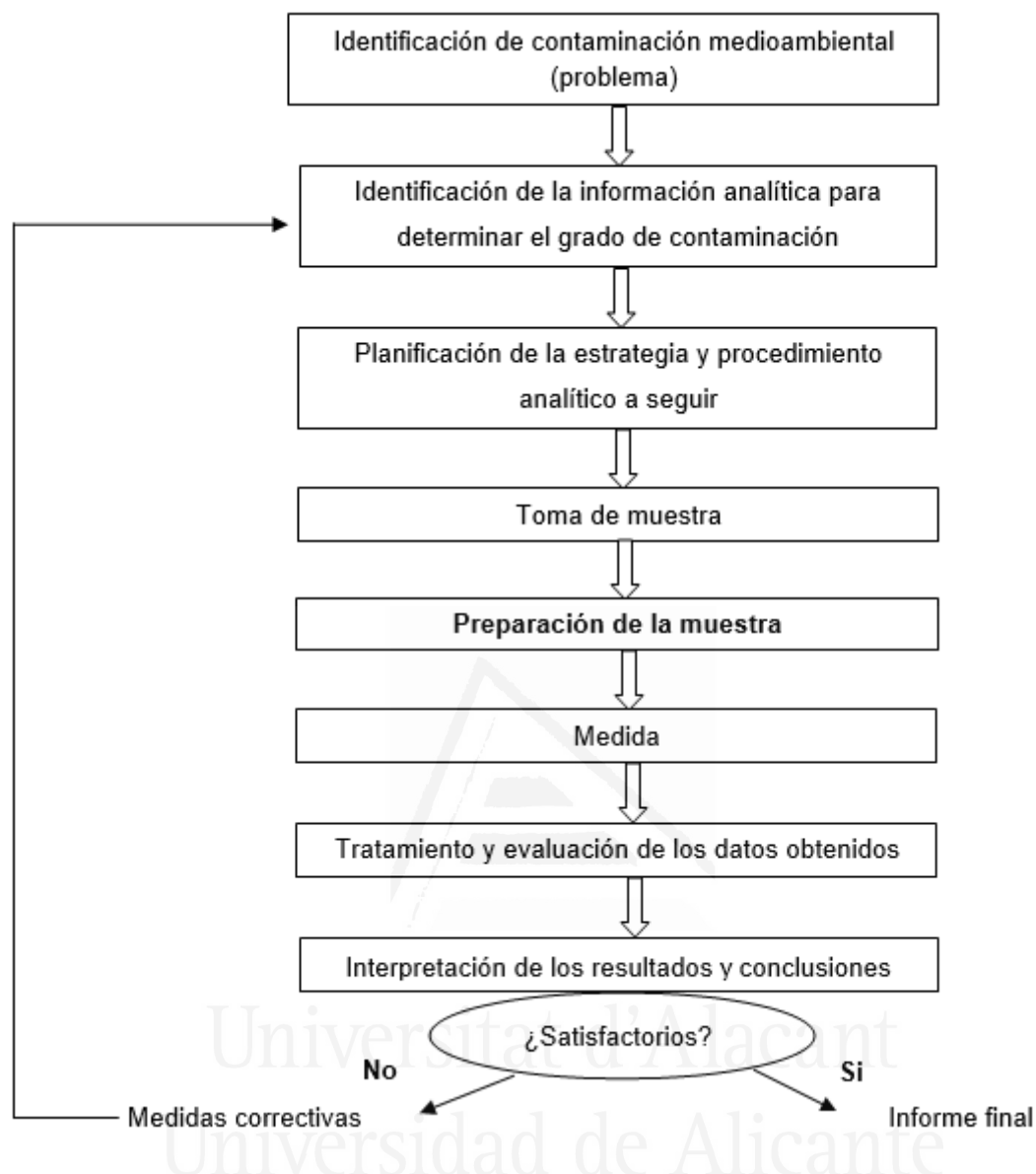


Figura 4.1 Esquema del proceso analítico total para la determinación de contaminantes orgánicos [Fuente: adaptado de la referencia 1].

En la sociedad actual, el desarrollo sostenible es muy importante debido a los graves daños ambientales provocados por la actividad humana. Dentro de este contexto, en los últimos años, la Química Analítica también ha ido incorporando un mayor carácter sostenible para monitorear los contaminantes en el medioambiente a través de procesos cada vez ecológicos. La Química Analítica Verde o Ecológica (*Green Analytical Chemistry*, GAC), propuesta a finales del siglo pasado, es hoy en día una realidad palpable incluyendo

desarrollos en automatización, miniaturización y tratamiento *in-situ* de los residuos generados con el objetivo de minimizar los daños provocados en el ambiente por el empleo de los métodos de análisis. La práctica reducción de los costes de muchos métodos de análisis debido a la menor escala de trabajo, la automatización, tratamiento en línea de los desechos y la eliminación de etapas en el análisis de las muestras, también ha contribuido a la disminución de los riesgos para el ambiente [2].

Sin embargo, gran parte de la instrumentación analítica actual no permite realizar el análisis directo de muestras por lo que deben ser sometidas a un tratamiento previo. Por ello, la Química Analítica actual se preocupa cada vez más por el desarrollo de técnicas de preparación de muestras que sigan los principios de la Química Analítica Verde (GAC) [2], para lo cual los aspectos a considerar son:

1. Aplicar técnicas analíticas directas que no requieran de etapas de tratamiento de muestra;
2. Minimizar el número de muestras y su volumen;
3. Realizar muestreos *in-situ*;
4. Integrar los procesos y operaciones analíticas para el ahorro de energía y reducción del consumo de reactivos;
5. Utilizar metodologías de análisis miniaturizadas y/o automatizadas;
6. Evitar el uso de procedimientos de derivatización;
7. Evitar la generación de residuos y gestionar adecuadamente los residuos producidos;
8. Diseñar métodos multi-analito o multi-parámetro en lugar de métodos que determinen un único analito/parámetro en cada análisis;
9. Aumentar la eficiencia energética;
10. Utilizar reactivos obtenidos de fuentes renovables o reciclados;
11. Eliminar o reemplazar el uso de reactivos tóxicos;
12. Minimizar el riesgo de accidentes.

Partiendo de las técnicas clásicas de extracción (LLE y SPE) se han desarrollado nuevas técnicas de extracción miniaturizadas que podrían ser clasificadas en dos grandes grupos: las técnicas de extracción en las que se emplea un disolvente extractante, la miniaturización de la extracción líquido-líquido (*liquid-phase microextraction*, LPME) o (*liquid-liquid microextraction*, LLME); y las técnicas de extracción en las que se emplea un sólido como fase extractante, la microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME) o la extracción sobre barra agitadora (*stir bar sorptive extraction*, SBSE), entre otras. Otra de las tendencias actuales en la preparación de la muestra consiste en utilizar para la extracción, disolventes no convencionales, así como nuevos materiales sólidos, que sean menos tóxicos y mejoren las limitaciones de los actualmente existentes. De este modo, se han desarrollado aplicaciones basadas en líquidos iónicos (*ionic liquids*, ILs) [3,4] y más recientemente en líquidos iónicos magnéticos (*magnetic ionic liquids*, MILs) [4,5]. También ha habido avances importantes en el desarrollo de adsorbentes cada vez más selectivos como los inmuno-adsorbentes (*immuno-sorbents*, ISPEs) y los polímeros de impresión molecular (*molecular imprinted polymers*, MIPs) [6].

Las técnicas de extracción son un conjunto de técnicas muy importante dentro de la preparación de la muestra. Las mismas se fundamentan en el reparto de los analitos entre dos fases: donadora (muestra)/aceptora (extractante), las cuales pueden ser sólida, líquida o gaseosa. En la presente memoria se describen metodologías analíticas basadas en los principios de la GAC (mencionados anteriormente), en las que se incluyen etapas de preparación de una muestra líquida mediante la extracción de los analitos estudiados a una fase extractante líquida o sólida.

4.2 Técnicas de extracción – evolución histórica

4.2.1 Extracción en fase líquida

La extracción líquido-líquido (LLE) convencional consiste en separar una o más sustancias disueltas en un disolvente mediante su transferencia a otro

disolvente inmiscible, o parcialmente miscible, de manera que los analitos se distribuyan entre ambas fases hasta alcanzar el equilibrio. Generalmente se utiliza un embudo de decantación que se agita durante un tiempo adecuado y que, tras la extracción, se deja reposar produciéndose la separación de las fases en equilibrio por diferencia de densidades (Figura 4.2) [7].

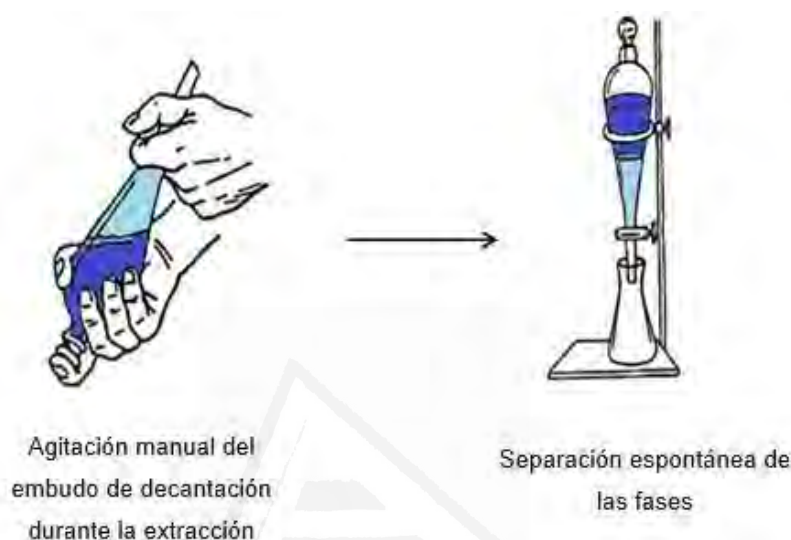
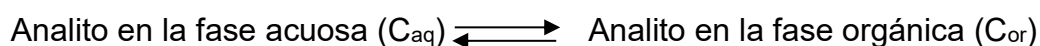


Figura 4.2 Extracción líquido-líquido mediante agitación en embudo de decantación [Fuente: adaptado de la referencia 7].

Durante la LLE hay una distribución del analito entre la fase dadora, normalmente acuosa, y la fase aceptora (también conocida como fase extractante), de naturaleza orgánica, que está gobernada por la Ley de Distribución [7] descrita esquemáticamente como:



En el equilibrio, para una mezcla compuesta por agua + analito + disolvente orgánico de concentraciones fijas y para unas condiciones de temperatura y presión, la relación de concentraciones del analito entre las fases acuosa y orgánica será constante. En el equilibrio, la composición de la fase acuosa y la composición de la fase orgánica extractante en el diagrama de composiciones,

se unen por una recta llamada recta de reparto dentro de la cual debe pertenecer la composición de la mezcla global (composición teórica media del sistema de fases) para que se cumpla el balance de materia. La recta de reparto correspondiente a esta mezcla global tiene un coeficiente de distribución (K_d) constante, cuando las sustancias no reaccionan químicamente en ninguna de las fases, que debe cumplir la relación:

$$K_d = \frac{C_{org}}{C_{aq}}$$

siendo C_{org} la concentración del analito en la fase orgánica y C_{aq} la concentración del analito en la fase acuosa.

Esta técnica de separación ha sido ampliamente utilizada para la extracción de analitos tanto orgánicos como inorgánicos contenidos en muestras líquidas y su posterior determinación por técnicas cromatográficas o atómicas, respectivamente.

Para un conjunto de analitos y una pareja de disolventes, cada analito tendrá un valor del coeficiente de distribución diferente. Es posible saber con antelación si la extracción de una gran cantidad de compuestos orgánicos será eficiente consultando los valores tabulados de los denominados coeficientes de distribución octanol-agua ($(K_d)_{ow}$) ya que estos coeficientes proporcionan una medida de la hidrofobicidad de estos compuestos [7].

La eficiencia de las técnicas de extracción líquido-líquido está influenciada por las siguientes variables [7]:

- (i) **Disolvente de extracción.** La correcta elección del disolvente de extracción permite controlar la selectividad del método. Generalmente se selecciona como fase extractante aquellos disolventes orgánicos que tengan una elevada afinidad por los analitos a separar, que sean totalmente inmiscibles con la fase acuosa y que sean relativamente volátiles para facilitar la posterior eliminación por evaporación del disolvente y así preconcentrar el analito.
- (ii) **pH de la muestra.** El compuesto a extraer puede ser modificado para conseguir la máxima extracción dependiendo del pH de la muestra.

- (iii) Fuerza iónica.** Se puede favorecer la extracción al utilizar una sal (NaCl, Na₂SO₄, etc). Este efecto es denominado “*salting-out*” y en el mismo, el equilibrio es desplazado favoreciendo el paso del analito hacia la fase orgánica. En este caso, la presencia de la sal produce una disminución del coeficiente de actividad del agua por la solvatación de los iones de la sal. Esto produce una “expulsión” del analito hacia la fase aceptora.
- (iv) Relación de fases: entre el volumen de disolvente de extracción y el de muestra acuosa.** La relación de volúmenes modifica la concentración de la mezcla global obtenida, la recta de reparto en el equilibrio y, por lo tanto, se modificará el valor de K_d . Es común emplear un volumen grande de agua y un volumen pequeño de disolvente de extracción para que la recta de reparto resultante proporcione una fase orgánica con la mayor concentración posible de analito.
- (v) Número de extracciones realizadas.** Al realizarse una segunda y tercera extracción, después de “n” extracciones, la concentración final del analito en la fase acuosa disminuirá. Con varias porciones pequeñas de disolvente se logra una extracción más eficiente.

Sin embargo, a pesar de ser una técnica muy útil para la extracción de una amplia gama de compuestos orgánicos, presenta algunas desventajas, entre las que se encuentran [1]:

- Tiempo largo de extracción;
- Uso de una gran cantidad de disolventes orgánicos, muchas veces tóxicos y costosos;
- Pérdida del analito en estudio debido a la posible formación de emulsiones en la interfase;
- Posibles pérdidas de compuestos volátiles en el proceso de evaporación (si es necesario);
- Dificultad para automatizar el proceso de extracción.

En los últimos años se ha comenzado a aplicar los principios de la GAC [2] a las técnicas de extracción. Entre ellos, la miniaturización ocupa un papel destacado, surgiendo las diferentes modalidades de la LPME.

4.2.2 Microextracción en fase líquida

Como técnica miniaturizada de la LLE, la microextracción en fase líquida (*liquid-phase microextraction*, LPME) o microextracción líquido-líquido (*liquid-liquid microextraction*, LLME), extrae y concentra analitos en una fase extractante con un volumen igual o inferior a 100 μL [8].

En 1995, Liu y Dasgupta desarrollaron el primer método de análisis basado en una extracción en gota [9], aunque tradicionalmente se considera que el inicio de la técnica LPME ocurrió en el año 1996 [10]. En el primer trabajo, los analitos (i.e., NH_3 y SO_2) eran extraídos, desde una muestra gaseosa, hacia una gota de 5 μL de una disolución acuosa suspendida al final de un tubo capilar (Figura 4.3) [9].

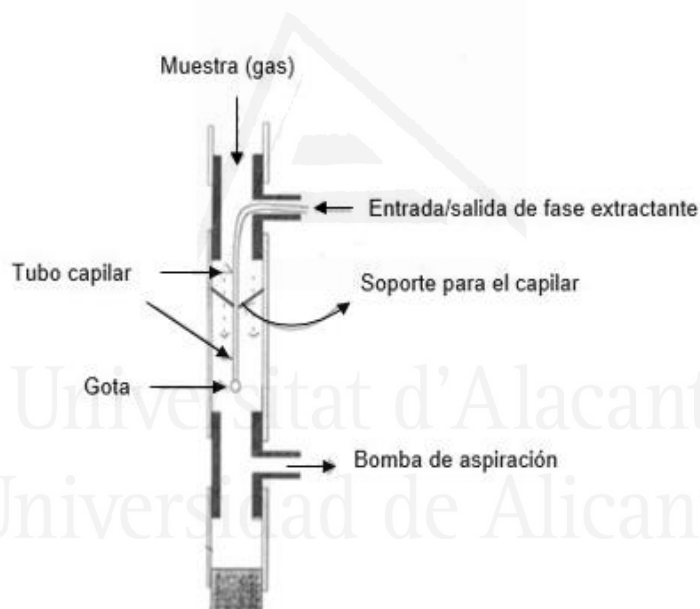


Figura 4.3 Esquema del primer método de microextracción basado en una gota [Fuente: referencia 9].

El segundo sistema de microextracción (Figura 4.4a), desarrollado en 1996 por Liu y Dasgupta, consistía en una gota de 1.3 μL de cloroformo suspendida en el interior de una gota acuosa de mayor tamaño que contenía los analitos y que era continuamente renovada mediante un sistema de bombeo (sistema “drop-in-drop”) [10]. Esta modalidad de microextracción fue utilizada para extraer

pares iónicos formados por dodecilsulfato sódico y azul de metileno. Sin embargo, la precisión de la respuesta analítica del instrumento se veía afectada por el volumen de la gota orgánica. Aun así, este dispositivo tenía ventajas como la automatización del proceso y el empleo de un pequeño volumen de disolvente orgánico [10]. El mismo año, Jeannot y Cantwell propusieron un sistema totalmente distinto donde una gota de 8 μL de n-octano era suspendida al final de una varilla de TeflonTM que estaba sumergida en una muestra acuosa agitada mediante una barra magnética (Figura 4.4b) [11]. Transcurrido el tiempo de la extracción, la varilla era retirada de la disolución de la muestra y, utilizando una microjeringa, se inyectaba 1 μL de la fase orgánica en un cromatógrafo de gases. Aunque era un sistema sensible, de alta precisión y rápido, resultaba difícil mantener la gota suspendida al final de la varilla de TeflonTM, debido a que era necesario llenar el hueco de la varilla con disolvente al inicio del experimento, y recoger la gota al final de éste con la microjeringa [11]. Con este sistema, las etapas de extracción e inyección se realizaban con dispositivos diferentes (i.e., barra de TeflonTM/microjeringa).

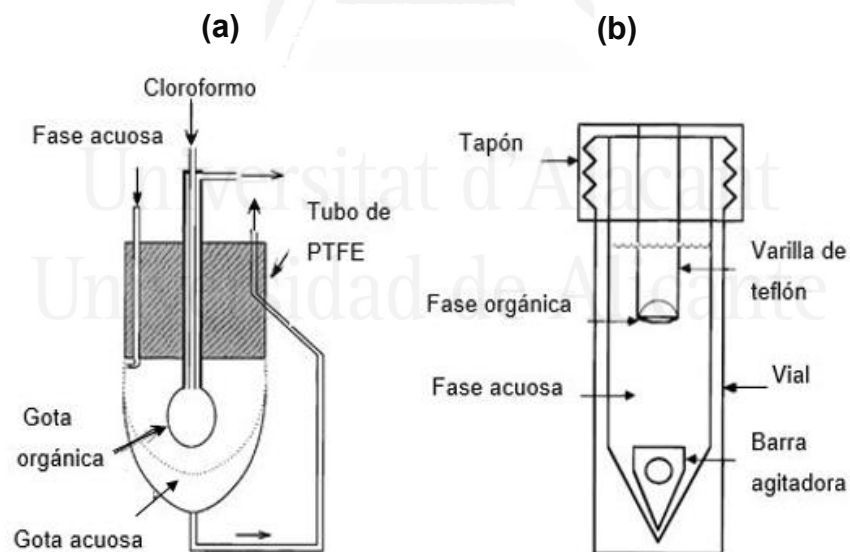


Figura 4.4 Sistemas de microextracción en gota diseñados por (a) Liu y Dasgupta; y (b) Jeannot y Cantwell [Fuente: referencias 10 y 11].

Jeannot y Cantwell presentaron en 1997 una configuración alternativa en la que utilizaban una jeringa de cromatografía para poner en contacto la gota de

disolvente extractante, suspendida en la punta de la aguja, con la muestra [12]. Transcurrido un determinado tiempo, la gota se retrotraía en la jeringa y era inyectada directamente en el sistema cromatográfico para su análisis. De esta forma se integraban las etapas de extracción e inyección. A partir de entonces, surgió la técnica conocida como microextracción en gota en modo de inmersión directa (*direct immersion single-drop microextraction*, DI-SDME) (Figura 4.5) [12].

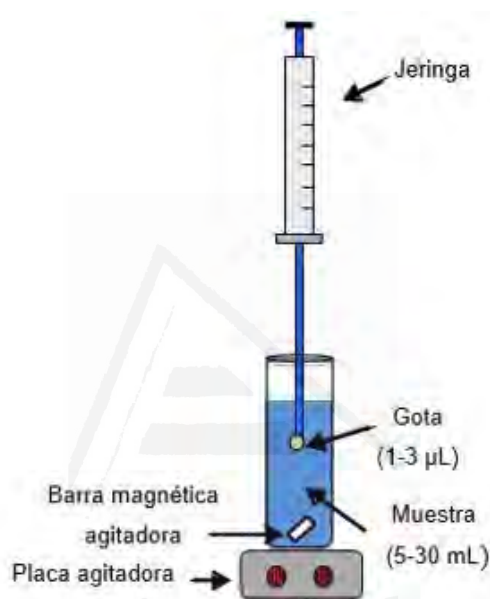


Figura 4.5 Técnica convencional para la microextracción en gota con inmersión directa.

Los diferentes sistemas LPME desarrollados hasta 1997 utilizaban dos fases: la muestra acuosa y el disolvente orgánico extractante. Fue entonces que en 1998, Ma y Cantwell propusieron por primera vez un sistema de extracción de tres fases conocido como microextracción líquido-líquido-líquido (*liquid-liquid-liquid microextraction*, LLLME) (Figura 4.6) [13]. En esta técnica, los analitos son extraídos desde la muestra acuosa a un disolvente orgánico intermedio y, posteriormente, son re-extraídos a una nueva fase acuosa aceptora final. El disolvente orgánico, menos denso que el agua, actúa como interfase entre las dos disoluciones acuosas. En el sistema desarrollado en 1998 por Ma y Cantwell, la fase orgánica consistía en 40-80 µL de n-octano sobre 0.5-1.0 mL de muestra

acuosa a pH 13, que estaban contenidos en un vial de microextracción de 1-2 mL de volumen y separados por un anillo pequeño de Teflon™. La fase aceptora final consistía en 200-100 μL de una disolución acuosa de NaH_2PO_4 (pH=2.1) situada encima del anillo de Teflon™ y de la fase orgánica. Los analitos (mefentermina y 2-feniletilamina) eran recogidos en la fase acuosa aceptora después de 30 min de agitación (2000 rpm). Finalmente, una alícuota de la fase aceptora era inyectada en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución [13].



Figura 4.6 Diagrama esquemático del sistema de microextracción líquido-líquido [Fuente: adaptada de la referencia 13].

La técnica LLLME es adecuada para la extracción de compuestos orgánicos ionizables con propiedades ácido-base. El pH de ambas disoluciones acuosas es un factor crítico en este tipo de microextracción. Por ejemplo, para la extracción de especies básicas, el pH de la muestra debe ser ajustado por encima del pK_a de los analitos con el fin de asegurar la supresión de su ionización, disminuir su solubilidad en la fase acuosa y facilitar así su transferencia al disolvente orgánico. Al mismo tiempo, la fase aceptora es acidificada ($\text{pH} < \text{pK}_a$) de manera que los analitos son ionizados en la interfase disolvente orgánico/fase acuosa aceptora, aumentando su solubilidad en esta última. En el caso de la extracción de especies ácidas el pH de la muestra debe ajustarse por debajo del pK_a de los analitos, utilizándose una fase aceptora basificada ($\text{pH} > \text{pK}_a$) [13].

Debido a los problemas de inestabilidad y riesgo de desprendimiento de la gota durante la agitación de la muestra de la punta de la jeringa, en 1999,

Pedersen-Bjergaard y Rasmussen propusieron la técnica de microextracción en fibra hueca (*hollow fiber liquid-phase microextraction*, HF-LPME). Esta modalidad de microextracción consistía en impregnar los poros de una fibra hueca con un disolvente orgánico formando una membrana líquida soportada (*supported liquid membrane*, SLM) [14].

Existen dos modalidades principales de la HF-LPME, en dos o tres fases (Figura 4.7). En la modalidad de dos fases (Figura 4.7a), los analitos son extraídos de la muestra acuosa con un disolvente orgánico inmiscible con el agua que está inmovilizado en los poros de una fibra hueca mientras que el interior de la fibra se llena con otra porción del mismo disolvente orgánico (fase aceptora). La extracción está basada en la difusión pasiva y es gobernada por las constantes de distribución de los analitos (K_d). Finalizada la extracción, un volumen del disolvente orgánico conteniendo los analitos es inyectado en un sistema de separación/detección. Por otro lado, la HF-LPME de tres fases (Figura 4.7b) consiste en la extracción de los analitos de la muestra acuosa a través de una fina capa de disolvente orgánico inmiscible con el agua que se encuentra inmovilizado en los poros de la fibra hueca. Dentro del hueco de la fibra se introduce una segunda fase acuosa aceptora. También, como en la modalidad anterior, los analitos son extraídos por difusión pasiva, que es gobernada por sus K_d . En el caso de analitos básicos, la muestra debe ser alcalina y los analitos son recogidos en una disolución acuosa ácida que se concentra dentro del hueco de la fibra. Para analitos ácidos, la muestra debe tener un pH ácido y la disolución aceptora un pH alcalino [14].

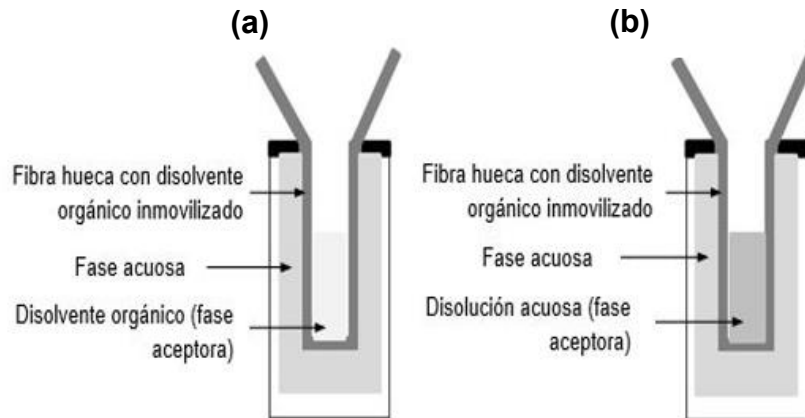


Figura 4.7 Esquemas de la técnica de microextracción en fibra hueca. Modalidades de **(a)** dos fases y **(b)** tres fases [Fuente: adaptada de la referencia 14].

Liu y Lee introdujeron en el año 2000 una técnica de microextracción líquido-líquido en flujo continuo (*continuous-flow microextraction, CFME*) (Figura 4.8) [15]. La CFME se llevó a cabo en una pequeña cámara de vidrio de 0.5 mL. Un tubo de polieterecetona (PEEK) fue introducido en la cámara de vidrio para la entrada de la muestra acuosa. Con una jeringa de inyección de cromatografía líquida de alta eficiencia (*high-performance liquid chromatography, HPLC*) se inyectaron 1-5 μL de disolvente orgánico. A la salida del tubo de PEEK se formaba una gota de disolvente orgánico que se mantenía retenida mientras la muestra acuosa fluía a través de la gota con lo que se favorecía la extracción. Terminada la extracción, la gota era introducida en la jeringa e inyectada en el cromatógrafo de gases [15]. En esta modalidad de extracción, la misma jeringa es utilizada para sostener la fase extractante durante la extracción e inyectarla posteriormente en el sistema de separación/detección, lo que reduce el tiempo y facilita el proceso de extracción [15].

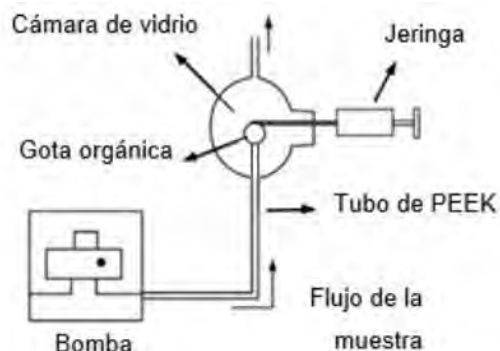


Figura 4.8 Sistema de microextracción en flujo continuo [Fuente: adaptada de la referencia 15].

Hasta aquí, en las técnicas LPME presentadas había un contacto directo entre la muestra y la fase extractante bien a través de una gota sumergida o bien de una membrana. Sin embargo, los sistemas basados en gotas sumergidas presentan problemas de solubilidad de las mismas o inestabilidad durante la agitación de la muestra. Además, algunos componentes de la matriz pueden pasar a la fase aceptora. Con la finalidad de solucionar estos inconvenientes, dos grupos de investigación propusieron en el año 2001, la microextracción en gota en la modalidad de espacio de cabeza (*headspace single-drop microextraction*, HS-SDME). En la misma, la gota de disolvente extractante es expuesta en el espacio de cabeza situado por encima de la muestra evitando (Figura 4.9), de esta forma, el contacto directo entre las dos fases [16,17]. Es un procedimiento idéntico al de microextracción en gota sumergida, con la diferencia de que la gota de extractante no entra en contacto directo con la muestra. Los analitos pasan desde la matriz de la muestra hasta el espacio de cabeza y después a la gota (fase extractante) (Figura 4.9). Esta modalidad de la técnica permite determinar analitos volátiles y semivolátiles en matrices más complejas [16,17].

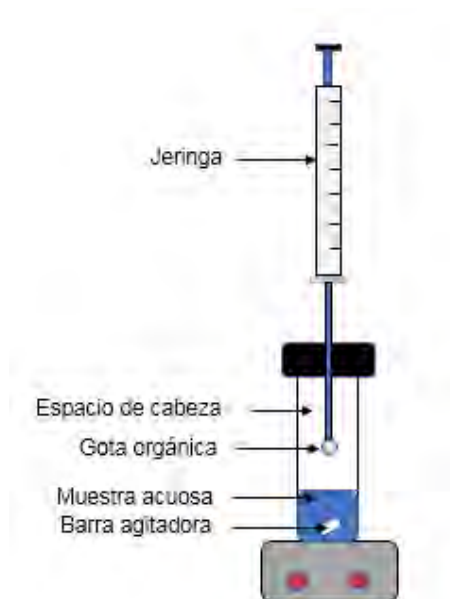


Figura 4.9 Esquema de la técnica de microextracción en gota, en la modalidad de espacio de cabeza.

Siguiendo la evolución de las técnicas de microextracción en fase líquida, en el año 2002 surgió la extracción con disolvente asistida por membrana (*membrane-assisted solvent extraction*, MASE) [18]. En esta modalidad de extracción la fase orgánica está separada de la fase acuosa por una membrana de polietileno de baja densidad (*low density polyethylene*, LDPE) permeable al analito (Figura 4.10). La fase acuosa conteniendo los analitos era introducida en un vial mientras que la fase orgánica era introducida dentro de la membrana. Una agitación vigorosa favorecía el paso de los analitos a través de la membrana. Tras la extracción, un volumen de extractante era inyectado en un cromatógrafo de gases [18].

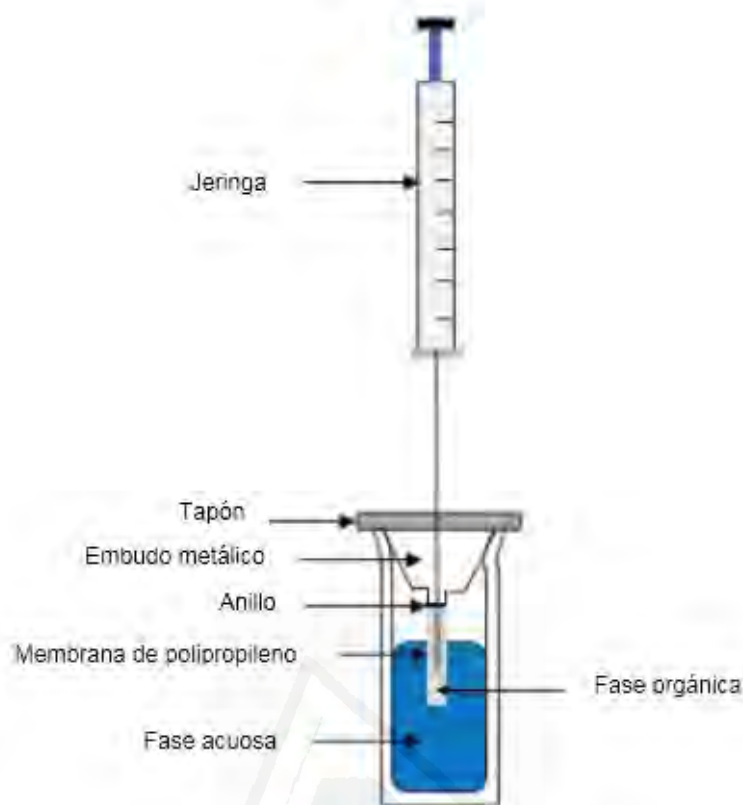


Figura 4.10 Representación de la técnica extracción con disolvente asistida por membrana.

La técnica HF-LPME [14], desarrollada en 1999, fue objeto de varias modificaciones posteriores entre los años 2004 y 2006 con el objetivo de mejorar su manejo y la eficiencia de la extracción. De este modo surgió la microextracción en barra con disolvente (*solvent bar microextraction*, SBME) [19] y, en el año 2006, la técnica de extracción con electromembrana (*electromembrane extraction*, EME) [20]. En la SBME, un pequeño trozo de una fibra hueca rellena con la fase extractante (disolvente orgánico) es sellada por ambos extremos y sumergida directamente en la muestra sin utilizar ningún tipo de soporte (e.g., jeringa) (Figura 4.11). La muestra acuosa es agitada continuamente permitiendo que la fibra se mueva libremente en la muestra, mejorando la transferencia de materia entre la muestra y la fase extractante, lo que proporciona mayores factores de enriquecimiento que las configuraciones mostradas en la Figura 4.7. Posteriormente, la fibra se extrae de la muestra, se corta un extremo de la misma y se retira la fase extractante con una jeringa para ser finalmente analizada [19].

Por otro lado, la técnica EME permite extraer sustancias cargadas desde un pequeño volumen de muestra, a través de una fina membrana de disolvente orgánico inmovilizado en la pared de una fibra hueca, mediante la imposición de una diferencia de potencial entre la fase dadora (acuosa) y aceptora (orgánica). Esta diferencia de potencial genera una migración electrocinética que favorece el transporte del analito (Figura 4.12) [20].

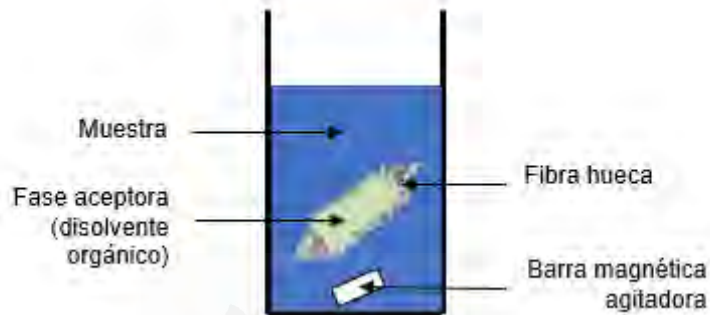


Figura 4.11 Microextracción en barra con disolvente [Fuente: adaptada de la referencia 19].

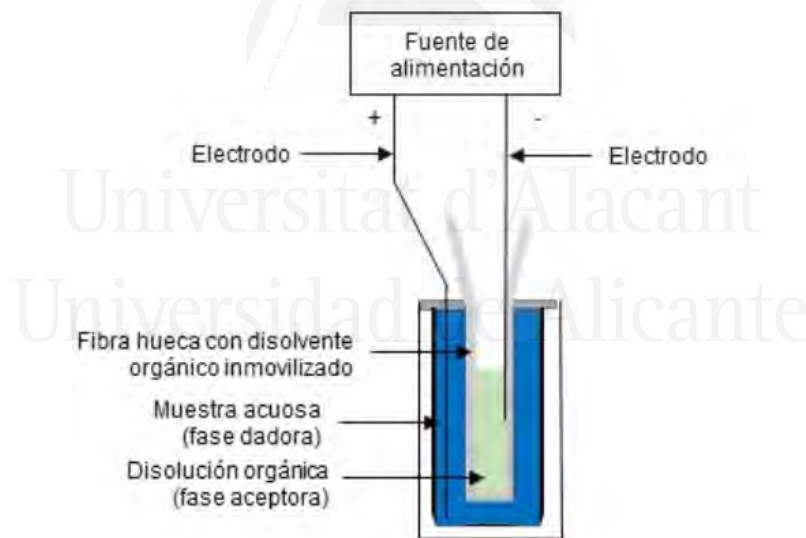


Figura 4.12 Diagrama esquemático de la extracción con electromembrana [Fuente: adaptada de la referencia 20].

Todas las técnicas LPME descritas hasta el momento, utilizan diferentes tipos de soportes (i.e., jeringa, fibra hueca, tubo capilar, etc...) para sostener la fase extractante durante la extracción. En el año 2006, dos nuevas técnicas de extracción fueron presentadas. Sin la presencia de ningún soporte y con la fase extractante dispuesta directamente en el interior de la muestra, la microextracción líquido-líquido dispersiva (*dispersive liquid-liquid microextraction*, DLLME) [21] y la microextracción en gota directamente suspendida (*directly suspended droplet microextraction*, DSDME) [22] entraron en la historia de las técnicas miniaturizadas de la LLE. La DLLME, introducida por Rezaee y col. [21], consistía en mezclar 8.0 μL de tetracloroetano como disolvente extractante con 1.0 mL de acetona como disolvente dispersante, que posee alta miscibilidad tanto con el disolvente extractante como con la fase acuosa. Tal mezcla era inyectada rápidamente con una jeringa en una muestra acuosa de 5.0 mL conteniendo los analitos de interés. Tras la mezcla de fases se obtenía una disolución turbia ya que el disolvente extractante se encontraba en forma de una gran cantidad de gotas muy pequeñas dispersas en la fase acuosa. La muestra era centrifugada haciendo que el disolvente extractante se depositase en el fondo cónico del tubo de extracción. Al final, una alícuota del disolvente extractante era inyectada en un cromatógrafo de gases (Figura 4.13) [21]. Por otra parte, en la DSDME, presentada por Yangcheng y col. [22], la fase extractante conserva su integridad en forma de gota flotando sobre la superficie de la muestra acuosa sometida a agitación (Figura 4.14) [22]. Esta modalidad de extracción se realiza depositando una microgota (10 μL) de disolvente orgánico directamente sobre la superficie de la muestra. La agitación de la muestra mediante una barra magnética agitadora favorece la extracción. Finalmente, las fases orgánica y acuosa se separan por centrifugación, recogiendo la gota del disolvente extractante que contiene los analitos (microextracto) con una jeringa de inyección de cromatografía para su análisis (Figura 4.14) [22]. Hay una serie de ventajas al utilizar la técnica DSDME: (i) instrumentación sencilla; (ii) la gota se mueve libremente al ser agitada, con lo que no hay problemas de estabilidad de la gota; (iii) se alcanza el equilibrio con mayor rapidez, disminuyendo el tiempo de extracción; (iv) facilidad de operación; (v) bajo coste. Sin embargo, presenta

la desventaja del tamaño de la barra magnética agitadora que podría afectar a la forma de la gota, dificultando su retirada después de la extracción. Debido a esto, tres años más tarde se propuso la rotación directa del vial que contiene la muestra como forma de eliminar la barra magnética agitadora. De esta forma se obtenían gotas más estables y reproducibles proporcionando una mayor precisión al método [23].

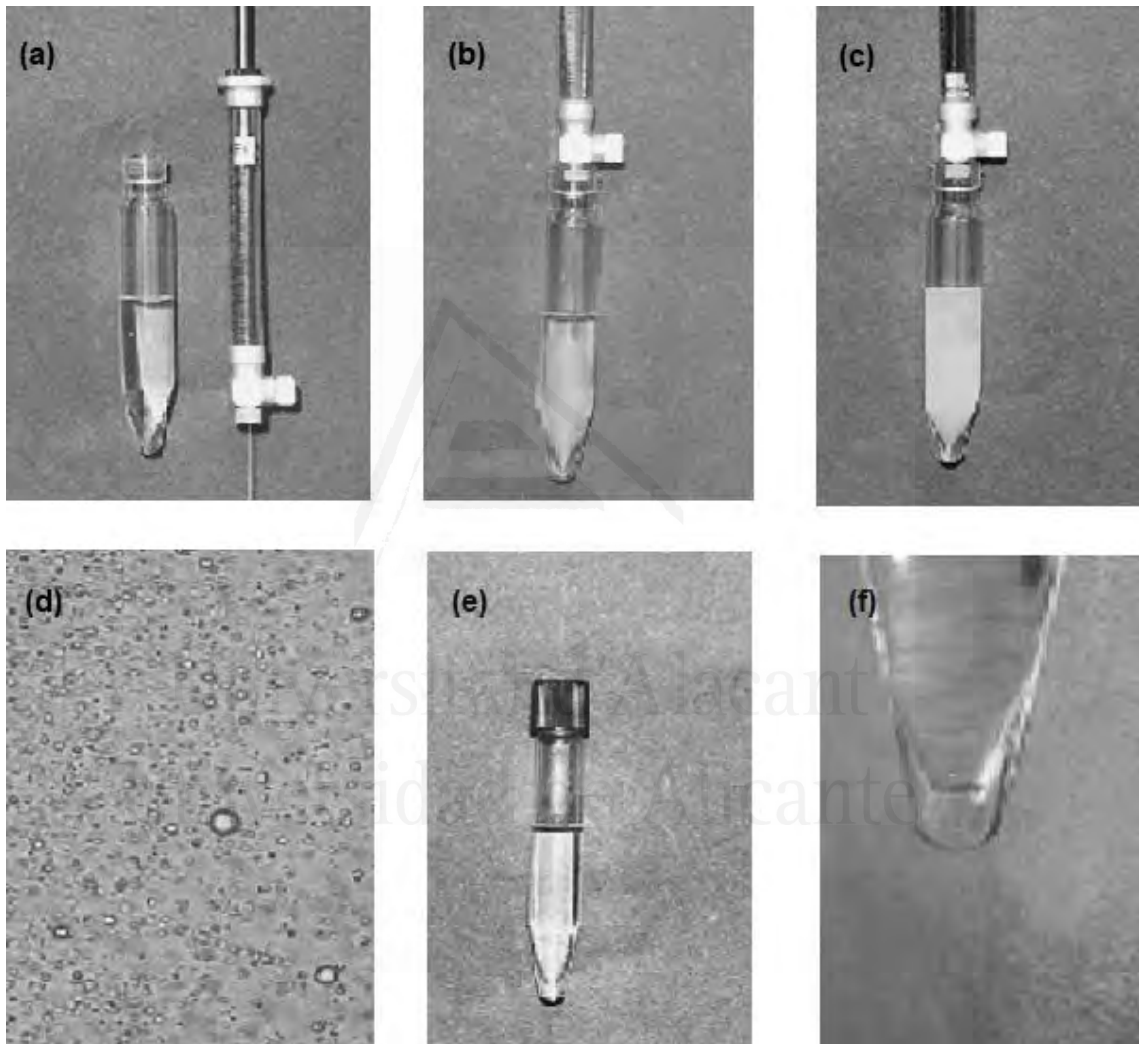


Figura 4.13 Fotografías de los diferentes pasos de la DLLME: **(a)** muestra acuosa antes de la inyección de la mezcla de disolvente dispersante (acetona) y disolvente extractante (C_2Cl_4), **(b)** inicio de introducción de la mezcla en muestra, **(c)** introducción, **(d)** imagen de microscopía óptica (x1000) donde se aprecia el disolvente C_2Cl_4 formando multitud de microgotas, **(e)** después de la

centrifugación y (f) ampliación de la imagen del disolvente extractante conteniendo los analitos depositado en el fondo del tubo [Fuente: referencia 21].

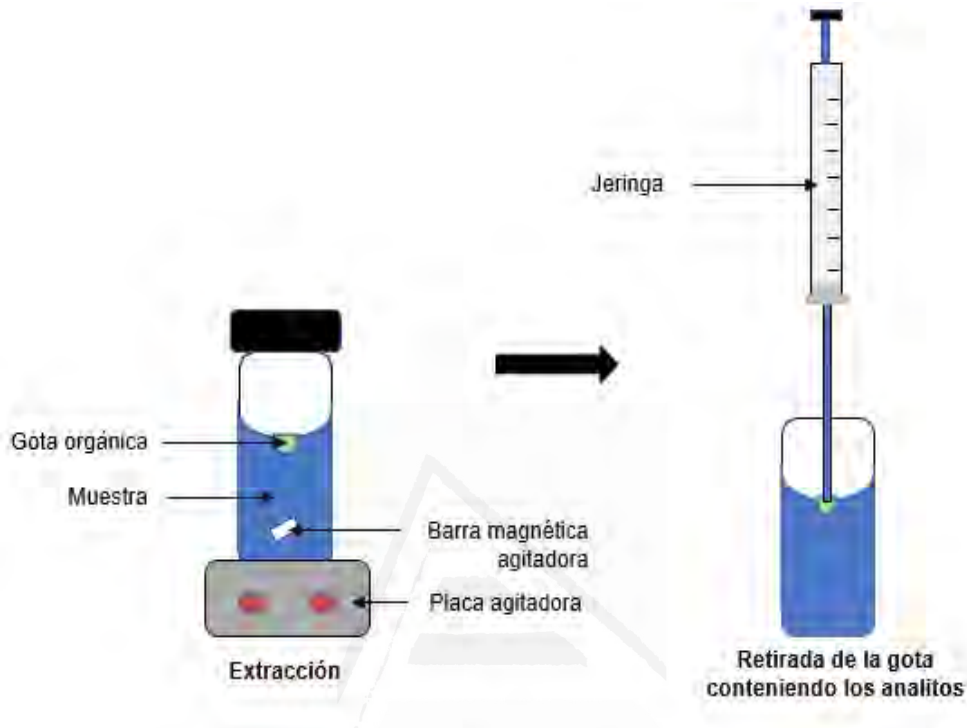


Figura 4.14 Esquema del procedimiento de microextracción en gota directamente suspendida.

Sin embargo, retirar la gota tras la DSDME resultaba difícil y requería cierto cuidado y habilidad por parte del operador. En busca de una solución para este inconveniente, en 2007 se desarrolló un nuevo modo de coger la gota, dando lugar a la microextracción con solidificación de la gota orgánica flotante (*solidification of the floating organic drop microextraction*, SFODME) [24]. Esta técnica de microextracción consiste en introducir, tras la extracción, el vial donde se ha producido la extracción en un baño de hielo. De esta manera, la gota rápidamente se congela (en aproximadamente 5 minutos) y puede ser separada de la muestra fácilmente. Posteriormente, la gota es fundida y una porción de esta fase orgánica es inyectada mediante una jeringa en el sistema de separación/detección. Los disolventes orgánicos utilizados en SFODME han de

poseer un punto de fusión cercano a la temperatura ambiente (entre 10 y 30 °C), además de una baja solubilidad en agua y baja volatilidad [24].

En la Tabla 4.1 se resumen cronológicamente las principales técnicas de LPME descritas en este apartado. Posteriormente, numerosas modificaciones han sido propuestas para todas estas técnicas. Por ejemplo, se han propuesto fases extractantes alternativas a los disolventes orgánicos tradicionales (e.g., líquidos iónicos, surfactantes, etc...), se han utilizado distintos modos de energía o radiación para calentar o dispersar las fases (e.g., microondas, ultrasonidos, vórtex, etc...), se han desarrollado novedosas asociaciones con sistemas de detección y algunos procedimientos han sido automatizados [8,25]. En base a las modificaciones realizadas, los investigadores han sugerido nuevos términos y acrónimos para nombrar las nuevas técnicas que proponían. Esto ha creado una cierta confusión ya que se han propuesto más de 100 acrónimos diferentes para describir las diversas técnicas de LPME propuestas [25]. Una publicación reciente ha realizado duras críticas sobre la falta de consenso dentro de la comunidad científica que dificulta enormemente la búsqueda bibliográfica del investigador interesado en un tema concreto [8].

Tabla 4.1 Resumen cronológico de las principales técnicas de microextracción en fase líquida.

Año	Autores	Técnica desarrollada	Ref.
1995	Liu y Dasgupta	Método en el que un flujo de gas pasa alrededor de una gota de líquido	[9]
1996	Liu y Dasgupta	Sistema de extracción con disolvente “drop-in-drop”	[10]
1996	Jeannot y Cantwell	Técnica donde una gota es suspendida al final de una varilla de teflón	[11]
1997	Jeannot y Cantwell	Método que utiliza una jeringa de cromatografía para poner en contacto la gota de disolvente con la muestra (DI-SDME)	[12]
1998	Ma y Cantwell	Sistema de tres fases que posee un soporte de membrana líquida y una gota acuosa de disolución aceptora (LLLME)	[13]
1999	Pedersen-Bjergaard y Rasmussen	El disolvente extractante es introducido en una fibra hueca porosa (HF-LPME)	[14]
2000	Liu y Lee	Técnica de microextracción en flujo continuo (CFME)	[15]
2001	Theis y col.	Microextracción en gota en el modo de espacio de cabeza (HS-SDME)	[16]
2001	Tankeviciute y col.		[17]
2002	Hauser y col.	Método que utiliza una membrana de polietileno de baja densidad para realizar la separación entre la fase acuosa y orgánica (MASE)	[18]
2004	Jiang y Lee	Microextracción en barra con disolvente donde un pequeño trozo de fibra hueca rellena con la fase extractante es sumergida directamente en la muestra (SBME)	[19]
2006	Pedersen y Rasmussen	Técnica con electromembrana combinando la extracción en fibra hueca con los principios de la electroextracción (EME)	[20]

2006	Rezaee y col.	Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)	[21]
2006	Yangcheng y col.	Método cuya fase extractante, en forma de gota, se mantiene flotando sobre la superficie de la muestra acuosa sometida a agitación (DSDME)	[22]
2007	Zanjani y col.	Método en el cual la gota de extractante es solidificada (microextracción con solidificación de la gota orgánica flotante, SFODME)	[24]

4.2.3 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE) emplea sorbentes sólidos dispuestos en diferentes formatos, en discos (membranas) o en cartuchos (tubos) por donde circula la muestra líquida o gaseosa [7]. Los sorbentes utilizados en SPE poseen propiedades de adsorción y/o absorción, siendo capaces de retener analitos en su superficie (adsorción) o retenerlos por difusión en el interior de sus poros (absorción) [7]. También entran en esta categoría, el uso de materiales sorbentes sólidos recubiertos de pequeñas películas de material líquido viscoso [7].

Las etapas principales que conlleva la técnica SPE convencional son cuatro (Figura 4.15): (i) acondicionamiento del disco o cartucho; (ii) retención de los analitos y/o especies interferentes mediante el paso de la muestra líquida; (iii) lavado de la columna, donde normalmente se eluyen las sustancias interferentes mientras los analitos permanecen en el sorbente; y (iv) finalmente, elución de los analitos. Para esta última etapa se suele utilizar un disolvente diferente al utilizado en la etapa de elución de los interferentes. Se obtiene, de esta forma, los analitos concentrados y purificados (Figura 4.15). A fin de facilitar la elución (desorción) se puede utilizar la gravedad, una fuente de vacío, la presión o la centrifugación [7].

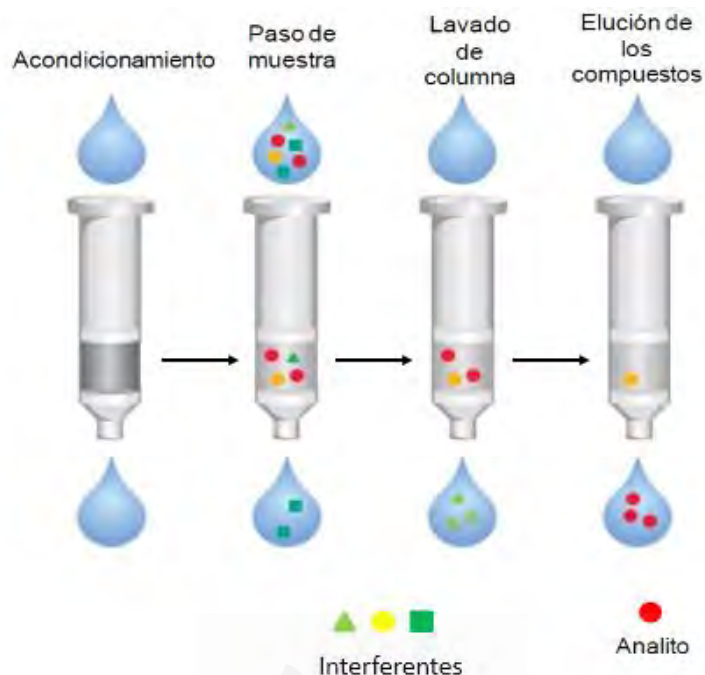


Figura 4.15 Etapas de una SPE general empleando cartuchos [Fuente: referencia 26].

Existe una gran variedad de materiales sorbentes disponibles comercialmente. Han sido empleados como materiales sorbentes, el carbón activado, alúmina, gel de sílice, silicato de magnesio (Florisil), fases químicamente enlazadas, polímeros, etc. En los últimos años se ha desarrollado nuevas fases extractantes (sorbentes sólidos) con el objetivo de resolver problemas relacionados con la extracción de compuestos altamente polares y extracciones con muestras muy complejas (con gran cantidad de especies interferentes). Entre estas nuevas fases sorbentes se encuentran los materiales sólidos recubiertos de pequeñas películas de un material líquido (e.g., sílica recubierta de surfactante) [27].

