



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**“DESARROLLO DE MATERIALES SELECTIVOS PARA LA RECUPERACIÓN Y
PRECONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS AMBIENTAL A PARTIR DE
MATRICES COMPLEJAS”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. OLIVIA ZAMORA MARTÍNEZ



TUTOR: DRA. LUZ ELENA VERA ÁVILA

AÑO: 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Sofía Guillermina Burillo Amezcua
Vocal	Dr. José Luis Gallegos Pérez
Vocal	Dra. Martha Patricia García Camacho
Vocal	Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel Guerrero
Secretario	Dr. Emilio Bucio Carrillo

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ EL TRABAJO

Laboratorio 115 de la División de Estudios de Posgrado, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, UNAM.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid España.

TUTOR:

Dra. Luz Elena Vera Ávila

SUSTENTANTE:

M. en C. Olivia Zamora Martínez

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química de la UNAM.

Al Posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM.

A la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid España por la estancia de doctorado permitida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca doctoral otorgada en el periodo de agosto de 2003 a julio de 2007.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM por el complemento económico recibido.

A la Fundación Telmex por el apoyo otorgado a través de su programa de excelencia académica.

Se agradece también el apoyo financiero a través de los siguientes proyectos:

PAPIIT- DGAPA (UNAM) No. IX232104.

CONACyT 46558-Y (México).

DGCYT CTQ2005-02281 (España).

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila por la dirección, análisis y evaluación de este trabajo de tesis.

A la M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera por el todo el apoyo experimental, observaciones y atenciones durante el desarrollo de esta tesis.

A los doctores, Guadalupe Albarrán, Pandiyan Tangarasu y Martha Patricia García, miembros de mi comité tutelar, por todas las aportaciones realizadas a este trabajo doctoral.

También quiero agradecer a las siguientes personas del departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid España:

Dra. Carmen Cámara por la oportunidad de realizar la estancia de doctorado en su grupo de trabajo.

Dra. Concepción Pérez Conde por su dirección y asesoría durante la estancia de doctorado, así como su hospitalidad y cuidados durante mi estancia en ese país.

Dra. Carmen del Cacho Vicente por su asesoría incondicional, su gran hospitalidad y la de su familia, así como los muchos cuidados y atenciones que siempre me tuviste.

A los H. Miembros del Jurado evaluador de este trabajo de tesis por sus comentarios observaciones y aportaciones.

El desarrollo de esta tesis dio origen a los siguientes trabajos:

ARTÍCULO:

Determination of bencimidazole fungicides in water samples by on-line MISPE-HPLC. O. Zamora, E. E. Paniagua, C. Cacho, L. E. Vera-Avila and C. Perez-Conde. Analytical and bioanalytical Chemistry. 2009, **393**, 1745-1753.

CONGRESOS:

Síntesis de un polímero impreso molecularmente con etiléntiourea y su evaluación como adsorbente selectivo en sistemas de extracción en fase sólida. Zamora M. Olivia, Vera Á. Luz, Covarrubias H. Ma. XVIII Congreso Nacional de Química Analítica, Pachuca, Hidalgo, del 30 de Junio al 2 de Julio de 2004.

Efecto del disolvente porógeno sobre la impresión molecular de etiléntiourea en sistemas de extracción en fase sólida. Zamora M. Olivia y Vera Á. Luz. XIX Congreso Nacional de Química Analítica. Guadalajara, Jalisco, del 11 al 13 de Octubre de 2005.

Determinación de etiléntiourea por HPLC. Zamora M. Olivia, Vera Á. Luz. XI Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Ciencias Afines (XI COLACRO). Mérida, Yucatán, del 28 al 30 de Junio de 2006.

Selective Adsorbent for SPE. Zamora-Martínez O. and Vera-Ávila L.E. The Pittsburg Conference (PITTCON 2008). New Orleans LA, USA, del 2 al 7 de Marzo de 2008.

Desarrollo y caracterización de un polímero impreso con tiabendazol y su aplicación para la determinación de bencimidazoles en muestras acuosas. Zamora M. Olivia, Paniagua R. Esteban,

Cacho C. Carmen, Pérez C. Concepción y Vera Á Luz. XXII Congreso Nacional de Química Analítica. Mérida, Yucatán, del 23 al 27 de Junio de 2008.

Determination of benzimidazole fungicides in water samples by on-line MISPE-HPLC. Cacho Carmen, Zamora Olivia, Paniagua Esteban, Vera Á. Luz, Pérez Concepción. The Fifth International Workshop on Molecular Imprinting. Kobe Japón, del 7 al 11 de septiembre de 2008.

Molecularly Imprinted Polymers for the determination of benzimidazole fungicides in water samples. Cacho Carmen, Paniagua Esteban, Zamora Olivia, Turiel Esther, Pérez Concepción. 12as. Jornadas de Análisis Instrumental. Barcelona España, del 21 al 23 de octubre de 2008.

A mi familia, amigos y profesores por todas sus enseñanzas de vida.

ÍNDICE

	Pag.
Lista de abreviaturas	i
Lista de figuras	iv
Lista de tablas	vii
Abstract	xi
Resumen	xiv
Capítulo I. Introducción	1
Capítulo II. Objetivos	5
Capítulo III. Antecedentes	6
3.1 <i>Polímeros impresos molecularmente (PIM's)</i>	6
3.1.1 <i>Síntesis de los polímeros generados por impresión molecular</i>	6

3.1.1.1	<i>Copolimerización</i>	8
3.1.1.2	<i>Tacticidad</i>	9
3.1.1.3	<i>Polimerización vía radicales libres</i>	10
3.1.1.4	<i>Formatos de polimerización para la obtención de PIM's</i>	16
3.1.1.5	<i>Formatos de impresión molecular</i>	19
3.1.1.6	<i>Optimización de la síntesis de PIM's</i>	21
3.1.1.7	<i>Monómeros funcionales</i>	24
3.1.1.8	<i>Agentes de entrecruzamiento</i>	31
3.1.1.9	<i>Disolvente porógeno</i>	33
3.1.1.10	<i>Iniciador</i>	35
3.1.1.11	<i>Efecto de la temperatura y la presión sobre la polimerización</i>	37
3.1.1.12	<i>Estabilidad de los sitios, integridad y accesibilidad</i>	37
3.1.2	<i>Caracterización físico-química de los PIM's</i>	40
3.1.2.1	<i>Técnicas morfológicas empleadas en la caracterización de PIM's</i>	40
3.1.2.2	<i>Técnicas químicas empleadas en la caracterización de PIM's</i>	41
3.1.2.3	<i>Isotermas de adsorción</i>	42
3.1.3	<i>Aplicaciones de los PIM's</i>	45
3.1.3.1	<i>Empleo de PIM's como adsorbentes selectivos en procesos de EFS</i>	46
3.1.3.2	<i>Empleo de PIM's como fases estacionarias selectivas en CLAR</i>	54
3.1.3.3	<i>Empleo de PIM's como fases estacionarias selectivas en electrocromatografía capilar</i>	55
3.1.3.4	<i>Empleo de PIM's en el desarrollo de sensores</i>	56
3.2	<i>Pesticidas</i>	57
3.2.1	<i>Ditiocarbamatos</i>	58
3.2.1.1	<i>Etilénbisditiocarbamatos (EBDC's)</i>	58

3.2.1.2	<i>Etiléntiourea</i>	61
3.2.1.3	<i>Bencimidazoles</i>	69
3.3	<i>Polímeros impresos para etiléntiourea y bencimidazoles</i>	74
Capítulo IV.	Parte experimental	76
4.1	<i>Instrumentación</i>	76
4.1.1	<i>Equipo y Materiales</i>	76
4.1.2	<i>Columnas y Cartuchos</i>	77
4.1.3	<i>Reactivos y disolventes</i>	78
4.2	<i>Métodos cromatográficos</i>	80
4.2.1	<i>Condiciones cromatográficas para la determinación de etiléntiourea</i>	80
4.2.2	<i>Condiciones cromatográficas para la determinación de bencimidazoles.</i>	82
	<i>Tiabendazol, carbendazim y benomil</i>	
4.3	<i>Polímeros impresos para Etiléntiourea</i>	83
4.3.1	<i>Metodología de síntesis de los materiales impresos</i>	83
4.3.1.1	<i>Ensayos preliminares. Uso de AMA como monómero funcional, evaluación del disolvente porógeno</i>	84
4.3.1.2	<i>Evaluación de mezclas de monómeros funcionales</i>	84
4.3.1.3	<i>Efecto de la proporción de Acrilamida:4-Vinilpiridina sobre las propiedades del material adsorbente</i>	85
4.3.1.4	<i>Efecto de la proporción de disolvente porógeno en la mezcla de reacción</i>	86
4.3.2	<i>Caracterización cromatográfica de los materiales poliméricos</i>	87
4.3.2.1	<i>Variación del volumen de la disolución de carga a cantidad cargada constante</i>	88
4.3.2.2	<i>Variación de la concentración de la disolución de carga y de la cantidad cargada</i>	89

4.3.2.3	<i>Análisis Frontal</i>	90
4.3.2.4	<i>Perfiles de elución</i>	90
4.4	<i>Polímeros impresos para bencimidazoles</i>	91
4.4.1	<i>Metodología de síntesis de los materiales impresos</i>	91
4.4.1.1	<i>Evaluación del volumen de disolvente porógeno. Pruebas preliminares</i>	91
4.4.1.2	<i>Síntesis del material impreso para bencimidazoles</i>	92
4.4.2	<i>Evaluación del grado de impresión en el polímero</i>	94
4.4.2.1	<i>Optimización del proceso de extracción fuera de línea.</i>	94
4.4.2.2	<i>Isotermas de adsorción. Caracterización físico-química del PIM</i>	95
4.4.2.3	<i>Capacidad del polímero impreso para preconcentrar los analitos a partir de muestras de agua</i>	96
4.4.2.4	<i>Diseño del sistema de preconcentración y determinación de los bencimidazoles en línea</i>	97
Capítulo V.	<i>Resultados y discusión</i>	100
5.1	<i>Métodos para la cuantificación de etiléntiourea</i>	100
5.1.1	<i>Selección de la longitud de onda de trabajo</i>	100
5.1.2	<i>Determinación de etiléntiourea en muestras acuosas</i>	101
5.1.3	<i>Determinación de etiléntiourea en muestras orgánicas</i>	106
5.1.4	<i>Parámetros estadísticos de los métodos desarrollados</i>	112
5.2	<i>Polímeros impresos para etiléntiourea</i>	116
5.2.1	<i>Ensayos preliminares. Uso de AMA como monómero funcional, evaluación del disolvente porógeno</i>	116
5.2.2	<i>Evaluación de mezclas de monómeros funcionales</i>	120

5.2.3 Efecto de la proporción Acrilamida:4-Vinilpiridina sobre las propiedades del material adsorbente	129
5.2.4 Efecto de la proporción de disolvente porógeno en la mezcla de reacción	133
5.2.5 Caracterización cromatográfica de los materiales poliméricos	136
5.2.5.1 Variación del volumen de la disolución de carga a cantidad cargada constante	136
5.2.5.2 Variación de la concentración de la disolución de carga y de la cantidad cargada	150
5.3 Polímeros impresos para bencimidazoles	166
5.3.1 Evaluación del grado de impresión en el polímero	166
5.3.1.1 Optimización del proceso de extracción fuera de línea	166
5.3.1.2 Isotermas de adsorción. Caracterización físico-química del PIM	168
5.3.2. Capacidad del polímero impreso para preconcentrar a los analitos en muestras acuosas	177
5.3.3 Diseño del sistema de preconcentración y determinación en línea	181
Capítulo VI. Conclusiones	186
Capítulo VII. Bibliografía	188
Anexo 1	208

LISTA DE ABREVIATURAS

ABDV	2,2'-azo-bis-(2,4-dimetilvaleronitrilo).
ACA	Acrilamida.
AcCN	Acetonitrilo.
AFM	Microscopia de fuerza atómica.
AIBN	2,2'-azobis-isobutironitrilo.
AMA	Ácido metacrílico.
ATP	Adenosin trifosfato.
BEN	Benomil.
CBZ	Carbendazim.
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a espectrometría de masas.
CLAR	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.
CLAR-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con Detección con Arreglo de Diodos.
CLAR-UV	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección UltraVioleta.
CL-EM	Cromatografía de líquidos acoplada a Espectrometría de Masas.
CV	Coefficiente de variabilidad.
EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato.
DMFS	Dispersión de matriz en fase sólida.
DVB	Divinilbenceno.
EBDC's	Etilenbisditiocarbamatos.

LISTA DE ABREVIATURAS

ECC	Electrocromatografía capilar.
EDA	Etiléndiamina.
EFS	Extracción en Fase Sólida.
EFS-CG	Extracción en Fase Sólida acoplada a Cromatografía de Gases.
EFSIM	Extracción en Fase Sólida utilizado como adsorbente polímeros impresos molecularmente.
EFSIM-CLAR-UV	Extracción en Fase Sólida con polímeros impresos molecularmente acoplada a Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución con detección Ultra Violeta.
ELL	Extracción líquido-líquido.
EtOH	Etanol.
ETU	Etiléntiourea.
EU	Etilénurea.
FT-IR	Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier.
HAcO	Ácido acético.
HEMA	2-hidroxietil metacrilato.
IsoOH	Isopropanol.
LMR's	Límites máximos de residuos.
MeOH	Metanol.
Min	Minuto.
MMA	Metilmetaacrilato.
PB	Polímero Blanco.

LISTA DE ABREVIATURAS

PIM	Polímero impreso molecularmente.
PIM's	Polímeros impresos molecularmente.
p-MAM	Polimetacrilato de metilo .
rpm	Revoluciones por minuto.
SEM	Microscopia Electrónica de Barrido.
TBZ	Tiabendazol.
TRIM	Trimetacrilato de trimetilopropano.
TSH	Hormona tiroidea.
UV	Ultravioleta.
UV-Vis	Ultravioleta-Visible.
4-VP	4-Vinilpiridina.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
3.1	Etapas implicadas en la síntesis de los polímeros impresos molecularmente.	7
3.2	Mecanismo de iniciación. a) Homólisis del agente de iniciación, b) Generación del radical olefínico.	11
3.3	Mecanismos de combinación y desproporción.	13
3.4	Mecanismo de inhibición por efecto de hidroquinona.	15
3.5	Formación de la estructura porosa al preparar un polímero impreso.	34
3.6	Tipos de sitios de enlazamiento en polímeros que contienen micro, meso y macroporos.	38
3.7	Comparación entre las isotermas de adsorción medidas al equilibrio ($t= 30$ minutos) y fuera del equilibrio ($t= 0$).	43
3.8	Proceso de EFS utilizando como adsorbente un polímero impreso molecularmente.	47
3.9	Curva característica del análisis frontal.	50
3.10	Estructura química del Zineb y Maneb.	59
3.11	Vías de descomposición de la etiléntiourea.	63
4.1.	Esquema del sistema en línea con la válvula de conmutación en: (a) posición de carga y (b) posición de inyección.	99
5.1	Espectro de absorción en el UV de una disolución acuosa de ETU a concentración de 20 mg L^{-1} .	102

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
5.2	Curva de calibración para la cuantificación de ETU en muestras acuosas utilizando la columna polimérica PRP-1.	104
5.3	Curva de calibración para la cuantificación de ETU en muestras acuosas utilizando la columna de carbón grafitizado Hypercarb.	106
5.4	Curva de calibración para la cuantificación de ETU en muestras de acetonitrilo utilizando como fase estacionaria la columna amino.	109
5.5	Curva de calibración para la cuantificación de ETU en muestras de metanol utilizando como fase estacionaria la columna amino.	111
5.6	(a) Efecto del volumen de carga sobre la cantidad retenida y (b) Efecto de la concentración de ETU en el influente sobre la cantidad retenida. (PD) retención total en el polímero dopado, (PD-PB) retención específica en el polímero dopado, (PB) retención en el blanco.	141
5.7	(a) Efecto del volumen de carga sobre la cantidad retenida y (b) Efecto de la concentración de ETU en el influente sobre la cantidad retenida. (PD) retención total en el polímero dopado, (PB) retención en el blanco.	147
5.8	Frentes de migración de la ETU en los cartuchos empacados con el PIM y el polímero blanco 12. Concentración de ETU en el influente: (a) $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$.	153
5.9	Frentes de migración obtenidos al variar la concentración de ETU en el influente: (a) PIM, (b) Blanco.	156
5.10	Cantidad de ETU adsorbida por el PIM y el polímero blanco (BCO) en condiciones de saturación del cartucho (Q_{eq}), para diferentes concentraciones de ETU en el influente (C_0). La curva PIM-BCO representa la cantidad de ETU retenida específicamente en el polímero impreso.	160

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
5.11	Perfiles de elución de la ETU retenida en el cartucho de PIM cargado a saturación. Eluyente: acetato de amonio 0.5 M en metanol, a flujo de 0.6 mL min ⁻¹ . Concentración de ETU en la carga: (a) 0.05 µg mL ⁻¹ , (b) 0.25 µg mL ⁻¹ , (c) 0.4 µg mL ⁻¹ .	162
5.12	Isotermas de adsorción de (a) Tiabendazol, (b) Carbendazim y (c) Benomil en el PIM sintetizado.	171
5.13	Estructuras químicas de los bencimidazoles estudiados.	173
5.14	Isoterma de adsorción para TBZ representada conforme al modelo de Langmuir.	174
5.15	Perfiles de elución obtenidos para: (a) TBZ, (b) CBZ y (c) BEN. Carga de 1 µg de bencimidazol disuelto en 1 mL (1 mg L ⁻¹) o en 100 mL (10 µg L ⁻¹) de agua, lavado con 5 mL de acetonitrilo. Cartucho empacado con 300 mg de PIM.	180
5.16	Cromatogramas obtenidos del análisis de muestras: a. Agua grado reactivo sin fortificar. b. Agua grado reactivo fortificada con: (1) Carbendazim, (2) Tiabendazol, y (3) Benomil a 10 µg L ⁻¹ cada uno. Cada muestra (100 mL) se preconcentró y purificó en una columna de PIM, se transfirió en línea a una columna analítica C ₁₈ y se separó mediante un gradiente de elución. Detección UV a varias longitudes de onda mediante un detector de arreglo de diodos.	183
5.17	Cromatograma obtenido del análisis de una muestra real de agua de río fortificada con: (1) Carbendazim, (2) Tiabendazol, y (3) Benomil a 10 µg L ⁻¹ cada uno. La muestra (100 mL) se preconcentró y purificó en una columna de PIM, se transfirió en línea a una columna analítica C ₁₈ y se separó mediante un gradiente de elución. Detección UV a varias longitudes de onda mediante un detector de arreglo de diodos.	185

LISTA DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
3.1	Métodos de polimerización para la obtención de PIM's.	17
3.2	Monómeros más comúnmente empleados en la obtención de PIM's.	30
3.3	Entrecruzantes empleados en la síntesis de PIM's.	32
3.4	Modelos de isotermas de adsorción empleados en la caracterización de los puntos de unión de los polímeros generados por impresión molecular.	44
3.5	Propiedades físicas y químicas del maneb, zineb y mancozeb.	59
3.6	Propiedades de la etiléntiurea.	62
3.7	Metodologías analíticas para la determinación de etiléntiurea.	68
3.8	Propiedades físicas y químicas de los bencimidazoles en estudio.	70
3.9	Metodologías analíticas utilizadas en la determinación de bencimidazoles.	73
4.1	Condiciones cromatográficas para la determinación de etiléntiurea.	80
4.2	Condiciones cromatográficas para la determinación de bencimidazoles.	82
4.3	Programa de gradiente empleado para la separación de bencimidazoles.	82
4.4	Condiciones de síntesis para la obtención de los materiales impresos con AMA como monómero funcional.	84
4.5	Condiciones de síntesis para la obtención de los materiales impresos con mezclas de monómeros.	85
4.6	Condiciones de síntesis para la obtención de los materiales impresos variando proporción de reactivos.	86
4.7	Condiciones de síntesis para la obtención de los materiales impresos variando la cantidad de porógeno.	87

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
4.8	Condiciones de variación del volumen en la etapa de carga.	89
4.9	Condiciones de variación de la concentración de ETU.	89
4.10	Condiciones de síntesis de los polímeros con AMA. Variación del volumen de porógeno.	92
4.11	Condiciones de síntesis del polímero impreso para bencimidazoles.	93
5.1	Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de ETU en muestras acuosas utilizando una columna con fase estacionaria polimérica.	103
5.2	Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de ETU en muestras acuosas utilizando una columna de carbón grafitizado.	105
5.3	Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de ETU en muestras de acetonitrilo utilizando la columna amino.	108
5.4	Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de ETU en muestras de metanol utilizando la columna amino.	110
5.5	Parámetros de la prueba de hipótesis sobre el valor de la ordenada. Nivel de confianza $\alpha= 0.05$.	112
5.6	Parámetros de la prueba de hipótesis sobre el valor de la pendiente. Nivel de confianza $\alpha= 0.05$.	113
5.7	Coeficiente de variabilidad del área de pico para una concentración de 5 mg L^{-1} de etiléntiourea ($n= 3$).	114
5.8	Valores de exactitud para una concentración de 5 mg L^{-1} de etiléntiourea ($n= 3$).	115
5.9	Disoluciones y disolventes ensayados en los experimentos de EFS para la evaluación de los polímeros sintetizados.	117
5.10	Condiciones de EFS utilizadas en la evaluación del polímero 6 y su blanco.	122
5.11	Condiciones para eliminar la retención no específica de ETU en el polímero 7 y su blanco.	124

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
5.12	Cantidad total y porcentaje de ETU recuperada en los efluentes de carga y lavado del polímero 7 y su blanco.	125
5.13	Valores de recobro de ETU para diferentes disoluciones utilizadas en la etapa de elución de los cartuchos empacados con el polímero 7 y su blanco.	126
5.14	Repetibilidad del recobro de ETU en la etapa de elución utilizando dos disoluciones de diferente composición (polímero 7 y su blanco).	128
5.15	Protocolo de EFS establecido para la evaluación de los polímeros sintetizados a partir de acrilamida y 4-vinilpiridina.	128
5.16	Relaciones estequiométricas ETU-ACA-4VP-EGDMA utilizadas en la síntesis de los polímeros 7-10.	130
5.17	Cantidad total (μg) y porcentaje de ETU recuperada en los efluentes de carga y lavado de los cartuchos empacados con los polímeros 7-10.	130
5.18	Valores de recobro de ETU en la etapa de elución de los cartuchos empacados con los polímeros 7-10.	132
5.19	Diferencias composicionales de los polímeros mixtos de acrilamida y 4-vinilpiridina comparados.	134
5.20	Cantidades (μg) y porcentajes de ETU recuperada en los efluentes de carga y lavado de los cartuchos empacados con polímeros mixtos ACA-4VP.	134
5.21	Valores de recobro de ETU en la etapa de elución de los cartuchos empacados con polímeros mixtos ACA-4VP.	136
5.22	Cantidad (μg) y porcentaje de ETU determinada en los efluentes de carga y lavado para diferentes volúmenes de carga.	138
5.23	Valores de recobro de ETU obtenidos en la etapa de elución. Los cartuchos del polímero 11 y su blanco fueron cargados con 1.3 μg de ETU disuelta en volúmenes crecientes de acetonitrilo.	145

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁGINA
5.24	Valores de recobro de ETU obtenidos en la etapa de elución. Los cartuchos del polímero 12 y su blanco fueron cargados con 1.3 µg de ETU disuelta en volúmenes crecientes de acetonitrilo.	149
5.25	Cantidades retenidas a saturación del cartucho de PIM con disoluciones de ETU de diferente concentración en acetonitrilo. Cantidades recuperadas en la elución (µg) y % de Recobro.	163
5.26	Desempeño de los materiales sintetizados en los ensayos de EFSIM fuera de línea. % de tiabendazol (TBZ) recuperado en los efluentes de la carga, el lavado y la elución.	168
5.27	Parámetros derivados del ajuste de los datos experimentales mediante la ecuación de la isoterma de Langmuir-Freundlich.	172
5.28	Parámetros derivados del ajuste de los datos experimentales mediante la ecuación de la isoterma de Langmuir para tiabendazol.	175
5.29	Coefficiente de distribución entre la disolución acuosa y el PIM sintetizado determinado para TBZ.	176
5.30	Longitud de onda de detección y tiempo de elución del máximo para cada bencimidazol.	181
5.31	Tabla de tiempo, operaciones y parámetros experimentales del método EFSIM-CLAR-UV en línea para la determinación de tres bencimidazoles en muestras acuosas.	182

ABSTRACT

The protection and care of the environment, as a matter of actual concern, have promoted the development of very selective and sensitive analytical methodologies for the detection and determination of pesticides, or their metabolites, in complex environmental matrices. Among the various proposals presented during the last years for the extraction and preconcentration of organic micropollutants from these samples, Molecularly Imprinted Polymers (MIPs) are outstanding. By comparison with other high selective adsorbents, MIPs are advantageous because they are more stable and economical, so their preparation is based on reagents and materials that are easily available and of low cost. However, the development of a new MIP, with adequate properties for application in Solid Phase Extraction (SPE) processes or for sensing purposes, is not straightforward. Extensive work and multiple assays are required to optimize the conditions synthesis in order to characterize the obtained materials and to develop the appropriate protocols for the selected application.

This work describes the development and characterization of two new polymeric materials, one was molecularly imprinted with ethylthiourea, a metabolite of pesticides Maneb and Zineb, while the other was imprinted with thiabendazole, a fungicide of the benzimidazole family. The achievement of these materials represents an important contribution in the area of molecularly imprinted polymers for different reasons. The first

material demonstrated the feasibility of generating specific sites in the polymeric structure capable of recognizing very small molecules, such as ethylthiourea. In the second case, the synthesized material presented optimal properties for application as a very selective adsorbent in the SPE of benzimidazole fungicides from aqueous matrices.

The ethylthiourea imprinted polymer was obtained by bulk polymerization via free radicals using the non covalent interaction approach for imprinting. Synthesis was carried out using ethylenethiourea as template molecule, acrylamide and 4-vinylpyridine as functional monomers, ethyleneglycol dimethacrylate as cross-linker, azo-bis-isobutyronitrile as initiator agent and acetonitrile as porogen. The chromatographic characterization of the finally obtained material indicated the generation of a heterogeneous population of imprinted sites with very different bonding energies. Some sites exhibited too strong interactions with ethylthiourea, which rendered impossible the quantitative elution of the analyte in SPE experiments. However, the synthesized MIP was capable of removing and preconcentrating relatively large amounts (μg) of ethylthiourea from an organic matrix (acetonitrile) containing trace level concentrations of this compound ($\leq 50 \text{ ng mL}^{-1}$). Therefore, this material could be eventually applied as sensor of ethylthiourea in sediment, soil or biological tissue extracts.

The thiabendazole imprinted polymer was synthesized by precipitation polymerization via free radicals, using the non covalent approach for imprinting. The pre-polymerization mixture was prepared using thiabendazole as template, methacrylic acid as functional monomer and divinylbenzene (DVB) as cross-linker. Chromatographic characterization of the obtained material demonstrated that this MIP was capable of selectively rebinding

thiabendazole and other benzimidazole compounds (carbendazim and benomyl) commonly used as fungicides or anthelmintics, from aqueous solutions. Therefore, this material was used as selective sorbent for the multiresidual determination of benzimidazole compounds in water samples. The developed procedure is based on the on-line enrichment of the water sample on a MIP column and subsequent analysis of benzimidazole compounds by reversed phase HPLC-UV. This methodology has been successfully applied to the quantification of thiabendazole, carbendazim and benomyl in river water samples within a single analytical run at concentration levels below the ppb level (<1 ng mL⁻¹).

RESUMEN

El interés actual por el cuidado y protección del medio ambiente, ha impulsado el desarrollo de metodologías analíticas cada vez más sensibles y selectivas para la detección y determinación de pesticidas, o sus metabolitos, en las complejas matrices ambientales. Entre las diversas propuestas que han surgido en los últimos años para la extracción y preconcentración de microcontaminantes orgánicos en este tipo de muestras, destacan los polímeros impresos molecularmente (PIM's). Con respecto a otros adsorbentes de alta selectividad, los PIM's presentan la ventaja de ser muy estables y económicos, pues los reactivos y materiales requeridos para su preparación son fácilmente accesibles y de bajo costo. Sin embargo, el desarrollo de un nuevo PIM, con propiedades adecuadas para su uso en sistemas de extracción en fase sólida (EFS) o como sensor, implica un extenso y arduo trabajo para la optimización del proceso de síntesis, la caracterización del material obtenido y la puesta a punto de condiciones óptimas para la aplicación deseada.

En este trabajo se describe el desarrollo y caracterización de dos nuevos materiales poliméricos, uno impreso molecularmente con etiléntiourea, metabolito de los pesticidas Maneb y Zineb, el otro impreso con el fungicida tiabendazol. La obtención de estos materiales representa una contribución importante en el área de los polímeros impresos por diferentes razones. Con el primer material se demostró que es posible generar en la

estructura polimérica sitios de reconocimiento específico para moléculas muy pequeñas, como lo es la etiléntiourea. En el segundo caso se logró obtener un material con óptimas propiedades para su aplicación como adsorbente de muy alta selectividad en la EFS de algunos bencimidazoles a partir de matrices acuosas.

El polímero impreso con etiléntiourea se obtuvo mediante el método de polimerización en bloque vía radicales libres, utilizando el formato de impresión por interacciones no covalentes. Este material fue sintetizado utilizando etiléntiourea como molécula plantilla, acrilamida y 4-vinilpiridina como monómeros funcionales, etilenglicol dimetacrilato como agente de entrecruzamiento, azo-bis-isobutironitrilo como agente iniciador y acetonitrilo como disolvente porógeno. La caracterización cromatográfica del material finalmente obtenido indicó la presencia de sitios impresos heterogéneos con muy diferentes energías de enlace; algunos sitios exhibieron interacciones muy fuertes con la etiléntiourea, lo cual impidió la elución cuantitativa de este analito en experimentos de extracción en fase sólida. Sin embargo, el PIM sintetizado fue capaz de remover y preconcentrar cantidades relativamente importantes de etiléntiourea (μg) a partir de una matriz orgánica (acetonitrilo) donde la concentración del analito era del orden de trazas ($\leq 50 \text{ ng mL}^{-1}$). Por ello, este material podría tener aplicación como sensor de etiléntiourea en extractos de sedimentos, suelos o tejido biológico.

El polímero impreso con tiabendazol se sintetizó por el método de polimerización por precipitación vía radicales libres, utilizando el formato de impresión por interacciones no covalentes. La mezcla de prepolimerización se preparó usando tiabendazol como molécula plantilla, ácido metacrílico como monómero funcional y divinilbenceno como

agente de entrecruzamiento. La caracterización cromatográfica del material obtenido mostró que este PIM era capaz de reenlazar selectivamente tiabendazol y otros bencimidazoles (carbendazim y benomil) comúnmente utilizados como fungicidas o agentes antihelmínticos, a partir de disoluciones acuosas. Debido a ello, el material fue empleado como adsorbente selectivo en la extracción de estos bencimidazoles en muestras acuosas. El procedimiento desarrollado comprende la recuperación y enriquecimiento de los analitos en una columna de EFS empacada con el PIM, su transferencia en línea al sistema cromatográfico y la subsecuente separación y análisis de los bencimidazoles mediante CLAR-UV. Este procedimiento ha sido aplicado exitosamente en la determinación simultánea de tiabendazol, carbendazim y benomil en muestras de agua de río fortificadas con los analitos a niveles de concentración del orden de las partes por billón (1 ng mL^{-1}).

I. INTRODUCCIÓN

A finales del siglo pasado se registraron grandes avances en el campo de la instrumentación analítica, los cuales condujeron al desarrollo de herramientas de análisis muy poderosas, principalmente a través del acoplamiento de las técnicas de separación y las técnicas de detección o caracterización. Surgieron así los sistemas acoplados (CG-EM, CLAR-EM, CG-FTIR, FIA-ICP, etc.) que permitieron resolver eficaz y eficientemente problemas analíticos muy variados en tiempos relativamente cortos.

Sin embargo, la capacidad de esta instrumentación no es aún suficiente para cuantificar o al menos detectar compuestos que se encuentran al nivel de trazas o ultratrazas en matrices complejas, constituidas por muchos otros compuestos químicos millones de veces más concentrados. Como ejemplo se puede mencionar a los contaminantes orgánicos en matrices ambientales, los fármacos en fluidos biológicos, algunas sustancias altamente tóxicas en tejidos de plantas y animales, etc. En estos casos, ha sido generalmente necesario efectuar largos y complicados procedimientos de preparación de muestra, para aislar, purificar y preconcentrar a la sustancia de interés previo a sus análisis por alguna técnica instrumental eficaz.

Esta paradójica disimetría entre los rudimentarios procesos de preparación de muestra y las avanzadas técnicas instrumentales de análisis, ha provocado el desarrollo de nuevas metodologías para el tratamiento previo de la muestra. En el caso de los compuestos orgánicos

en matrices líquidas, la extracción en fase sólida (EFS) ha resultado ser una alternativa excelente, que poco a poco está sustituyendo a los tradicionales y tediosos procesos de extracción líquido-líquido (ELL), y cuyas investigaciones más recientes han sido enfocadas hacia el desarrollo de materiales adsorbentes más selectivos. Entre los materiales más interesantes se encuentran los Polímeros Impresos Molecularmente (PIM's), los cuales debido a su forma de preparación, ofrecen un enlazamiento altamente selectivo hacia el analito para el cual fueron desarrollados, además de estabilidad frente a cambios de pH, fuerza iónica, temperatura y presión.

La presencia cada vez mayor de sustancias altamente tóxicas en el ambiente, como son los microcontaminantes orgánicos se ha convertido en una de las principales preocupaciones de la sociedad actual. Para limitar sus efectos y prevenir daños en la salud y vida humanas se han establecido, en la mayoría de los países, normas muy severas que limitan fuertemente las concentraciones máximas admisibles (CMA) de estas sustancias en el agua, aire o suelo. Desafortunadamente en muchos países (incluido México) estas normas no se cumplen por la gran dificultad (traducida en alto costo) que representa el análisis de algunas de estas sustancias. Tal es el caso de los pesticidas polares y de algunos de sus metabolitos, que en ocasiones resultan ser más tóxicos que la sustancia original. Un ejemplo de esto es la etiléntiurea, un metabolito del Maneb (pesticida de la familia de los etilénbisditiocarbamatos) cuyos efectos carcinógenos han sido bien documentados. El Maneb (Mancozeb o Manzate) se utiliza extensamente en los cultivos de cítricos; en el ambiente se transforma rápidamente en etiléntiurea, cuya toxicidad es más alta que la del pesticida original. Cabe mencionar que por su pequeño tamaño y alta polaridad, la etiléntiurea es sumamente difícil de extraer, aislar y

preconcentrar a partir de matrices ambientales (p. ej. aguas superficiales, suelos, etc.), tejidos biológicos, etc.

Por otro lado se sabe que algunos miembros de la familia de los bencimidazoles, agentes antihelmínticos de amplio espectro, utilizados en el tratamiento de infecciones de origen parasitario y como agentes fungicidas en el control de plagas de cultivos durante su almacenamiento y transporte, presentan efectos teratogénicos y embriotóxicos en especies animales. Debido a esto, también ha sido necesario fijar las concentraciones máximas permisibles de estos compuestos en diferentes matrices. Desafortunadamente, la presencia de interferentes de matriz hace difícil su determinación, por lo que es necesario realizar un paso de preparación de muestra previo a su análisis, con el cual se logre disminuir el efecto matriz y además se pueda preconcentrar a los analitos. La extracción líquido-líquido ha sido la técnica de preparación de muestra más comúnmente utilizada en el análisis de estos pesticidas. Sin embargo, la polaridad y los valores de pKa entre estos compuestos y sus metabolitos pueden diferir enormemente, haciendo difícil el desarrollo de un método multi-residuos, que además posea la sensibilidad adecuada para determinar estas especies en bajos niveles de concentración.

Considerando lo anterior, y para contribuir de alguna manera a resolver los graves problemas ambientales, el presente proyecto de investigación se enfocó en el desarrollo de nuevos materiales adsorbentes para la extracción en fase sólida de compuestos de interés ambiental y su aplicación en la generación de métodos analíticos simples y confiables, para la determinación de los correspondientes pesticidas (o sus metabolitos) en matrices complejas. Para este propósito se optó por explorar la síntesis de polímeros molecularmente impresos, ya que los

adsorbentes obtenidos por esta vía, además de presentar una alta selectividad, aventajan a otros materiales similares (p. ej. inmunoadsorbentes) por su gran estabilidad y su bajo costo. La sencillez, robustez y eficacia que pueden alcanzar los métodos analíticos basados en la EFS con polímeros impresos provienen fundamentalmente de las características propias del adsorbente. Estas cualidades podrían promover a futuro el uso generalizado de los PIM's en análisis ambientales de rutina.

II. OBJETIVOS

Objetivos generales:

- ✓ Sintetizar, caracterizar y evaluar nuevos materiales adsorbentes de alta selectividad con el fin de utilizarlos para la extracción en fase sólida de pesticidas en matrices acuosas ambientales. Asimismo desarrollar métodos analíticos por Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (EFS-CLAR) para la determinación de dichos compuestos a muy bajos niveles de concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$ o menores).

Objetivos particulares:

- ✓ Sintetizar y caracterizar nuevos materiales impresos para etiléntiurea.
- ✓ Evaluar el efecto de las proporciones y naturaleza de los reactivos utilizados durante la síntesis de los polímeros impresos para etiléntiurea.
- ✓ Sintetizar y caracterizar nuevos materiales impresos para bencimidazoles.
- ✓ Desarrollar una nueva metodología para la preconcentración y determinación de tiabendazol, carbendazim y benomil en niveles de concentración del orden de $\mu\text{g mL}^{-1}$ o menores en muestras acuosas, utilizando un sistema en línea de EFS-CLAR.

III. ANTECEDENTES

3.1 Polímeros impresos molecularmente (PIM's)

Durante los últimos años, los polímeros impresos molecularmente (PIM's) han sido utilizados exitosamente como adsorbentes selectivos en procedimientos de Extracción en Fase Sólida (EFSIM). Los PIM's son polímeros sintéticos entrecruzados, obtenidos mediante la copolimerización de un monómero (o monómeros) y un agente de entrecruzamiento en presencia de una molécula plantilla en el disolvente porógeno adecuado. Después de la polimerización, la plantilla es removida del arreglo poroso mediante un lavado, dejando cavidades en la matriz polimérica que le son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química. Posteriormente, cuando una muestra que contiene esta molécula es cargada en un cartucho empacado con el PIM en un procedimiento típico de Extracción en Fase Sólida, el polímero es capaz de reenlazar selectivamente al analito (o analitos de estructura muy similar), en las cavidades que fueron formadas durante el proceso de polimerización, pudiendo ser posteriormente eluido(s) libre(s) de compuestos interferentes de la matriz.⁽¹⁾

3.1.1 Síntesis de los polímeros generados por impresión molecular

La síntesis de los PIM's consta de tres etapas básicas las cuales aparecen esquematizadas en la Figura 3.1. Durante la primera etapa se ponen en contacto el analito plantilla y el monómero funcional, dando lugar a la formación del complejo de pre-polimerización. Es importante destacar

que las propiedades del copolímero obtenido dependen en gran medida de la estabilidad y del tipo de enlace formado en esta etapa. En la segunda etapa se lleva a cabo el proceso de copolimerización, el cual generalmente sigue un mecanismo de propagación vía radicales libres y puede ser inducido tanto térmica como fotoquímicamente. Sin embargo, todos los tipos de polimerización (vía radicales, catiónica, aniónica y de condensación) pueden ser utilizados para la impresión molecular. El único requisito es que la polimerización pueda proceder satisfactoriamente bajo las condiciones donde todos los componentes (plantilla, monómeros, agente de entrecruzamiento y complejo de prepolimerización en el caso de la impresión molecular no covalente) permanezcan intactos. Por último, en la tercera etapa se elimina el analito plantilla de la matriz polimérica, liberando cavidades que son capaces de reconocerlo selectivamente.⁽¹⁾

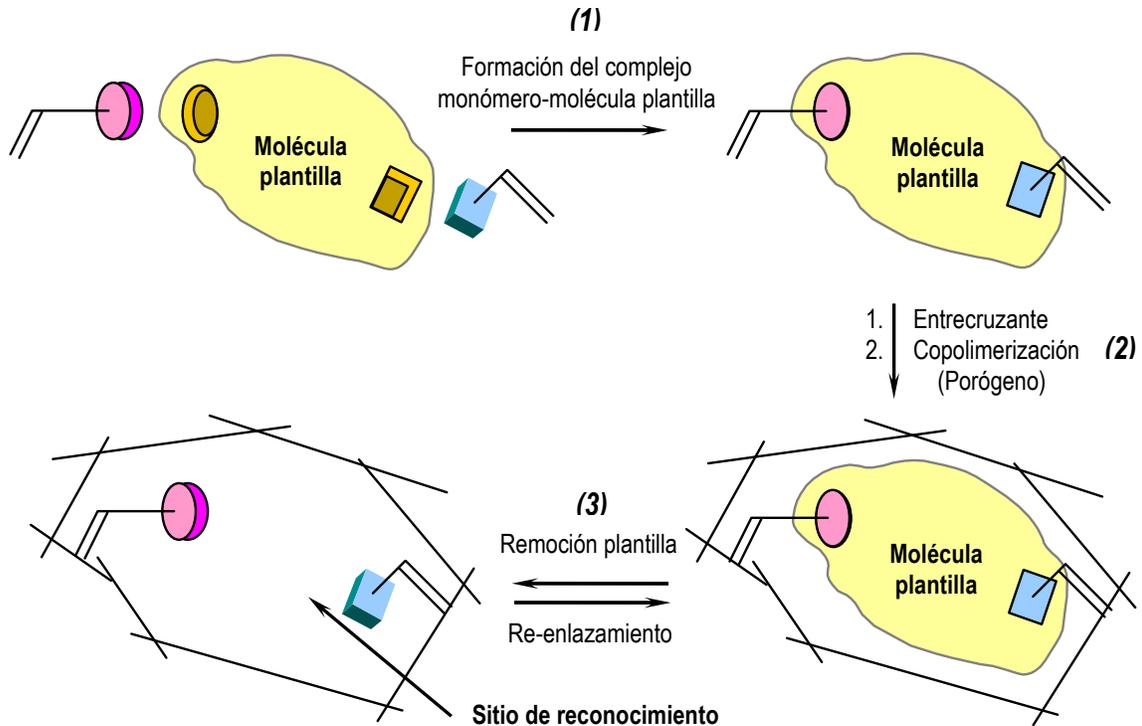


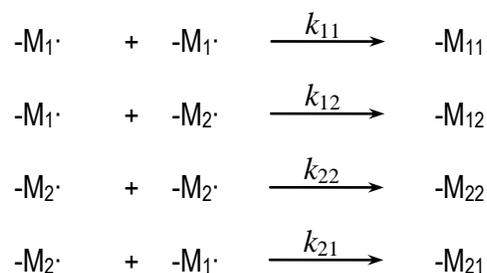
Figura 3.1. Etapas implicadas en la síntesis de los polímeros impresos molecularmente.

3.1.1.1 Copolimerización

Muchos de los polímeros impresos a la fecha son copolímeros, es decir, materiales producidos mediante la incorporación de al menos dos monómeros en el polímero. En la polimerización de divinil y monovinilmonómeros inicialmente se forman cadenas primarias, en las cuales los dobles enlaces terminales participan en los procesos de entrecruzamiento para generar el copolímero. Dependiendo de la reactividad relativa de los monómeros se producen diferentes tipos de polímero. En el caso de polímeros de vinilo lineales existen:

- ☞ Copolímeros estadísticos, formados cuando los monómeros constituyen la cadena en un arreglo estadístico.
- ☞ Copolímeros alternantes, cuando existe una tendencia de reacción en la cual los monómeros reaccionan el uno con el otro.
- ☞ Copolímeros en bloque, donde en forma contraria a los alternantes los monómeros tienden a reaccionar con ellos mismos.

Con la finalidad de predecir la formación de las estructuras poliméricas, la reactividad relativa de los monómeros debe ser estimada. Para este propósito la cinética de reacción correspondiente debe ser definida:



Donde k_{11} , k_{22} y k_{12} , k_{21} son las constantes de velocidad para las correspondientes reacciones de propagación consigo mismo y de propagación cruzada. Las relaciones de reactividad, $r_1 = k_{11}/k_{12}$ y $r_2 = k_{22}/k_{21}$, dan información acerca de la tendencia de los monómeros para formar bloques o estructuras alternantes cuando copolimerizan con otro monómero dado. Estas cantidades proporcionan la composición del polímero, si $r_1 = r_2 = 1$, la copolimerización es considerada ideal y los monómeros serán incorporados al azar en el polímero. Cuando tanto r_1 y r_2 son grandes, una tendencia hacia la formación del polímero en bloque es la esperada, mientras que cuando los valores son pequeños, una tendencia alternante será la observada. Para evitar estas estructuras el producto $r_1 r_2$ deberá ser cercano a 1.⁽²⁾

3.1.1.2 Tacticidad

Si los sustituyentes de uno de los carbonos vinílicos son diferentes entre sí, la polimerización producirá centros pseudoquirales a través de la cadena polimérica. Dependiendo de la estereoquímica de cada centro, el polímero puede ser: **Isotáctico** si las configuraciones están del mismo lado de la cadena o **sindiotáctico** si se encuentran en forma alternante. Si no existe una configuración que se repita la estructura es **atáctica**. La estereoregularidad tiene la mayor influencia en las propiedades físicas y químicas del polímero. Para el caso del polimetacrilato de metilo (p-MAM), la flexibilidad de la cadena polimérica en disolución disminuye en el orden sindiotáctico > atáctico > isotáctico, mientras que la temperatura de transición vítrea varía en la dirección opuesta. En la impresión molecular, un punto importante es si la plantilla es capaz de inducir una tacticidad preferente que eventualmente influya sobre las propiedades de reconocimiento molecular.⁽²⁾

3.1.1.3 Polimerización vía radicales libres

Los dobles enlaces de muchos compuestos vinilideno de estructura general $\text{CH}_2=\text{CR}_1\text{R}_2$, pueden reaccionar con radicales libres, cationes o aniones, formando especies transientes con un tiempo de vida lo suficientemente grande como para adicionar en su estructura a otra molécula, la cual debe contener al menos un doble enlace. Esto genera un centro activo nuevo y la repetición de este proceso de adición provoca la formación del polímero. El crecimiento de la cadena polimérica es detenida mediante varios mecanismos de terminación.

Los pasos clave de una polimerización son:

- (i) Iniciación,
- (ii) Propagación y
- (iii) Terminación.

i. Iniciación

Un agente de iniciación, generalmente un compuesto azo o peróxido, es sometido a un tratamiento térmico o fotoquímico con el cual es posible generar radicales libres. Este paso puede hacerse a diferentes temperaturas por lo que es posible evitar problemas de labilidad térmica o solubilidad de la plantilla a imprimir. Posteriormente, cada radical libre puede reaccionar con el monómero olefínico correspondiente (Fig. 3.2).



Figura 3.2. Mecanismo de iniciación. (a) Homólisis del agente de iniciación. (b) Generación del radical olefínico.

ii. Propagación

Una cadena guía es formada cuando un radical libre y una unidad de monómero nueva reaccionan y la propagación ocurre mediante la adición de monómeros nuevos para producir cadenas poliméricas lineales primarias:



El avance de la reacción puede ser monitoreado a través de la desaparición del monómero.

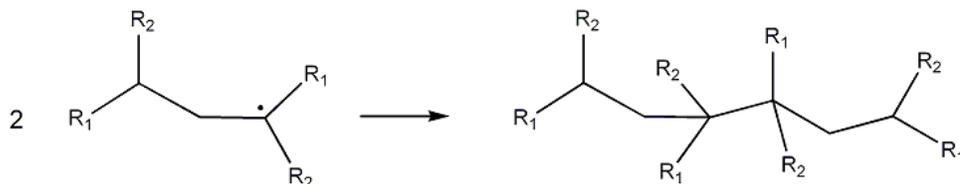
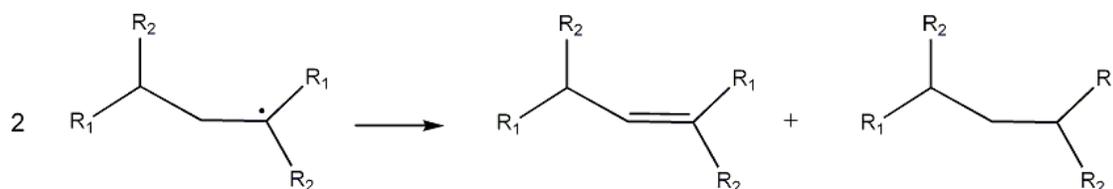
iii. Terminación

La propagación continúa hasta que el radical libre reacciona y forma un enlace covalente inactivo, con lo que se alcanza la etapa de terminación de la polimerización. Esto puede ocurrir cuando la concentración de radicales libres es elevada o cuando se encuentran presentes agentes de transferencia de cadena. Los mecanismos de terminación que pueden ocurrir son a partir de:

- a. La interacción de dos cadenas activas terminales,
- b. La transferencia del centro activo a otra molécula, la cual puede ser disolvente, iniciador, monómero o plantilla
- c. La interacción con impurezas (por ejemplo oxígeno) o inhibidores.

a. Interacción de dos cadenas activas terminales

Esta forma es la más importante y puede ocurrir mediante dos mecanismos: por combinación y por desproporción (Fig. 3.3).

Combinación**Desproporción****Figura 3.3.** Mecanismos de combinación y desproporción.

En el caso de metilmetaacrilato (MMA) el mecanismo por combinación es el más común cuando la temperatura de polimerización es menor que 330 K, mientras que el de desproporción predomina por encima de esta temperatura.

b. Transferencia del centro activo

En la polimerización vía radicales libres este tipo de transferencia es el mecanismo de terminación menos esperado, ya que la cadena polimérica creciente puede transferir el radical a otras especies, provocando la terminación de una cadena pero generando un nuevo radical que

reaccionará posteriormente. Los tipos de transferencia del centro activo que pueden ocurrir son los siguientes:

- ▣ Transferencia al monómero: este tipo de transferencia involucra la abstracción de un hidrógeno radical del monómero.

- ▣ Transferencia al iniciador: este tipo de mecanismo ocurre cuando hay transferencia de radicales al iniciador. Los peróxidos orgánicos son particularmente susceptibles a este tipo de transferencia, mientras que los iniciadores azo no lo presentan.

- ▣ Transferencia al polímero: provoca la ramificación del polímero y ocurre en la copolimerización del MMA y el etilenglicol dimetacrilato (EGDMA).

- ▣ Transferencia al disolvente: numerosos disolventes son reactivos hacia los radicales libres. Los disolventes halogenados pertenecen a este grupo y el CCl_4 es particularmente reactivo. Estos reaccionan con la cadena polimérica creciente mediante la abstracción de un radical cloro y el radical disolvente también puede iniciar una nueva cadena o terminar el crecimiento de otra.

- ▣ Transferencia a la plantilla: muchas moléculas plantillas no son compatibles con las reacciones de radicales libres ya que se comportan como unidades de monómero o pueden ser capaces de transferir radicales hacia el polímero creciente o el disolvente.

c. Inhibidores

Algunos compuestos reaccionan con los radicales iniciales para producir especies no reactivas, a este proceso se le conoce como inhibición. Un agente de inhibición para polimerizaciones de vinilos es la hidroquinona, la cual reacciona transfiriendo dos radicales hidrógeno hacia dos radicales iniciadores, produciendo quinona y el iniciador inactivo (Fig. 3.4).

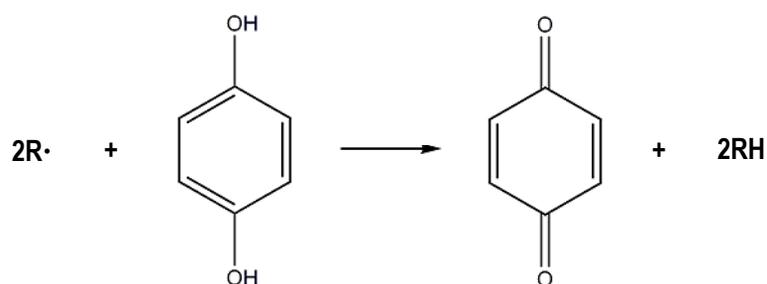


Figura 3.4. Mecanismo de inhibición por efecto de hidroquinona.

La presencia de inhibidores provoca un retraso en el tiempo de polimerización y una disminución de la concentración del iniciador.

Con la finalidad de prevenir la polimerización de los monómeros, a menudo son almacenados en presencia de un inhibidor; la cantidad y tipo de éste puede variar dependiendo del monómero y del fabricante.⁽²⁾

3.1.1.4 Formatos de polimerización para la obtención de PIM's

A la fecha, se han sintetizado materiales impresos utilizando diversos métodos de polimerización; cada forma de obtención influye sobre la morfología del polímero y debido a esto, es posible generar partículas esféricas mono o polidispersas, partículas de tamaño de poro controlado, agregados aleatorios de partículas, bloques, etc.⁽³⁾

En la producción de polímeros impresos convencionales, monolíticos y esféricos, se utiliza una gran cantidad de entrecruzante. En consecuencia, la fracción de monómeros totales en el medio de reacción puede oscilar entre el 20 y el 50% (v/v) con respecto al disolvente. La separación de fases ocurre cuando se inicia la formación de gel cuando se tiene al menos un entrecruzamiento en la cadena polimérica. Los polímeros impresos con un pequeño intervalo de porosidades pueden ser preparados mediante el control del punto de separación de fase, el cual depende de la naturaleza y del volumen de porógeno, y de la cantidad de entrecruzante utilizado. En los sistemas de reacción más diluidos, las cadenas de polímero crecientes no son capaces de ocupar el volumen total de la mezcla, lo que ocasiona la dispersión de las partículas del macrogel en el disolvente.⁽³⁾

En la Tabla 3.1 se presentan algunos de los métodos de polimerización reportados en la bibliografía.

Tabla 3.1. Métodos de polimerización para la obtención de PIM's.⁽³⁾

Método de polimerización	Morfología
Polimerización en bloque	Agregados aleatorios de partículas irregulares (después de triturar y tamizar)
Precipitación	Partículas esféricas polidispersas
Suspensión en agua	Partículas esféricas polidispersas
Suspensión en perfluorocarbono	Partículas esféricas polidispersas
Polimerización en dos etapas	Partículas esféricas monodispersas
En columna (por dispersión)	Agregados aleatorios (sin estabilizantes) Partículas esféricas monodispersas (con estabilizantes)
En columna (bloque)	Monolito (bloque)
Polimerización sobre superficie de látex	Partículas esféricas monodispersas
Polimerización en partículas de sílice	Partículas esféricas monodispersas de porosidad controlada

Es importante mencionar que el método de polimerización también puede afectar el reconocimiento de los analitos por parte del polímero. En un trabajo de polímeros impresos con propazina obtenidos mediante dos formas de polimerización, en bloque y por precipitación, se demostró la variación de las propiedades de reconocimiento (afinidad, capacidad, homogeneidad y selectividad) de los materiales obtenidos.⁽⁴⁾ En otro estudio, Pérez-Moral y Mayes⁽⁵⁾ demostraron la influencia del método de polimerización en el reconocimiento de propanolol (analito-plantilla). Los procedimientos empleados por estos autores fueron: la polimerización en

bloque, por suspensión, por precipitación y en emulsiones de tolueno y agua. El máximo reconocimiento se alcanzó cuando la muestra se cargó en tolueno empleando el polímero obtenido por precipitación.

En las siguientes secciones se describen los métodos de polimerización en bloque y por precipitación, ya que estos dos protocolos de síntesis fueron utilizados en la obtención de los polímeros impresos desarrollados en este trabajo de investigación.

3.1.1.4.1 Polímeros en bloque

Generalmente los PIM's han sido (y continúan siendo) preparados como monolitos mediante la polimerización en bloque de mezclas de monómeros vinílicos con iniciación por vía radicales libres. La obtención del material en muchos casos se realiza utilizando una relación 3:4 v/v de unidades polimerizantes totales-porógeno. Una vez obtenido el polímero, es necesario someterlo a un proceso de molienda y en algunos casos a uno de tamizado, con la finalidad de fraccionarlo por tamaño de partícula. Debido a estos procesos, el PIM obtenido mediante esta técnica presenta bajos rendimientos y se encuentra constituido por partículas irregulares. Estas partículas a menudo muestran buena selectividad y alta afinidad por la plantilla utilizada, pero también presentan baja capacidad y difícil accesibilidad hacia los sitios de impresión por la molécula-plantilla⁽⁵⁾. No obstante, estos materiales han sido ampliamente utilizados en experimentos de Extracción en Fase Sólida (EFS), Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) y Electrochromatografía Capilar (ECC).⁽⁶⁻⁷⁾

3.1.1.4.2 Polimerización por precipitación

La impresión molecular de esferas de microgel es una técnica basada en la polimerización por precipitación de los monómeros funcionales y el agente de entrecruzamiento en presencia de la molécula plantilla, involucra la obtención del material impreso en una disolución diluida (<5%, p/v monómeros/porógeno).⁽⁸⁾ Debido a que no se utilizan componentes interferentes como surfactantes o estabilizantes, las microesferas obtenidas del PIM son uniformes y fáciles de manejar; por ello es viable realizar una modificación post-impresión mediante la introducción de una funcionalidad secundaria. Por otro lado, la mejor accesibilidad hacia los sitios específicos de enlace que presentan los PIM's obtenidos mediante esta técnica, es sin lugar a dudas una ventaja al compararlos con los PIM's en bloque.⁽⁹⁻¹⁰⁾

3.1.1.5 Formatos de impresión molecular

Existen tres métodos para la introducción de la funcionalidad en los sitios de reconocimiento de los polímeros impresos: vía interacciones no covalentes, covalente y semicovalente.

3.1.1.5.1 Vía no covalente

Este procedimiento de síntesis fue introducido por Arshady y Mosbach⁽¹¹⁾ y está basado en la formación de interacciones no covalentes relativamente débiles, como los puentes de hidrógeno, los pares iónicos y las interacciones dipolo-dipolo, entre los monómeros y el analito plantilla antes de la polimerización. Este procedimiento es el más utilizado para la preparación de PIM's debido a su simplicidad experimental (solamente es necesario mezclar la plantilla y los monómeros en el disolvente adecuado) y a la disponibilidad de una amplia variedad de monómeros capaces de

interaccionar con casi cualquier tipo de plantilla. Sin embargo, este tipo de preparación presenta algunos inconvenientes ya que el paso de prepolimerización es un proceso no bien definido, en el cual se forman complejos plantilla-monomero de diferente estequiometría, que a su vez generan diferentes sitios de enlace. Adicionalmente, ya que las interacciones plantilla-monomero están gobernadas por un equilibrio, es necesario utilizar una cantidad considerable de monómero con la finalidad de desplazarlo hacia la formación del complejo plantilla-monomero. Como consecuencia, el exceso de monómero libre, incorporado al azar en la matriz polimérica, genera la formación de sitios de enlace no selectivos. En este sentido, algunos autores han reportado dificultades en la determinación cromatográfica de moléculas plantilla después del EFSIM, como lo es la coextracción de algunos componentes de la matriz⁽¹²⁻¹⁵⁾, o la pérdida del desempeño del PIM atribuida a compuestos de la matriz que quedan fuertemente enlazados en el polímero después de haberlo utilizado.⁽¹⁶⁻¹⁷⁾

3.1.1.5.2 Vía covalente

Este procedimiento fue introducido por Wulff y Sarchan⁽¹⁸⁾ e involucra la formación de enlaces covalentes reversibles entre la plantilla y los monómeros antes de la polimerización. Posteriormente la molécula plantilla es removida del polímero mediante la ruptura de los enlaces covalentes correspondientes, los cuales volverán a formarse para reenlazar al analito. Es evidente que la alta estabilidad y definición de las interacciones plantilla-monomero, generadas por los enlaces covalentes antes de la polimerización, provocarán una población de sitios de enlace más homogéneos, minimizando la existencia de sitios no específicos. Sin embargo esta vía de obtención de PIM's algunas veces es restrictiva, ya que no es fácil el diseño de un complejo apropiado plantilla-monomero, en el cual la formación y la ruptura del enlace covalente

sean reversibles bajo condiciones suaves. Solamente un número limitado de compuestos, tales como alcoholes (dioles), aldehídos, cetonas, aminas y ácidos carboxílicos, pueden ser impresos mediante esta técnica.

3.1.1.5.3 Vía semicovalente

Esta forma de obtención de polímeros impresos, atribuida a Whitcombe y colaboradores⁽¹⁹⁾, ofrece una alternativa intermedia en la cual la plantilla es enlazada covalentemente al monómero funcional, como en la forma covalente, pero el re-enlazamiento posterior de la plantilla está basado únicamente en interacciones no covalentes. Al realizar el proceso de impresión mediante esta técnica es posible obtener sitios con afinidad de re-enlazamiento más uniformes⁽¹⁹⁾, y como este re-enlazamiento es llevado a cabo por interacciones no covalentes, no presenta problemas de restricción cinética excepto cuando se trata de la difusión de la molécula-plantilla.⁽²⁰⁾

Esta metodología se ha aplicado con éxito en la síntesis de polímeros impresos capaces de reconocer, entre otros muchos compuestos, nandrolona⁽³⁾, propofol⁽²¹⁾, bisfenol A⁽³⁾, testosterona⁽²²⁾, 4-nitrofenol⁽²³⁾ y esteroides.⁽²⁴⁾

3.1.1.6 Optimización de la síntesis de PIM's

Entre los parámetros a optimizar en la síntesis de los polímeros generados por impresión molecular se encuentran: la naturaleza y cantidad del monómero, del iniciador, del entrecruzante y del porógeno, la forma de iniciación de la polimerización y la metodología de producción del polímero.^(2, 25-26)

Debido al elevado número de variables que pueden influir en la síntesis de los polímeros impresos y en su posterior aplicación, la optimización es considerablemente compleja. En la actualidad se han desarrollado tres tipos de aproximaciones para facilitar dicha optimización: el empleo de mini-PIM's, la utilización de métodos quimiométricos y el estudio de la dinámica molecular de la interacción del analito plantilla con diferentes polímeros modelados previamente.

3.1.1.6.1 Mini-PIM's

El empleo de mini-PIM's fue desarrollado por los grupos de Takeuchi⁽²⁷⁾ y Sellergren⁽²⁸⁾. En esta técnica se utiliza un dispensador automático de disoluciones, que proporciona volúmenes pequeños de cada uno de los reactivos que intervienen en la polimerización, y se aplica una variación sistemática en la composición de las mezclas de reacción.

Después de la extracción exhaustiva del analito plantilla mediante lavados repetidos, se realizan algunas pruebas para evaluar el funcionamiento de los diferentes materiales obtenidos. Posteriormente, se sintetizan cantidades mayores de los polímeros que presentaron los mejores grados de reconocimiento para llevar a cabo una evaluación más detallada. La preparación manual de las diferentes mezclas de polimerización, aunque puede llevarse a cabo, limita considerablemente el número de polímeros a evaluar.

Sin embargo, el elevado número de posibles combinaciones de las diferentes variables a evaluar limita considerablemente el número de parámetros que se pueden optimizar simultáneamente.⁽¹⁾

3.1.1.6.2 Métodos quimiométricos

Por el contrario, el empleo de métodos quimiométricos permite la optimización de un elevado número de variables, ya que se genera una matriz multidimensional en la que se varían todos los parámetros a evaluar durante la optimización y donde solamente se eligen unos pocos experimentos representativos. El análisis multivariante de los resultados obtenidos durante la caracterización de los polímeros seleccionados, permite identificar y obtener las superficies de respuesta, pudiendo predecir a partir de éstas el procedimiento óptimo para la obtención del polímero impreso.⁽¹⁾

3.1.1.6.3 Modelación molecular

La modelación molecular de los PIM's permite evaluar un número elevado de posibles polímeros impresos sin tener que sintetizarlos en el laboratorio. Esta técnica se basa en el estudio de la fuerza de los enlaces que se formarían entre el analito plantilla y los monómeros funcionales bajo diferentes condiciones, simulando los diferentes disolventes empleados durante la polimerización.

De esta forma, el empleo de modelos de mecánica molecular es capaz de predecir el comportamiento de diferentes polímeros, sintetizándose únicamente aquellos para los que se ha establecido un enlace lo suficientemente fuerte en los diferentes medios de polimerización. La comparación de los resultados obtenidos con los predichos por la modelación molecular generalmente es satisfactoria.^(1, 29-30)

3.1.1.7 Monómeros funcionales

La selección del monómero más adecuado se debe realizar en función de las características y grupos funcionales del analito con el que se pretende formar un complejo de pre-polimerización estable. Además, es deseable que entre el analito y el monómero funcional se den interacciones complementarias que aumenten la afinidad y la selectividad de las cavidades generadas.⁽³¹⁾

3.1.1.7.1 Impresión covalente

En esta vía de impresión los ésteres y amidas de ácido acrílico o metacrílico son a menudo utilizados como monómeros funcionales.⁽³²⁾

a. Ésteres de ácidos carbónicos

Los ésteres de ácidos carbónicos son sintetizados con ácido borónico y compuestos cis-1,2 ó cis-1,3-diol. Su formación y disociación son procesos rápidos y fáciles. Poseen estructuras cíclicas de cinco miembros, las cuales son lo suficientemente rígidas como para fijar los conjugados covalentes en una conformación deseada, lo que permite lograr una impresión molecular efectiva. Después de la polimerización, los enlaces son destruidos mediante hidrólisis, dejando los grupos borónicos libres y ordenados adecuadamente. Estos conjugados son especialmente utilizados para la impresión molecular de carbohidratos y sus derivados que posean grupos cis-diol. Como es de esperarse, la impresión molecular es todavía más efectiva cuando las plantillas de carbohidrato tienen dos o más estructuras cis-diol.⁽³³⁾

b. Ésteres de ácidos carboxílicos

Diferentes ácidos carboxílicos han sido impresos por Shea y colaboradores⁽³²⁻³³⁾ utilizando interacciones de ésteres carboxílicos. Después de la remoción exitosa de la molécula plantilla, el re-enlazamiento es llevado a cabo mediante una reacción de un cloruro de carbonilo con un alcohol, o mediante el desplazamiento de bromuro con un anión carboxilato. La impresión molecular covalente de ácidos carboxílicos se ha visto limitada debido a una cinética de re-enlazamiento lenta y a la necesidad de activar intermediarios.

c. Ésteres de carbonato

Los ésteres de carbonato son menos estables que los ésteres de ácidos carboxílicos y pueden ser hidrolizados completamente mediante una reacción con hidróxido de sodio en metanol. En los polímeros impresos molecularmente, los residuos OH quedan localizados en una posición apropiada de los sitios de enlace. En sentido estricto, el re-enlazamiento del analito debería ocurrir a través de la formación del éster de carbonato original. Sin embargo no es muy utilizado ya que es un proceso de cinética lenta, en el que además es necesario activar el grupo carbonato (como por ejemplo formando el cloruro de acilo correspondiente) en el compuesto plantilla utilizado, con lo cual, se restringe su aplicación. De acuerdo con esto, lo más común para el re-enlazamiento del analito es a partir de una interacción de puente de hidrógeno con el grupo OH del polímero.⁽³³⁾

d. Acetales y cetales

Moléculas tipo cetona y aldehído se hacen reaccionar con compuestos 1,3-diol. Los productos generados, cetales y acetales, son utilizados como monómeros funcionales.⁽³³⁾

e. Bases de Schiff

El uso de bases de Schiff es un método utilizado para la impresión molecular de aminas y de aldehídos, la reacción es completamente reversible sin ningún paso adicional de activación y procede de manera cuantitativa⁽³³⁾. Aminoácidos⁽³⁴⁻³⁵⁾, mono y di-aldehídos⁽³⁶⁻³⁷⁾ han sido impresos mediante esta técnica. Sin embargo el re-enlazamiento con el polímero mediante la reformación del enlace covalente es muy lenta, limitando el uso de estos polímeros en casos como el de la cromatografía.

f. Ésteres de boronato

La vía covalente más común para la impresión molecular de plantillas con pares de grupos hidroxilo cercanos, utiliza ésteres de boronato. Las moléculas impresas mediante este formato incluyen ácido glicérico⁽³⁸⁻³⁹⁾, aminoácidos⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾, derivados de manosa⁽⁴²⁻⁴³⁾, galactosa y fructuosa⁽⁴⁴⁻⁴⁵⁾, D-manitol⁽⁴⁶⁾ y α -hidroxi ácidos carboxílicos.⁽⁴⁷⁾

3.1.1.7.2 Impresión no covalente

Para la impresión no covalente los monómeros de vinilo o acrilato son los más comúnmente empleados.⁽³¹⁾

a. Monómeros ácidos

A pesar de que los monómeros derivados de los ácidos carboxílicos son capaces de dimerizar en las condiciones empleadas durante la síntesis del polímero (altas concentraciones de monómero y un medio apolar), son los más utilizados en la preparación de PIM's no

covalentes, debido a que son capaces de interactuar de múltiples maneras con una gran cantidad de analitos plantilla. Entre los posibles mecanismos de interacción se encuentran: su carácter tanto aceptor como donador de protones en la formación del enlace por puente de hidrógeno, la formación de pares iónicos y la interacción dipolo-dipolo⁽¹¹⁾. De todos estos compuestos el más utilizado es el ácido metacrílico (AMA), que al presentar un menor número de grados de libertad rotacional de sus enlaces, contribuye en el incremento de la estabilidad del complejo de prepolimerización.

En disolventes como el acetonitrilo, los ácidos carboxílicos y las aminas pueden formar arreglos mediante interacciones de puente de hidrógeno, donde la fuerza de asociación para un ácido dado se incrementa con la fuerza de la base. De esta manera, las moléculas plantilla que presentan un comportamiento de base tipo Brønsted o grupos funcionales que puedan formar enlaces de hidrógeno, son potencialmente adecuadas para ser impresas con el sistema AMA/EGDMA.⁽²⁾

Para obtener un grado de reconocimiento adecuado, generalmente es necesario utilizar un exceso de AMA en el paso de síntesis del material impreso, combinado con el empleo de disolventes de polaridad baja a media y con capacidad de formación de puentes hidrógeno. De hecho, en estos casos el disolvente de re-enlazamiento óptimo es a menudo el utilizado como porógeno, ya que el polímero presenta memoria hacia ese disolvente y la molécula plantilla con los cuales se sintetizó.⁽⁴⁸⁾

A la fecha el ácido metacrílico ha sido utilizado para imprimir esteroides⁽⁴⁹⁾, nucleótidos⁽⁵⁰⁾ péptidos cíclicos⁽⁵¹⁾ y pesticidas⁽⁵²⁾. Otros monómeros ácidos empleados con éxito variable han sido el ácido 4-vinilbenzoico⁽⁵³⁾, el ácido acrílico⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾ y el ácido itacónico.⁽⁵⁶⁾

b. Monómeros básicos

En caso de que el analito plantilla sea de naturaleza ácida, se puede recurrir al empleo de vinilpiridina como monómero. En su forma básica este compuesto presenta un anillo aromático rico en electrones π , por lo que es capaz de interactuar muy eficientemente con analitos aromáticos deficientes en electrones. No obstante, la interacción de tipo π - π^* que tiene lugar en medio acuoso, aunque a primera vista pudiera parecer interesante, generalmente conduce a la presencia de un elevado número de interacciones no específicas.⁽⁴⁸⁾

La piridina es intrínsecamente una base débil ($pK_a = 5.4$), pero forma aductos mediante interacciones de puente de hidrógeno lo suficientemente fuertes con varios compuestos ácidos.