Aunque la técnica SPE requiere una instrumentación económica, sencilla y un bajo consumo de disolventes, presenta, en algunos casos, efectos de matriz y/o efectos de memoria. El efecto de matriz ocurre cuando un componente de la matriz impide o dificulta la interacción entre el analito y el sorbente, proporcionando valores bajos de las recuperaciones de los analitos de interés. Este efecto es más común en la extracción con matrices biológicas. También

puede haber obstrucción de los canales del disco o del cartucho por los componentes oleosos y/o sólidos, lo que dificulta la retención de los analitos. El efecto de memoria, difícil de eliminar incluso a altas temperaturas, ocurre debido a la presencia de analitos retenidos en el sorbente de la SPE en análisis anteriores, que son desorbidos paulatinamente en análisis posteriores y son detectados por el sistema analítico, incrementando la señal obtenida [28].

La SPE se puede emplearse en fase reversa, fase normal e intercambio iónico. En el caso de las fases reversas (C8, C18 y CN), la retención de analitos ocurre debido a las interacciones del tipo van der Waals no polares entre enlaces C-H del analito con grupos funcionales de la superficie de la sílice modificada. Las principales interacciones en el modo normal son entre grupos polares del analito y la fase extractante por intermedio de puentes de hidrógeno, interacciones π - π y dipolo-dipolo. En el modo de intercambio iónico las interacciones electrostáticas son las responsables de la extracción selectiva del analito [29].

Por todo eso, la SPE presenta como ventaja principal la gran variedad de sorbentes disponibles que pueden ser empleados con varios tipos de matrices y para una amplia gama de compuestos (Tabla 4.2) [29].

Tabla 4.2 Modos de operación de la técnica SPE y ejemplos de aplicaciones [Fuente: referencia 29].

Modo	Analitos	Matrices	Sorbentes	Disolventes de elución
Fase Reversa	Apolares: drogas, péptidos, pesticidas	Acuosas: agua, tampones, fluidos biológicos	Octadecilsilano Octilsilano Metilsilano Ciclohexilsilano	Metanol, acetonitrilo, cloroformo, hexano, acetona, etc.
Fase Normal	Polares: vitaminas, carbohidratos, fenoles	Aceitosas: aceites, lípidos. Hexano Cloroformo	Florisil Alúmina Sílica Aminopropilsilano	Metanol, isopropanol, acetona.
Intercambio Iónico	Catiónicos: bases iónicas o ionizables (catecolaminas, herbicidas, fármacos)	Acuosas: agua, tampones, ácidos, fluidos biológicos	Carboximetilsilano Sulfonilpropilsilano	Tampones básicos o con alta fuerza iónica.
	Aniónicos: ácidos iónicos o ionizables (ácidos orgánicos, vitaminas, grasos, fosfatos)	Acuosas: agua, tampones básicos, fluidos biológicos	Dietilaminopropilsilano Trimetilaminopropilsilano	Tampones ácidos o con alta fuerza iónica.

Los métodos de extracción convencionales, como es el caso de la SPE, requieren el empleo de disolventes tóxicos e inflamables, y en ocasiones grandes volúmenes de éstos. Además, la manipulación de la muestra y su laboriosidad provoca pérdidas significativas de los analitos de interés. A fin de eliminar, o al menos reducir, estas dificultades, en los últimos años han sido desarrolladas nuevas alternativas de extracción que permiten una mayor interacción entre la fase sólida y la muestra, así como un mejor manejo de la fase extractante, con

la finalidad de incrementar el rendimiento de la extracción, así como la exactitud de esta.

4.2.4 Microextracción en fase sólida

En el año 1990 Arthur y Pawliszyn propusieron el concepto de la microextracción en fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME) como una alternativa a los métodos convencionales de extracción en fase sólida [30]. Esta técnica miniaturiza la extracción en fase sólida utilizando una fibra recubierta de una pequeña cantidad de sorbente líquido, eliminando el uso de grandes cantidades de disolvente/sorbente. La modalidad SPME en fibra presenta numerosas ventajas frente a la técnica de extracción en fase sólida convencional ya que se emplea un menor volumen de muestra, no es necesaria la concentración final del extracto mediante evaporación, con lo que no se producen pérdidas de los compuestos de interés, y se obtienen mejores límites de detección que con la SPE convencional [30].

La SPME en fibra emplea una fibra de sílice fundida, químicamente inerte y estable a altas temperaturas, recubierta con una película fina de polímero que puede ser polidimetilsiloxano (PDMS), resultando en una fibra apolar; polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB), carboxen-polidimetilsiloxano (carboxen-PDMS) o divinilbenceno-carboxen-polidimetilsiloxano (DVB-carboxen-PDMS), obteniéndose fibras semipolares; y poliacrilato (PA), carbowax-divinilbenceno (CW-DVB) o carbowax-resina templada (CW-TPR) para obtener fibras polares. La fibra, sílice recubierta con la película sorbente (fase extractante), se encuentra dentro de la aguja de una jeringa (Figura 4.16). En el procedimiento de extracción, la aguja perfora el septum del vial de la muestra y la fibra, que estaba retraída en la aguja, es expuesta a la muestra. Finalizada la extracción, la fibra es nuevamente retraída dentro de la aguja. Posteriormente, la aguja es introducida en el sistema de separación/detección [31].

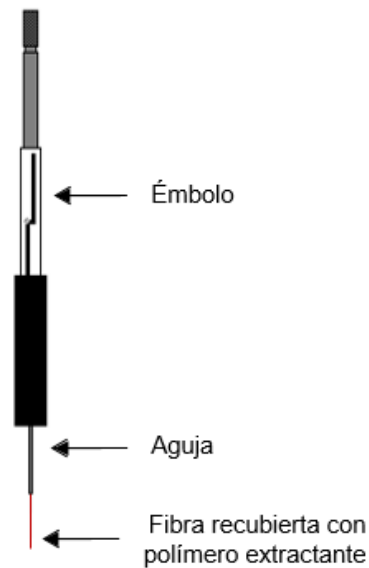


Figura 4.16 Dispositivo utilizado para realizar la microextracción en fase sólida en fibra [Fuente: adaptada de la referencia 31].

La SPME en fibra se puede llevar a cabo en tres modalidades (Figura 4.17) [1]:

- a) **Extracción directa:** la fibra es expuesta fuera de la aguja y directamente introducida en la muestra líquida, la cual es sometida a agitación por un tiempo determinado (2-15 min); transcurrido el tiempo de extracción, la fibra es retraída dentro de la aguja. Este modo de extracción es adecuado para la separación de analitos de baja volatilidad. Además, la muestra no debe contener material particulado ni burbujas.
- b) **Extracción en espacio de cabeza:** la muestra es calentada para evaporar los componentes volátiles, siendo éstos adsorbidos en la fibra. Se utiliza específicamente para la separación de compuestos de media y alta volatilidad.
- c) **Extracción con membrana:** en el caso de muestras muy complejas o sucias se recubre la fibra con una membrana para protegerla antes de su inmersión en la muestra.

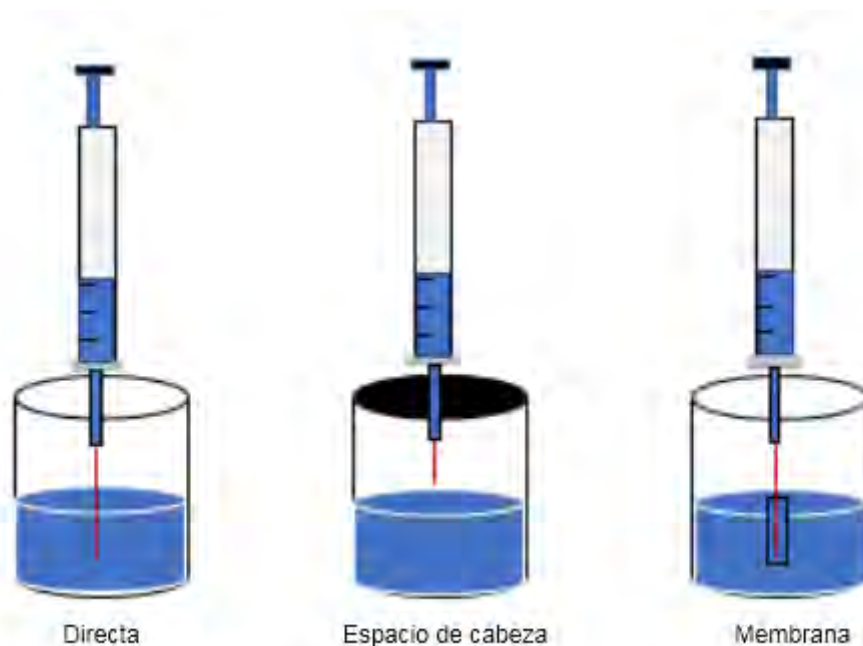


Figura 4.17 Modos de SPME [Fuente: adaptada de la referencia 1].

En todas las modalidades anteriores, los analitos presentes en la fibra son finalmente bien desorbidos térmicamente por introducción de la fibra en el inyector caliente de un cromatógrafo de gases o bien eluidos con un disolvente adecuado del cual se introduce un pequeño volumen en un cromatógrafo de líquidos [1].

Son muchas las ventajas que presenta la técnica SPME en fibra, pero también presenta algunos inconvenientes, entre los que se encuentran: (i) la cantidad limitada de sorbente sólido y, por tanto, de recubrimiento líquido lo que afecta directamente a la cantidad de analito extraído; (ii) la fragilidad de las fibras; (iii) los posibles efectos de memoria a la hora de reutilizarla; (iv) el elevado coste de las fibras; y, (v) la dificultad del acoplamiento on-line con otras técnicas instrumentales como la cromatografía de líquidos (*liquid chromatography*, LC). Debido a estos problemas, se han desarrollado nuevas modalidades de SPE miniaturizadas.

Eisert y Pawliszyn presentaron en 1997 la SPME en tubo (*in-tube solid-phase microextraction*) [32]. Esta técnica cuenta con dos modalidades de extracción. En una modalidad, la muestra fluye en una sola dirección a través de un tubo capilar abierto por sus dos extremos. Las paredes internas están recubiertas con

un material sorbente (modo flujo continuo) (Figura 4.18a). En la segunda modalidad, la muestra es repetidamente aspirada y expulsada de un tubo capilar cerrado por uno de sus extremos (modo ciclo aspirar/expulsar), quedando los analitos retenidos en el material sorbente que impregna el interior del tubo (Figura 4.18b). Finalizada la extracción, los analitos son eluidos con un disolvente adecuado [33]. Aunque la SPME en tubo fue originalmente propuesta para su acoplamiento on-line con la LC [32], posteriormente ha sido utilizada junto a otras técnicas de separación como la cromatografía de gases (*gas chromatography*, GC) o la electroforesis capilar [34]. También se ha propuesto modificaciones en las técnicas SPME en tubo, como la fijación de nanopartículas magnéticas sobre la pared interna del tubo capilar de extracción, lo cual permite utilizar un campo magnético externo en la etapa de extracción. Las nanopartículas magnéticas son magnetizadas cuando se aplica un campo magnético, lo que afecta la partición de los analitos entre la muestra líquida y la fase sólida. Los analitos diamagnéticos (con propiedad de repulsión a los campos magnéticos) son atrapados en el área donde las fuerzas magnéticas son mínimas, quedando adsorbidos a la pared magnética del tubo los analitos con propiedad de atracción a los campos magnéticos [34]. La técnica de extracción SPME en tubo ha sido extensamente utilizada para la preconcentración de analitos de interés en diversas áreas. Por lo tanto, han sido muchas las modificaciones en su diseño desde su aparición en 1997. En los últimos años, el desarrollo de nuevos recubrimientos (material sorbente) para el tubo capilar es una de las áreas de mayor actividad [34]. Entre ellos se encuentra el uso de grafeno multicapa [35], así como polianilina, polietilen glicol y compuesto de polidimetilsiloxano [36].

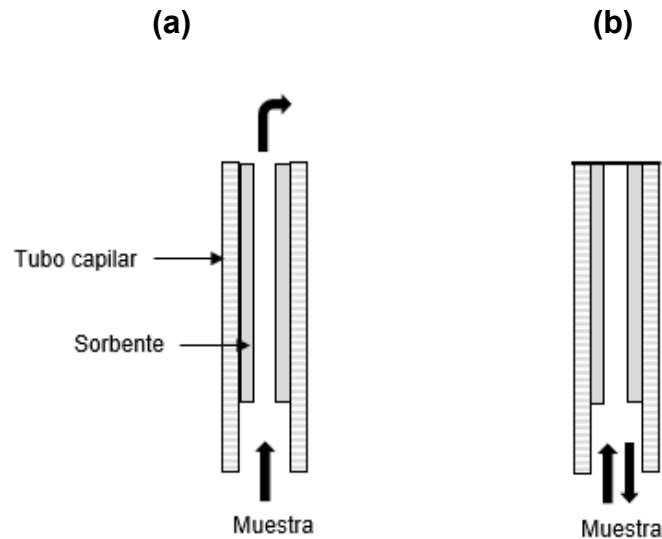


Figura 4.18 Modalidades de microextracción en fase sólida en tubo: **(a)** modo flujo continuo o dinámico, y; **(b)** modo ciclo aspirar/expulsar o pasivo [Fuente: adaptada de la referencia 33].

Una limitación de la técnica SPME en tubo es el bloqueo del capilar cuando la muestra a tratar posee material particulado en suspensión. En estos casos es necesario filtrar la muestra antes de someterla al proceso de extracción.

4.2.5 Extracción por sorción en barra agitadora

La extracción por sorción en barra agitadora (*stir bar sorptive extraction*, SBSE) fue introducida en el año de 1999 por Baltussen y col. [37] para solucionar las limitaciones e inconvenientes de las técnicas introducidas anteriormente, principalmente la cantidad reducida de fase extractante que se utilizaba en SPME en fibra. En su configuración original, la técnica consiste en una barra agitadora magnética recubierta con PDMS. Sin embargo, en esta técnica se dispone de una mayor superficie del soporte lo cual permite utilizar un mayor volumen del polímero sorbente (Figura 4.19) [38]. La barra agitadora se introduce en la muestra, normalmente acuosa, y la extracción se lleva a cabo durante la agitación. Después de un tiempo prefijado de agitación, la barra se extrae de la muestra y se introduce en el inyector de un cromatógrafo de gases provisto de desorción térmica. Los analitos también pueden ser desorbidos mediante la inmersión de la barra en un disolvente adecuado. Es posible determinar compuestos presentes no solo en muestras acuosas sino también en muestras

sólidas utilizando un muestreo en el espacio de cabeza, y gaseosas [39]. Esta técnica mejora los límites de detección frente a la técnica SPME en fibra y proporciona buena repetibilidad. Además, con la técnica SBSE se alcanzan altos factores de preconcentración lo que permite analizar pequeños volúmenes de muestras. Sin embargo, el tiempo de extracción puede ser muy largo, además de presentar problemas de efecto de memoria y efectos de matriz [40,41].



Figura 4.19 Barra agitadora magnética utilizada en la técnica de extracción por sorción en barra agitadora [Fuente: adaptada de la referencia 38].

Aunque esta técnica de extracción fue introducida para paliar las limitaciones de la técnica miniaturizada SPME en fibra, la SBSE no posee en su denominación el término “micro” debido a la mayor cantidad de fase extractante (24-100 μL) que se utiliza, frente a SPME en fibra ($\sim 0.5 \mu\text{L}$). Aún así, es considerada una técnica miniaturizada de extracción. El aumento en la cantidad de fase extractante ha permitido extraer mayor cantidad de analito y, por lo tanto, obtener mayor sensibilidad [42].

Como se ha indicado anteriormente, la SBSE fue desarrollada para superar las limitaciones que presentaba la SPME en fibra [43]. Además de la pequeña cantidad de fase extractante, otra limitación de la SPME en fibra era el número limitado de fibras disponibles comercialmente o desarrolladas para aplicaciones específicas. Desde el año 2011 ha crecido el número de publicaciones relacionadas con el desarrollo de nuevos recubrimientos para la técnica SBSE, lo que ha contribuido a mejorar la eficiencia en la extracción, por ejemplo, de compuestos polares [43].

Considerada una técnica de extracción no exhaustiva, así como la SPME en fibra, la SBSE presenta mayor capacidad de extracción. Sin embargo, presenta

otras desventajas, además de las citadas anteriormente, como dificultad en la automatización y contaminación provocada por la introducción de material externo (e.g., pinzas o varillas) para realizar el transporte de la barra hacia el sistema de desorción o recipiente con disolvente [43].

4.2.6 Extracción en fase sólida magnética

La extracción en fase sólida magnética (*magnetic solid-phase extraction*, MSPE) fue introducida en 1999 por Šafaříková y Šafarík al desarrollar una estrategia de separación para colorantes orgánicos. Para tal fin emplearon dos sorbentes: magnetita azul (ftalocianina de cobre unida a magnetita silanizada) y carbón vegetal magnético [44]. De forma general, la MSPE utiliza un sorbente sólido compuesto de una fase extractante y una fase magnética.

Esta técnica presenta la ventaja de tener el sorbente sólido normalmente dispersado directamente en la muestra, favoreciendo el contacto entre la muestra y la fase sólida extractante. La fase magnética facilita su manejabilidad mediante un campo magnético externo (imán). Una correcta elección del material extractante permite mejorar la selectividad y la eficiencia de la extracción. Además, en algunos casos, existe la posibilidad de reutilizar el sorbente [44-46].

Los sorbentes utilizados en la técnica MSPE poseen una fase magnética compuesta principalmente por minerales de hierro u óxidos de hierro, como magnetita (Fe_3O_4) o maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), y una fase extractante formada por diversos materiales, entre los cuales se encuentran los polímeros orgánicos e inorgánicos [47], y otros óxidos metálicos [46]. También se han utilizado sílices modificadas (C18, C8 y grupos fenilo) [48], polímeros molecularmente impresos [49] y más recientemente nanotubos de carbono [50], grafeno [51] y óxido de grafeno [52].

A fin de aumentar la selectividad de la extracción, la fase extractante de los sorbentes magnéticos puede ser modificada con diferentes grupos funcionales, iones o moléculas. También es posible funcionalizar directamente la fase magnética para obtener un sorbente magnético específico para esta técnica. Las principales interacciones entre los analitos y la fase extractante involucran la biocompatibilidad, fisisorción, quimisorción y reconocimiento de forma [53].

En los últimos años, se han desarrollado sorbentes con fase extractante basada en materiales carbonosos avanzados, como el grafeno y su derivado GO. Con estos materiales se consigue combinar de forma sinérgica la alta capacidad de adsorción superficial de estos materiales con las propiedades magnéticas de la fase magnética, lo cual favorece la eficiencia y la selectividad de la extracción así como su facilidad de manejo. Gran parte de estos sorbentes magnéticos poseen una elevada superficie de contacto lo que permite el empleo de grandes volúmenes de muestra [54].

El uso de sólidos magnéticos es una buena alternativa para el aislamiento y la preconcentración de diferentes especies químicas. Las etapas básicas de esta técnica de extracción son la separación magnética y la elución de los analitos de interés (Figura 4.20).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

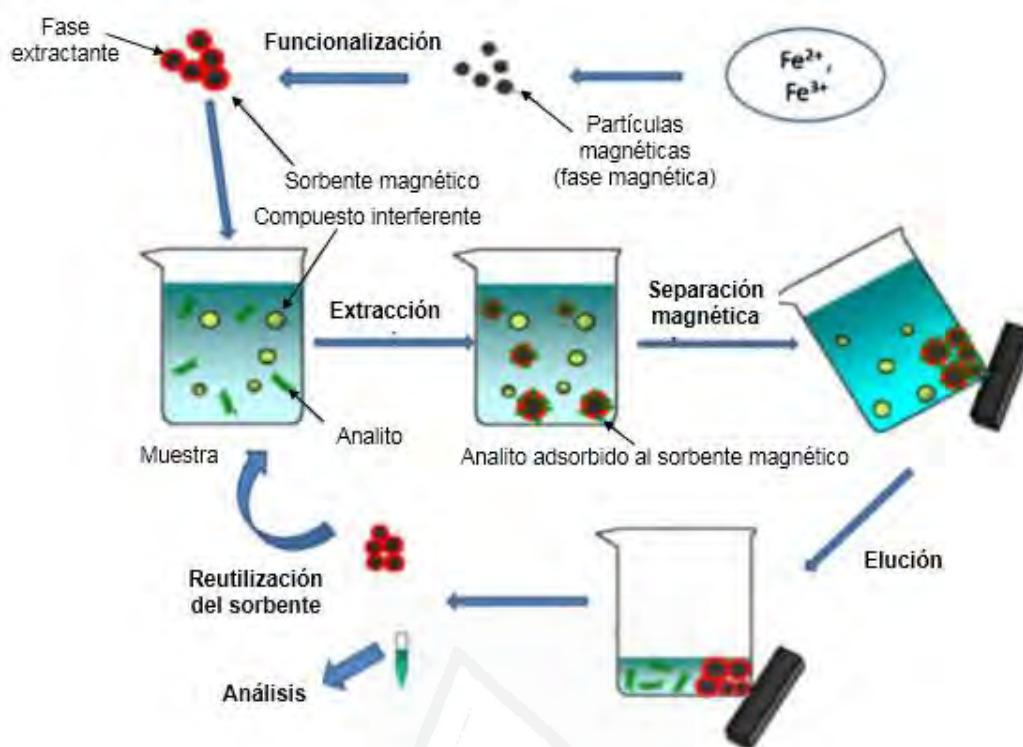


Figura 4.20 Representación de la técnica de extracción en fase sólida magnética [Fuente: adaptada de la referencia 55].

Esta técnica de extracción se ha aplicado al análisis de compuestos fenólicos [47], compuestos perfluorados [48], bisfenol A [50], anti-inflamatorios [45] y pesticidas [51,56], entre otros.

Existen varias ventajas en el uso de la MSPE, entre ellas: (i) reducción en el tiempo de tratamiento de la muestra debido al mayor contacto entre la muestra y el sorbente; (ii) facilidad de separación de fases mediante la aplicación de un campo magnético externo, lo que evita las etapas de centrifugación y/o filtración; (iii) bajo consumo de disolventes; (iv) fácil manejo de grandes volúmenes de muestra; (v) posibilidad de tratar muestras con gran cantidad de impurezas o partículas en suspensión sin que se originen problemas de rotura de fibras (SPME en fibra) o bloqueo del tubo capilar (SPME en tubo) [57,58].

Los sorbentes sólidos magnéticos más utilizados en la MSPE son las nanopartículas magnéticas (*magnetic nanoparticles*, MNPs) (e.g., Fe_2O_3 , Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 , CoFe_2O_4) funcionalizadas. Poseen una elevada relación área/volumen y un comportamiento superparamagnético. Las MNPs pueden ser atraídas por

un imán externo pero no poseen magnetismo residual una vez se elimina el campo magnético externo. Debido a su tamaño nanométrico, las MNPs tienden a formar aglomerados. Además, muchas nanopartículas metálicas son fácilmente oxidables en contacto con el aire o pueden ser atacadas por compuestos agresivos presentes durante la extracción, lo que hace que pierdan sus propiedades magnéticas. Por tanto, para uso en MSPE, las MNPs funcionalizadas suelen ser recubiertas para su protección y estabilización (Figura 4.21). Tal recubrimiento sirve como base para la modificación superficial con diferentes compuestos o materiales que son los que interactúan con los analitos, proporcionando a la técnica gran versatilidad y selectividad [55,57].

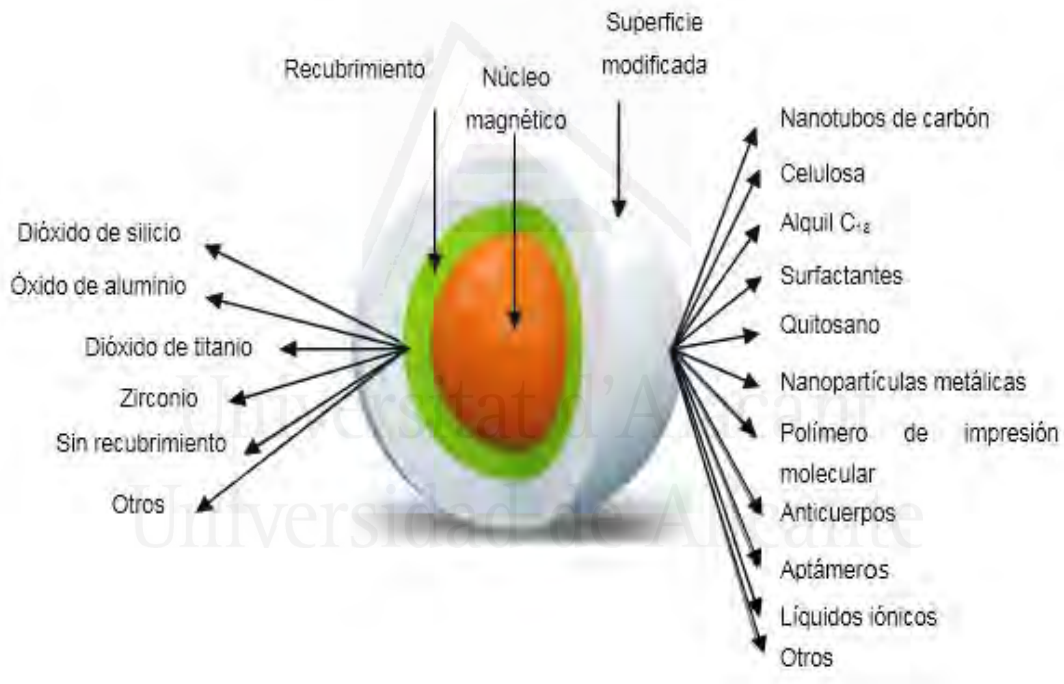


Figura 4.21 Nanopartículas magnéticas funcionalizadas utilizadas en la extracción en fase sólida magnética [Fuente: referencia: 57].

Por otro lado, también se han empleado sorbentes formados por una fase magnética y una fase extractante. De esta forma, se puede utilizar como fase extractante materiales que, por su propia naturaleza, no poseen propiedades magnéticas pero que pueden ser modificados/decorados con óxidos de hierro

con el fin de otorgarles dichas propiedades. Así constituyen un nanocompuesto formado por dos o más materiales. Entre los materiales extractantes podemos destacar los de base carbonosa (e.g., grafeno, óxido de grafeno, nanotubos de carbono) [59-61], las redes metal-orgánico (*metal-organic frameworks*, MOFs) [62] y las zeolitas [63], entre otros.

4.2.7 Otras técnicas de microextracción en fase sólida

Teniendo en cuenta la principal limitación de la SPME en fibra (e.g., la pequeña cantidad de sorbente disponible para la extracción de los analitos) y con la intención de eliminar este inconveniente, se han ido desarrollando nuevas técnicas miniaturizadas de extracción en fase sólida.

Bruheim y col. propusieron en el año 2003 la técnica de microextracción en película delgada (*thin-film microextraction*, TFME), en la modalidad de espacio de cabeza [64]. En la TFME se utiliza como fase extractante una lámina delgada, generalmente de PDMS, soportada por una membrana plana que proporciona una elevada relación área/volumen (Figura 4.22). En esta configuración, la cantidad disponible de fase extractante es mayor que en la SPME en fibra, proporcionando una mayor capacidad de extracción. Además, los tiempos de extracción son cortos debido a la elevada superficie de contacto entre las fases [64].

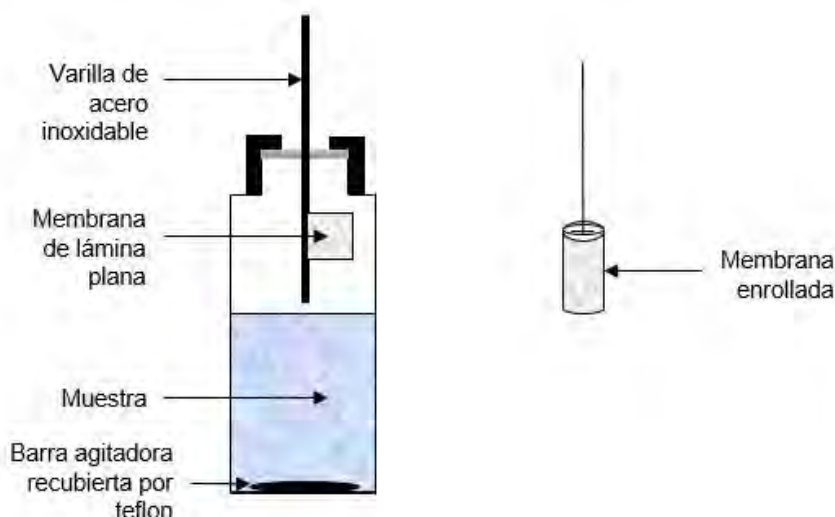


Figura 4.22 Dispositivo de microextracción en película delgada [Fuente: referencia 64].

En el año 2004, Abdel-Rehim introdujo la técnica de microextracción en jeringa empaquetada (*microextraction in a packed syringe*, MEPS) [65]. Esta modalidad de extracción representa la expresión más fiel de la miniaturización de la SPE convencional. En MEPS se utiliza como dispositivo de extracción una jeringa de entre 100 y 250 μL rellena de unos pocos mg de material sorbente empaquetado. De la misma forma que en la SPE convencional, la muestra pasa a través del sólido sorbente en donde los analitos quedan retenidos. Posteriormente, los analitos son eluidos con un disolvente apropiado. Existen dispositivos comerciales para la MEPS basados en los mismos tipos de sorbentes que los utilizados en los cartuchos de SPE tradicionales. Las grandes ventajas de esta modalidad miniaturizada son la significativa reducción en los tiempos de extracción y en el volumen de muestra necesarios para lograr un alto factor de enriquecimiento [66].

Extraer analitos directamente desde matrices complejas con sólidos en suspensión puede ocasionar inconvenientes en ciertas técnicas de microextracción como la SPME en fibra (e.g., bloqueo, daño o rotura de la fibra) o la SPME en tubo (e.g., bloqueo del capilar). Con el fin de solucionar estos posibles problemas, Basheer y col. propusieron en 2006 la microextracción en fase sólida con membrana de fibra hueca protectora (*hollow fiber membrane-*

protected micro-solid-phase extraction, HFM-SPME) [67]. En el diseño original, el dispositivo de extracción consistía en una pequeña bolsa porosa de polipropileno en la que se introducía el material sorbente para protegerlo. La bolsa era sumergida directamente en la muestra de modo que la membrana porosa impedía el paso del material sorbente particulado a la muestra y evitaba la contaminación de la fase extractante por los componentes de la matriz [67].

Tres años más tarde Tsai y col. utilizaron por primera vez el término de microextracción en fase sólida dispersiva (*dispersive solid-phase microextraction*, DSPME) [68]. Esta nueva técnica de extracción fue presentada como una miniaturización de la extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE) basada en la metodología QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), cuyas características son altas recuperaciones, resultados precisos, rapidez de tratamiento, escaso consumo de disolvente, además de necesitar poco espacio en el laboratorio y pocos reactivos [69]. En la DSPME se utiliza una pequeña cantidad de un sorbente sólido (del orden de unos pocos μg o mg) que es introducido directamente en la muestra acuosa y dispersado en la misma mediante agitación manual o utilizando algún dispositivo adicional como la agitación magnética, el vórtex o la energía de ultrasonidos [70]. Después de la extracción, las dos fases (i.e., sorbente sólido con los analitos retenidos y fase líquida) son separadas por centrifugación o filtración y, finalmente, los analitos son desorbidos térmicamente o con un disolvente para su determinación. La dispersión de la fase extractante en la muestra da lugar a una mayor área superficial activa del sorbente y a un mayor contacto entre las fases lo que se refleja en una mayor rapidez y eficiencia de la extracción [70].

En la Tabla 4.3 se encuentran resumidas, de forma cronológica, las principales técnicas miniaturizadas de la SPE.

Tabla 4.3 Cronología de las principales técnicas miniaturizadas de extracción en fase sólida.

Año	Autores	Técnica desarrollada	Ref.
1990	Arthur y Pawliszyn	Una fibra es utilizada como soporte de un pequeño volumen de fase extractante (SPME en fibra)	[30]
1997	Eisert y Pawliszyn	Técnica SPME en tubo con dos modalidades: (i) flujo dinámico y; (ii) flujo pasivo	[32]
1999	Baltussen y col.	Barra agitadora magnética recubierta con PDMS que proporciona una mayor superficie de contacto entre la muestra y el sorbente (SBSE)	[37]
1999	Šafaříková y Šafarík	Técnica cuyo sorbente sólido, compuesto por una fase extractante y una fase magnética, es dispersado directamente en la muestra, lo que favorece el contacto entre la misma y la fase extractante (MSPE)	[44]
2003	Bruheim y col.	Una membrana plana es utilizada como soporte de una lámina delgada de fase extractante (TFME). Proporciona una elevada relación área/volumen	[64]
2004	Abdel-Rehim	Una jeringa de pequeño volumen rellena de unos pocos mg de material sorbente empaquetado es utilizada como dispositivo de extracción (MEPS)	[65]
2006	Basheer y col.	Dispositivo de extracción consistente en una pequeña bolsa porosa de polipropileno en la que se introduce el material sorbente (HFM-SPME)	[67]

2009	Tsai y col.	Unos pocos μg o mg de un sorbente sólido son introducidos directamente en la muestra acuosa y dispersados mediante agitación manual o dispositivos como el agitador magnético, el vórtex o la energía de ultrasonidos (DSPME)	[68]
------	-------------	---	------

4.3 Materiales carbonosos avanzados como adsorbentes

Los materiales de carbono o carbonosos son conocidos por su alta capacidad de adsorción por lo que poseen un elevado potencial para extraer contaminantes de diversos tipos de muestras. Así podemos encontrar en la bibliografía el uso de carbón activo (material carbonoso clásico), y más recientemente, los materiales carbonosos avanzados, entre los que se encuentran los fullerenos y nanotubos de carbono, entre otros, como adsorbentes en técnicas de extracción. Estos materiales han sido utilizados para la adsorción de iones de plomo (carbón activo) [71], diésteres ftálicos (fullerenos) [72] y fenoles (nanotubos de carbono) [73] con la finalidad de determinar los niveles de estos contaminantes en muestras de aguas.

Desarrollados a partir de los años 80, los materiales carbonosos avanzados incluyen, entre otros, el grafeno, los fullerenos y los nanotubos de carbono. Estos materiales de dimensiones nanométricas presentan hibridación sp^2 , y como base estructural una red de átomos de carbono organizados en formas geométricas. El grafeno es la forma más simple de esta red de carbonos, consistiendo en una monocapa, o sea, una estructura bidimensional de átomos de carbono (Figura 4.23). A partir de esta base bidimensional, se pueden obtener varias estructuras tridimensionales. Las estructuras pueden ser cerradas (fullerenos), enrolladas en tubo (nanotubos de carbono) o apiladas (grafito) [74].

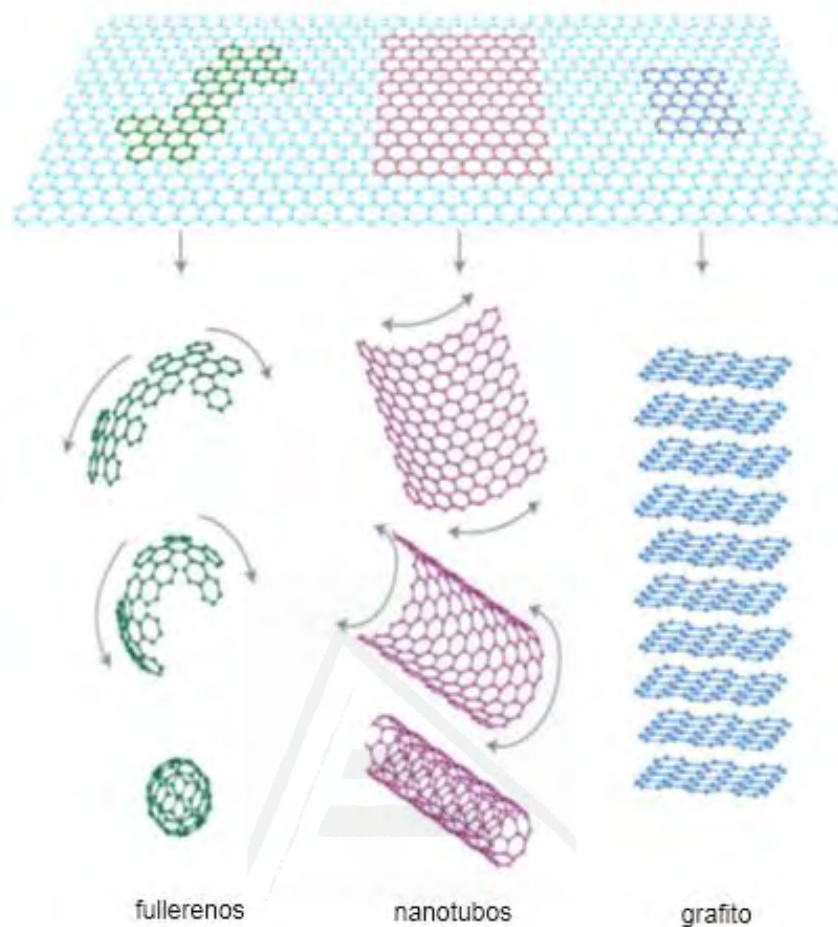


Figura 4.23 El grafeno como base de las formas estructurales de los materiales de carbono con hibridación sp^2 [Fuente: referencia 74].

4.3.1 Fullerenos

Los fullerenos (*fullerenes*) consisten en series de átomos de carbono unidos formando esferas o elipsoides. El primer fullereno, el C₆₀ (*buckminsterfullerene*) fue presentado en 1985 por Kroto y col. [75]. Utilizando un láser para vaporizar varillas de grafito en una atmósfera de helio gaseoso se obtuvieron moléculas en forma de cápsula compuestas por 60 átomos de carbono (C₆₀) unidas por enlaces simples y dobles. Cada esfera hueca estaba compuesta por 12 caras pentagonales y 20 hexagonales; diseño que se asemeja a un balón de fútbol [75]. Este nanomaterial puede ser fácilmente modificado superficialmente [76] lo que le confiere capacidad para adsorber compuestos metálicos, orgánicos y biomoléculas (Figura 4.24).

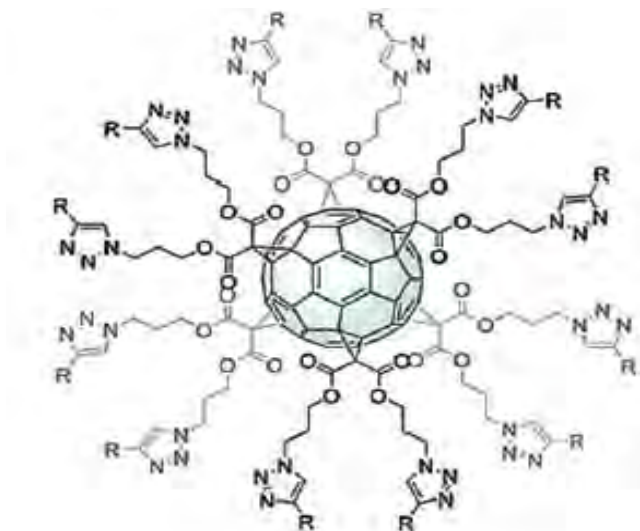


Figura 4.24 Fullerenos modificados superficialmente con carbohidratos [Fuente: referencia 76].

4.3.2 Nanotubos de carbono

Otros nanomateriales carbonosos avanzados ampliamente utilizados como adsorbentes son los nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*, CNTs). Su descubrimiento se atribuye a Sumio Iijima en 1991 [77]. Los CNTs son estructuras constituidas por una única lámina de átomos de carbono enrollada en forma de tubo (nanotubos monocapa) o varios tubos con diámetros crecientes dispuestos alrededor de un eje común (nanotubos multicapa). Poseen excelente capacidad de extracción debido a su elevada área superficial y posibilidad de modificación superficial mediante la introducción de grupos funcionales capaces de interactuar específicamente con los analitos de interés (Figura 4.25) [78]. Entre las diversas posibilidades que poseen, los CNTs también pueden ser utilizados como adsorbentes magnéticos en la técnica MSPE. La magnetización se lleva a cabo mediante la incorporación de diferentes metales u óxidos metálicos de forma endohédrica (i.e., encapsulación de MNPs en el interior de los CNTs) o exohédrica (i.e., fijación de las MNPs en la superficie de los CNTs) [79]. El procedimiento de obtención de nanotubos de carbono magnéticos (M-CNTs) puede ser realizado en dos etapas: (i) síntesis de las MNPs y; (ii) posterior auto-ensamblaje de las MNPs; o en una sola etapa de precipitación directa e “in-situ” de las MNPs sobre la superficie del nanomaterial carbonoso [79].

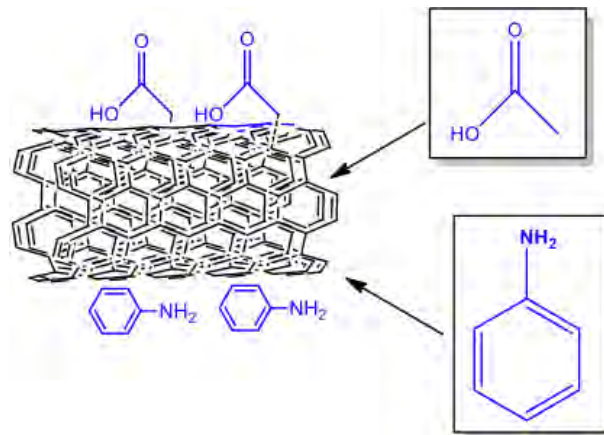


Figura 4.25 Nanotubo de carbono modificado superficialmente con ácido acético y anilina [Fuente: referencia 78].

4.3.3 Grafeno

El grafeno consiste en una lámina de un solo átomo de espesor formada por átomos de carbono organizados en estructuras hexagonales (Figura 4.26) [80]. Fue descrito, por primera vez en 1947, por el físico canadiense P.R. Wallace, en el estudio de las propiedades electrónicas del grafito [81]. No fue hasta el año 1962, en el que los químicos alemanes Ulrich Hofmann, Hanns-Peter Boehm y col. lo observaron por primera vez [82]. Boehm y col. introdujeron el término grafeno (*graphene*) en 1986, derivado de las palabras grafito (*graphite*) e hidrocarburo policíclico aromático (*polycyclic aromatic hydrocarbon*), más el sufijo **-ene**, referente a los enlaces dobles de sus carbonos [83]. Sin embargo, no se conocieron sus propiedades hasta el año 2004, cuando un estudio conducido por Konstantin Novoselov y Andre Geim definió las propiedades únicas de este material avanzado [84].

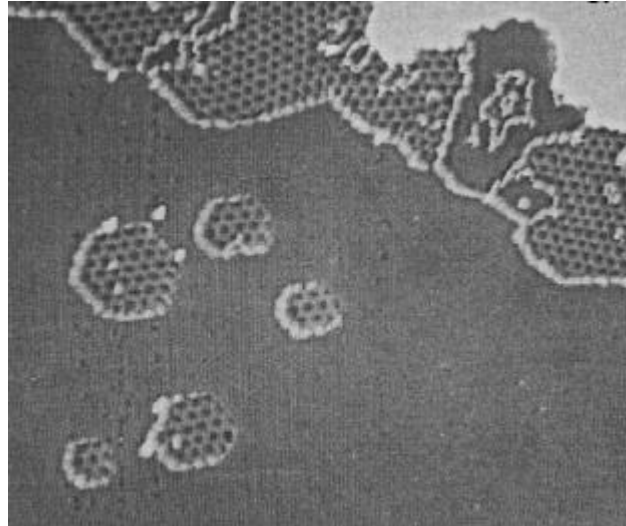


Figura 4.26 Imagen obtenida por microscopía de efecto túnel (STM) de la estructura laminar del grafeno [Fuente: referencia 80].

En este material bidimensional, los átomos de carbono presentan hibridación sp^2 y se organizan en una red de hexágonos en forma de panal de abeja. Posee propiedades únicas (e.g., excelente capacidad de almacenamiento de energía, alto módulo de elasticidad, alta conductividad eléctrica, capacidad de adsorción para infinidad de compuestos) [85-88]. Entre estas propiedades se encuentra la elevada capacidad de adsorción debido a su gran área superficial teórica ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$). Además, los dos lados de las láminas de grafeno están disponibles para la adsorción de compuestos [89]. Su sistema de electrones deslocalizados permite formar enlaces π - π con anillos bencénicos. Esto hace que el grafeno sea un excelente adsorbente de compuestos aromáticos [89,90]. Sobre la lámina de grafeno también se producen interacciones hidrofóbicas con grupos $-\text{CH}_3$ de otros compuestos. La capacidad de adsorción de la lámina de grafeno puede ser mejorada mediante la funcionalización superficial o combinación con otros compuestos, posibilitando la extracción tanto de compuestos polares como no polares por intermedio de puentes de hidrógeno e interacción electrostática (Figura 4.27) [59].

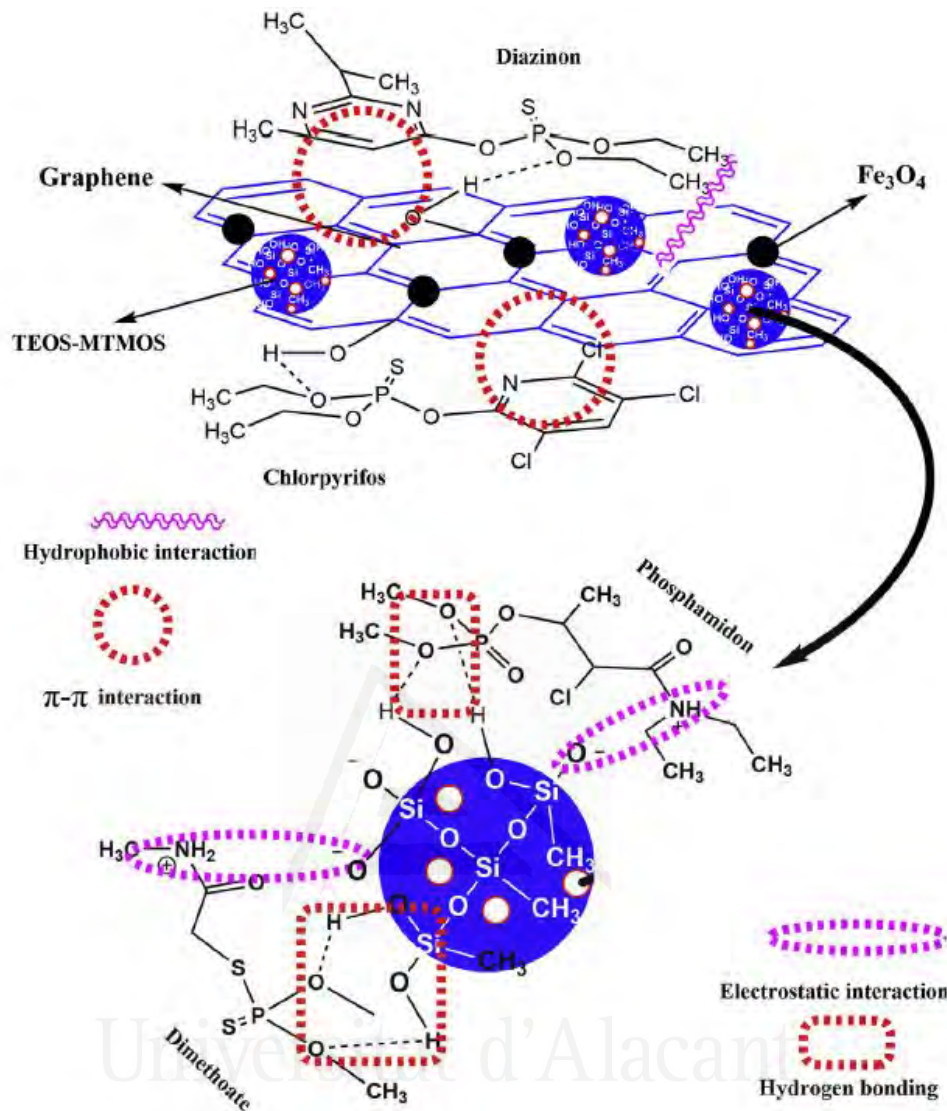


Figura 4.27 Mecanismos de adsorción de pesticidas polares y no-polares sobre láminas de grafeno funcionalizadas [Fuente: referencia 59].

En el grafeno, el átomo de carbono presenta la siguiente configuración electrónica: ${}^6\text{C} = 1s^2 2s^2 2p^2$. Los estados 1s están intensamente enlazados al núcleo atómico y, por lo tanto, los enlaces covalentes entre dos átomos de carbono son atribuidos a los orbitales 2s y 2p. Cada átomo de carbono posee cuatro electrones débilmente enlazados ocupando tres orbitales híbridos sp^2 en un mismo plano y un orbital p perpendicular al plano de los híbridos. La densidad electrónica está distribuida de forma simétrica por encima y por debajo del plano. Entre dos átomos de carbono enlazados, existen ocho electrones que completan las tres primeras bandas σ y la primera banda π . Los electrones pueden ocupar

o desocupar las bandas π y, por eso, el grafeno es conocido como material electrón- π . Esta deslocalización de electrones tipo π es la que permite el transporte eléctrico en las bandas π , atribuyendo al grafeno la capacidad de ser un excelente conductor eléctrico [91].

Debido a la configuración electrónica sp^2 de sus carbonos, los tres enlaces covalentes tipo σ están separados por un ángulo de 120° entre si. Los átomos de carbono se ordenan, por lo tanto, en una red hexagonal típica (Figura 4.28). Estos enlaces covalentes del carbono presentan un valor del Módulo de Young del orden de 1.0 TPa. Tal fuerza presenta ventajas en el desarrollo de diferentes nanoestructuras de interés actual (e.g., láminas, cintas, tubos, fullerenos), que son usados para fabricar prototipos en diversas áreas de la nanociencia y la nanotecnología [92].

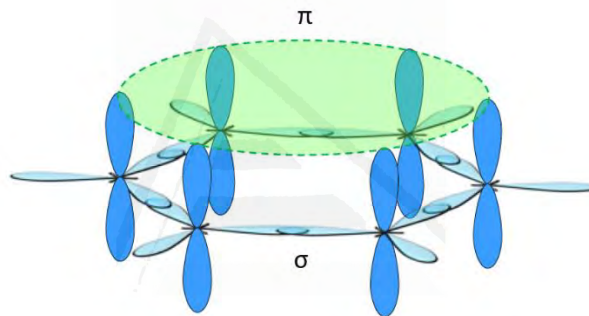


Figura 4.28 Esquema de la estructura hexagonal del grafeno formada por los enlaces covalentes tipo σ entre los átomos de carbono.

4.3.4 Óxido de grafeno

En 1859, el químico británico Benjamin Brodie observó, por primera vez, pequeños cristales de óxido de grafito (término atribuido: *graphon*) producidos por exposición del grafito a ácidos fuertes [93]. En 1962, Boehm y col. demostraron la existencia de láminas de óxido de grafeno, que consistía en una monocapa de óxido de grafito densamente cubierta por grupos hidroxilo (-OH) y epoxi (-O-) [82].

El óxido de grafeno (*graphene oxide*, GO) posee una estructura única de carbonos con hibridación sp^2 rodeados de otros carbonos sp^3 , además de grupos funcionales oxidados como hidroxilos, carboxilos, carbonilos y epoxi. Son estos grupos los responsables de la gran solubilidad del GO, la facilidad de su modificación superficial y la capacidad de enlazarse a compuestos aromáticos y

polares por puentes de hidrógeno, interacción π - π e interacción electrostática [88,94], y a metales por interacciones electrostáticas [95] (Figura 4.29). Sin embargo, a diferencia del grafeno, el GO carece de movilidad electrónica debido a los grupos funcionales oxidados, situando su conductividad eléctrica en el intervalo entre aislante y semiconductor [97].

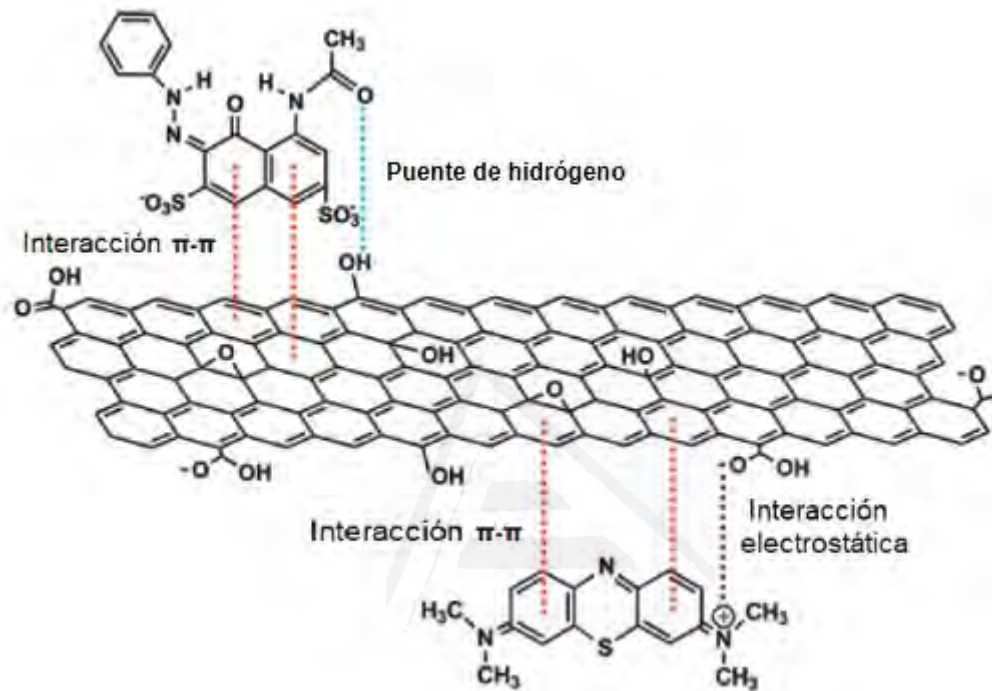


Figura 4.29 Posibles interacciones de compuestos aromáticos sobre la superficie del GO [Fuente: adaptada de la referencia 96].

La síntesis del óxido de grafeno puede ser realizada, entre otros, por el método Brodie [93], método Staudenmaier [98] y método Hummers-Offeman [99].

El método Brodie [93] consiste en la oxidación de grafito con ácido nítrico humeante y clorato de potasio. El grado de oxidación varía de acuerdo a las condiciones de la reacción (e.g., temperatura, presión, etc.), estequiometría y la calidad del grafito utilizado como material inicial. Este método de síntesis es largo debido a la realización de varias reacciones de oxidación, además de presentar riesgos por el uso prolongado de compuestos peligrosos.

Staudenmaier [98] introdujo dos cambios en el método Brodie: (i) adición de ácido sulfúrico concentrado para aumentar la acidez de la mezcla y; (ii) adición de múltiples alícuotas de disolución de cloruro de potasio durante la reacción de oxidación. Estos cambios proporcionaron GO altamente oxidado a partir de una única reacción, simplificando el método Brodie. Aún así, el método Staudenmaier seguía siendo un proceso peligroso debido al uso de ácido sulfúrico así como a las posibles explosiones que podía provocar el dióxido de cloro generado.

Con el fin de subsanar los problemas de los métodos anteriores, Hummers y Offeman [99] desarrollaron, en 1958, un método para la obtención del óxido de grafito mezclando grafito con nitrato de sodio, ácido sulfúrico y permanganato de potasio, manteniendo la temperatura a 45 °C. Cuando el grafito se convierte en óxido de grafito, el espacio intercapa ensancha dos o tres veces el espaciado del grafito inicial. Después de 1 hora de reacción oxidativa, la distancia intercapa para el óxido de grafito es de 3.34 Å, una expansión que llega a 7.0 ± 0.35 Å cuando la oxidación se alarga por 24 horas. Las distancias intercapas pueden ser ampliadas por inserción de líquidos polares [99]. El óxido de grafito obtenido presenta átomos de carbono sp^3 en el plano basal con gran cantidad de grupos hidroxilo y epóxido, y en los bordes se encuentran grupos carbonilo y carboxilo enlazados a átomos de carbono sp^2 . Mediante la exfoliación del óxido de grafito en agua u otros disolventes como N,N-dimetilformamida, tetrahidrofurano, N-metil-2-pirrolidona o etilenglicol, se obtiene dispersiones estables de GO [100]. El GO puede ser convertido fácilmente en grafeno por reducción química con un agente reductor (e.g., hidrazina).

La Figura 4.30 ilustra el método clásico Hummers-Offeman. Se puede apreciar el GO como producto intermedio de la síntesis del grafeno, también conocido por óxido de grafeno reducido (rGO).

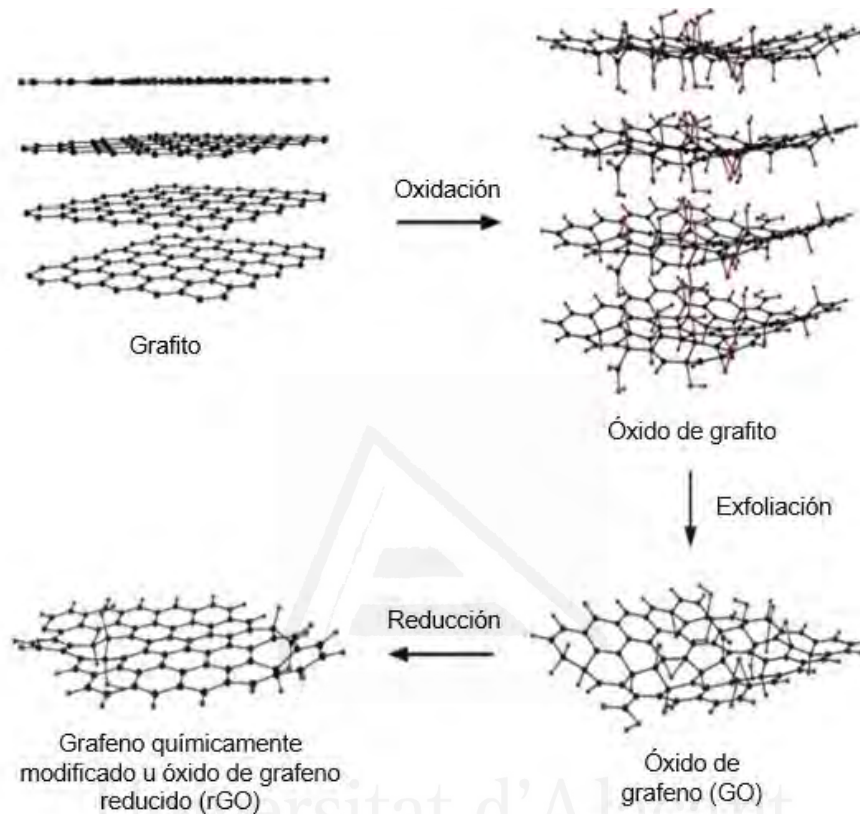


Figura 4.30 Método Hummers-Offeman para la producción de grafeno y GO [Fuente: referencia 101].

En 2006, Ruoff y col. [102] propusieron la síntesis de GO a través de la previa obtención de óxido de grafito por el método Hummers-Offeman seguido de un tratamiento químico diferenciado. El óxido de grafito obtenido fue sometido a un tratamiento con isocianatos orgánicos lo que permitió la completa exfoliación del óxido de grafito en láminas de GO. Sin embargo, este método produce un GO modificado químicamente con grupos isocianatos.

Los grupos funcionales dotan al GO de sitios reactivos que posibilitan su modificación superficial, lo cual es una excelente ventaja para el uso como adsorbente específico en técnicas analíticas. La modificación superficial puede ser alcanzada mediante funcionalización covalente o no covalente. En la funcionalización covalente se utilizan los grupos hidroxilo y epoxi del plano basal para modificar la funcionalidad a amidas y carbamatos, tratando el GO con isocianato u otros compuestos como cloruro de tionilo [103] y N,N-diciclohexilcarbodiimida [104], entre otros. Añadiendo al GO aminas y alcoholes se forman amidas y ésteres, respectivamente. También se puede llevar a cabo la funcionalización del GO con líquidos iónicos que contengan un grupo amino terminal [105]. La funcionalización no covalente se basa en interacciones débiles, como las fuerzas de van der Waals, interacciones π - π e interacciones electrostáticas. Este tipo de funcionalización presenta la ventaja de no afectar la conjugación de tipo π de la superficie del GO. Entre los compuestos utilizados para la funcionalización no covalente del GO están el poli(sodio 4-estirenosulfonato), polianilina sulfonada, poli(3-hexiltoleno) y pireno [106], entre otros.

4.4 Grafeno y óxido de grafeno como adsorbentes para técnicas de extracción

La gran área superficial específica del grafeno y su carácter aromático convierten a este nanomaterial en un excelente adsorbente para diversos analitos. Además, la morfología de esta lámina de carbono permite alcanzar rápidamente el equilibrio de adsorción y elución del analito. Estas son características muy deseadas en las técnicas de SPE y SPME [107].

El grafeno ha sido utilizado como adsorbente en la SPE ya que posee una mayor capacidad adsorbente que los adsorbentes convencionales así como otros nanomateriales de carbono. También presenta otras ventajas como ausencia de impurezas metálicas en su composición, a diferencia de los CNTs [89]. Sin embargo, el grafeno no se dispersa en cualquier disolvente debido a la presencia de interacciones de van der Waals, siendo un claro inconveniente para la extracción de compuestos orgánicos en modalidad dispersiva.

El grafeno ha sido utilizado como adsorbente para el pretratamiento de muestras de agua conteniendo pesticidas [108] e hidrocarburos policíclicos aromáticos [109]; y también antioxidantes fenólicos presentes en alimentos [110], entre otros compuestos.

Como derivado del grafeno, el GO mantiene la ventaja de su gran área superficial pero incorpora una propiedad muy importante para su aplicación analítica: la presencia de grupos funcionales oxidados. Estos grupos favorecen, por un lado, la dispersión del GO en el agua, que se presenta como una ventaja excelente para ser utilizado como adsorbente en técnicas de extracción, y por otro lado, se pueden dar diferentes interacciones con el/los analitos, pudiendo extraer tanto analitos apolares como polares [89].

Debido a todas las propiedades interesantes que aportan estos materiales carbonosos avanzados, se ha promovido el desarrollo de nuevos adsorbentes basados en grafeno, tanto en el propio grafeno como en sus derivados (i.e., GO). Estos materiales combinan la excelente capacidad de adsorción de la lámina de grafeno con otras propiedades diferentes conseguidas por la presencia de otros materiales en un mismo material adsorbente (i.e., la facilidad de manejo). La asociación de dos o más materiales en un mismo material adsorbente forma un material compuesto, también conocido como composite (palabra proveniente del inglés para definir este tipo de materiales). Si estos materiales son de dimensiones nanométricas (≤ 100 nm al menos en una dirección), reciben el nombre de nanocomposite.

En los últimos años, el grafeno y sus derivados han sido ampliamente utilizados en diversas áreas científicas y tecnológicas. Especialmente interesantes se han mostrado como materiales adsorbentes para aplicaciones analíticas, concretamente en métodos de extracción.

Cuando los materiales basados en grafeno son comparados con otros materiales sorbentes disponibles comercialmente, como los descritos en la bibliografía (e.g., C18, C8, etc.), se observa que los primeros permiten obtener unos mejores resultados en la mayoría de los casos [111]. Teniendo en cuenta que se pueden aplicar a un espectro mayor de matrices diferentes (e.g., ambiental, alimentaria y biológica) y que poseen unas buenas propiedades

físicoquímicas, los materiales derivados del grafeno son muy prometedores como materiales adsorbentes pudiendo llegar a su comercialización a gran escala en un futuro próximo [111].

El adsorbente ideal para la extracción en fase sólida debería tener gran área superficial, baja señal residual, alta estabilidad química y mecánica, cinética rápida para la adsorción y desorción, alta selectividad y alta eficiencia para la recuperación del analito de interés [112], características todas ellas presentes en el grafeno y sus derivados. Además, el uso de grafeno combinado con otros nanomateriales en un mismo material adsorbente (nanocomposite) facilita, en muchos casos, la extracción de los analitos de interés. La modificación superficial de los materiales basados en grafeno permite extraer al mismo tiempo varios compuestos con características similares. También es posible utilizar estos materiales en aplicaciones específicas como biosensores para detección de compuestos bioquímicos de interés clínico (Figura 4.31).

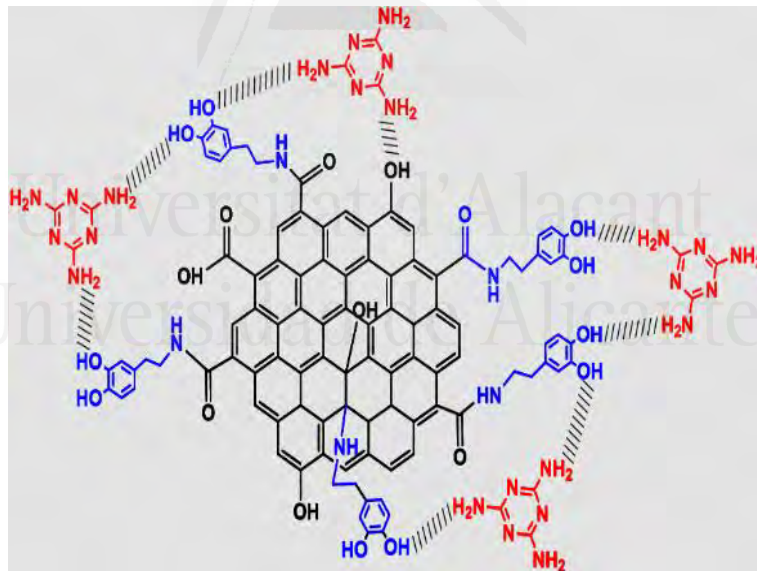


Figura 4.31 Funcionalización del grafeno con biomoléculas de dopamina y la interacción específica entre el grupo catecol de la dopamina y el grupo amino de una molécula de melamina (composite rGO-DA) [Fuente: referencia 113].

Una especial atención conviene prestar a la extracción en fase sólida magnética (MSPE) la cual ha experimentado un gran interés desde su aparición [44,114,115].

Como adsorbentes, los nanocomposites magnéticos son una buena alternativa a los problemas típicos que presenta la SPE relacionados con el empaquetamiento del adsorbente, tales como la alta presión y la obstrucción del lecho empaquetado [116]. La facilidad de manejo y separación de los adsorbentes magnéticos de las muestras acuosas mediante la aplicación de un campo magnético externo simplifica el manejo y reduce el tiempo de la extracción. Además, en muchos casos, los adsorbentes magnéticos pueden ser reutilizados después de una etapa adecuada de limpieza, lo que es rentable económicamente y respetuoso con el medio ambiente.

4.4.1 Nanocomposites magnéticos de grafeno y óxido de grafeno

4.4.1.1 Propiedades magnéticas

Los nanocomposites derivados del grafeno han sido utilizados en un gran número de metodologías analíticas basadas en técnicas miniaturizadas de extracción. Sus dimensiones nanométricas aportan elevada disponibilidad de área superficial para adsorción de compuestos químicos. Además, en la mayoría de los casos, contribuyen a la reducción del número de etapas experimentales y consumo de reactivos en las metodologías dedicadas al pretratamiento de muestras.

Formados por la combinación de materiales, los nanocomposites magnéticos poseen una elevada relación área/volumen y, por lo tanto, gran capacidad y eficiencia de extracción [117]. Las nanopartículas magnéticas (MNPs) utilizadas en la síntesis de nanocomposites magnéticos para fines analíticos son, en la mayoría de los casos, óxidos que contienen hierro (e.g., $\text{Fe}_3\text{O}_4 = \text{Fe}^{2+}\text{O} \cdot \text{Fe}_2^{3+}\text{O}_3$, $\text{MgFe}_2\text{O}_4 = \text{MgO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Estos óxidos presentan comportamiento ferrimagnético, es decir, sus dipolos magnéticos elementales están alineados en la misma dirección del campo magnético externo aplicado pero en sentido contrario y con diferentes intensidades (Figura 4.32).

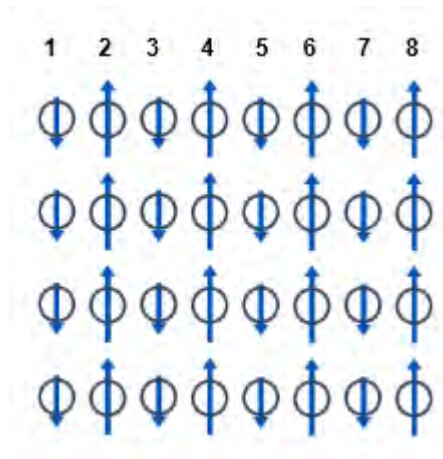


Figura 4.32 Esquema del ordenamiento ferrimagnético: los dipolos magnéticos elementales están ordenados en sentidos opuestos y las intensidades de los dipolos de las columnas impares no compensan los de las columnas pares [Fuente: referencia 118].

No se deben confundir con los materiales ferromagnéticos cuyos dipolos magnéticos elementales están también alineados en la misma dirección del campo magnético externo pero en un mismo sentido. Sin embargo, tanto los materiales ferrimagnéticos como los ferromagnéticos son capaces de conservar el magnetismo proveniente del campo magnético externo después de la retirada del mismo. El ferrimagnetismo es una variedad especial del comportamiento antiferromagnético. Los materiales con comportamiento antiferromagnético presentan dipolos magnéticos elementales ordenados en sentidos opuestos pero con las mismas intensidades resultando un momento magnético nulo. Los óxidos citados anteriormente, clasificados como materiales ferrimagnéticos, poseen dipolos magnéticos elementales ordenados en sentidos opuestos con intensidades significativamente diferentes. De este modo, al ser sometidos a un campo magnético externo (H , A/m) sus dipolos magnéticos elementales no se anulan por completo (Figura 4.32). Eliminandose el campo magnético externo, el momento magnético resultante es elevado debido a la diferencia de intensidad entre los dipolos opuestos [118].

El comportamiento frente a un campo magnético externo puede ser medido y se reconoce por curva de magnetización (Figura 4.33). La tendencia de los compuestos ferromagnéticos y ferrimagnéticos a conservar la propiedad

magnética, en ausencia del campo magnético que la generó, es conocida por histéresis [118]. Por lo tanto, ambos materiales magnéticos son caracterizados por dos curvas de magnetización (una debido a la aplicación de un campo magnético y otra debido a su retirada), formando el ciclo de histéresis (Figura 4.33). El valor más alto de la curva es conocido como magnetización de saturación (M_s), correspondiente al estado alcanzado cuando cualquier incremento posterior en un campo magnético externo no provoca un aumento en la magnetización del material. Cuando el material posee solamente una curva de magnetización con alto valor de M_s , es denominado como superparamagnético. El comportamiento superparamagnético comparte características del paramagnetismo (magnetización M proporcional al campo magnético H) y del ferromagnetismo (pueden exhibir ciclos de histéresis magnéticos si el momento magnético inducido no es capaz de seguir la dirección del campo aplicado) [118]. El superparamagnetismo es un fenómeno que ocurre solamente con partículas muy pequeñas (nanopartículas), cuyos momentos magnéticos cambian de dirección aleatoriamente por el simple efecto de la energía térmica del ambiente. Las nanopartículas de maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) y magnetita (Fe_3O_4), por ejemplo, exhiben comportamiento superparamagnético a temperatura ambiente [118]. En la Figura 4.33 se muestra la dependencia de la intensidad de imantación (M) con el campo magnético aplicado (H) para cada uno de los tres diferentes comportamientos principales de los materiales magnéticos.

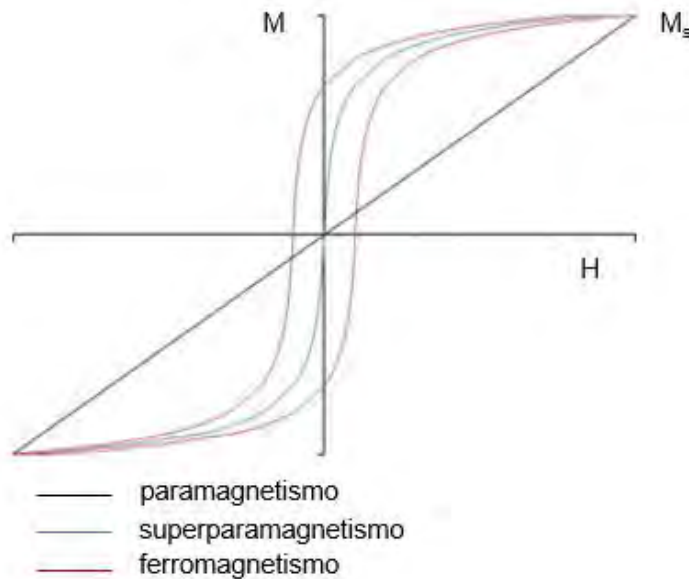


Figura 4.33 Curvas de magnetización para los principales comportamientos de los materiales magnéticos [Fuente: referencia 119].

4.4.1.2 Aplicaciones de los nanocomposites magnéticos de grafeno y óxido de grafeno

Los nanocomposites magnéticos derivados del grafeno han sido ampliamente utilizados como adsorbentes magnéticos en técnicas de extracción. Musa y col. han utilizado el nanocomposite magnético G-Fe₃O₄ para la extracción de ácidos fenólicos en muestras de miel de abeja en la técnica MSPE [120]. Akbarzade y col. han extraído plomo de muestras reales de agua y de alimentos utilizando el nanocomposite magnético GO-PAR@Fe₃O₄ como adsorbente en la técnica de extracción en fase sólida magnética dispersiva (*magnetic dispersive solid-phase extraction*, MDSPE) [121]. Otros autores han sintetizado materiales compuestos/híbridos que contienen MNPs combinadas con MIPs [122], CNTs [123] y óxido de grafeno [124] para una aplicación posterior. Los nanocomposites magnéticos basados en grafeno presentan características morfológicas y químicas favorables para la adsorción de una gran variedad de compuestos.

Entre los diferentes materiales utilizados como fase adsorbente para los nanocomposites magnéticos, el grafeno destaca por sus excepcionales propiedades mecánicas, térmicas, electrónicas y por tener una gran área

específica. El grafeno, como lámina bidimensional de una o unas pocas láminas de átomos de carbono, favorecen la extracción de compuestos aromáticos y no polares [125]. Así, los nanocomposites magnéticos cuya fase extractante está constituida por grafeno, han mostrado gran eficiencia en el aislamiento y enriquecimiento de contaminantes orgánicos en matrices acuosas [126], pesticidas en leche [127] y residuos de drogas veterinarias en orina [128], entre otros. Por otro lado, el GO presenta carácter polar e hidrofílico debido a la gran cantidad de grupos polares (i.e., grupos hidroxilo, epoxi y carboxilo) existentes en su superficie. Así, los nanocomposites cuya fase extractante está constituida por GO, son comúnmente utilizados para extraer compuestos de alta polaridad [129].

4.4.2 Tipos de interacción entre los nanocomposites magnéticos de grafeno y óxido de grafeno y las especies químicas

El mecanismo de adsorción de una especie química (i.e., analito) sobre la superficie de los nanocomposites magnéticos basados en grafeno ocurre principalmente por la interacción entre los grupos funcionales de la fase extractante y los grupos funcionales similares o afines del analito.

Como se ha mencionado anteriormente, el grafeno interacciona predominantemente a través de fuertes interacciones π - π con los anillos aromáticos de los compuestos orgánicos [130]. Estas monoláminas de carbono también retienen quelatos neutros de metales y analitos orgánicos neutros [88].

Por otro lado, el GO puede adsorber especies metálicas iónicas y compuestos orgánicos polares, incluidos grupos funcionales de oxígeno y nitrógeno, por enlaces dativos, interacciones catión- π , interacciones electrostáticas o puentes de hidrógeno [130].

Los nanocomposites magnéticos también pueden contener otros compuestos formando la fase extractante junto al material basado en grafeno para mejorar la eficiencia y la selectividad de la extracción. Entre ellos se encuentran los surfactantes iónicos [131], polímeros orgánicos (como la polidopamina [132] y polipirrol [133]), líquidos iónicos [134], y MOFs [135]. En estos casos, las interacciones pueden ser más variadas dependiendo de los

grupos funcionales disponibles en el compuesto adicional que compone la fase extractante junto con los grupos disponibles en el material basado en grafeno. De este modo, es posible la extracción de una mayor variedad de especies químicas o de una forma más específica, uno o unos pocos analito/s de interés según los grupos funcionales disponibles creados durante la síntesis de los nanocomposites magnéticos.

4.4.3 Métodos de síntesis de composites magnéticos basados en grafeno

En la preparación de composites magnéticos a base de grafeno se puede utilizar como fase magnética metales magnéticos como hierro, cobalto y níquel. Sin embargo, los adsorbentes utilizados en la técnica MSPE son mayormente magnetizados con óxido de hierro (γ -Fe₂O₃ y Fe₃O₄) por su fácil obtención; además, poseen magnetización controlable, comportamiento superparamagnético y baja toxicidad [136].

Existen diversos métodos de síntesis en la literatura. Li y col. han propuesto la agrupación de los diferentes métodos de síntesis de acuerdo con los tres tipos de composites magnéticos basados en grafeno [125]: (i) composite magnético basado en grafeno puro (*bare MGC*); (ii) composite magnético basado en grafeno funcionalizado (*functionalized MGC*) y; (iii) composite magnético basado en grafeno tridimensional (*three-dimensional MGC*) (Figura 4.34).

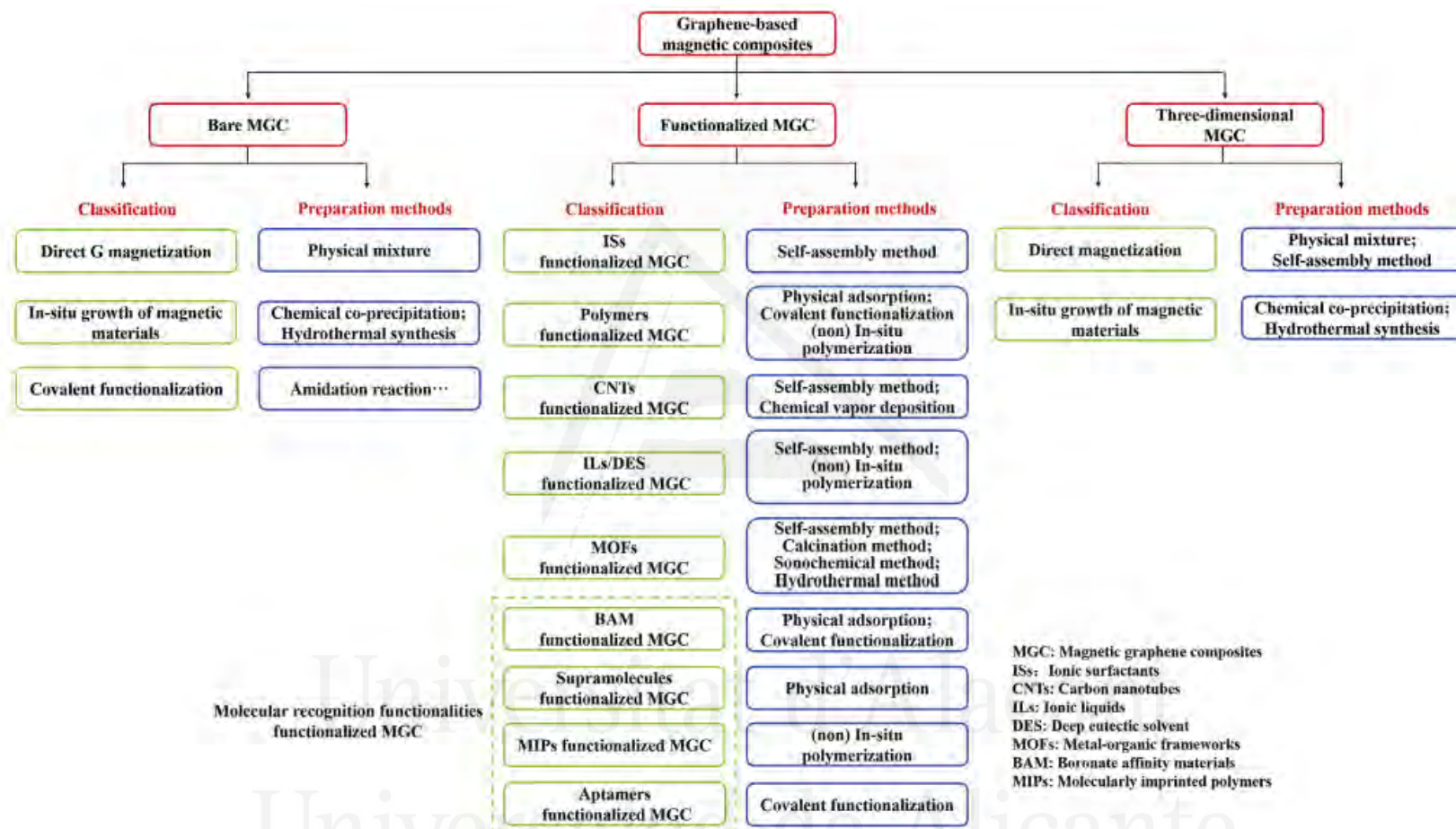


Figura 4.34 Métodos de síntesis de composites magnéticos basados en grafeno [Fuente: referencia 125].

El composite magnético formado por la unión de láminas de grafeno puras y un compuesto magnético capaz de aportar la facilidad de manejo es conocido como composite magnético basado en grafeno puro (*bare MGC*). Este tipo de composite al mantener las dimensiones nanométricas de las nanopartículas que lo componen se le considera un nanocomposite. El MGC puro (*bare MGC*) ha sido producido para minimizar los problemas causados por la agregación irreversible de las láminas de grafeno provocadas por las fuertes interacciones de van der Waals. La preparación de MGC puro puede ser realizada mediante diferentes métodos:

(1) Magnetización directa de las láminas de grafeno: consiste en mezclar grafeno y material magnético en disolución, manteniendo la mezcla en agitación o irradiada con energía de ultrasonidos. El compuesto magnético se une a la superficie del grafeno por adsorción física, por lo que el nanocomposite formado no es suficientemente estable para su reutilización. $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{grafeno}$ es un nanocomposite MGC puro sintetizado por este método [137].

(2) Crecimiento “in-situ” del material magnético: se lleva a cabo por dos rutas diferentes; (i) la coprecipitación química de los iones $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ mediante la adición de una disolución de amoníaco en una dispersión acuosa de sales de $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ y grafeno a temperatura elevada y (ii) por la síntesis hidrotermal [138]. La primera es un método directo, pero presenta dificultades en el control de la morfología de las nanopartículas formadas de Fe_3O_4 sobre las láminas de grafeno. La forma y el tamaño de las nanopartículas de magnetita dependen de las condiciones de síntesis (i.e., relación $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$, valor de pH, temperatura y fuerza iónica). Además, las nanopartículas de óxido de hierro no se distribuyen de manera homogénea sobre la superficie del grafeno, ocupando los sitios activos de las láminas de grafeno [139]. La síntesis hidrotermal fue introducida para mejorar las características del nanocomposite obtenido. En este tipo de síntesis, el MGC puro se sintetiza mediante la reducción de Fe^{3+} y GO en presencia de acetato de sodio y polietilenglicol en un autoclave a elevada temperatura (e.g. 200 °C) [140]. De esta manera, se obtiene un nanocomposite con una morfología más controlada y con una mejor distribución de las nanopartículas de Fe_3O_4 sobre las láminas de grafeno lo que permite obtener un

mayor número de sitios activos expuestos y disponibles para la adsorción de los analitos de interés.

(3) Funcionalización covalente: método de síntesis en el cual se establece un enlace químico entre el material magnético y las láminas de grafeno. Para eso, se utiliza GO como precursor. En primer lugar, las nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 preparadas previamente son modificadas con dos agentes de acoplamiento basado en silano, ortosilicato de tetraetilo (TEOS) y (3-aminopropil) trietoxisilano (APTES), que permiten introducir grupos amino en la superficie de las nanopartículas magnéticas. A continuación, las MNPs de Fe_3O_4 modificadas con grupos amino se unen a la superficie del GO vía reacción de amidación. Finalmente, se reduce químicamente el GO, disminuyendo significativamente el número de grupos funcionales epoxi e hidroxilo en el plano basal, lo que genera óxido de grafeno reducido (grafeno) [141].

Los nanocomposites magnéticos basados en grafeno funcionalizado pueden ser obtenidos mediante nueve métodos de preparación diferentes. Debido a que las nanopartículas magnéticas no presentan una capacidad de adsorción significativa en el nanocomposite MGC puro, la adsorción predominante de los analitos de interés ocurre sobre las láminas de grafeno. El grafeno puro, como se ha mencionado anteriormente, exhibe una gran afinidad por compuestos que también poseen anillos de carbono con sistema de electrones π deslocalizados. Por lo tanto, las láminas de grafeno son capaces de adsorber una gran variedad de compuestos en su superficie lo que provoca una adsorción competitiva entre los analitos de interés y los compuestos interferentes [70]. En consecuencia, la funcionalización de las láminas de grafeno del nanocomposite MGC puro se ha hecho necesaria para favorecer la selectividad de la adsorción y permitir la extracción de compuestos polares o iónicos. El MGC puro es poco soluble en agua por lo que disminuye la dispersión de este nanocomposite en muestras acuosas y consecuentemente el área interfacial efectiva entre el adsorbente y la muestra [125]. Por todo ello, se han clasificado los principales métodos de síntesis de nanocomposites magnéticos basados en grafeno funcionalizado en: adición de surfactantes iónicos, adición de polímeros, adición de CNTs, adición

de líquidos iónicos, adición de MOFs y cuatro métodos diferentes de adición de funcionalidades de reconocimiento molecular.

Finalmente, el tercer tipo de composite magnético a base de grafeno es el tridimensional, desarrollado como macroestructuras tridimensionales semejantes a hidrogeles y aerogeles, con la misma finalidad de evitar la agregación irreversible de las láminas de grafeno. Estas estructuras de mayores dimensiones no son clasificadas como nanocomposites pero mantienen la elevada área superficial específica para adsorción de compuestos, además de proporcionar una mejor resistencia mecánica y una estructura porosa bien definida. En general, la gran superficie específica y una correcta elección del tamaño de los poros puede favorecer un mayor número de interacciones con los analitos de interés. Esto es conveniente para la eliminación de los efectos de matriz comunes en extracciones con muestras complejas [142].

4.4.4 Nanocomposites magnéticos y no magnéticos basados en grafeno para la determinación de contaminantes orgánicos

Entre los derivados del grafeno, el GO presenta mayor capacidad para adsorción de compuestos orgánicos debido a sus grupos funcionalizados oxidados que, por interacciones más simples (puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas) son capaces de extraer compuestos orgánicos de matrices acuosas con gran eficiencia y rapidez [143].

Un estudio sobre la adsorción de 1,2,4-triclorobenceno (TCB), 2,4,6-triclorofenol (TCP), 2-naftol y naftaleno (NAPH) sobre láminas de grafeno y GO indicaron que la presencia de un mayor número de grupos oxidados favorece la adsorción de moléculas orgánicas polares. De este modo, el GO presentaba mayor capacidad de adsorción para TCP y 2-naftol ya que los grupos hidroxil de estos compuestos eran capaces de enlazarse a los grupos que contienen oxígeno del GO por puentes de hidrógeno [144].

Un estudio sobre la adsorción de cuatro insecticidas en muestras de agua ha mostrado que la fase magnética de Fe_3O_4 no extrae a los analitos si no que lo hace el grafeno [145].

El óxido de grafeno magnético (nanocomposite $\text{GO}/\text{Fe}_3\text{O}_4$) ha sido utilizado en la técnica MSPE para preconcentrar, de forma simple y eficiente, trazas de

hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs) en muestras de agua ambiental como etapa previa al análisis por cromatografía líquida de alta eficacia acoplada a un detector ultravioleta (HPLC-UV) [52]. El mecanismo de interacción entre los PAHs y el GO se debe principalmente a interacciones del tipo π - π debido a la ausencia de grupos oxidados en los hidrocarburos estudiados.

Qi y col. [146] han desarrollado un nanocomposite de polisacárido y óxido de grafeno (PS-GO) para la adsorción de colorantes orgánicos presentes en disoluciones acuosas. En esta investigación se concluye que los nanocomposites poseen mayor capacidad de adsorción que el grafeno o GO aislados.

Wang y Chen [147] realizaron un estudio sobre la adsorción y desorción de compuestos orgánicos sobre láminas de grafeno. En este estudio se realizaron experimentos para analizar el mecanismo de adsorción de contaminantes orgánicos sobre el grafeno. Se observó que la presencia de iones metálicos sobre las láminas de grafeno favorecía la adsorción de compuestos orgánicos. Los resultados sobre la capacidad de adsorción del GO mostraron que la presencia del ion cadmio (10 mg L^{-1}) aumentaba un 30% la afinidad del naftaleno y un 120% la del 1-naftol por el GO. Debido a la gran cantidad de grupos oxidados en la superficie del GO, los iones metálicos se enlazan a los oxígenos mediante interacciones electrostáticas. De esta forma, los iones metálicos crean nuevos sitios activos, donde pueden interactuar los compuestos no polares via interacción catión- π . Las propiedades de la superficie de los materiales de grafeno también cambian con la variación del pH a través de la protonación o desprotonación de grupos funcionales, principalmente en el caso del GO (intervalo de pH entre 2 y 7). Así, la adsorción del 1-naftol sobre el GO disminuye cuando el pH sobrepasa el rango 2-7. Sin embargo, los sitios activos para la adsorción de contaminantes orgánicos no polares no son tan afectados por las variaciones de pH de la disolución [147].

Por todo lo anterior, se puede concluir que los adsorbentes basados en grafeno poseen características muy favorables para su uso en técnicas de preconcentración para la extracción de contaminantes orgánicos, lo que ha

favorecido el desarrollo de multitud de nanocomposites basados en estos materiales así como de sus aplicaciones.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN UTILIZADAS EN LA PRESENTE MEMORIA

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

5 TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN UTILIZADAS EN LA PRESENTE MEMORIA – ASPECTOS IMPORTANTES Y APLICACIONES ACTUALES

5.1 Microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos

La DLLME está basada en la dispersión de la fase extractante orgánica en el seno de la muestra acuosa con el fin de aumentar el área de contacto entre ambas fases y, de esta forma, favorecer la transferencia de materia. El procedimiento original de esta modalidad de microextracción en fase líquida consiste en un sistema de tres componentes en el que se utiliza un disolvente orgánico más denso que el agua como fase extractante (20-100 μL) y otro disolvente orgánico como agente dispersante (0.1-2 mL). El disolvente dispersante es parcialmente miscible tanto en la fase extractante como en la muestra acuosa con el fin de lograr una dispersión homogénea. Una vez finalizada la extracción, las fases son separadas por centrifugación y el extracto enriquecido con el analito es recogido para ser analizado.

A partir de su introducción en 2006 [21], la DLLME ha sufrido numerosas modificaciones. Una de estas modificaciones ha sido la sustitución de los disolventes comúnmente utilizados por otros disolventes de menor toxicidad. En lugar de disolventes clorados, fueron utilizados alcoholes de cadena larga u otros hidrocarburos, que por ser menos densos que el agua se quedan en la superficie de la muestra acuosa después de la etapa de centrifugación.

Esta técnica miniaturizada presenta algunas ventajas como poseer unos tiempos de extracción reducidos debido a la elevada superficie de contacto entre las finas gotas de fase extractante y la muestra, unos altos factores de enriquecimiento y un fácil manejo. La DLLME también ha contribuido a la eliminación de ciertos inconvenientes observados en otras técnicas anteriores de LPME, como el desprendimiento de la gota en SDME o la manipulación de la fibra en HF-LPME.

En la DLLME, el disolvente dispersante permite aumentar el área superficial de contacto entre la fase acuosa y la fase extractante de manera que se alcanza más rápidamente el equilibrio de reparto del analito y se consigue, por lo tanto, una rápida extracción del mismo.

El factor de enriquecimiento (*enrichment factor*, EF), también llamado factor de preconcentración (*preconcentration factor*, PF), se define como el cociente entre la concentración de analito en la fase extractante al alcanzar el equilibrio y la concentración inicial del analito en la fase acuosa:

$$EF = \frac{[\text{analito}]_{\text{fase extractante, equilibrio}}}{[\text{analito}]_{\text{fase acuosa, inicial}}}$$

y la eficiencia de extracción (EE) se define como el porcentaje de analito extraído a la fase extractante:

$$EE = \frac{n_{\text{extractante}}}{n_{\text{acuosa}}} = \frac{V_{\text{extractante}} \cdot [\text{analito}]_{\text{extractante, eq}}}{V_{\text{acuosa}} \cdot [\text{analito}]_{\text{acuosa, inic}}} \cdot 100 = \left(\frac{V_{\text{extractante}}}{V_{\text{acuosa}}} \right) \cdot EF \cdot 100$$

siendo n_i los moles de analito en cada una de las fases y V_i el volumen de fase i .

El factor que más afecta a la eficiencia de extracción en el proceso DLLME es la naturaleza del disolvente extractante. Para la elección del extractante se debe tener en cuenta su densidad, su capacidad para extraer el analito de interés y su compatibilidad posterior con el detector. Los hidrocarburos halogenados tales como clorobenceno, cloroformo, tetracloruro de carbono y tetracloroetano son los más utilizados. Al aumentar el volumen de fase extractante el factor de preconcentración disminuye, ya que la recta de reparto de equilibrio dará una concentración menor de analito en la fase extractante (ver sección 4.2.1). Por lo tanto, el valor más adecuado para este volumen es aquel que satisface la situación de compromiso entre elevados factores de preconcentración y el mínimo volumen necesario que permite aplicar la técnica de detección seleccionada. Los volúmenes habituales de fase extractante se encuentran en el intervalo de 5 a 100 μL .

El volumen de agente dispersante afecta a la formación de la fase dispersa, es decir, a la eficiencia con la que se dispersa el disolvente extractante y, por tanto, a la eficiencia de extracción. Este volumen óptimo depende del volumen de fase extractante y fase acuosa utilizados. En general se emplean volúmenes en el intervalo de 0.5 a 1.5 mL. Aunque se conozca la solubilidad de la fase extractante en agua, la presencia del agente dispersante (acetona, acetonitrilo, metanol, etc.) altera este valor y en consecuencia siempre resulta imprescindible realizar estudios para encontrar la composición idónea de los tres componentes. Hay que tener en cuenta que el dispersante habitualmente deteriora el coeficiente de reparto del analito (K_d), por lo que algunos autores han recurrido recientemente al empleo de ultrasonidos para generar la fase dispersa.

En DLLME, el tiempo de extracción es el tiempo que transcurre desde la introducción de la mezcla de los disolventes extractante y dispersante hasta la centrifugación. En realidad, el tiempo de extracción tiene poco efecto en la eficacia del proceso de extracción debido a que el transporte del analito desde la fase acuosa (muestra) a la fase extractante suele ser muy rápido, y el estado de equilibrio se alcanza de forma casi instantánea, lo que supone una notable ventaja.

Además de los parámetros mencionados, el volumen de muestra, su pH y concentración salina y las condiciones de centrifugación (i.e., velocidad y tiempo) son comúnmente optimizados en las diferentes aplicaciones de la técnica.

Los líquidos iónicos (*ionic liquids*, ILs) han sido propuestos como fase extractante de la técnica DLLME como una alternativa eficiente, selectiva y respetuosa con el medio ambiente. Debido a su baja presión de vapor son compuestos relativamente seguros. Los ILs son sales líquidas a temperatura ambiente cuyo punto de fusión máximo no excede los 100 °C [148]. En la mayoría de los casos, los ILs están formados por cationes orgánicos y aniones orgánicos o inorgánicos. Como consecuencia, la combinación de la gran variedad de cationes y aniones existentes da lugar a un enorme número de ILs con propiedades diferentes. Esto proporciona un amplio intervalo de posibilidades entre las que se puede seleccionar el IL más apropiado para una aplicación concreta [148].

La técnica DLLME presenta una alta eficiencia de extracción debido a los altos factores de enriquecimiento obtenidos. Sin embargo, debido al requerimiento de un volumen de disolvente dispersante en el rango de mL el extracto es diluido lo que deteriora los factores de enriquecimiento y la precisión. Por ello, se han propuesto modalidades de DLLME en las cuales no se utiliza agente dispersante. En estos casos se suele introducir una etapa de agitación con vórtex [149] o energía de ultrasonidos [150] que dispersa la fase extractante en el seno de la muestra favoreciendo la transferencia de materia (analitos) a la fase extractante.

E. Fernández y col. [149] han propuesto la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa asistida por vórtex (*vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction*, vortex-assisted RP-DLLME) para la determinación de fenoles hidrofílicos en muestras de aceite de oliva. En esta nueva modalidad de la DLLME, la agitación con vórtex ha sido utilizada para dispersar la fase extractante (disolución acuosa ácida) en las muestras de aceite.

J. Regueiro y col. [150] han utilizado la energía de ultrasonidos para dispersar la fase extractante en muestras de agua ambiental para facilitar la extracción de contaminantes emergentes y pesticidas. Esta modalidad de DLLME ha sido nombrada como microextracción-emulsificación asistida por ultrasonidos (*ultrasound-assisted emulsification-microextraction*, USAEME). Esta misma técnica ha recibido una nomenclatura diferente en los últimos años, microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos (*ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction*, USA-DLLME) [151].

En la revisión de M.J. Trujillo-Rodríguez y col. [152] se ha presentado la energía de ultrasonidos como una excelente alternativa para la sustitución del agente dispersante de la técnica de extracción DLLME. Un gran número de publicaciones ha utilizado los ultrasonidos para aportar rapidez y simplicidad al procedimiento de extracción DLLME. La energía de ultrasonidos aumenta la superficie de contacto entre fases así como la temperatura a nivel microscópico, aunque no en gran medida a nivel macroscópico y, consecuentemente, disminuye el tiempo de extracción.

El movimiento vibratorio de un sólido dentro de un fluido con una frecuencia de vibración dentro de un intervalo específico genera unas ondas mecánicas (sonido) que se propagan a través del fluido. La energía ultrasónica generada es capaz de aumentar a nivel microscópico la temperatura en el fluido hasta 5000 °C y la presión hasta 2000 atmósferas. Los ultrasonidos se definen como una onda mecánica de frecuencia mayor a la que es capaz de percibir el oído humano (16 Hz - 18 kHz) y cuyas frecuencias se encuentran en un intervalo comprendido entre 20 kHz y 10 MHz. Las frecuencias de ultrasonidos pueden dividirse en zona de alta frecuencia (5 - 10 MHz), utilizadas en equipos de diagnóstico, y en zona de baja frecuencia (20 kHz - 2 MHz), frecuencias utilizadas para limpieza y favorecimiento de reacciones químicas [153]. Las ondas sonoras se suelen representar como ondas sinusoidales con ciclos de compresión y rarefacción (o expansión) (Figura 5.1) [153]. En cada ciclo se provoca una presión en el líquido que equivale a la presión acústica suministrada por la onda y la presión hidrostática existente en el medio líquido, siendo la del ciclo de compresión positiva y la del ciclo de rarefacción negativa. Cuando la presión negativa que se ejerce durante un ciclo de rarefacción es suficientemente grande, la distancia entre las moléculas del medio transmisor alcanzan una distancia crítica (R) a la cual las fuerzas intermoleculares que mantienen unidas las moléculas del líquido son superadas, rompiéndose el líquido y creándose las burbujas de cavitación que son la clave de la sonoquímica. Durante los ciclos de compresión/rarefacción, las microburbujas de cavitación pueden ir aumentando su tamaño y, finalmente, colapsar mediante una implosión en la que se libera una gran cantidad de energía, llegándose a alcanzar dentro de las burbujas colapsadas temperaturas y presiones muy altas (Figura 5.1). Estas implosiones representan la parte más importante de la química asistida o favorecida por ondas de ultrasonidos (sonoquímica) ya que son las causantes de los procesos químicos y mecánicos [153].

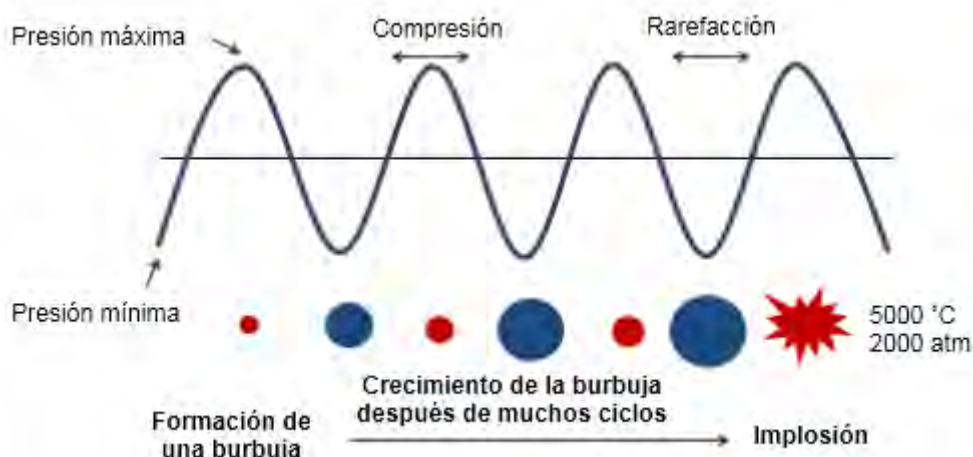


Figura 5.1 Representación de una onda sonora y del crecimiento > colapso de una burbuja de cavitación [Fuente: referencia 153].

5.2 Extracción en fase sólida magnética

Según Šafaříková y Šafařík (1999) [44], la técnica de preconcentración MSPE es muy útil para la determinación de compuestos biológicamente activos o xenobióticos en grandes volúmenes de disoluciones y/o suspensiones. La separación y preconcentración de analitos presentes en grandes volúmenes de muestra mediante la técnica convencional de SPE es un proceso largo. De este modo, la MSPE aparece como un nuevo procedimiento de SPE que utiliza adsorbentes magnéticos capaces de reducir drásticamente el tiempo de la extracción debido a la gran superficie de contacto entre la muestra y el adsorbente así como la rápida separación de las fases sólida y líquida por la aplicación de un campo magnético externo (imán). El procedimiento consiste en dispersar el adsorbente magnético sólido en la muestra acuosa. Las partículas del adsorbente, en general de dimensiones nanométricas (nanocomposites), son dispersadas homogéneamente por toda la muestra mediante agitación manual o dispositivos alternativos como el vórtex [154] o la energía de ultrasonidos [155]. Tras la extracción, el adsorbente sólido enriquecido es separado de la muestra (fase líquida) mediante la acción de un campo magnético externo. A continuación, la fase líquida sobrenadante es eliminada y el adsorbente magnético puede ser llevado directamente a un sistema de desorción térmica o

bien dispersado en un disolvente apropiado para la desorción/elución de los analitos. Si en el procedimiento de elución se emplea un disolvente, es necesario aplicar una fuente de energía que facilite la desorción de los analitos (e.g., vórtex, ultrasonidos, etc...) [156,157]. Una vez finalizada la desorción, se utiliza nuevamente el imán para separar el adsorbente magnético del disolvente enriquecido en analito (eluato), y este último es recogido para su posterior análisis.

En general, los factores que pueden afectar a la técnica MSPE, son: el volumen de muestra, la cantidad de adsorbente, el tiempo de extracción, la fuerza iónica de la muestra, el pH de la muestra, el tipo de eluyente, el volumen de eluyente y el tiempo de desorción.

- (i) Volumen de muestra: volúmenes muy grandes de muestra disminuyen el porcentaje de recuperación de los analitos analizados [44] debido a que la pequeña cantidad de adsorbente utilizada en la extracción no es capaz de retener cuantitativamente los analitos de la fase acuosa.
- (ii) Cantidad de adsorbente: el estudio de la cantidad del adsorbente sólido utilizado en una MSPE es muy importante debido a los posibles problemas de saturación de la superficie disponible para su adsorción. Experimentos realizados por Han y col. [52] observaron que para una misma cantidad de PAHs presente en la muestra, un incremento en la cantidad de adsorbente favorecía la adsorción de una mayor cantidad de estos compuestos. Sin embargo, a partir de un determinado valor de la masa de adsorbente la cantidad de PAHs adsorbidos permanecía constante. Esto significa que a partir de una cantidad óptima de adsorbente, se alcanza la máxima capacidad de adsorción del adsorbente, no siendo necesario incrementar la masa del mismo para obtener mayores factores de preconcentración.
- (iii) Tiempo de extracción: la preparación de la muestra generalmente consume más de 60% del tiempo de un análisis [44], por lo que es muy conveniente optimizar el tiempo de extracción de la MSPE a fin de reducir el tiempo de esta etapa del análisis. Dependiendo del analito de interés, del tipo de adsorbente y la modalidad de extracción utilizada habrá un tiempo óptimo (en min) que permita la adsorción cuantitativa de los analitos, lo cual se

refleja en mejores respuestas en las determinaciones analíticas. El objetivo de un proceso de extracción, es alcanzar el equilibrio de distribución del sistema correspondiente de tal forma que se extraiga la cantidad máxima de analito. Cuando la cantidad de analito en cada fase es constante, se considera que el sistema ha alcanzado el equilibrio y, por lo tanto, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio debería ser el tiempo óptimo de extracción. Para alcanzar el equilibrio en un menor tiempo es necesario utilizar un método de agitación eficiente que favorezca la difusión del/los analito/s hacia la fase extractante.