Dentro de este tipo de monómeros la 4-vinilpiridina es el más utilizado⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾, pero otros monómeros básicos como el N,N-dietilaminoetilmetacrilato⁽⁶⁰⁻⁶¹⁾, el aminoestireno⁽⁶²⁻⁶³⁾ y el vinilimidazol⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾ también han sido utilizados.

c. Monómeros neutros

Dentro de los monómeros neutros, la acrilamida⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾, la vinil pirrolidona⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾ y el 2-hidroxiethyl metacrilato (HEMA)⁽⁷²⁻⁷⁴⁾ han sido empleados. Sin embargo la acrilamida es la más utilizada, ya

que genera puentes de hidrógeno más estables que el ácido metacrílico en medios apolares, siendo el empleo de ésta una buena alternativa en la preparación de fases estacionarias para CLAR.⁽⁷⁵⁾

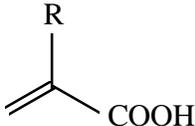
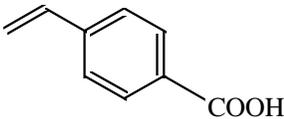
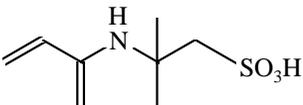
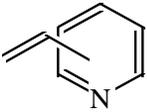
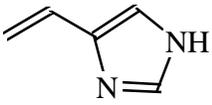
Por otro lado la incorporación de HEMA en los PIM's constituidos de metacrilato hace que los polímeros obtenidos sean menos hidrofóbicos, ayudando con ello a la difusión de moléculas-plantilla hidrofílicas.⁽⁷⁶⁻⁷⁷⁾

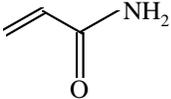
d. Mezclas de monómeros

Ocasionalmente se han utilizado combinaciones de monómeros funcionales para mejorar las propiedades de impresión de los PIM's con respecto a aquellos sintetizados con un solo monómero. Las combinaciones que han sido empleadas incluyen: 2-vinilpiridina con ácido metacrílico⁽⁷⁸⁻⁷⁹⁾, 4-vinilpiridina con ácido metacrílico⁽⁸⁰⁻⁸²⁾, acrilamida con ácido metacrílico⁽⁸³⁻⁸⁴⁾, acrilamida con ácido acrílico⁽⁸³⁻⁸⁴⁾ y acrilamida con 2-vinilpiridina.⁽⁸⁵⁾

En la Tabla 3.2 se muestran los tipos de monómeros más utilizados en la síntesis de polímeros generados por impresión molecular, su estructura química y el tipo de interacción que pueden presentar con el analito plantilla.

Tabla 3.2. Monómeros más comúnmente empleados en la obtención de PIM's.⁽³⁾

Monómero	Estructura	Tipo de interacción	Aplicación
Ácidos acrílicos (R= H, CH ₃ , CF ₃ , CH ₂ COOH)		Enlaces de hidrógeno Iónica	Aminoácidos Péptidos Teofilina Propranolol Morfina Monosacáridos Pesticidas Timolol Norefedrina Atrazina Nicotina
Ácido vinilbenzoico		Enlaces de hidrógeno Iónicas	Aminoácidos
Ácido acrilamido sulfónico		Iónica	Desmetrín
Vinilpiridinas		Iónica Enlaces de hidrógeno Transferencia de carga	Naproxeno Aminoácidos
Vinylimidazol		Iónica Enlaces de hidrógeno Coordinación	Aminoácidos ATP

Monómero	Estructura	Tipo de interacción	Aplicación
Acrilamida		Enlaces de hidrógeno	Aminoácidos

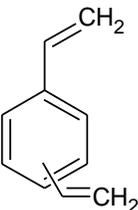
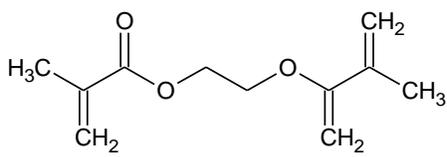
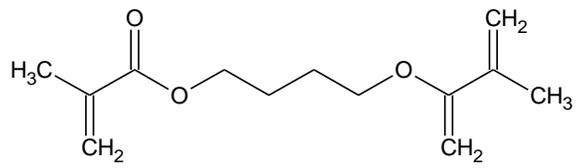
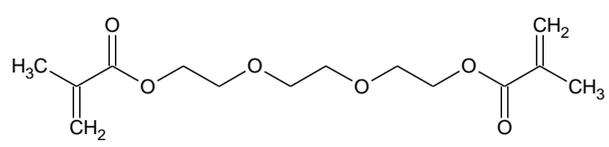
3.1.1.8 Agentes de entrecruzamiento

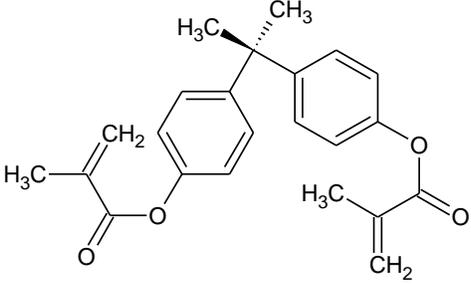
La integridad estructural del complejo de pre-polimerización y la consecuente obtención de cavidades en el material polimérico, dependen de la naturaleza y de la cantidad del entrecruzante empleado⁽⁸⁶⁾, ya que éste debe ser capaz de interactuar con el complejo de pre-polimerización y preservarlo durante la síntesis del polímero. El entrecruzante también afecta las propiedades físicas y químicas del polímero resultante, al que confiere estabilidad mecánica y térmica, proporcionándole la porosidad adecuada para garantizar la accesibilidad del analito a las cavidades generadas⁽⁸⁷⁾. En la Tabla 3.3 se presentan los agentes de entrecruzamiento empleados en la preparación de polímeros impresos.

El etilenglicol dimetacrilato (EGDMA) y el divinilbenceno (DVB) son los entrecruzantes más comúnmente utilizados en la obtención de polímeros impresos, ya que generan materiales que poseen estabilidad térmica y mecánica, con un buen grado de humectación en medios re-enlazantes, una rápida transferencia de masa y con aceptables propiedades de reconocimiento⁽³¹⁾. Se sabe que los materiales impresos generados con EGDMA generalmente presentan factores de separación (α) superiores a los mostrados por los PIM's sintetizados con DVB. Este comportamiento fue atribuido a la combinación de la unión corta y flexible y al carácter proquiral de los grupos metacrilato del EGDMA⁽⁸⁸⁻⁸⁹⁾.

Con excepción de monómeros de trimetacrilato como el de trimetilolpropano (TRIM), ningún otro monómero de entrecruzamiento genera materiales con propiedades de reconocimiento similares para una cantidad tan grande de moléculas plantilla como el EGDMA. El TRIM sin embargo presenta un mejor desempeño que el EGDMA cuando se desea imprimir péptidos, ya que los polímeros impresos preparados con TRIM poseen una capacidad de carga más alta que los materiales similares sintetizados con EGDMA⁽³¹⁾.

Tabla 3.3. Entrecruzantes empleados en la síntesis de PIM's.⁽³⁾

Entrecruzante	Fórmula	Aplicaciones
Divinilbenceno		Nicotina Bilirrubina
Etilenglicol dimetacrilato		Triazinas Tiabendazol
1,4-butanodiol dimetacrilato		Fenilalanina
Trietilenglicol dimetacrilato		Atrazina

Entrecruzante	Fórmula	Aplicaciones
Dimetacrilato de bisfenol A		Enantiómeros

3.1.1.9 Disolvente porógeno^(31, 90-92)

Los disolventes capaces de formar poros se conocen como porógenos. Durante la polimerización se forman poros permanentes hasta que el material se seca, colapsándose en mayor o menor grado dependiendo de la calidad del disolvente. Si los poros del material resultante son lo suficientemente grandes, las moléculas pequeñas pueden difundir libremente; por el contrario, en microporos con diámetros inferiores a 20 Å la difusión es lenta debido a las fuerzas capilares. Es posible obtener polímeros que contienen aglomerados de microesferas entre los 1000 y 2000 Å que se encuentran más o menos conectados, en los que cada microesfera está conformada por un pequeño núcleo entre los 50 y 300 Å (Fig. 3.5).

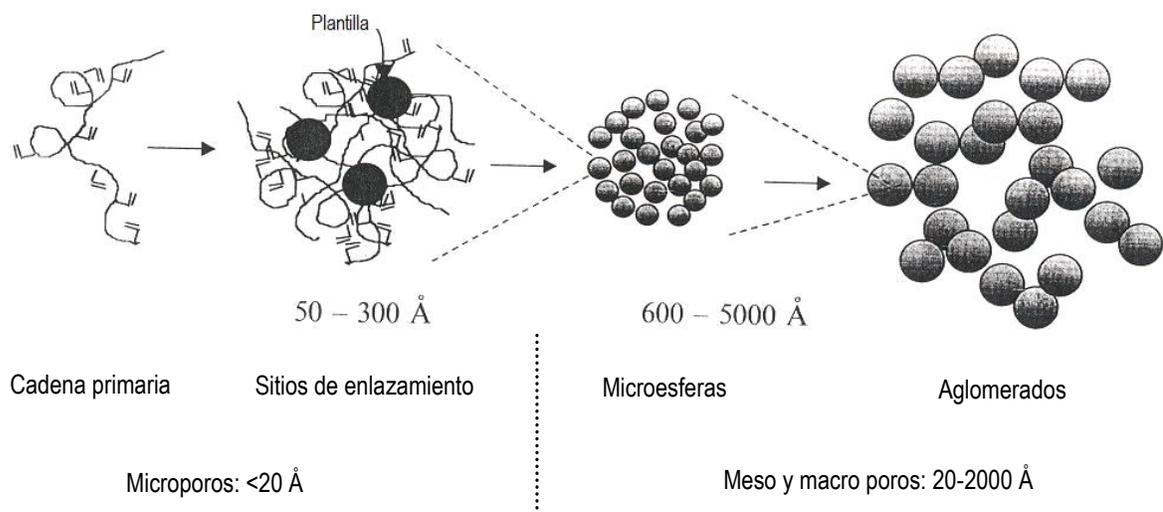


Figura 3.5. Formación de la estructura porosa al preparar un polímero impreso.

Dentro del núcleo existe una familia de poros muy pequeños (entre 50 y 150 \AA), los cuales son responsables de la gran área superficial de estos materiales. Al incrementar el nivel de entrecruzante, el tamaño de poro promedio disminuye. Si la cantidad de porógeno se incrementa la cantidad de poros grandes entre los aglomerados de microesferas también aumenta.⁽²⁾

El disolvente porógeno se elige en función de su capacidad para estabilizar el complejo de pre-polimerización. De esta forma se seleccionan disolventes de baja constante dieléctrica, como el tolueno y el cloroformo, para estabilizar complejos basados en la formación de enlaces por puente de hidrógeno o fuerzas electrostáticas entre el monómero y el analito plantilla. Los disolventes polares como el agua, el acetonitrilo o el metanol tienden a desestabilizar dichas uniones, dificultando la formación de cavidades en la matriz polimérica. La elección del tipo y cantidad del disolvente porógeno utilizado en la síntesis del polímero impreso, afectará tanto el

proceso de impresión como el estado físico del material (estructura de poro, distribución de tamaño de poro, hinchamiento, resistencia y morfología).

En polímeros de EGDMA, el área superficial aumenta al incrementarse la cantidad de este agente de entrecruzamiento y llega a un máximo al elevarse también la cantidad del porógeno. A bajas concentraciones de porógeno, el polímero llega a ser muy denso e impenetrable, generando un material de área superficial muy baja, mientras que cuando la cantidad de porógeno es alta, la densidad del núcleo polimérico es pequeña. Cerca de la cantidad óptima del disolvente porógeno, el área superficial es principalmente controlada por la concentración de EGDMA.⁽²⁾

3.1.1.10 Iniciador

La elección del iniciador depende de cuál sea el método de iniciación empleado, radiación ultravioleta o por acción de calor, y, en este último caso, de la temperatura a la cual se lleva a cabo la polimerización. Estos parámetros modifican el tiempo necesario para que tenga lugar la solidificación del polímero. La temperatura de la polimerización se elige en función de la estabilidad térmica del iniciador, que debe de fragmentarse para que comience el proceso de polimerización.⁽⁹³⁾

Los compuestos azo y peróxido con energías de enlace entre los 105 y 170 KJ/mol son utilizados como iniciadores en impresión molecular, ya que generan radicales libres cuya reactividad es lo suficientemente baja como para reaccionar con el monómero funcional.

Al trabajar con iniciadores de tipo azo, los radicales libres son generados mediante la radiación UV en la longitud de onda del máximo de absorción del mismo o térmicamente al aplicar el calor suficiente que provoque la velocidad de descomposición adecuada.

Para el iniciador común 2,2'-azobis-isobutironitrilo (AIBN), la reacción de homólisis ocurre mediante la irradiación UV a $\lambda_{\text{max}} = 345$ nm utilizando una lámpara de vapor de mercurio o mediante el calentamiento de la mezcla de reacción cerca de los 65 °C.

En los protocolos de impresión molecular ya establecidos, aproximadamente una cantidad del 1% p/p de AIBN, con respecto a la cantidad total de monómeros, se adiciona a la mezcla de polimerización. La constante de velocidad para la descomposición del AIBN es de aproximadamente $1.9 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$.

En el caso de la polimerización con iniciación fotoquímica es necesario considerar la intensidad de la luz UV, la distancia de la fuente de luz y la profundidad de la penetración (la cual depende del coeficiente de extinción molar, ϵ), ya que estos parámetros determinan la velocidad de producción de radicales.⁽²⁾ La descomposición fotoquímica del AIBN permite que los materiales impresos puedan ser preparados a baja temperatura⁽⁹³⁻⁹⁴⁾, lo que en algunos casos logra incrementar la eficiencia de separación del PIM obtenido. Otro iniciador utilizado en la síntesis de materiales impresos es el 2,2'-azo-bis-(2,4-dimetilvaleronitrilo) (ABDV), el cual presenta una temperatura de descomposición térmica menor que la del AIBN permitiendo que la polimerización sea iniciada a 40 °C.⁽⁹³⁾

3.1.1.11 Efecto de la temperatura y la presión sobre la polimerización

El efecto de la temperatura de polimerización sobre el desempeño del PIM ha sido el objetivo de muchos estudios.⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾ Se ha encontrado en algunos casos que lo mejor es llevar a cabo la iniciación de la polimerización a la temperatura más baja posible permitida por la mezcla de síntesis, ya que con esto se garantiza que el complejo monómero-plantilla no será destruido por un exceso de energía cinética, sobre todo cuando se realiza una impresión molecular vía no covalente. En el caso de polímeros en bloque este factor es aún más importante, pues se sabe que en la parte interna del monolito la temperatura es mucho más alta que en los alrededores, debido a la naturaleza exotérmica del proceso de polimerización.⁽⁹⁷⁾

El efecto de una alta presión sobre la síntesis del PIM también ha sido investigado⁽⁹⁸⁾, ya que debe favorecer procesos asociativos como la formación del complejo de pre-polimerización, sin embargo solamente efectos benéficos moderados han sido observados al realizar la síntesis del PIM en un sistema de alta presión.

3.1.1.12 Estabilidad de los sitios, integridad y accesibilidad

La función de la matriz polimérica no es solamente la de contener los sitios de enlace en una forma estable, sino también la de proporcionar la porosidad necesaria para permitir el fácil acceso de la molécula plantilla a todos los sitios. Desafortunadamente, muchos de los polímeros entrecruzados impresos molecularmente presentan una amplia distribución de tamaño de poro, asociada con diferentes grados de limitación de transferencia de masa por difusión y grados de hinchamiento.

Existen diferentes tipos de sitios en el polímero en función de su accesibilidad, integridad y estabilidad. En la Figura 3.6 se ilustran gráficamente los diferentes tipos de sitios: en macroporos (A), en microporos (B), embebidos (C), sitios complementarios a dímeros o multímeros de molécula-plantilla (D), sitios de enlace inducidos (E), sitios no selectivos (F) y sitios con moléculas-plantilla residuales (G).

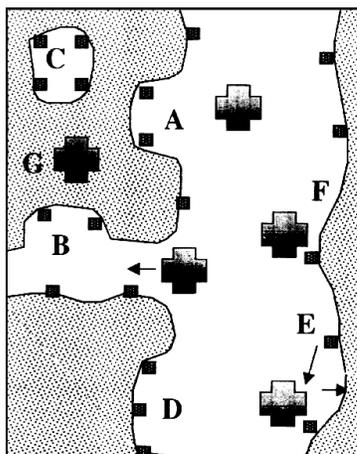


Figura 3.6. Tipos de sitios de enlazamiento en polímeros que contienen micro, meso y macroporos.

Es de esperarse que los sitios asociados con meso y macro poros ($>20 \text{ \AA}$, sitio A) sean de fácil acceso comparados con los sitios localizados en microporos ($<20 \text{ \AA}$, sitio B) donde la difusión es lenta.

Un efecto no deseable al adicionar un exceso de plantilla es la pérdida de la integridad del sitio debido a la coalescencia de sitios de enlace (sitio D), lo cual está relacionado con el incremento de la asociación de la molécula-plantilla consigo misma. La cantidad óptima de la molécula de impresión es usualmente alrededor del 5% de la cantidad total de monómeros, pero

puede ser más alta cuando se utilizan trivinil-monómeros como agentes de entrecruzamiento (en cuyo caso se emplea una fracción más grande de plantilla), sin perder de vista que la cantidad de la molécula-plantilla está limitada por su solubilidad en el disolvente porógeno utilizado.

A menudo los materiales poliméricos se hinchan en grado diferente dependiendo del tamaño de poro y del tipo de disolvente. El hinchamiento del polímero es normalmente alto en disolventes y bajo en no disolventes. Debido a esto, cuando el disolvente se pone en contacto con el material impreso se modifican las propiedades de accesibilidad y densidad de los sitios enlazantes. Además, si el re-enlazamiento de la plantilla en los sitios ocurre en un disolvente que lo hincha y la desorción es llevada a cabo en uno que no, la plantilla sufre el riesgo de quedar atrapada en los poros pequeños del arreglo entrecruzado. Para muchas aplicaciones en medios líquidos es preferible una porosidad permanente y una área superficial grande, conformada por meso y macroporos, ya que el material tendrá principalmente sitios accesibles del tipo A. Para conseguir este propósito el volumen de porógeno deberá ser ligeramente mayor que el volumen de los monómeros, el nivel de entrecruzante deberá ser relativamente alto (>50% mol/mol), mientras que el grado de hinchamiento y la porosidad del material polimérico deberán ser controlados por el tipo de la mezcla disolvente-no disolvente utilizada durante la polimerización, sin perder de vista que esta última también afectará la estabilidad de los arreglos monómero-plantilla.

Uno de los problemas que se presentan en la obtención de los PIM's, es el que ocurre cuando una pequeña cantidad de la molécula plantilla permanece fuertemente unida al material polimérico, aún después de haber realizado un cuidadoso proceso de extracción de la misma. Esta cantidad es usualmente mayor que el 1% de la cantidad total utilizada para obtener el material impreso. Aunque este hecho no constituye un problema en separaciones preparativas o

catálisis, sí lo es cuando los materiales son utilizados en la preparación de muestras para el análisis cuantitativo de analitos en bajos niveles de concentración, ya que esa fracción de plantilla provocará falsos resultados.⁽²⁾

3.1.2 Caracterización físico-química de los PIM's

A lo largo de los años, se han empleado numerosas técnicas para caracterizar los polímeros generados por impresión molecular. Dicha caracterización implica conocer, entre otras muchas cosas, el grado de estabilidad del complejo de prepolimerización, la determinación del grado de eliminación de la plantilla utilizada durante la síntesis del polímero, el rendimiento de la polimerización, la morfología de las partículas o las características de los puntos de unión en la matriz polimérica. A continuación se hace una breve descripción de las distintas técnicas que se pueden aplicar para evaluar cada uno de estos parámetros.

3.1.2.1 Técnicas morfológicas empleadas en la caracterización de PIM's

Las técnicas morfológicas más importantes empleadas en la caracterización de materiales impresos se basan en la observación microscópica de la superficie del polímero y en la medida de la porosidad del mismo.

La superficie del polímero puede evaluarse tanto mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) como mediante la microscopía de fuerza atómica (AFM). En este sentido, la microscopía electrónica de barrido permite obtener una imagen superficial de las partículas de polímero y de los macroporos superficiales, mientras que la microscopía de fuerza atómica

proporciona un perfil tridimensional cuantitativo de la superficie del polímero, que permite diferenciar entre las fases cristalinas y las amorfas.

Por otro lado, la porosidad del polímero determina la accesibilidad de los analitos a los puntos de unión presentes en el interior de la matriz polimérica, de forma que cuanto mayor sea dicha porosidad, más rápido será el proceso de transferencia de masa y más rápidamente se alcanzará el equilibrio. Aunque existen diversas técnicas para la evaluación de la porosidad, las más empleadas son las basadas en la intrusión/extrusión de mercurio o la adsorción/desorción de nitrógeno, siendo la primera de ellas la más adecuada en el caso de la presencia de macroporos con tamaños superiores a 50 nm.

Estas técnicas se basan en la medida de la cantidad de nitrógeno o mercurio que es capaz de atravesar el material, proporcionando información acerca del área superficial específica, el volumen de poro específico, la distribución del tamaño de los poros y su diámetro medio.⁽³⁾

3.1.2.2 Técnicas químicas empleadas en la caracterización de PIM's

Debido a la baja solubilidad de los polímeros generados por impresión molecular, las técnicas químicas más empleadas en la caracterización de este tipo de materiales son aquellas que permiten el análisis en estado sólido.

El análisis elemental proporciona información acerca del contenido de los distintos elementos (C, O, H, N, S) presentes en el polímero. Mediante la comparación del resultado con datos teóricos, esta técnica puede utilizarse para determinar, por ejemplo, la cantidad de monómero

funcional incorporada a la matriz polimérica, la cantidad de polímero sintetizada sobre una partícula de látex o sílice o la disolución de las partículas de sílica empleadas como “molde” en la preparación del polímero.

El análisis espectroscópico del polímero, tanto mediante espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) como por ultravioleta visible (UV-Vis), proporciona información útil acerca del grado de entrecruzamiento, los grupos funcionales presentes en el polímero, la formación de enlaces por puentes de hidrógeno o la relación estequiométrica entre el monómero funcional y el analito plantilla.

Por último, el estudio mediante resonancia magnética nuclear de carbono y protón permite evaluar el grado de curación del polímero, estableciendo el número de dobles enlaces presentes en el mismo y, lo que es más importante, la estabilidad del complejo de prepolimerización.⁽³⁾

3.1.2.3 *Isotermas de adsorción*

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los principales inconvenientes de los polímeros no-covalentes es la heterogeneidad de los puntos de unión específica del analito en el material impreso. Una de las técnicas más empleadas para conocer los mecanismos de adsorción y de retención específica en el polímero impreso es la determinación de la isoterma de adsorción, la cual permite obtener información de la selectividad, el valor de la constante de afinidad y la densidad de los sitios de unión.⁽³⁾

En esta determinación se efectúa una serie de ensayos destinados a evaluar la cantidad de analito que se une al polímero al cargar concentraciones crecientes del mismo en experimentos típicos de EFS. Los resultados experimentales obtenidos pueden ajustarse a diversos modelos (ver Tabla 3.4). Para elegir el modelo apropiado, es necesario realizar los experimentos cuando el sistema se encuentre efectivamente en equilibrio termodinámico de forma que no se introduzcan otros parámetros suplementarios, tales como la accesibilidad a los puntos de unión, que generalmente se traducen en una subestimación de la capacidad real del polímero, como puede observarse en la Figura 3.7.

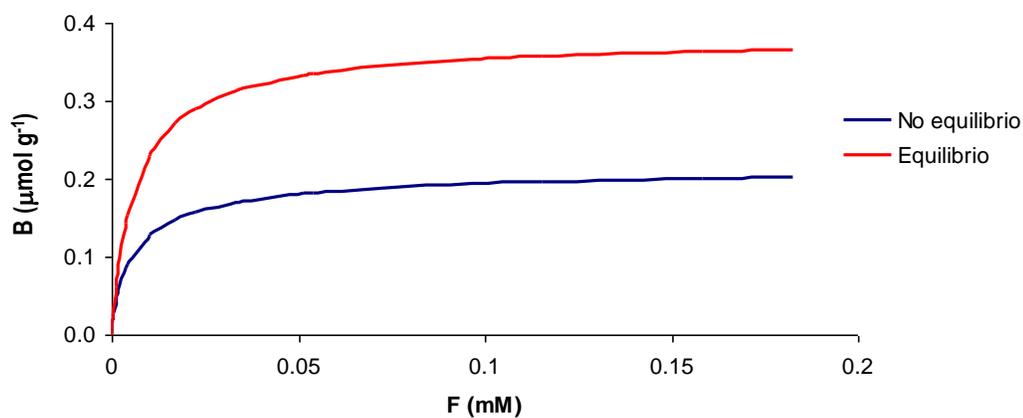


Figura 3.7. Comparación entre las isoterma de adsorción medidas al equilibrio ($t = 30$ minutos) y fuera del equilibrio ($t = 0$).

Tabla 3.4. Modelos de isothermas de adsorción empleados en la caracterización de los puntos de unión de los polímeros generados por impresión molecular.

Modelo de isoterma	Fórmula	Ref.
Freundlich	$B = a F^m$	(92)
Langmuir	$B = \frac{q K F}{1 + K F}$	(93)
Bi-Langmuir	$B = \frac{q_1 K_1 F}{1 + K_1 F} + \frac{q_2 K_2 F}{1 + K_2 F}$	(94)
Langmuir-Freundlich	$B = \frac{q K F^m}{1 + K F^m}$	(95)
Jovanovic	$B = q (1 - e^{-K F})$	(96)
Bi-Jovanovic	$B = q_1 (1 - e^{-K_1 F}) + q_2 (1 - e^{-K_2 F})$	(97)

En las fórmulas de la Tabla 3.4, **B** representa la cantidad de analito que se une de manera específica al polímero generado por impresión molecular, mientras que **F** es una medida de la cantidad de analito que permanece en la disolución. El valor **q** corresponde a la densidad de puntos de unión presentes en la matriz polimérica, **a** está relacionado con la constante de afinidad media **K** a través de la fórmula $K = a^{1/m}$ y **m** es el índice de heterogeneidad que toma valores comprendidos entre 0 (material heterogéneo) y 1 (material homogéneo).

De todos estos modelos, el más sencillo es el modelo de Freundlich, útil en la descripción de materiales heterogéneos, donde la adsorción es generalmente a través de puntos de unión de

baja afinidad. Los modelos de Langmuir o Jovanovic, por otro lado, se ajustan bien al comportamiento de materiales homogéneos. En el caso de que co-existan puntos de unión de elevada y baja afinidad, puede recurrirse al empleo de los modelos de bi-Langmuir o bi-Jovanovic, que en muchas ocasiones son una mejor aproximación que los modelos simples, dónde sólo se considera un tipo de puntos de unión.

Por último, el modelo de Langmuir-Freundlich es capaz de describir el comportamiento de materiales tanto homogéneos como heterogéneos, siendo una buena aproximación a la descripción del mecanismo de adsorción presente en la inmensa mayoría de los polímeros generados por impresión molecular.

Una forma sencilla de evaluar cuál es la isoterma más adecuada para la descripción de cada mecanismo concreto consiste en la representación de $\log B$ en función de $\log F$, de forma que aquellos datos de adsorción que presenten una relación lineal de ambas magnitudes en todo el intervalo de concentraciones se ajustan preferentemente a una isoterma de Freundlich, mientras que si no presentan una relación lineal lo más probable es que se ajusten al modelo de Langmuir. Para aquellos casos en los que se presente un comportamiento mixto (relación lineal a bajas concentraciones y no lineal a concentraciones elevadas) el modelo de Langmuir-Freundlich es el que se ajusta.⁽³⁾

3.1.3 Aplicaciones de los PIM's

En la actualidad el uso de los polímeros de impresión molecular es muy amplio, entre las aplicaciones más importantes se encuentra su empleo como adsorbentes selectivos en procesos

de Extracción en Fase Sólida⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾ o como fases estacionarias en Cromatografía de Líquidos⁽¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾, Electrochromatografía Capilar^(108, 111-113), y como sensores⁽¹¹⁴⁻¹¹⁵⁾. A continuación se resumen estas aplicaciones.

3.1.3.1 Empleo de PIM's como adsorbentes selectivos en procesos de EFS

Los polímeros generados por impresión molecular se emplean como materiales selectivos en procesos de Extracción en Fase Sólida para la limpieza de muestras. Esta aplicación ha adquirido mucha importancia debido a que presentan mejores resultados al compararlos con los obtenidos por otros adsorbentes, como la sílice modificada (C₁₈) o las resinas de intercambio iónico.

Una vez obtenido el polímero, se tritura y en algunos casos se tamiza hasta obtener el tamaño de partícula deseado (generalmente 50-100 µm). Posteriormente, se somete a un proceso de extracción del analito plantilla con el fin de liberar las cavidades formadas. Habitualmente, esta etapa se lleva a cabo por extracción Soxhlet o lavando con disolventes de elevada constante dieléctrica. Por último, una pequeña cantidad (100-500 mg) del material polimérico se trasvasa a un cartucho para realizar experimentos típicos de EFS.

Los polímeros impresos se han aplicado con éxito en la determinación de una gran variedad de analitos (pesticidas, productos farmacéuticos, aminoácidos, metales) en muestras de muy diversa naturaleza (alimentos, agua, suelos, fluidos biológicos, medicamentos).⁽¹¹⁶⁻¹²⁴⁾

3.1.3.1.1 Extracción en Fase Sólida con polímeros impresos (EFSIM)

La EFS es un método de preparación de muestra. Las etapas que lo conforman se muestran en la Figura 3.8; incluyen el acondicionamiento previo del polímero con el disolvente en el que se va a cargar la muestra, la carga de la muestra en el cartucho y la fijación selectiva de los analitos en las cavidades del polímero impreso, el lavado de los compuestos interferentes retenidos de manera inespecífica y la elución de los analitos con el disolvente adecuado.

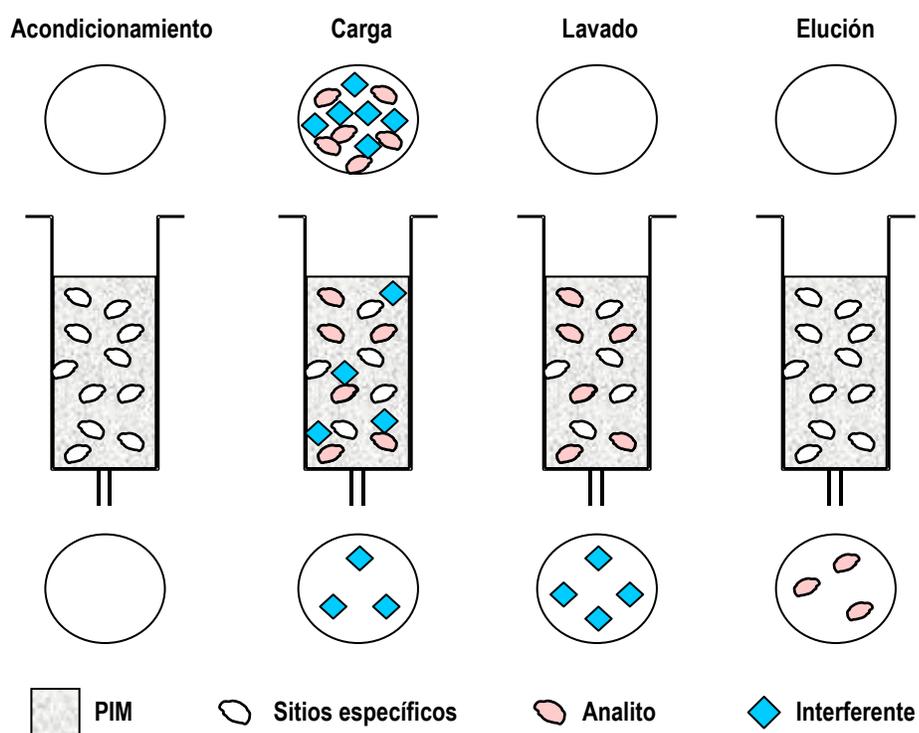


Figura 3.8. Proceso de EFS utilizando como adsorbente un polímero impreso molecularmente.

La elección del disolvente adecuado para cada una de estas etapas se basa en la solubilidad de los analitos y en el tipo de interacción implicada en la unión analito-polímero.⁽³⁾

El re-enlazamiento del analito-plantilla por el polímero impreso molecularmente (PIM) puede ser debido a interacciones específicas y no específicas. Las primeras se refieren al reconocimiento del tamaño y disposición de grupos funcionales de la molécula de analito por el arreglo espacial particular de los grupos funcionales superficiales del polímero en los sitios impresos. Este tipo de interacciones sólo se dará, en principio, con el compuesto que generó los sitios o con compuestos de la misma familia que guardan similitud estructural con él. Las interacciones no específicas, por el contrario, pueden presentarse con cualquier compuesto (incluyendo el compuesto-plantilla) y son debidas tanto a interacciones polares (grupos polares de los solutos con grupos polares en la superficie del polímero), como a efectos solvofóbicos. Este tipo de interacciones son indeseables pues nulifican la selectividad del PIM.

La optimización de condiciones en un proceso de Extracción en Fase Sólida Impresa Molecularmente (EFSIM) implica maximizar las interacciones específicas y minimizar las no específicas durante las etapas de acondicionamiento, carga y lavado. Normalmente, las interacciones específicas son favorecidas en presencia del disolvente que se utilizó como porógeno en la síntesis del PIM, o uno muy similar. Por eso este disolvente se emplea a menudo en la etapa de acondicionamiento de los cartuchos pues prepara al adsorbente para la interacción subsecuente con el analito. Durante la etapa de carga, los solutos presentes son retenidos en el PIM por diversos mecanismos dependiendo de la matriz de la muestra. En el caso de muestras acuosas, los efectos hidrofóbicos promueven la retención no específica de la mayoría de los compuestos orgánicos presentes, excepto los muy polares o iónicos. La retención del analito-plantilla también es promovida inicialmente por efectos hidrofóbicos, pero una vez que se encuentra en la superficie o en los poros del polímero, difundirá hasta encontrar sitios impresos libres donde quedará inmovilizado por fuertes interacciones específicas. En la etapa de

lavado es común utilizar de nuevo al disolvente porógeno, sólo o en mezclas, para no perturbar la interacción del analito con los sitios impresos; en general, el uso de un disolvente orgánico más o menos polar en la etapa de lavado permite desorber a todos los demás solutos que fueron retenidos únicamente por hidrofobicidad y también logra romper interacciones polares débiles no específicas. La etapa de elución en los procesos de EFSIM es a menudo la más crítica. Esto es debido a que la energía de interacción del analito con algunos sitios impresos puede llegar a ser sumamente alta. El disolvente o disolución empleado(a) en esta etapa, se selecciona en función de su facilidad para destruir la interacciones específicas entre el analito y el polímero impreso.

No obstante, un proceso de Extracción en Fase Sólida nunca se realiza bajo condiciones de saturación porque, lógicamente, no todo el analito sería retenido. La retención cuantitativa está condicionada por el volumen de muestra cargada y el volumen de fuga del compuesto de interés en el cartucho (o columna) empacado con una cantidad dada de adsorbente.

3.1.3.1.2 *Análisis Frontal*⁽¹²⁵⁾

Durante la etapa de carga de la muestra en un cartucho de EFS ocurre un proceso conocido como análisis frontal. A medida que la muestra es percolada por el material adsorbente, el analito disuelto va ocupando los sitios de adsorción disponibles. Las moléculas que no encuentran un sitio libre continúan avanzando a lo largo del lecho empacado, generándose así un frente de migración del soluto, el cual se dispersa o ensancha a medida que avanza. La migración del frente va acompañada de una dispersión que refleja la cinética del proceso, por lo que el frente (también llamado zona de transición) se extiende progresivamente a lo largo del eje del cartucho

adquiriendo un perfil sigmoidal, que depende de la velocidad de flujo de la fase móvil, el volumen percolado y de la concentración del soluto. Cuando el frente emerge del cartucho la concentración del soluto en el efluente aumenta hasta alcanzar el mismo nivel que la concentración en el influente. En la Figura 3.9 se muestra una típica curva de análisis frontal, obtenida al graficar la concentración relativa del soluto, ϕ , en el efluente ($\phi = C/C_0$, donde C es la concentración de soluto en el efluente y C_0 es la concentración en el influente), en función del volumen de la disolución percolada a través del cartucho.

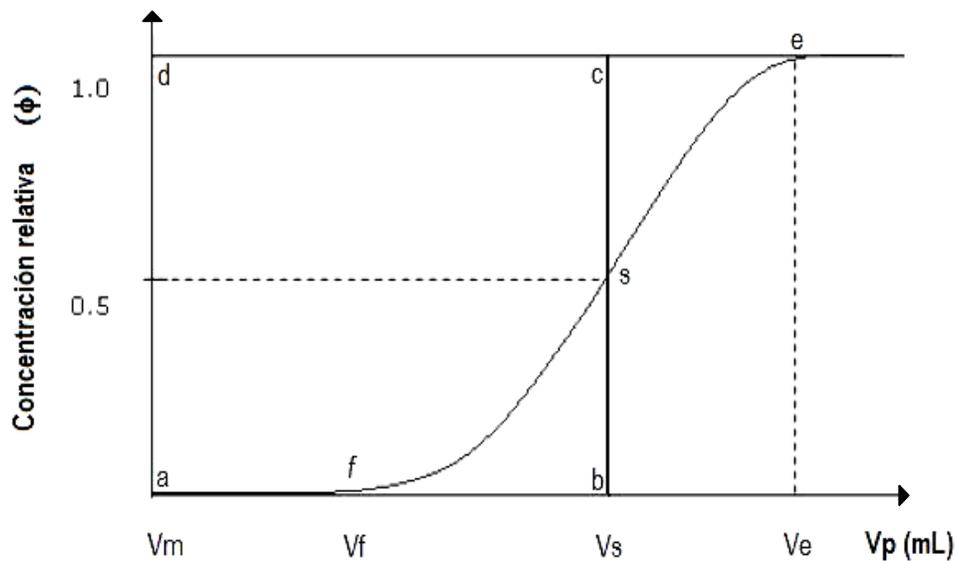


Figura 3.9. Curva característica del análisis frontal.

Los volúmenes característicos de esta curva, V_f , V_s y V_e (asociados a los puntos “f”, “s” y “e”) indican el volumen de fuga, el volumen estequiométrico y el volumen de equilibrio. El volumen de

fuga se define como el máximo volumen de muestra que puede cargarse sin que se pierda analito. Usualmente se acostumbra tomar como volumen de fuga aquél en el cual aparece en el efluente del cartucho una concentración de analito <5% de su concentración en la muestra original o influente, este volumen es muy importante en los procesos de Extracción en Fase Sólida pues, para una recuperación cuantitativa del analito, se requiere que $V_p < V_f$ (V_p volumen de disolución percolado). En disoluciones diluidas (lo que es el caso en el análisis de trazas), el volumen de fuga está relacionado con el coeficiente de distribución del soluto y por lo tanto con la isoterma de adsorción (capacidad del adsorbente y constante de afinidad). Si el sistema fuera ideal, el volumen de fuga sería igual al volumen de retención (V_r) que tendría el analito si se inyectara en el cartucho usando como fase móvil el disolvente de la disolución de carga (e.d. agua). En dicho caso, sería posible estimarlo a partir del parámetro termodinámico K_D y de parámetros experimentales como el volumen muerto del cartucho (V_m) y la masa de adsorbente (W_{ad}), utilizando la bien conocida ecuación fundamental de la cromatografía que relaciona estos parámetros:

$$V_r = V_m + K_D \times W_{ad} \quad (\text{Ec. 1})$$

Sin embargo, el volumen de fuga también depende de parámetros cinéticos (flujo, homogeneidad del empaque, tamaño y forma de las partículas de adsorbente, cinética de adsorción) que determinan el ensanchamiento del frente del soluto durante su migración a lo largo del cartucho. Este ensanchamiento puede ser muy importante en el caso de un PIM y no puede evaluarse teóricamente. Existen diferentes métodos experimentales para determinar o estimar el volumen de fuga, cada uno con ciertas ventajas e inconvenientes.

El volumen estequiométrico tiene un significado termodinámico, representa el volumen de retención que tendría el soluto si se realizaría una inyección analítica de éste en el cartucho, usando como fase móvil una disolución de la misma composición que la disolución percolada (pero obviamente sin el analito). Finalmente, el volumen de equilibrio es aquél a partir del cual se cumple que todo el adsorbente contenido en el cartucho está en equilibrio con la disolución percolada, es decir, ya no se retiene soluto en el adsorbente porque todos sus sitios activos están ocupados. Es importante señalar que, si el proceso tuviera una cinética infinitamente rápida, el frente sería una línea vertical (llamado frente estequiométrico) que emergería del cartucho en el volumen V_s . En dicho caso (hipotético) V_s sería a la vez el volumen de fuga y el volumen de equilibrio.

Las curvas de análisis frontal proporcionan información interesante para la evaluación cualitativa y cuantitativa del comportamiento de retención de un lecho empacado. Desde el punto de vista cualitativo, la forma y la extensión de la zona de transición, $\Delta V_{zt} = V_e - V_f$, son indicativos de la calidad del empacado y del empaque. Un lecho homogéneamente empacado, sin canales de flujo preferenciales y con sitios de adsorción homogéneamente repartidos en el soporte, conduce a un frente perfectamente simétrico, donde el centro de masa o punto estequiométrico se encuentra situado exactamente a la mitad de la altura del frente. Si además las partículas del empaque son muy pequeñas y de tamaño muy regular, la dispersión del frente es mínima y los volúmenes de fuga y de equilibrio se acercan al volumen estequiométrico. Sin embargo, la cinética de adsorción-desorción también influye en el grado de dispersión del frente; una cinética lenta conjugada con una velocidad de flujo elevada conduce a una zona de transición muy dispersa y, eventualmente, a la no formación del frente. Esto último significa que la longitud del

lecho empacado no es suficiente para contener el frente y por lo tanto se observa una fuga importante del soluto desde el inicio del proceso.

En lo que se refiere a los aspectos cuantitativos, la curva del análisis frontal puede explotarse según se explica a continuación. Para cualquier punto “*f*” en el frente (por ejemplo, $i = s$ en la Figura 3.9) se puede trazar una línea vertical que define un rectángulo (**abcd** en la misma figura), cuya área es proporcional a la cantidad de soluto percolado hasta dicho punto. Dentro de este rectángulo, el área sobre la curva del frente (área enmarcada por los puntos **afscd**) es proporcional a la cantidad de soluto retenido, mientras que el área bajo la curva (área enmarcada por los puntos **fsb**) es proporcional a la cantidad de soluto no retenido. Cuando el punto “*f*” es el correspondiente al volumen de fuga (o sea punto “*f*”), el área bajo la curva es nula y todo el soluto percolado ha sido retenido. En este caso se tendrá:

$$q_{ad(f)} = (V_f - V_m)C_o \quad (\text{Ec. 2})$$

donde: $q_{ad(f)}$ es la cantidad retenida al punto de fuga,

V_m = volumen muerto del cartucho

Si el frente es perfectamente simétrico la línea vertical trazada en el punto “*s*” divide al frente de tal manera que el área bajo la curva entre los puntos **s-f** es igual al área sobre la curva entre los puntos **s-e**. Por esta razón, cuando se considera el punto de equilibrio “*e*”, el área sobre la curva (enmarcada por los puntos **afsed**) es igual al área del rectángulo definido por el frente estequiométrico (es decir, el rectángulo **abcd**). De esta manera, la cantidad de soluto retenido en el punto de equilibrio, o sea la máxima cantidad de soluto que puede retenerse en la columna o

cartucho bajo las condiciones experimentales usadas, se calcula fácilmente por la siguiente ecuación:

$$q_{ad(e)} = (V_s - V_m)C_o \quad (\text{Ec. 3})$$

donde: $q_{ad(e)}$ es la cantidad retenida al equilibrio.

3.1.3.2 Empleo de PIM's como fases estacionarias selectivas en CLAR

El empleo de polímeros de impresión molecular como fases estacionarias en CLAR plantea una serie de problemas que han limitado considerablemente su aplicación. Entre estos problemas se encuentran, por ejemplo, la heterogeneidad de las cavidades generadas durante la síntesis del polímero, la necesidad de disponer de partículas esféricas de polímero con una distribución homogénea de tamaños y la reducida velocidad a la que transcurren los procesos de transferencia de masa hasta las cavidades.

Estos problemas se han solucionado en parte mediante la optimización de las condiciones de síntesis del polímero. Así por ejemplo, se puede recurrir a un método de síntesis covalente o semi-covalente, ya que de esta forma se consigue una distribución más homogénea de los huecos en la matriz polimérica. Los problemas de heterogeneidad en el tamaño de las partículas y de transferencia de masa se pueden solucionar mediante la polimerización sobre partículas de sílice o látex⁽³⁾.

Una ventaja al emplear los polímeros impresos como fases estacionarias en CLAR, es que se puede llevar a cabo la caracterización del reconocimiento de los analitos de una manera rápida y sencilla, para lo que generalmente se utiliza la técnica de análisis frontal. Existen numerosos trabajos de revisión en los que se describe el uso y la caracterización de los polímeros impresos como fases estacionarias en cromatografía.

De esta forma, los PIM's se han aplicado con éxito en la separación cromatográfica de numerosos analitos. Entre éstos se encuentran, por ejemplo, carbohidratos, aminoácidos, péptidos, proteínas, productos farmacéuticos, herbicidas, fungicidas⁽³⁾.

3.1.3.3 Empleo de PIM's como fases estacionarias selectivas en electrocromatografía capilar

El uso de polímeros generados por impresión molecular como fases estacionarias en electrocromatografía capilar, es capaz de proporcionar separaciones altamente eficaces y selectivas de los analitos. Además, la miniaturización del sistema permite trabajar con analitos plantilla caros o difíciles de obtener en estado puro, puesto que sólo se necesita una pequeñísima cantidad (nmol) para preparar el polímero. Este hecho es especialmente importante en el caso de los polímeros sintetizados para la separación de enantiómeros.

No obstante, la adaptación de la tecnología de impresión molecular a la electrocromatografía plantea una serie de inconvenientes que deben subsanarse. El más importante de todos ellos es, sin lugar a dudas, la incompatibilidad existente entre el medio necesario para favorecer la interacción específica analito plantilla-PIM (generalmente un disolvente apolar) y el medio

necesario para sustentar el flujo electrosmótico en electrocromatografía capilar (agua o disoluciones salinas acuosas).

La inmensa mayoría de las aplicaciones de los polímeros de impresión molecular como fases estacionarias en electrocromatografía capilar se han centrado en la separación de mezclas racémicas, debido fundamentalmente a la posibilidad de demostrar sin lugar a dudas la existencia de huecos de unión específicos para el enantiómero empleado como analito plantilla, ya que tanto la movilidad electroforética como las interacciones inespecíficas con la matriz polimérica deben ser idénticas para ambos enantiómeros. Además, el análisis de enantiómeros está motivado por la demostración de que la actividad biológica, el metabolismo y la toxicidad de muchos compuestos quirales dependen de su configuración.

A la fecha se han publicado numerosos artículos en los que se utilizan PIM's como fases estacionarias en sistemas de electrocromatografía capilar. Entre las principales aplicaciones reportadas se encuentran las determinaciones de aminoácidos, anestésicos y nucleótidos.⁽³⁾

3.1.3.4 Empleo de PIM's en el desarrollo de sensores

En los últimos años se han desarrollado sensores basados en el uso de polímeros generados por impresión molecular para la detección selectiva de analitos en muestras relativamente complejas y en condiciones extremas (altas temperaturas o medios químicos agresivos).

De esta forma, se han generado sensores ópticos, electroquímicos y piezoeléctricos, para la determinación de pesticidas, productos farmacéuticos, aminoácidos y glucosa entre otros.⁽³⁾

3.2 Pesticidas

La explosión demográfica en la actualidad ha desencadenado la búsqueda de sistemas más eficientes para la producción de alimentos con la finalidad de satisfacer la creciente demanda de los mismos. Es por ello que la agricultura debe hacer frente a la necesidad de obtener un mayor número de alimentos en un terreno cada vez más pequeño y con menos mano de obra. Para lograrlo, se ha recurrido al uso masivo de pesticidas.

Se denominan pesticidas a aquellos compuestos que se aplican sobre el terreno de cultivo para controlar, destruir, prevenir o limitar la acción de plantas, microorganismos o animales que puedan afectar al desarrollo, rendimiento y conservación de los productos cultivados. En función de que la plaga tratada sean malas hierbas, insectos, hongos o roedores, los pesticidas se dividen en herbicidas, insecticidas, fungicidas o rodenticidas.⁽³⁾

El grupo de los fungicidas comprende una gran variedad de compuestos, los cuales han sido agrupados de la siguiente manera:

- Derivados de metales: compuestos de arsénico, cobre y mercurio.
- Derivados de ftalimida: captán, captafol.
- Ditiocarbamatos: zineb, maneb, mancozeb, thiram, nabam.
- Fenoles y ésteres fenólicos: dinitrofenoles, pentaclorofenol, triclorofenol.
- Anilino, nitrobenzoides y aromáticos: diclorán, quintozeno, hexaclorobenceno, clorotalonil.
- Compuestos heterocíclicos de nitrógeno: bencimidazoles.

3.2.1 Ditiocarbamatos

Los ditiocarbamatos comprenden una serie de sustancias que tienen una estructura química relacionada con la de los insecticidas y herbicidas carbamatos, y su acción plaguicida se ejerce casi exclusivamente contra hongos.⁽¹²⁶⁾ Son productos derivados del ácido ditiocarbámico, que en su forma libre es inestable, pero cuyas sales son estables.

Varios de ellos contienen en su estructura química un metal (hierro, zinc, manganeso).

El grupo comprende varias subclases:

- Bisditiocarbamatos: thiram.
- Metalobisditiocarbamatos: ziram (contiene zinc), nabam (contiene sodio), ferbam (contiene hierro).
- Etilenbisditiocarbamatos (EBDC's): maneb (contiene manganeso), zineb (contiene zinc) y mancozeb que es una mezcla de maneb y zineb

3.2.1.1 Etilénbisditiocarbamatos (EBDC's)⁽¹²⁷⁾

3.2.1.1.1 Estructura química

A continuación se presentan las fórmulas básicas del maneb y zineb.

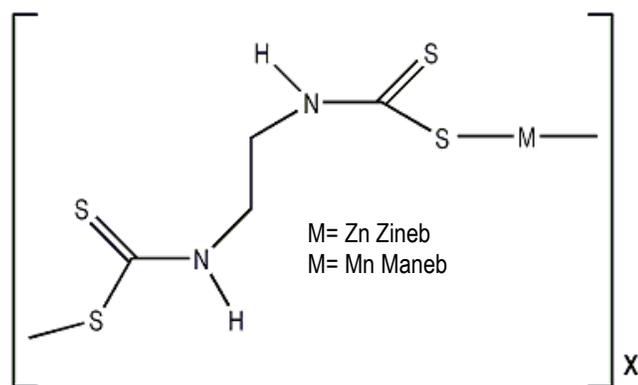


Figura 3.10. Estructura química del Zineb y Maneb.

3.2.1.1.2 Propiedades físicas y químicas de los EBDC's

En la Tabla 3.5 se resumen algunas propiedades de estos compuestos.

Tabla 3.5. Propiedades físicas y químicas del manebl, zineb y mancozeb.

Propiedad	Maneb ⁽¹²⁸⁾	Zineb ⁽¹²⁹⁾	Mancozeb ⁽¹³⁰⁾
Nº de CAS:	12427-38-2	12122-67-7	8018-01-7
Fórmula molecular:	C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Mn	C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Zn	C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Mn C ₄ H ₆ N ₂ S ₄ Zn
Masa molar:	265.3 g/mol	275.7 g/mol	541.2 g/mol
Coefficiente de reparto octanol-agua (K _{ow}):	N. R.	N. R.	1.33
Aspecto físico:	Polvo amarillo	Polvo color azul	Polvo grisáceo-amarillo
Presión de vapor a 20 °C:	N. R.	Inferior a 0.01 mPa	Despreciable

Propiedad	Maneb ⁽¹²⁸⁾	Zineb ⁽¹²⁹⁾	Mancozeb ⁽¹³⁰⁾
Punto de fusión:	Descompone a 192-204 °C sin fundir	Descompone a 157 °C sin fundir	Descompone por debajo del punto de fusión
Punto de ebullición:	No aplicable	No aplicable	No aplicable
Solubilidad en agua a 20 °C:	Muy escasa	Aproximadamente 10 mg L ⁻¹	Ninguna
Densidad:	1.92 g mL ⁻¹	N. R.	1.92 g mL ⁻¹

3.2.1.1.3 Presentación comercial de los EBDC's

Generalmente se formulan como polvos, polvos mojables, gránulos, pastas o suspensiones acuosas, y se presentan comercialmente con los nombres: dithane M-45 (mancozeb), manzate (maneb), zineb.

3.2.1.1.4 Toxicidad

Los etilénbisditiocarbamatos son moderadamente irritantes de la piel y de las membranas mucosas. Debido a que estos agentes se degradan parcialmente a CS₂ en el organismo, se sospecha que este metabolito juega un papel en los efectos neurotóxicos. Teóricamente, este grupo de compuestos induce una intolerancia al alcohol parecida a la del antabuse (disulfiram), ya sea por inhibición de la acetaldéhid deshidrogenasa o por la formación de un compuesto cuaternario con el etanol.⁽¹²⁶⁾

3.2.1.1.5 Usos

En la industria son utilizados en la manufactura del azúcar y del papel, y como antioxidantes y aceleradores del proceso de vulcanización en la obtención del caucho. Además, debido a sus propiedades quelantes también son utilizados en el tratamiento de aguas residuales.

El consumo mundial de los ditiocarbamatos se encuentra entre las 25,000 y 35,000 toneladas métricas por año.⁽¹³¹⁾

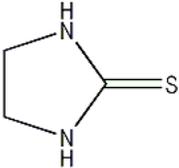
3.2.1.2 Etiléntiourea

Uno de los productos metabólicos de la descomposición de los etilénbisditiocarbamatos (EBDC's) en mamíferos, plantas, y organismos inferiores, es la etiléntiourea (ETU). Durante el almacenamiento de formulaciones de EBDC's, y de la cocción de vegetales que contienen residuos de estos compuestos, se genera etiléntiourea como producto de degradación.

3.2.1.2.1 Propiedades físicas y químicas de la etiléntiourea

En la Tabla 3.6 se resumen algunas propiedades de este compuesto.

Tabla 3.6. Propiedades de la etiléntiourea.

Propiedad	Descripción
No de CAS:	96-45-7
Estructura química:	
Fórmula empírica:	C ₃ H ₆ N ₂ S
Masa molecular:	102.17 g mol ⁻¹
Apariencia:	Cristales blancos-amarillos
	En 100 mL de agua: 2 g a 30 °C, 9 g a 60 °C, 44 g a 90 °C*
Solubilidad	Moderadamente soluble en metanol, etanol, etilenglicol y piridina. Insoluble en acetona, éter, cloroformo y benceno*.
Punto de inflamación:	252 °C*
Coefficiente de reparto octanol-agua como log P _{ow} :	-0.66*
Base débil, pKa:	2.09±0.20 ^(a)

^(a)Calculada mediante el programa Advanced Chemistry Development (ACD/Labs) Software V8.14 for Solaris (1994-2006 ACD/Labs)

*International chemical safety cards⁽¹³²⁾.

3.2.1.2.2 Distribución y transformación

Aunque la etiléntiourea es un compuesto muy estable con respecto a reacciones de hidrólisis, es fácilmente oxidable a etilénurea (EU). La transformación a EU toma lugar principalmente en sistemas biológicos mediante una reacción fotolítica, especialmente en presencia de

fotosensibilizadores. En la Figura 3.11 se presentan las principales vías de descomposición de la ETU.

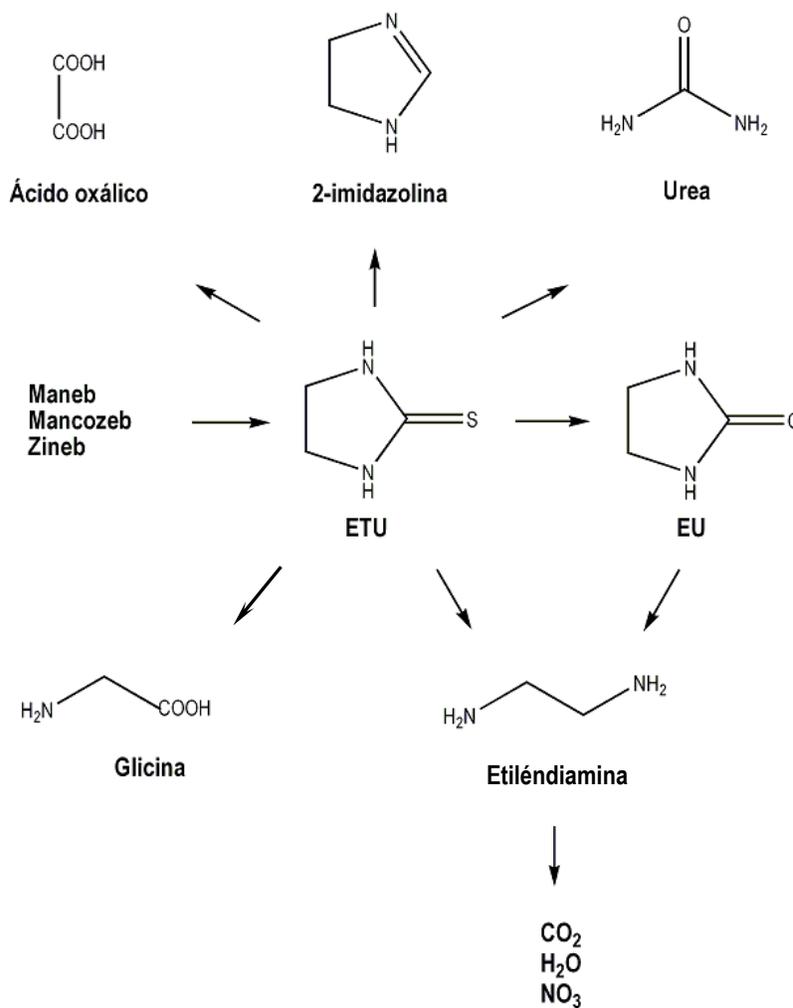


Figura 3.11. Vías de descomposición de la etilentiourea.

En muestras de suelo, solamente la etilenurea es identificada como producto de descomposición de la ETU. Por otro lado, la cinética de degradación de la etilentiourea es más

lenta en muestras de suelo que son sometidas previamente a un proceso de autoclave que en muestras de suelo no estériles.

La etiléntiurea es estable en agua desionizada en ausencia de fotosensibilizadores, pero es rápidamente oxidada en su presencia. En estudios de Ross y Crosby, se observó que después de 4 días de haber adicionado riboflavina a disoluciones de 10 y 25 mg L⁻¹ de ETU, la concentración de este compuesto en ambas disoluciones era menor del 5% al compararlas con disoluciones control conservadas en la oscuridad.

En estudios realizados con raíces de maíz, lechuga, tomate y semilleros de pimienta, se observó que la etiléntiurea es rápidamente absorbida y degradada.

La etiléntiurea es también rápidamente absorbida, metabolizada, y excretada por los mamíferos. Una cantidad superior al 90% es eliminada por la orina y solamente una pequeña cantidad en las heces. La distribución de ETU en el organismo de un mamífero aparentemente es uniforme con la excepción de una acumulación relativa en la glándula tiroidea. La ETU puede degradarse a etiléndiamina (EDA), urea, dióxido de carbono y ácido oxálico, aunque también puede ser transformada en derivados de imidazol en mamíferos, plantas y medio ambiente.⁽¹³³⁾

3.2.1.2.3 Niveles ambientales y exposición humana

La cantidad de ETU en formulaciones comerciales de EBDC's se incrementa al elevarse la temperatura y la humedad. La formación de ETU durante el almacenamiento de los

etilénbisditiocarbamatos es más grande en formulaciones de maneb (>14%), seguida de zineb y mancozeb. Las proporciones relativas de los productos de degradación son diferentes para los distintos EBDC's.

Estudios realizados en Canadá y los Estados Unidos, han mostrado que vegetales como espinacas, zanahorias, y papas, que han sido tratados con EBDC's, contienen altos niveles de ETU después de su cocción.

Por otro lado, se determinó la concentración de ETU formada a partir de residuos de mancozeb en manzanas que fueron procesadas para obtener jugo. Los resultados mostraron un contenido de ETU de 0.05 mg kg⁻¹ de jugo.⁽¹³³⁾

En otro estudio se analizó la degradación del mancozeb y de la ETU en uvas tratadas con este EBDC. Los residuos de estos compuestos disminuyeron al 50% en la primera semana, y reducciones mayores ocurrieron con el crecimiento del fruto. El tiempo de vida media fue de 35 días para el EBDC y de 28 días para la ETU (presentes al inicio en una concentración de 0.3 mg L⁻¹).⁽¹³⁴⁾

Un programa de monitoreo iniciado en 1972 por el gobierno canadiense, reveló que el 33% de las muestras de alimentos analizadas contenían residuos detectables de ETU. En muestras de espinaca y naranja empacadas se encontraron valores promedio de 0.047 mg Kg⁻¹ y 0.083 mg Kg⁻¹ de producto respectivamente.

Estudios más recientes de niveles de ETU en productos para venta comercial, muestran que el nivel más alto de este compuesto fue encontrado en duraznos enlatados con una concentración de 0.61 mg Kg⁻¹ de producto, mientras que los niveles en piel de naranja, tomate, papas, fresas, duraznos y lechugas fueron menores que 0.2 mg Kg⁻¹ de producto.

Los valores de exposición estimados en la población de los Estados Unidos son del orden de 0.24 a 3.65 µg ETU Kg⁻¹ de peso corporal por día y en Canadá alrededor de 1 µg ETU Kg⁻¹ de peso corporal por día.⁽¹³³⁾

3.2.1.2.4 Toxicidad

Dentro de los efectos adversos que la etiléntiurea induce en mamíferos, se encuentran reportados: efectos mutagénicos, carcinogénicos y de toxicidad materna. Las investigaciones realizadas en varios animales modelo indican que las ratas son probablemente la especie más sensible.⁽¹³⁵⁾

En niveles de dosis >25 mg Kg⁻¹ de peso corporal, disminuye la cantidad de la proteína enlazante de yoduro (PBI) e incrementa la estimulación de la hormona tiroidea (TSH). En niveles de dosis más altos (>100 mg Kg⁻¹ de peso corporal), incrementa el peso de la tiroides y se desarrolla hiperplasia, la cual finalmente provoca adenocarcinoma.

Se ha visto que los efectos de exposición a corto plazo hacia bajos niveles de ETU son reversibles, pero cuando se tiene una exposición prolongada a altos niveles de este compuesto,

los efectos llegan a ser en cierto momento irreversibles. Se sabe que a un nivel de aproximadamente 5 mg Kg⁻¹ de peso corporal no se presentan efectos tóxicos.⁽¹³⁶⁾

En ratas y ratones la ETU induce toxicidad perinatal, provoca la reducción y en algunos casos la ausencia de producción de leche materna en estos mamíferos. Cuando la dosis aplicada a las madres lactantes es igual o mayor a 30 mg Kg⁻¹ de su peso corporal provoca la mortalidad de las crías.⁽¹³⁵⁾

La ETU ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer como posible carcinógeno en humanos.⁽¹³⁷⁾

Debido a su relativa estabilidad y su clasificación como probable carcinógeno en humanos es necesario realizar estudios ambientales acerca de su persistencia y movilidad.⁽¹³⁸⁾

3.2.1.2.5 Métodos analíticos

En la Tabla 3.7 se presentan las metodologías analíticas que se han utilizado para la determinación de etiléntiurea.

Tabla 3.7. Metodologías analíticas para la determinación de etiléntiourea.

Descripción	Preparación de muestra	Parámetros analíticos	Ref.
Determinación simultánea de maneb y sus principales metabolitos en jitomate utilizando CLAR-UV	Extracción Líquido Líquido (ELL)	%Recobro: 50-90 %CV: ≤ 3.8 LC: 0.040 mg Kg ⁻¹ Intervalo lineal: 0.025-5 mg L ⁻¹	(139)
Determinación de ETU en alimentos mediante cromatografía de gases con detección de captura de electrones y de nitrógeno-fósforo	Microextracción en Fase Sólida (MEFS)	%Recobro: >85	(140)
Aplicación de CG/MS para la determinación de ETU en orina de humanos	Extracción en Fase Sólida (EFS)	%Recobro: >90 %CV: < 20 LC: 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ Intervalo lineal: 0-200 mg L ⁻¹	(141)
Método oficial AOAC 992.31. Residuos de etiléntiourea en agua. Cromatografía de gases.	Extracción en Fase Sólida (EFS)	Intervalo lineal: 6-100 $\mu\text{g L}^{-1}$	(142)
Determinación de ditiocarbamatos y sus metabolitos en plantas mediante CL-MS	Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) y Extracción en Fase Sólida (EFS)	<u>DMFS</u> %Recobro: 42.5-67.6 Intervalo lineal: 1-50 mg L ⁻¹ <u>EFS</u> %Recobro: ≤ 15 Intervalo lineal: 0.25-50 mg L ⁻¹	(143)

Descripción	Preparación de muestra	Parámetros analíticos	Ref.
ETU en orina como un indicador de exposición a mancozeb en trabajadores de viñedo	Extracción en Fase Sólida (EFS)	%Recobro: ≈ 72 %CV: 2-12 LC: $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ de creatinina Intervalo lineal: $0-100 \mu\text{g g}^{-1}$ de creatinina	(144)
Optimización de un método de dispersión de matriz en fase sólida para la determinación de residuos de EBDC's en almendras	Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)	%Recobro: ≤ 76 %CV: < 5 LC: 0.05 mg Kg^{-1}	(145)

3.2.1.2.6 Usos

La etiléntiurea se utiliza como acelerador en la cura del policloropreno (neopreno) y otros elastómeros, como intermediario químico en la manufactura de pesticidas, colorantes y productos farmacéuticos.⁽¹⁴⁶⁾

3.2.1.3 Bencimidazoles

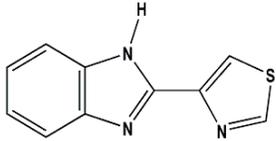
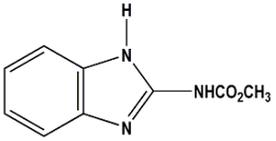
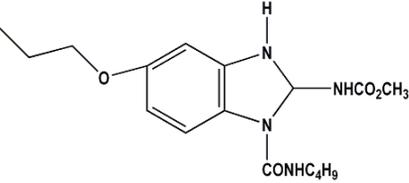
Los bencimidazoles se han empleado ampliamente en la prevención y tratamiento de las enfermedades infecciosas ocasionadas por numerosos tipos de parásitos, así como en el control de una amplia variedad de hongos que afectan cultivos de frutas y verduras durante su

almacenamiento y transporte.⁽¹⁴⁷⁾ Dentro de estos compuestos destacan el **tiabendazol** (TBZ), **benomil** (BEN) y **carbendazim** (CBZ).

3.2.1.3.1 Propiedades físicas y químicas

En la Tabla 3.8 se resumen algunas propiedades de estos compuestos.

Tabla 3.8. Propiedades físicas y químicas de los bencimidazoles en estudio.

Propiedad	Tiabendazol	Carbendazim	Benomil
No de CAS:	148-79-8	10605-21-7	17804-35-2
Fórmula molecular:	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₄
Masa molar:	201.2 g/mol	191.2 g/mol	290.4 g/mol
Estructura química:			
Coefficiente de reparto octanol-agua (K _{ow}):	5.3-6.2	N. R.*	N. R.*
Valores de pKa:	2.5 y 4.7	4.8 y 9.52	N. R.*

*N. R. No reportado

3.2.1.3.2 Toxicidad

Debido a que algunos miembros de esta clase de compuestos presentan efectos teratogénicos y embriotóxicos en especies animales, la Unión Europea ha fijado los límites máximos de residuos (LMR's) de bencimidazoles y sus metabolitos en los productos animales. Un límite máximo del residuo o un "LMR máximo" significa la concentración máxima del residuo, que como resultado del uso de un producto medicinal veterinario se puede permitir legalmente como aceptable en un alimento. Este límite se basa en el tipo y la cantidad del compuesto que puede estar presente sin provocar peligro toxicológico para la salud humana. El hígado, el riñón, el músculo y la grasa son los tejidos utilizados para el control del residuo. El intervalo de LMR se encuentra entre 10 y 1000 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ dependiendo del compuesto y de la matriz.

En el caso de los bencimidazoles utilizados como agentes fungicidas y debido a su capacidad de alcanzar las partes comestibles del alimento, los límites máximos establecidos se encuentran en el intervalo de 0.05 a 15 mg Kg^{-1} dependiendo del cultivo.⁽¹⁴⁸⁾

Se tiene el conocimiento de que el TBZ presenta una ligera toxicidad en dosis muy altas y que provoca desórdenes en el intestino e hígado en animales de prueba en periodos de exposición prolongados. Algunos desórdenes reproductivos y de disminución de peso también han sido observados. Cuando se utiliza como fármaco, puede provocar los siguientes efectos secundarios en el hombre: náusea, vómito, pérdida del apetito, diarrea, mareos, somnolencia o dolor de cabeza, ojos y piel amarilla, fiebre y fatiga. No se han observado efectos mutagénicos ni carcinogénicos.

En el caso del benomil, éste puede interferir en el metabolismo de las hormonas, por lo que su uso ha sido restringido por razones ambientales y de salud en Suecia. También ha sido relacionado con daños ambientales en Florida.⁽¹⁴⁸⁾

3.2.1.3.3 Métodos de extracción

La Extracción Líquido-Líquido es la técnica de preparación de muestras más comúnmente utilizada en el análisis de bencimidazoles. Sin embargo, la polaridad y los valores de pKa pueden diferir enormemente entre estos compuestos y sus metabolitos, lo cual hace difícil el desarrollo de un método multi-residuos.

En el caso de tejidos de origen animal, los bencimidazoles son extraídos con un disolvente orgánico y purificados mediante Extracción en Fase Sólida para posteriormente ser analizados con CLAR-UV. Algunos investigadores han extraído estos compuestos utilizando un sistema de disolvente simple, como el acetonitrilo, o mezclas binarias agua/disolvente orgánico en valores de pH neutro⁽¹⁴⁹⁾. Por otro lado, el empleo de extractantes ácidos ha tenido un campo de aplicación muy pequeño debido a que la metodología involucra pasos de hidrólisis o digestión.

A continuación se mencionan algunas metodologías utilizadas en la extracción de bencimidazoles (Tabla 3.9).

Tabla 3.9. Metodologías de extracción utilizadas en la determinación de bencimidazoles.