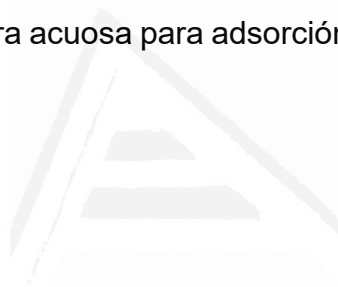
- (iv) Fuerza iónica de la muestra: el proceso de extracción se ve muy influido por la cantidad de sales presentes en la muestra acuosa debido al aumento de la fuerza iónica de la disolución. La adición de sales a la muestra acuosa puede favorecer la extracción debido al efecto conocido como “salting-out” (efecto salino desplazante) ya que modifica el coeficiente de partición de algunos compuestos [158]. Sales como NaCl, KCl o Na₂SO₄ disminuyen la solubilidad de los analitos en agua favoreciendo su paso a otros sistemas. Dependiendo de la afinidad del analito hacia el adsorbente, la adición de sal puede ser favorable, desfavorable o incluso no ser significativa en el proceso de extracción.
- (v) pH de la muestra: el pH de la disolución acuosa puede modificar la conformación de una molécula y afectar al equilibrio de disociación del analito en medio acuoso [52]. En MSPE es necesario conocer el tipo de interacción existente entre el adsorbente y el analito. De este modo, por ejemplo, si la adsorción ocurre mediante una interacción electrostática, conviene ajustar el pH de la muestra de manera que el analito tenga carga opuesta a la carga del adsorbente.
- (vi) Tipo de eluyente: la elección del disolvente para la etapa de desorción (elución) también es muy importante. En la desorción del analito es necesario utilizar un disolvente (eluyente) que tenga afinidad por el analito, favoreciendo su desorción. La polaridad del analito debe ser igual a la del eluyente para favorecer la migración del/os analito/s de interés del adsorbente sólido hacia la fase orgánica (eluyente). El eluyente debe tener

volatilidad media o baja para alcanzar una desorción adecuada del/os analito/s y ser compatible con la técnica analítica elegida para la determinación del/los analito/os de modo que permita obtener buena señal en los mismos. Por ello, es muy recomendable realizar un estudio previo para seleccionar el eluyente más apropiado para una aplicación concreta. Los eluyentes considerados en un estudio de optimización deberían desorber la mayor cantidad posible de analito/s y generar la mejor señal posible en el método de separación/detección seleccionado. Además, es importante considerar los efectos nocivos tanto para el medioambiente como para los analistas.

- (vii) Volumen de eluyente: esta variable condiciona la concentración final en el eluyente. Un menor volumen de eluyente produce un aumento en la concentración del analito, pero también puede ser insuficiente para desorber totalmente una cantidad adecuada de analito que produzca una buena señal en el sistema de separación/detección.
- (viii) Tiempo de desorción: el tiempo consumido en la desorción de los analitos del adsorbente debe ser el mínimo posible a fin de obtener una técnica de extracción rápida. Cuando se utilice una fuente de energía para promover una desorción más rápida de los analitos hay que tener en cuenta que cuanto más tiempo estén los analitos expuestos a esta energía (e.g., ultrasonidos) mayor es la posibilidad de degradación de los mismos. Por tanto, es necesario considerar el tiempo de desorción como variable (factor) experimental en un estudio de optimización de las variables de la extracción.

Los principios en que se basan la técnica MSPE han sido utilizados en el desarrollo de nuevas modalidades de la misma: (i) extracción adsorptiva magnética en espacio de cabeza (*magnetic headspace adsorptive extraction*, Mag-HSAE) [159], (ii) microextracción en fase sólida magnética dispersiva (*magnetic dispersive solid-phase microextraction*, MDSPME) [160], (iii) extracción en fase sólida magnética asistida por ultrasonidos (*ultrasound assisted magnetic solid phase extraction*, UA-MSPE) [161], entre otras. La Mag-HSAE ha sido empleada como técnica de pretratamiento de muestras de aguas para determinación de clorobencenos por cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas utilizando óxido de grafeno decorado con óxido de hierro como adsorbente. En la metodología que ha utilizado la técnica MDSPME, se han determinado metales pesados por la técnica de espectroscopía de emisión por plasma de acoplamiento inductivo (*inductively coupled plasma optical emission spectrometry*, ICP-OES) en muestras de orina. Finalmente, la técnica UA-MSPE ha sido utilizada para la preconcentración de arsénico en muestras de agua de río antes de su determinación por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (*inductively coupled plasma mass spectrometry*, ICP-MS). En la metodología UA-MSPE/ICP-MS se ha desarrollado un nanocomposite magnético de óxido férrico-ferroso sintetizado por métodos de coprecipitación y sol-gel y se ha propuesto la energía de ultrasonidos como fuente de energía para el procedimiento de extracción (dispersión del nanocomposite en la muestra acuosa para adsorción de los iones As(III) y As(V)) y su posterior desorción.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

6 DISEÑO ESTADÍSTICO DE EXPERIMENTOS

El diseño estadístico de experimentos o diseño experimental es una metodología basada en herramientas matemáticas y estadísticas que permite planificar un experimento para obtener unos datos apropiados que permita alcanzar conclusiones válidas y objetivas [162]. Para analizar un problema que involucre datos sujetos a errores experimentales es necesario una metodología estadística que seleccione la estrategia experimental óptima, que permita obtener la información buscada con el mínimo coste y evalúe los resultados experimentales garantizando la máxima fiabilidad de las conclusiones. Por lo tanto, siempre tendremos dos aspectos fundamentales en cualquier método experimental propuesto para solucionar problemas: el diseño del experimento y el análisis estadístico de los resultados [162].

De forma general, el diseño experimental se aplica a sistemas o procesos en los cuales se obtiene una o más respuestas (variables dependientes) que dependen de los valores de una o más variables controlables (variables independientes), también conocidas como factores. Además, las respuestas pueden depender también de otras variables no controladas por el experimentador (Figura 6.1).

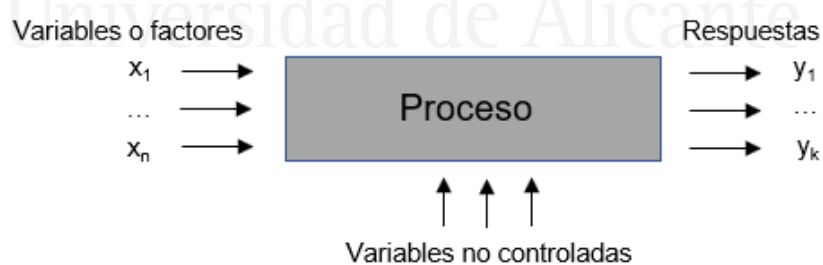


Figura 6.1 Esquema general de un proceso o sistema [Fuente: referencia 162].

La optimización mediante diseño experimental es una buena alternativa frente a la optimización clásica realizada paso a paso. El método clásico consiste en fijar todos los factores que están siendo investigados a un nivel determinado, menos uno de ellos. Este último es el único factor variado durante los diferentes

experimentos hasta que se encuentre la mejor respuesta. Una vez encontrado el valor óptimo de este factor, se toma este valor como fijo y se procede a variar otro factor dentro de un intervalo prefijado. El proceso se repite para todos los factores y al finalizar el proceso completo se obtiene un conjunto de valores formado por el óptimo de cada factor estudiado. Sin embargo, el proceso es largo y tedioso, además de ser caro debido a la realización de muchos experimentos hasta que se encuentre el valor óptimo para cada factor estudiado. Una alternativa más eficiente consiste en variar más de un factor simultáneamente al realizar un nuevo experimento (análisis multivariante). De este modo, se alcanza una mayor eficiencia con un menor número de experimentos y adicionalmente se obtiene información sobre las interacciones entre factores. El diseño experimental proporciona el marco matemático para modificar todos los factores simultáneamente y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos. Para utilizar esta metodología en el estudio de la optimización de experimentos se requiere considerar las siguientes etapas:

I. Comprender el problema y definir el objetivo

Debido a que el diseño experimental es una metodología para encontrar respuestas a problemas perfectamente identificados y definidos, es necesario tener una comprensión profunda del sistema, del problema, y recopilar toda la información disponible y relevante antes de iniciar los experimentos del diseño.

II. Identificar los factores y niveles

Se debe identificar todos los factores (variables independientes) que pueden influir sobre el proceso y la respuesta, aunque a priori se crea que pueden tener poca importancia. Los factores no controlados pueden variar las respuestas, dificultando el análisis final. Una búsqueda bibliográfica previa a la experimentación es de extrema importancia para decidir qué factores deberían ser estudiados y cuales serían los niveles específicos a utilizar en los experimentos. Cuando el objetivo es el escrutinio de factores o la caracterización del proceso, es conveniente mantener bajo el número de niveles de los factores (lo más común es utilizar dos niveles).

III. Selección de la variable respuesta

El experimentador debe estar seguro de que la respuesta a medir realmente proporcione información útil acerca del proceso en estudio. Frecuentemente se utiliza como variable respuesta el promedio o la desviación estándar (o ambos) de la característica medida.

IV. Elección del diseño experimental

Es fundamental tener presente el objetivo del diseño experimental al seleccionar el diseño. Después de haber realizado correctamente los tres pasos anteriores, la selección del diseño experimental es una tarea relativamente sencilla.

V. Realización de la experimentación

El diseño experimental generalmente está descrito mediante variables codificadas correspondientes a los factores elegidos para el estudio. Se comprueba si los experimentos son posibles y se realiza la experimentación en un orden aleatorio con respecto al orden listado. La realización de los experimentos en orden aleatorio es necesaria para asegurar que los factores no contemplados no introduzcan confusión y/o sesgo en los resultados. Además, es importante controlar el proceso cuidadosamente para asegurar que todo se haga conforme a lo planeado. Los errores cometidos durante el procedimiento serán detectados en el análisis de datos posterior.

VI. Análisis de datos

Deben emplearse métodos estadísticos para analizar los datos con la finalidad de que los resultados y conclusiones sean objetivos más que apreciativos. Si el experimento ha sido diseñado correctamente y se ha realizado conforme al diseño previsto, los métodos estadísticos que se requieren no son complicados. Existen muchos paquetes de software excelentes para el análisis de datos y los métodos gráficos sencillos son importantes en la interpretación de tales datos.

Conviene resaltar que los métodos estadísticos no pueden probar que un factor (o varios factores) tiene un efecto particular; sólo proporcionan directrices para la veracidad y validez de los resultados. Los métodos estadísticos, aplicados adecuadamente, no permiten probar algo experimental, sólo hacen

posible obtener el error probable de una conclusión o asignar un nivel de fiabilidad a los resultados. La principal ventaja de los métodos estadísticos es que agregan objetividad al proceso de toma de decisiones. Las técnicas estadísticas, junto a un buen conocimiento técnico del proceso y al sentido común, suelen llevar a conclusiones razonables.

De este modo, es recomendable utilizar un programa estadístico (software) que proporcione el número de experimentos que deben ser realizados indicando los niveles de cada factor en cada experimento. Estos programas utilizan herramientas estadísticas que proporcionan un diseño factorial (e.g., Plackett-Burman) capaz de combinar los factores en los niveles establecidos previamente, resultando en una matriz factorial cuyas variables respuestas que se obtendrán de los N experimentos serán analizadas por una herramienta de análisis de varianza (e.g., ANOVA).

VII. Conclusiones y recomendaciones

Una vez que se han analizado los datos, el experimentador debe extraer conclusiones prácticas de los resultados y recomendar un tipo de acción. También debe realizarse un seguimiento y pruebas de confirmación para validar las conclusiones del diseño.

Existen varios tipos de diseños experimentales dependiendo de las aplicaciones. En las metodologías desarrolladas en esta memoria se ha utilizado el diseño factorial fraccionado de Plackett-Burman y el diseño central compuesto, que serán comentados brevemente a continuación.

6.1 Diseño factorial

En el diseño factorial se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores estudiados en cada ensayo [162]. Los diseños factoriales son los más eficientes para estudiar los efectos producidos por dos o más factores los cuales tienen dos o más niveles (la notación más habitual para los factores, por lo general, es el valor -1 para el nivel inferior y el valor +1 para el nivel superior del experimento). El efecto de un factor se define como el cambio en la variable respuesta producido por un cambio en el nivel del factor.

Existen varios casos especiales del diseño factorial general que resultan importantes porque son utilizados ampliamente en el trabajo de investigación y,

además, éstos constituyen la base para otros diseños de gran valor práctico. El caso más importante es el diseño factorial completo 2^k , en el cual se tienen k factores con dos niveles cada uno (superior e inferior), aunque también es posible realizar diseños a 3 y 5 niveles, 3^k y 5^k respectivamente. Debido a que en el diseño 2^k sólo hay dos niveles para cada factor, se debe suponer que la respuesta es aproximadamente lineal en el intervalo de los niveles elegidos de los factores. El modelo estadístico del diseño 2^k describe los experimentos más adecuados para conocer simultáneamente qué efecto tienen los k factores sobre una respuesta y descubrir si interaccionan entre ellos. Sin embargo, incluso para un número pequeño de factores, el número de combinaciones o tratamientos en un diseño 2^k es grande.

Muchas veces no se cuenta con los recursos necesarios para llevar a cabo el experimento más de una vez, o no se dispone de tiempo para llevarlo a cabo una segunda vez, por lo que el investigador se ve en la necesidad de realizar el experimento una sola vez. A este tipo de diseño factorial 2^k se le llama *factorial no replicado*.

Los diseños factoriales presentan varias ventajas. Son más eficaces que los métodos de optimización en los cuales se varía solo un factor ya que permiten obtener más información con el menor número de experimentos posible. Además, un diseño factorial es necesario cuando hay presentes interacciones para evitar conclusiones erróneas. Finalmente, estos diseños permiten estimar los efectos de un factor a varios niveles de los otros factores, así como interacciones entre dichos factores, aportando conclusiones que son válidas en el intervalo de condiciones experimentales estudiadas.

6.2 Diseño factorial fraccionado

6.2.1 Definición general

A medida que el número de factores en un diseño factorial 2^k aumenta, el número de ensayos necesarios para obtener un diseño completo sobrepasa rápidamente los recursos de la mayoría de los experimentadores. Un diseño 2^6 requiere 64 ensayos. En este caso sólo 6 de los 63 grados de libertad (n° de ensayos menos 1) corresponden a los efectos principales y únicamente 15

corresponden a las interacciones de dos factores. Los 42 restantes corresponden a las interacciones de tres o más factores.

Si el experimentador puede razonablemente suponer que algunas interacciones de orden superior son despreciables, la información sobre los efectos principales y las interacciones de menor orden puede obtenerse realizando sólo una fracción del diseño factorial completo. Estos diseños factoriales fraccionados [162] se encuentran entre los tipos más ampliamente utilizados en el diseño de productos y procesos así como en la detección y solución de problemas.

Un uso importante de este tipo de diseño se da en los experimentos de escrutinio, también llamados de tamizado, cribado o “*screening*”. Éstos son diseños en los cuales se consideran muchos factores con el fin de identificar aquellos que presentan efectos importantes. Los experimentos de escrutinio suelen realizarse en las primeras fases de un proyecto o proceso de optimización, cuando es probable que muchos de los factores inicialmente considerados tengan poco o ningún efecto sobre la respuesta. Los factores que se identifican como importantes en esta primera etapa son investigados entonces con mayor detalle en diseños posteriores.

El empleo exitoso de los diseños factoriales fraccionados se basa en tres ideas fundamentales:

- (i) **Principio de dispersidad de efectos:** cuando existen varias variables es probable que el sistema o proceso se vea influido principalmente por algunos de los efectos principales e interacciones de orden superior.
- (ii) **La propiedad de proyección:** los diseños factoriales fraccionados pueden ser extendidos a diseños factoriales más grandes.
- (iii) **Experimentación secuencial:** es posible combinar los ensayos de dos o más diseños factoriales fraccionados para conformar de manera secuencial un diseño más grande y estimar los efectos de los factores y las interacciones de interés.

El diseño factorial fraccionado más utilizado es el conocido como Plackett-Burman, que es un diseño saturado que se utiliza principalmente para identificar las variables significativas del proceso.

6.2.2 Diseño de Plackett-Burman

Este diseño factorial fraccionado fue propuesto en 1946 por Plackett y Burman [162]. Es un diseño de dos niveles (± 1) y es utilizado para estudiar k factores con N ensayos, siendo N múltiplo de 4. Este tipo de diseño es útil cuando $N = 8, 12, 20, 24, 28$ y 36 . La Tabla 6.1 presenta la matriz del diseño para 11 factores (k) con 12 ensayos (N), uno de los más utilizados.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Tabla 6.1 Matriz de experimentos del diseño factorial fraccionado de Plackett-Burman para estudiar $k=11$ factores en $N=12$ experimentos.

Experimento	Factores										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
2	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
3	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
4	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
6	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	+1
7	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1
8	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
9	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	-1
10	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
11	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	+1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Este diseño asume que las interacciones pueden ser ignoradas y que únicamente los efectos principales son calculados con un número reducido de experimentos. Se emplea cuando se quiere conocer los factores que son significativos en el proceso y cuáles afectan en menor grado y, por lo tanto, pueden ser fijados. Posteriormente los factores que afectan significativamente al proceso son optimizados mediante un diseño factorial completo u otro tipo de diseño, como el diseño central compuesto.

En la última década se ha introducido el uso de factores ficticios o factores fantasma (*"dummy"*) en este tipo de diseño [162]. El objetivo de la utilización de estos factores fantasma es la estimación del error experimental utilizado en la interpretación estadística. De este modo, al aplicar un diseño de Plackett-

Burman, tenemos un número de factores reales y el resto hasta N-1 de factores fantasmas. Por ejemplo, si utilizamos la matriz de 12 ensayos, podríamos tener 6 factores reales y 5 factores fantasma.

6.3 Diseño central compuesto

El diseño central compuesto (*central composite design*, CCD) es un diseño cuya superficie de respuesta se ajusta a un polinomio de segundo orden. Este tipo de diseño se utiliza para optimizar y evaluar los factores principales, las interacciones y los efectos cuadráticos. Si se realiza la optimización de tres factores, como en el primer trabajo de la presente memoria (descrito posteriormente en el capítulo 9), el diseño viene definido por el siguiente modelo polinomial de segundo orden:

$$y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_3x_3 + \beta_{12}x_1x_2 + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_2x_3 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_{33}x_3^2$$

donde y es la variable respuesta, x_1 , x_2 y x_3 son las variables independientes, β_0 es la ordenada en el origen y β_1 - β_{33} son los coeficientes de regresión. Dado que no es posible representar en este caso la respuesta del sistema en función simultáneamente de todas las variables en estudio, la respuesta viene representada por una superficie en un espacio tridimensional que muestra el efecto que ejerce un par de variables por separado sobre la función objetivo. En la Figura 6.2 se muestra una superficie de respuesta obtenida para dos de los tres factores estudiados.

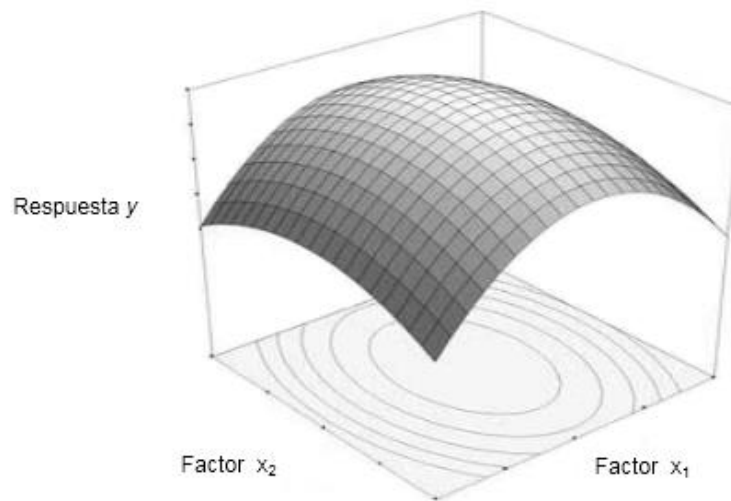


Figura 6.2 Superficie de respuesta tridimensional.

Este tipo de diseño fue introducido por Box y Wilson en el año 1951 y es el más utilizado de los diseños de segundo orden. Por ello, este diseño también es conocido por diseño Box-Wilson. El diseño CCD está construido por la superposición de varios diseños. Consiste en un diseño factorial (2^k) aumentado con puntos estrella ($2k$) y con un punto central, el cual puede ser replicado n veces [162]. Los puntos correspondientes al diseño factorial representan el modelo de primer orden junto con las interacciones entre dos factores. Los puntos centrales proporcionan información sobre la existencia de una posible curvatura en el sistema, y si existe curvatura, los puntos estrella permiten estimar los términos cuadráticos.

En la presente memoria el tipo de diseño CCD utilizado es el conocido como diseño central compuesto circunscrito (*circumscribed central composite design*, CCCD), en el que los puntos estrella se encuentran localizados a una distancia $\pm \alpha$ ($|\alpha| > 1$) del centro del diseño, el cual es situado en el punto 0. El valor de α depende de las propiedades deseadas del diseño y del número de factores. Para establecer la ortogonalidad y rotabilidad del diseño, las réplicas del punto central (n) se fijan en 9 y $\alpha = \sqrt[4]{2^k} = 1,682$ [162].

En el diseño CCCD utilizado en la primera metodología propuesta en esta memoria se han estudiado tres factores o variables a 5 niveles, siendo éstos el

punto estrella inferior ($-\alpha$), el nivel bajo (-1), el nivel central (0), el nivel superior (+1) y el punto estrella superior ($+\alpha$).



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

ANALITOS OBJETO DE ESTUDIO



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

7 ANALITOS OBJETO DE ESTUDIO

Los analitos estudiados en este trabajo fueron seleccionados con el objetivo de desarrollar metodologías miniaturizadas más eficientes y respetuosas con el medioambiente para el análisis de microcontaminantes orgánicos en muestras de agua. Conociendo los daños ocasionados en los equipos de aprovechamiento del biogás producido por estaciones depuradoras de aguas residuales (*Wastewater treatment plants*, WWTPs) y como forma de ofrecer alternativas a la eliminación previa de los compuestos que ocasionan estos daños, se han desarrollado dos metodologías para la determinación de siloxanos lineales y cíclicos presentes en aguas residuales. También se ha evaluado la aplicabilidad de una de las metodologías a la determinación de siloxanos en aguas potables ya que estos compuestos han sido clasificados como cancerígenos para algunas especies, pudiendo llegar al ser humano a través del agua o especies acuáticas que se utilizan en la alimentación. De este modo se han estudiado los siloxanos lineales hexametildisiloxano (L2), octametiltrisiloxano (L3), decametiltetrasiloxano (L4), dodecametilpentasiloxano (L5); los siloxanos cíclicos hexametilciclotrisiloxano (D3), octametilciclotetrasiloxano (D4), decametilciclopentasiloxano (D5) y dodecametilciclohexasiloxano (D6); y el producto de la hidrólisis de los polidimetilsiloxanos, el trimetilsilanol (TMS). Por otro lado, también se ha estudiado el explosivo nitroaromático 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) como analito modelo en la técnica de pretratamiento MSPE. Este explosivo ha sido clasificado como contaminante orgánico de aguas superficiales y subterráneas ya que muestra efectos tóxicos severos en animales y humanos.

7.1 Siloxanos

Descubiertos por Frederick S. Kipping en el siglo XX [163], los siloxanos son polímeros de cadenas saturadas de hidruros de silicio-oxígeno con alternancia entre átomos de silicio y oxígeno (cada átomo de silicio se separa de sus vecinos más próximos de silicio por átomos de oxígeno individuales). Se presentan en forma de estructuras lineales o ramificadas cuyos enlaces Si-O presentan sustituyentes orgánicos, en su mayoría grupos metilo (-CH₃) [163]. El término

"siloxano" deriva de la abreviatura de **silicio**, **oxígeno** y **alcano** [164]. La estructura general de un siloxano lineal es $\text{H}_3\text{Si}[\text{OSiH}_2]_n\text{OSiH}_3$ y de un siloxano ramificado, $\text{H}_3\text{Si}[\text{OSiH}_2]_n\text{OSiH}[\text{OSiH}_2\text{OSiH}_3]_2$ [164].

El significado del término "siloxano" es similar al de "silicona", aunque ambos no están exactamente definidos [165]. Los compuestos nombrados como siliconas o como siloxanos son compuestos orgánicos formados predominantemente por unidades $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2-\text{O}-$. El término "siloxano" se utiliza más frecuentemente para especies oligoméricas (moléculas cuyos radicales asociados son distintos entre sí) y el término "silicona" preferentemente para polímeros (moléculas con dos o más radicales de la misma especie) [165]. En una clasificación más tradicional, estos compuestos de hidruros de silicio-oxígeno son conocidos como poliorganosiloxanos [163]. Así mismo, pueden contener grupos alquilo o fenilo (normalmente sustituidos) en lugar de grupos metilo [165].

Según W. Noll, una silicona está constituida por un polisiloxano $[\text{Si-O}]_n$ unido a grupos $-\text{CH}_3$ y por otros grupos funcionales (e.g., hidroxilo, fenilo) [163]. La gran diversidad de los tipos de compuestos encontrados en la química de poliorganosiloxanos ocurre principalmente por la amplia gama de combinaciones posibles entre unidades Si-O en una misma molécula y los grupos funcionales enlazados a estas unidades. El término silicona es más comúnmente utilizado para nombrar los poliorganosiloxanos presentes en la composición de aceites y grasas para vacío, agentes impermeabilizantes, disolventes para las pinturas, entre otros.

Por otro lado, los siloxanos son preparados a partir de unidades Si-O de los silicatos minerales. El mineral es molido con una mezcla de HCl concentrado y frío, alcohol isopropílico y hexametildisiloxano [163]. Solubles en la mayoría de disolventes orgánicos, los siloxanos son utilizados en la fabricación de productos electrónicos y dispositivos médicos, en la composición de cosméticos, pinturas, aditivos alimentarios, entre otros [166].

Entre la amplia variedad de siloxanos utilizados industrialmente, se ha prestado especial atención a los metilsiloxanos volátiles (VMS). Estos compuestos han sido ampliamente detectados en el medioambiente ya que no

se eliminan eficazmente en los tratamientos aplicados a las aguas residuales. Los VMS pueden migrar a través de diferentes matrices debido a su lipofilidad, bioacumularse y biomagnificarse en organismos vivos [166]. Con un punto de ebullición inferior a 250 °C, los VMS lineales tienen la fórmula general $(\text{CH}_3)_3\text{SiO}\{(\text{CH}_3)_2\text{SiO}\}_x\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, y los VMS cíclicos $\{(\text{CH}_3)_2\text{SiO}\}_y$ en la que “x” es 0-3 e “y” es 3-6 [163]. Debido a las propiedades físico-químicas requeridas en la industria cosmética (e.g., volatilidad, solubilidad en disolventes orgánicos y esparcidores de fragancias), los VMS cíclicos D4, D5 y D6 son ampliamente encontrados en la composición de diversos productos de cuidado e higiene personal, como cremas para cabello sin aclarado, desodorantes, cremas de tratamiento facial, protectores solares, etc.

A continuación se muestran las estructuras químicas del TMS y los VMS estudiados en dos de las metodologías propuestas en esta memoria.

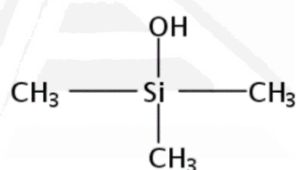


Figura 7.1 Trimetilsilanol (TMS).

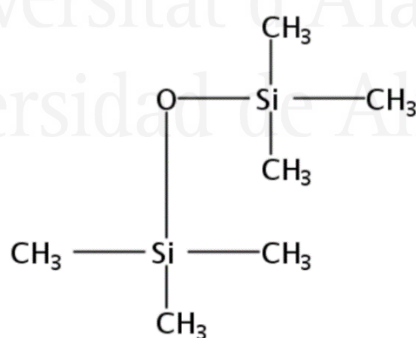


Figura 7.2 Hexametildisiloxano (L2).

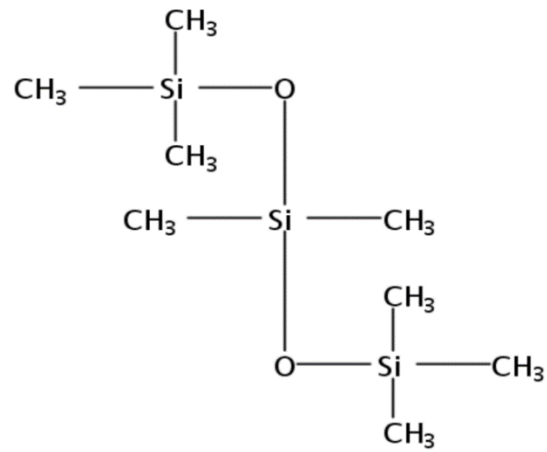


Figura 7.3 Octametiltrisiloxano (L3).

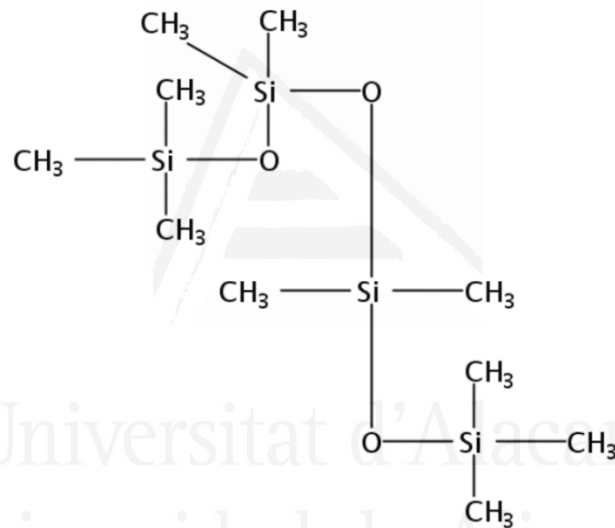


Figura 7.4 Decamethyltetrasiloxano (L4).

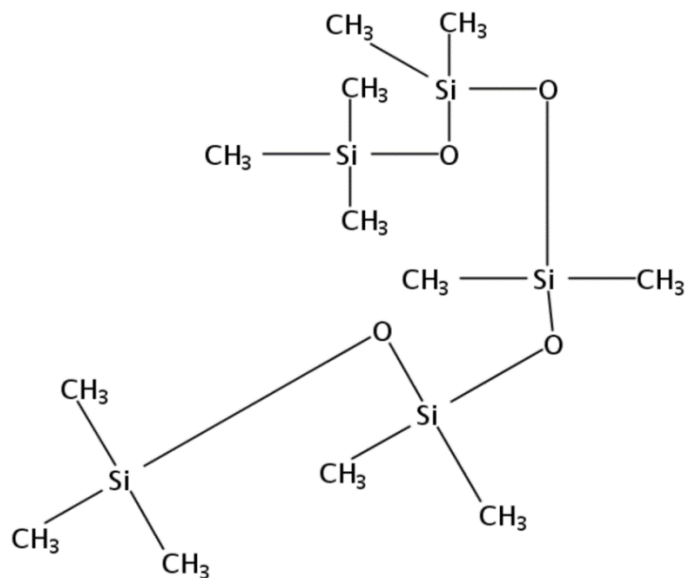


Figura 7.5 Dodecametilpentasiloxano (L5).

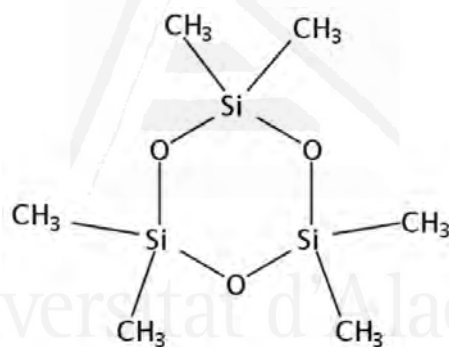


Figura 7.6 Hexametilciclotrisiloxano (D3).

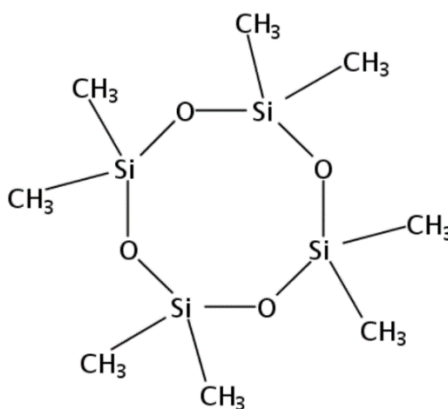


Figura 7.7 Octametilciclotetrasiloxano (D4).

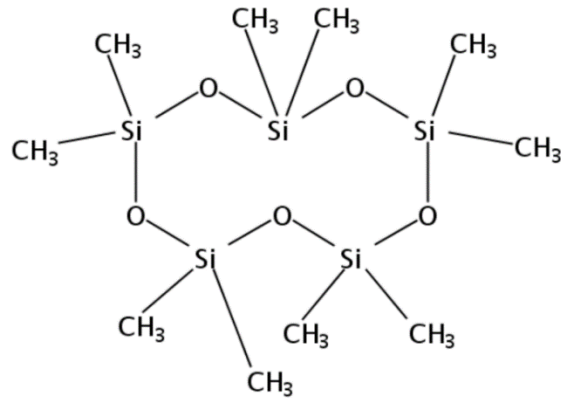


Figura 7.8 Decametilciclopentasiloxano (D5).

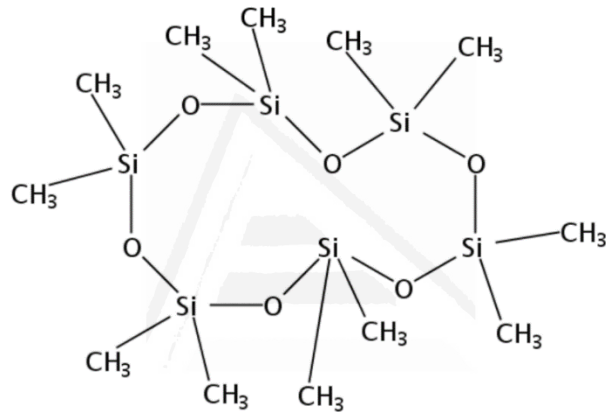


Figura 7.9 Dodecametilciclohexasiloxano (D6).

La elevada solubilidad en disolventes orgánicos contrasta con la baja solubilidad en agua. Aunque posean baja solubilidad, los siloxanos pueden encontrarse en las aguas residuales de varios puntos de las WWTPs así como en ríos que reciben estas aguas residuales tratadas debido al aumento en el consumo de productos que contienen estos compuestos. Una parte de los siloxanos pueden ser degradados aún estando en el agua y otra parte significativa llega a los lodos durante los procesos de decantación de la materia orgánica. Los siloxanos pueden ser destruidos por incineración de los lodos, enterrados en vertederos, o esparcidos en campos de golf, bosques y campos agrícolas. Esta última técnica de eliminación permite que los siloxanos se incorporen al suelo. En el suelo, los siloxanos son degradados mediante hidrólisis abiótica formando polímeros de cadena más corta de hidruros de silicio-

oxígeno. El producto final de la degradación de los siloxanos presentes en el suelo es el dimetilsiloxano (DMS), el cual es degradado a gas carbónico (CO_2) y silicato inorgánico. Por otra parte, si los lodos provenientes de las WWTPs son utilizados para la producción de biogás, los siloxanos causan problemas relacionados con el deterioro de los equipos utilizados en la quema del biogás para obtención de energía. Los siloxanos se adhieren a la materia orgánica de los lodos en los tanques de tratamiento primario y secundario de las WWTPs. El lodo secundario obtenido al final del tratamiento de las aguas residuales, generalmente, contiene siloxanos a niveles de unos pocos mg m^{-3} , dependiendo de las concentraciones presentes en estas aguas. En el proceso de digestión del lodo secundario, la materia orgánica es sometida a un proceso de fermentación anaeróbica por los microorganismos presentes en el propio lodo. Durante la fermentación, los siloxanos volátiles migran hacia el gas producido por los microorganismos, el biogás, cuya composición es: $\text{CH}_4 + \text{CO}_2 + \text{vapor de H}_2\text{O} + \text{trazas de H}_2\text{S, NH}_3, \text{siloxanos, hidrocarburos halogenados y O}_2$. Los siloxanos de baja volatilidad o cadena muy larga, como el PDMS, son hidrolizados a TMS durante los procesos de tratamiento de las aguas residuales. Formado únicamente por un átomo de Si unido a tres grupos metilo y un grupo hidroxilo (Figura 7.1), el TMS también se volatiliza para formar parte del biogás. El biogás producido por la fermentación del lodo se almacena en las WWTPs para su posterior utilización como biocombustible. Sin embargo, para ser utilizado eficientemente como biocombustible, el biogás debe tener un bajo contenido de humedad y de otros compuestos perjudiciales para la vida útil de los equipos utilizados en la transformación del biogás en energía eléctrica. Entre estos compuestos están el TMS y los siloxanos volátiles. Durante la combustión del biogás en la parte interna de los motores, los compuestos de silicio-oxígeno son convertidos en dióxido de silicio/sílice (SiO_2) que se deposita sobre las piezas del motor. Estos depósitos de sílice ocasionan la abrasión de las superficies del motor generando una significativa pérdida de eficiencia y un deterioro prematuro del mismo. Los depósitos de sílice también deterioran los catalizadores utilizados en el aprovechamiento del biogás así como las turbinas, los intercambiadores de calor y los equipos de control de emisiones.

7.2 2,4,6 - Trinitrotolueno

El explosivo 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) (Figura 7.10), se utiliza con frecuencia en actividades militares, minería y demolición de edificios. Sintetizado por primera vez en 1865 por Willbrand, ha sido utilizado extensivamente como explosivo desde 1902. Por ello, residuos de este compuesto nitroaromático pueden ser encontrados en el medioambiente, contaminando primeramente los suelos donde existen, o han existido, actividades que lo requieran y posteriormente, arrastrado por la lluvia, en aguas superficiales y subterráneas. Muchos explosivos o mezclas explosivas tienen efectos tóxicos en el medioambiente, animales y humanos [167]. Clasificado como un alto explosivo secundario, el TNT contamina el suelo y agua durante el proceso de producción, purificación y uso. Además de su carácter explosivo, pequeñas cantidades de TNT también son utilizadas en la composición de colorantes y componentes fotográficos [168]. Entre los varios explosivos existentes actualmente, el TNT y sus subproductos son contaminantes orgánicos emergentes de alto impacto ambiental, según la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (U.S. EPA, 2017) [169]. En su producción, mediante la progresiva nitración del tolueno, el TNT es sometido a un proceso de intenso lavado para su purificación. Por todo esto, las aguas residuales generadas en el proceso de producción y purificación del TNT presentan una gran toxicidad afectando principalmente a los peces [170].

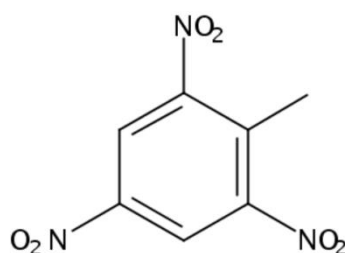


Figura 7.10 Fórmula del explosivo 2,4,6-trinitrotolueno.



REFERENCIAS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

8 REFERENCIAS

- [1] C.E. Domini, D. Hristozov, B. Almagro, S. Prats, A. Canals, Sample preparation for chromatographic analysis of environmental samples, in: L.M. Nollet (Ed.), *Chromatographic Analysis of the Environment*, 3rd ed., Taylor and Francis Inc., Boca Raton (USA), 2006: pp. 31-131.
- [2] M. de la Guardia, S. Armenta, *Green Analytical Chemistry: Theory and practice*, Elsevier, Amsterdam (The Netherlands), 2011.
- [3] T.D. Ho, C. Zhang, L.W. Hantao, J.L. Anderson, Ionic liquids in analytical chemistry: Fundamentals, advances, and perspectives, *Anal. Chem.* 86 (2014) 262-285.
- [4] M.J. Trujillo-Rodríguez, O. Nacham, K.D. Clark, V. Pino, J.L. Anderson, J.H. Ayala, A.M. Afonso, Magnetic ionic liquids as non-conventional extraction solvents for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, *Anal. Chim. Acta* 934 (2016) 106-113.
- [5] J. An, K.L. Rahn, J.L. Anderson, Headspace single drop microextraction versus dispersive liquid-liquid microextraction using magnetic ionic liquid extraction solvents, *Talanta* 167 (2017) 268-278.
- [6] L. Ramos, Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* 1221 (2012) 84-98.
- [7] R. Cela, R.A. Lorenzo, M. C. Casais, *Técnicas de Separación en Química Analítica*, 1ª ed., Editorial Síntesis, Madrid (España), 2002.
- [8] J.M. Kokosa, Advances in solvent-microextraction techniques, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 2-13.
- [9] S. Liu, P.K. Dasgupta, Liquid droplet. A renewable gas sampling interface, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2042-2049.
- [10] H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817-1821.
- [11] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236-2240.
- [12] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle, *Anal. Chem.* 69 (1997) 235-239.

- [13] M. Ma, F.F. Cantwell, Solvent microextraction with simultaneous back-extraction for sample cleanup and preconcentration: quantitative extraction, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3912-3919.
- [14] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650-2656.
- [15] W. Liu, H.K. Lee, Continuous flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes, *Anal. Chem.* 72 (2000) 4462-4467.
- [16] A.L. Theis, A.J. Waldack, S.M. Hansen, M.A. Jeannot, Headspace solvent microextraction, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5651-5654.
- [17] A. Tankeviciute, R. Kazlauskas, V. Vickackaite, Headspace extraction of alcohols into a single drop, *Analyst* 126 (2001) 1674-1677.
- [18] B. Hauser, P. Popp, E. Kleine-Benne, Membrane-assisted solvent extraction of triazines and other semi-volatile contaminants directly coupled to large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 27-36.
- [19] X. Jiang, H.K. Lee, Solvent bar microextraction, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5591-5596.
- [20] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: new concept for rapid sample preparation of biological fluids, *J. Chromatogr. A* 1109 (2006) 183-190.
- [21] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.
- [22] L. Yangcheng, L. Quan, L. Guangsheng, D. Youyuan, Directly suspended droplet microextraction, *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 259-264.
- [23] G. Mingyuan, L. Yangcheng, L. Guangsheng, Directly suspended droplet microextraction in a rotating vial, *Anal. Chim. Acta* 648 (2009) 123-127.
- [24] M.R.K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J.A. Jönsson, A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 286-293.
- [25] A. Spietelun, L. Marcinkowski, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Green

aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques, *Talanta* 119 (2014) 34-45.

[26] <http://www.gilson.com/en/Al/Products/9.307/Default.aspx#.WfDPAYg3Giw> (07/05/2018).

[27] F. Augusto, L.W. Hantao, N.G.S. Mogollón, S.C.G.N. Braga, New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 43 (2013) 14-23.

[28] M.C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 3-54.

[29] S.C.N. Queiroz, C.H. Collins, I.C.S.F. Jardim, Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Quim. Nova* 24 (2001) 68-76.

[30] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145-2148.

[31] A.L.P. Valente, F. Augusto, Microextração por fase sólida, *Quim. Nova.* 23 (2000) 523-530.

[32] R. Eisert, J. Pawliszyn, Automated in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography, *Anal. Chem.* 69 (1997) 3140-3147.

[33] H. Lord, J. Pawliszyn, Evolution of solid-phase microextraction technology, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 153-193.

[34] M. Fernández-Amado, M.C. Prieto-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Strengths and weaknesses of in-tube solid-phase microextraction: A scoping review, *Anal. Chim. Acta* 906 (2016) 41-57.

[35] W. Zhang, J. Zhang, T. Bao, W. Zhou, J. Meng, Z. Chen, Universal multilayer assemblies of graphene in chemically resistant microtubes for microextraction, *Anal. Chem.* 85 (2013) 6846-6854.

[36] S. Poorahong, C. Thammakhet, P. Thavarungkul, P. Kanatharana, Online in-tube microextractor coupled with UV-Vis spectrophotometer for bisphenol A detection, *J. Environ. Sci. Health A* 48 (2013) 242-250.

[37] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles,

- J. Microcolumn Sep. 11 (1999) 737-747.
- [38] J. Vercauteren, C. Pérès, C. Devos, P. Sandra, F. Vanhaecke, L. Moens, Stir bar sorptive extraction for the determination of ppq-level traces of organotin compounds in environmental samples with thermal desorption-capillary gas chromatography-ICP mass spectrometry, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1509-1514.
- [39] C. Bicchi, C. Iori, P. Rubiolo, P. Sandra, Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE), and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee brew, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 449-459.
- [40] V.M. León, B. Álvarez, M.A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, Analysis of 35 priority semivolatile compounds in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: I. Method optimisation, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 91-101.
- [41] P. Tölgyessy, S. Nagyová, M. Sládkovicová, Determination of short chain chlorinated paraffins in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1494 (2017) 77-80.
- [42] F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J.M. Cano-Pavón, A review of stir bar sorptive extraction, *Chromatographia* 69 (2009) 79-94.
- [43] F.J. Camino-Sánchez, R. Rodríguez-Gómez, A. Zafra-Gómez, A. Santos-Fandila, J.L. Vilchez, Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends, *Talanta* 130 (2014) 388-399.
- [44] M. Šafaříková, I. Šafařík, Magnetic solid-phase extraction, *J. Magn. Mater.* 194 (1999) 108-112.
- [45] K. Aguilar-Arteaga, J.A. Rodriguez, J.M. Miranda, J. Medina, E. Barrado, Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion-HPLC, *Talanta* 80 (2010) 1152-1157.
- [46] T. Sasaki, S. Tanaka, Adsorption behavior of some aromatic compounds on hydrophobic magnetite for magnetic separation, *J. Hazard Mater.* 196 (2011) 327-334.
- [47] J. Meng, C. Shi, B. Wei, W. Yu, C. Deng, X. Zhang, Preparation of Fe₃O₄@C@PANI magnetic microspheres for the extraction and analysis of

phenolic compounds in water samples by gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A.* 1218 (2011) 2841-2847.

[48] X. Zhang, H. Niu, Y. Pan, Y. Shi, Y. Cai, Modifying the surface of Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles with C₁₈/NH₂ mixed group to get an efficient sorbent for anionic organic pollutants, *J. Colloid Interface Sci.* 362 (2011) 107-112.

[49] H. Tang, L. Zhu, C. Yu, X. Shen, Selective photocatalysis mediated by magnetic molecularly imprinted polymers, *Sep. Purif. Technol.* 95 (2012) 165-171.

[50] S. Li, Y. Gong, Y. Yang, C. He, L. Hu, L. Zhu, L. Sun, D. Shu, Recyclable CNTs/Fe₃O₄ magnetic nanocomposites as adsorbents to remove bisphenol A from water and their regeneration, *Chem. Eng. J.* 260 (2015) 231-239.

[51] T. Sun, J. Yang, L. Li, X. Wang, X. Li, Y. Jin, Preparation of graphene sheets with covalently bonded Fe₃O₄ for magnetic solid-phase extraction applied to organochlorine pesticides in orange juice, *Chromatographia* 79 (2016) 345-353.

[52] Q. Han, Z. Wang, J. Xia, S. Chen, X. Zhang, M. Ding, Facile and tunable fabrication of Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposites and their application in the magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples, *Talanta* 101 (2012) 388-395.

[53] K. Aguilar-Arteaga, J.A. Rodríguez, E. Barrado, Magnetic solids in analytical chemistry: A review, *Anal. Chim. Acta.* 674 (2010) 157-165.

[54] J.A. Rodríguez, K. Aguilar-Arteaga, C. Díez, E. Barrado, Recent advances in the extraction of triazines from water samples, in: A. Price (Ed.), *Herbicides - Advances in Research*, IntechOpen Limited, London (UK), 2013: pp. 255-276.

[55] L. Xie, R. Jiang, F. Zhu, H. Liu, G. Ouyang, Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 377-399.

[56] A. Targhoo, A. Amiri, M. Baghayeri, Magnetic nanoparticles coated with poly(p-phenylenediamine-co-thiophene) as a sorbent for preconcentration of organophosphorus pesticides, *Microchim. Acta* 185 (2018).

[57] Á. Ríos, M. Zougagh, Recent advances in magnetic nanomaterials for improving analytical processes, *Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 72-83.

- [58] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R.M. Peña-Crecente, J. Otárola-Jiménez, Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review, *Anal. Chim. Acta* 892 (2015) 10-26.
- [59] H.R. Nodeh, W.A.W. Ibrahim, M.A. Kamboh, M.M. Sanagi, New magnetic graphene-based inorganic-organic sol-gel hybrid nanocomposite for simultaneous analysis of polar and non-polar organophosphorus pesticides from water samples using solid-phase extraction, *Chemosphere* 166 (2017) 21-30.
- [60] J. Yan, J.-M. Cen, X.-C. Tan, S.-F. Tan, Y.-Yu Wu, H. Zhang, Q. Wang, Determination of trace rhodamine B by spectrofluorometry and magnetic solid phase extraction based on a 3D reduced graphene oxide composite, *Anal. Methods* 9 (2017) 5433-5440.
- [61] Z. Wang, X. Zhang, S. Jiang, X. Guo, Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multiwalled carbon nanotubes for the simultaneous enantiomeric analysis of five β -blockers in the environmental samples by chiral liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Talanta* 180 (2018) 98-107.
- [62] F. Maya, C.P. Cabello, R.M. Frizzarin, J.M. Estela, G.T. Palomino, V. Cerdà, Magnetic solid-phase extraction using metal-organic frameworks (MOFs) and their derived carbons, *Trends Anal. Chem.* 90 (2017) 142-152.
- [63] E. Fernández, L. Vidal, A. Canals, Zeolite/iron oxide composite as sorbent for magnetic solid-phase extraction of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes from water samples prior to gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1458 (2016) 18-24.
- [64] I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn, Thin-film microextraction, *Anal. Chem.* 75 (2003) 1002-1010.
- [65] M. Abdel-Rehim, New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 801 (2004) 317-321.
- [66] J. Plotka-Wasyłka, N. Szczepanska, M. de la Guardia, J. Namiesnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques, *Trends Anal. Chem.* 73 (2015) 19-38.

- [67] C. Basheer, A.A. Alnedhary, B.S.M. Rao, S. Valliyaveettil, H.K. Lee, Development and application of porous membrane-protected carbon nanotube micro-solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2853-2858.
- [68] W.-H. Tsai, T.-C. Huang, J.-J. Huang, Y.-H. Hsue, H.-Y. Chuang, Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2263-2269.
- [69] M.L. Martins, M. Kemmerich, O.D. Prestes, L. Maldaner, I.C.S.F. Jardim, R. Zanella, Evaluation of an alternative fluorinated sorbent for dispersive solid-phase extraction clean-up of the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method for pesticide residues analysis, *J. Chromatogr. A* 1514 (2017) 36-43.
- [70] T. Khezeli, A. Daneshfar, Development of dispersive micro-solid phase extraction based on micro and nano sorbents, *Trends Anal. Chem.* 89 (2017) 99-118.
- [71] A.A. Ensafi, A.Z. Shiraz, On-line separation and preconcentration of lead(II) by solid-phase extraction using activated carbon loaded with xylenol orange and its determination by flame atomic absorption spectrometry, *J. Hazard. Mater.* 150 (2008) 554-559.
- [72] Z. Yang, W. Zhang, C. Wang, L. Xie, F. Lan, K. Pan, C. Wu, Application of novel sol-gel fullerene coating to determine the phthalic diesters in the dipping solution of plastics in water by solid-phase microextraction and gas chromatography, *Chinese J. Anal. Chem.* 32 (2004) 637-640.
- [73] Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, Q. Zhou, Multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the determination of bisphenol A, 4-*n*-nonylphenol, and 4-*tert*-octylphenol, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2517-2521.
- [74] A.K. Geim, K.S. Novoselov, The rise of graphene, *Nat. Mater.* 6 (2007) 183-191.
- [75] H.W. Kroto, J.R. Heath, S.C. O'Brien, R.F. Curl, R.E. Smalley, C₆₀: Buckminsterfullerene, *Nature* 318 (1985) 162-163.

- [76] E. Castro, A.H. Garcia, G. Zavala, L. Echegoyen, Fullerenes in biology and medicine, *J. Mater. Chem. B* 5 (2017) 6523-6535.
- [77] S. Iijima, Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* 354 (1991) 56-58.
- [78] C.J. Cabello, A. Sáenz, C. Pérez, L. López, L. Barajas, L.C. Sifuentes, C. Ávila, Modificación de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWNTC`s) usando ácido acético y anilina mediante radiación ultrasónica, *Rev. Latin. Am. Metal. Mat.* 35 (2015) 1-7.
- [79] C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R.M. Peña-Crecente, J. Otárola-Jiménez, Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review, *Anal. Chim. Acta* 892 (2015) 10-26.
- [80] A.K. Geim, Graphene prehistory, *Phys. Scr. T146* (2012) 1-4.
- [81] P.R. Wallace, The band theory of graphite, *Phys. Rev.* 71 (1947) 622-634.
- [82] V.H.P. Boehm, A. Clauss, G.O. Fischer, U. Hofmann, Das Adsorptionsverhalten sehr dünner Kohlenstoff-Folien, *Z. Anorg. Allg. Chem.* 316 (1962) 119-127.
- [83] V.H.P. Boehm, R. Setton, E. Stumpp, Nomenclature and terminology of graphite intercalation compounds, *Carbon* 24 (1986) 241-245.
- [84] K.S. Novoselov, A.K. Geim, S.V. Morozov, D. Jiang, Y. Zhang, S.V. Dubonos, I.V. Grigorieva, A.A. Firsov, Electric field effect in atomically thin carbon films, *Science* 306 (2004) 666-669.
- [85] M.D. Stoller, S. Park, Y. Zhu, J. An, R.S. Ruoff, Graphene-based ultracapacitors, *Nano Lett.* 8 (2008) 3498-3502.
- [86] C. Lee, X.D. Wei, J.W. Kysar, J. Hone, Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene, *Science* 321 (2008) 385-388.
- [87] K.I. Bolotin, K.J. Sikes, Z. Jiang, M. Klima, G. Fudenberg, J. Hone, P. Kim, H.L. Stormer, Ultrahigh electron mobility in suspended graphene, *Solid State Commun.* 146 (2008) 351-355.
- [88] R. Sitko, B. Zawisza, E. Malicka, Graphene as a new sorbent in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* 51 (2013) 33-43.
- [89] Q. Liu, J. Shi, L. Zeng, T. Wang, Y.Q. Cai, G. Jiang, Evaluation of graphene as an advantageous adsorbent for solid-phase extraction with chlorophenols as model analytes, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 197-204.

- [90] S. Zhang, Z. Li, X. Yang, C. Wang, Z. Wang, Fabrication of a three-dimensional graphene coating for solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons, *RSC Adv.* 5 (2015) 54329-54337.
- [91] R. Saito, G. Dresselhaus, M.S. Dresselhaus, Carbon materials, in: *Physical Properties of Carbon Nanotubes*, Imperial College Press, London (UK), 1998: pp. 1-15.
- [92] Z.M. Xia, C.G. Wang, H.F. Tan, Elastic properties of graphene: A pseudo-beam model with modified internal bending moment and its application, *Physica E Low Dimens. Syst. Nanostruct.* 98 (2018) 45-52.
- [93] B.C. Brodie, On the atomic weight of graphite, *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 149 (1859) 249-259.
- [94] X. Yang, J. Li, T. Wen, X. Ren, Y. Huang, X. Wang, Adsorption of naphthalene and its derivatives on magnetic graphene composites and the mechanism investigation, *Colloid. Surface A.* 422 (2013) 118-125.
- [95] R. Sitko, E. Turek, B. Zawisza, E. Malicka, E. Talik, J. Heimann, A. Gagor, B. Feist, R. Wrzalik, Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using graphene oxide, *Dalton Trans.* 42 (2013) 5682-5689.
- [96] H. Kim, S.-O. Kang, S. Park, H.S. Park, Adsorption isotherms and kinetics of cationic and anionic dyes on three-dimensional reduced graphene oxide macrostructure, *J. Ind. Eng. Chem.* 21 (2015) 1191-1196.
- [97] W. Cai, R.D. Piner, F.J. Stadermann, S. Park, M.A. Shaibat, Y. Ishii, D. Yang, A. Velamakanni, S.J. An, M. Stoller, J. An, D. Chen, R.S. Ruoff, Synthesis and solid-state NMR structural characterization of ^{13}C -labeled graphite oxide, *Science* 321 (2008) 1815-1817.
- [98] L. Staudenmaier, Verfahren zur darstellung der graphitsaure, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 31 (1898) 1481-1499.
- [99] W.S. Hummers, R.E. Offeman, Preparation of graphitic oxide, *J. Am. Chem. Soc.* 80 (1958) 1339-1339.
- [100] J.I. Paredes, S. Villar-Rodil, A. Martínez-Alonso, J.M.D. Tascón, Graphene oxide dispersions in organic solvents, *Langmuir* 24 (2008) 10560-10564.
- [101] C. Li, G. Shi, Three-dimensional graphene architectures, *Nanoscale* 4 (2012) 5549-5563.

- [102] S. Stankovich, R.D. Piner, S.T. Nguyen, R.S. Ruoff, Synthesis and exfoliation of isocyanate-treated graphene oxide nanoplatelets, *Carbon* 44 (2006) 3342-3347.
- [103] Y. Xu, Z. Liu, X. Zhang, Y. Wang, J. Tian, Y. Huang, Y. Ma, X. Zhang, Y. Chen, A graphene hybrid material covalently functionalized with porphyrin: synthesis and optical limiting property, *Adv. Mater.* 21 (2009) 1275-1279.
- [104] L.M. Veca, F. Lu, M.J. Meziani, L. Cao, P. Zhang, G. Qi, L. Qu, M. Shrestha, Y.-P. Sun, Polymer functionalization and solubilization of carbon nanosheets, *Chem. Commun.* (2009) 2565-2567.
- [105] H. Yang, C. Shan, F. Li, D. Han, Q. Zhang, L. Niu., Covalent functionalization of polydisperse chemically-converted graphene sheets with amine-terminated ionic liquid, *Chem. Commun.* (2009) 3880-3882.
- [106] Q. Su, S. Pang, V. Alijani, C. Li, X. Feng, K. Mullen, Composites of graphene with large aromatic molecules, *Adv. Mater.* 21 (2009) 3191-3195.
- [107] Q. Liu, J. Shi, G. Jiang, Application of graphene in analytical sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 1-11.
- [108] Q. Han, Z. Wang, J. Xia, L. Xia, S. Chen, X. Zhang, M. Ding, Graphene as an efficient sorbent for the SPE of organochlorine pesticides in water samples coupled with GC-MS, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3586-3591.
- [109] Z. Wang, Q. Han, J. Xia, L. Xia, M. Ding, J. Tang, Graphene-based solid-phase extraction disk for fast separation and preconcentration of trace polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 1834-1842.
- [110] R. Mateos, S. Vera, A.M. Díez-Pascual, M.P. San Andrés, Graphene solid phase extraction (SPE) of synthetic antioxidants in complex food matrices, *J. Food Compos. Anal.* 62 (2017) 223-230.
- [111] A.L. Toffoli, E.V.S. Maciel, B.H. Fumes, F.M. Lanças, The role of graphene-based sorbents in modern sample preparation techniques, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 288-302.
- [112] B. Hu, M. He, B. Chen, Nanometer-sized materials for solid-phase extraction of trace elements, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 2685-2710.

- [113] <http://www.carbonhagen.com/abstracts-1/posters/arnabhaldermussel-inspiredbiofunctionalizationofgrapheneforelectrochemicalsensorapplications> (16/05/2018).
- [114] I. Vasconcelos, C. Fernandes, Magnetic solid phase extraction for determination of drugs in biological matrices, *Trends Anal. Chem.* 89 (2017) 41-52.
- [115] M. Wierucka, M. Biziuk, Application of magnetic nanoparticles for magnetic solid-phase extraction in preparing biological, environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.* 59 (2014) 50-58.
- [116] X. Liu, C. Wang, Q. Wu, Z. Wang, Metal-organic framework-templated synthesis of magnetic nanoporous carbon as an efficient adsorbent for enrichment of phenylurea herbicides, *Anal. Chim. Acta* 870 (2015) 67-74.
- [117] L. Xie, R. Jiang, F. Zhu, H. Liu, G. Ouyang, Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 377-399.
- [118] D. Vollath, *Nanoparticles-Nanocomposites-Nanomaterials*, Wiley-VCH, Weinheim (Germany) 2013.
- [119] L. Borlido, A.M. Azevedo, A.C.A. Roque, M.R. Aires-Barros, Magnetic separations in biotechnology, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1374-1385.
- [120] M. Musa, W.A.W. Ibrahim, F.M. Marsin, A.S.A. Keyon, Graphene-magnetite as adsorbent for magnetic solid phase extraction of 4-hydroxybenzoic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid in stingless bee honey, *Food Chem.* 265 (2018) 165-172.
- [121] S. Akbarzade, M. Chamsaz, G.H. Rounaghi, Highly selective preconcentration of ultra-trace amounts of lead ions in real water and food samples by dispersive solid phase extraction using modified magnetic graphene oxide as a novel sorbent, *Anal. Methods* 10 (2018) 2081-2087.
- [122] R.-T. Ma, W. Ha, J. Chen, Y.-P. Shi, Highly dispersed magnetic molecularly imprinted nanoparticles with well-defined thin film for the selective extraction of glycoprotein, *J. Mater. Chem. B* 4 (2016) 2620-2627.

- [123] G. Korneva, H. Ye, Y. Gogotsi, D. Halverson, G. Friedman, J.-C. Bradley, K.G. Kornev, Carbon nanotubes loaded with magnetic particles, *Nano Lett.* 5 (2005) 879-884.
- [124] T.V. Thu, A. Sandhu, Chemical synthesis of Fe₃O₄-graphene oxide nanohybrids as building blocks for magnetic and conductive membranes, *Mat. Sci. Eng. B* 189 (2014) 13-20.
- [125] N. Li, H.-L. Jiang, X.-L. Wang, X. Wang, G.-J. Xu, B.-B. Zhang, L.-J. Wang, R.-S. Zhao, J.-M. Lin, Recent advances in graphene-based magnetic composites for magnetic solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 60-74.
- [126] A.A. Karamani, A.P. Douvalis, C.D. Stalikas, Zero-valent iron/iron oxide-oxyhydroxide/graphene as a magnetic sorbent for the enrichment of polychlorinated biphenyls, polyaromatic hydrocarbons and phthalates prior to gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1271 (2013) 1-9.
- [127] H.R. Nodeh, W.A.W. Ibrahim, M.M. Sanagi, H.Y. Aboul-Enein, Magnetic graphene-based cyanopropyltriethoxysilane as an adsorbent for simultaneous determination of polar and non-polar organophosphorus pesticides in cow's milk, *RSC Adv.* 6 (2016) 24853-24864.
- [128] G.N. Wang, N.P. Wu, X. He, H.C. Zhang, J. Liu, J.P. Wang, Magnetic graphene dispersive solid phase extraction-ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for determination of β -agonists in urine, *J. Chromatogr. B* 1067 (2017) 18-24.
- [129] J. Qiu, G. Chen, S. Liu, T. Zhang, J. Wu, F. Wang, J. Xu, Y. Liu, F. Zhu, G. Ouyang, Bioinspired polyelectrolyte-assembled graphene-oxide-coated C18 composite solid-phase microextraction fibers for in vivo monitoring of acidic pharmaceuticals in fish, *Anal. Chem.* 88 (2016) 5841-5848.
- [130] M. Valcárcel, S. Cárdenas, B.M. Simonet, Y. Moliner-Martínez, R. Lucena, Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 34-43.
- [131] J. Zou, M. Guo, Y. Feng, M. Yang, Y. Cao, D. Zhu, Y. Yu, Voltammetric determination of nonylphenol using a glassy carbon electrode modified with a nanocomposite consisting of CTAB, Fe₃O₄ nanoparticles and reduced graphene oxide, *Microchim. Acta* 184 (2017) 533-540.

- [132] H. Lin, C. Deng, Development of Hf^{4+} -immobilized polydopamine-coated magnetic graphene for highly selective enrichment of phosphopeptides, *Talanta* 149 (2016) 91-97.
- [133] H. Wang, X. Yuan, Y. Wu, X. Chen, L. Leng, H. Wang, H. Li, G. Zeng, Facile synthesis of polypyrrole decorated reduced graphene oxide- Fe_3O_4 magnetic composites and its application for the Cr(VI) removal, *Chem. Eng. J.* 262 (2015) 597-606.
- [134] Y. Chen, S. Cao, L. Zhang, C. Xi, X. Li, Z. Chen, G. Wang, Preparation of size-controlled magnetite nanoparticles with a graphene and polymeric ionic liquid coating for the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of preservatives from vegetables, *J. Chromatogr. A* 1448 (2016) 9-19.
- [135] V. Jabbari, J.M. Veleta, M. Zarei-Chaleshtori, J. Gardea-Torresdey, D. Villagrán, Green synthesis of magnetic MOF@GO and MOF@CNT hybrid nanocomposites with high adsorption capacity towards organic pollutants, *Chem. Eng. J.* 304 (2016) 774-783.
- [136] X.-S. Li, G.-T. Zhu, Y.-B. Luo, B.-F. Yuan, Y.-Q. Feng, Synthesis and applications of functionalized magnetic materials in sample preparation, *Trends Anal. Chem.* 45 (2013) 233-247.
- [137] Y.-B Luo, Z.-G. Shi, Q. Gao, Y.-Q. Feng, Magnetic retrieval of graphene: Extraction of sulfonamide antibiotics from environmental water samples, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1353-1358.
- [138] Z. Geng, Y. Lin, X. Yu, Q. Shen, L. Ma, Z. Li, N. Pan, X. Wang, Highly efficient dye adsorption and removal: a functional hybrid of reduced graphene oxide- Fe_3O_4 nanoparticles as an easily regenerative adsorbent, *J. Mater. Chem.* 22 (2012) 3527-3535.
- [139] K. Zhou, Y. Zhu, X. Yang, C. Li, One-pot preparation of graphene/ Fe_3O_4 composites by a solvothermal reaction, *New J. Chem.* 34 (2010) 2950-2955.
- [140] Q. Wu, C. Feng, C. Wang, Z. Wang, A facile one-pot solvothermal method to produce superparamagnetic graphene- Fe_3O_4 nanocomposite and its application in the removal of dye from aqueous solution, *Colloids Surf. B Biointerfaces* 101 (2013) 210-214.

- [141] R. Zhang, P. Su, Y. Yang, Microwave-assisted preparation of magnetic nanoparticles modified with graphene oxide for the extraction and analysis of phenolic compounds, *J. Sep. Sci.* 37 (2014) 3339-3346.
- [142] L. Guo, P. Ye, J. Wang, F. Fu, Z. Wu, Three-dimensional Fe₃O₄-graphene macroscopic composites for arsenic and arsenate removal, *J. Hazard. Mater.* 298 (2015) 28-35.
- [143] X. Wang, B. Liu, Q. Lu, Q. Qu, Graphene-based materials: Fabrication and application for adsorption in analytical chemistry, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 1-15.
- [144] Z. Pei, L. Li, L. Sun, S. Zhang, X.-q Shan, S. Yang, B. Wen, Adsorption characteristics of 1,2,4-trichlorobenzene, 2,4,6-trichlorophenol, 2-naphthol and naphthalene on graphene and graphene oxide, *Carbon* 51 (2013) 156-163.
- [145] W. Wang, Y. Li, Q. Wu, C. Wang, X. Zang, Z. Wang, Extraction of neonicotinoid insecticides from environmental water samples with magnetic graphene nanoparticles as adsorbent followed by determination with HPLC, *Anal. Methods* 4 (2012) 766-772.
- [146] Y. Qi, M. Yang, W. Xu, S. He, Y. Men, Natural polysaccharides-modified graphene oxide for adsorption of organic dyes from aqueous solutions, *J. Colloid Interface Sci.* 486 (2017) 84-96.
- [147] J. Wang, B. Chen, Adsorption and coadsorption of organic pollutants and a heavy metal by graphene oxide and reduced graphene materials, *Chem. Eng. J.* 281 (2015) 379-388.
- [148] T.D. Ho, C. Zhang, L.W. Hantao, J.L. Anderson, Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives, *Anal. Chem.* 86 (2014) 262-285.
- [149] E. Fernández, L. Vidal, A. Canals, Rapid determination of hydrophilic phenols in olive oil by vortex-assisted reversed-phase dispersive liquid-liquid microextraction and screen-printed carbon electrodes, *Talanta* 181 (2018) 44-51.
- [150] J. Regueiro, M. Llompart, C. Garcia-Jares, J.C. Garcia-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27-38.

- [151] C. Cortada, L.C. dos Reis, L. Vidal, J. Llorca, A. Canals, Determination of cyclic and linear siloxanes in wastewater samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Talanta* 120 (2014) 191-197.
- [152] M.J. Trujillo-Rodríguez, P. Rocío-Bautista, V. Pino, A.M. Afonso, Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction, *Trends Anal. Chem.* 51 (2013) 87-106.
- [153] *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*, Edited by José-Luis Capelo-Martínez, Wiley-VCH, Weinheim (Germany), 2009.
- [154] M. Khan, E. Yilmaz, M. Soylak, Vortex assisted magnetic solid phase extraction of lead(II) and cobalt(II) on silica coated magnetic multiwalled carbon nanotubes impregnated with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol, *J. Mol. Liq.* 224 (2016) 639-647.
- [155] R.M. Peña Crecente, C. Gutiérrez Lovera, J. Barciela García, C. Herrero Latorre, S. García Martín, Ultrasound-assisted magnetic solid-phase extraction for the determination of some transition metals in Orujo spirit samples by capillary electrophoresis, *Food Chem.* 190 (2016) 263-269.
- [156] L. Chen, M. Zhang, F. Fu, J. Li, Z. Lin, Facile synthesis of magnetic covalent organic framework nanobeads and application to magnetic solid-phase extraction of trace estrogens from human urine, *J. Chromatogr. A* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.066>
- [157] F.A. Casado-Carmona, M.C. Alcudia-León, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, Magnetic nanoparticles coated with ionic liquid for the extraction of endocrine disrupting compounds from waters, *Microchem. J.* 128 (2016) 347-353.
- [158] W. Wardencki, J. Curylo, J. Namiesnik, Trends solventless sample preparation techniques for environmental analysis, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 275-288.
- [159] L. Vidal, M. Ahmadi, E. Fernández, T. Madrakian, A. Canals, Magnetic headspace adsorptive extraction of chlorobenzenes prior to thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 971 (2017) 40-47.

- [160] P. Baile, L. Vidal, M.A. Aguirre, A. Canals, A modified ZSM-5 zeolite/Fe₂O₃ composite as a sorbent for magnetic dispersive solid-phase microextraction of cadmium, mercury and lead from urine samples prior to inductively coupled plasma optical emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.* 33 (2018) 856-866.
- [161] T.S. Munonde, N.W. Maxakato, P.N. Nomngongo, Preparation of magnetic Fe₃O₄ nanocomposites modified with MnO₂, Al₂O₃, Au and their application for preconcentration of arsenic in river water samples, *J. Environ. Chem. Eng.* 6 (2018) 1673-1681.
- [162] D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, Seventh Edition, Wiley-VCH, New Jersey (USA), 2009.
- [163] W. Noll, *Chemistry and Technology of Silicones*, Academic Press Inc., New York (USA), 1968.
- [164] IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. Gold Book, 2017. Disponible en: <http://goldbook.iupac.org/html/S/S05671.html> (28/05/2018).
- [165] C. Rücker, K. Kümmerer, Environmental chemistry of organosiloxanes, *Chem. Rev.* 115 (2015) 466-524.
- [166] V. Homem, D. Capela, J.A. Silva, A. Cincinelli, L. Santos, A. Alves, N. Ratola, An approach to the environmental prioritisation of volatile methylsiloxanes in several matrices, *Sci. Total Environ.* 579 (2017) 506-513.
- [167] R. Meyer, J. Köhler, A. Homburg, *Explosives*, Seventh Edition, Wiley-VCH, Weinheim (Germany), 2015.
- [168] E.N. Ribeiro, F.T. Da Silva, T.C.B. De Paiva, Ecotoxicological evaluation of wastewater from 2,4,6-TNT production, *J. Environ. Sci. Health A* 47 (2012) 184-191.
- [169] United States Environmental Protection Agency. Technical Fact Sheet 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT), 2017. Disponible en: <https://www.epa.gov/fedfac/technical-fact-sheet-246-trinitrotoluene-tnt> (28/05/2018).
- [170] E. Mariussen, S.M. Stornes, K.O. Boifot, B.O. Rosseland, B. Salbu, L.S. Heier, Uptake and effects of 2, 4, 6 - trinitrotoluene (TNT) in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquat. Toxicol.* 194 (2018) 176-184.

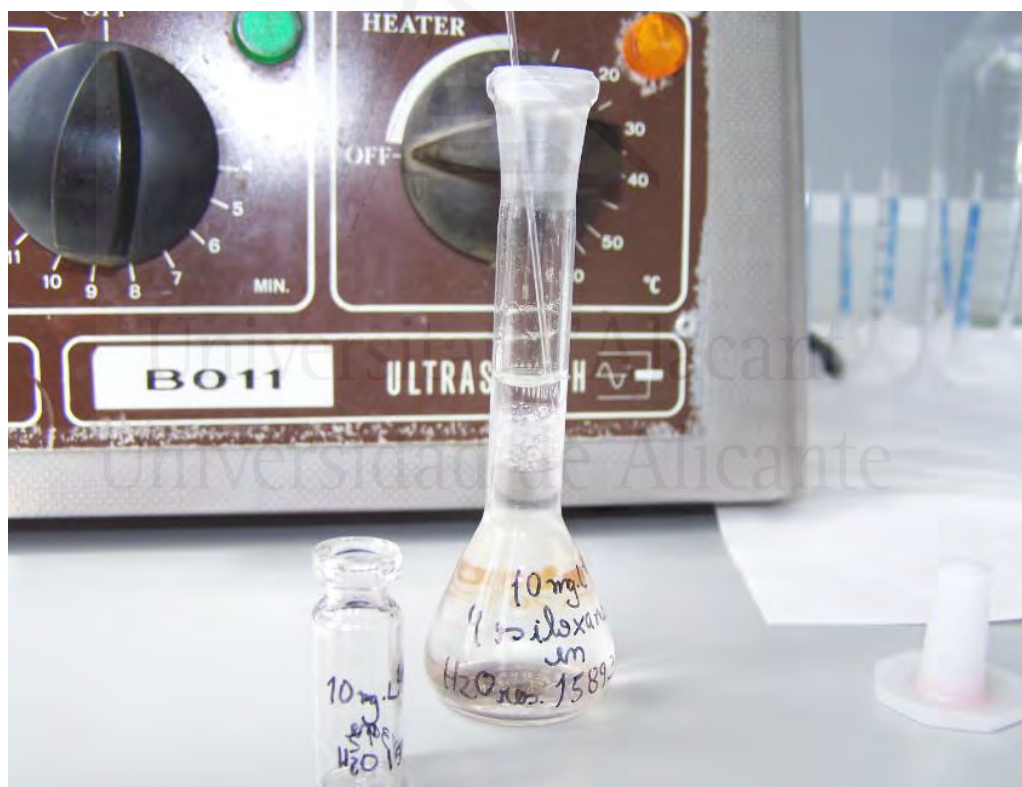
PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIONES

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

9 PARTE EXPERIMENTAL, RESULTADOS Y DISCUSIONES

DISCUSIONES

9.1 Determination of cyclic and linear siloxanes in wastewater samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry



Talanta 120 (2014) 191–197



Determination of cyclic and linear siloxanes in wastewater samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry

Carol Cortada^a, Luciana Costa dos Reis^a, Lorena Vidal^{b,*}, Julio Llorca^a, and Antonio Canals^{b,*}

^aLabaqua S.A., C/Dracma 16-18, Pol. Ind. Las Atalayas, 03114 Alicante, Spain.

^bDepartamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología e Instituto de Materiales, Universidad de Alicante, Apdo. 99, 03080 Alicante, Spain.

Received: 23 July 2013 / Received in revised form: 8 November 2013 / Accepted: 14 November 2013 / Available online: 2 December 2013

Abstract

A fast, simple and environmentally friendly ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USA-DLLME) procedure has been developed to preconcentrate eight cyclic and linear siloxanes from wastewater samples prior to quantification by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). A two-stage multivariate optimization approach has been developed employing a Plackett-Burman design for screening and selecting the significant factors involved in the USA-DLLME procedure, which was later optimized by means of a circumscribed central composite design. The optimum conditions were: extractant solvent volume, 13 μ L; solvent type, chlorobenzene; sample volume, 142

13 mL; centrifugation speed, 2300 rpm; centrifugation time, 5 min; and sonication time, 2 min. Under the optimized experimental conditions the method gave levels of repeatability with coefficients of variation between 10 and 24% (n=7). Limits of detection were between 0.002 and 1.4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Calculated calibration curves gave high levels of linearity with correlation coefficient values between 0.991 and 0.9997. Finally, the proposed method was applied for the analysis of wastewater samples. Relative recovery values ranged between 71-116% showing that the matrix had a negligible effect upon extraction. To our knowledge, this is the first time that combines LLME and GC-MS for the analysis of methylsiloxanes in wastewater samples.

Keywords: Volatile siloxanes; ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USA-DLLME); experimental design; wastewater.

1. Introduction

Low molecular weight cyclic and linear methylsiloxanes are synthetic compounds which belong to the class of organosilicons. The analysis of these compounds has increased in recent years, especially due the interest in environmental and fuel industry.

Siloxanes are used in the manufacture of a great variety of products such as electronics, cosmetics, paints, food additives, medical devices, cosmetic surgery, needles coating, coating pacemaker, etc. [1]. This growing use has led to a considerable increase of these compounds in wastewaters [2]. Although the toxicological behaviour of these compounds is still poorly studied, some works have indicated that they can cause adverse toxicological effects on wildlife [3].

On the other hand, biogas is an important renewable energy source produced from the anaerobic digestion of sludge in wastewater treatment plant. The presence of siloxanes in the biogas can adversely affect the life-time of combustion engines due to abrasive effects of microcrystalline silicon dioxide generated at high temperature [4]. Physical damage and poor performance of biogas are the reasons to seek new alternatives to the removal of these compounds before they reach the landfill gas [5]. Therefore, it is important that

siloxanes may be detected and quantified in the wastewater and sewage sludge, as well as in the biogas, to prevent combustion engines damages and to select and design the appropriate siloxane abatement technique.

Literature describes some methods for the determination of the volatile siloxanes in biogas [6-9], in sewage sludge [10,11], but the studies on wastewaters are scarce [4,12-14]. One of the main limitations in the analysis of methylsiloxanes is the high volatility of these compounds and the potential sources of background contamination that affect their final determination. The detection technique of choice for most of the studies carried out till now has been gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) after a sample preparation step.

Determination of cyclic siloxanes from wastewater samples and activated or digested sludge were carried out successfully after stripping the siloxanes from samples by helium and adsorption on XAD resins [4]. Nevertheless, this method is time-consuming and labor. Sparham et al. [12] proposed a sensitive headspace (HS)-GC-MS method to analyze D5 in river water and treated wastewater samples. However, the static headspace method can be only used for clean water samples with low organic matters since cyclic methylsiloxanes have high organic carbon-water partition coefficients [14]. Sanchís et al. [13] analyzed methylsiloxanes on wastewater samples using liquid-liquid extraction followed by GC-MS/MS. Although the method is very sensitive it needs an evaporation step where analytes could be lost. Recently, D.G. Wang et al. [14] has developed a simple, rapid, and environmentally friendly analytical methodology for determination of three cyclic volatile methylsiloxanes (i.e., D4, D5 and D6) in industrial wastewater, sediment, soil, biota and biosolid samples. For water samples, a membrane-assisted solvent extraction technique was used followed by large-volume injection (LVI)-GC-MS. Therefore, the data about the presence of siloxanes in wastewater samples are limited and these studies were mainly focused on environmental risk assessment. Hence, more studies are needed to assess the content of siloxanes in wastewater samples used for biogas production.

Over the last two decades, liquid-liquid microextraction (LLME) techniques have been widely used in sample preparation due to their numerous advantages such as rapidity, price, easiness and environmental friendliness, among others [15]. Different modes of LLME have been developed, being ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USA-DLLME) [16] one of the modes that presents most of the advantages of the LLME techniques. In this technique, the disperser solvent is avoided and as a consequence the organic solvent volume is reduced and the enrichment factors increased. For this reason, USA-DLLME was considered as an excellent LLME candidate technique for the determination of siloxanes in wastewater samples.

The aim of this paper was to develop a fast, inexpensive and environmentally friendly sample preparation method based on ultrasound energy to assist the dispersion of a few microliters of extractant solvent for the preconcentration of eight volatile siloxanes from complex samples, as wastewaters, before the quantification by GC-MS. The optimization of the extraction conditions was done using experimental design. Good figures of merit were obtained and the analytical method was applied to wastewater samples.

To our knowledge, this is the first time that LLME has been combined with GC-MS for preconcentration and quantification of methylsiloxanes in complex wastewater samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals and “real-world” water samples

Trimethylsilanol (TMS), hexamethyldisiloxane (L2), hexamethylcyclotrisiloxane (D3), octamethylcyclotetrasiloxane (D4), decamethyltetrasiloxane (L4), decamethylcyclopentasiloxane (D5), dodecamethylpentasiloxane (L5), and dodecamethylcyclohexasiloxane (D6) were all obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pesticide grade methanol, carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, and chlorobenzene were also from Sigma-Aldrich. Deionized water was prepared on a water purification system (Gradient A10) supplied by Millipore (Billerica, MA, USA). Stock standard solution of 1 g L⁻¹ of target compounds was prepared in methanol. Working

solutions were daily prepared by dilution of stock standard solution. All solutions were stored in the dark at 4°C.

Wastewater samples from a municipal and industrial wastewater treatment plant located in Alicante (Spain) and from two treatment plants located in Murcia (Spain) were analyzed. Samples were stored in the dark at 4°C before use. Analysis of samples collected at different points of the treatment plants (influent, effluent, UV reactor inlet and UV reactor outlet) in Murcia confirmed the presence of siloxanes. On the other hand, analysis of samples from Alicante confirmed that all target analytes were below the LOD of method, and these samples were used to carry out the recovery study.

2.2. Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USA-DLLME)

For USA-DLLME, 13 mL of the sample solution was placed in a 20 mL glass test tube with a conical bottom and 13 μ L of chlorobenzene as extractant solvent was dropped into the sample solution. The mixture was sonicated in an ultrasonic bath (Ultrasons-H, Selecta, Barcelona, Spain) for 2 min and subsequently centrifugated for 5 min at 2300 rpm in a centrifuge table (GS-6R of Belman, Fullerton, CA, USA). Finally, 2 μ L of the extractant phase deposited at the bottom of the test tube was manually injected into de GC-MS system for analysis.

2.3. GC-MS determination

All analyses were carried out on a Varian 3900-Saturn 2100 Gas Chromatograph/Mass Spectrometer system (Walnut Creek, CA, USA) equipped with a low bleed DB-624 Agilent J&W column (60 m \times 0.25 mm, 1.40 μ m) (Palo Alto, CA, USA). The inlet septa used was absent of siloxanes (CrossLab non-stick BTO inlet septa, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). The mass spectrometer employed was an ion trap (20 μ A) with 0.82 s of scan time. The injector was maintained at 250 °C and operated in the splitless mode with the split closed for 0.75 min. Helium (> 99.999 % pure) was used as the carrier gas at a flow rate of 1.0 mL min⁻¹. The column oven was initially set at 40°C for 2 min, programmed to 120°C at 6°C min⁻¹ rate, where it was held for 5 min, followed by

a $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ramp up to 150°C , and finally to 220°C at $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ rate, where it was held for 5 min. The interface temperature was set at 200°C and the detector voltage at 4 V. A solvent cut time was allowed between 21 to 22.8 min for all analysis. The base peak ion was chosen as the quantification ion and two other significant ions of each analyte were chosen for confirmation. **Table 1.1** shows the ions selected for quantification and confirmation of methylsiloxanes using the GC-MS method. Prior to quantification, the identification of all target compounds was based on their mass spectra and GC retention times. **Figure 1.1** shows a typical chromatogram of deionized water spiked at $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ level of all target analytes and a chromatogram of a blank. As can be seen, contamination from the septum or chromatographic column could be considered negligible.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Table 1.1 Quantification and confirmation ions selected for the GC-MS analysis

Analyte	Retention time (min)	Quantification ion (m/z)	Confirmation ions (m/z)
TMS	11.1	75	45;47
L2	12.6	147	148;149
D3	17.9	207	96;208
D4	24.9	281	282;283
L4	26.9	207	73;295
D5	28.6	355	73;267
L5	30.2	281	73;147
D6	32.0	341	73;429

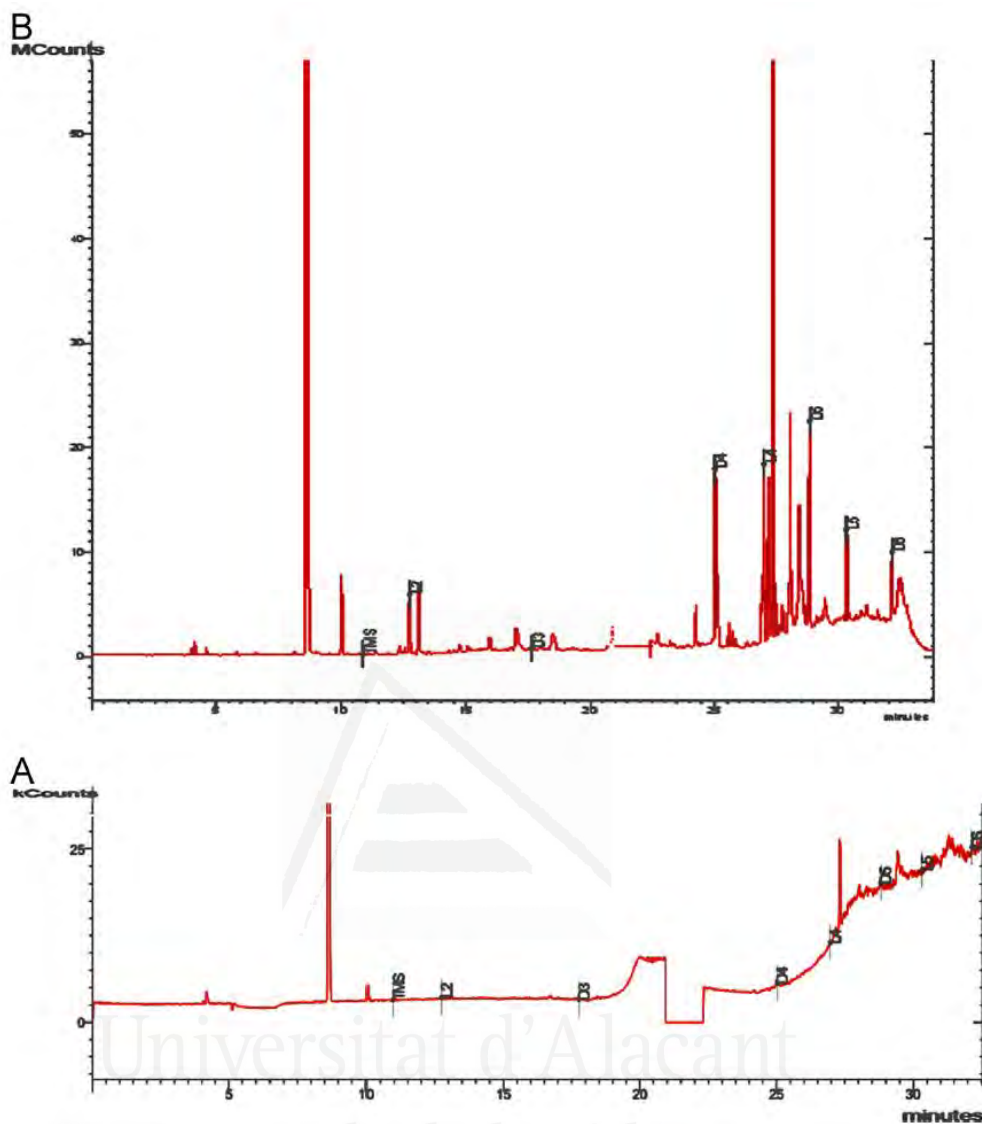


Figure 1.1(A) Chromatogram of a blank solution subjected to the optimized USA-DLLME-GC-MS method; **(B)** chromatogram of a standard solution ($10 \mu\text{g L}^{-1}$) subjected to the developed method. TMS, trimethylsilanol; L2, hexamethyldisiloxane; D3, hexamethylcyclotrisiloxane; D4, octamethylcyclotetrasiloxane; L4, decamethyltetrasiloxane; D5, decamethylcyclopentasiloxane; L5, dodecamethylpentasiloxane; D6, dodecamethylcyclohexasiloxane.

2.4. Data handling and processing

According to previous works, the response of the instrument used in the screening study was based on each area of the individual peaks eluted during

GC-MS analysis [17]. By contrast, the optimization of the significant factors was based on the sum of all the areas of the individual peaks [18-20], in order to obtain one unique set of optimum conditions for the simultaneous extraction of all siloxanes. Concentrations of 5 and 1 mg L⁻¹ were used for the screening and optimization of the significant factors, respectively, in order to assure a detectable signal (peak area) in every experimental run for all the analytes.

Experimental design matrices were constructed and results were evaluated using the Statgraphics Statistical Computer Package "Statgraphics Plus 5.1" (Statpoint Technologies, Inc. Warrenton, VA, USA).

3. Results and discussion

Preliminary experiments proved that the conventional liquid-liquid extraction of these compounds in wastewater samples produced emulsion problems. Therefore, its determination using this methodology was unfeasible. However, the emulsion problem was not produced when LLME is carried out. Therefore, USA-DLLME, as an advantageous mode of LLME, was chosen in this work.

3.1. Study of experimental factors involved in USA-DLLME

3.1.1. Study of solvent extraction

The selection of an appropriate extraction solvent is very critical for developing an efficient dispersive liquid-liquid microextraction. Generally, extraction solvent used in USA-DLLME procedures must fulfil the following requirements: It is preferably to have a higher density than water, low solubility in water, high extraction capability of the target analytes, and in addition, it should be easily dispersed in water during sonication. Additionally, the extraction solvent should also have good chromatographic behaviour during the course of chromatographic separation. Based on these facts, three solvents including carbon tetrachloride, tetrachloroethylene, and chlorobenzene were tested as potential acceptor phases.

Solvent selectivity was evaluated with 10 mL of sample containing 10 mg L⁻¹ of target analytes and 40 µL of extractant solvent was added. The mixture was sonicated in an ultrasonic bath for 3 min and then was centrifugated for 3

min at 2300 rpm. As shown in **Figure 1.2**, all the solvents supplied similar extraction behaviour with all the siloxanes. However, L2 co-eluted with carbon tetrachlorhyde and D3 co-eluted with tetrachloroethylene. Therefore, chlorobenzene was chosen as extractant phase.

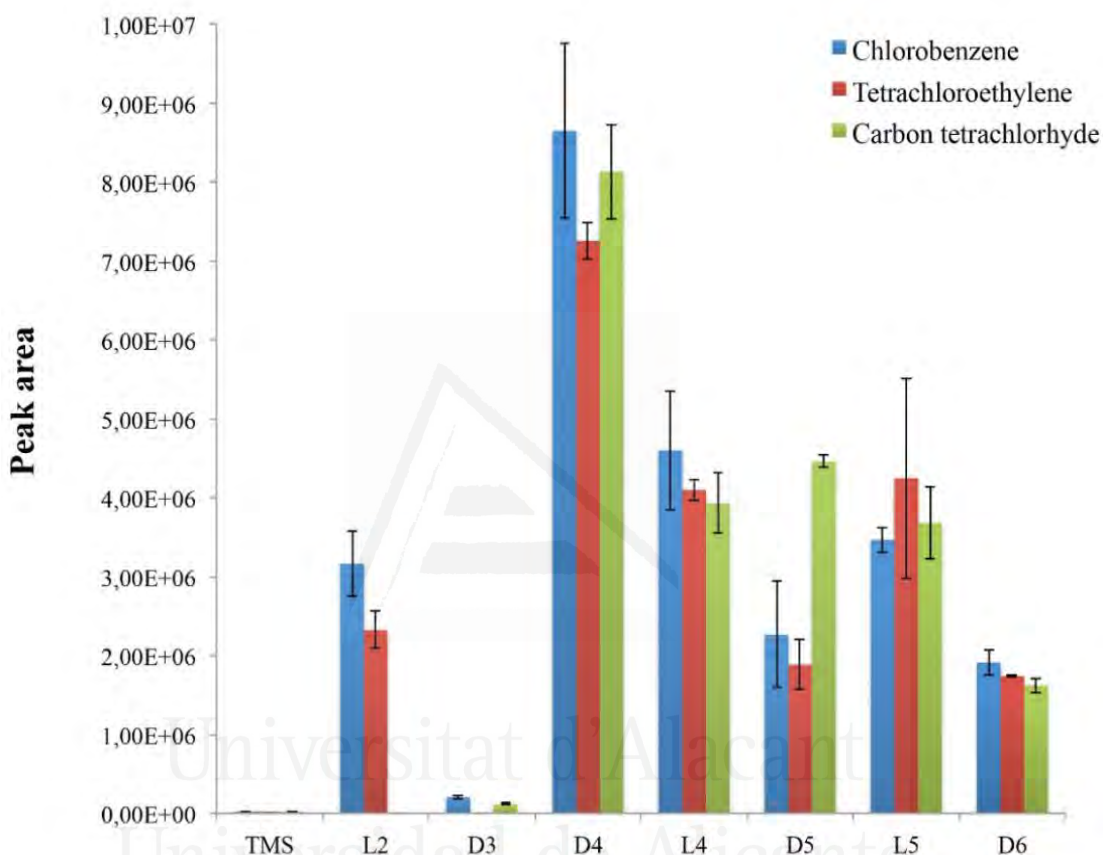


Figure 1.2 Response of the organic solvents tested. Deionized water samples spiked at 10 mg L^{-1} concentration level. Error bars correspond to standard deviation.

3.1.2. Study of other experimental factors by experimental design

Different factors can affect the extraction yield in the USA-DLLME procedure and in most cases they could be correlated. Therefore, a multivariate approach is recommended for their optimization. In this study, based on the literature and previous experience of our group [17,20,21], the influence of five factors, namely extractant solvent volume, sample volume, sonication time, centrifugation speed and centrifugation time, were studied in order to maximize the extraction yield of

the USA-DLLME procedure. However, some of them might not have a significant effect and they can, thus, be obviated. In this respect, a screening study, prior to optimization of significant factors, is helpful in order to assess the significant factors involved in the analytical system under investigation.

If a large number of factors are involved, reduced factorial designs are employed for screening. A particular type of those designs is the Plackett-Burman design [22], which assumes that the interactions can be completely ignored and so the main effects are only calculated with a reduced number of experiments. A saturated Plackett-Burman matrix was employed because of the large number of factors to be tested. A matrix with 11 factors (five real factors and six dummy factors) was used. The effects of dummy factors were used for the estimation of the experimental error used in the statistical interpretation [23,24].

Two levels were considered for each factor (**Table 1.2**). The matrix of the Plackett-Burman design was composed of 12 experiments. The experiments were randomly carried out in order to nullify the effect of extraneous or nuisance factors. On these experiments standard solutions of 5 mg L⁻¹ were used and GC peak area of individual analytes were used as goal function.

Table 1.2 Experimental factors and levels studied on the Plackett-Burman design.

Factors	Level	
	Low (-1)	High (+1)
Sample volume (mL)	5	10
Extractant volume (μL)	20	50
Sonication time (min)	1	3
Centrifugation speed (rpm)	1500	2300
Centrifugation time (min)	4	6

An ANOVA test was used to evaluate the data and statistically significant effects were determined using a *t*-test with a 95% probability [23,24] and visualized by using main effects Pareto charts (**Figure 1.3**). The Pareto charts, shown in **Figure 1.3**, belong to D3 and L4. The charts for the rest of the analytes are not shown as they are similar.

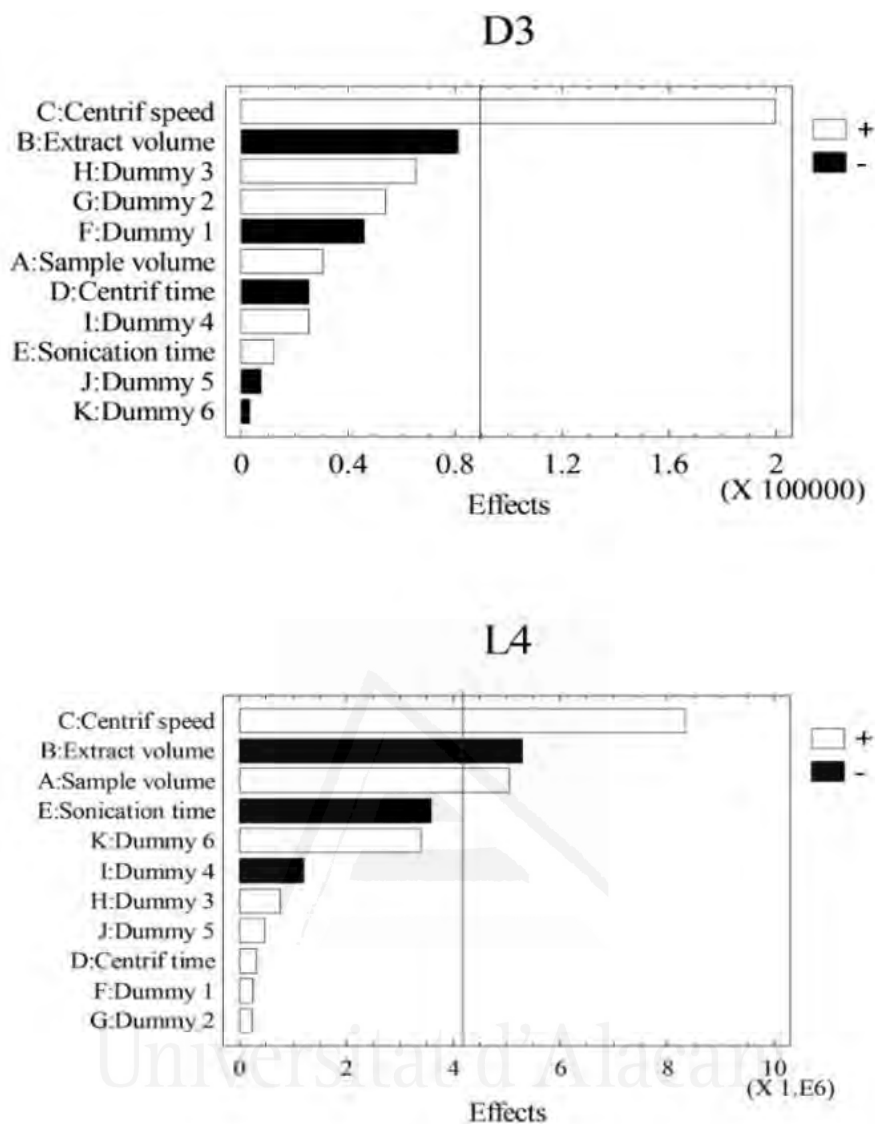


Figure 1.3 Pareto charts of the main effects obtained from the Plackett-Burman design.

According to the results, centrifugation speed was the most significant factor for all target analytes showing a positive effect. Higher centrifugation speed provides easier deposition of extractant solvent at the bottom of the tube. Pareto charts also reveal that sample volume appeared as a positive non-significant effect except for L4, D5 and D6 that appeared as positive significant factor. This positive effect agrees with the fact that increasing the aqueous sample volume also led to an increase in the total amount of analytes present in the solution, given that all samples were spiked at the same concentration level.

Consequently, a greater amount of target pollutants was transferred to the extractant solvent.

Extractant solvent volume appeared as a non-significant effect except for L4, D5 and D6 that appeared as significant effect showing a negative sign. This is because increasing the extractant volume, the enrichment factor is reduced for dilution effect, so that the signal is larger by decreasing the ratio between extractant solvent and sample volumes. Sonication time appeared as non-significant effect for all the analytes with different sign for each target compound. Therefore, 2 min was chosen as a compromise value for all analytes.

Centrifugation time, also appeared as non-significant effect in all cases with different sign for each target compound. As previously, 5 min were chosen as a compromise value for all analytes.

The second study was concerned with optimizing the significant factors in order to obtain the best response. Different experimental designs can be found in the literature, many of them are based on the so-called response surface designs. Box-Wilson or central composite design (CCD) is one of the most used response surface designs, which is constructed by several superimposed designs. It consists of a factorial design (2^k) augmented with $(2k)$ star points, where k is the number of factors to be optimized, and with a central point, which can be run n times [22]. A circumscribed central composite design (CCCD) was employed, where the star points were located at $\pm\alpha$ from the centre of the experimental domain, which was situated at 0. In order to establish the rotatability of the experimental design, n was set at 2 and $\alpha = \sqrt[4]{2^k}$ [22]. The overall matrix of CCCD design involved 16 experiments.

In this study, the three factors considered were: sample volume, extractant solvent volume and centrifugation speed. The low (-1), central (0), and high (+1) levels of these factors, as well as the location of their star points ($\alpha = \sqrt[4]{2^k} = 1.682$), are given in **Table 1.3**. Standard solutions of 1 mg L^{-1} were used and the response function was GC sum peak area of all siloxanes since the extraction conditions should be the optimum simultaneously for all model analytes.

Table 1.3 Experimental factors and levels studied on the circumscribed central composite design (CCCD).

Factors	Level			Star points ($\alpha = 1.682$)	
	Low (-1)	Central (0)	High (+1)	- α	+ α
Centrifugation speed (rpm)	1500	1800	2100	1295	2305
Extractant volume (μL)	20	30	40	13	47
Sample volume (mL)	8.0	10.0	12.0	6.6	13.4

The data obtained were evaluated by ANOVA test, and the effects were visualized by using Pareto chart (**Figure 1.4**). As can be seen, extractant solvent volume is significant showing a negative effect, whilst sample volume shows a non-significant positive effect upon extraction. Indeed, increasing the sample volume results in an increase in the total amount of analyte extracted, reaching a maximum at 13.3 mL (+1.652). Extractant solvent volume shows a negative effect, reaching a maximum at 13 μL (-1.682). This negative effect could be attributed to a dilution effect. Centrifugation speed shows a positive non-significant effect, reaching a maximum at 2300 rpm (1.682).

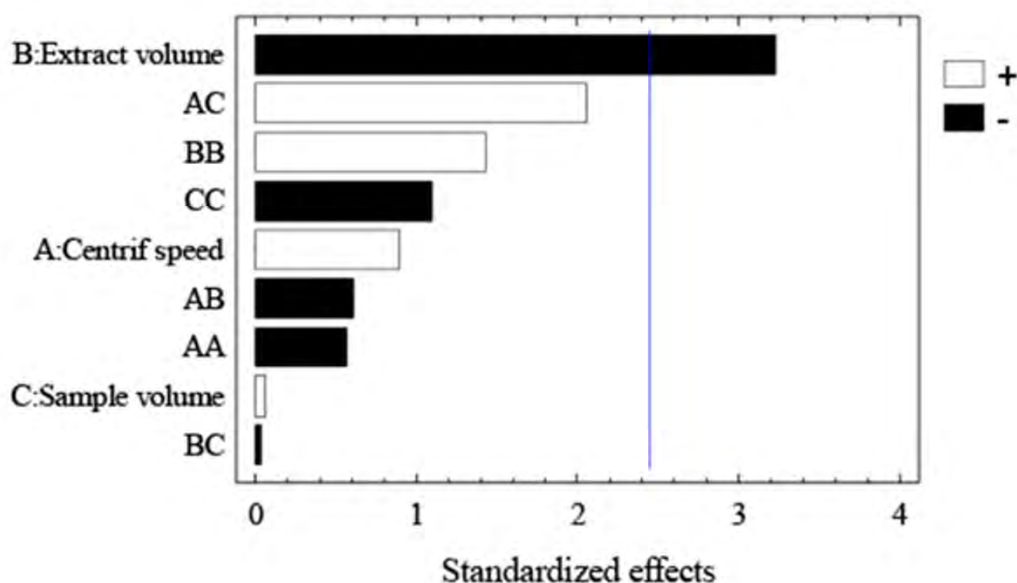


Figure 1.4 Pareto chart of the main effects obtained from the circumscribed central composite design.

Overall, the results obtained from the optimization process lead to the following experimental conditions: extraction solvent volume, 13 μL ; sample volume, 13 mL; centrifugation speed, 2300 rpm; centrifugation time, 5 min; and sonication time, 2 min.

3.2. Study of performance parameters

A calibration study was performed by spiking deionized aqueous samples with analytes over the concentration range of 5-25 $\mu\text{g L}^{-1}$ for TMS and D3, 2-25 $\mu\text{g L}^{-1}$ for L2, D4, L4 and D5, and 2-15 $\mu\text{g L}^{-1}$ for L5 and D6. In addition, L5 and D6 showed non-linear behaviour above concentrations of 15 $\mu\text{g L}^{-1}$. The calculated calibration curves gave a high level of linearity for all target analytes with correlation coefficients (r) ranged between 0.991 and 0.9997 as shown in **Table 1. 4**. The repeatability of the proposed method, expressed as coefficient of variation (CV), was evaluated by extracting seven consecutive aqueous samples spiked at 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ with each target analyte and was found between 10 and 24%. The limits of detection (LODs) for all target analytes were determined according to a signal-to-noise-ratio (S/N) of three and the limits of quantification (LOQs) as ten times the above mentioned ratio. LODs values were found between 0.002

and $1.4 \mu\text{g L}^{-1}$ and LOQs values between 0.007 and $4.7 \mu\text{g L}^{-1}$ (**Table 1.4**). **Table 1.5** shows USA-DLLME enrichment factors obtained with deionized water samples at 25 and $50 \mu\text{g L}^{-1}$ spiked level. The enrichment factors were obtained as the ratio of concentrations of the extractant solvent and deionized water samples (25 and $50 \mu\text{g L}^{-1}$). As can be seen, the mean enrichment factor values range between 153 for TMS to 855 for D4.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Table 1.4 Performance parameters of the developed USA-DLLME-GC-MS method for the determination of siloxanes in water samples.

Analyte	Correlation coefficient (r) ^a	CV (%) ^b	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^c	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^d
TMS	0.994	10	1.4	4.7
L2	0.993	20	0.006	0.02
D3	0.993	24	0.4	1.3
D4	0.996	22	0.002	0.007
L4	0.991	22	0.003	0.01
D5	0.993	21	0.003	0.01
L5	0.9997	22	0.02	0.07
D6	0.992	22	0.03	0.1

^a Studied linear range: TMS and D3: 5-25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (number of standards = 5, number of replicates = 3 for level); L2, D4, L4 and D5: 2-25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (number of standards = 6; number of replicates = 3 for level); L5 and D6: 2-15 $\mu\text{g L}^{-1}$ (number of standards = 4, number of replicates = 3 for level).

^b Coefficient of variation (CV); mean value for seven replicate analyses; spiked level: 10 $\mu\text{g L}^{-1}$.

^c Limits of detection (LODs) were calculated for a signal-to-noise ratio of three (S/N = 3).

^d Limits of quantification (LOQs) were calculated for a signal-to-noise ratio of ten (S/N = 10).

Universidad de Alicante

Table 1.5 Enrichment factors of the optimized USA-DLLME-GC-MS method for the determination of siloxanes in water samples.