Compuesto*	Matriz	Extracción	Limpieza	% Recobro	Ref.
TBZ	Jugos de fruta	EFS	EFS	81-100	(149)
ABZ y TBZ	Músculo, hígado y riñón	Acetonitrilo-agua	ELL	65-87	(150)
ABZ y TBZ	Hígado	Acetato de etilo	EFS con alúmina y C ₁₈	67-90	(151)
ABZ y TBZ	Leche	Acetonitrilo	ELL	62-108	(152)
ABZ y TBZ	Leche, hígado y riñón	Acetato de etilo en pH alcalino	EFS	44-87	(153)
ABZ y TBZ	Músculo	DMFS	DMFS	63-86	(154)
CBZ y TBZ	Jugo de frutas	EFS	EFS	70-107	(155)

*ABZ: albendazol; TBZ: tiabendazol; CBZ: carbendazim. EFS: Extracción en Fase Sólida. ELL: Extracción líquido-líquido. DMFS: Dispersión de Matriz en Fase Sólida.

3.2.1.3.4 Usos

Los agentes antiparásitos representan una clase importante en la medicina veterinaria. Entre ellos los bencimidazoles antihelmínticos son ampliamente utilizados en la producción de carne animal (ganados, ovejas y cerdos) para el control de endoparásitos.

El tiabendazol (TBZ) fue el primer bencimidazol comercializado desde hace más de 40 años y ha sido ampliamente utilizado en el control de nemátodos gastrointestinales y gusanos pulmonares. Presenta propiedades acaricidas y antihelmínticas hacia especies que dañan

animales silvestres, ganado y al hombre. También se emplea en el tratamiento de infecciones en el oído de perros y gatos. Además se utiliza en el control de las enfermedades ocasionadas por hongos en frutas y vegetales, así como en el control del proceso de maduración de los mismos. El TBZ es aplicado en cosechas de bananas para garantizar su frescura. Por otro lado, el tiabendazol también es un agente quelante, por lo que es utilizado en tratamientos medicinales en casos de envenenamiento por exposición hacia metales, como por ejemplo: plomo, mercurio y antimonio.

El benomil es utilizado como agente acaricida, fungicida y nematocida. Es uno de los bencimidazoles más utilizados en el cultivo de la vid.

Por su parte el carbendazim es utilizado como fungicida de amplio espectro y, junto con el benomil, es también uno de los bencimidazoles más utilizados en el cultivo de la vid, mientras que el albendazol es utilizado en el tratamiento de nemátodos gastrointestinales en todas sus etapas de crecimiento.⁽¹⁴⁷⁾

3.3 Polímeros impresos para etiléntiourea y bencimidazoles

Hasta el momento no se encuentra reportado ningún polímero impreso para etiléntiourea y debido a las características intrínsecas de esta molécula, como son: una alta polaridad, un tamaño muy pequeño con un número limitado de sustituyentes y características de detección deficientes, la obtención de un material adsorbente que reconozca a esta especie es de suma importancia y representa un reto científico.

En el caso de los bencimidazoles y de acuerdo con lo reportado por C. Cacho et al.⁽¹⁵⁶⁾, se ha logrado sintetizar monolitos impresos para tiabendazol en el interior de columnas capilares al utilizarse ácido metacrílico como monómero funcional y etilenglicol dimetacrilato como entrecruzante. El empleo de este PIM como fase estacionaria en electrocromatografía capilar se ha aplicado en la determinación de tiabendazol en muestras de cítricos (limón y naranja) a niveles de concentración inferiores a los límites máximos legislados (5 mg L^{-1}). La elevada selectividad del método desarrollado permite la separación del tiabendazol del resto de los componentes de la matriz, con lo cual no es necesario ningún paso previo de limpieza de la muestra lo que acorta considerablemente el tiempo de análisis requerido.

Por otro lado C. Cacho et al.⁽¹⁵⁷⁾, también ha logrado sintetizar dos tipos de materiales impresos para tiabendazol mediante el método de polimerización por precipitación, en agitación constante de 20 rpm, utilizando ácido metacrílico como monómero funcional y etilenglicol dimetacrilato y divinilbenceno como entrecruzantes. Estos polímeros fueron empleados como adsorbentes en ensayos de Extracción en Fase Sólida. El acoplamiento fuera de línea de este tipo de preparación de muestra con cromatografía de líquidos de alta resolución permitió la cuantificación de diferentes bencimidazoles (albendazol, benomil, carbendazim, fenbendazol, flubendazol, fuberidazol y tiabendazol) en muestras de agua de río, grifo y pozo, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0.1 y $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, la posterior eliminación de la molécula plantilla de la matriz polimérica que involucra un paso de extracción Soxhlet y la necesidad de utilizar una pequeña cantidad de dimetilsulfóxido durante la etapa de lavado en los ensayos de EFS, indican la existencia de poros de impresión un poco restringidos en este material.

IV. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Instrumentación

4.1.1 Equipo, materiales y reactivos

- Para la cuantificación de la etiléntiurea se utilizó un cromatógrafo de líquidos constituido por una bomba de alta presión series II de Lab Alliance, un detector UV de longitud de onda variable de Linear Instruments, una válvula de inyección con rizo de 25 μ L de Lab Alliance y un sistema de adquisición de datos Data Ally 2000 versión 2.09.
- Los análisis de tiabendazol, benomil y carbendazim fueron realizados con un cromatógrafo de líquidos constituido por una bomba de alta presión de Thermo Separation Products serie 4100 y un detector UV de arreglo de diodos Spectro Monitor 5000 de Thermo Separation Products.
- Bomba isocrática Beckman 110B.
- Baño de ultrasonido Sonicor SC-100.
- Baño de ultrasonido, P-Selecta Ultrasons Serie 0416297.
- Purificador y desionizador de agua, Nanopure Ultrapure Water System Barnsted Thermolyne 04747.
- Purificador y desionizador de agua, Milli-Q Modelo 185 de Millipore.
- Balanza analítica con capacidad de 210 g y precisión de 0.1 mg, Ohaus AP210S.

- Válvula de conmutación automática de 6 puertos, Rheodyne 7750E06.

4.1.2 Columnas y Cartuchos

a. Columnas analíticas utilizadas en los ensayos con etiléntiurea

- Columna **APS-2 Hypersil** (250 x 4.6 mm, d.i.) de 5 μm de tamaño de partícula, Thermo Electron Corporation.
- Columna **Hypercarb** (100 x 3 mm, d.i.) de 3 μm de tamaño de partícula, Thermo Electron Corporation.
- Columna **PRP-1** (150 x 4.1 mm, d.i.) de 10 μm de tamaño de partícula, Hamilton Company.

b. Columna analítica utilizada en los ensayos con bencimidazoles.

- Columna **Hypersil ODS** (250 x 4.6 mm, d.i.) de 5 μm de tamaño de partícula, Thermo Electron Corporation.

c. Cartuchos de extracción en fase sólida utilizados en los ensayos con etiléntiurea.

- Constituidos por jeringas de polipropileno (capacidad 5 mL) y filtros de acero inoxidable (12 mm de diámetro, 0.075 mm de grosor y 2 μm de diámetro de poro), los cuales fueron empacados con 0.5 g del polímero impreso (PIM) o del blanco de polimerización (PB).

- d. Cartuchos de extracción en fase sólida utilizados en los ensayos con bencimidazoles.
- Constituidos por jeringas de polipropileno (capacidad 5 mL) y filtros de polietileno poroso (12 mm de diámetro, 0.075 mm de grosor y 2 μm de diámetro de poro), los cuales fueron empacados con una cantidad conocida del PIM o del PB.
- e. Columna de preconcentración en línea utilizada en los ensayos con bencimidazoles.
- Constituida por una columna de acero inoxidable (50 x 4.6 mm d.i.) con filtros de acero sinterizado poroso (2 μm de diámetro de poro), empacada con aproximadamente 300 mg del material impreso.

4.1.3 Reactivos y disolventes

Reactivos

- Etilétiourea (ETU), pureza del 99%, Chem Service.
- Tiabendazol (TBZ), pureza del 99%, Riedel Haen
- Carbendazim (CBZ), pureza del 97%, Riedel Haen
- Benomil (BEN), pureza del 99%, Riedel Haen
- Ácido metacrílico (AMA), pureza del 99%, Sigma-Aldrich.
- Divinilbenceno (DVB), pureza del 85 %, Sigma-Aldrich.
- Acrilamida (ACA), grado electroforético, Aldrich.
- 4-Vinilpiridina (4-VP), pureza del 95%, Sigma.
- Etilenglicol dimetacrilato (EGDMA), pureza del 98 %, Aldrich.
- 2-2'-azobisisobutironitrilo (AIBN), pureza del 99% Sigma-Aldrich.

- Ácido acético glacial, pureza del 99.7%, Scharlab S.L.
- Ácido perclórico, pureza del 69-72%, J.T. Baker.
- Hidróxido de sodio, grado reactivo analítico, J.T. Baker.
- Ácido acético glacial, pureza del 99.7%, J.T. Baker.
- Ácido fórmico, pureza del 88%, J.T. Baker.
- Acetato de amonio, reactivo analítico, Productos Químicos Monterrey.
- Ácido fosfórico, pureza del 85%, J.T. Baker.

Disolventes

- Agua desionizada Nanopure.
- Acetonitrilo, grado CLAR, Tecsiquim.
- Metanol, grado CLAR, Tecsiquim.
- Etanol, grado ACS, J.T. Baker.
- Hexano, grado CLAR, Tecsiquim.
- Acetonitrilo (AcCN), grado CLAR, Scharlab S.L.
- Acetonitrilo (AcCN), grado CLAR, Tecsiquim.
- Metanol (MeOH), grado CLAR, Scharlab S.L.
- Metanol (MeOH), grado CLAR, Tecsiquim.
- Metanol, grado ACS, J.T. Baker.
- Etanol, grado ACS, J.T. Baker.
- Isopropanol (IsoOH), grado CLAR, Fermont.
- Hexano, grado CLAR, Tecsiquim.

4.2 Métodos cromatográficos

4.2.1 Condiciones cromatográficas para la determinación de etiléntiourea

La determinación de etiléntiourea se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección ultravioleta a 230 nm. En la Tabla 4.1 se presentan las condiciones de trabajo optimizadas para la cuantificación de etiléntiourea en matrices acuosas y orgánicas (acetonitrilo y metanol).

Tabla 4.1. Condiciones cromatográficas para la determinación de etiléntiourea.

Columna	Matriz	Modo	Fase móvil	Flujo
PRP-1 (fase reversa polimérica)	Acuosa	Isocrático	Agua-MeOH 95-5 (v/v)	1 mL min ⁻¹
Hypercarb (fase reversa carbón grafitizado)	Acuosa	Isocrático	Agua-AcCN 95-5 (v/v)	0.3 mL min ⁻¹
APS-2 Hypersil (fase normal)	Orgánica	Isocrático	Hexano-EtOH 60-40 (v/v)	1 mL min ⁻¹

Para los tres métodos cromatográficos establecidos se verificaron los principales parámetros analíticos como: intervalo lineal de concentración, precisión, exactitud y límite de detección.

a) Intervalo lineal

La linealidad del instrumento se evaluó inyectando por triplicado 10 disoluciones de ETU en el intervalo de 0.05-20 mg L⁻¹. Las curvas de calibración se trazaron en diferentes días, a partir de disoluciones de ETU preparadas cada día a los diferentes niveles de concentración (muestras

independientes). Al graficar el valor de área obtenido para cada valor de concentración, se realizó el ajuste por mínimos cuadrados de las rectas obtenidas con el software Excel® de Microsoft Office Professional Edition 2003.

b) Precisión

Para evaluar la precisión del instrumento se realizaron 3 inyecciones de la disolución estándar de ETU de 0.05 mg mL^{-1} . El análisis de datos se realizó mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variabilidad (%CV) descrito en el anexo 1.

c) Exactitud

El parámetro de exactitud instrumental fue calculado a partir de la inyección de 3 disoluciones independientes de ETU de concentración igual a 5 mg mL^{-1} . Con los valores de área determinados y los parámetros de regresión calculados de las curvas del intervalo lineal, se determinó la concentración de cada estándar y se comparó con el valor conocido (5 mg mL^{-1}).

d) Límite de detección experimental

Se realizaron 7 inyecciones de una disolución blanco (disolución preparada en ausencia de ETU). Con los valores de área determinados se calcularon la media y su desviación estándar. El límite de detección se reporta de acuerdo con lo establecido por Miller y Miller⁽¹⁵⁸⁾ descrito en el anexo 1.

4.2.2 Condiciones cromatográficas para la determinación de bencimidazoles. Tiabendazol, carbendazim y benomil

La determinación de los bencimidazoles se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección ultravioleta. El monitoreo de tiabendazol se verificó a 305 nm, mientras que el carbendazim y benomil a 240 nm. Las condiciones cromatográficas y el programa de gradiente optimizado para la separación de los 3 bencimidazoles se presentan en las Tablas 4.2 y 4.3.

Tabla 4.2. Condiciones cromatográficas para la determinación de bencimidazoles.

Columna	Modo
ODS Hypersil (fase reversa)	Gradiente Disolución A: CH ₃ COOH al 2% Disolución B: acetonitrilo

Tabla 4.3. Programa de gradiente empleado para la separación de bencimidazoles.

Tiempo (min)	%B
0	0
4	20
14	20
26	100

4.3 Polímeros impresos para Etiléntiourea

4.3.1. Metodología de síntesis de los materiales impresos

Todos los materiales impresos para etiléntiourea fueron obtenidos con el método de **polimerización en bloque vía radicales libres**, y el formato de impresión **no covalente**. Para cada ensayo de síntesis se preparó una mezcla que contenía el(los) monómero(s) funcional(es), el analito-plantilla, el entrecruzador y el iniciador en cantidades conocidas, en un volumen determinado de disolvente porógeno. En algunos casos, la mezcla de reacción fue burbujeada con N₂ gaseoso durante 10 minutos para eliminar el O₂ presente. Los contenedores de la mezcla fueron sellados y sumergidos en un baño de agua a temperatura controlada (60 °C), hasta que el polímero solidificó completamente (24 h). El sólido obtenido fue molido y empacado en jeringas de polipropileno, a través de las cuales se percoló una disolución de HClO₄ 0.1 M en MeOH. La finalidad de dicho tratamiento fue la de remover en su totalidad la molécula plantilla utilizada durante la síntesis del material impreso, dejando libres los sitios de reconocimiento para etiléntiourea.

Paralelamente, en la preparación de cada material impreso también se sintetizó un blanco de polimerización, el cual fue sintetizado bajo las mismas condiciones de reacción pero sin la adición de molécula plantilla.

4.3.1.1 Ensayos preliminares. Uso de AMA como monómero funcional, evaluación del disolvente porógeno

En una primera etapa de este trabajo de investigación se utilizó ácido metacrílico como monómero funcional y EGDMA como agente de entrecruzamiento, se verificó el desempeño de cuatro disolventes porógeno sobre la impresión molecular de ETU. En la Tabla 4.4 se resumen las composiciones de las mezclas de reacción ensayadas para la síntesis del polímero.

Tabla 4.4. Condiciones de síntesis para la obtención de los materiales impresos con AMA como monómero funcional.

Polímero	1	2	3	4
Porógeno	<i>MeOH</i>	<i>AcCN</i>	<i>IsoOH</i>	<i>MeOH-H₂O 4:1</i>
Monómero funcional	Ácido metacrílico			
Agente entrecruzador	Etilenglicol dimetacrilato			
Iniciador	Azo-isobutironitrilo			
Relación en mol Plantilla-Monómero-Entrecruzante	1:8:40			
Relación Unidades polimerizantes-Disolvente porógeno (v/v)	3:4			
Relación en mol Unidades polimerizantes-Iniciador	100:1			

4.3.1.2 Evaluación de mezclas de monómeros funcionales

Posteriormente se probaron diferentes mezclas de monómeros funcionales y relaciones plantilla-monómero₁-monómero₂-entrecruzante para tratar de imprimir el analito de interés en el material polimérico (Tabla 4.5).

Tabla 4.5. Condiciones de síntesis para la obtención de los materiales impresos con mezclas de monómeros.

Polímero	5	6	7
Monómeros funcionales	AMA y ACA	AMA y 4-VP	ACA y 4-VP
Agente entrecruzador	Etilenglicol dimetacrilato		
Porógeno	MeOH	AcCN	AcCN
Iniciador	Azo-isobutironitrilo		
Relación en mol Plantilla-Monómero ₁ -Monómero ₂ -Entrecruzante	1:4:4:40	1:2:2:20	1:2:2:20
Relación Unidades polimerizantes-Disolvente porógeno (v/v)	3:8	3:8	3:8
Relación en mol Unidades polimerizantes-Iniciador	100:1		

4.3.1.3 Efecto de la proporción de Acrilamida:4-Vinilpiridina sobre las propiedades del material adsorbente

Debido a los resultados de mínima retención no específica y mejores porcentajes de recobro, se tomó como material base de composición el número 7, constituido de acrilamida y 4-vinilpiridina, para llevar a cabo el estudio del efecto de la proporción de estos reactivos sobre la impresión molecular de la etiléntiourea. Para ello se seleccionaron tres relaciones de composición de acrilamida y 4-vinilpiridina diferentes a la del polímero 7, manteniendo constantes los demás parámetros de la síntesis. En la Tabla 4.6 se resumen las proporciones de los reactivos utilizados en estos nuevos sistemas.

Tabla 4.6. Condiciones de síntesis para la obtención de los materiales impresos variando proporción de reactivos.

Polímero	8	9	10
Monómeros funcionales	ACA y 4-VP	ACA y 4-VP	ACA y 4-VP
Agente entrecruzador	Etilenglicol dimetacrilato		
Porógeno	AcCN		
Iniciador	Azo-isobutironitrilo		
Relación en mol ETU-ACA-4-VP-EGDMA	1:0:4:20	1:4:0:20	1:1:3:20
Relación Unidades polimerizantes-Disolvente porógeno (v/v)	3:8	3:8	3:8
Relación en mol Unidades polimerizantes-Iniciador	100:1		

4.3.1.4 Efecto de la proporción de disolvente porógeno en la mezcla de reacción

Para llevar a cabo el estudio del efecto de la cantidad del disolvente porógeno sobre la impresión molecular de la ETU, y debido a los resultados obtenidos mediante los ensayos de EFS, se seleccionaron las condiciones de síntesis de los materiales **7** y **10**. Las relaciones unidades polimerizantes-porógeno que se pretendían ensayar en esta parte del trabajo fueron la **3:4** y la **3:12 (v/v)**. Sin embargo, al intentar preparar la mezcla de reacción con la relación **3:4**, no fue posible disolver en su totalidad la cantidad requerida de molécula plantilla, por lo que solamente la relación **3:12** fue evaluada. En la Tabla 4.7 se resumen las condiciones de síntesis de los nuevos polímeros preparados. Los resultados de EFS obtenidos con estos nuevos materiales fueron comparados con los observados cuando la relación utilizada fue la **3:8**.

Tabla 4.7. Condiciones de síntesis para la obtención de los materiales impresos variando la cantidad de porógeno.

Polímero	11	12
Monómeros funcionales	ACA y 4-VP	
Agente entrecruzador	Etilenglicol dimetacrilato	
Porógeno	AcCN	
Iniciador	Azo-isobutironitrilo	
Relación en mol ETU-ACA-4-VP-EGDMA	1:2:2:20	1:1:3:20
Relación Unidades polimerizantes-Disolvente porógeno (v/v)	3:12	
Relación en mol Unidades polimerizantes/ Iniciador	100:1	

4.3.2 Caracterización cromatográfica de los materiales poliméricos

La evaluación del grado de impresión de etiléntiurea en cada uno de los materiales sintetizados se llevó a cabo mediante ensayos de extracción en fase sólida fuera de línea. En estos ensayos se probaron diferentes disolventes y disoluciones con el fin de optimizar las etapas de carga, lavado y elución del proceso de EFS. La velocidad de flujo se mantuvo en 1 mL min⁻¹. La selección del disolvente o disolución adecuados para cada etapa, se basó en un cuidadoso seguimiento de la etiléntiurea a lo largo de todo el proceso. La cuantificación de ETU se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución en modo de fase normal o fase reversa con detección UV a 230 nm.

Con el fin de completar la caracterización cromatográfica de los materiales **11** y **12**, se realizaron experimentos de EFS, variando la concentración de ETU en la disolución de carga y el volumen cargado. Adicionalmente, con el polímero **12** se efectuó un estudio de retención por análisis frontal, donde se utilizó un flujo de 0.6 mL min^{-1} .

4.3.2.1 Variación del volumen de la disolución de carga a cantidad cargada constante

Durante el paso de carga en experimentos de extracción en fase sólida, una cantidad constante y conocida de ETU ($1.3 \mu\text{g}$), contenida en diferentes volúmenes de acetonitrilo (Tabla 4.8), fue percolada a través de los cartuchos empacados con aproximadamente 0.5 g de los polímeros sintetizados. En todos los ensayos, el acondicionamiento, lavado y elución fueron realizados como a continuación se describe:

- Acondicionamiento: 10 mL de acetonitrilo puro.
- Lavado: 5 mL de acetonitrilo.
- Elución: 5 mL de una disolución de $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.1 M en MeOH .

Tabla 4.8. Condiciones de variación del volumen en la etapa de carga.

Volumen disolución ETU (mL)	Concentración disolución ETU ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cantidad total de ETU cargada (μg)
2	0.65	1.3
5	0.26	
10	0.13	
25	0.052	
50	0.026	
100	0.013	
200	0.007	

4.3.2.2 Variación de la concentración de la disolución de carga y de la cantidad cargada

Se realizaron experimentos de EFS variando la cantidad de ETU disuelta en un volumen de carga constante de 50 mL (Tabla 4.9). Las condiciones de acondicionamiento, lavado y elución del cartucho fueron las descritas en el apartado 4.3.2.1.

Tabla 4.9. Condiciones de variación de la concentración de ETU.

Volumen disolución ETU (mL)	Concentración disolución ETU ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cantidad de ETU cargada (μg)
50	0.06	3.0
	0.1	5.0
	0.15	7.5
	0.25	12.5
	0.65	32.5

4.3.2.3 Análisis Frontal

Los frentes de migración de ETU en cartuchos empacados con el PIM y el PB fueron obtenidos mediante la percolación de disoluciones de concentración conocida del analito en acetonitrilo (influyente). Cada cartucho fue previamente acondicionado con el mismo disolvente. La disolución emergente del cartucho (efluente), fue recolectada en pequeñas fracciones de volumen conocido para su posterior cuantificación por CLAR. El paso de la disolución de ETU a través del cartucho fue mantenido únicamente hasta que los valores de concentración en el influyente y en el efluente se igualaron. La velocidad de flujo de la disolución percolada se mantuvo constante a 0.6 mL min^{-1} durante todo el experimento. El análisis frontal se realizó para las siguientes concentraciones de ETU en el influyente: 0.05, 0.1, 0.15, 0.25, 0.4 y $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.3.2.4 Perfiles de elución

Una vez que todos los sitios de adsorción en el PIM se encontraron ocupados por moléculas de etiléntiourea (estado de saturación o equilibrio), se realizó el proceso de desorción del analito con una disolución de acetato de amonio 0.1 M en MeOH al mismo flujo de 0.6 mL min^{-1} . El efluente fue recolectado en pequeñas fracciones de volumen conocido y cuantificado por CLAR.

4.4 Polímeros impresos para bencimidazoles

4.4.1 Metodología de síntesis de los materiales impresos

Los materiales impresos para los bencimidazoles fueron preparados con tiabendazol (TBZ) como molécula plantilla y fueron obtenidos con el método de **polimerización por precipitación vía radicales libres**, bajo el formato de impresión **no covalente**.

Para la síntesis de los polímeros impresos se utilizó ácido metacrílico (AMA) como monómero funcional, divinilbenceno (DVB) como agente de entrecruzamiento y azoisobutironitrilo (AIBN) como iniciador de la polimerización. El porógeno utilizado fue una mezcla de acetonitrilo-tolueno (3:1, v/v).

4.4.1.1 Evaluación del volumen de disolvente porógeno. Pruebas preliminares

Se ensayaron tres volúmenes de disolvente porógeno: 2.5, 5 y 7.5 mL. Las mezclas de polimerización preparadas solo contenían el monómero funcional, el agente de entrecruzamiento, el AIBN y el disolvente porógeno. Una vez obtenida una mezcla homogénea con ayuda de ultrasonido, los sistemas fueron cerrados y colocados en una estufa a 75 °C por 24 h. Transcurrido ese tiempo, los polímeros se dejaron curar a 40 °C durante 48 h para inactivar los radicales libres remanentes en la matriz polimérica.

De los tres sistemas obtenidos, el que presentó el mayor rendimiento y las mejores características de manejo (material completamente sólido), fue el que se preparó con 5 mL de

disolvente porógeno, por lo que este volumen fue seleccionado como el óptimo de trabajo (polímero 2 de la Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Condiciones de síntesis de los polímeros con AMA. Variación del volumen de porógeno.

Polímero	1	2	3
Monómero funcional	Ácido metacrílico		
Agente entrecruzador	Divinilbenceno		
Porógeno	Acetonitrilo-tolueno (3:1, v/v)		
Iniciador	Azo-isobutironitrilo		
Relación en mol Unidades polimerizantes-Iniciador	70:4		
Relación Unidades polimerizantes-Disolvente porógeno (v/v)	1:28	1:56	1:84

4.4.1.2 Síntesis del material impreso para bencimidazoles

En la Tabla 4.11 se resumen las condiciones de síntesis utilizadas en la obtención del material impreso para bencimidazoles.

Tabla 4.11. Condiciones de síntesis del polímero impreso para bencimidazoles.

Polímero	2
Monómero funcional	Ácido metacrílico
Agente entrecruzador	Divinilbenceno
Porógeno	Acetonitrilo-tolueno (3:1, v/v)
Iniciador	Azo-isobutironitrilo
Relación en mol TBZ-AMA-DVB	1: 5.5: 28.5
Relación en mol Unidades polimerizantes-Iniciador	70:4
Relación Unidades polimerizantes-Disolvente porógeno (v/v)	1:56

Con la finalidad de incrementar el tamaño de partícula del material impreso, y con ello obtener un material apropiado para su uso en columnas de extracción en fase sólida, la mezcla de polimerización se mantuvo en agitación controlada (a 300 rpm) durante el proceso de síntesis a 75 °C. El polímero obtenido fue tamizado, y las partículas con diámetro de entre 100 y 250 μm fueron seleccionadas y empacadas en un cartucho para remover la molécula plantilla con una mezcla de ácido acético- metanol (1:1 v/v).

De la misma forma se preparó un polímero no impreso (PB), en cuya síntesis no se utilizó molécula plantilla.

4.4.2 Evaluación del grado de impresión en el polímero

4.4.2.1 Optimización del proceso de extracción fuera de línea.

Alrededor de 300 mg del material polimérico fueron empacados en un cartucho de EFS, el cual fue acondicionado con 10 mL de acetonitrilo y cargado con 2 mL de una disolución acuosa de TBZ de concentración igual a 1 mg L⁻¹. Con la finalidad de encontrar la disolución de lavado adecuada, que eliminara por completo las interacciones no específicas que pudiese presentar el blanco de polimerización, se probaron mezclas de acetonitrilo-agua en diferentes proporciones utilizándose un volumen total de 5 mL.

Como disolución de elución se utilizó una mezcla de ácido acético glacial-MeOH en una relación 1:1 (v/v), la cual fue elegida por experiencias previas del grupo de investigación de C. Cacho con polímeros similares, verificándose que en el caso de este polímero impreso también eluyera cuantitativamente al analito. El volumen empleado de fase de elución fue de 12 mL. ⁽¹⁵⁷⁾

Los resultados obtenidos mostraron que era necesario utilizar acetonitrilo puro como fase de lavado para la eliminación completa de las interacciones no específicas presentadas por el blanco, por lo que las condiciones experimentales finalmente establecidas para los ensayos de extracción en fase sólida se detallan a continuación:

- Acondicionamiento del cartucho: 10 mL de acetonitrilo.
- Carga: 2 mL de una disolución de concentración conocida de TBZ.
- Lavado: 5 mL de acetonitrilo.
- Elución: 12 mL CH₃COOH-MeOH 1:1 (v/v).

4.4.2.2 Isothermas de adsorción. Caracterización físico-química del PIM

Con el protocolo de EFS optimizado, se procedió a llevar a cabo la caracterización físico-química del PIM mediante el trazo de las isothermas de adsorción de tres bencimidazoles: tiabendazol, benomil y carbendazim.

Como primera parte fue necesario determinar el tiempo de contacto requerido entre la fase de carga y el material impreso para alcanzar el equilibrio. Con este fin, se ensayaron cuatro diferentes tiempos: 0, 15, 30 y 60 min. El procedimiento utilizado fue el siguiente:

1. En un cartucho de EFS que contenía 25 mg del polímero impreso, el cual previamente había sido acondicionado, se vertió un volumen de 2 mL de una disolución acuosa del bencimidazol a concentración de 1 mg L⁻¹, bloqueando la salida para mantener todo el líquido en contacto con el adsorbente.
2. Se esperó a que transcurriera el tiempo de contacto elegido.
3. Se retiró la disolución del cartucho y se determinó la concentración por espectroscopia UV.
4. El cartucho se lavó con una mezcla de CH₃COOH-MeOH 1:1 (v/v), para eliminar completamente al analito adsorbido en el polímero, y se acondicionó para repetir el experimento.

La isoterma de adsorción de cada bencimidazol se obtuvo variando la concentración del analito en la disolución de carga y manteniendo esta última en el cartucho durante el tiempo previamente establecido.

4.4.2.3 Capacidad del polímero impreso para preconcentrar los analitos a partir de muestras de agua

Para realizar la preconcentración, aproximadamente 300 mg del PIM sintetizado fueron empacados en una columna de acero inoxidable de 50 x 4.6 mm de diámetro interno. La columna fue conectada a una bomba de CLAR y a un detector UV con arreglo de diodos. Por lo tanto, esta parte del trabajo se desarrolló utilizando la modalidad de EFS en línea, ya que la carga de la muestra, el lavado y la elución se realizaron monitoreando en continuo el efluente de la columna mediante el detector UV. El estudio de preconcentración se realizó para 3 bencimidazoles (tiabendazol, carbendazim y benomil) trabajando cada uno de ellos por separado.

a. Pruebas preliminares. Evaluación del sistema

Primeramente se llevaron a cabo ensayos de EFS en línea utilizando en la etapa de carga un volumen pequeño de una disolución relativamente concentrada de un solo bencimidazol con la finalidad de evaluar su perfil de elución sin problemas de cuantificación.

Las condiciones del experimento fueron:

- Acondicionamiento del cartucho: 10 mL de agua desionizada.
- Carga: 1 mL de una disolución de 1 ppm (1 mg L^{-1}) del bencimidazol en agua (equivalente a $1 \mu\text{g}$ de analito).
- Lavado: 5 mL de acetonitrilo.
- Elución: 10 mL de una disolución de CH_3COOH al 2% en agua.

b. Experimentos de preconcentración en línea

Posteriormente se realizaron experimentos de preconcentración, en los cuales, un volumen de disolución 100 veces mayor al inicialmente cargado a concentración 100 veces menor del bencimidazol, fue percolado a través del cartucho.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Carga: 100 mL de una disolución de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ del bencimidazol en agua (equivalente a $1 \mu\text{g}$ de analito).
- Lavado: 5 mL de acetonitrilo.
- Elución: 5 mL de una disolución de CH_3COOH al 2% en agua.

Ambos experimentos se realizaron con los tres bencimidazoles y los valores de tiempo de retención (t_r) y de área de pico para cada bencimidazol fueron determinados y comparados.

4.4.2.4 Diseño del sistema de preconcentración y determinación de los bencimidazoles en línea

En un sistema como el descrito en el punto anterior, los bencimidazoles pueden ser preconcentrados pero eluyen de la columna con el mismo tiempo de retención y, como sus espectros de absorción UV son semejantes, no es posible determinarlos al mismo tiempo. Sin embargo, si se intercala una válvula de conmutación automática y una columna cromatográfica de fase reversa (C_{18}) entre la columna de preconcentración que contiene al PIM y el detector, los

bencimidazoles eluidos al mismo tiempo de la columna del PIM podrán ser separados en la columna cromatográfica.

Durante las etapas de carga y lavado, la válvula insertada se mantiene en la posición de “carga” y los efluentes de la columna del PIM son enviados directamente a los desechos; mientras tanto, por la columna cromatográfica y el detector se hace circular una fase móvil constituida por una disolución de CH_3COOH al 2% en agua (es decir la fase antes empleada para eluir los bencimidazoles de la columna del PIM). Posteriormente, la válvula se conmuta a la posición de “inyección”, con lo cual la fase móvil pasa por la columna del PIM, desorbe a los bencimidazoles y los transfiere en línea a la columna cromatográfica. En total se hacen pasar 5 mL de CH_3COOH al 2% en agua a través de la columna del PIM. En estas condiciones, los solutos no migran en la columna cromatográfica de fase reversa, sino que son enfocados al principio de ésta. La separación posterior de los analitos se realiza por gradiente de elución, conmutando la válvula de nuevo hacia la posición de “carga” y haciendo pasar la fase móvil únicamente por la columna cromatográfica. En la Figura 4.1 se presenta el esquema del sistema en línea mostrando las líneas de flujo en las posiciones de “carga” e “inyección” de la válvula de conmutación.

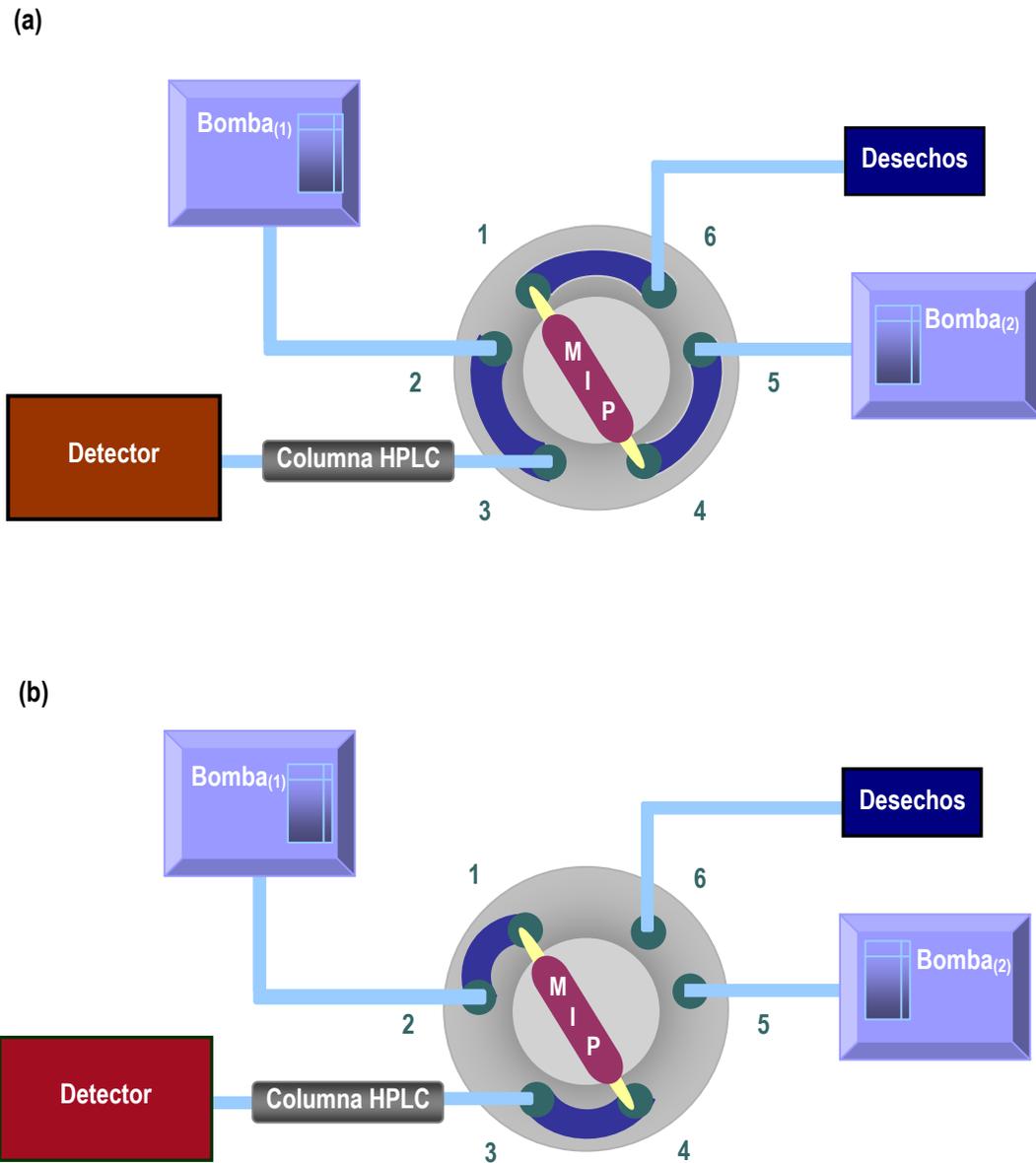


Figura 4.1. Esquema del sistema en línea con la válvula de conmutación en: (a) Posición de carga y (b) Posición de inyección.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Métodos para la cuantificación de etiléntiurea

Dentro de la caracterización y evaluación de los materiales impresos para ETU a partir de ensayos de extracción en fase sólida (EFS), un punto de suma importancia fue la determinación de la concentración de este compuesto en los efluentes de cada uno de los pasos que conforman un protocolo de EFS típico. La optimización de este procedimiento cromatográfico conlleva el uso de disolventes de diferente naturaleza en cada uno de los pasos que lo conforman, por lo que fue necesario desarrollar diferentes métodos que permitiesen la cuantificación de este analito tanto en disoluciones acuosas como orgánicas. La cuantificación de etiléntiurea se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección ultravioleta utilizando los modos de fase normal y fase reversa.