Analyte	Enrichment factor		Mean
	25 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	
TMS	160	146	153
L2	350	344	347
D3	619	642	631
D4	855	856	855
L4	268	303	286
D5	245	320	282
L5	260	273	266
D6	362	309	335

Comparison of different analytical methods developed for the determination of siloxanes in wastewater samples is shown in **Table1.6**. Similar LODs values are obtained, however, the sample preparation step in the present work is shorter, easy to handle and more environmentally friendly than those previously published. In addition, a higher number of siloxanes have been analyzed and some of them not previously reported (i.e., TMS). Furthermore, emulsion problem has been obviated, what is considered an important problem in other sample preparation methodologies (i.e., LLE) of wastewater samples.

Table 1.6 Comparison of different methods developed for the determination of siloxanes in wastewater samples.

Analyte	Separation/ detection	Extraction	Extraction time (min)	Linear range	CV (%)	LOD	Enrichment factor	Comments	Ref.
D3, D4, D6	GC-FID	XAD-resin	-	-	-	-	-	-	[4]
D5	GC-MS	Heating (headspace)	10	0-1 10 ³ (ng L ⁻¹)	4-20	6.2 (ng L ⁻¹)	-	-	[12]
L3, L4, L5, D3, D4, D5	GC-(QqQ)-MS-MS	LLE	>20	0.25-5000 (µg L ⁻¹)	4.5-13.2	0.1-0.4 (ng L ⁻¹) 3.2-13 (ng L ⁻¹)	-	750 mL of hexane Two steps concentration	[13]
D4, D5, D6	GC-MS	Membrane-assisted solvent (pentane, 0.5 mL)	60	0.1-1.5 (µg L ⁻¹)	21-25	0.002-0.005 (µg L ⁻¹)	-	Two isotopic internal standards. Large volume injection.	[14]
TMS, L2, L4, L5 D3, D4, D5, D6	GC-MS	USA-DLLME	7	2-25 (µg L ⁻¹)	10-24	1.4 (µg L ⁻¹) 0.003-0.02 (µg L ⁻¹) 0.002-0.4 (µg L ⁻¹)	153-855	-	This work

 Universitat d'Alicante
 Universidad de Alicante

3.3. “Real-world” water analysis

As described above, three replicates of each wastewater samples from different treatment plants were extracted using the USA-DLLME developed method and analyzed by GC-MS. The preliminary results showed that only samples from Murcia treatment plants contained siloxanes above the LODs of the method (**Table 1.7**). This table shows the analysis of wastewater samples taken at different points of two wastewater treatment plants. As can be seen, L2, D3, D4, D5 and D6 shows positive results in some of the points studied.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Table 1.7 Analysis of wastewater samples collected at different points in two treatment plants using the proposed USA-DLLME-GC-MS method.

Analyte	Concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$) \pm SD						
	Industrial & urban effluent (TPI) ^a	UV reactor inlet (TPI) ^a	UV reactor outlet (TPI) ^a	Industrial & urban influent (TPII) ^b	Industrial & urban effluent (TPII) ^b	UV reactor inlet (TPII) ^b	UV reactor outlet (TPII) ^b
TMS	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD
L2	\leq LOD	\leq LOD	1.7 \pm 0.3	\leq LOD	\leq LOD	1.7 \pm 0.3	\leq LOD
D3	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	0.9 \pm 0.2	\leq LOD
D4	1.8 \pm 0.4	\leq LOD	2.5 \pm 0.5	3.6 \pm 0.8	2.2 \pm 0.5	\leq LOD	\leq LOD
L4	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD
D5	22.7 \pm 4.8	4.6 \pm 1.0	3.7 \pm 0.8	4.8 \pm 1.0	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD
L5	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD	\leq LOD
D6	\leq LOD	0.6 \pm 0.1	\leq LOD	\leq LOD	1.2 \pm 0.3	4.6 \pm 1.0	9.5 \pm 2.1

^a Samples taken from the treatment plant (I) in Murcia.

^b Samples taken from the treatment plant (II) in Murcia.

Universidad de Alicante

In order to investigate the effects of sample matrix upon the USA-DLLME procedure three replicate analyses were carried out with the effluent wastewater samples from Alicante treatment plant. Samples were spiked at $10 \mu\text{g L}^{-1}$ and $5 \mu\text{g L}^{-1}$ with each target contaminant, filtrated with common lab filter paper and analyzed under optimized experimental conditions. Relative recovery values were determined as the ratio of the concentrations found in real-world and deionized water samples, spiked at the same contamination level. The results for each set of experiments are summarized in **Tables 1.8** and **9**. Relative recovery values range between 71 and 116% for all analytes. As shown in the table, matrix effects were not significant, considering 70% and 120% as the acceptable lower and upper recovery limits, respectively.

Table 1.8 Relative recoveries and CV values of the siloxanes studied in wastewater samples.

Analyte	Relative recoveries and CV values (%) in parentheses ^a		
	Industrial & urban effluent (S1) ^b	Industrial & urban effluent (S2) ^b	Industrial & urban effluent (S3) ^b
TMS	93 (18)	99 (15)	116 (13)
L2	71 (23)	73 (20)	73 (19)
D3	71 (15)	85 (6)	86 (7)
D4	77 (18)	82 (11)	82 (11)
L4	73 (16)	79 (20)	74 (21)
D5	72 (26)	77 (29)	81 (19)
L5	71 (14)	72 (24)	74 (19)
D6	73 (20)	76 (22)	81 (21)

^a Three replicate analyses at $5 \mu\text{g L}^{-1}$ spiked level.

^b Three samples from the treatment plant in Alicante.

Table 1.9 Relative recoveries and CV values of the siloxanes studied in wastewater samples.

Analyte	Relative recoveries and CV values (%) in parentheses ^a		
	Industrial & urban effluent	Industrial & urban effluent	Industrial & urban effluent
	(S1) ^b	(S2) ^b	(S3) ^b
TMS	82 (7)	94 (8)	89 (7)
L2	76 (10)	84 (10)	83 (1)
D3	82 (12)	74 (18)	82 (20)
D4	71 (10)	72 (15)	80 (12)
L4	93 (10)	81 (20)	85 (16)
D5	99 (7)	74 (11)	80 (20)
L5	80 (3)	86 (10)	81 (9)
D6	89 (4)	92 (11)	86 (21)

^a Three replicate analyses at 10 µg L⁻¹ spiked level.

^b Three samples from the treatment plant in Alicante.

4. Conclusions

A new and an environmentally friendly method has been developed for the analysis of eight siloxanes in wastewater samples based on ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (USA-DLLME) coupled to GC-MS. Optimization of the microextraction method has been done by experimental design. USA-DLLME methodology is faster, cheaper and easier to handle than those previously studied for the same purpose. The LOD values obtained satisfy the requirements for these analytes in wastewater samples for biogas production studies. Therefore, the suggested method can be an excellent alternative for laboratories that perform analysis of these compounds in this type of complex samples.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Science and Innovation (project n. CTQ2011-23968), Generalitat Valenciana (Spain) (project

n. ACOMP/2013/072) and LABAQUA S.A (Alicante, Spain) for the financial support.

References

- [1] C. Lassen, C.L. Hansen, S.H. Mikkelsen, J. Maag, <http://www.miljoestyrelsen.dk/udgiv/publications/2005/87-7614-756-8/pdf/87-7614-757-6.pdf>
- [2] L. Kaj, M. Schlabach, J. Andersson, A.P. Cousins, N. Schmidbauer, E. Brorström-Lundén, B.B. Mogensen, M. Dam, J. P. Hirvi, A.S. Sigurdsson, O. Glesne, B. Hedlund, A. Lundgren, Siloxanes in the Nordic Environment, Nordic Council of Ministers, Copenhagen 2005: http://www.norden.org/da/publikationer/publikationer/2005-593/at_download/publicationfile
- [3] J. Velicogna, E. Ritchie, J. Princz, M.E. Lessard, R. Scroggins, Chemosphere 87 (2012) 77-83.
- [4] R. Huppmann, H. Werner, H. Schröder, Fresenius J. Anal. Chem. 354 (1996) 66-71.
- [5] M. Schweigkofler, R. Niessner, J. Hazard. Mater. B83 (2001) 183-196.
- [6] R. Dewil, L. Appels, J. Baeyens, Energ. Convers. Manage. 47 (2006) 1711-1722.
- [7] Y. Cheng, M. Shoeib, L. Ahrens, T. Harner, J. Ma, Environ. Pollut. 159 (2011) 2380-2386.
- [8] S. Rasi, J. Lehtinen, J. Rintala, Renew. Energ. 35 (2010) 2666-2673.
- [9] M. Schweigkofler, R. Niessner, Environ. Sci. Technol. 33 (1999) 3680-3685.
- [10] R. Dewil, L. Appels, J. Baeyens, A. Buczynska, L. Van Vaeck, Talanta 74 (2007) 14-19.
- [11] Z. Zhang, H. Qi, N. Ren, Y. Li, D. Gao, K. Kannan, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 60 (2011) 204-211.
- [12] C. Sparham, R. Van Egmond, S. O'Connor, C Hastie, M. Whelan, R. Kanda, O. Franklin, J. Chromatogr. A 1212 (2008) 124-129.
- [13] J. Sanchís, E. Martínez, A. Ginebreda, M. Farré, D. Barceló, Sci. Total Environ. 443 (2013) 530-538.

- [14] D.G. Wang, M. Alaei, H. Steer, T. Tait, Z. Williams, S. Brimble, L. Svoboda, E. Barresi, M. DeJong, J. Schachtschneider, E. Kaminski, W. Norwood, E. Sverko, *Chemosphere* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.10.044>.
- [15] D. Han, K.H. Row, *Microchim. Acta* 176 (2012) 1-22.
- [16] J. Regueiro, M. Llompарт, C. García-Jares, J.C. García-Monteaгudo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27-38.
- [17] L. Vidal, E. Psillakis, C. Domini, N. Grané, F. Marken, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 584 (2007) 189-195.
- [18] L. Vidal, C.E. Domini, N. Grané, E. Psillakis, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 592 (2007) 9-15.
- [19] F. Pellati, S. Benvenuto, F. Yoshizaki, D. Bertelli, M.C. Rossi, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 265-273.
- [20] C. Cortada, L. Vidal, S. Tejada, A. Romo, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 29-35.
- [21] C. Cortada, L. Vidal, A. Canals, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 17-22.
- [22] D.C. Montgomery, *Design and Analysis of Experiments*, seventh ed., Wiley, New Jersey, 2009.
- [23] Y.V. Heyden, K. Luypaert, C. Hartmann, D.L. Massart, J. Hoogmartens, J.D. Beer, *Anal. Chim. Acta* 312 (1995) 245-262.
- [24] Y.V. Heyden, C. Hartmann, D.L. Massart, L. Michel, P. Kiechle, F. Erni, *Anal. Chim. Acta* 316 (1995) 15-26.

9.2 Graphene oxide/ Fe_3O_4 as sorbent for magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography to determine 2,4,6-trinitrotoluene in water samples





RESEARCH PAPER

Graphene oxide/Fe₃O₄ as sorbent for magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography to determine 2,4,6-trinitrotoluene in water samples

Luciana Costa dos Reis¹ · Lorena Vidal¹ · Antonio Canals¹

Received: 6 October 2016 / Revised: 23 December 2016 / Accepted: 16 January 2017

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017

Abstract

A fast, simple, economical and environmentally friendly magnetic solid-phase extraction (MSPE) procedure has been developed to preconcentrate 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) from water samples prior to determination by liquid chromatography-UV-Vis employing graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite as sorbent. The nanocomposite synthesis was investigated, and the MSPE was optimized by a multivariate approach. The optimum MSPE conditions were 40 mg of nanocomposite, 10 min of vortex extraction, 1 mL of acetonitrile as eluent, and 6 min of desorption in an ultrasonic bath. Under the optimized experimental conditions, the method was evaluated to obtain a preconcentration factor of 153. The linearity of the method was studied from 1 to 100 µg L⁻¹ (N=5), obtaining a correlation coefficient of 0.994. The relative standard deviation and limit of detection were found to be 12% (n=6, 10 µg L⁻¹) and 0.3 µg L⁻¹, respectively. The applicability of the method was investigated, analyzing three types of water samples (i.e., reservoir and drinking water and effluent wastewater) and recovery values ranged between 87 and 120% (50 µg L⁻¹ spiking level), showing that the

matrix had a negligible effect upon extraction. Finally, the semiquantitative Eco-Scale metrics confirmed the greenness of the developed method.

Electronic supplementary material: The online version of this article (doi:10.1007/s00216-017-0211-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Keywords Graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite · Liquid-chromatography-UV-Vis · Magnetic solid-phase extraction · 2,4,6-Trinitrotoluene · Water samples

Introduction

The existence of graphene was reported in 2004 and classified as an advanced carbonaceous two-dimensional material of unique properties that has been the object of various investigations [1-3]. Among these properties, graphene has a high theoretical surface area (2630 m² g⁻¹), resulting in a high adsorption capacity. In addition, its electron delocalization system can form π-π bonds with benzene rings. Thanks to these particular properties, graphene can be used for adsorbing aromatic compounds [4-8]. The chemical synthesis of graphene commonly follows the Hummers method [9], consisting of the oxidation of graphite to form graphene oxide (GO) followed by the chemical reduction of GO to graphene using a reducing agent such as hydrazine. Hummers oxidation method [9] is considered the most efficient for the production of graphene on a large scale and is also highly economical.

Graphene has been used as an adsorbent for solid-phase extraction (SPE) to increase the adsorptive capacity [4]. The SPE separation technique turns out to be simple, fast, economical, offers a low consumption of reagents, and has the ability to combine with different detection techniques in off-line and as well as in on-line modes [10]. Recent studies using graphene as adsorbent presented excellent extraction efficiency for pesticides [11], polycyclic aromatic hydrocarbons [12], drugs [13], and phthalate esters [14]. An increased selectivity of the SPE can be achieved when using functionalized graphene with oxidized groups [4]. Hydrophilic functional groups, such as hydroxyl and carbonyl, increase the affinity of graphene with polar compounds [4]. Miniaturization of the

SPE technique includes the solid-phase microextraction (SPME) technique which also used graphene as adsorbent coating of the fibers [5-8,15]. However, the use of fiber as adsorbent has disadvantages such as its fragility, the reduced amount of adsorbent phase, its high cost, and possible memory effects [16].

On the other hand, GO as a derivative of the graphene synthesis presents numerous oxygen groups on the surface such as epoxy, carboxyl, and hydroxyl radical-groups [17], providing greater hydrophilicity than graphene [18]. The functional groups of GO are capable of forming hydrogen bonds or electrostatic interactions with aromatics and polar compounds or metal ions [18-20]. GO has proved to be an ideal sorbent for SPE [21] and SPME [22].

Another recent sample separation technique is the magnetic solid-phase extraction (MSPE). The adsorbents used in the MSPE technique possess a magnetic phase mainly composed of an iron mineral or iron oxides such as magnetite (Fe_3O_4) or maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) and a sorbent, including organic and inorganics polymers [23] and metal oxides [24]. Modified silica (C18, C8, and phenyl groups) [25], molecularly imprinted polymers [26], and recently carbon nanotubes [27], graphene [28], and GO [29] have been employed. The use of sorbents decorated with magnetic solids is an excellent alternative for preconcentrating and isolating different chemical species because it synergically combines the excellent sorbent capacity with easy sorbent handling by means of an external magnetic field. Other advantages are the reduced processing time, amount of sorbent, solvent consumption, and the reusability of sorbent [18]. This sample preparation technique has been employed in the analysis of phenolic compounds [23], perfluorinated compounds [25], bisphenol A [27], anti-inflammatory drugs [30], and pesticides [28, 31]. Recently, GO hybrid materials have gained interest in analytical sample preparation. The GO/ Fe_3O_4 magnetic nanocomposite has been synthesized and used in MSPE for adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [29], drugs [32], and PCBs [33], among others, but the number of applications is still scarce.

Military activities, mining, and building demolition leave explosive residues in the environment that can easily contaminate soils, surface water, and groundwater. Many explosives or explosive mixtures have toxic effects on the

environment, animals, and humans [34]. 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) is classified as a high secondary explosive that pollutes the soil and water during the production process, purification, and use [35]. Small amounts of TNT are also used in the colorant industry and as photographic components [36]. However, the direct determination of TNT in the environment at trace levels is limited due to its low concentration and matrix interferences. To this end, bulky and expensive instrumentation as gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) has been usually employed [37-40]. Thus, the demand for innovative, simple, fast, economical, and sensitive analytical techniques capable of detecting nitroaromatic explosives (i.e., TNT) at trace level concentrations is mandatory.

Therefore, the objective of this work was to develop a new, fast, and sensitive analytical method for TNT determination in water samples employing the GO/Fe₃O₄ nanocomposite as sorbent prior to liquid chromatography-UV-Vis detection (LC-UV-Vis). The method was optimized by experimental design, validated, and applied to real samples. Finally, the Eco-Scale metrics was carried out in order to assess the greenness of the developed method.

Materials and methods

Chemical reagents and real-world water samples

Iron oxide II, III (Fe₃O₄) (50-100 nm) and graphene oxide (GO) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

TNT solution of 1000 mg L⁻¹ in acetonitrile was obtained from LGC Standards (Barcelona, Spain). This standard solution was stored in the dark at 4 °C. Working solutions were prepared daily by diluting the stock solution with deionized water.

Acetonitrile and methanol HPLC-grade from Sigma-Aldrich and milli-Q water (resistivity of 18 mΩ cm) from Millipore (Billerica, MA, USA) were used for elution and mobile phase.

HNO₃ 65% from Merck (Darmstadt, Germany) and NaOH pellets from Scharlau (Barcelona, Spain) were used for the synthesis of nanocomposite.

Reservoir water and drinking water from Seville (Spain) and effluent wastewater from a sewage treatment plant in Vitoria (Spain) were used in the

study as real-world water samples. All samples were stored in the dark at 4 °C. The previous analysis of the real-world water samples confirmed the absence of TNT.

Instrumentation

Transmission electron microscope JEM 2010 (JEOL, Japan), X-ray photoelectron spectrometer Thermo K-Alpha-Scientific (Waltham, MA, USA), D8 Advance X-ray diffractometer (Bruker, Germany), and SQUID magnetometer MPMS-XL-5 (Quantum Design, CA, USA) were used for nanocomposite characterization (i.e., GO/Fe₃O₄).

In the MSPE procedure, a Ni-coated neodymium magnet, N45 grade, dimensions 45 x 30 mm from Supermagnete (Gottmadingen, Germany) was used as magnetic external field.

The chromatographic analyses were performed by Shimadzu LC-20AT liquid chromatograph (Kyoto, Japan) coupled to a Shimadzu SPD-10A UV-Vis detector (operated at 254 nm), equipped with a Phenomenex C18 column (3 µm particle diameter, 4.6 mm i.d. x 15 cm) (Torrance, CA, USA). Isocratic water/methanol mixture (50:50, v/v) was employed as mobile phase at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The injection volume was 20 µL.

Synthesis of GO/Fe₃O₄ nanocomposite

The synthesis of GO/Fe₃O₄ nanocomposite is based on a previous work conducted by Han et al [29]. Fe₃O₄ nanoparticles were dispersed in 1 M HNO₃ solution through sonication for 30 min, generating a solution containing 150 mg mL⁻¹ of Fe₃O₄ with positively charged surface. A dispersion of GO in deionized water (1 mg mL⁻¹) was prepared using ultrasound energy for 1 h, wherein the GO surface was negatively charged. The dispersions of Fe₃O₄ and GO were mixed, the pH of the mixture was adjusted to 2, and the mixture (GO/Fe₃O₄ ratio 1:5 (w/w)) was subjected to vigorous magnetic stirring for 5 h. Later, GO/Fe₃O₄ nanocomposite was separated from the liquid phase applying an external magnetic field (neodymium magnet). Finally, the nanocomposite was dried in an

oven under vacuum of 70 cm/Hg at 60 °C for 24 h. **Figure 2.S1** shows the magnetization hysteresis loops of (A) Fe₃O₄ and (B) GO/Fe₃O₄ and a photograph showing the magnetic attraction between the synthesized composite and the magnet. The magnetization hysteresis loops of Fe₃O₄ and GO/Fe₃O₄ were S-like curves indicating that both were superparamagnetic materials. The specific magnetization saturation (M_s) was 87.1 and 77.6 emu g⁻¹ for Fe₃O₄ and GO/Fe₃O₄ nanocomposite, respectively. M_s decreases when Fe₃O₄ nanoparticles were decorating GO sheets, which could be attributed to the surface spin effect on Fe₃O₄ caused by modification [41].

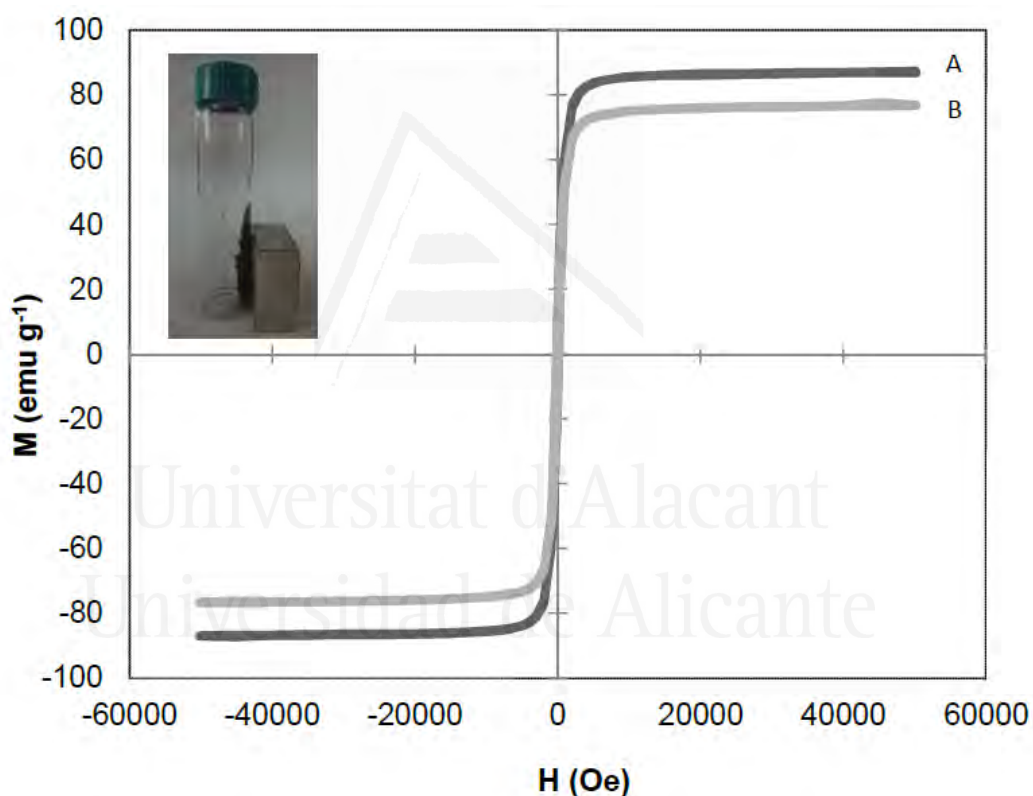


Figure 2.S1 The magnetization hysteresis loops of (A) Fe₃O₄ and (B) GO/Fe₃O₄. Inset shows a photograph showing the magnetic attraction between GO/Fe₃O₄ composite and neodymium magnet.

Magnetic solid-phase extraction procedure

The procedure of MSPE is illustrated in **Figure 2.1** For each MSPE experiment, 40 mg GO/Fe₃O₄ nanocomposite was introduced into a 22 mL vial. Then, 20 mL of standard solution or water sample was added. The mixture was

vortex stirred during 10 min, and once the extraction was complete, the nanocomposite was separated from the liquid phase with a neodymium magnet placed at the bottom of the vial. The liquid was discarded, and 1 mL of acetonitrile was added to the nanocomposite to elute the analyte. The vial was left in an ultrasonic bath for 6 min. Then, using the magnet, the eluate obtained was transferred to another vial. The solvent was completely evaporated by N₂ gas at 800 mbar pressure for 20 min and reconstituted with 50 μ L of acetonitrile. Finally, 20 μ L of the eluate was injected into the LC-UV-Vis system. **Figure 2.2** shows a typical chromatogram of a drinking water sample non-spiked and spiked at 50 μ g L⁻¹ level with the target analyte subjected to the optimized MSPE-LC-UV-Vis method. In order to ensure that no residual TNT remained adsorbed on composite, two more elutions were carried out with 1 mL of acetonitrile and 6 min in ultrasonic bath.

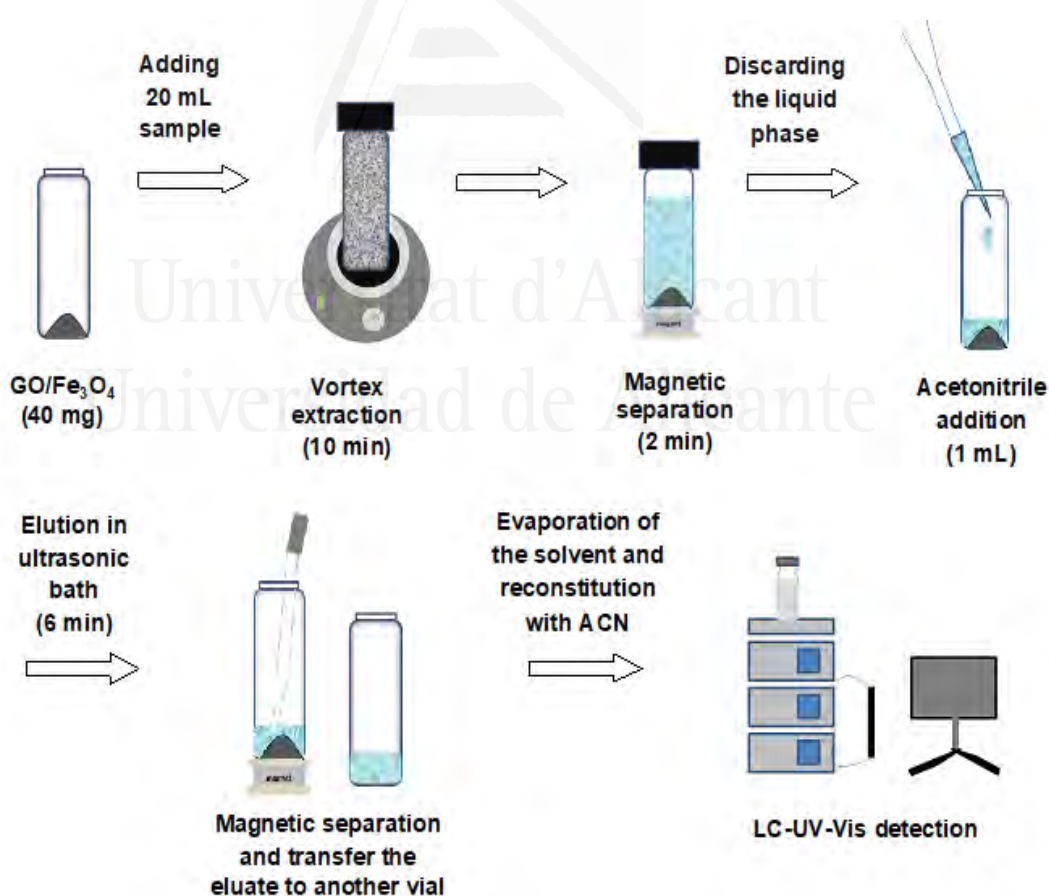


Figure 2.1 MSPE of TNT using the GO/Fe₃O₄ nanocomposite.

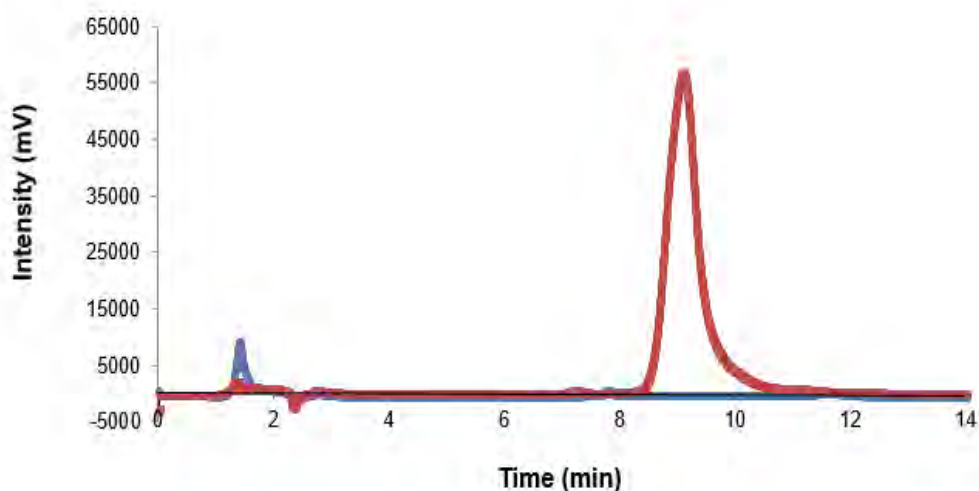


Figure 2.2. Chromatogram obtained after MSPE of a drinking water sample non-spiked (*blue line*) and spiked at $50 \mu\text{g L}^{-1}$ level with target analyte (*red line*). Retention time of the TNT is 9.6 min.

Data processing

Plackett-Burman design was carried out to determine the optimum conditions for MSPE procedure. The statistical software NEMRODW[®] version 2007/2010 ("New Efficient Methodology for Research using Optimal Design") from LPRAI (Marseille, France) was used to build the experimental design matrices and evaluate the results. The peak area of TNT was used as the response function.

Results and discussion

Study of the synthesis of GO/Fe₃O₄ nanocomposite

Firstly, the optimal conditions for the synthesis were investigated. Factors such as the type of stirring, pH, and GO/Fe₃O₄ ratio were studied. The optimal conditions for the synthesis of GO/Fe₃O₄ nanocomposite were determined according to the highest chromatographic peak area of TNT after MSPE.

Different stirring systems were studied (i.e., magnetic stir plate, oscillating table, and vortex) obtaining better results for magnetic stir plate (**Figure 2.S2**).

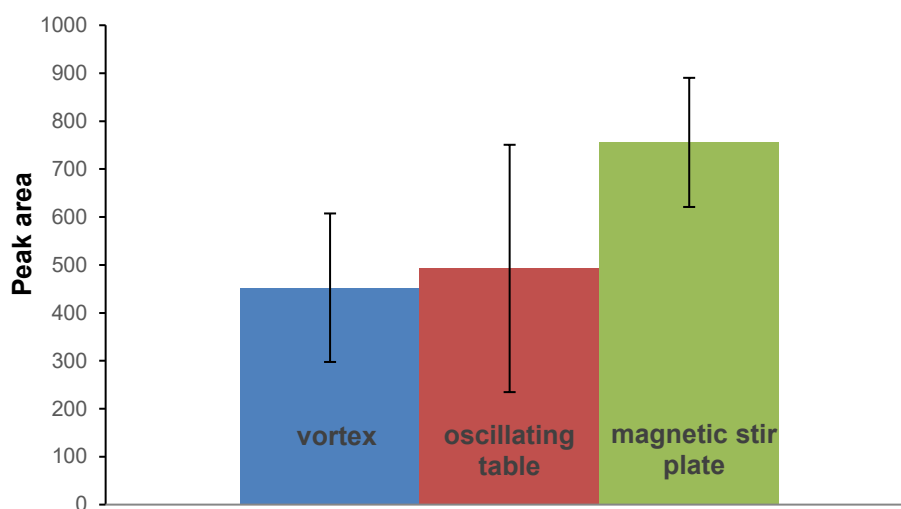


Figure 2.S2 Effect of type of stirring on the synthesis of nanocomposite. Synthesis conditions: GO/Fe₃O₄ ratio (w/w) 1/5 and pH unmodified (0.6). Extraction conditions: 20 mg of nanocomposite, 20 mL standard solution of 1 mg L⁻¹ of TNT, vortex stirring for 5 min, elution with 1 mL of ACN and 3 min in ultrasonic bath. Error bars represent the standard deviation of three replicated analysis.

The study of the GO/Fe₃O₄ ratio (w/w) was made for 1:5 and 1:1 in accordance with the best results obtained in the work conducted by Han et al [29]. The results were similar for the TNT extraction with a ratio of 1:5 and 1:1. However, in the present study, we decided to work with the ratio 1:5 for practical and economical reasons. The MSPE procedure with a GO/Fe₃O₄ ratio 1:1 generates an eluate containing dispersed nanoparticles that can cause obstruction problems in the chromatographic column. In addition, GO is more expensive than Fe₃O₄.

The pH was also studied from 0.6 to 6, and the results are shown in **Figure 2.S3** The better extraction was obtained with the nanocomposite synthesized at pH 2. The GO/Fe₃O₄ nanocomposite can be formed through electrostatic self-assembly. Hence, the effect of pH on the nanocomposite synthesis can be a compromise between the negative charge of GO when dispersed in aqueous solution, as a result of the ionization of the carboxylic acid and phenolic hydroxyl groups on the GO particles, and the positively charged surface of Fe₃O₄. At a low

pH (i.e., 0.6), Fe_3O_4 particles possess a high positive surface charge and they are strongly attracted by GO sheets, decreasing the available surface area of the GO for adsorption of analytes. On the other hand, at a pH higher than 2, the carboxyl groups of the GO sheets are deprotonated [42], also increasing the attraction by the Fe_3O_4 particles and decreasing the available surface area of GO. However, at 2 pH, a maximum value is observed (**Figure 2.S3**) due to maximum GO area available (**Figure 2.S4b**).

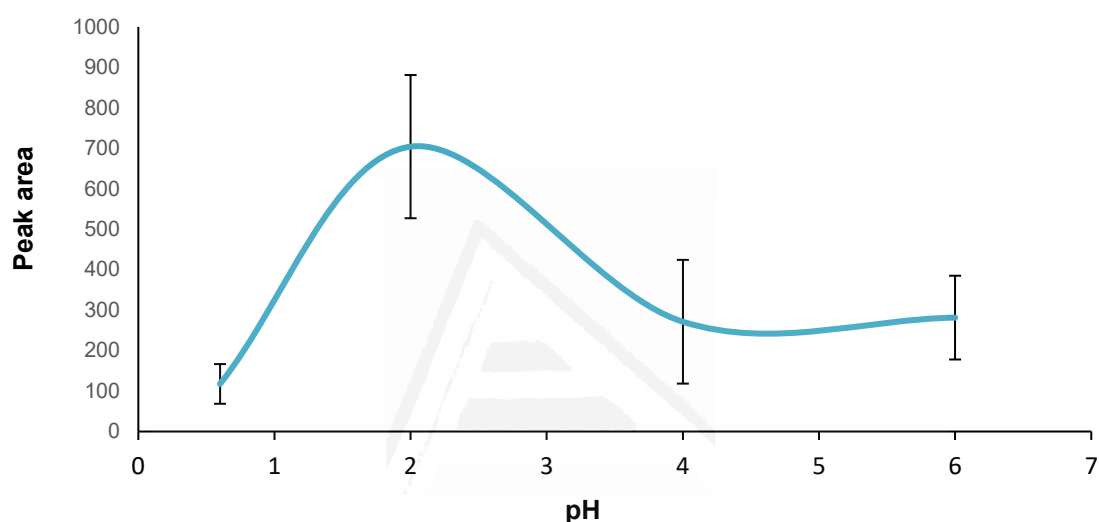


Figure 2.S3 Effect of pH on the synthesis of nanocomposite. Synthesis conditions: GO/ Fe_3O_4 ratio (w/w) 1:5 and magnetic stir plate. Extraction conditions: 20 mg of nanocomposite, 20 mL standard solution of 1 mg L^{-1} of TNT, vortex stirring for 5 min, elution with 1 mL of ACN and 3 min in ultrasonic bath. Error bars represent the standard deviation of three replicated analysis.

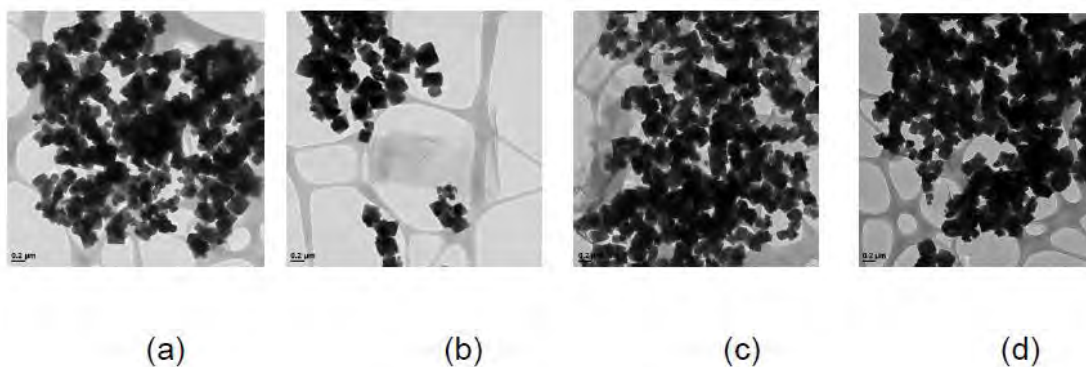


Figure 2.S4 Nanocomposite synthesized under different pH: (a) 0.6; (b) 2; (c) 4; and, (d) 6.

In summary, the optimal conditions for the GO/Fe₃O₄ nanocomposite synthesis were: stirring on magnetic stir plate, pH 2, and GO/Fe₃O₄ ratio (w/w) 1:5. Additionally, batch-to-batch repeatability was studied for three different batches using each and every batch to MPSE of an aqueous solution spiked at 0.5 mg L⁻¹ in triplicate. The relative standard deviation (RSD) obtained was of 15%, confirming the good repeatability of the synthesis process.

Finally, it is important to point out that extractions using Fe₃O₄ as extractant phase (without GO) were carried out and TNT was not detected in the eluates, showing that Fe₃O₄ did not possess a sorption capacity for target analytes.

Characterization of the GO/Fe₃O₄ nanocomposite

Transmission electron microscopy

The morphology of the GO, Fe₃O₄, and prepared nanocomposite were characterized by transmission electron microscopy (TEM) (**Figure 2.3**). As shown in **Figure 2.3a**, the TEM image of the GO sheet revealed an irregular shape and contained some wrinkles providing a large surface area. The Fe₃O₄ nanoparticles (**Figure 2.3b**) were cubic in shape with a mean size of approximately 100 nm, and they aggregated by dipole-dipole interaction. **Figure 2.3c** presents a representative TEM image of the obtained GO/Fe₃O₄ nanocomposite. It can be observed that the Fe₃O₄ nanoparticles were anchored as clusters onto the surface of the GO sheets. This observation was attributed to electrostatic self-assembly between the positively charged surface of the Fe₃O₄ and the negatively charged GO in aqueous solution.

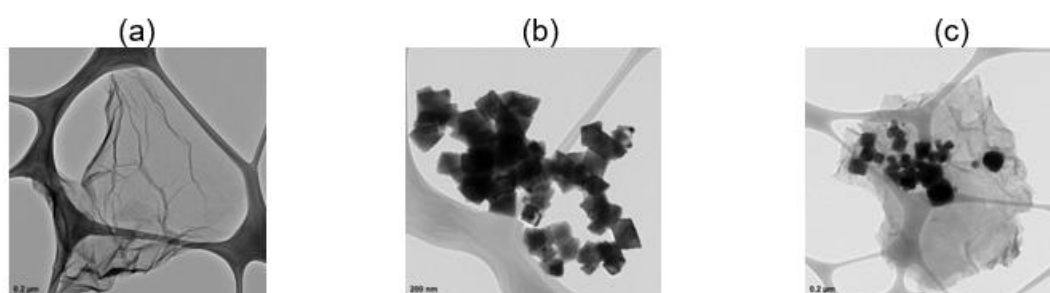


Figure 2.3 TEM analysis of (a) GO, (b) Fe₃O₄ nanoparticles, and (c) GO/Fe₃O₄ nanocomposite.

X-ray photoelectron spectroscopy

X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) determined the chemical composition of the GO/Fe₃O₄ nanocomposite, confirming the exclusive presence of carbon (C), iron (Fe), and oxygen (O) and the absence of impurities (**Figure 2.4**).

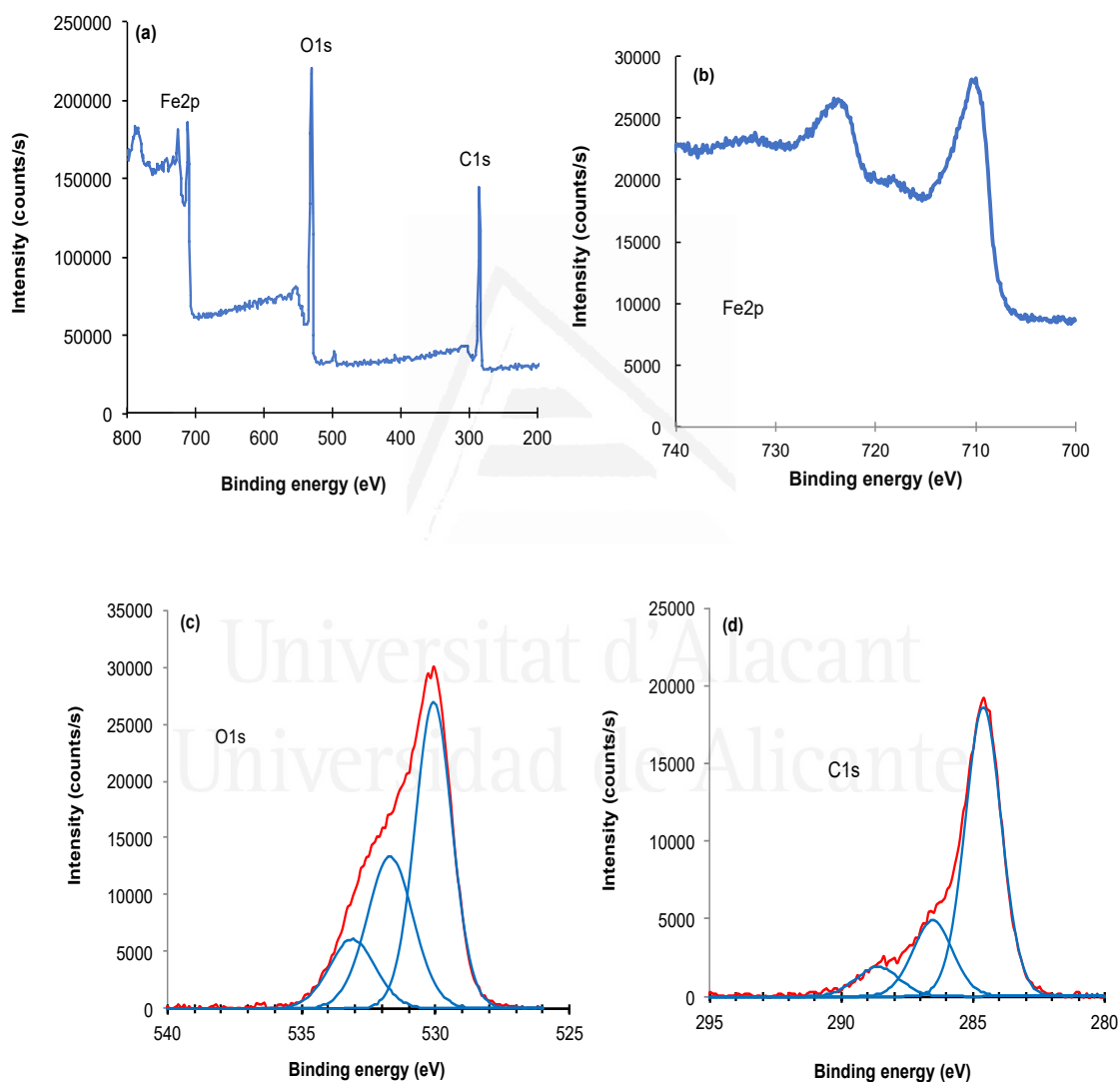


Figure 2.4 XPS spectra of (a) GO/Fe₃O₄, (b) Fe2p, (c) O1s, (d) C1s.

The scan XPS spectra of the GO/Fe₃O₄ nanocomposite appeared at binding energies of approximately 290, 520 and 710 eV attributed to the C1s, O1s, and Fe 2p, respectively (**Figure 2.4a**). There were two peaks for Fe 2p, corresponding

to Fe 2p_{1/2} and Fe 2p_{3/2}, which indicated the presence of Fe₃O₄ in the nanocomposite (**Figure 2.4a**). **Figure 2.4b** corresponds to the spectrum in the Fe 2p region. Comparing the spectrum obtained with database spectra [43], it confirmed that the iron oxide of the nanocomposite was magnetite (i.e., Fe₃O₄). Three peaks were present in the O1s spectra of nanocomposite (**Figure 2.4c**), which corresponded to C(O)OH at 530 eV, C=O at 531.5 eV, and C-OH at 533 eV. C1s spectra was represented in the **Figure 2.4d** with binding energies of 284.8 eV for C=C, 286.9 to 289 eV for epoxy and alcoxyl carbon (C-O), and the carboxylate carbon (O-C=O), respectively.

X-ray diffraction

The X-ray diffraction (XRD) measurement was performed to obtain crystalline structural information of the GO/Fe₃O₄ nanocomposite. **Figure 2.S5** shows the XRD pattern of the GO/Fe₃O₄ where intense peaks can be observed at 2θ values of 30.2°, 35.5°, 43.2°, 53.4°, 57°, and 62.5° indexed to (220), (311), (400), (422), (511), and (440) reflections, respectively. These results are consistent with the standard XRD data for the cubic phase Fe₃O₄ (blue lines assigned in the **Figure 2.S5**) and confirm the magnetite as the iron oxide in the synthesized GO/Fe₃O₄ nanocomposite.

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

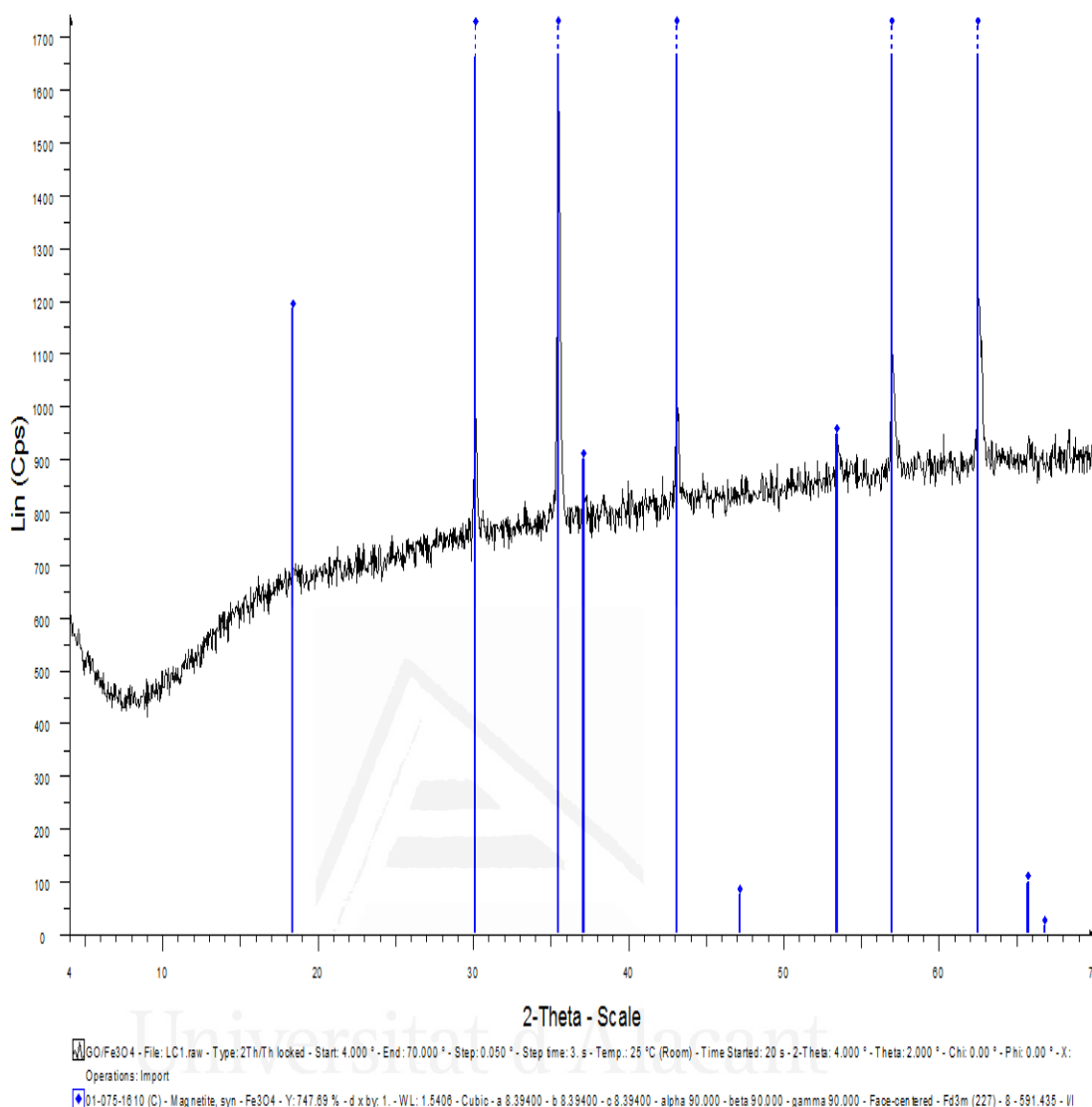


Figure 2.S5 XRD pattern of GO/Fe₃O₄.

Optimization of the MSPE procedure

Fractional factorial designs are commonly used in optimization studies for screening to identify the important variables (i.e., factors) [44]. Plackett-Burman is a two-level fractional factorial design for studying up to $K=N-1$ variables in N runs, where N is a multiple of 4. This sort of design assumes that interactions between factors can be ignored, so the main effects can be calculated with a reduced number of experiments [44]. A Plackett-Burman design was chosen to construct the matrix of experiments including five factors (**Table 2. 1**).

Table 2. 1 Factors and levels of Plackett-Burman design.

Factor	Low level (-1)	High level (+1)
Amount of nanocomposite (mg)	10	20
Vortex extraction time (min)	5	10
Type of eluent	Acetonitrile	Methanol
Desorption time in ultrasound (min)	3	6
Volume of eluent (mL)	1	1.5

According to the type of design, eight different experiments were randomly conducted with 20 mL standard solution of 0.5 mg L⁻¹ of TNT. The data obtained were evaluated by ANOVA, and the results were visualized with the Pareto chart shown in **Figure 2.5**. The length of each bar was proportional to the influence of the corresponding factor, while the effects that exceed reference vertical lines can be considered significant with 95% of probability. In addition, negative and positive signs reveal whether the system response decreases or increases, respectively, when passing from the lowest to the highest level of the corresponding factor.

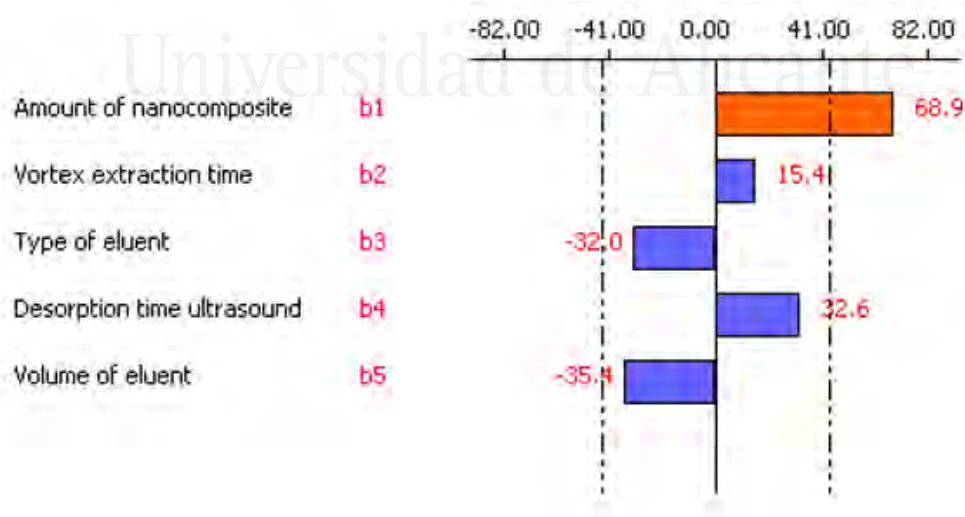


Figure 2.5 Pareto chart of the Plackett-Burman design.

As shown in **Figure 2.5**, the amount of nanocomposite was the only significant factor exhibiting a positive effect. Thus, the other factors were selected considering the sign of effect. Extraction time and desorption time were non-significant with positive effect as longer times increase the extraction and elution, and they were fixed at maximum level (i.e., 10 min and 6 min, respectively). Type and volume of eluent were non-significant with negative effect because best elution with acetonitrile at a lower volume increases the concentration of analyte in the eluent. Therefore, these factors were fixed at minimum level (i.e., acetonitrile and 1 mL, respectively).

According to the result of the experimental design, the amount of nanocomposite was thoroughly studied varying the amount of sorbent from 10 to 50 mg, with the other factors at the corresponding fixed level. A TNT solution of 0.5 mg L^{-1} was used in the extractions. **Figure 2.6** presents the results of MSPE with different amounts of nanocomposite (i.e., 10-50 mg).

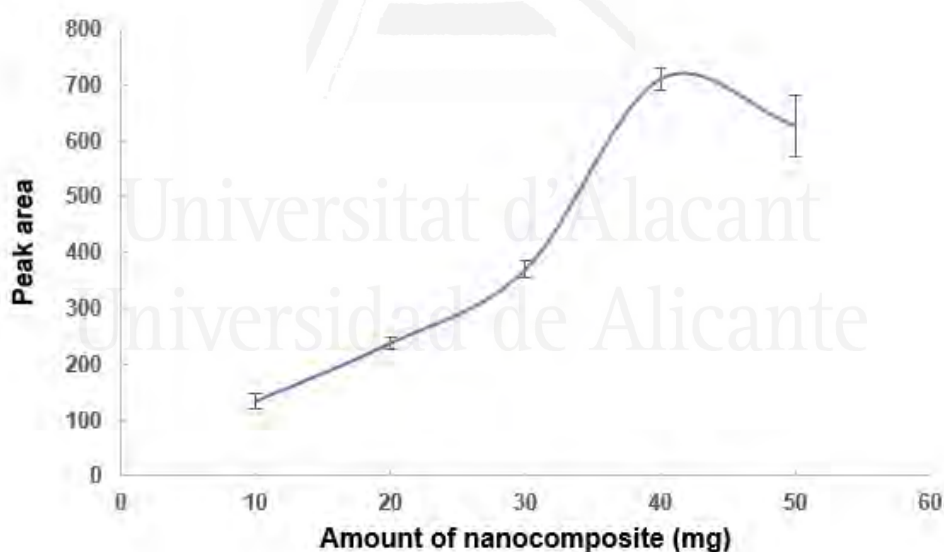


Figure 2.6 Effect of the amount of nanocomposite in MSPE. Error bars represent the standard deviation of three replicated analysis.

The peak area increased by increasing the amount of nanocomposite from 10 up to 40 mg. Below 40 mg of nanocomposite, the analyte was not quantitatively adsorbed due to saturation of the adsorption sites; as a result, the

sensitivity decreased. On the other hand, at over 40 mg, and considering the experimental error, the peak area exhibited a small decrease. Hence, 40 mg of nanocomposite was used in all the experiments.

Optimal MSPE conditions for extracting TNT were: 40 mg of nanocomposite, 10 min of vortex extraction, acetonitrile as eluent, 6 min of ultrasonic desorption, and 1 mL of eluent.

Reuse of GO/Fe₃O₄ nanocomposite

The possibility of reusing the nanocomposite was studied in twelve consecutive MSPE experiments using a TNT solution of 0.5 mg L⁻¹.

The peak area obtained remains without significant changes up to the sixth MSPE. XPS study of fresh and six times used nanocomposite was carried out. Results provided that the fresh nanocomposite was made of 43% of C and 8% of Fe. However, the six times used material contained around 34% of C and 10% of Fe. Although these results confirmed the detachment of the GO, the extraction capacity and the magnetic property were maintained up to the sixth extraction. After the sixth extraction, the sorbent was still extracting TNT but in a less effective way, decreasing around 40% the signal intensity. Therefore, the same nanocomposite could be used up to six times without losing adsorptive capacity. Reuse of the nanocomposite allows reducing the cost of the method and generates less waste.

Analytical parameters

The analytical figures of merit were determined under optimized extraction conditions. Quantitative parameters regarding the working range, correlation coefficient, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) were examined to validate the proposed MSPE-LC-UV-Vis method. The methodological working range and correlation coefficient (r) of the calibration curve were from 1 to 100 µg L⁻¹ and 0.994 (N=5), respectively. In the repeatability study, extractions of an aqueous solution of 10 µg L⁻¹ of TNT were made, obtaining a RSD of 12% for the intra-day repeatability and of 17% for the inter-day repeatability. The intra-day RSD values were obtained by repeating the

extraction six times within a day, and the inter-day RSD values were obtained by repeating the extraction in triplicate in three different days. Methodological LOD was empirically determined, progressively measuring more diluted concentrations of the analyte. LOD was found to be $0.3 \mu\text{g L}^{-1}$, and LOQ was calculated as 3.3 times LOD, being $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (i.e., lowest concentration of the working range). Additionally, LOD was evaluated using $3s_b$ criterion, being s_b the standard deviation of a diluted concentration solution obtaining a value of $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$, which confirmed the results obtained in the empirical approach.

The preconcentration factor of the proposed procedure, defined as the ratio C_e/C_o , wherein C_e is the concentration of TNT in the eluate after the extraction and C_o is the initial concentration of TNT in aqueous phase, was 153. For comparison, the analytical figures of merit of different chromatographic methods for TNT determination are given in **Table 2.2**.

Table 2.2 Chromatographic methods for the determination of TNT.

Preconcentration method	Separation/detection technique	Calibration range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Solvent (volume)	Extraction time (min)	Sample volume (mL)	Ref.
SPME ^a	GC-MS	20-1000	0.27	-	15	5	37
SDME ^b	GC-MS	20-1000	0.40	Toluene (1 μL)	15	5	38
HF-LPME ^c	GC-MS	10-500	0.45	Toluene (3 μL)	20	5	39
DUSA-DLLME ^d	GC-MS	1-10	0.17	Chlorobenzene (20 μL)	1	10	40
MSPE	LC-UV-Vis	1-100	0.3	Acetonitrile (1 mL)	10	20	This work

^aSolid phase microextraction.

^bSingle drop microextraction.

^cHollow fiber liquid-phase microextraction.

^dDirect ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction.

The MSPE method used in this work presents an extraction time similar to most of the other analytical methods, but the most striking feature is the low LOD value that is of the same order as those supplied by more expensive and sensitive instrumentation (i.e., gas chromatography-mass spectrometry) employing just 40 mg of sorbent.

MSPE-LC-UV-Vis applied to real-world water samples analysis

The developed method was applied for TNT determination in samples of reservoir water, drinking water, and effluent wastewater in order to assess the method applicability and matrix effects. Preliminary analysis of these samples confirmed the absence of TNT. Therefore, three analyses were conducted for each sample at 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ spiking level, and the relative recoveries and RSD for each sample were calculated. The relative recovery values obtained were 101, 120, and 87%, and the RSD values 13, 13, and 10% for reservoir water, drinking water, and effluent wastewater, respectively. These results indicate that the matrix effects were negligible for the determination of TNT in the water samples studied.

Eco-Scale metrics to assess the greenness of the analytical method

A. Gałuszka et al. [45] have recently introduced a method for semiquantitatively evaluating the greenness of analytical methodologies. It is based on assigning penalty points to parameters of an analytical process that are not in agreement with the ideal green analysis.

The Eco-Scale metrics was applied to assess the developed method and the results are given in **Table 2.3**.

Table 2.3 The penalty points (PP) to assess the greenness of the new MSPE-LC-UV-Vis method for TNT determination in water samples.

Reagents	Penalty points (PP)
	Amount PP x Hazard PP
GO/Fe ₃ O ₄ 1:5: 40 mg	0
Nitric acid (65%): 0.22 mL	4
Sodium hydroxide (1 M): <10 mL	2
Solution 0.5 mg L ⁻¹ of TNT: 20 mL	2
Acetonitrile as eluent (MSPE + 2 cleaning): 3 mL	3
Instruments	
pH meter: 3 min	0
Stirring of GO + Fe ₃ O ₄ mixture in magnetic stir plate: 5 h	1
Nanocomposite drying in vacuum oven: 24 h	2
Vortex stirring: 10 min	0
Ultrasonic bath (MSPE + 2 cleaning): 6 min	0
Acetonitrile evaporation by N ₂ gas at 800 mbar pressure: 20 min	0
LC-UV-Vis analysis	4
Waste	11
∑ Penalty points	29

Analytical Eco-Scale total score: 100-29= 71

The penalty points were calculated taking into account the synthesis of GO/Fe₃O₄ nanocomposite for one MSPE and MSPE-LC-UV-Vis method applied to a sample of 0.5 mg L⁻¹ of TNT and 2 cleaning stages between samples.

In accordance with Eco-Scale metrics, the result of this work is >50 and <75, representing an acceptable green analysis.

Conclusion

A sensitive and environmentally friendly method has been developed for the analysis of TNT in water samples based of magnetic solid-phase extraction (MSPE) coupled to LC-UV-Vis. GO/Fe₃O₄ nanocomposite has been used as sorbent that synergistically combines the excellent extraction capabilities of GO with the easy handling of Fe₃O₄. In addition, the nanocomposite can be reused up to six times without losing extraction capacity, reducing cost and wastes. Optimization of MSPE has been done by experimental design. MSPE-LC-UV-Vis methodology is simple, fast, economical, and sensitive, reaching LOD values obtained with more expensive and sensitive instrumentation (GC-MS). Therefore, the suggested method represents an attractive alternative very affordable to any laboratory.

The promising analytical eco-scale concept has been used to assess the greenness of the suggested analytical method. Although the suggested Eco-scale concept still has limitations, this simple and fast-to-use green analytical metrics can be an excellent semiquantitative tool that should be applied to any known and new analytical methodologies.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Ministry of Science and Innovation of Spain (project no. CTQ2011-23968) for the financial support and L. Costa thanks the Capes Foundation within the Ministry of Education in Brazil (Process 12013/13-7).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- [1] Stoller MD, Park S, Zhu Y, An J, Ruoff RS. Graphene-based ultracapacitors. *Nano Lett.* 2008;8:3498-502.
- [2] Lee C, Wei X, Kysar JW, Hone J. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science.* 2008;321:385-88.
- [3] Bolotin KI, Sikes KJ, Jiang Z, Klima M, Fudenberg G, Hone J, Kim P, Stormer HL. Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. *Solid State Commun.* 2008;146:351-55.
- [4] Liu Q, Shi J, Zeng L, Wang T, Cai Y, Jiang G. Evaluation of graphene as an advantageous adsorbent for solid-phase extraction with chlorophenols as model analytes. *J. Chromatogr. A* 2011;1218:197-204.
- [5] Chen J, Zou J, Zeng J, Song X, Ji J, Wang Y, Ha J, Chen X. Preparation and evaluation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber. *Anal. Chim. Acta.* 2010;678:44-9.
- [6] Zhang H, Lee HK. Plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol-gel coating as sorbent for determination of polybrominated diphenyl ethers. *J. Chromatogr. A* 2011;1218:4509-16.
- [7] Zhang S, Du Z, Li G. Layer-by-layer fabrication of chemical-bonded graphene coating for solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 2011;83: 7531-41.
- [8] Ponnusamy VK, Jen JF. A novel graphene nanosheets coated stainless steel fiber for microwave assisted headspace solid phase microextraction of organochlorine pesticides in aqueous samples followed by gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A.* 2011; 1218:6861-68.
- [9] Hummers WS, Offeman RE. Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 1958;80:1339-39.
- [10] Fritz JS. *Analytical solid-phase extraction.* New York: Wiley-VCH; 1999.
- [11] Han Q, Wang Z, Xia J, Xia L, Chen S, Zhang XQ, Ding M. Graphene as an efficient sorbent for the SPE of organochlorine pesticides in water samples coupled with GC-MS. *J. Sep. Sci.* 2013;36:3586-91.
- [12] Wang Z, Han Q, Xia J, Xia L, Ding M, Tang J. Graphene-based solid-phase extraction disk for fast separation and preconcentration of trace polycyclic

aromatic hydrocarbons from environmental water samples. *J. Sep. Sci.* 2013;36:1834-42.

[13] Wu J, Chen L, Mao P, Lu Y, Wang HZ. Determination of chloramphenicol in aquatic products by graphene-based SPE coupled with HPLC-MS/MS. *J. Sep. Sci.* 2012;35:3586-92.

[14] Luo X, Zhang FF, Ji S, Yang B, Liang X. Graphene nanoplatelets as a highly efficient solid-phase extraction sorbent for determination of phthalate esters in aqueous solution. *Talanta.* 2014;120:71-5.

[15] Wang SL, Hu S, Xu H. Analysis of aldehydes in human exhaled breath condensates by in-tube SPME-HPLC. *Anal. Chim. Acta.* 2015;900:67-75.

[16] Pawliszyn J. *Solid Phase Microextraction. Theory and Practice.* New York: Wiley; 1997.

[17] He H, Klinowski J, Forster M, Lefr A. A new structural model for graphite oxide. *Chem. Phys. Lett.* 1998;287:53-6.

[18] Sitko R, Zawisza B, Malicka E. Graphene as a new sorbent in analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* 2013;51:33-43.

[19] Yang X, Li J, Wen T, Ren X, Huang Y, Wang X. Adsorption of naphthalene and its derivatives on magnetic graphene composites and the mechanism investigation. *Colloid. Surface A.* 2013;422:118-25.

[20] Sitko R, Turek E, Zawisza B, Malicka E, Talik E, Heimann J, Gagor A, Feist B, Wrzalik R. Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using graphene oxide. *Dalton Trans.* 2013;42:5682-89.

[21] Liu Q, Shi J, Sun J, Wang T, Zeng L, Jiang G. Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011;50: 5913-17.

[22] Xu L, Feng J, Li J, Liu X, Jiang S. Graphene oxide bonded fused-silica fiber for solid-phase microextraction-gas chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *J. Sep. Sci.* 2012;35:93-100.

[23] Meng J, Shi C, Wei B, Yu W, Deng C, Zhang X. Preparation of Fe₃O₄@C@PANI magnetic microspheres for the extraction and analysis of phenolic compounds in water samples by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2011;1218:2841-47.

- [24] Sasaki T, Tanaka S. Adsorption behavior of some aromatic compounds on hydrophobic magnetite for magnetic separation. *J. Hazard. Mater.* 2011;196:327-34.
- [25] Zhang X, Niu H, Pan Y, Shi Y, Cai Y. Modifying the surface of Fe₃O₄/SiO₂ magnetic nanoparticles with C₁₈/NH₂ mixed group to get an efficient sorbent for anionic organic pollutants. *J. Colloid Interface Sci.* 2011;362:107-12.
- [26] Tang H, Zhu L, Yu C, Shen X. Selective photocatalysis mediated by magnetic molecularly imprinted polymers. *Sep. Purif. Technol.* 2012;95:165-71.
- [27] Li S, Gong Y, Yang Y, He C, Hu L, Zhu L, Sun L, Shu D. Recyclable CNTs/Fe₃O₄ magnetic nanocomposites as adsorbents to remove bisphenol A from water and their regeneration. *Chem. Eng. J.* 2015;260:231-39.
- [28] Sun T, Yang J, Li L, Wang X, Li X, Jin Y. Preparation of graphene sheets with covalently bonded Fe₃O₄ for magnetic solid-phase extraction applied to organochlorine pesticides in orange juice. *Chromatographia.* 2016;79:345-53.
- [29] Han Q, Wang Z, Xia J, Chen S, Zhang X, Ding M. Facile and tunable fabrication of Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposites and their application in the magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples. *Talanta.* 2012;101:388-95.
- [30] Aguilar-Arteaga K, Rodriguez JA, Miranda JM, Medina J, Barrado E. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion–HPLC. *Talanta.* 2010;80:1152-57.
- [31] Šafařík I, Šafaříková M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. *Water Res.* 2002;36:196-200.
- [32] Taghvimi A, Hamishehkar H, Ebrahimi M. Magnetic nano graphene oxide as solid phase extraction adsorbent coupled with liquid chromatography to determine pseudoephedrine in urine samples. *J. Chromatogr. B.* 2016;1009-1010:66-72.
- [33] Zeng S, Gan N, Weideman-Mera R, Cao Y, Li T, Sang W. Enrichment of polychlorinated biphenyl 28 from aqueous solutions using Fe₃O₄ grafted graphene oxide. *Chem. Eng. J.* 2013;218:108-15.
- [34] Stucki H. Toxicity and degradation of explosives. *Chimia.* 2004;58:409-13.

- [35] Keith L, Telliard W. Priority pollutants I - a perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 1979;13:416-23.
- [36] Talmage SS, Opresko DM, Maxwell CJ, Welsh CJE, Cretella FM, Reno PH, Daniel FB. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York: Springer; 1999.
- [37] Psillakis E, Kalogerakis N. Solid-phase microextraction versus single-drop microextraction for the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *J. Chromatogr. A.* 2011;938:113-20.
- [38] Psillakis E, Kalogerakis N. Application of solvent microextraction to the analysis of nitroaromatic explosives in water samples. *J. Chromatogr. A.* 2001;907:211-19.
- [39] Psillakis E, Mantzavinos D, Kalogerakis N. Development of a hollow fibre liquid phase microextraction method to monitor the sonochemical degradation of explosives in water. *Anal. Chim. Acta.* 2004;501:3-10.
- [40] Cortada C, Vidal L, Canals A. Determination of nitroaromatic explosives in water samples by direct ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta.* 2011;85:2546-52.
- [41] Wei Y, Han B, Hu X, Lin Y, Wang X, Deng X. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties. *Procedia Eng.* 2012;27:632-7.
- [42] Shih CJ, Lin S, Sharma R, Strano MS, Blankschtein D. Understanding the pH-dependent behavior of graphene oxide aqueous solutions: a comparative experimental and molecular dynamics simulation study. *J. Am. Chem. Soc.* 2012;28:235-41.
- [43] Thermo Scientific database (November, 2016), www.lasurface.com.
- [44] Draper NR. Plackett and Burman designs. In: Kotz S, Johnson L, editors. *Encyclopedia of Statistical Sciences*. New York: John Wiley & Sons; 1985. pp. 754-8.
- [45] Gałuszka A, Konieczka P, Migaszewski ZM, Namiesnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends Anal. Chem.* 2012;37:61-72.

9.3 Determination of siloxanes in water samples employing graphene oxide/ Fe_3O_4 nanocomposite as sorbent for magnetic solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry



Determination of siloxanes in water samples employing graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite as sorbent for magnetic solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry

Luciana Costa dos Reis^{1,2}, Lorena Vidal^{1*} and Antonio Canals^{1*}

¹*Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología e Instituto Universitario de Materiales, Universidad de Alicante, P.O. Box 99, E-03080 Alicante, Spain.*

²*CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, Brasília – DF 70040-020, Brazil.*

* *Corresponding authors. Tel.: +34965909790; fax: +34965903697.*

E-mail addresses: lorena.vidal@ua.es (L. Vidal), a.canals@ua.es (A. Canals)

Keywords: gas chromatography-mass spectrometry, graphene oxide/Fe₃O₄ nanocomposite, magnetic solid-phase extraction, siloxanes, water samples.

Abstract

A new, fast, simple and environmentally friendly analytical method has been developed to determine six siloxanes in water samples: octamethyltrisiloxane (L3), octamethylcyclotetrasiloxane (D4), decamethyltetrasiloxane (L4), decamethylcyclopentasiloxane (D5), dodecamethylpentasiloxane (L5) and dodecamethylcyclohexasiloxane (D6). The analytical method consists of a magnetic solid-phase extraction (MSPE) employing graphene oxide/Fe₃O₄ as sorbent for separation and preconcentration of siloxanes prior to GC-MS

determination. MSPE procedure was optimized by means of a Plackett-Burman design. Under the optimized extraction conditions, the method gave repeatability levels with a relative standard deviation between 9 and 20% ($n=6$, $10 \mu\text{g L}^{-1}$). Methodological limits of detection were $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (L3), $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ (L4) and $0.003 \mu\text{g L}^{-1}$ (L5, D4, D5 and D6). The linearity of the method was studied between the methodological limit of quantification and $100 \mu\text{g L}^{-1}$, obtaining correlation coefficient values between 0.990 and 0.999. The applicability of the method was assessed by analyzing one drinking water and five wastewater samples from three different treatment plants. Relative recovery values ranged between 70 and 120% ($1 \mu\text{g L}^{-1}$ and $60 \mu\text{g L}^{-1}$ spiking level) showing that the matrix had a negligible effect on extraction. Finally, the greenness of this method was confirmed by the semiquantitative Eco-Scale metrics.

1 Introduction

Siloxanes are used in various products, such as electronics, cosmetics, paints, food additives, medical devices, cosmetic surgery, needles coating, pacemaker coating, etc. The volatile methylsiloxanes (VMSs) are the most detected in the environment because they are not effectively removed from wastewater and may migrate through different matrices. Their lipophilicity allows the VMSs to spread in the environment and to accumulate in wildlife and humans [1]. The cyclic siloxanes D5 and D6 are currently the most used in personal care products, including perfumes, hair care products, deodorants, antiperspirants, nail polishes, lotions, and skin cleansers [2]. Consequently, VMSs are present in several types of water. Sparham et al. [3] reported D5 concentrations between 0.013 and $0.027 \mu\text{g L}^{-1}$ in river water which serves a population of more than 3 million people. Wang et al. [4] determined the concentrations of D4, D5, and D6 in influent (entrance) of 11 wastewater treatment plants (WWTPs) (0.282 - $6.69 \mu\text{g L}^{-1}$, 7.75 - $135 \mu\text{g L}^{-1}$, and 1.53 - $26.9 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively) and receiving water (point of discharge of the effluent into a waterbody) (<0.009 - $0.023 \mu\text{g L}^{-1}$, <0.027 - $1.48 \mu\text{g L}^{-1}$, and <0.022 - $0.151 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively). D4, D5 and D6 were also detected in receiving water and their concentrations varied as a function of those in the effluent (tertiary treatment in the WWTP) (<0.009 - $0.045 \mu\text{g L}^{-1}$,

<0.027-1.56 $\mu\text{g L}^{-1}$, and <0.022-0.093 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively). Siloxanes also impair the efficient energy production by burning biogas due to significant amounts of siloxanes in the sludge of wastewater treatment plants (WWTP). The volatility of some siloxanes means they are present in the gas resulting from the anaerobic digestion process of the sludge. At high temperatures siloxanes become silicon dioxide (SiO_2), which quickly deteriorate energy recovery biogas facilities (engine power generation, cogeneration, fuel cells, etc.). Burning biofuel produces the solid SiO_2 , which erodes engines and other equipment, causing damage [5]. Such biogas-related damage and poor performance are promoting the search for alternatives in order to remove siloxanes before they reach the landfill gas [6]. The increased presence of siloxanes in wastewater calls for reliable analytical methods to determine these compounds, which end up in biogas [5]. Likewise, to improve the use of biogas as a renewable energy source, methods to eliminate the compounds that can damage gas-burning equipment are needed, of which siloxanes are the most difficult to remove [7]. Studies on the preconcentration/determination of the volatile siloxanes in water [3,4,8-14] are scarce compared to similar studies in biogas and sewage sludge. Previous studies favor gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) as the separation and detection technique for siloxanes determination. The high volatility of methylsiloxanes and the potential sources of background contamination affecting their final determination are the main factors limiting their analysis. Thus, there is a need to develop methods for siloxanes determination in water and wastewater to assist the WWTPs in the VMSs elimination. Such determination methods normally require a sample preparation step because organic compounds are contained at trace levels or in a matrix that interferes. The solid-phase extraction (SPE) technique is simple, fast and economical. It consumes fewer reagents than liquid-liquid extraction and can be combined with different detection techniques in off-line and on-line modes [15]. Graphene has been used as an adsorbent for SPE, increasing adsorptive capacity due to its high theoretical surface area ($2630 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) [16]. Graphene has an electron delocalization system which can form π - π bonds with benzene rings and adsorbing aromatic compounds [16-20]. Graphene oxide (GO), a derivative of

graphene synthesis by the Hummers method [21], possess an important amount of -COOH, -C=O and -OH groups on the surface [22]. These surface functional groups of GO indicate the high capability of forming hydrogen bonds or electrostatic interactions with aromatics and polar compounds or metal ions [23-25]. GO has been proved to be an ideal sorbent for SPE [26] and its miniaturization, the solid-phase microextraction (SPME) technique [27].

Recently, magnetic solid-phase extraction (MSPE) has been employed as sample preparation technique, using adsorbents decorated with a magnetic phase mainly composed of an iron mineral or iron oxides such as magnetite (Fe_3O_4) or maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). In this extraction procedure the magnetic sorbent is dispersed directly into the liquid phase (standard solution or water sample), and after the extraction the phases separation is done by an external magnetic field (neodymium magnet). As sorbent phase of the adsorbents, there are various possible materials to be used, including GO [28], silica [29], carbon nanotubes [30] and more recently, zeolites [31] and metal-organic frameworks (MOFs) [32]. The sorbents decorated with magnetic solids synergistically combine an excellent sorbent capacity with easy sorbent handling by the external magnetic field, helping to reduce processing time, amount of sorbent and solvent consumption.

Here it is reported a magnetic solid-phase extraction method employing graphene oxide/ Fe_3O_4 as sorbent for the fast and ecological determination of siloxanes prior to GC-MS determination. To the best of our knowledge, this is the first time that MSPE/GC-MS has been used to determine siloxanes in water samples. The method was optimized by experimental design, validated and applied to real-world samples. Finally, Eco-Scale metrics [33] were used to assess the greenness of the new method.

2 Materials and Methods

2.1 Reagents and real-world water samples

The six siloxanes studied in this work were octamethyltrisiloxane (L3) (98%), octamethylcyclotetrasiloxane (D4) (98%), decamethyltetrasiloxane (L4) (97%), decamethylcyclopentasiloxane (D5) (97%), dodecamethylpentasiloxane (L5)

(97%) and dodecamethylcyclohexasiloxane (D6) (95%). All siloxanes as well as HPLC-grade acetonitrile, methanol, ethanol and hexane were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The stock standard solution of 1 g L⁻¹ of the six siloxanes was prepared in acetonitrile. Deionized water (resistivity of 18.2 MΩ cm at 25 °C) was prepared on a water purification system (GradientA10) supplied by Millipore (Billerica, MA, USA). Working solutions were prepared daily by diluting the stock standard solution with deionized water. All solutions were stored in the dark at 4 °C.

Iron oxide II, III (Fe₃O₄) (50-100 nm) was obtained from Sigma-Aldrich and graphene oxide (GO) from Graphenano nanotechnologies (Yecla, Spain).

HNO₃ 65% from Merck (Darmstadt, Germany) and NaOH pellets from Scharlau (Barcelona, Spain) were employed for the nanocomposite synthesis.

Drinking water from a water purification plant (Murcia, Spain), wastewater samples from three different points of Rincón de León WWTP (WWTP1) (Alicante, Spain), from Monte Orgegia WWTP (WWTP2) (Alicante, Spain) and from a WWTP of Portugal were used in the study as real-world water samples. All samples were stored in the dark at 4 °C.

2.2 Apparatus and instrumentation

A Ni-coated neodymium magnet, N45 grade, dimensions 45x30mm from Supermagnete (Gottmadingen, Germany) was used as magnetic external field in the MSPE procedure. Automatic vortex from Heidolph Instruments GmbH (Schwabach, Germany) was used for the extraction procedure and an ultrasonic bath from Elma Schmidbauer GmbH (Singen, Germany) for the elution procedure.

Two chromatographic systems were employed. The inlet septa used in both systems was Premium Non-Stick Inlet Septa, Bleed and Temperature Optimized from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA). For MSPE optimization and nanocomposite reusing study, chromatographic analyses were performed on a gas chromatograph (model 7820A) from Agilent Technologies equipped with a splitless/split automatic injector and a flame ionization detector. A capillary column HP-5 (5% phenyl-95% dimethylpolysiloxane, 30 m x 0.32 mm I.D., 0.25 μm film thickness) was from Agilent. The injector temperature was

maintained at 250 °C and the injection volume was 1.0 µL in the splitless mode. The oven temperature program was initially set at 40 °C and was raised by 6 °C min⁻¹ up to 120 °C (held 5 min), followed by an 8 °C min⁻¹ ramp up to 150 °C, where it was held for 5 min. Helium (99.999%) from Air Liquide (Madrid, Spain) was used as the carrier gas at a constant flow rate of 1 mL min⁻¹. The detector temperature was set at 200 °C.

Method validation and real samples analyses were carried out by Agilent 7890A gas chromatograph coupled to a mass spectrometry detector Agilent 5975C with electron impact ionization at ionization energy of 70 eV. The capillary column employed was HP5-MS UI (5% phenyl-95% dimethylpolysiloxane, 30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm film thickness) from Agilent J&W GC Column (Santa Clara, CA, USA). Extracts (1 µL) were injected in the splitless mode with the split closed for 0.75 min. Helium (99.999 %pure) was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL min⁻¹. The oven temperature was initially set at 35 °C for 5 min, programmed to 140 °C at 5 °C min⁻¹ rate, where it was held for 1 min, followed by a 20 °C min⁻¹ ramp up to 300 °C, where it was held for 5 min. The mass spectrometer source and quadrupole were set at 230 and 150 °C, respectively. Measurements were taken with a solvent delay of 4 min and in selected ion monitoring (SIM) mode. All target compounds were identified by their mass spectra and GC retention times (**Figure 3.1**). The (m/z) ratio to quantify significant ions and the retention times of the six siloxanes using the GC-MS method are (73), (221), and (222) from minute 8.50-11 for L3; (73), (193) and (281) from minute 11-15 for D4; (73), (207) and (295) from minute 15-17.50 for L4; (73), (267) and (355) from minute 17.50-20 for D5; (73), (147), (281) and (369) from minute 20-22.50 for L5; and (73), (341) and (429) from minute 22.50-24 for D6 determinations. **Figure 3.1** shows typical chromatograms after MSPE of a blank and a standard solution spiked at 10 µg L⁻¹ with the six siloxanes.

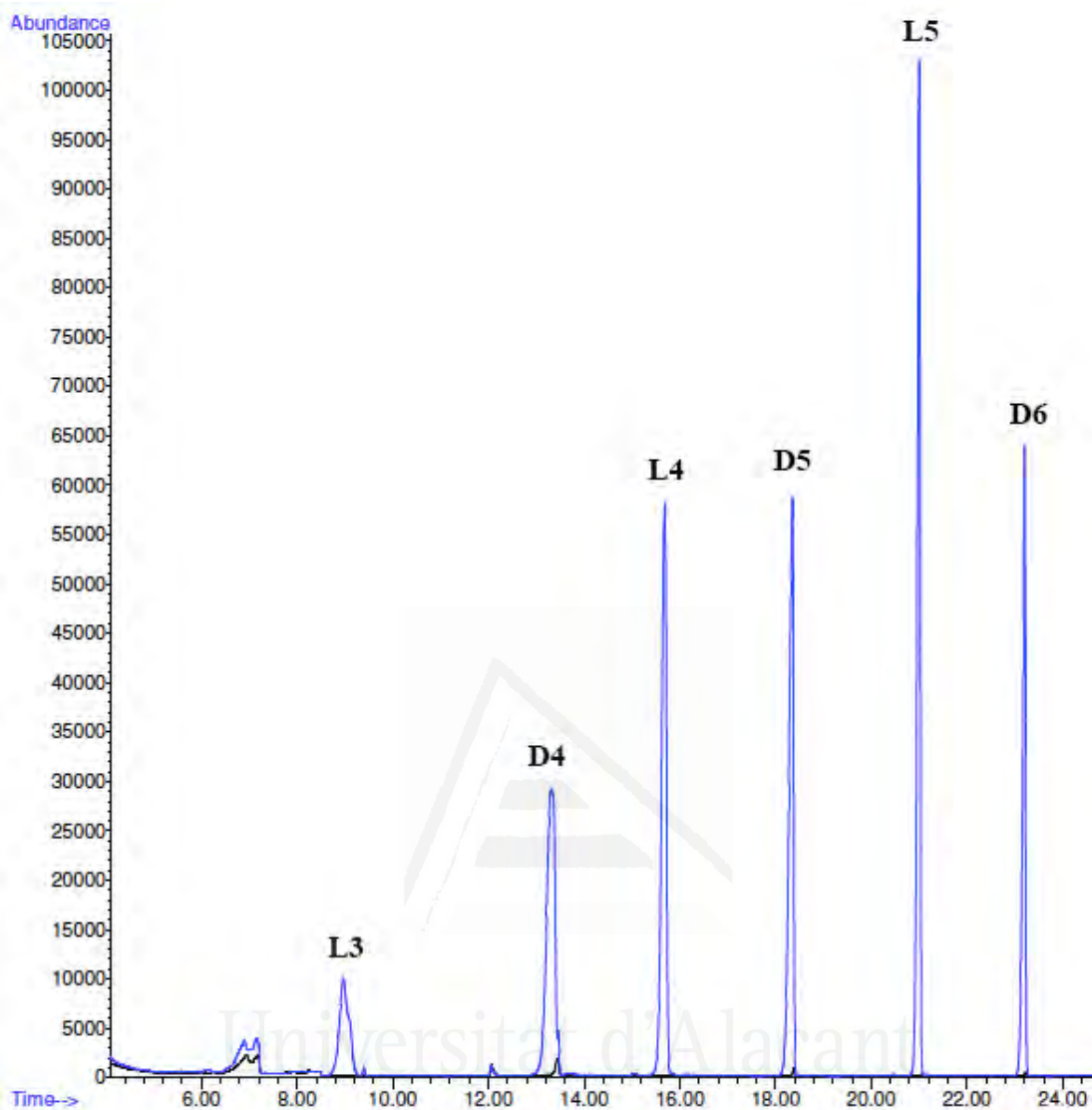


Figure 3.1 Chromatogram of a blank solution (black line) and chromatogram of a standard solution (blue line) containing all siloxanes ($10 \mu\text{g L}^{-1}$ each) both subjected to the developed method (MSPE/GC-MS). MSPE conditions: amount of nanocomposite, 20 mg; extraction time, 10 min; 0.5 mL of acetonitrile for elution; elution time, 2.5 min; sample volume, 20 mL.

2.3 Synthesis and characterization of GO/Fe₃O₄ nanocomposite

In a previous work the GO/Fe₃O₄ nanocomposite was synthesized and characterized [34]. The composite is formed by electrostatic attraction between magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ with a positively charged surface and negatively charged nanosheets of GO. Optimal conditions for GO/Fe₃O₄ nanocomposite synthesis were: stirring on a magnetic stir plate, pH 2 and GO/Fe₃O₄ ratio (w/w)

1/5. Transmission electron microscopy (TEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), X-ray diffraction (XRD) and vibrating sample magnetometer (VSM) were used to test nanocomposite formation and determine its composition and magnetic properties [34].

2.4 Magnetic solid-phase extraction procedure

Firstly, 20 mg of GO/Fe₃O₄ nanocomposite (40 mg for wastewater samples) was placed in a 22 mL vial. Then, 20 mL of standard solution or water sample was added, and the mixture was vortex stirred for 10 min. After full extraction, the nanocomposite was separated from the liquid phase placing the vial over a neodymium magnet and discarding the liquid with a glass pipette. Elution was carried out with 0.5 mL of acetonitrile and 2.5 min in ultrasonic bath. Finally, 1 μ L of the eluate was injected into the GC-FID or GC-MS system. Two more elutions with 0.5 mL of acetonitrile and 2.5 min in ultrasonic bath were performed to clean the nanocomposite for reuse.

It is important to point out that precaution, such as cosmetic use, protection and cleaning, during the extraction procedure to avoid false positives and cross-contaminations were taken.

2.5 Data handling and processing

In the screening study, the response of the GC-FID system used was based on the peak area of the eluate for each siloxane individually. The Plackett-Burman [35] design was carried out to screen the significant factors for the MSPE procedure. A concentration level of 10 mg L⁻¹ was used for screening to ensure a detectable signal (peak area) in all experimental runs of the six siloxanes. An experimental design matrix was constructed, and the results were evaluated using the statistical software NEMRODW[®] version 2007/2010 ("New Efficient Methodology for Research using Optimal Design") from LPRAI (Marseille, France).

3 Results and Discussion

3.1 Study of GO/Fe₃O₄ nanocomposite

Previous nanocomposite characterization studies [34] by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) confirmed the chemical composition. Transmission electron

microscopy (TEM) characterized the morphology of GO/Fe₃O₄ nanocomposite. **Figure 3.S1** shows a TEM image of the GO/Fe₃O₄ nanocomposite synthesized at the optimum conditions. The Fe₃O₄ nanoparticles (**darker**) are anchored as clusters onto the surface of the GO sheets (**clearer sheets**) due to electrostatic self-assembly between the positively charged surface of the Fe₃O₄ and the negatively charged GO.

A batch-to-batch repeatability study was carried out for three different batches, using each batch for MSPE of an aqueous standard solution spiked at 10 µg L⁻¹ in triplicate. The synthesis process was considered repetitive with relative standard deviations (RSD) between 5 and 8%.

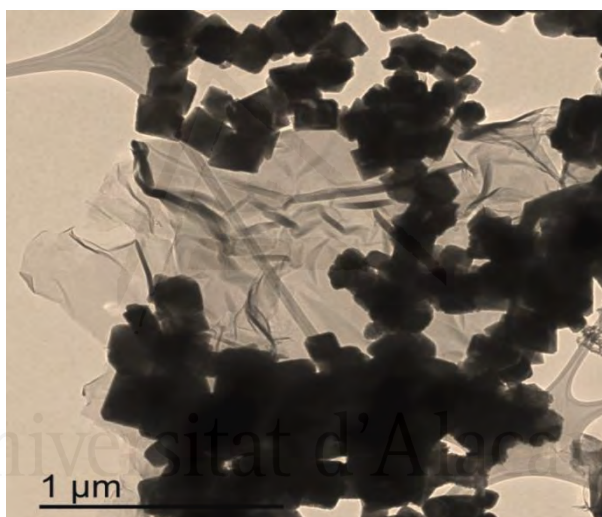


Figure 3.S1 TEM image of the GO/Fe₃O₄ nanocomposite.

3.2 Optimization of the MSPE procedure

3.2.1 Study of elution solvent

Prior to MSPE procedure optimization, extractions were performed with four different solvents in the elution step. These solvents must have a high desorption capability of the target analytes and good chromatographic behavior during the course of chromatographic separation. Accordingly, acetonitrile, methanol, ethanol and hexane were chosen to study solvent elution.

The MSPE procedures were performed as described in section 2.4. using 20 mL of standard solution at 10 mg L⁻¹ concentration of each siloxane. Results are

shown in **Figure 3.S2**. Acetonitrile and methanol showed the highest peak areas and all the analytes were eluted. Hexane and ethanol only responded for some of the six siloxanes. Hence, acetonitrile and methanol were selected for the screening study (i.e., Plackett-Burman design).

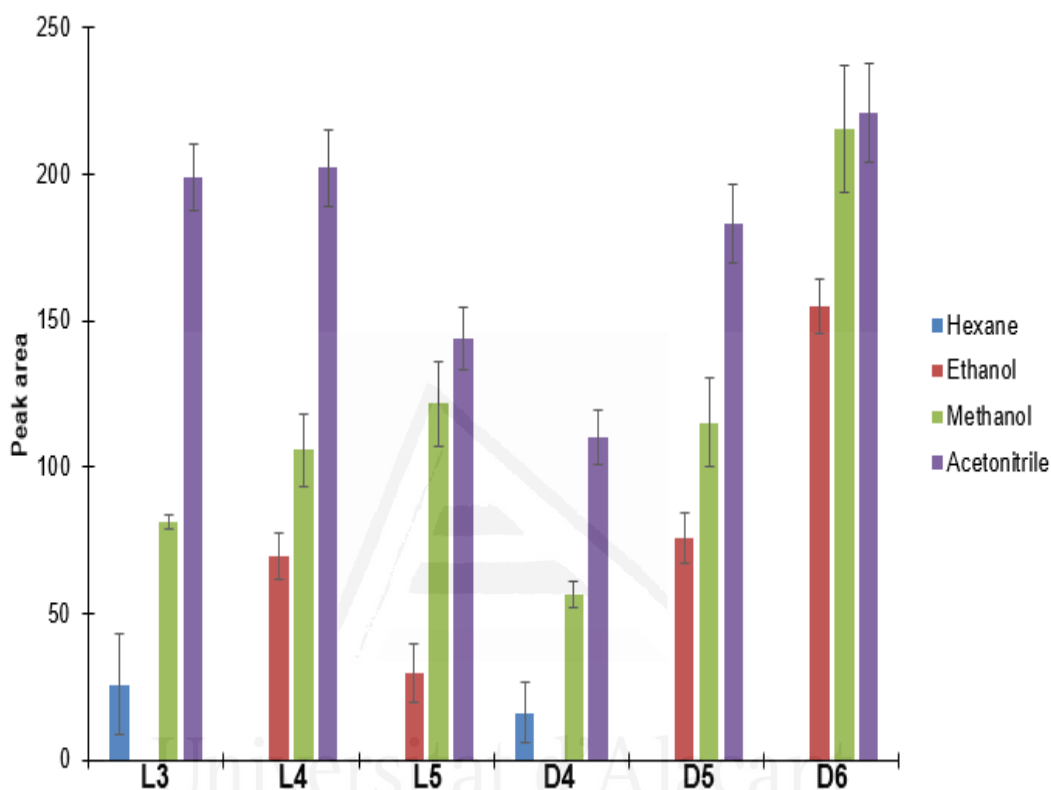


Figure 3.S2 Effect of elution solvent on MSPE procedure carried out with standard solutions at 10 mg L^{-1} of each siloxane. MSPE conditions: amount of nanocomposite, 20 mg; extraction time, 10 min; 0.5 mL of solvent for elution; elution time, 2.5 min; sample volume, 20 mL.

3.2.2 Plackett-Burman design

The extraction yield in the MSPE procedure can be affected by different factors and in most cases these factors are correlated. Therefore, a multivariate approach is recommended for their optimization. Based on the literature and previous experience, the multivariate approach selected was the Plackett-Burman design. For identifying the significant factors, this two-level fractional factorial design, assumes that interactions between factors can be completely

ignored. Thus, the main effects are calculated with a reduced number of experiments [35].

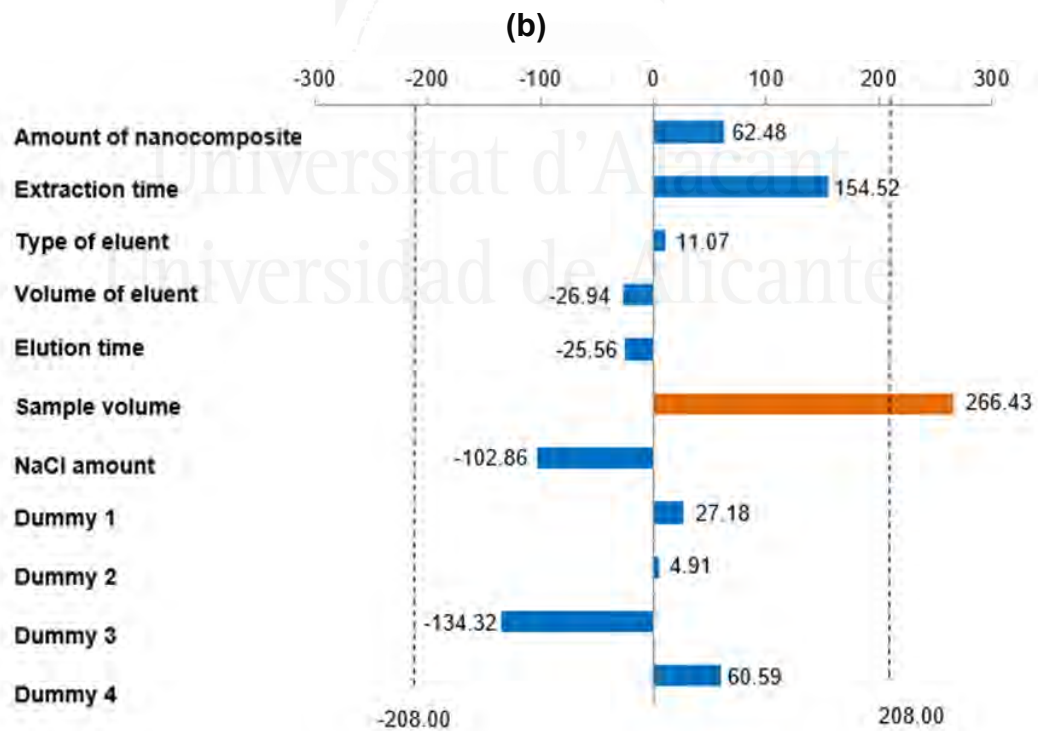
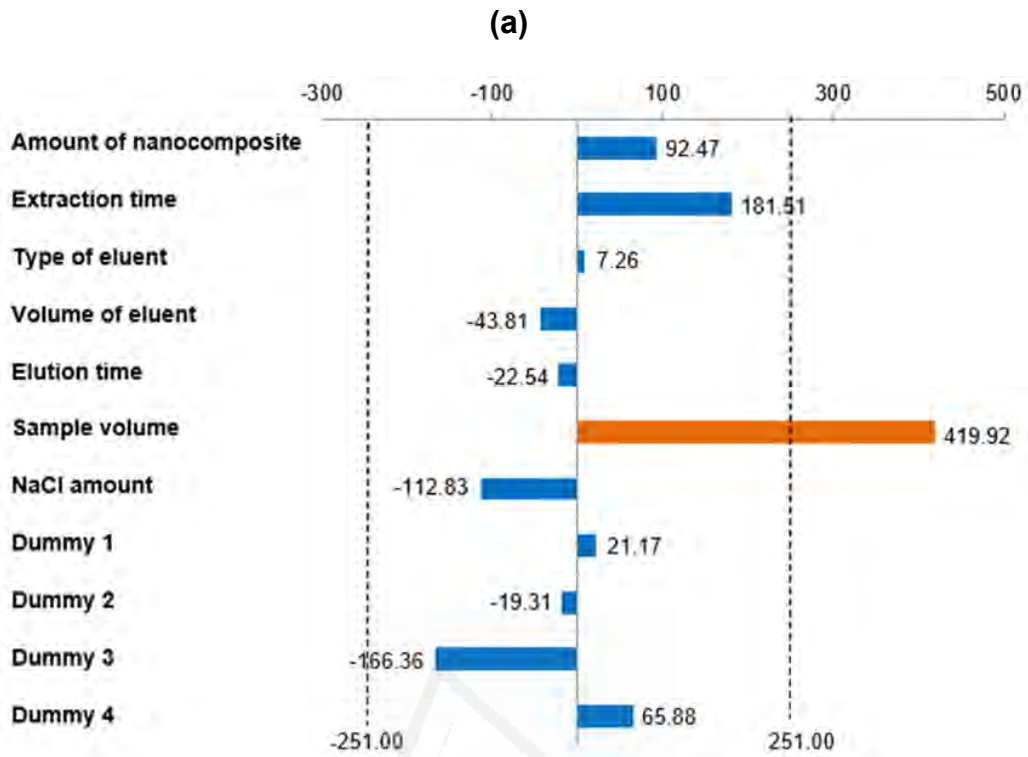
The saturated Plackett-Burman matrix with eleven factors was constructed (seven real factors and four dummy factors), and twelve different experiments were randomly conducted employing 20 mL of standard solution at 10 mg L⁻¹ concentration level of each siloxane (**Table 3.S1**). The value of the levels attributed to each factor was selected according to previous studies on MSPE using the GO/Fe₃O₄ nanocomposite as sorbent [34].

Table 3.S1 Factors and levels of the Plackett-Burman design.

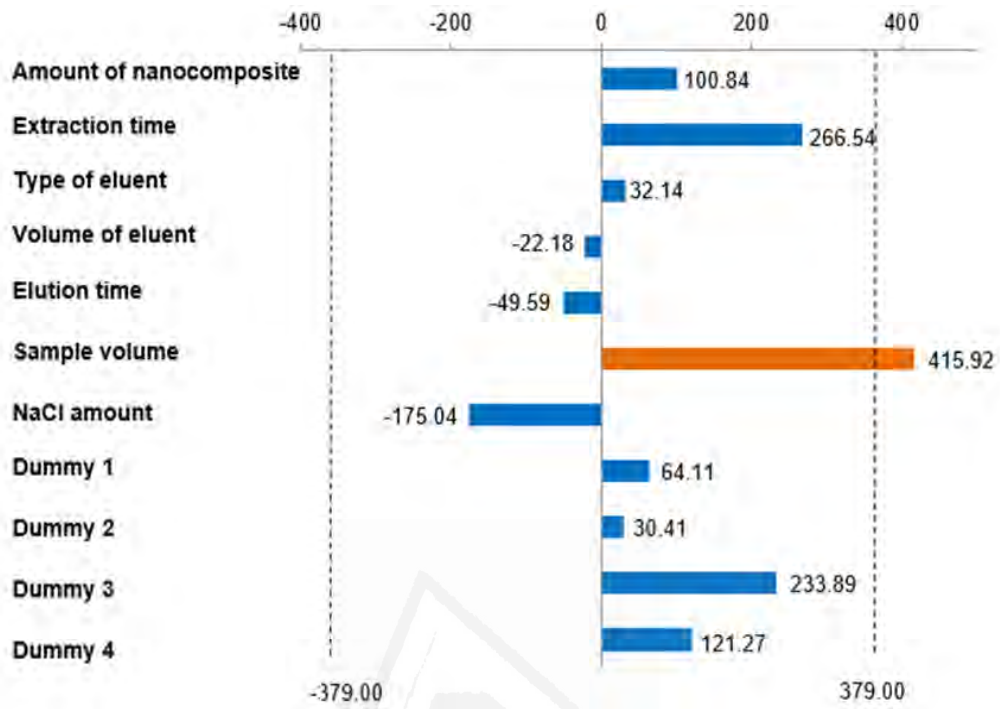
Factor	Low level (-1)	High level (+1)
Amount of nanocomposite (mg)	10	20
Extraction time (min)	5	10
Type of eluent	Acetonitrile	Methanol
Volume of eluent (mL)	0.5	1
Elution time (min)	2.5	5
Sample volume (mL)	10	20
NaCl amount (% w/v)	0	15

Variations in pH were not contemplated as a factor since pH does not affect the chemical structure of these compounds. Moreover, previous studies about the determination of cyclic volatile methyl siloxanes (cVMS) in freshwaters estimated that the half-lives of D4 and D5 siloxanes were short at both high and low pH values. Therefore, the highest half-life values were found at pH 7, proving that in the pH range of natural water samples, siloxanes persist longer time [2].

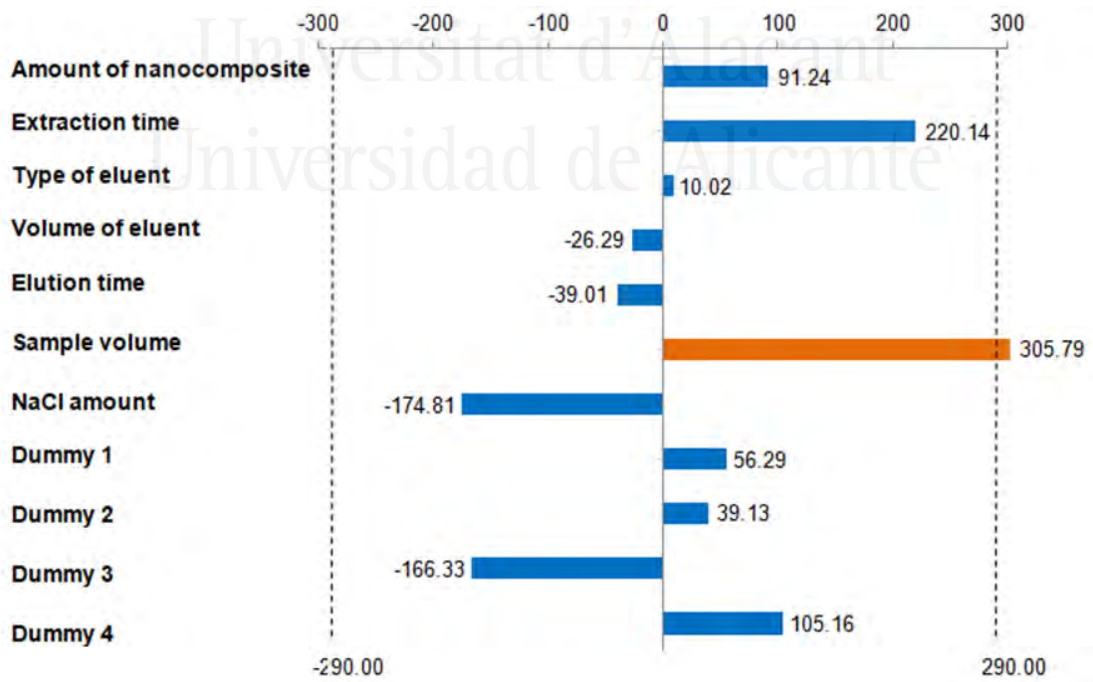
Data were evaluated by ANOVA and results were visualized with the Pareto chart for each siloxane (**Figure 3.S3**). The length of each bar was proportional to the influence of the corresponding factor, while the effects that exceed reference vertical lines can be considered significant with 95% of probability.