5.1.1 Selección de la longitud de onda de trabajo

Con la finalidad de seleccionar la mejor longitud de onda para el monitoreo de la etiléntiurea, se trazó el espectro de absorción en el ultravioleta de una disolución acuosa de este analito. En la Figura 5.1 se observa que este metabolito muestra dos máximos de absorción, de los cuales, el de 230 nm resulta ser el más adecuado ya que presenta un coeficiente de absorción mayor que el de 209 nm, por lo que se tiene una mejor sensibilidad de detección y la

posibilidad de determinar concentraciones más pequeñas de ETU. Además, cabe mencionar que la $\lambda = 209$ nm es muy poco selectiva y fácilmente pueden presentarse señales que interfieran con la detección del analito de interés. Por lo tanto, todas las determinaciones de ETU se realizaron a 230 nm.

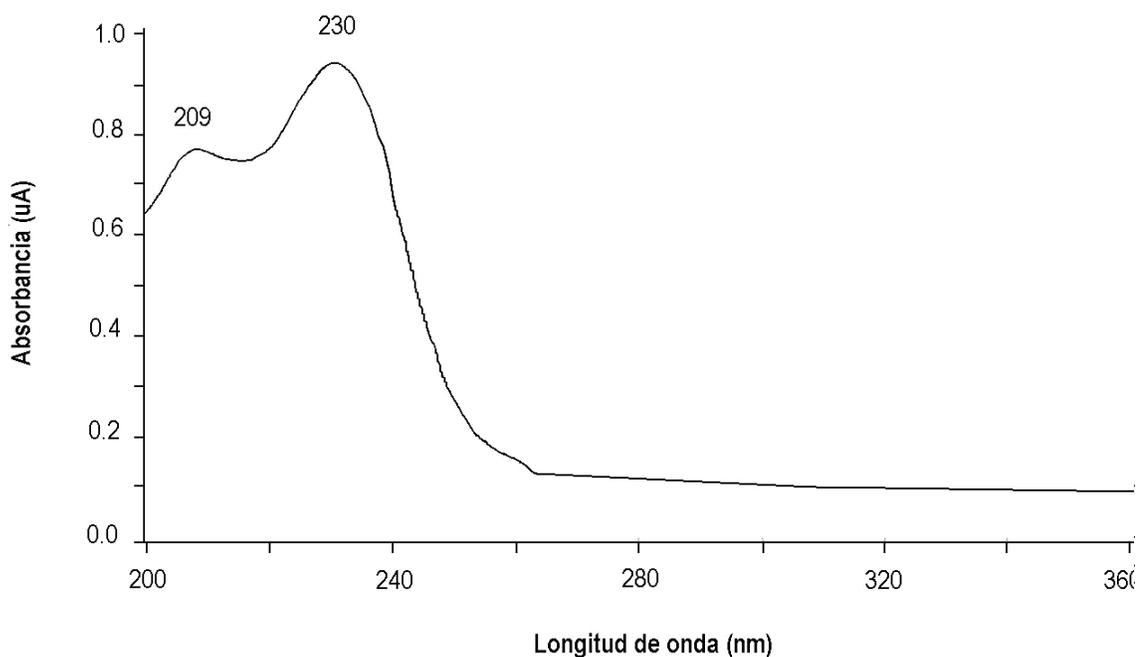


Figura 5.1. Espectro de absorción en el UV de una disolución acuosa de ETU a concentración de 20 mg L^{-1} .

5.1.2 Determinación de etiléntiourea en muestras acuosas

La cuantificación de ETU en disoluciones acuosas se realizó por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución en modo de fase reversa. Debido a que la etiléntiourea es una molécula pequeña, polar y muy poco hidrofóbica, fue necesario ensayar fases estacionarias con

un mayor poder de retención que las fases reversas típicas C₁₈. Las fases estacionarias poliméricas del tipo estireno-divinilbenceno y el carbón grafitizado han sido utilizados con éxito en la separación de compuestos muy polares, aunque su alta resistencia a la transferencia de masa provoca baja eficiencia y por lo tanto baja sensibilidad. Con base en estos antecedentes, en el presente trabajo se probaron dos tipos de columnas, una empacada con la fase polimérica (**PRP-1**) con tamaño de partícula de 10 µm y otra empacada con carbón grafitizado (**Hypercarb**) de 3 µm.

Todas las curvas de calibración presentadas en las siguientes secciones, se trazaron por triplicado en diferentes días a partir de muestras independientes (disoluciones de ETU preparadas cada día a los diferentes niveles de concentración ensayados).

a) Polimérica (PRP-1)

Utilizando como fase móvil una mezcla de H₂O-metanol (MeOH) 95:5 (v/v) a un flujo de 1 mL min⁻¹, se logró retener suficientemente al analito en la fase estacionaria sin un excesivo ensanchamiento del pico.

Con estas condiciones de composición y de flujo de la fase móvil se procedió a validar el método de cuantificación de ETU en muestras acuosas, para lo cual se determinó el área de los picos obtenidos al inyectar disoluciones de diferente concentración del analito. El límite superior de concentración de ETU en las muestras se fijó en 10 mg L⁻¹. Los datos se trataron estadísticamente de acuerdo con los criterios estipulados en el Anexo 1. Los parámetros de regresión y el factor de correlación de la curva de calibración se presentan en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de ETU en muestras acuosas utilizando una columna con fase estacionaria polimérica.

Parámetro	Valor
Intervalo lineal ($mg L^{-1}$)	0.05-10
Error típico ($S_{y/x}$, mV)	34
N	12
Pendiente (m)	767 ± 5
Ordenada al origen (b)	7 ± 30
Factor de correlación (R^2)	0.9999
Ecuación de regresión	$y = 767x + 7$

Los resultados obtenidos indican que este método presenta una respuesta lineal para concentraciones de etiléntiurea en el intervalo de 0.05 a 10 $mg L^{-1}$ (Figura 5.2).

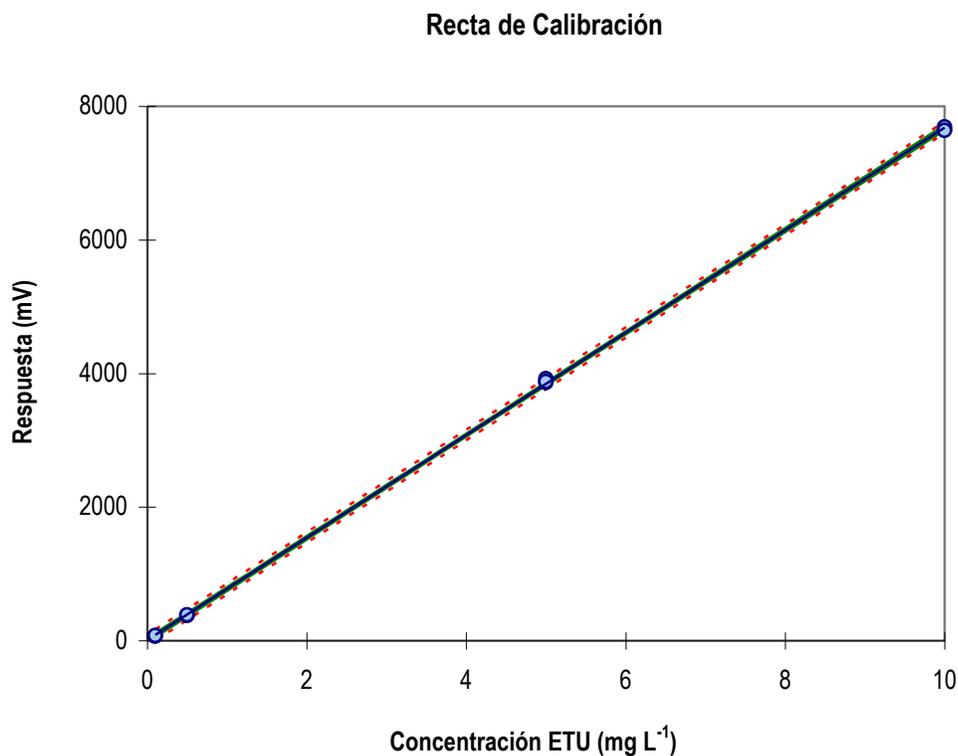


Figura 5.2. Curva de calibración para la cuantificación de ETU en muestras acuosas utilizando la columna polimérica PRP-1.

b) Carbón grafitizado (Hypercarb)

El carbón grafitizado es un adsorbente más hidrofóbico que las fases estireno-divinilbenceno, por ello en el caso presente se empleó como modificador orgánico de la fase móvil al acetonitrilo (5%) que es un eluyente más fuerte que el MeOH en fases reversas.

La validación del método de cuantificación de etiléntiourea en esta columna se realizó inyectando disoluciones de diferente concentración del analito y determinando su respuesta (área de pico). En la Tabla 5.2 se presentan los parámetros de regresión y de correlación del método

obtenidos a partir del tratamiento estadístico de los datos experimentales. Los resultados indican que este método de cuantificación de etiléntiurea presenta una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 10 mg L⁻¹. La representación gráfica de la curva de calibración obtenida por el método de mínimos cuadrados se presenta en la Figura 5.3.

Una desventaja de las fases estacionarias a base de carbón es su lenta cinética de adsorción-desorción, lo que se traduce en picos relativamente anchos y generalmente coleados. En consecuencia, como lo muestran los resultados de la Tabla 5.2, la precisión en la integración del área de pico es menor (error típico de regresión más grande) que el obtenido en la columna polimérica. No obstante, la sensibilidad de detección (evaluada por la pendiente de la curva de calibración) es mayor bajo las condiciones empleadas con la columna Hypercarb. Esto es lógico ya que la absorbancia de fondo en el UV a 230 nm es menor con fases móviles H₂O-AcCN que con H₂O-MeOH.

Tabla 5.2. Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de ETU en muestras acuosas utilizando una columna de carbón grafitizado.

Parámetro	Descripción
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	0.05-10
Error típico ($S_{y/x}$, mV)	103
N	12
Pendiente (m)	1557 ± 17
Ordenada al origen (b)	-40 ± 92
Factor de correlación (R^2)	0.9999
Ecuación de regresión	$y = 1557x - 40$

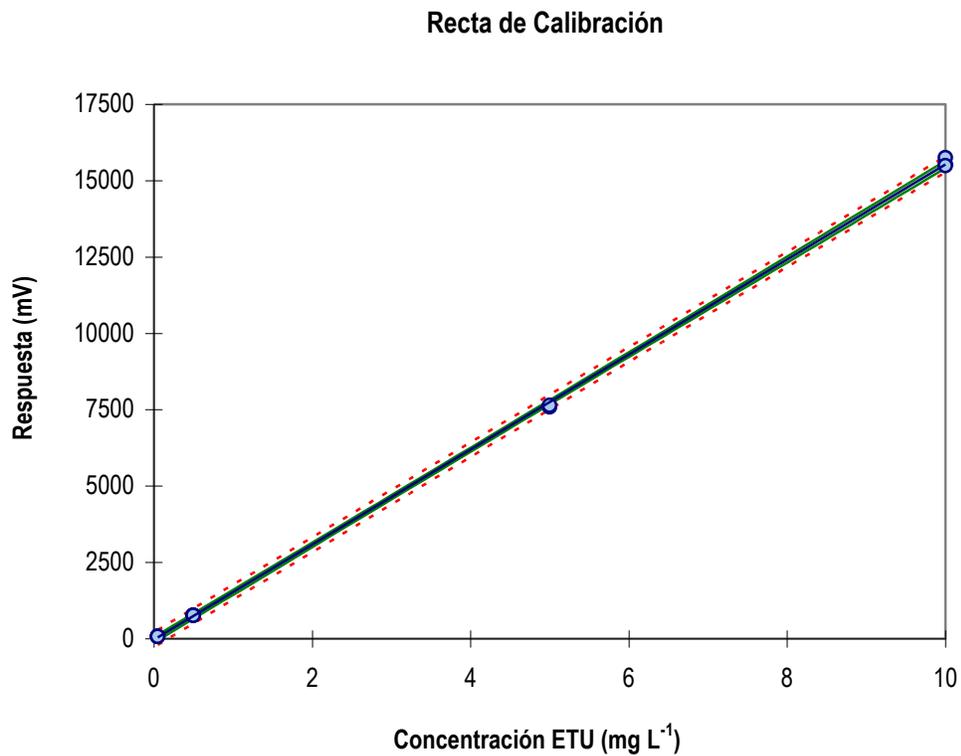


Figura 5.3. Curva de calibración para la cuantificación de ETU en muestras acuosas utilizando la columna de carbón grafitizado Hypercarb.

5.1.3 Determinación de etiléntiourea en muestras orgánicas

Cuando se pretende determinar algún contaminante polar en una matriz sólida, como suelos, sedimentos o tejido biológico, es usual realizar la extracción con un disolvente orgánico polar como metanol o acetonitrilo. Asimismo, en procesos de extracción en fase sólida fuera de línea también es común eluir al analito adsorbido con un pequeño volumen de uno de estos disolventes. En ambos casos, el extracto orgánico es posteriormente analizado por un método cromatográfico para cuantificar al compuesto de interés. Por esta razón se decidió poner a punto métodos de determinación de ETU en muestras de acetonitrilo o metanol por cromatografía de

líquidos.

Cabe destacar que los compuestos de muy baja hidrofobicidad no pueden ser inyectados en columnas de fase reversa cuando se encuentran disueltos en un disolvente orgánico porque, debido a su débil retención, el disolvente de muestra provoca que sean dispersados a lo largo del lecho estacionario durante la inyección, en vez de ser depositados como una banda fina. En estos casos se debe realizar una cromatografía de adsorción o una cromatografía en fase normal. En el presente trabajo se optó por la segunda, utilizando una columna amino (250 x 4.6 mm d.i.) **APS-2 Hypersil** de 5 μm .

Después de ensayar varias mezclas y proporciones de disolventes, se obtuvieron resultados satisfactorios con una fase móvil hexano-EtOH 70:30 (v/v) a un flujo de 1 mL min⁻¹. Las disoluciones de ETU evaluadas en el proceso de validación fueron preparadas en acetonitrilo o metanol como disolvente.

Todas las curvas de calibración presentadas en las siguientes secciones, se trazaron por triplicado en diferentes días a partir de muestras independientes (disoluciones de ETU preparadas cada día a los diferentes niveles de concentración ensayados).

a) Acetonitrilo

En la Tabla 5.3 se presentan los resultados obtenidos en el proceso de validación cuando se utilizó acetonitrilo como matriz de la muestra.

Tabla 5.3. Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de ETU en muestras de acetonitrilo utilizando la columna amino.

Parámetro	Valor
Intervalo lineal ($mg L^{-1}$)	0.05-5
Error típico ($S_{y/x}$, mV)	22
N	12
Pendiente (m)	517 ± 7
Ordenada al origen (b)	-5 ± 17
Factor de correlación (R^2)	0.9998
Ecuación de regresión	$y = 517x - 5$

Los resultados indican que el método para la cuantificación de etiléntiurea en muestras de acetonitrilo presenta una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 5 $mg L^{-1}$. La representación gráfica de la curva de calibración se muestra en la Figura 5.4.

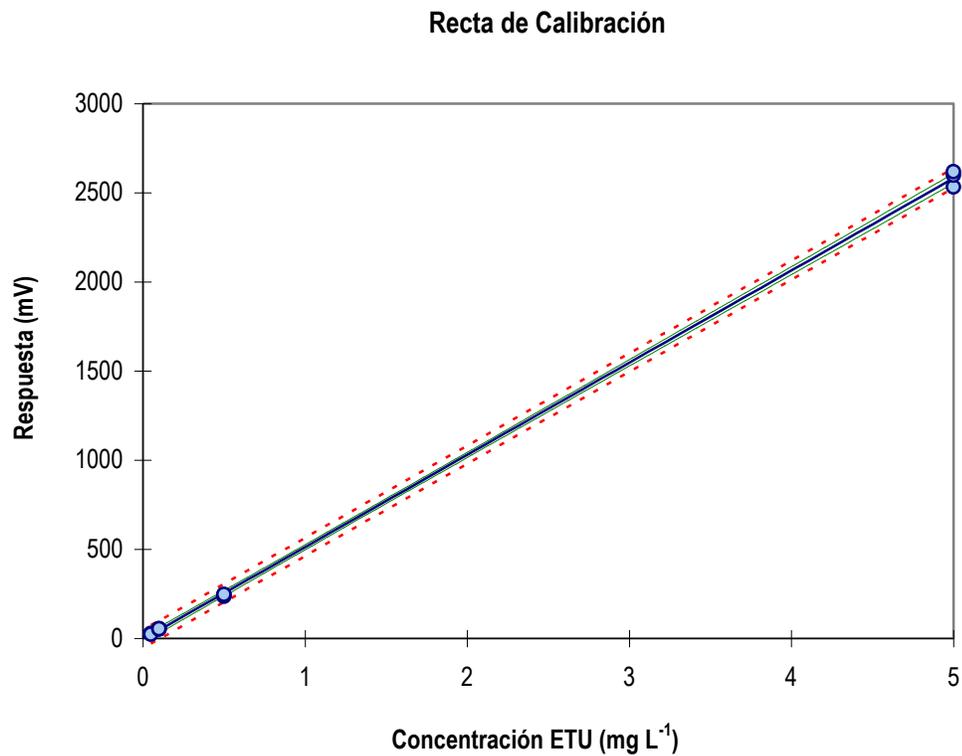


Figura 5.4. Curva de calibración para la cuantificación de ETU en muestras de acetonitrilo utilizando como fase estacionaria la columna amino.

b) Metanol

En la Tabla 5.4 se presentan los resultados obtenidos en el proceso de validación cuando se utilizó metanol como matriz de la muestra. El gráfico correspondiente a la curva de calibración se muestra en la Figura 5.5.

Tabla 5.4. Parámetros estadísticos de la validación del método de cuantificación de ETU en muestras de metanol utilizando la columna amino.

Parámetro	Valor
Intervalo lineal ($mg L^{-1}$)	0.05-5
Error típico ($S_{y/x}$, mV)	17
N	15
Pendiente (m)	396 ± 5
Ordenada al origen (b)	-5 ± 12
Factor de correlación (R^2)	0.9997
Ecuación de regresión	$y = 396x - 5$

En este caso, el método presentó una respuesta lineal en el intervalo de concentraciones de ETU de 0.05 a 5 $mg L^{-1}$. Comparando las Tablas 5.3 y 5.4 se constata que la matriz de la muestra afecta la respuesta del analito, obteniéndose mayor sensibilidad (mayor pendiente de la recta de calibración) cuando la ETU está disuelta en AcCN que cuando está disuelta en MeOH. Es de notar que el efecto de matriz sólo se presentó al nivel de la detección ya que la retención no fue afectada por este factor. Es posible que la etiléntiurea mantenga moléculas del disolvente inicial (MeOH o AcCN) en su esfera de solvatación durante su migración por la columna, y que sean éstas las que influyen en la mayor o menor absorbancia del soluto cuando éste se encuentra en la celda del detector. Sin embargo, se requiere un estudio más profundo de estos fenómenos para poder avalar la hipótesis planteada. En todo caso, los resultados obtenidos confirman la importancia de preparar los estándares de calibración en el mismo disolvente que la muestra problema para poder tener una cuantificación confiable.

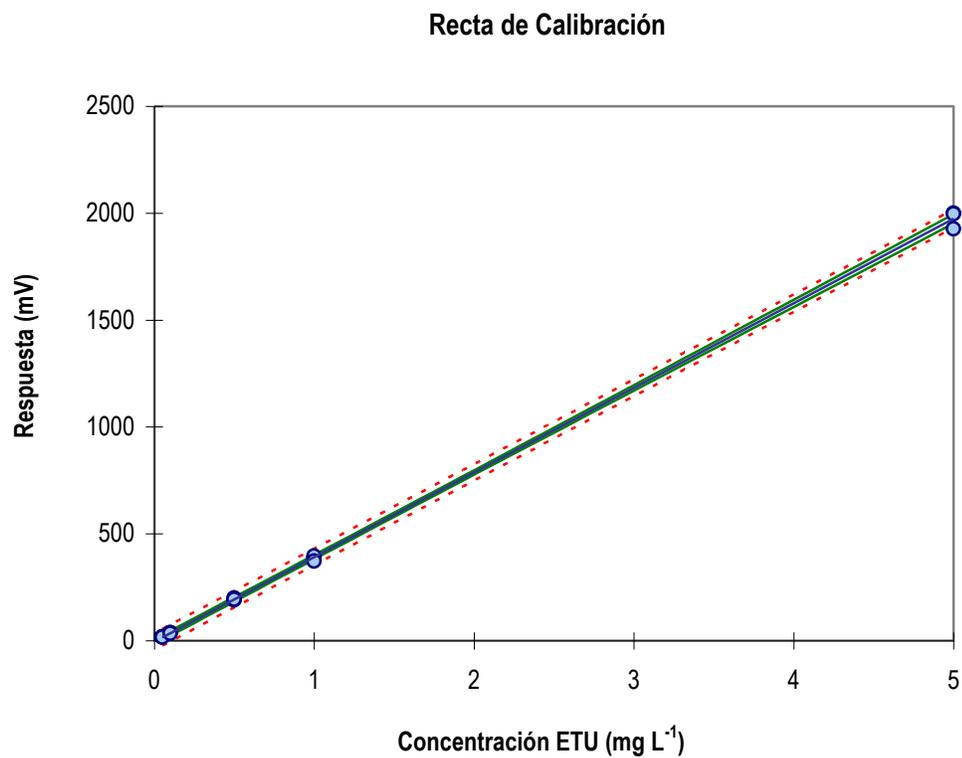


Figura 5.5. Curva de calibración para la cuantificación de ETU en muestras de metanol utilizando como fase estacionaria la columna amino.

Para las tres metodologías desarrolladas, tanto en muestras acuosas como orgánicas, el límite de detección experimental se determinó con la relación señal/ruido= 3, resultando en todos los casos del orden de 0.01 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

5.1.4 Parámetros estadísticos de los métodos desarrollados

a) Análisis de la ordenada al origen (b)

De acuerdo con el Anexo 1 se plantearon las pruebas de hipótesis necesarias para el análisis de la ordenada al origen de las curvas de calibración de los métodos desarrollados. Con los datos experimentales se calculó el valor del estadístico t y se comparó con el respectivo valor de tablas ($t_{critica}$). Los resultados de esta prueba se resumen en la Tabla 5.5.

Tabla 5.5. Parámetros de la prueba de hipótesis sobre el valor de la ordenada. Nivel de confianza $\alpha=0.05$.

Muestra	Método	Columna	$t_{calculada}$	$t_{critica}$	Decisión
ETU en agua	Fase reversa	Polimérica	0.53	2.23	Aceptar H_0
ETU en agua	Fase reversa	Carbón grafitizado	-0.97	2.23	Aceptar H_0
ETU en AcCN	Fase normal	Amino	-0.67	2.23	Aceptar H_0
ETU en MeOH	Fase normal	Amino	-0.83	2.16	Aceptar H_0

Como en todos los casos el valor de $t_{calculada}$ fue menor que el de $t_{critica}$, la hipótesis nula se acepta, es decir, el valor de la ordenada al origen de las cuatro curvas de calibración es igual a cero, por lo que no existen errores de tipo sistemático en los métodos de cuantificación propuestos.

b) Análisis de la pendiente (*m*)

Para corroborar la existencia de una dependencia entre el parámetro de medición (área de pico) y la concentración de etiléntiourea, se realizaron las correspondientes pruebas de hipótesis sobre la pendiente de acuerdo con lo descrito en el anexo 1.

Los resultados de esta prueba se presentan en la Tabla 5.6. Para las cuatro condiciones de análisis examinadas el valor de $t_{calculada}$ fue mayor que el de $t_{critica}$ por lo que se rechaza la hipótesis nula, es decir, en todos los casos el valor de la pendiente es mayor que cero, lo que indica que existe una dependencia entre el área de pico y la concentración de las disoluciones de etiléntiourea.

Tabla 5.6. Parámetros de la prueba de hipótesis sobre el valor de la pendiente. Nivel de confianza $\alpha=0.05$.

Muestra	Método	Columna	$t_{calculada}$	$t_{critica}$	Decisión
ETU en agua	Fase reversa	Polimérica	313.8	1.81	Rechazar H_0
ETU en agua	Fase reversa	Carbón grafitizado	210.1	1.81	Rechazar H_0
ETU en AcCN	Fase normal	Amino	169.9	1.81	Rechazar H_0
ETU en MeOH	Fase normal	Amino	166.2	1.77	Rechazar H_0

c) Precisión

Con la finalidad de evaluar el grado de dispersión de los resultados obtenidos en análisis repetidos de una muestra, se prepararon disoluciones de ETU a concentración de 0.05 mg L^{-1} en

agua, acetonitrilo y metanol, y cada una se inyectó por triplicado en la columna apropiada, bajo las condiciones establecidas en cada método. El coeficiente de variabilidad (%CV) de la respuesta para cada muestra se reporta en la Tabla 5.7. En todos los casos se obtuvo un CV < 5%, lo cual indica que los 3 métodos cromatográficos desarrollados para la determinación de etiléntiourea en diferentes matrices de muestra son precisos a este nivel.

Tabla 5.7. Coeficiente de variabilidad del área de pico para una concentración de 0.05 mg L⁻¹ de etiléntiourea (n= 3).

Método	Columna	%CV
ETU en agua	Polimérica	3.7
ETU en agua	Carbón grafitizado	3.2
ETU en AcCN	Amino	4.3
ETU en MeOH	Amino	4.8

d) Exactitud

Posteriormente se evaluó la exactitud de los métodos desarrollados a partir del valor promedio de la señal obtenida (área de pico, n= 3) en el análisis de disoluciones de etiléntiourea a concentración de 5 mg L⁻¹ (muestras independientes de las utilizadas para el trazo de las curvas de calibración). Mediante la ecuación de la curva de calibración y sus estadísticos, se calculó la concentración del analito en las muestras con su intervalo de confianza y se comparó con el valor real. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.8. Como puede observarse, la concentración real y la concentración calculada son estadísticamente iguales ya

que la primera está comprendida dentro del intervalo de confianza de la segunda. La diferencia máxima entre ambos valores fue de 1.6% y se presentó en el caso del análisis de disoluciones de ETU en agua por cromatografía en fase reversa con la columna de carbón grafitizado.

Tabla 5.8. Valores de exactitud para una concentración de 5 mg L⁻¹ de etiléntiourea (n= 3).

Muestra	Columna	C _{real} (mg L ⁻¹)	C _{calculada} (mg L ⁻¹)	Error relativo
ETU en agua	Polimérica	5	5.06 ± 0.10	1.2
ETU en agua	Carbón grafitizado	5	4.92 ± 0.15	1.6
ETU en AcCN	Amino	5	5.00 ± 0.11	0
ETU en MeOH	Amino	5	5.00 ± 0.11	0

5.2 Polímeros impresos para etiléntiourea

Para evitar ambigüedades, en la presente sección se denominará como “polímeros dopados” (PD) a los materiales poliméricos sintetizados en presencia de molécula plantilla (independientemente de que se haya o no logrado la impresión molecular de ésta), mientras que los materiales preparados en ausencia de plantilla serán llamados “polímeros blanco” (PB).

Todos los materiales obtenidos fueron tratados con una disolución de HClO₄ 0.1 M en metanol justo después del proceso de síntesis. Ensayos previos habían demostrado que la etiléntiourea (ETU) disuelta en medio muy ácido se degrada rápida y totalmente. Por lo tanto, la finalidad del tratamiento fue remover de la matriz polimérica las moléculas de la plantilla que fue utilizada para generar los sitios de impresión. En el caso de los polímeros blanco el tratamiento tuvo por objeto el que estos materiales de comparación estuvieran sometidos a condiciones idénticas a las de los polímeros dopados de interés.

5.2.1 Ensayos preliminares. Uso de AMA como monómero funcional, evaluación del disolvente porógeno

Como se indicó en la sección experimental (sección 4.3.1.1, Tabla 4.4), se prepararon cuatro materiales poliméricos con ácido metacrílico como monómero funcional, en los cuales sólo se varió el disolvente porógeno (MeOH, AcCN, IsoOH y MeOH-H₂O 4:1, v/v),

Diversos trabajos han señalado que las condiciones de carga, lavado y elución son críticas para poner en evidencia la existencia de cavidades molecularmente impresas en los polímeros en evaluación. Por ello, con cada uno de los materiales preparados se probaron numerosas combinaciones de los disolventes o mezclas enlistados en la Tabla 5.9.

Tabla 5.9. Disoluciones y disolventes ensayados en los experimentos de EFS para la evaluación de los polímeros sintetizados.

Acondicionamiento	Carga	Lavado	Elución
MeOH	MeOH	MeOH	NaOH 0.01 M en H ₂ O -MeOH 1:1 v/v
AcCN	AcCN	AcCN	NaOH 0.01 M en H ₂ O-IsoOH 1:1 v/v
IsoOH	IsoOH	IsoOH	CH ₃ COOH 0.1 M en MeOH
EtOH	EtOH	H ₂ O	HCOOH 0.1 M en MeOH
H ₂ O	H ₂ O	EtOH	CH ₃ COOH 0.1 M + Cu ²⁺ 0.1 M en MeOH
IsoOH-acetona 3:1 v/v	MeOH-H ₂ O 1:1 v/v	MeOH-AcCN 1:1 v/v	CH ₃ COOH 0.1 M + Cu ²⁺ 0.1 M en MeOH- AcCN 1:1 v/v
	AcCN-H ₂ O 1:1 v/v		

Sin embargo, los resultados obtenidos en la caracterización de los cuatro materiales y sus respectivos blancos de polimerización mediante experimentos de EFS no fueron satisfactorios.

En el caso de los polímeros blanco, aunque se realizaron numerosos ensayos de extracción en fase sólida, no fue posible encontrar condiciones en las cuales se pudiera recuperar, en los efluentes de carga y lavado, la cantidad total de ETU cargada. En el mejor de los casos, en el polímero

sintetizado con acetonitrilo, el porcentaje de ETU determinado en los efluentes de carga y lavado solo fue del 75% con respecto a la cantidad total percolada. Por otra parte, no se detectó presencia de ETU en el efluente de elución, lo que indica que una fracción del analito quedó fuertemente retenida en el cartucho. Para evitar la contaminación cruzada de un ensayo a otro, y sabiendo que la etiléntiurea es inestable en medios muy ácidos, en el protocolo de EFS se incluyó una etapa final de regeneración del adsorbente mediante un abundante lavado con HClO_4 0.1 M en MeOH, seguido de un lavado con MeOH puro para desalojar al ácido.

Los polímeros preparados en presencia de plantilla utilizando como porógeno al isopropanol o a la mezcla MeOH-agua 4:1 (v/v), tuvieron un comportamiento similar al de los polímeros blanco en los experimentos de EFS. Es decir, una parte de la ETU se fugó del cartucho durante las etapas de carga y lavado, y otra fracción quedó retenida tan fuertemente que no logró recuperarse con ninguno de los disolventes de elución ensayados. En el caso de los polímeros obtenidos utilizando metanol o acetonitrilo como disolvente porógeno, la retención de la ETU fue prácticamente nula ya que casi todo el analito fue recuperado en los efluentes de la carga y el lavado.

Los resultados anteriores llevaron a la conclusión de que no era posible lograr la impresión molecular de la etiléntiurea en un polímero a base de ácido metacrílico. La baja basicidad de la ETU (pKa estimado 2.09) probablemente no favorece la interacción de sus grupos amino con el grupo ácido carboxílico del monómero funcional; por ello, se piensa que el complejo ETU-monómero no se formó en la mezcla de reacción previo a la polimerización. Por otra parte, la fuerte retención no-específica de una fracción de la ETU en todos los cartuchos de polímero blanco y en los de polímero dopado preparado con IsoOH o MeOH-agua como porógeno, pudo ser debida a una de las alternativas siguientes (o a ambas):

- 1) Presencia aleatoria de sitios activos (de adsorción) muy fuertes en la superficie del sólido. Estos sitios pudieron ser debidos a alguna sustancia presente en la mezcla de prepolimerización (e.g. inhibidor, iniciador o impureza), la cual quedó fijada en regiones expuestas de la superficie cuando el polímero solidificó.

- 2) Formación de una estructura polimérica altamente microporosa (Fig. 3.5 pag. 34), en la cual los solutos (aún tan pequeños como la ETU) difunden muy lentamente y pueden quedar físicamente atrapados. Durante la etapa de carga del cartucho, la concentración del soluto en la disolución percolada es relativamente importante por lo que hay una alta probabilidad de que algunas moléculas penetren y se difundan en los canales microporosos. Estas moléculas, serán difícilmente desalojadas durante las etapas de lavado o elución, aunque no estén interaccionando con el polímero.

Es sabido que la estructura de algunos materiales poliméricos preparados en presencia y en ausencia de moléculas dopantes es significativamente diferente. Por ejemplo, se ha reportado que el volumen poroso y el tamaño de poro de los polímeros sol-gel dopados son considerablemente mayores que los de sus respectivos geles blanco⁽¹⁵⁹⁻¹⁶⁰⁾. Esto podría explicar el hecho de que en el presente trabajo los polímeros blanco retuvieran sistemáticamente una fracción de la ETU, la cual no pudo ser posteriormente eluida (porque no estaba retenida por interacción con el polímero sino atrapada en microporos). Dos de los polímeros dopados se comportaron de la misma manera que los blancos, tal vez porque el porógeno empleado (IsoOH y MeOH-H₂O) no era adecuado para generar poros más grandes. En los otros dos polímeros, la retención de la ETU fue prácticamente nula (porque no estaban impresos), pero esto también significa que el MeOH y el AcCN puros, usados como porógenos, fueron capaces de crear una estructura con poros de mayor tamaño.

Con base en las consideraciones anteriores, se decidió intentar la impresión molecular de la ETU con otros monómeros funcionales, manteniendo como disolvente porógeno al metanol o al acetonitrilo.