(c)



(d)



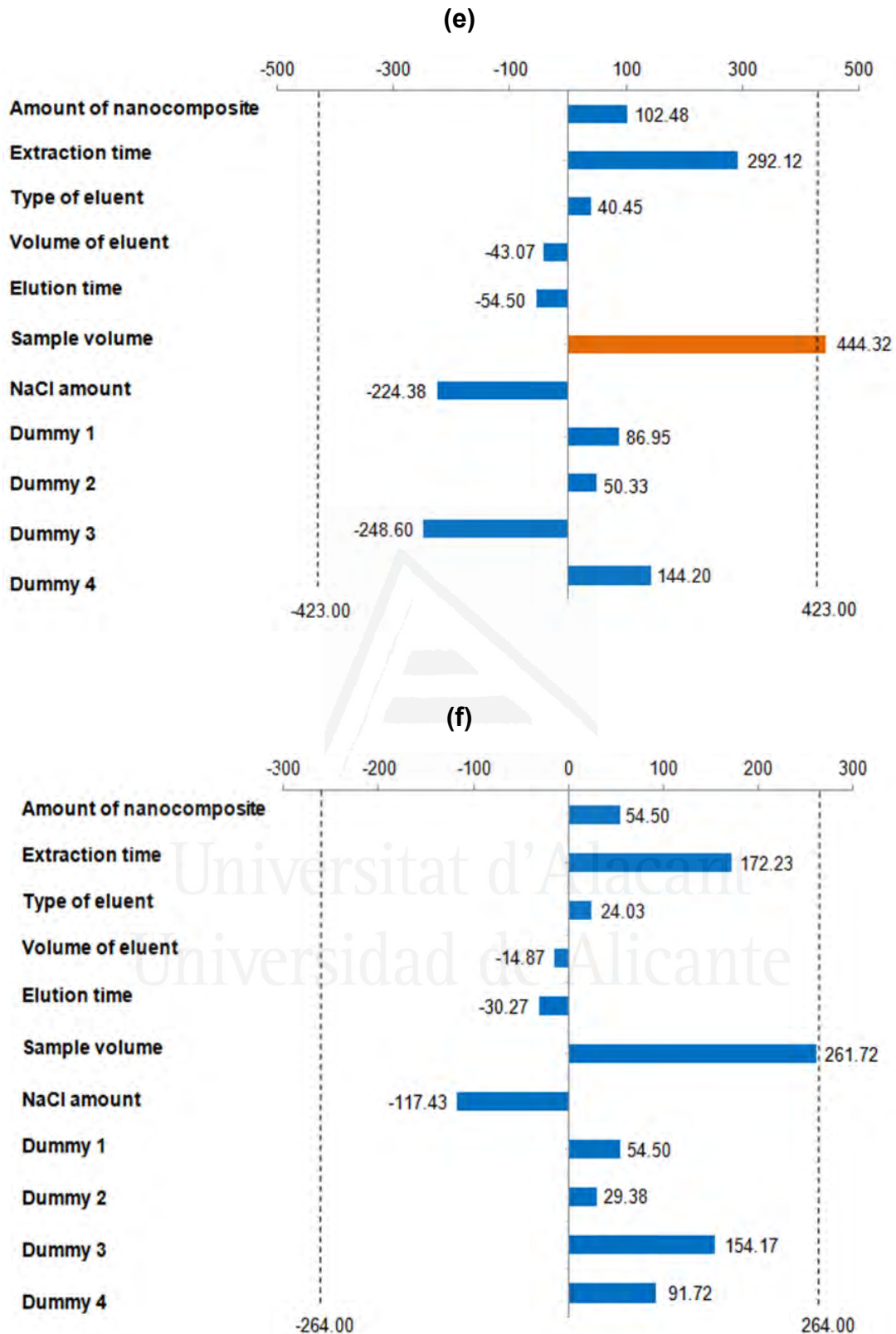


Figure 3.S3 Pareto charts of the Plackett-Burman design obtained for: **(a)** L3; **(b)** D4; **(c)** L4; **(d)** D5; **(e)** L5, and **(f)** D6.

Results indicate that the sample volume was the only significant factor for five out of the six siloxanes (L3, D4, L4, D5 and L5), exhibiting a positive effect for all siloxanes, including D6. The higher the sample volume, the larger the amount of analytes extracted. As 22 mL was the maximum volume of the vial used in the extractions, 20 mL was selected as optimum for all experiments. The other non-significant factors were selected considering the sign of effect. The amount of nanocomposite, extraction time and type of eluent were non-significant with a positive effect, hence larger amounts of nanocomposite and longer extraction times increase analyte extraction, thus they were fixed at the maximum level (i.e., 20 mg and 10 min, respectively). For the type of eluent, the bar length was very short. According to a previous study (**Section 3.2.1**), both methanol and acetonitrile were considered suitable eluents for the optimization study, but the highest elution was achieved with acetonitrile. Therefore, acetonitrile was selected as elution solvent. Volume of eluent, elution time and NaCl amount were non-significant with a negative effect. This effect could be related with the fact that the lower the volume of eluent, the higher the analyte concentration, and a higher elution time in ultrasound could affect the nanocomposite structure. Regarding the effect of salt, Han et al. [36] observed that NaCl concentrations between 0 and 0.6% indicated a negligible effect for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) extraction. The present study employed a concentration 25 times higher than Han et al. [36] (15% w/v), but this factor proved also a non-significant effect. Thus, we can conclude that this salt does not influence the extraction process. Therefore, these factors were fixed at a minimum level (i.e., 0.5 mL of acetonitrile, 2.5 min and 0% of NaCl, respectively).

The optimal MSPE conditions obtained for the preconcentration of the six siloxanes were: 20 mg of GO/Fe₃O₄ nanocomposite, 10 min of vortex extraction, 0.5 mL of acetonitrile, 2.5 min of elution in ultrasound, 20 mL of sample and no addition of NaCl in the sample.

3.3 Reuse of GO/Fe₃O₄ nanocomposite

Five consecutive MSPEs using a 10 mg L⁻¹ solution for each siloxane were carried out to evaluate GO/Fe₃O₄ nanocomposite reusability. Results for the six siloxanes revealed maintenance of GO extraction capacity and Fe₃O₄ magnetic

properties for all the extractions (**Figure 3.S4**). However, from the first to the fourth extraction, the peak areas were similar for all siloxanes obtaining relative standard deviation (RSD) values between 9 and 12%, but, in the fifth extraction the signal decreased between 50 and 81%. Hence, the same nanocomposite could be reused up to four MSPEs without losing adsorptive capacity, saving costs and generating less waste.

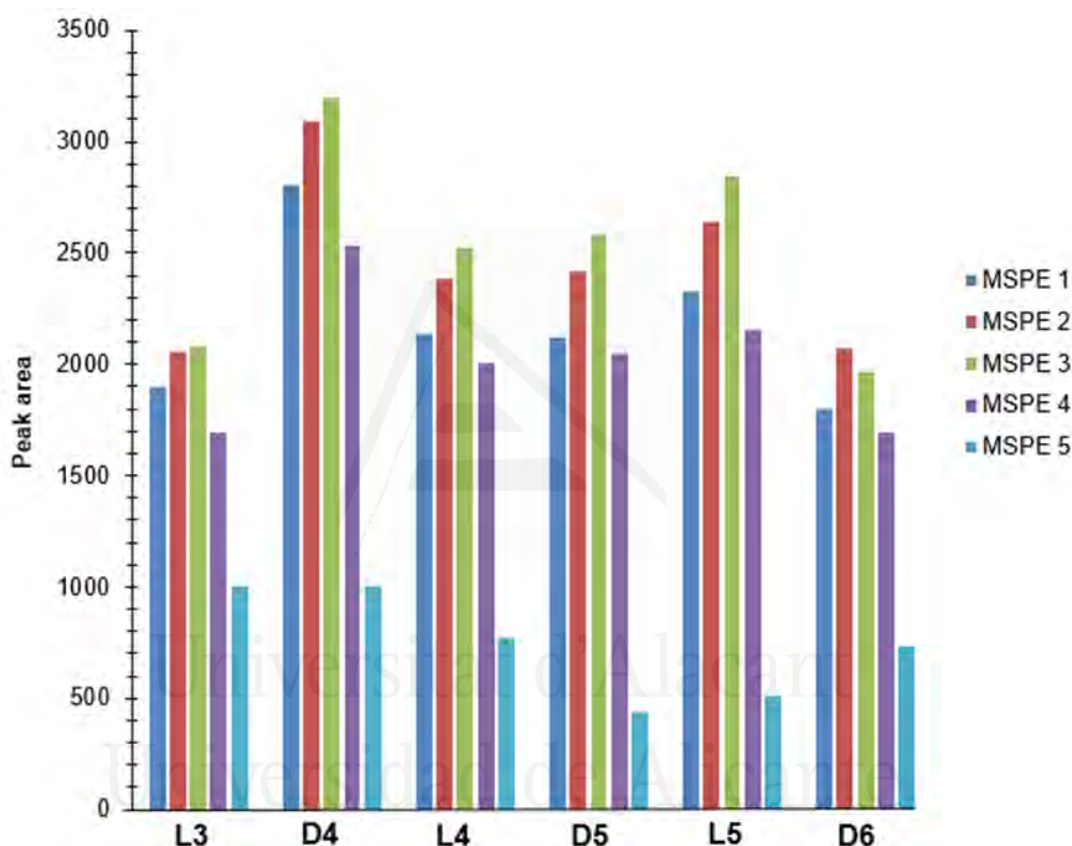


Figure 3.S4 Reusability study of the GO/Fe₃O₄ nanocomposite for the proposed methodology using a 10 mg L⁻¹ solution for each siloxane. MSPE conditions: amount of nanocomposite, 20 mg; extraction time, 10 min; 0.5 mL of acetonitrile for elution; elution time, 2.5 min; sample volume, 20 mL.

3.4 Validation of MSPE/GC-MS method

The proposed method was validated by determining the analytical parameters including the working range, correlation coefficient (r), RSD, methodological limit of detection (mLOD) and methodological limit of quantification (mLOQ). A calibration study was performed to define the working

range and correlation coefficient of the calibration curve of each siloxane (**Table 3.1**). The working ranges were 0.3-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (N=6) (L3); 0.01-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (N=7) (D4, D5, L5 and D6); 0.03-100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (N=7) (L4) and r ranged from 0.990 to 0.999. The repeatability of the method, expressed as RSD was obtained by six consecutive extractions within a day and the inter-day RSD values were obtained by repeating the extraction in triplicate on three different days. MSPEs of an aqueous solution of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ for each siloxane were carried out, obtaining RSD values from 9 to 20% for the intra-day repeatability, and from 18 to 24% for the inter-day repeatability. The mLODs for all siloxanes were empirically determined, analyzing progressively more diluted concentrations of the analytes. mLOD values were found between 0.003 and 0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ (**Table 3.1**). mLOQs were calculated as 3.3 times the mLODs [37], being the lowest concentration of the working range. Recorded mLOQ values were between 0.01 and 0.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ (**Table 3.1**).

Table 3.1 The main analytical figures of merit of the developed MSPE/GC-MS method.

Analyte	Working range ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Correlation coefficient (r) ^a	RSD (intra-day precision) (%) ^b	RSD (inter-day precision) (%) ^c	mLOD ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^d	mLOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
L3	0.3-100	0.993	20	18	0.1	0.3
D4	0.01-100	0.999	19	23	0.003	0.01
L4	0.03-100	0.997	10	23	0.01	0.03
D5	0.01-100	0.990	9	22	0.003	0.01
L5	0.01-100	0.997	12	24	0.003	0.01
D6	0.01-100	0.997	13	24	0.003	0.01

^a N=6 (L3) and N=7 (D4; L4; D5; L5 and D6).

^b Intra-day repeatability (n=6, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

^c Inter-day repeatability (n=3 in 3 different days, 10 $\mu\text{g L}^{-1}$).

^d Empirically determined.

The developed method (MSPE/GC-MS) presents lower or similar extraction times than other analytical methods used to determine siloxanes in water samples (**Table 3.S2**) and it has the great advantage that it uses an environmentally friendly eluent rather than chlorobenzene [8] and hexane [13]. Additionally, mLODs were empirically determined and they were in the same order as those obtained with the liquid-phase extraction techniques (i.e., LLE and USA-DLLME) (**Table 3.S2**). On the one hand, compared to the previous work using SPME [12], the LOD values obtained in the present work for lineal siloxanes were higher, although the LOD values for cyclic siloxanes were similar. Furthermore, the present work employed a sorbent for MSPE that is easily synthesized and manipulated, and the extraction time proved much lower (10 min versus 53 min), thereby avoiding temperature control.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

Table 3.S2 Comparison of different methods developed for the determination of siloxanes in water samples.

Analyte	Type of water sample	Preconcentration method	Separation/detection technique	Working range (ng L ⁻¹)	LOD ^a (ng L ⁻¹)	Eluent (volume)	Extraction time (min)	Sample volume (mL)	Ref.
L2 L3 L4 L5 D3 D4 D5 D6	River	HS-SPME ^b	GC-MS	0.2-20 0.01-20 0.03-20 0.8-20 35-150 20-150 (D4,D5,D6)	0.05 0.003 0.01 0.25 11 6 (D4,D5, D6)	-	53	20	[12]
L2 D4 L4 D5 TMS D3 L5 D6	Wastewater	USA-DLLME ^c	GC-MS	2-25 (10 ³) (L2, D4, L4, D5) 5-25 (10 ³) (TMS and D3) 2-15 (10 ³) (L5 and D6)	6 2 3 3 1400 400 20 30	Chlorobenzene (13 µL)	7	13	[8]
L3 L4 L5 D3 D4 D5	Wastewater and surface water	LLE ^d	GC-(QqQ)- MS/MS	0.25-5000 (10 ³)	0.4 0.4 0.1 7.4 13 3.2	Hexane (750 mL)	20	500	[13]
L3 L4 L5 D4 D5 D6	Drinking water and wastewater	MSPE	GC-MS	0.3-100 (10 ³) 0.03-100 (10 ³) 0.01-100 (10 ³) (L5,D4,D5,D6)	100 10 3 (L5,D4, D5,D6)	Acetonitrile (0.5 mL)	10	20	This work

^aMethodological limit of detection, ^bHeadspace solid-phase microextraction, ^cUltrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction, ^dLiquid-liquid extraction.

3.5 Real-world water sample analysis

The MSPE/GC-MS method was applied to determine six siloxanes in drinking and wastewater samples. Sample analysis using the proposed method reveal siloxanes presence in two out of the six studied samples. D5 was found at $2.7 \pm 0.3 \mu\text{g L}^{-1}$ concentration level in the wastewater collected in Monte Orgegia WWTP (WWTP2). D4, D5 and D6 at $3.1 \pm 0.6 \mu\text{g L}^{-1}$, $4.4 \pm 0.7 \mu\text{g L}^{-1}$ and $0.18 \pm 0.04 \mu\text{g L}^{-1}$, respectively, were found in the sample from Portugal WWTP. To investigate the effects of sample matrix upon the MSPE/GC-MS procedure, three analyses were conducted for a drinking water and for four wastewater samples (WWTP1 and WWTP2) spiked at $1 \mu\text{g L}^{-1}$ and $60 \mu\text{g L}^{-1}$ before the MSPE procedure. Relative recovery (RR) values for each siloxane were determined as the ratio of the area found in real-world and deionized water samples, spiked at the same level (**Table 3.2**).

Table 3.2 Relative recoveries and RSD values of the six siloxanes studied in real-world water samples.

Relative recovery and RSD values in parentheses (%)										
Analyte	Drinking water (n=3)		WWTP 1 entrance (n=3)		WWTP 1 secondary (n=3)		WWTP 1 tertiary (n=3)		WWTP 2 entrance (n=3)	
	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$60 \mu\text{g L}^{-1}$	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$60 \mu\text{g L}^{-1}$	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$60 \mu\text{g L}^{-1}$	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$60 \mu\text{g L}^{-1}$	$1 \mu\text{g L}^{-1}$	$60 \mu\text{g L}^{-1}$
L3	85 (5)	71 (8)	Not found	104 (7)	Not found	91 (17)	Not found	116 (2)	Not found	109 (1)
D4	105 (11)	70 (3)	102 (9)	94 (5)	96 (7)	102 (13)	92 (9)	113 (3)	92 (2)	120 (3)
L4	80 (8)	70 (3)	71 (26)	120 (10)	88 (6)	101 (16)	120 (3)	76 (8)	116 (2)	71 (5)
D5	99 (5)	70 (3)	84 (12)	118 (10)	95 (18)	100 (16)	86 (19)	75 (7)	112 (1)	70 (4)
L5	120 (2)	71 (5)	70 (13)	115 (9)	78 (10)	94 (16)	113 (1)	73 (2)	96 (3)	89 (5)
D6	91 (1)	70 (4)	81 (6)	120 (11)	88 (10)	103 (16)	82 (2)	76 (8)	92 (1)	92 (4)

Drinking water samples showed good RR between 70 and 120% (**Table 3.2**). On the other hand, siloxane L3 was not found in the eluates of the wastewater samples at 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ spiking level. This could be because the organic matter in wastewater retains the siloxane, and thus avoids its adsorption over the GO/Fe₃O₄. At highest spiking level (60 $\mu\text{g L}^{-1}$), RR values decreased by up to 40% for the wastewater samples, showing a matrix effect (data not shown). This effect could be because the organic matter blocks the nanocomposite; accordingly, 40 mg of GO/Fe₃O₄ was used instead of 20 mg. As a result, RR increased and ranged from 70 and 120%, considering acceptable values [38].

In conclusion, matrix effects were not significant for all siloxanes except for L3 in the wastewater samples at 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ spiking level.

3.6 Eco-scale metrics

In order to assess the greenness of the new MSPE/GC-MS method, semiquantitative Eco-Scale metrics were used to calculate the penalty points of the whole analytical process. Introduced by A. Gałuszka et al. [33], the Eco-Scale metrics can classify an analytical method as green, assigning penalty points to parameters of the analytical process that are not in agreement with the ideal green analysis.

Thus, it was applied Eco-Scale metrics to the method developed herein, the results of which appear in **Table 3.S3**. Penalty points were attributed to the synthesis of GO/Fe₃O₄ nanocomposite for one MSPE and MSPE/GC-MS method applied to a sample of 10 mg L^{-1} for each siloxane and two sorbent cleaning stages.

Table 3.S3 Penalty points (PP) calculated to assess the greenness of the MSPE/GC-MS method for six siloxanes determination in water samples.

	Penalty points (PP)
Amount PP x Hazard PP	
Reagents (Chemical hazard)	
GO/Fe ₃ O ₄ 1/5: 40 mg	0
Nitric acid (65%): 0.22 mL	4
Sodium hydroxide (1 M): <5 mL	2
Solution 10 mg L ⁻¹ of L3, D4, L4, D5, L5 and D6: 20 mL	(1+1+1+1+1+2) = 7
Acetonitrile as eluent (MSPE + 2 cleaning): 3 x 0.5 mL	1+1+1 = 3
Instruments (Energy consumed by equipment)	
pHmeter: 3 min (GO/Fe ₃ O ₄ nanocomposite synthesis)	0
Stirring of GO + Fe ₃ O ₄ mixture in magnetic stir plate: 5 h	1
Nanocomposite drying in vacuum oven: 24 h	2
Vortex stirring: 10 min	0
Ultrasonic bath (MSPE + 2 cleaning): 7.5 min	0
GC-MS analysis (blank sample + standard sample + eluate sample)	2+2+2 = 6
GC-FID analysis (cleaning sample)	1
Waste	11
Analytical Eco-Scale total score: 100-37= 63	

The result obtained in the Eco-Scale metrics was >50 and <75, representing an acceptable green analysis.

4 Concluding remarks

An ecological MSPE/GC-MS procedure using GO/Fe₃O₄ nanocomposite as sorbent has been developed to analyze six siloxanes in water samples. The magnetic nanocomposite combines the excellent extraction capabilities of GO with the easy handling of Fe₃O₄ under an external magnetic field. Advantages such as the simple synthesis of the nanocomposite, easy manipulation and

potential reuse, reduce both costs and impact of wastes. According to LOD values obtained, the proposed method is sufficiently sensitive to determine siloxanes at trace levels in real-world water samples. This is the first time that a GO/Fe₃O₄ nanocomposite has been used for siloxanes extraction and preconcentration from water samples.

Finally, given the importance of developing environmentally friendly analytical methods, it is noteworthy that this novel and promising method is classified as green on the Eco-scale metrics.

Acknowledgements

The authors would like to thank “Vicerrectorado de Investigación y Transferencia de Conocimiento” of the University of Alicante (UAUSTI16-04), the Ministry of Science and Innovation of Spain (project no. CTQ2011-23968), the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness of Spain (project no. CTQ2016-79991-R, AEI/FEDER, UE) for the financial support. The authors would also like to thank Labaqua S.A (Alicante, Spain) and Aguas Municipalizadas de Alicante E.M. (Alicante, Spain) for supplying the real water samples, and Graphenano Group for supplying the graphene oxide. L. Costa thanks the Capes Foundation within the Ministry of Education in Brazil (Process 99999.012013/2013-07).

Conflict of interest statement

The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

- [1] Homem V., Capela D., Silva J. A., Cincinelli A., Santos L., Alves A., Ratola N., An approach to the environmental prioritisation of volatile methylsiloxanes in several matrices. *Sci. Total Environ.* 2017, *579*, 506-513.
- [2] Wang D.-G., Norwood W., Alaei M., Byer J. D., Brimble S., Review of recent advances in research on the toxicity, detection, occurrence and fate of cyclic volatile methyl siloxanes in the environment. *Chemosphere* 2013, *93*, 711-725.

- [3] Sparham C., Van Egmond R., O'Connor S., Hastie C., Whelan M., Kanda R., Franklin O., Determination of decamethylcyclopentasiloxane in river water and final effluent by headspace gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2008, *1212*, 124-129.
- [4] Wang D. -G., Steer H., Tait T., Williams Z., Pacepavicius G., Young T., Ng T., Smyth S. A., Kinsman L., Alae M., Concentrations of cyclic volatile methylsiloxanes in biosolid amended soil, influent, effluent, receiving water, and sediment of wastewater treatment plants in Canada. *Chemosphere* 2013, *93*, 766-773.
- [5] Van Egmond R., Sparham C., Hastie C., Gore D., Chowdhury N., Monitoring and modelling of siloxanes in a sewage treatment plant in the UK. *Chemosphere* 2013, *93*, 757-765.
- [6] Danish Environmental Protection Agency. Environmental Project No. 1031. <http://www2.mst.dk/udgiv/publications/2005/87-7614-756-8/pdf/87-7614-757-6.pdf> (last time accessed: February 19, 2018).
- [7] Appels L., Baeyens J., Degreève J., Dewil R., Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 2008, *34*, 755-781.
- [8] Cortada C., Costa dos Reis L., Vidal L., Llorca J., Canals A., Determination of cyclic and linear siloxanes in wastewater samples by ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 2014, *120*, 191-197.
- [9] Xu L., Shi Y., Cai Y., Occurrence and fate of volatile siloxanes in a municipal wastewater treatment plant of Beijing, China. *Water Res.* 2013, *47*, 715-724.
- [10] Wang D. -G., Alae M., Steer H., Tait T., Williams Z., Brimble S., Svoboda L., Barresi E., Dejong M., Schachtschneider J., Kaminski E., Norwood W., Sverko E., Determination of cyclic volatile methylsiloxanes in water, sediment, soil, biota, and biosolid using large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometry. *Chemosphere* 2013, *93*, 741-748.
- [11] Watanabe N., Yasuda Y., Kato K., Nakamura T., Funasaka R., Shimokawa K., Determination of trace amounts of siloxanes in water, sediments and fish

tissues by inductively coupled plasma emission spectrometry. *Sci. Total Environ.* 1984, **34**, 169-176.

[12] Companioni-Damas E. Y., Santos F. J., Galceran M. T., Analysis of linear and cyclic methylsiloxanes in water by headspace-solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 2012, **89**, 63-69.

[13] Sanchís J., Martínez E., Ginebreda A., Farré M., Barceló D., Occurrence of linear and cyclic volatile methylsiloxanes in wastewater, surface water and sediments from Catalonia. *Sci. Total Environ.* 2013, **443**, 530-538.

[14] Bletsou A. A., Asimakopoulos A. G., Stasinakis A. S., Thomaidis N. S., Kannan K., Mass loading and fate of linear and cyclic siloxanes in a wastewater treatment plant in Greece. *Environ. Sci. Technol.* 2013, **47**, 1824-1832.

[15] Fritz J. S., Analytical Solid-Phase Extraction. Wiley, New York 1999.

[16] Liu Q., Shi J. B., Zeng L. X., Wang T., Cai Y. Q., Jiang G. B., Evaluation of graphene as an advantageous adsorbent for solid-phase extraction with chlorophenols as model analytes. *J. Chromatogr. A* 2011, **1218**, 197-204.

[17] Chen J. M., Zou J., Zeng F. B., Song X. H., Ji J. J., Wang Y. R., Ha J., Chen X., Preparation and evaluation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber. *Anal. Chim. Acta* 2010, **678**, 44-49.

[18] Zhang H., Lee H. K., Plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol-gel coating as sorbent for determination of polybrominated diphenyl ethers. *J. Chromatogr. A* 2011, **1218**, 4509-4516.

[19] Zhang S., Du Z., Li G., Layer-by-layer fabrication of chemical-bonded graphene coating for solid-phase microextraction. *Anal. Chem.* 2011, **83**, 7531-7541.

[20] Ponnusamy V. K., Jen J. F., A novel graphene nanosheets coated stainless steel fiber for microwave assisted headspace solid phase microextraction of organochlorine pesticides in aqueous samples followed by gas chromatography with electron capture detection. *J. Chromatogr. A* 2011, **1218**, 6861-6868.

[21] Hummers W. S., Offeman R. E., Preparation of graphitic oxide. *J. Am. Chem. Soc.* 1958, **80**, 1339-1339.

- [22] Chandra S., Bag S., Das P., Bhattacharya D., Pramanik P., Fabrication of magnetically separable palladium-graphene nanocomposite with unique catalytic property of hydrogenation. *Chem. Phys. Lett.* 2012, *519-520*, 59-63.
- [23] Sitko R., Zawisza B., Malicka E., Graphene as a new sorbent in analytical chemistry. *Trends Anal. Chem.* 2013, *51*, 33-43.
- [24] Yang X., Li J., Wen T., Ren X., Huang Y., Wang X., Adsorption of naphthalene and its derivatives on magnetic graphene composites and the mechanism investigation. *Colloid. Surface A* 2013, *422*, 118-125.
- [25] Sitko R., Turek E., Zawisza B., Malicka E., Talik E., Heimann J., Gagor A., Feist B., Wrzalik R., Adsorption of divalent metal ions from aqueous solutions using graphene oxide. *Dalton Trans.* 2013, *42*, 5682-5689.
- [26] Liu Q., Shi J., Sun J., Wang T., Zeng L., Jiang G., Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011, *50*, 5913-5917.
- [27] Xu L., Feng J., Li J., Liu X., Jiang S., Graphene oxide bonded fused-silica fiber for solid-phase microextraction-gas chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *J. Sep. Sci.* 2012, *35*, 93-100.
- [28] Wu L., Yu L., Ding X., Li P., Dai X., Chen X., Zhou H., Bai Y., Ding J., Magnetic solid-phase extraction based on graphene oxide for the determination of lignans in sesame oil. *Food Chem.* 2017, *217*, 320-325.
- [29] Xu M., Liu M., Sun M., Chen K., Cao X., Hu Y., Magnetic solid-phase extraction of phthalate esters (PAEs) in apparel textile by core-shell structured Fe₃O₄@silica@triblock-copolymer magnetic microspheres. *Talanta* 2016, *150*, 125-134.
- [30] Kılınç E., Çelik K. S., Bilgetekin H., γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticle functionalized with carboxylated-multi walled carbon nanotube for magnetic solid phase extractions and determinations of Sudan dyes and Para Red in food samples. *Food Chem.* 2018, *242*, 533-537.
- [31] Fernández E., Vidal L., Canals A., Zeolite/iron oxide composite as sorbent for magnetic solid-phase extraction of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes from water samples prior to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2016, *1458*, 18-24.

- [32] Hao L., Wang C., Wu Q., Li Z., Zang X., Wang Z., Metal-organic framework derived magnetic nanoporous carbon: novel adsorbent for magnetic solid-phase extraction. *Anal. Chem.* 2014, **86**, 12199-12205.
- [33] Gałuszka A., Konieczka P., Migaszewski Z. M., Namiesnik J., Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends Anal. Chem.* 2012, **37**, 61-72.
- [34] Costa dos Reis L., Vidal L., Canals A., Graphene oxide/Fe₃O₄ as sorbent for magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography to determine 2,4,6-trinitrotoluene in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, **409**, 2665-2674.
- [35] Montgomery D. C., *Design and Analysis of Experiments*. Seventh Edition, Wiley, New Jersey 2009.
- [36] Han Q., Wang Z., Xia J., Chen S., Zhang X., Ding M., Facile and tunable fabrication of Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposites and their application in the magnetic solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental water samples. *Talanta* 2012, **101**, 388-395.
- [37] Miller J. N., Miller J. C., *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Sixth Edition, Pearson Education Limited, Harlow (UK) 2010.
- [38] Cortada C., Vidal L., Tejada S., Romo A., Canals A., Determination of organochlorine pesticides in complex matrices by single-drop microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2009, **638**, 29-35.

DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

10 DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

10.1 Aspectos generales

En esta memoria se han propuesto nuevas metodologías miniaturizadas y respetuosas con el medioambiente para la determinación de microcontaminantes orgánicos en muestras de agua. Dichas metodologías han posibilitado la resolución de algunos problemas analíticos encontrados en metodologías ya existentes. En ellas se han investigado nuevas formas de abordar tanto la microextracción líquido-líquido como la microextracción en fase sólida. La primera metodología desarrollada ha propuesto la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva basada en la utilización de la energía de ultrasonidos como forma de dispersar la fase extractante en la muestra acuosa. En las otras dos metodologías, se ha utilizado la técnica de extracción en fase sólida magnética para la preparación de la muestra utilizando un nuevo nanocomposite de óxido de grafeno, decorado con óxido de hierro. Las tres metodologías han sido optimizadas, validadas y aplicadas al análisis de muestras reales de agua. Las metodologías de preparación de la muestra investigadas han permitido alcanzar límites de detección para los microcontaminantes siloxanos lineales y cíclicos, y el explosivo 2,4,6-trinitrotolueno a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$, llegando a alcanzar, en algunos casos, valores del orden de ng L^{-1} .

En este capítulo se presenta una visión general de los resultados más relevantes obtenidos en este trabajo de investigación así como una visión crítica sobre los mismos. Con este fin, se han tratado los elementos comunes a todas las metodologías analíticas propuestas, como son el desarrollo de métodos analíticos sencillos, rápidos y ecológicos, así como algunos de los analitos determinados por distintos métodos; y se ha puesto en evidencia los puntos diferenciadores entre los capítulos, como son las técnicas de extracción y las fases extractantes utilizadas, los analitos, los factores estudiados en la optimización de cada técnica de extracción así como los sistemas de separación/detección utilizados. También, se ha realizado una discusión crítica

sobre los resultados obtenidos en las tres metodologías propuestas, destacando los logros diferenciadores obtenidos en cada una de ellas.

10.2 Elementos comunes y no comunes

En esta memoria se ha presentado tres metodologías analíticas en las cuales se han utilizado técnicas de extracción miniaturizadas como etapa de preparación de la muestra. La principal novedad propuesta en las tres metodologías consiste en su aspecto ecológico, si son comparadas con otras metodologías existentes para la determinación de siloxanos y el 2,4,6-trinitrotolueno en aguas. Además, la aplicación de la herramienta semicuantitativa “Eco-Scale” ha permitido evaluar el carácter ecológico de dos de las metodologías (secciones 9.2 y 9.3 del capítulo 9).

En la Tabla 10.1 se muestran las características representativas de las metodologías analíticas desarrolladas. De forma general, todas las metodologías de preparación de la muestra son:

- ✚ **Sencillas:** debido a la facilidad de realización de los experimentos para llevar a cabo cada análisis;
- ✚ **Rápidas:** a causa del corto espacio de tiempo necesario para la realización del procedimiento de extracción;
- ✚ **Respetuosas con el medio ambiente:** debido a la reducción del consumo de reactivos y etapas experimentales para cada técnica de extracción, se ha logrado disminuir la contaminación ambiental y los riesgos de manipulación de compuestos tóxicos por los operadores. De este modo, se ha conseguido disminuir la generación de residuos y el consumo de energía. En las tres metodologías propuestas se ha reducido, e incluso eliminado, el disolvente orgánico; así se ha utilizado una fase sólida reutilizable como fase extractante (e.g., nanocomposite magnético de óxido de grafeno), o se ha utilizado un modo alternativo para generar la dispersión del pequeño volumen de fase extractante en el seno de la muestra (e.g, energía de ultrasonidos). También se ha eliminado la centrifugación/filtración para la separación de las fases en las metodologías de MSPE.

Tabla 10.1 Características representativas de las metodologías analíticas propuestas en la presente memoria.

Metodología	Analitos	Muestra	Técnica de microextracción	Fase extractante	Cantidad de fase extractante	Desorción (elución) de los analitos	Cantidad de muestra	Tiempo de extracción/elución
USA-DLLME/ GC-MS	Siloxanos lineales y cíclicos, TMS	Agua residual	USA-DLLME	clorobenceno	13 µL	-	13 mL	7 min (extracción)
MSPE/ LC-UV-Vis	TNT	Agua de embalse, potable y residual	MSPE	GO/Fe ₃ O ₄	40 mg	Acetonitrilo: 1 mL + [50 µL (reconstitución del eluato)]	20 mL	10 min/6 min + [20 min (reconstitución del eluato)]
MSPE/GC-MS	Siloxanos lineales y cíclicos	Agua potable y residual	MSPE	GO/Fe ₃ O ₄	20 mg (agua potable) 40 mg (agua residual)	0.5 mL de acetonitrilo	20 mL	10 min/2.5 min

La técnica USA-DLLME ha permitido minimizar el consumo de reactivos y de muestra y, por tanto, la generación de residuos. Además, esta técnica ha permitido obtener unos altos valores de los factores de enriquecimiento en tiempos de extracción cortos y con un procedimiento bastante sencillo. A diferencia de las técnicas clásicas de DLLME, en las que se utiliza un disolvente orgánico como agente dispersante, la USA-DLLME desarrollada emplea la energía de ultrasonidos como un recurso fácil, económico y ecológico que permite dispersar rápidamente la fase extractante (unos pocos microlitros de disolvente orgánico) en la muestra de agua residual. De igual forma, la técnica MSPE también disminuye el consumo de reactivos y, por tanto, la generación de residuos, al utilizar unos pocos miligramos de adsorbente sólido que, además, pueden ser reutilizados después de un proceso simple de limpieza, sin pérdida significativa de su capacidad de adsorción. Por otro lado, el componente magnético del adsorbente facilita enormemente su manejo mediante la utilización de un imán que permite separar rápidamente la fase sólida de la muestra líquida, evitando etapas adicionales de separación entre fases (i.e., centrifugación, filtración).

En la Tabla 10.2 se muestran los principales parámetros analíticos obtenidos en las tres metodologías propuestas.

Tabla 10.2 Principales parámetros analíticos de las metodologías propuestas en esta memoria.

Metodología	Analito	Intervalo lineal	Coefficiente de correlación (puntos de calibración)	CV ¹ (%) intra-day (nivel de concentración)	CV ² (%) inter-day (nivel de concentración)	LOD ³	EF ⁴
USA-DLLME/GC-MS	TMS	5-25 µg L ⁻¹	0.994 (N=5)	10 (10 µg L ⁻¹)	-	1.4 µg L ⁻¹	153
	L2	2-25 µg L ⁻¹	0.993 (N=6)	20 (10 µg L ⁻¹)		0.006 µg L ⁻¹	347
	L4	2-25 µg L ⁻¹	0.991 (N=6)	22 (10 µg L ⁻¹)		0.003 µg L⁻¹	286
	L5	2-15 µg L ⁻¹	0.9997 (N=4)	22 (10 µg L ⁻¹)		0.02 µg L⁻¹	266
	D3	5-25 µg L ⁻¹	0.993 (N=5)	24 (10 µg L ⁻¹)		0.4 µg L ⁻¹	631
	D4	2-25 µg L ⁻¹	0.996 (N=6)	22 (10 µg L ⁻¹)		0.002 µg L⁻¹	855
	D5	2-25 µg L ⁻¹	0.993 (N=6)	21 (10 µg L ⁻¹)		0.003 µg L⁻¹	282
	D6	2-15 µg L ⁻¹	0.992 (N=4)	22 (10 µg L ⁻¹)		0.03 µg L⁻¹	335
MSPE/LC-UV-Vis	TNT	1-100 µg L ⁻¹	0.994 (N=5)	12 (10 µg L ⁻¹)	17 (10 µg L ⁻¹)	0.3 µg L ⁻¹	153
MSPE/GC-MS	L3	0.3-100 µg L ⁻¹	0.993 (N=6)	20 (10 µg L ⁻¹)	18 (10 µg L ⁻¹)	0.1 µg L ⁻¹	-
	L4	0.03-100 µg L ⁻¹	0.997 (N=7)	10 (10 µg L ⁻¹)	23 (10 µg L ⁻¹)	0.01 µg L⁻¹	
	L5	0.01-100 µg L ⁻¹	0.997 (N=7)	12 (10 µg L ⁻¹)	24 (10 µg L ⁻¹)	0.003 µg L⁻¹	
	D4	0.01-100 µg L ⁻¹	0.999 (N=7)	19 (10 µg L ⁻¹)	23 (10 µg L ⁻¹)	0.003 µg L⁻¹	
	D5	0.01-100 µg L ⁻¹	0.990 (N=7)	9 (10 µg L ⁻¹)	22 (10 µg L ⁻¹)	0.003 µg L⁻¹	
	D6	0.01-100 µg L ⁻¹	0.997 (N=7)	13 (10 µg L ⁻¹)	24 (10 µg L ⁻¹)	0.003 µg L⁻¹	

¹Coefficiente de variación (CV) obtenido a partir de: siete extracciones consecutivas al nivel de concentración señalado (Sección 9.1); a partir de seis extracciones consecutivas (Sección 9.2); a partir de seis extracciones consecutivas (Sección 9.3); lo mismo que desviación estándar relativa (RSD).

²CV obtenida a partir de tres extracciones consecutivas al nivel de concentración señalado realizadas en tres días distintos.

³Límite de detección obtenido utilizando tres veces la relación señal/ruido (Sección 9.1); experimentalmente (Secciones 9.2 y 9.3).

⁴Factor de enriquecimiento (EF) o factor de preconcentración (PF).

En la validación de las tres metodologías se ha obtenido una buena linealidad en el intervalo de concentraciones señalado. Para evaluar este parámetro, se ha utilizado tanto la inspección visual de las curvas de calibración derivadas de los resultados experimentales así como sus coeficientes de correlación, cuyos valores se encuentran comprendidos entre 0.990 y 0.9997. En la Tabla 10.2 también se muestra la precisión “intra-day” e “inter-day” de los métodos desarrollados, expresada a través del CV. Los valores de CV para la repetibilidad “intra-day” oscilan entre 9 y 24%, y para la repetibilidad “inter-day” los valores (Secciones 9.2 y 9.3), oscilan entre 17 y 24%. Finalmente, los LODs obtenidos son del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$ o ng L^{-1} , lo que ha permitido la determinación a niveles traza de los compuestos orgánicos estudiados en muestras de agua de diferente origen y puntos de estaciones depuradoras de aguas residuales.

Los analitos comunes entre las metodologías presentadas en las secciones 9.1 y 9.3 están marcados con diferentes colores en la Tabla 10.2. Como se puede apreciar en esta tabla, para el siloxano cíclico D5, el valor de LOD alcanzado es el mismo para las dos metodologías. Los valores de LOD para los VMS L4, L5, D4 y D6 han sido diferentes en las metodologías USA-DLLME/GC-MS y MSPE/LC-UV-Vis. Mientras que la primera ha permitido alcanzar menores límites de detección para los siloxanos L4 y D4, la segunda metodología ha proporcionado menores valores de LOD para L5 y D6.

Las metodologías han sido aplicadas al análisis de muestras reales de aguas que presentan problemas por la presencia de los analitos estudiados, ya sea por cuestiones de bajo rendimiento en el aprovechamiento del biogás (Secciones 9.1 y 9.3), toxicidad de las aguas utilizadas para suministro urbano (Secciones 9.2 y 9.3) o ecotoxicidad de aguas naturales (Sección 9.2). Las recuperaciones relativas obtenidas durante el análisis de las muestras reales se muestran en la Tabla 10.3.

Tabla 10.3 Recuperaciones relativas obtenidas en la aplicación de las metodologías propuestas al análisis de muestras reales de aguas.

Metodología	Analitos	Muestra	Recuperación relativa (RR) (nivel de concentración)
USA-DLLME/ GC-MS	Siloxanos	Agua residual	71-116% (5 µg L ⁻¹)
			71-99% (10 µg L ⁻¹)
MSPE/ LC-UV-Vis	TNT	Agua de embalse	101% (50 µg L ⁻¹)
		Agua potable	120% (50 µg L ⁻¹)
		Agua residual de entrada de una WWTP	87% (50 µg L ⁻¹)
MSPE/ GC-MS	Siloxanos	Agua potable	80-120% (1 µg L ⁻¹)
			70-71% (60 µg L ⁻¹)
		Agua residual de entrada WWTP 1	70-102% (1 µg L ⁻¹)
			94-120% (60 µg L ⁻¹)
		Agua residual de tratamiento secundario WWTP 1	78-96% (1 µg L ⁻¹)
			91-103% (60 µg L ⁻¹)
		Agua residual de tratamiento terciario WWTP 1	82-120% (1 µg L ⁻¹)
	73-116% (60 µg L ⁻¹)		
		Agua residual de entrada WWTP 2	92-116% (1 µg L ⁻¹)
			70-120% (60 µg L ⁻¹)

El cálculo de las recuperaciones relativas (RR) ha sido realizado mediante el cociente entre el promedio de las áreas cromatográficas obtenidas en las tres réplicas del procedimiento extracción-separación/detección de la muestra real dopada al nivel de concentración indicado en la Tabla 10.3 y el promedio de las áreas obtenidas para el mismo procedimiento analítico aplicado a agua desionizada dopada a los mismos niveles. Como se puede apreciar en la Tabla 10.3, los valores de RR para todos los analitos investigados indicaron que no existen efectos de matriz significativos en las muestras reales de agua

estudiadas. Sin embargo, como se ha mostrado en los resultados de la sección 9.3 del capítulo 9, el siloxano lineal L3 no ha sido detectado en las aguas residuales dopadas a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, indicando que a este bajo nivel de concentración existen efectos de matriz para el análisis de este siloxano. En esta aplicación concreta, se ha utilizado 20 mg de nanocomposite para el estudio de las muestras reales dopadas a $1 \mu\text{g L}^{-1}$, obteniendo resultados satisfactorios para los demás siloxanos. Sin embargo, como no se ha detectado el siloxano L3 en la metodología propuesta, en la que se utiliza 20 mg de nanocomposite, se ha probado el doble de adsorbente (resultados no mostrados en la sección 9.3). Aún así, el L3 tampoco ha sido detectado. Portanto, se puede concluir que el compuesto octametiltrisiloxano (L3) no puede ser detectado en aguas residuales a niveles bajos de concentración por el método MSPE/GC-MS utilizando GO/Fe₃O₄ como adsorbente.

Los aspectos comunes y no comunes entre las tres metodologías desarrolladas se muestran en la Figura 10.1. En este esquema se puede apreciar los elementos no comunes entre las tres metodologías y también no comunes entre una y las otras dos. A modo de ejemplo, algunos de los siloxanos estudiados en la sección 9.1, se repiten en la sección 9.3. Sin embargo, en la sección 9.2 se estudia otro microcontaminante orgánico, pero se utiliza la misma técnica de microextracción utilizada en la sección 9.3.

Universidad de Alicante

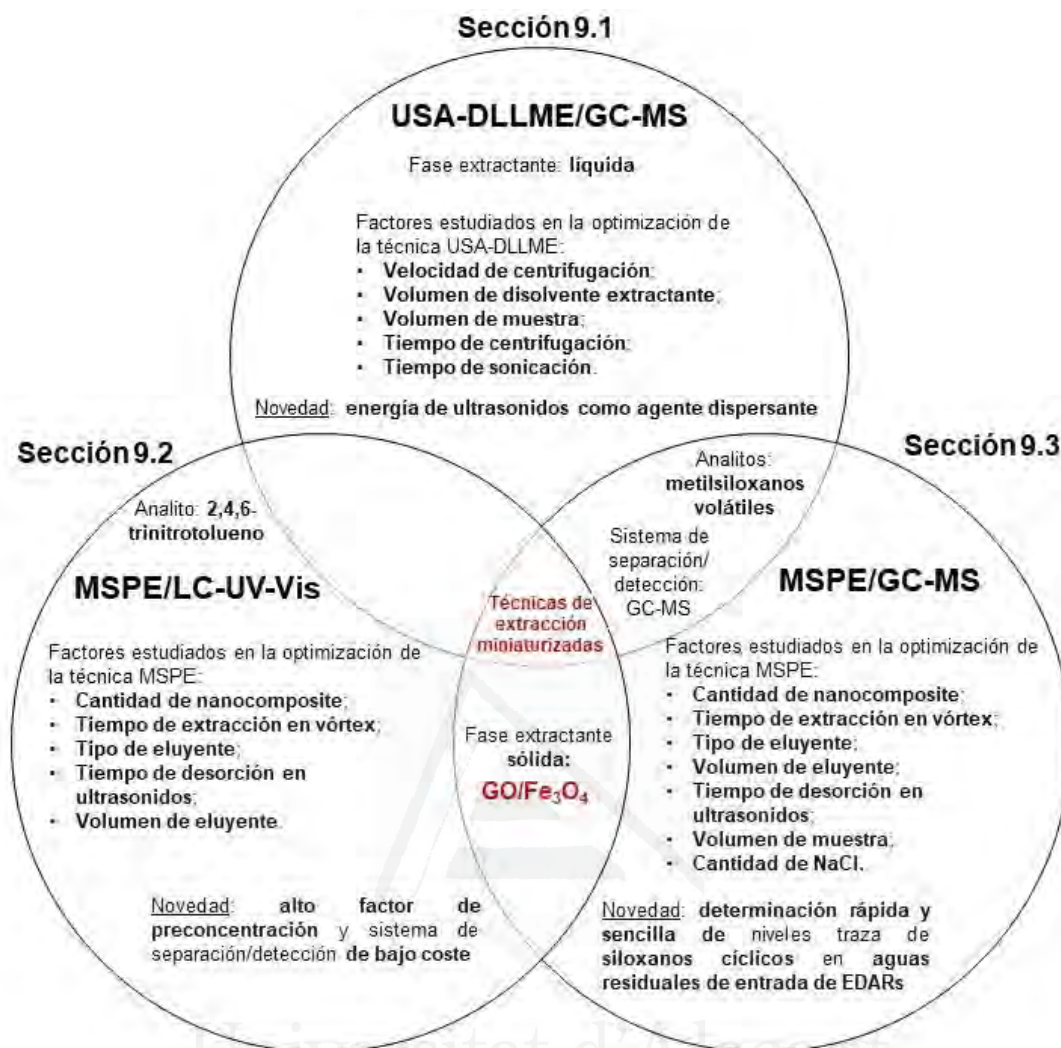


Figura 10.1 Esquema que relaciona los principales elementos comunes y no comunes entre las tres metodologías propuestas.

Como se muestra en el diagrama de la Figura 10.1, las tres metodologías utilizan técnicas miniaturizadas de extracción para la preparación de muestras de aguas antes del análisis de microcontaminantes orgánicos por técnicas de separación cromatográficas. La primera metodología desarrollada utiliza una técnica de microextracción en fase líquida, mientras que en las otras dos se utiliza una técnica miniaturizada de extracción en fase sólida.

En la sección 9.1, la fase extractante líquida es un disolvente comúnmente utilizado en técnicas de extracción en fase líquida, el clorobenceno. Este disolvente presenta baja toxicidad y, además, el volumen empleado ha sido bajo

(13 μL), si se le compara con el volumen empleado en otras metodologías que utilizan la misma técnica de extracción. Como se ha mencionado anteriormente, la mayor diferencia con respecto a la metodología **DLLME/GC-MS** consiste en el uso de la **energía de ultrasonidos** como **agente dispersante**, eliminando, de esta forma, el uso de un disolvente dispersante.

En la metodología de la sección 9.2 se utiliza una técnica de microextracción en fase sólida cuya fase extractante es el nanocomposite GO/Fe₃O₄. La técnica de extracción en fase sólida magnética (MSPE) es una técnica reciente en la que se utiliza la propiedad magnética de uno de los componentes del adsorbente para facilitar la separación entre las fases sólida y líquida. Otra diferencia es el analito modelo estudiado. Esta ha sido la primera vez que se ha aplicado la metodología **MSPE/LC-UV-Vis** para la determinación del 2,4,6-trinitrotolueno en aguas. La técnica MSPE ha permitido concentrar 153 veces el TNT lo que ha permitido su detección a nivel de trazas en muestras de agua. El adsorbente formado por una fase extractante de óxido de grafeno ha sido la clave para alcanzar este alto factor de preconcentración. Sin embargo, la gran aportación de esta metodología analítica ha sido la utilización de un sistema de separación/detección de bajo coste (**cromatografía líquida acoplada a un detector ultravioleta-visible**).

Finalmente, en la sección 9.3 se propone una metodología alternativa para el análisis de metilsiloxanos volátiles. Con la metodología MSPE/GC-MS desarrollada ha sido posible detectar los mismos siloxanos estudiados anteriormente mediante USA-DLLME/GC-MS (sección 9.1) y un siloxano no estudiado antes, el L3. Experimentos previos realizados con el siloxano L3 durante el desarrollo de la metodología **DLLME/GC-MS** no permitieron determinar este siloxano lineal (resultados no mostrados en la memoria). Sin embargo, la metodología basada en la microextracción con óxido de grafeno ha proporcionado resultados satisfactorios para todos los siloxanos estudiados, incluso el L3. La nueva metodología propuesta para el análisis de siloxanos en muestras de agua (sección 9.3) ha podido solventar dos inconvenientes que mostraba la metodología USA-DLLME/GC-MS (sección 9.1): (i) ha permitido realizar el análisis del siloxano L3 en aguas potable y en aguas residuales a nivel

de $60 \mu\text{g L}^{-1}$, y ; (ii) ha permitido la determinación de niveles traza de los siloxanos cíclicos D4, D5 y D6 con bajos valores de error experimental (incertidumbre) en aguas residuales de entrada de dos diferentes WWTPs, sin necesidad de una etapa previa de filtración.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



CONCLUSIONES

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

11 CONCLUSIONES GENERALES

Esta memoria propone tres metodologías novedosas, simples, rápidas y respetuosas con el medioambiente para el análisis de niveles traza de siloxanos lineales y cíclicos, y el explosivo TNT.

El nanocomposite investigado en esta memoria (GO/Fe₃O₄) presenta un gran potencial para aplicaciones analíticas ya que los límites de detección alcanzados mediante su uso en las metodologías presentadas en las secciones 9.2 y 9.3, han sido totalmente satisfactorios para el análisis de TNT y siloxanos permitiendo alcanzar niveles hasta los ng L⁻¹ en muestras de aguas contaminadas. La gran área superficial de las láminas de óxido de grafeno junto con la gran cantidad de grupos oxidados superficiales ha permitido la obtención de un nanocomposite magnético con una excelente capacidad de adsorción para los microcontaminantes orgánicos estudiados. Su síntesis sencilla y eficiente, pone en evidencia un futuro prometedor para el óxido de grafeno como fase adsorbente para técnicas de microextracción en fase sólida.

Al igual que se destaca la técnica MSPE, la técnica USA-DLLME propuesta en el primer trabajo, ha eliminado el uso de agente dispersante al emplear la energía de ultrasonidos. Esta aportación ha permitido obtener altos factores de preconcentración para los siloxanos estudiados en un corto espacio de tiempo.

De modo general, se puede concluir que:

- ✓ La técnica de extracción USA-DLLME propuesta, es más rápida, económica y fácil de manejar que aquellas estudiadas previamente para el mismo propósito, permitiendo detectar niveles de siloxanos en aguas residuales que satisfacen las exigencias para su control en las WWTPs;
- ✓ El método propuesto en la sección 9.2 (MSPE/LC-UV-Vis) representa una alternativa atractiva muy asequible para cualquier laboratorio debido a la utilización de un equipo de separación/detección económico, lo que ha sido posible gracias a la utilización del adsorbente investigado (GO/Fe₃O₄) de excelente capacidad de extracción para el explosivo TNT;

- ✓ Finalmente, en la metodología MSPE/GC-MS ha sido posible detectar siloxanos a niveles traza en muestras reales de aguas residuales de manera simple y rápida, siendo la primera vez que se ha utilizado el óxido de grafeno como fase adsorbente para la extracción de estos compuestos perjudiciales al aprovechamiento del biogás.



Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante



PERSPECTIVAS FUTURAS

Universitat d'Alacant
Universidad de Alicante

12 PERSPECTIVAS FUTURAS

Los avances obtenidos sobre la utilización del óxido de grafeno en técnicas de pretratamiento de muestras de agua abre el camino para nuevas aplicaciones, tanto de interés social como tecnológico, del nanocomposite GO/Fe₃O₄ sintetizado en esta memoria ya que posee una excelente capacidad de adsorción de compuestos orgánicos. Debido a los problemas analíticos encontrados durante la determinación de microcontaminantes emergentes en aguas naturales y residuales cuyo destino son los recursos hídricos, es muy recomendable el desarrollo de nuevas metodologías que permitan determinar otros contaminantes a los niveles de concentración exigidos en las correspondientes normativas de calidad de aguas, que cada vez son más estrictas.

Así, el nuevo nanocomposite presentado en los trabajos propuestos podrá ser utilizado para el análisis de otros compuestos orgánicos en aguas así como en otras matrices (sólidas o gaseosas), como por ejemplo, matrices biológicas de interés médico.

Los conocimientos adquiridos durante el desarrollo del presente trabajo experimental permitirán su extensión a nuevos nanomateriales adsorbentes, más baratos y ecológicos, como podría ser la nanocelulosa obtenida de residuos lignocelulósicos abundantes en Brasil.