5.2.2 Evaluación de mezclas de monómeros funcionales

Algunos trabajos reportados en la literatura sugieren el uso de mezclas de monómeros funcionales, en vez de uno sólo, para imprimir moléculas de tipo polar⁽¹⁶¹⁻¹⁶²⁾. Por ello, se ensayaron las mezclas de monómeros descritas en la parte experimental (sección 4.3.1.2, Tabla 4.5). Las condiciones de síntesis inicialmente probadas fueron las que dieron resultados más satisfactorios para otras moléculas plantilla polares en los trabajos mencionados.

En las siguientes subsecciones se presentan los resultados obtenidos con los polímeros numerados 5, 6 y 7, que fueron preparados bajo las condiciones especificadas en la Tabla 4.5. Como referencia también se describen brevemente en cada caso las condiciones de síntesis más relevantes, es decir aquellas que se variaron entre los diferentes materiales.

a) Polímero 5

Este polímero fue preparado con una mezcla de ácido metacrílico (monómero 1) y acrilamida (monómero 2), usando como porógeno al MeOH. La relación plantilla – monómero 1 – monómero 2 – entrecruzador fue 1:4:4:40 en mol y la relación unidades polimerizantes – disolvente porógeno fue 3:8 en volumen. Con respecto a los polímeros de ácido metacrílico solo, discutidos en la sección

anterior, en el caso presente se incrementó la proporción de disolvente porógeno en la mezcla de reacción.

La caracterización del comportamiento del polímero y su respectivo blanco por EFS se realizó ensayando prácticamente todas las disoluciones y disolventes presentados en la Tabla 5.9, a excepción de las disoluciones que contienen cobre. Cabe mencionar que las disoluciones de elución que contienen cobre, descritas en esta tabla, fueron propuestas con la finalidad de que la interacción natural que se sabe puede existir entre moléculas que contienen azufre en su estructura, como lo es el caso de la ETU, y especies de cobre, favorecieran la elución de la etiléntiourea que había quedado retenida en el polímero, ya que al interactuar el cobre con el azufre de la ETU, se puede ver disminuida la interacción de esta molécula con la matriz del polímero. Debido a que no se observó algún efecto en la elución de la etiléntiourea al utilizar cobre, pero si un cambio de coloración del cartucho de EFS de blanco a ligeramente azul, producido por la retención de cobre, se decidió evitar su posterior uso.

Desafortunadamente, en ninguna de las pruebas realizadas con el cartucho del polímero blanco se logró recuperar la cantidad total de ETU percolada en los efluentes de la carga y el lavado. Por otra parte, aunque en esta ocasión sí se observó retención de una fracción del analito en el polímero dopado, sólo una pequeña parte de éste pudo ser recuperado durante la etapa de elución (10%).

Puesto que el comportamiento del polímero dopado fue muy similar al de su blanco, se concluye que en este caso tampoco se logró realizar la impresión de la molécula plantilla. Es evidente que la retención de una fracción de la ETU en los dos materiales fue debida al mismo fenómeno, aunque no se puede decir con certeza si se trató de un atrapamiento físico o una fuerte interacción química.

Cabe destacar que el polímero 5 y su blanco fueron sintetizados usando una mayor proporción de disolvente porógeno, con lo cual se esperaba disminuir la microporosidad en el sólido resultante. No obstante, sólo una parte marginal de la ETU retenida pudo ser eluida, por lo que no se descarta la persistencia de una red de canales sumamente estrechos en la estructura de la matriz polimérica.

b) Material 6

Este polímero fue preparado con una mezcla de ácido metacrílico (monómero 1) y 4-vinilpiridina (monómero 2), usando como porógeno al AcCN. La relación plantilla – monómero 1 – monómero 2 – entrecruzador fue 1:2:2:20 en mol y la relación unidades polimerizantes – disolvente porógeno fue 3:8 en volumen. Con respecto al material anterior (polímero 5), en el caso presente se incrementó la proporción de plantilla con la finalidad de favorecer la formación del complejo de prepolimerización y por tanto la creación de cavidades impresas.

Para los experimentos de EFS con este material también se ensayaron una gran variedad de disolventes y mezclas en las diferentes etapas del proceso. Las condiciones que condujeron a los mejores resultados, particularmente con el polímero blanco, se muestran en la Tabla 5.10.

Tabla 5.10. Condiciones de EFS utilizadas en la evaluación del polímero 6 y su blanco.

Paso	Condición
Acondicionamiento	10 mL de AcCN
Carga	2 mL de disolución de ETU (0.67 mg L ⁻¹) en AcCN
Lavado	5 mL de MeOH
Elución	5 mL de CH ₃ COOH 0.1 M en MeOH

Con este protocolo fue posible eliminar casi por completo la retención no específica de ETU en el cartucho de polímero blanco, ya que prácticamente toda la cantidad cargada fue recuperada en los efluentes de la carga y el lavado. Desafortunadamente, el recobro de la ETU en el eluyente del cartucho empacado con el polímero dopado fue de sólo el 14%, debido a que no todo el analito cargado fue retenido y de lo que se retuvo sólo una fracción fue eluida. Además el porcentaje de recobro no fue repetible al realizar réplicas del mismo experimento.

Los resultados alentadores obtenidos con el polímero blanco podrían indicar que la 4-vinilpiridina incorporada en la matriz polimérica mejora sus propiedades estructurales, haciendo posible la recuperación del soluto en los experimentos de EFS cuando se utilizan los disolventes adecuados en las etapas de carga y lavado. Aunque en este caso se utilizó como porógeno el AcCN (en vez del MeOH) y se incrementó la cantidad de plantilla, no se considera que estos parámetros hayan tenido una influencia definitiva en el aspecto estructural mencionado. Cabe recordar que el AcCN había ya sido utilizado como porógeno en los materiales fabricados con ácido metacrílico solo, sin que se obtuvieran resultados satisfactorios con el correspondiente polímero blanco.

En lo que se refiere al polímero dopado, la conjunción de grupos funcionales ácidos (del ácido metacrílico) y básicos (de la 4-vinilpiridina) no dio resultados satisfactorios en cuanto a la impresión de la plantilla. Por tal motivo, se decidió descartar definitivamente al ácido metacrílico como monómero funcional.

c) Material 7

El material 7 fue preparado con una mezcla de acrilamida (monómero 1) y 4-vinilpiridina (monómero 2), usando como porógeno al AcCN. La relación plantilla – monómero 1 – monómero 2 – entrecruzador fue 1:2:2:20 en mol y la relación unidades polimerizantes – disolvente porógeno fue 3:8 en volumen. Excepto por la naturaleza de uno de los monómeros, las condiciones de síntesis fueron idénticas a las del material inmediato anterior (polímero 6).

Bajo las condiciones de acondicionamiento, carga y lavado descritas en la tabla 5.11, fue posible eliminar la retención no específica de la ETU en el cartucho de polímero blanco.

Tabla 5.11. Condiciones para eliminar la retención no específica de ETU en el polímero 7 y su blanco.

Paso	Condición
Acondicionamiento	10 mL de AcCN
Carga	2 mL de disolución de ETU (0.67 mg L^{-1}) en AcCN
Lavado	5 mL de AcCN

En la Tabla 5.12 se reportan las cantidades de ETU que fueron determinadas en los efluentes de carga y lavado de los cartuchos, tanto de polímero dopado como de su respectivo blanco, en una serie de repeticiones del mismo ensayo.

Tabla 5.12. Cantidad total y porcentaje de ETU recuperada en los efluentes de carga y lavado del polímero 7 y su blanco^a.

Réplica	PD ^b (µg)	PB ^b (µg)
1	0.37 (28%)	1.44 (110%)
2	0.29 (22%)	1.32 (101%)
3	0.35 (27%)	1.38 (106%)
Media	0.34 (25%)	1.38 (106%)

^aLa cantidad total cargada fue 1.3 µg.

^bPD = polímero dopado, PB = polímero blanco.

En todas las réplicas del ensayo se observó que las interacciones no específicas en el blanco fueron eliminadas, mientras que en el polímero dopado quedó retenida alrededor del 75% de la cantidad cargada de ETU. Los valores obtenidos indican una buena repetibilidad del sistema. Cabe señalar que la variabilidad observada, así como los resultados ligeramente superiores al 100%, se atribuyen a que la cantidad de ETU en las fracciones colectadas, particularmente durante la etapa de lavado, era muy pequeña por lo que la concentración de este soluto se acercaba a los límites de detección experimentales del método analítico.

Para eluir la ETU que quedaba retenida en el cartucho de polímero dopado se ensayaron una amplia variedad de disoluciones. En la Tabla 5.13 se reporta el recobro del analito alcanzado con cada una. El porcentaje de recobro fue calculado con respecto a la cantidad de ETU que se sabe quedó retenida en el polímero después de haberse llevado a cabo los pasos de carga y lavado. Dado que cada ensayo se realizó simultáneamente con los dos polímeros (blanco y dopado), también se reporta la cantidad de ETU detectada en el eluyente del cartucho blanco.

Tabla 5.13. Valores de recobro de ETU para diferentes disoluciones utilizadas en la etapa de elución de los cartuchos empacados con el polímero 7 y su blanco.

Disolución de Elución	Recobro ^{a, b}	
	PD (µg)	PB (µg)
CH ₃ COOH 0.1 M en MeOH	0.19 (20%)	nd
CH ₃ COOH 0.1 M + Cu ²⁺ 10 ⁻² M en MeOH	0.07 (7%)	nd
CH ₃ COOH 0.1 M en EtOH	0.07 (7%)	nd
CH ₃ COOH 0.1 M en MeOH-H ₂ O 1:1 v/v	0.02 (2%)	nd
CH ₃ COOH 0.1 M en MeOH-AcCN 1:1 v/v	0.05 (5%)	0.01
CH ₃ COOH 0.1 M + ClO ₄ ⁻ 0.1 M en MeOH	0.01 (1%)	nd
CH ₃ COOH 5 x 10 ⁻² M en MeOH	0.05 (5%)	0.01
CH ₃ COOH 0.5 M en MeOH	0.12 (12%)	nd
HCOOH 0.1 M en MeOH	0.14 (15%)	0.02
H ₃ PO ₄ 0.1 M en MeOH	0.06 (6%)	0.01
Ácido octansulfónico 10 ⁻² M en MeOH	0	nd
NaOH 0.1 M en MeOH	0.12 (12%)	nd
NaOH 0.1 M en MeOH-H ₂ O 1:1 v/v	0.06 (6%)	nd
CH ₃ COONH ₄ 0.1 M en MeOH	0.24 (25%)	nd
CH ₃ COONH ₄ 0.1 M en MeOH-THF 1:1 v/v	0.99 (100%)	0.05

^aCantidad total cargada 1.3 µg, volumen de elución 5 mL.

^b% de recobro con respecto a la ETU retenida.

nd= no detectable

Flujo= 1 mL min⁻¹

De acuerdo con los recobros determinados, la mejor disolución de elución fue el **CH₃COONH₄ 0.1 M en MeOH-THF 1:1 (v/v)**, con un valor de prácticamente el 100%. Sin embargo, cuando se

realizaron posteriores ensayos de EFS con el mismo cartucho, se observó que el analito ya no era retenido por el polímero. Esto indica que, aunque el THF logra romper las interacciones responsables de la retención de la etiléntiurea, modifica la estructura de la matriz polimérica de manera irreversible haciéndola definitivamente inutilizable para el reenlazamiento del analito.

Considerando las demás disoluciones de elución, se observa que los recobros más altos se tuvieron con el ácido acético y el acetato de amonio 0.1 M en metanol, por lo que ambos fueron seleccionados para verificar la repetibilidad de los resultados en ensayos replicados de EFS. Los recobros determinados para cada ensayo se reportan en la Tabla 5.14. De acuerdo con éstos, los dos eluyentes probados dan resultados repetibles aunque sólo logran eluir una fracción relativamente baja de la ETU retenida en el cartucho de polímero dopado. En todos los casos, la ETU eluida se recuperó en los primeros dos o máximo tres mililitros de disolvente de elución (de un total de 5 mL), lo que indica que un aumento en el volumen de elución no mejoraría el recobro, además de no tener sentido práctico en un proceso de EFS. El acetato de amonio 0.1 M en metanol proporcionó recobros ligeramente más altos, por lo que se estableció este eluyente como parte del protocolo de EFS para el trabajo posterior. Dicho protocolo se resume en la Tabla 5.15.

Tabla 5.14. Repetibilidad del recobro de ETU en la etapa de elución utilizando dos disoluciones de diferente composición (polímero 7 y su blanco).

Disolución de Elución	Recobro ^{a, b}	
	PD (µg)	PB (µg)
CH ₃ COOH 0.1 M en MeOH	0.19 (20%)	nd
	0.16 (17%)	0.02
	0.19 (20%)	nd
Media	0.18 (19%)	nd
CH ₃ COONH ₄ 0.1 M en MeOH	0.24 (25%)	nd
	0.22 (23%)	nd
	0.26 (27%)	nd
Media	0.24 (25%)	nd

^aCantidad total cargada 1.3 µg, volumen de elución 5 mL.

^b% de recobro con respecto a la ETU retenida.

nd= no detectable.

Tabla 5.15. Protocolo de EFS establecido para la evaluación de los polímeros sintetizados a partir de acrilamida y 4-vinilpiridina.

Paso	Condición
Acondicionamiento	10 mL de AcCN
Carga	2 mL de disolución de ETU (0.67 mg L ⁻¹) en AcCN
Lavado	5 mL de AcCN
Elución	5 mL de CH ₃ COONH ₄ 0.1 M en MeOH

Los estudios realizados con el material 7 muestran que bajo las mismas condiciones de trabajo, una cantidad de ETU cercana a los 950 ng es retenida sistemáticamente en el polímero dopado y prácticamente nada se retiene en el polímero blanco. Esto puede considerarse como una evidencia de la existencia de sitios de interacción específica en el primero. Aparentemente dichos sitios no son homogéneos y algunos de ellos presentan una energía de interacción muy alta ya que sólo se logró eluir una fracción limitada del soluto retenido (~240 ng), a pesar de que se ensayó una amplia gama de disolventes polares modificados con ácidos, sales o base fuerte a diferentes concentraciones. La única excepción fue el eluyente que contenía tetrahidrofurano, el cual eluyó cuantitativamente a la ETU pero afectó de manera total e irreversible la capacidad de retención del polímero.

5.2.3 Efecto de la proporción Acrilamida:4-Vinilpiridina sobre las propiedades del material adsorbente

Considerando que la mezcla de monómeros más prometedora para la impresión molecular de ETU fue la de acrilamida y 4-vinilpiridina (material 7), se optó por variar la proporción de estos reactivos con el fin de conocer más a fondo el efecto de cada monómero y mejorar en lo posible las características de adsorción-desorción del material. En la Tabla 5.16 se presentan las relaciones estequiométricas plantilla-monómeros funcionales-entrecruzador ensayadas para los polímeros a base de acrilamida y 4-vinilpiridina. El desempeño de los nuevos materiales fue evaluado con el protocolo de EFS descrito en la Tabla 5.15. En la Tabla 5.17 se reportan las cantidades de ETU que fueron determinadas en los efluentes de carga y lavado de cada uno de estos sistemas, incluyendo los resultados anteriormente obtenidos con el polímero 7 para facilitar la comparación.

Tabla 5.16. Relaciones estequiométricas ETU-ACA-4VP-EGDMA utilizadas en la síntesis de los polímeros 7-10*.

PD ₇	PB ₇	PD ₈	PB ₈	PD ₉	PB ₉	PD ₁₀	PB ₁₀
1:2:2:20	0:2:2:20	1:0:4:20	0:0:4:20	1:4:0:20	0:4:0:20	1:1:3:20	0:1:3:20

*PD = polímero dopado; PB = polímero blanco

Tabla 5.17. Cantidad total (μg) y porcentaje de ETU recuperada en los efluentes de carga y lavado de los cartuchos empacados con los polímeros 7-10.^a

Ensayo	PD ₇	PB ₇	PD ₈	PB ₈	PD ₉	PB ₉	PD ₁₀	PB ₁₀
1	0.37	1.44	0.22	0.48	0.84	0.21	0.11	0.83
	(28%)	(110%)	(17%)	(37%)	(65%)	(16%)	(8%)	(65%)
2	0.29	1.32	0.28	0.63	0.79	0.37	0.14	0.90
	(22%)	(101%)	(22%)	(48%)	(61%)	(28%)	(11%)	(69%)
3	0.35	1.38	0.12	0.46	0.59	0.28	0.12	0.95
	(27%)	(106%)	(9%)	(35%)	(45%)	(22%)	(9%)	(73%)
Media	0.34	1.38	0.21	0.52	0.74	0.29	0.12	0.89
	(26%)	(106%)	(16%)	(40%)	(57%)	(22%)	(11%)	(68%)
%Retenido	74%	-6%	84%	60%	43%	78%	89%	32%
%C.V.	12.2	4.3	39.1	17.8	17.8	28.0	12.7	12.5

^aLa cantidad total cargada fue 1.3 μg .

Los resultados mostraron que los blancos de polimerización de los sistemas **8** y **9** presentaban en gran medida interacciones no específicas hacia la etiléntiourea, ya que la cantidad recuperada de esta molécula en los respectivos efluentes de carga y lavado fue <50%. Aparentemente, la presencia de un solo monómero funcional durante la síntesis de los polímeros incrementa notablemente la retención no específica, siendo más dramático el efecto cuando sólo se utiliza acrilamida. En el caso

del blanco **10**, si bien la cantidad promedio de ETU recuperada en la carga y el lavado no llegó al 70%, en los ensayos individuales se observó cierta tendencia a disminuir la retención no específica con el uso del cartucho.

Por otro lado, la comparación de los nuevos polímeros dopados con el polímero inicial (**PD₇**) condujo a las siguientes conclusiones. La presencia de sólo acrilamida como monómero funcional en el material 9 definitivamente no funcionó para los fines deseados; como puede observarse en la Tabla 5.17, el blanco de polimerización (**PB₉**) retuvo más ETU que el polímero dopado (**PD₉**). El empleo de 4-vinilpiridina como único monómero funcional (**PD₈**), mejoró la capacidad de retención del adsorbente, sin embargo lo observado con su blanco (**PB₈**) muestra que una buena parte de la retención fue debida a interacciones de tipo no específico. Finalmente, cuando en el polímero mixto se incrementó la proporción de 4-vinilpiridina con respecto a la de acrilamida (**PD₁₀**), la retención del analito se vio notablemente favorecida, aunque no se descarta que parte del efecto positivo sea debida a interacciones no específicas.

En la Tabla 5.18 se presentan los valores de recobro de ETU en la etapa de elución para los cuatro materiales. Los porcentajes de recobro fueron determinados con respecto a la cantidad de ETU que se sabe quedó retenida después del paso de lavado.

Tabla 5.18. Valores de recobro de ETU en la etapa de elución de los cartuchos empacados con los polímeros 7-10.^a

Recobros (μg) ^b								
Ensayo	PD ₇	PB ₇	PD ₈	PB ₈	PD ₉	PB ₉	PD ₁₀	PB ₁₀
1	0.24 (25%)	nd	0.04 (4%)	0.01 (1%)	0.17 (37%)	nd	0.39 (33%)	0.02 (4%)
2	0.22 (22%)	nd	0.26 (25%)	0.01 (2%)	0.19 (37%)	nd	0.32 (28%)	nd
3	0.26 (27%)	nd	0.25 (21%)	nd	0.26 (37%)	nd	0.31 (26%)	nd
Media	0.24 (25%)	nd	0.18 (17%)	0.01 (1%)	0.21 (37%)	nd	0.36 (29%)	0.01 (1%)

^aLa cantidad total cargada fue 1.3 μg .

^b% de recobro con respecto a la ETU retenida.

nd= no detectable.

Los valores de recobro obtenidos para los blancos de polimerización de los tres nuevos materiales (8-10) fueron prácticamente nulos. Cabe subrayar que el blanco del polímero de referencia (PB₇) no retuvo ETU, ya que la cantidad total cargada en el ensayo de EFS fue recuperada en los efluentes de carga y lavado, por lo que es lógico que este compuesto no esté presente en el eluyente. En cambio en los blancos de los nuevos materiales, que si retuvieron cierta cantidad de ETU, ya que no toda la ETU cargada fue recuperada en los efluentes correspondientes a los pasos de carga y lavado, no se logró eluir la cantidad remanente del analito.

En cuanto a los polímeros dopados, el mayor porcentaje de recobro de la ETU retenida correspondió al material 9, lo que es congruente con el hecho de que este polímero, a base de

acrilamida sola, presentó también la menor retención del analito. En el polímero a base de 4-vinilpiridina sola (material 8), el % de recobro fue el más bajo y variable, indicando la posible existencia de interacciones muy fuertes pero no forzosamente de tipo específico, además de una cinética de desorción lenta. Como se mencionó anteriormente, el blanco de este material retuvo una importante fracción de ETU y prácticamente nada de ésta logró ser eluida. Al comparar los resultados obtenidos para los polímeros dopados **PD₇** y **PD₁₀**, se observó que los porcentajes de recobro en la elución eran similares, con la ventaja para el material 10 de que la cantidad retenida de ETU durante la carga fue mayor (~1200 ng).

Cabe mencionar que con el **PD₁₀** también se ensayaron algunas de las disoluciones de elución que ya habían sido probadas para el **PD₇**, con la finalidad de mejorar los valores de recobro, sin embargo el mejor eluyente también resultó ser el acetato de amonio 0.1 M en MeOH.

De acuerdo con estos resultados, solamente el desempeño del polímero 10 y de su respectivo blanco fueron equiparables con los del material 7, por lo que sólo se continuó trabajando con estos dos sistemas en los ensayos subsecuentes.

5.2.4 Efecto de la proporción de disolvente porógeno en la mezcla de reacción

Uno de los parámetros que controlan la forma y tamaño de los poros que se generan durante el proceso de polimerización, influyendo también sobre la accesibilidad del analito hacia los sitios de impresión y su posterior desorción cuantitativa, es la cantidad del disolvente porógeno. Por lo tanto, con la finalidad de mejorar los valores de recobro de los materiales **7** y **10** se estudió el efecto del

incremento en la proporción de porógeno sobre el comportamiento de adsorción-desorción en estos sistemas.

En la Tabla 5.19 se resumen las principales condiciones de composición de los materiales evaluados en esta sección.

Tabla 5.19. Diferencias composicionales de los polímeros mixtos de acrilamida y 4-vinilpiridina comparados.

Material Polimérico	7	11	10	12
Relación ETU-ACA-VP-DMAEG (en mol)	1:2:2:20	1:2:2:20	1:1:3:20	1:1:3:20
Relación Unidades polimerizantes-Disolvente porógeno (en volumen)	3:8	3:12	3:8	3:12

En la Tabla 5.20 se reportan las cantidades de ETU determinadas en los efluentes provenientes de la carga y lavado de estos cuatro materiales y de sus respectivos blancos. Todos los ensayos de EFS se realizaron utilizando el protocolo descrito en la Tabla 5.15.

Tabla 5.20. Cantidades (μg) y porcentajes de ETU recuperada en los efluentes de carga y lavado de los cartuchos empacados con polímeros mixtos ACA-4VP.^a

PD ₇	PB ₇	PD ₁₁	PB ₁₁	PD ₁₀	PB ₁₀	PD ₁₂	PB ₁₂
0.37 (28%)	1.44 (110%)	0.14 (11%)	0.87 (67%)	0.32 (24%)	0.89 (68%)	0.11 (8%)	1.2 (92%)

^aLa cantidad total cargada fue 1.3 μg .

En estos experimentos se observó que el polímero dopado **10** retuvo una cantidad ligeramente menor de analito que en los ensayos anteriores (Tabla 5.17), equiparándose al polímero **7** en cuanto a capacidad de retención. Por otra parte, los resultados indicaron que al incrementarse la cantidad de porógeno se mejoró la calidad de retención de los polímeros dopados, ya que una cantidad menor de ETU fue analizada en los efluentes de carga y lavado de los materiales **11** y **12** con respecto a la determinada en los sistemas **7** y **10**. Esto podría indicar que se mejoró la accesibilidad del analito hacia los sitios de enlace, o bien que un mayor número de moléculas de plantilla interaccionó favorablemente con los monómeros y logró imprimirse.

Al comparar los resultados de los blancos de polimerización de los sistemas **7** y **11**, se observó que el incremento en la cantidad de porógeno no fue del todo benéfico en lo que se refiere a la retención no específica, ya que solo el 67% de la ETU cargada fue recuperada en los efluentes de carga y lavado del **PB₁₁** mientras que en el **PB₇** continuó recuperándose el 100%. En los sistemas **10** y **12** por el contrario se observó que la retención de ETU en el polímero blanco disminuyó al utilizar más disolvente porógeno durante la síntesis, obteniéndose un incremento de la cantidad de ETU recuperada del 68% al 92%.

Con respecto a los valores de recobro de ETU durante la etapa de elución, éstos se muestran en la Tabla 5.21. Para las dos relaciones de monómeros evaluadas (ACA-4VP 2:2 y 1:3), los resultados indicaron que los valores de recobro mejoran al utilizar más disolvente porógeno durante la síntesis del material impreso. Sin embargo, a pesar de todas las modificaciones ensayadas tanto en la síntesis de los polímeros como en el protocolo de EFS, en ningún caso fue posible recuperar la cantidad total de etiléntiurea retenida en los cartuchos empacados con polímeros dopados.

Tabla 5.21. Valores de recobro de ETU en la etapa de elución de los cartuchos empacados con polímeros mixtos ACA-4VP.^a

Recobros (μg) ^b							
PD ₇	PB ₇	PD ₁₁	PB ₁₁	PD ₁₀	PB ₁₀	PD ₁₂	PB ₁₂
0.24 (26%)	nd	0.80 (69%)	Nd	0.36 (37%)	nd	0.53 (44%)	0.03 (30%)

^a La cantidad total cargada fue 1.3 μg .

^b % de recobro con respecto a la ETU retenida.

nd= no detectable.

Como los polímeros dopados **11** y **12** presentaron un mejor desempeño que los **7** y **10** en cuanto a la retención de la ETU y su posterior recobro en la elución, se realizaron estudios complementarios de su desempeño cromatográfico.

5.2.5 Caracterización cromatográfica de los materiales poliméricos

5.2.5.1 Variación del volumen de la disolución de carga a cantidad cargada constante

Es sabido que en los procesos de EFS, el volumen de muestra percolado a través del cartucho es un factor que puede incidir en la cantidad de analito retenida, aunque la cantidad cargada de éste se mantenga constante. Esto es debido a que el propio disolvente de la muestra puede actuar como eluyente, desorbiendo en mayor o menor grado al analito previamente retenido. En general este tipo de experimentos permite tener una idea de qué tan fuerte es la interacción del compuesto de interés con los sitios de adsorción en presencia del disolvente de carga.

Los resultados de la sección anterior para los materiales **11** y **12** mostraron que con un volumen de carga de 2 mL y una cantidad cargada de 1.3 μg , una pequeña fracción de la ETU (11% y 8%, respectivamente) se fugaba de los cartuchos de polímero dopado, mientras que en los cartuchos de polímero blanco la mayor parte del analito (67% y 92%, respectivamente) era eluida por el AcCN usado como disolvente de carga y lavado. En los actuales experimentos, la cantidad total de ETU cargada fue de 1.3 μg en todos los casos, pero ésta se disolvió en volúmenes crecientes de AcCN, desde 2 hasta 200 mL. Para conocer la cantidad retenida, se analizaron los efluentes de carga y lavado, ya que por diferencia mediante un análisis de balance de masa entre la ETU total cargada y la determinada en estos dos pasos del ensayo es posible determinarla. A pesar de que en los casos específicos de los volúmenes de carga de 100 y 200 mL, la concentración de ETU es demasiado pequeña para ser detectada y mucho menos cuantificada por el método de análisis utilizado, aún antes de pasar por el cartucho, y por lo tanto no pudiéndose determinar en ambos experimentos la cantidad de etiléntiurea fugada, éstos fueron realizados con la finalidad de verificar si era posible que el polímero dopado retuviera ETU al estar en contacto con disoluciones muy diluidas de este analito, lo cual sería posteriormente verificado al determinar la cantidad de ETU en los respectivos efluentes de elución. En la Tabla 5.22 se resumen los resultados obtenidos.

Tabla 5.22. Cantidad (μg) y porcentaje de ETU determinada en los efluentes de carga más lavado para diferentes volúmenes de carga^a.

Volumen de carga (mL)	C _{influyente} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	ETU no retenida ^b				ETU retenida ^c			
		PD ₁₁	PB ₁₁	PD ₁₂	PB ₁₂	PD ₁₁	PB ₁₁	PD ₁₂	PB ₁₂
2	0.65	0.14 (11%)	0.87 (67%)	0.11 (8%)	1.2 (92%)	1.16	0.43	1.19	0.1
5	0.26	0.33 (25%)	1.05 (81%)	0.17 (13%)	1.16 (89%)	0.97	0.25	1.13	0.14
10	0.13	1.02 (78%)	1.19 (92%)	0.30 (23%)	1.17 (90%)	0.28	0.11	1.00	0.13
25	0.052	1.30 (100%)	1.29 (99%)	0.32 (25%)	1.27 (98%)	nd	0.01	0.98	0.03
50	0.026	nr	nr	nd	nr				
100	0.013	nr	nr	nd	nr				
200	0.006	nr	nr	nd	nr				

^a La cantidad cargada fue 1.3 μg .

^b Cantidad determinada en los efluentes de carga más lavado.

^c Cantidad cargada-cantidad efluente de carga más lavado.

^d El porcentaje fue calculado con respecto a la cantidad total cargada.

nr= no realizado, nd= no detectable.

a) Material 11

Los resultados obtenidos, tanto para el polímero dopado 11 como para su blanco, mostraron una notable disminución en la cantidad de ETU retenida al aumentar el volumen de carga (ver Figura 5.6

(a). Así, con un volumen de tan sólo 10 mL de muestra cargada, la fuga del analito en los cartuchos de **PD₁₁** y **PB₁₁** fue de 78% y 92%, respectivamente, y con 25 mL no se retuvo prácticamente nada. Esto parecería indicar que la interacción de la ETU con los sitios de adsorción en la matriz polimérica (ya sea sitios específicos en el polímero dopado o no específicos en el polímero blanco) es bastante débil en presencia de AcCN, pues al disminuir la concentración del analito por el aumento en el volumen de carga, la retención decayó drásticamente.

Sin embargo, este postulado es incongruente con los resultados de secciones anteriores (5.2.3 y 5.2.4), en donde los cartuchos de diferentes polímeros mixtos dopados (incluyendo al material 11) se cargaron con la misma cantidad de ETU disuelta en 2 mL de AcCN y luego se lavaron con 5 mL de AcCN puro. Una pequeña fracción de la ETU que quedó en el cartucho durante la carga fue desalojada durante el lavado, pero la mayor parte permaneció retenida (89% en el caso del polímero 11) y posteriormente no pudo ser eluida cuantitativamente, a pesar de que en algunos casos se ensayó una amplia variedad de disolventes de elución. Por lo tanto, no es posible considerar que las interacciones entre el analito y la matriz polimérica son muy débiles en presencia de AcCN. El fenómeno responsable de la retención de ETU es más complejo y sin duda involucra otros procesos además de la adsorción.

Considerando que un cambio en el volumen de carga para una cantidad constante de ETU, significa un cambio en la concentración, se procedió a analizar la influencia de este parámetro en el proceso de retención. En la Figura 5.6 (b) se muestra la gráficas de “Cantidad de ETU retenida” en función de la concentración de ETU en el influente (e.d. en la muestra cargada), para el polímero 11 y su blanco. Así mismo, se incluye una gráfica que ilustra la retención específica en el polímero 11,

obtenida al restarle a la cantidad total retenida lo que se retuvo en el blanco (**PD₁₁-PB₁₁**). Es evidente que el efecto de la concentración no es el mismo en el polímero dopado y el blanco por lo que el mecanismo de retención de la ETU debe ser diferente.

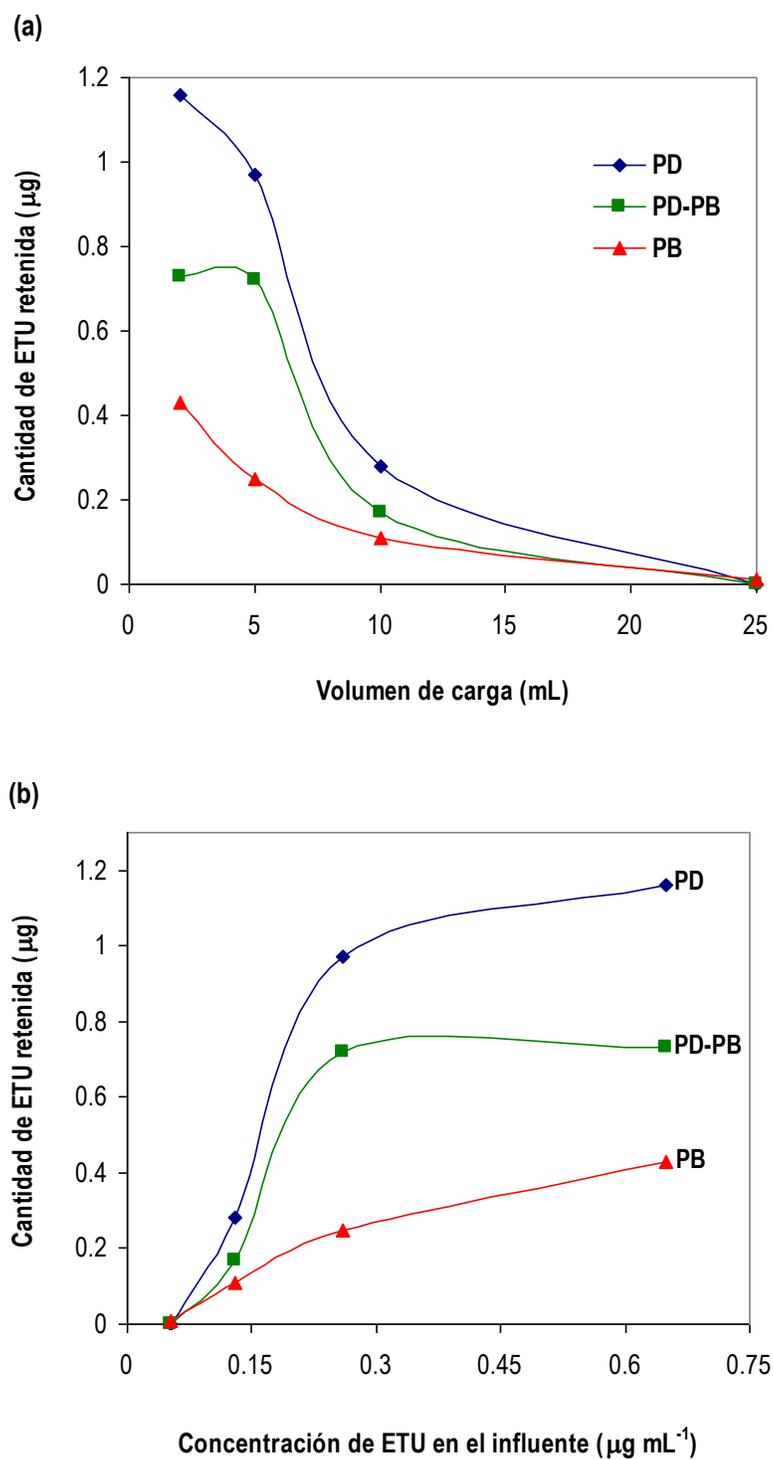


Figura 5.6. (a) Efecto del volumen de carga sobre la cantidad retenida y (b) Efecto de la concentración de ETU en el influente sobre la cantidad retenida. (PD) retención total en el polímero dopado, (PD-PB) retención específica en el polímero dopado, (PB) retención en el blanco.

En el caso del polímero blanco la fuga de ETU para el menor volumen de carga (2 mL) fue cercana al 70%, lo que lleva a suponer que el frente de migración del soluto emergió del cartucho muy rápidamente; por lo tanto, en este ensayo y en todos los subsecuentes debió alcanzarse un estado de equilibrio entre el influente y el polímero. Esto significa que la curva del polímero blanco en la Figura 5.6 (b) curva PB, es una imagen de la isoterma de distribución del analito en este material. El ligero desfase de la curva con respecto al origen se debe a que los datos de la Tabla 5.22, utilizados para el trazo de las gráficas, incluyen la fracción de ETU que fue desalojada durante el lavado. El comportamiento general del polímero blanco se asemeja al de un mecanismo de reparto, particularmente en la zona de más altas concentraciones donde la retención tiende a aumentar linealmente con la concentración. Este mecanismo implica una distribución del analito entre el líquido interparticular que fluye a través del lecho estacionario y el líquido intraparticular contenido en los canales porosos de la estructura polimérica. Puesto que el disolvente inter e intraparticular es el mismo, la fuerza directora del reparto es únicamente el gradiente de concentración. Si la barrera interfacial es difícil de superar (p. ej. en el caso de una superficie con microporos de difícil acceso), se requerirá de un gradiente de concentración suficientemente elevado para promover el reparto. Esto podría explicar la inflexión de la curva experimental (Fig. 5.6 (b) curva PB) en la zona de bajas concentraciones. Por otra parte, es probable que la limitada fracción de ETU que logra transferirse al líquido intraparticular penetre profundamente en la estructura interna de la partícula, pues las pequeñas moléculas del soluto pueden difundir a través de la red de canales y poros internos aún si éstos son relativamente estrechos. Este esquema es consistente con los nulos recobros del analito en la etapa de elución (ver Tabla 5.21). Dado que la ETU no es retenida en el polímero blanco por interacción con sitios de adsorción, el eluyente, cualquiera que éste sea, sólo juega el papel de vehículo. Sin embargo, el regreso del soluto hacia la corriente de flujo externa requiere de alguna fuerza que lo impulse. Considerando que la convección en los canales y poros

profundos es mínima y que no se cuenta con un gradiente de concentración, porque el soluto retenido no quedó acumulado en un lugar sino disperso en la estructura interna de las partículas de polímero, la elución se convierte en un proceso poco favorecido y por lo tanto sumamente lento.

En lo que concierne al polímero dopado, es importante señalar que la curva correspondiente a este material en la Figura 5.6 (b) curva PD, no representa fielmente a la isoterma de distribución del soluto, ya que en los experimentos realizados a bajos volúmenes de carga (2 y 5 mL) probablemente no se alcanzó un estado de equilibrio entre el influente y el adsorbente. A pesar de ello, es posible realizar un análisis cualitativo del comportamiento de retención del polímero dopado y deducir algunas conclusiones interesantes. Por similitud con lo observado para el polímero blanco, es posible que una parte de la ETU haya sido retenida por un mecanismo de reparto impulsado por el gradiente de concentración. Sin embargo, otro proceso más debió sumarse al anterior ya que el **PD₁₁** fue capaz de retener una cantidad de ETU mucho mayor que el **PB₁₁**. Suponiendo que ambos materiales hubieran tenido una estructura porosa similar y haciendo la aproximación de considerar aditivos a los procesos responsables de la retención total del soluto, se trazó la curva de la Fig. 5.6 (b) curva PD-PB, la cual refleja el segundo proceso de retención que es exclusivo del polímero dopado, es decir la retención específica. Esta curva presenta una meseta típica de un proceso de saturación de sitios activos en un adsorbente. Dichos sitios sólo pudieron ser generados por la plantilla durante el proceso de polimerización, por lo que formalmente se trataría de sitios de impresión molecular. De acuerdo con la curva, la capacidad máxima de retención específica en el cartucho empacado con **PD₁₁** es de aproximadamente 0.70-0.75 μg de ETU (alrededor de 7 nmol) por 500 mg de adsorbente. Curiosamente, el recobro de ETU en la elución del cartucho de **PD₁₁**, cuando éste se cargó con el soluto a la máxima concentración (1.3 μg en 2 mL), fue de 0.8 μg

(Tabla 5.21), lo que lleva a pensar que la fracción de ETU retenida específicamente sí puede ser eluida cuantitativamente. Cabe recordar que el recobro de ETU en la elución del cartucho blanco, cuando éste se cargó en las mismas condiciones, fue nulo. Tal vez los sitios impresos donde se retuvo la ETU se encontraban localizados en poros accesibles y cercanos a la superficie de las partículas, lo que permitió que el solvente de elución desorbiera al compuesto y lo transportara hacia la corriente de flujo. Esto no significa que no se hubieran formado sitios impresos en poros profundos, sólo que para llegar a ellos, las moléculas del soluto tendrían que difundir a través de los canales de la estructura interna de la partícula y el proceso sería similar al que tiene lugar en el polímero blanco; una vez atrapadas en estos canales, las moléculas de ETU son irrecuperables y es irrelevante si se adsorben o no.

Con base en la discusión anterior, se propone que la retención en el polímero dopado ocurre en primera instancia por un proceso de reparto del analito entre la disolución externa y la disolución contenida en los canales porosos de la matriz polimérica. Esta primera etapa requiere de un gradiente de concentración suficientemente elevado que impulse a las moléculas de ETU a atravesar la barrera interfacial. Posteriormente, una parte de las moléculas que lograron penetrar empieza a difundir y eventualmente interacciona con sitios de adsorción (sitios impresos) poco profundos quedando inmovilizada cerca de la superficie de la partícula, otra parte continúa difundiendo y queda atrapada (adsorbida o no) en la intrincada red de canales y poros profundos de la estructura polimérica. Es esta última fracción de analito la que no puede ser recuperada durante la etapa de elución.

En la Tabla 5.23 se presentan los valores de recobro de ETU determinados en la etapa de elución de los cartuchos empacados con el polímero dopado 11 y su blanco. Los porcentajes

reportados fueron calculados con respecto a la cantidad total que se sabe quedó retenida en cada cartucho después de la carga y lavado.

Tabla 5.23. Valores de recobro de ETU obtenidos en la etapa de elución. Los cartuchos del polímero 11 y su blanco fueron cargados con 1.3 μg de ETU disuelta en volúmenes crecientes de acetonitrilo.

Volumen disolución de carga (mL)	Recobro de ETU ^a	
	PD ₁₁	PB ₁₁
2	0.80 (69%)	0.13
5	0.61 (63%)	nd
10	0.12 (43%)	nd
25	nd	nd

^a% de recobro con respecto a la cantidad retenida.

^bnr = no realizado.

nd= no detectable.

Los resultados de la Tabla 5.23 indican que el polímero dopado disminuye drásticamente la cantidad de ETU al incrementarse el volumen de carga. Desde el punto de vista práctico, aun aceptando que se logró cierto grado de impresión molecular, el polímero 11 no presenta propiedades adecuadas para su empleo como adsorbente selectivo en procesos de EFS.

b) Material 12

Los resultados registrados en la Tabla 5.22 muestran que para todos los volúmenes de carga evaluados la retención de ETU en el blanco de polimerización (**PB₁₂**) fue insignificante. En el polímero dopado se observa que al incrementarse el volumen de la disolución de carga la retención de ETU decrece moderadamente (Figura 5.7 (a)). En efecto, la mayor fuga de analito registrada fue del 29% para un volumen de carga de 50 mL. En los ensayos con volúmenes de carga de 100 y 200 mL no fue posible cuantificar la cantidad de ETU no retenida, ya que las disoluciones utilizadas en estos casos se encontraban muy diluidas. Sin embargo, estos experimentos fueron realizados con la finalidad de saber si el polímero dopado era capaz de reconocer y retener a las moléculas de ETU, aún en condiciones de dilución.

En la Figura 5.7 (b) se muestran las gráficas de “Cantidad de ETU retenida” en función de la concentración de ETU en el influente para el polímero 12 y su blanco. Como puede observarse, en este caso (a diferencia del material 11) el efecto de la concentración no es tan significativo. La disminución de efectos cinéticos en el proceso de retención de la ETU en el material 12 está probablemente relacionada con su estructura superficial. Si la superficie presenta grandes poros fácilmente accesibles, las moléculas de ETU pueden atravesar la interfase que separa el medio externo (fase móvil) de la disolución contenida en los poros sin que se requiera un fuerte gradiente de concentración para impulsarlas. De hecho, la baja retención en el polímero blanco 12 apoya la hipótesis de un sistema donde la retención no específica ha sido casi eliminada (por las condiciones de carga y lavado) y las moléculas de analito pasan fácilmente del seno de la fase móvil a los poros superficiales y viceversa, sin quedar atrapadas físicamente en canales estrechos y tortuosos.

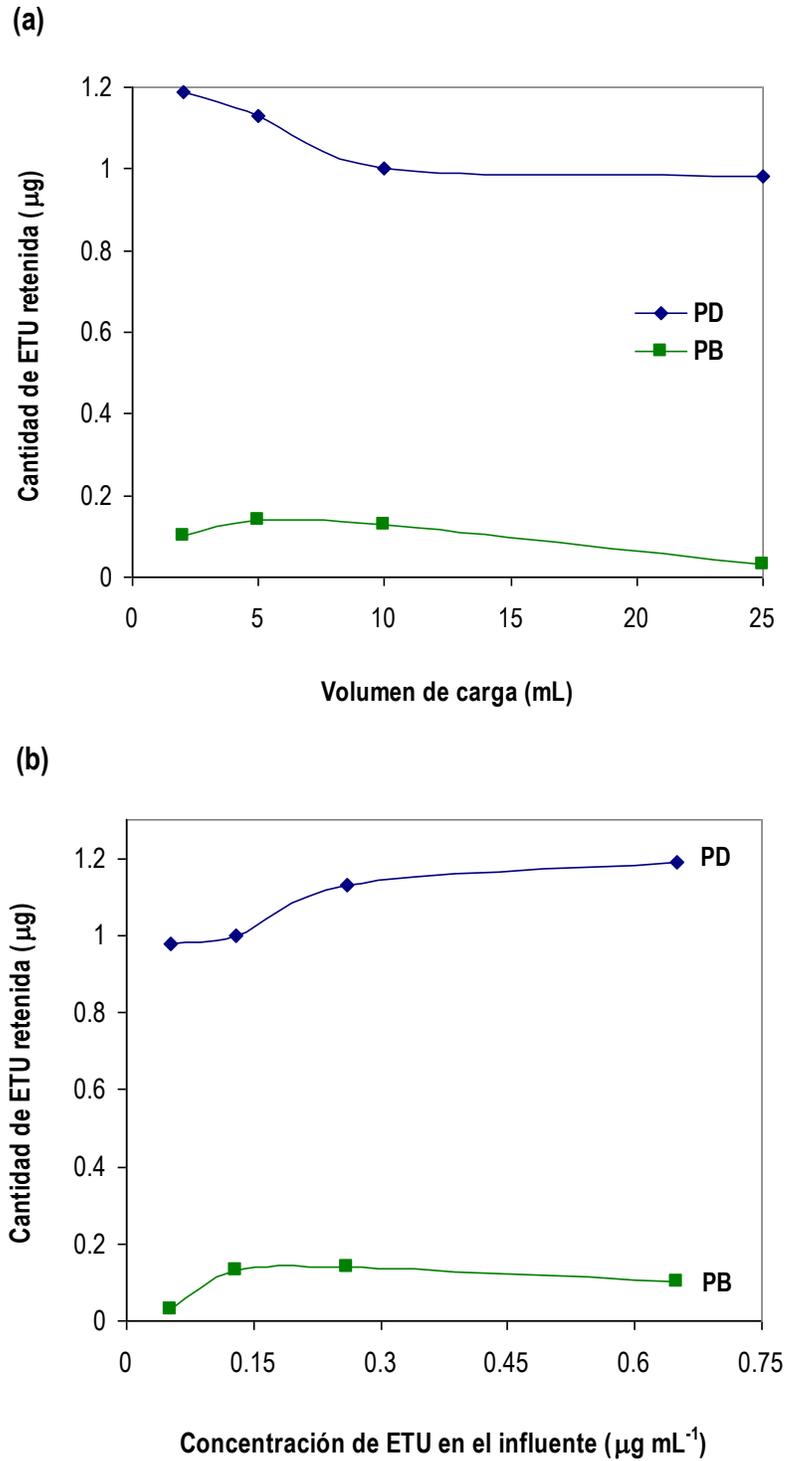


Figura 5.7. (a) Efecto del volumen de carga sobre la cantidad retenida y (b) Efecto de la concentración de ETU en el influente sobre la cantidad retenida. (PD) retención total en el polímero dopado, (PB) retención en el blanco.

La gráfica correspondiente al polímero dopado muestra que además de buena accesibilidad, los poros más externos de este material contienen sitios de adsorción que lo diferencian claramente del polímero blanco; por lo tanto se trata de un polímero impreso molecularmente (**PIM**) con sitios de adsorción generados por la plantilla. Presumiblemente, las primeras moléculas de analito interaccionan con los sitios de adsorción más expuestos en los poros superficiales; al agotarse estos sitios, las moléculas siguientes deben difundir por los canales porosos para interaccionar con sitios impresos más profundos. Este último proceso requiere más energía, por ello hay cierta disminución en la cantidad retenida cuando la disolución de carga está más diluida. Cabe hacer notar que todos los puntos experimentales de la gráfica de este polímero corresponden a un estado de no equilibrio, lo que significa que el moderado efecto de concentración observado es debido a cuestiones cinéticas, no termodinámicas.

A pesar de que este polímero mostró un mejor desempeño que todos los anteriores en lo que se refiere al proceso de retención, la elución continuó siendo un problema crítico. En la literatura se ha reportado la existencia de sitios de adsorción con energías de enlace muy variables en polímeros impresos sintetizados por el método de polimerización en bloque (utilizado en el presente caso). Aparentemente, los sitios con energías de enlace moderadas son predominantes pero también se puede presentar una población de sitios, menos numerosos, con muy alta energía de interacción⁽¹⁴⁰⁾. Los experimentos realizados y los resultados obtenidos no permiten definir si la no elución de una significativa fracción de la ETU retenida en el **PIM** es debida a efectos termodinámicos (sitios de alta energía) o bien a algún fenómeno cinético.

En la Tabla 5.24 se presentan los valores de recobro de ETU determinados en la etapa de elución de los cartuchos empacados con el polímero dopado 12 y su blanco. Los porcentajes

reportados fueron calculados con respecto a la cantidad total que se sabe quedó retenida en cada cartucho después de la carga y lavado.

Tabla 5.24. Valores de recobro de ETU obtenidos en la etapa de elución. Los cartuchos del polímero 12 y su blanco fueron cargados con 1.3 µg de ETU disuelta en volúmenes crecientes de acetonitrilo.

Volumen disolución de carga (mL)	Recobro de ETU ^a	
	PD ₁₂	PB ₁₂
2	0.53 (44%)	0.03
5	0.25 (22%)	nd
10	0.42 (42%)	0.03
25	0.31 (32%)	nd
50	0.47 (51%)	nr ^b
100	0.40	nr ^b
200	0.30	nr ^b

^a% de recobro con respecto a la cantidad retenida.

^bnr = no realizado.

nd= no detectable.

Los resultados de la Tabla 5.24 indican que el polímero dopado aún sigue reteniendo analito cuando el volumen de carga es de 200 mL, ya que durante la etapa de elución de ese ensayo se determinó una cantidad de etiléntiurea del mismo orden que en los demás ensayos. Desafortunadamente los porcentajes de recobro obtenidos en la elución del cartucho cuando éste se cargó con volúmenes de muestra menores fueron muy variables y aleatorios, lo cual impide estimar la cantidad de ETU retenida en los experimentos realizados con volúmenes de carga de 100 y 200

mL. En efecto, la cantidad eluida en los diferentes ensayos no guarda relación alguna, ni con el volumen de carga, ni con la cantidad retenida. En el mejor de los casos se tuvo un valor de recobro de alrededor del 50%, y aunque nuevamente se probó una amplia y variada serie de disoluciones de elución, la mejor de todas continuó siendo el $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.1 M en MeOH.

5.2.5.2 Variación de la concentración de la disolución de carga y de la cantidad cargada

a) A volumen de carga constante

En la sección anterior se comprobó que el polímero dopado **12** era capaz de retener una fracción importante (~70%) de la ETU cargada (1.3 μg) en un volumen de muestra relativamente grande (50 mL). Para conocer mejor el efecto de la concentración sobre las propiedades de retención del **PIM**, se realizó un estudio de retención a volumen de carga constante de 50 mL variando la concentración de ETU en la disolución de carga en el intervalo de 0.05-0.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Desafortunadamente los resultados obtenidos fueron poco congruentes y poco reproducibles. La razón de ello se atribuye a que el volumen de carga elegido era superior al volumen de fuga para todas las concentraciones probadas e inferior al volumen de equilibrio (o saturación) para la mayoría de los experimentos en el intervalo ensayado. Es decir, el volumen de 50 mL correspondía a diferentes puntos de la zona de transición del frente de migración del soluto, dependiendo de la concentración. En los materiales poliméricos altamente entrecruzados, la cinética es generalmente lenta y la zona de transición tiende a ser ancha y mal definida, además el ensanchamiento aumenta al disminuir la concentración. Esta zona es muy sensible a pequeñas variaciones en los parámetros experimentales (temperatura, flujo, viscosidad del influente, homogeneidad del lecho empacado,

etc.), por ello es muy difícil obtener resultados confiables cuando la EFS se realiza con volúmenes de carga que caen dentro de esta región del frente de migración del soluto estudiado.

Por las razones expuestas, se optó por estudiar el efecto de la concentración trazando los frentes de migración del soluto a diferentes concentraciones de éste en el influente. Además, considerando la cinética lenta de este tipo de polímeros, la velocidad de flujo se redujo de 1 mLmin^{-1} , usado en todos los experimentos anteriores, a 0.6 mL min^{-1} . En todos los casos se utilizó el mismo cartucho de material polimérico, blanco e impreso, para realizar los experimentos.

b) Análisis frontal

Conociendo los valores de concentración en el influente y determinando cromatográficamente la concentración de ETU en cada una de las fracciones colectadas del efluente, se calculó el valor de la concentración relativa (ϕ) correspondiente a cada fracción. La representación gráfica de ϕ (intervalo 0-1) en función del volumen de influente percolado a través del cartucho (V_p), constituye lo que se conoce como **frente de migración del soluto** o curva de ruptura. Con el objeto de comparar el comportamiento del **PIM** y de su respectivo blanco de polimerización, **PB₁₂**, se obtuvieron los frentes de migración de la ETU en ambos cartuchos a diferentes concentraciones en el intervalo $0.05\text{-}0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Aunque en ensayos anteriores se había demostrado que la retención de ETU en el polímero blanco era muy pequeña, las condiciones experimentales (volumen de carga) no correspondían forzosamente a un estado de equilibrio por lo que se consideró necesario verificar la magnitud de la retención no específica en este material. En la Figura 5.8 se comparan las curvas de análisis frontal en el PIM y el blanco para la menor y la mayor de las concentraciones ensayadas.

Como puede observarse, los frentes de ETU en el blanco y en el polímero impreso son muy diferentes, corroborando que el fenómeno de retención no es el mismo. Aunque el polímero blanco puede retener una pequeña cantidad de ETU, atribuido a interacciones de tipo no específico, el material impreso es capaz de retener cantidades mayores de analito para cualquier concentración de éste en la disolución percolada.

De acuerdo con la teoría del análisis frontal, para cualquier volumen de disolución percolada por el cartucho, es posible trazar en la gráfica de ϕ versus V_p una línea vertical que define un rectángulo entre los puntos de coordenadas $(V_m, 0)$, $(V_p, 0)$, $(V_m, 1)$ y $(V_p, 1)$, donde V_m es el volumen muerto del cartucho (el cual se estimó en $\sim 500 \mu\text{L}$ para el caso presente). El V_m fue determinado mediante la percolación de metanol a través del cartucho que contenía el PIM, el disolvente fue inyectado progresivamente por un extremo del cartucho con ayuda de una jeringa graduada, este proceso fue detenido cuando el disolvente comenzó a salir por el lado contrario del cartucho. El área de este rectángulo representa la cantidad total de ETU que ha sido suministrada al cartucho, corregida por el volumen muerto (ecuación 4):

$$\text{Área} = (V_p - V_m) \times C_o \quad (\text{Ec. 4})$$

Dentro del rectángulo, la fracción del área que se encuentra arriba de la curva del frente representa la fracción de analito retenida, mientras que la fracción del área que se encuentra bajo la curva representa la fracción de analito no retenida. En la Figura 5.8 se puede apreciar claramente que, para cualquier volumen percolado, el área sobre la curva del frente del PIM es mayor que el área sobre la curva del frente del blanco.

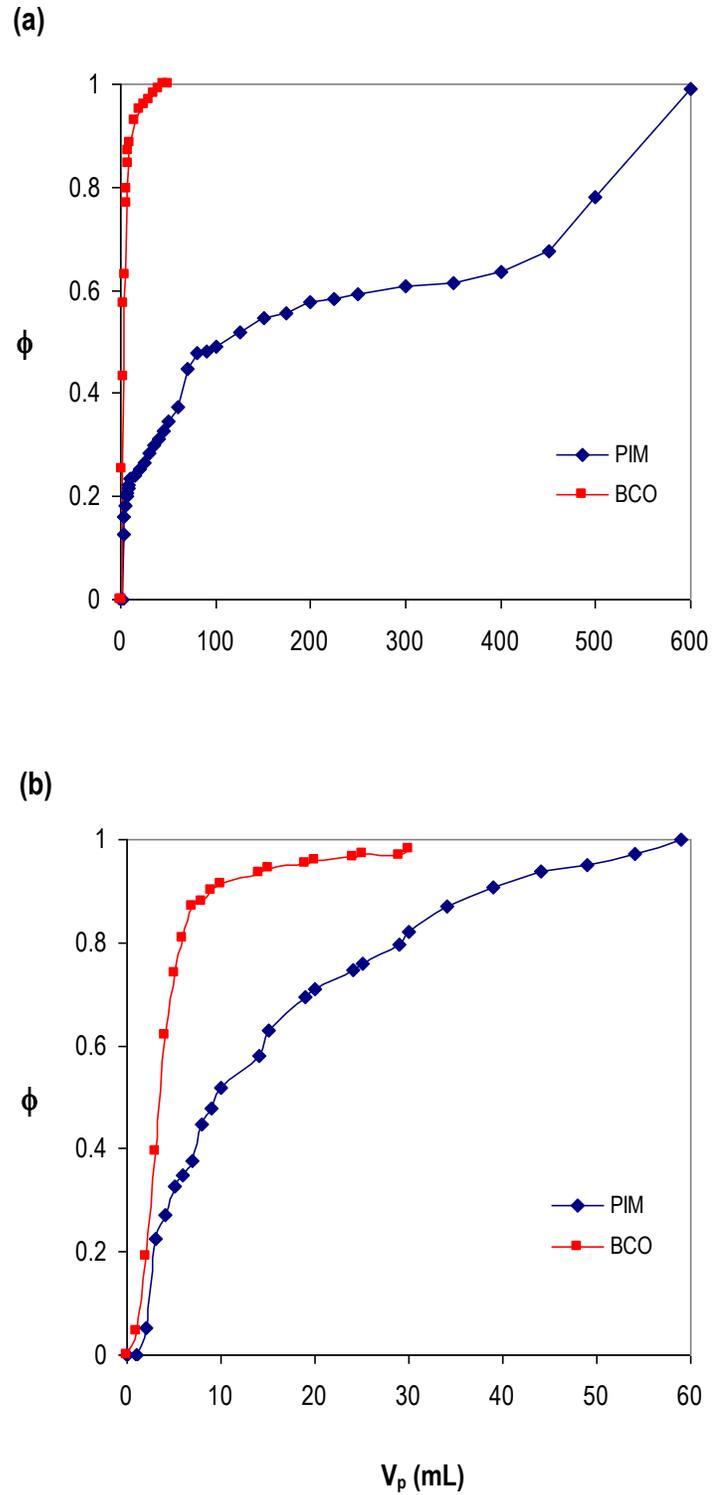


Figura 5.8. Frentes de migración de la ETU en los cartuchos empacados con el PIM y el polímero blanco 12.

Concentración de ETU en el influente: (a) $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$. (b) $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En la Figura 5.9 se presentan los frentes de migración obtenidos para todas las concentraciones ensayadas, tanto en el PIM como en el respectivo polímero blanco. Los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el orden creciente de concentraciones y a flujo de 0.6 mL min^{-1} , excepto para los frentes de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$, los cuales se trazaron al final del estudio utilizando un flujo de 0.2 mL min^{-1} . Antes de realizar estos últimos experimentos, los cartuchos de polímero impreso y blanco se desempacaron, el material se lavó exhaustivamente con metanol acidificado, metanol puro y acetonitrilo puro; finalmente los polímeros se volvieron a empacar cuidando que el lecho quedara bien asentado y sin irregularidades aparentes.

Como muestra la Figura 5.9 (b), en el caso del cartucho blanco todos los frentes empiezan a emerger en los primeros 1-2 mL de volumen percolado, suben rápidamente y presentan una inflexión abrupta a volúmenes $\leq 10 \text{ mL}$, lo que marca el fin de la zona de transición y el inicio de saturación de los sitios de interacción menos expuestos o accesibles. La saturación total de la capacidad de retención del polímero se alcanza a volúmenes mayores para las concentraciones más bajas, excepto en el experimento realizado a concentración de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$, donde la rama superior del frente está menos dispersa, probablemente porque en este caso se utilizó una velocidad de flujo más baja. El comportamiento observado es indicativo de un fenómeno controlado por la difusión; al disminuir la velocidad de flujo, las moléculas del soluto tienen más tiempo para difundir al interior de los poros permitiendo que se alcance el estado de equilibrio con un menor volumen percolado.

En el caso de los frentes obtenidos en el PIM, el efecto de la concentración de ETU en el influente sobre la forma y dispersión de los frentes es muy notable. Para las tres concentraciones menores, la zona de transición presenta una forma tanto más atípica y dispersa cuanto más baja es

la concentración. De hecho, la curva obtenida a la más baja concentración ($0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$), progresa en forma escalonada, como si se tratara de distintos fenómenos de adsorción o de una adsorción en multicapas. Aunque el error experimental debido a la colección y análisis de una enorme multitud de fracciones es responsable de algunas imperfecciones en las curvas, la forma global de éstas proviene del comportamiento de retención del polímero. Es interesante notar que la curva correspondiente a la concentración de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ sigue la tendencia antes indicada, mostrando una zona de transición dispersa y mal definida, a pesar de que en este caso se trabajó a muy baja velocidad de flujo (0.2 mL min^{-1}). Esto parece indicar que la cinética de adsorción del soluto en el PIM no está limitada por la difusión sino por otro fenómeno. Por otra parte, a partir de una concentración de $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$ en adelante, los frentes presentan menor ensanchamiento y una zona de transición más recta y definida; incluso, las curvas para las tres concentraciones mayores estudiadas se encuentran prácticamente traslapadas. Nuevamente, esto apoya la hipótesis de que la difusión no es un fenómeno preponderante en la cinética del proceso.

Sin embargo, independientemente de la concentración, el punto de ruptura o fuga en todos los frentes obtenidos en el cartucho del **PIM** se presenta en los primeros 2-3 mL. Esto significa que, aunque el material es capaz de adsorber una gran cantidad de ETU (proporcional al área sobre la curva hasta alcanzar el punto de saturación), también ocurre una significativa pérdida de analito desde prácticamente el inicio del proceso (proporcional al área bajo la curva para cualquier volumen percolado).

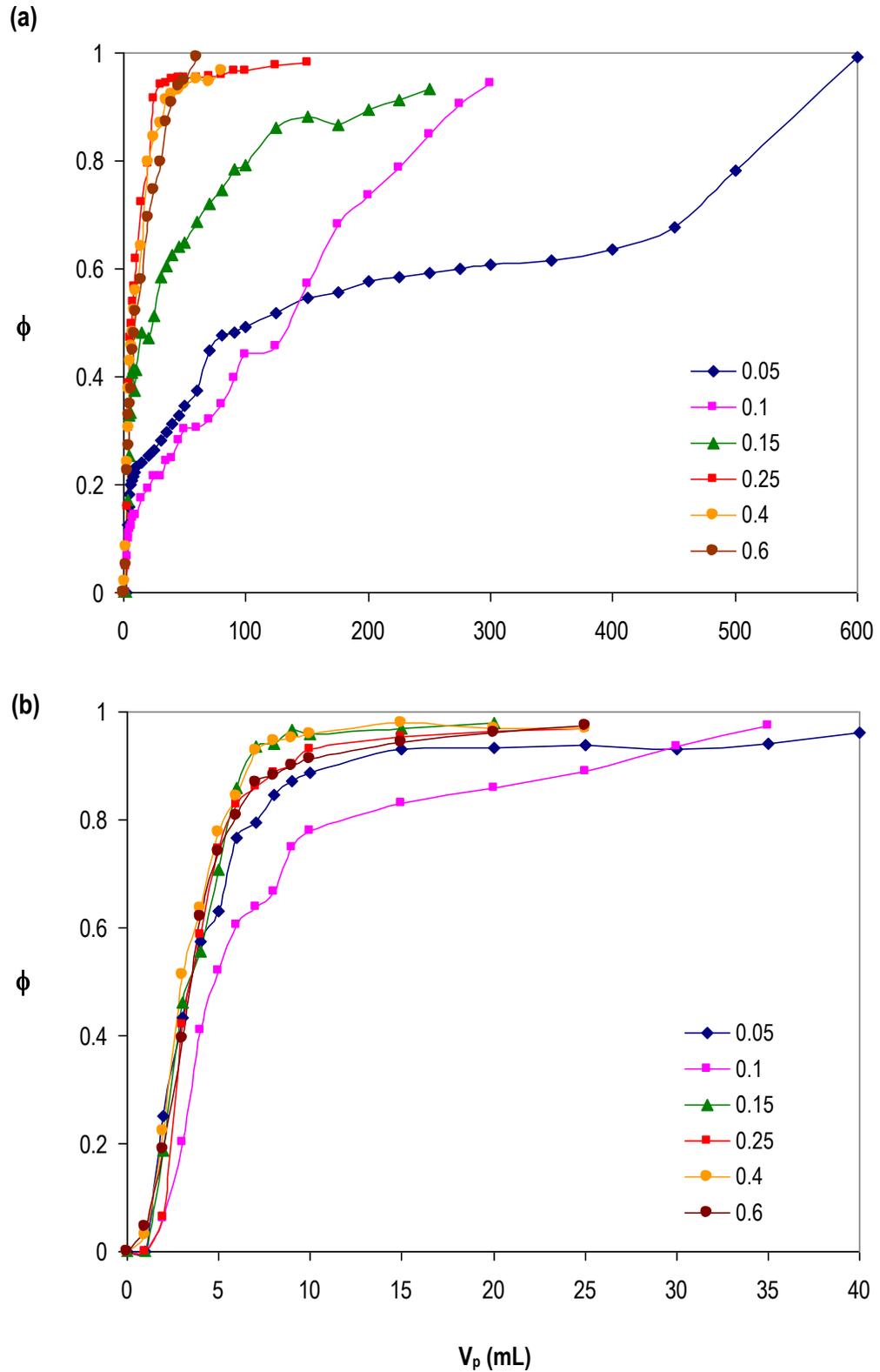


Figura 5.9. Frentes de migración obtenidos al variar la concentración de ETU ($0.05-0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$) en el influente: (a) PIM, (b) Blanco.

Las curvas de análisis frontal permiten determinar la cantidad de soluto retenido en un adsorbente al equilibrio, para diferentes concentraciones en el influente. Estos datos son útiles para trazar la isoterma de adsorción y caracterizar el mecanismo de retención. La determinación es muy sencilla cuando los frentes de migración presentan una zona de transición sigmoidal y simétrica, en cuyo caso el punto que se encuentra a la mitad de la altura del frente ($\phi = 0.5$) corresponde al punto estequiométrico o centro de masa de la curva. El volumen de disolución percolada cuando se alcanza el punto estequiométrico se denomina volumen estequiométrico (V_s) y es un importante parámetro termodinámico, equivalente al volumen de retención en cromatografía de elución. Si se traza una línea vertical a partir del volumen estequiométrico (llamada plano estequiométrico), ésta dividirá al frente de tal manera que el área bajo la curva a la izquierda del plano es igual al área sobre la curva a la derecha del plano. Por lo tanto, la cantidad de soluto retenida al equilibrio (Q_{eq}) se calcula con la siguiente relación (ecuación 5):

$$Q_{eq} = (V_s - V_m) \times C_o \quad (\text{Ec. 5})$$

Dado que los frentes experimentales mostrados en la Figura 5.9 no son simétricos ni sigmoidales, este método simple no puede aplicarse. Sin embargo, los datos obtenidos del análisis de todas las fracciones de efluente colectadas en cada experimento permitieron determinar la cantidad de ETU adsorbida en condiciones de saturación para cada una de las concentraciones en el influente ensayadas. La gráfica Q_{eq} Vs C_o resultante se presenta en la Figura 5.10.

En el polímero blanco se observa un incremento muy gradual de la cantidad de etiléntiurea retenida al elevarse la concentración del analito en la disolución de carga. La relación entre ambas

variables es aproximadamente lineal y con una pendiente muy baja. Esto puede indicar un fenómeno de reparto, o bien una adsorción inespecífica muy débil sobre la superficie del polímero. Es de notar que, a diferencia de experimentos descritos en secciones anteriores, en el caso de los frentes de migración se cuantifica toda la ETU que quedó en el cartucho durante la carga, en ausencia de una etapa de lavado. Por lo tanto, se puede esperar que en un proceso completo de EFS, la cantidad de ETU que permanece retenida por adsorción no específica o por reparto sea insignificante después de la etapa de lavado (tal como se reportó en la Tabla 5.22).

El sorprendente comportamiento observado en el PIM es completamente inusual para un adsorbente en estado de equilibrio, considerando que las gráficas de la Figura 5.10 son un símil de las isotermas de adsorción. Aún restando la retención no específica (gráfica PIM-BCO), la forma de la curva resulta poco lógica, ya que el adsorbente fue capaz de retener una mayor cantidad de etiléntiurea cuando las concentraciones de este analito en el influente eran menores.

Es importante subrayar que el experimento a concentración de $0.15 \mu\text{g mL}^{-1}$ se realizó al final de los demás, después de haber lavado exhaustivamente al polímero y reajustado el lecho empacado, y empleando una velocidad de flujo más baja. No obstante, la cantidad de ETU retenida en este caso fue congruente con la tendencia marcada por los resultados de las otras concentraciones (ver Fig. 5.10), lo que descarta como posibles responsables de la curva obtenida a problemas de difusión intrapartícula o a problemas experimentales como la contaminación cruzada, la compactación del lecho empacado o la progresiva degradación del PIM. Por lo anterior, se piensa que el comportamiento de retención observado sólo puede atribuirse a algún fenómeno relacionado con el propio analito.

Con esta base, se propone la posible formación de dímeros y agregados superiores de ETU en el disolvente orgánico (AcCN), cuya cantidad y número de agregación se verían favorecidos al aumentar la concentración del compuesto. Por la forma de la curva corregida PIM-BCO en la Fig. 5.10, es de esperarse que durante el proceso de síntesis del polímero se hubieran generado predominantemente sitios impresos con moléculas individuales o dímeros de la plantilla. Aunque la concentración de ETU en la mezcla de reacción era sumamente alta, su interacción con los monómeros funcionales y otras especies presentes pudo haber moderado hasta cierto grado la autoasociación de esta molécula. No obstante, dada la cantidad de ETU (25 mg) y el pequeño volumen de disolvente porógeno (AcCN, 4 mL) en la mezcla, una parte del compuesto debió quedar en forma de agregados predominantemente grandes, que generaron cavidades o sitios *ad hoc* cuando el polímero solidificó y la plantilla fue removida. Dichas cavidades fueron posteriormente capaces de reconocer a las entidades que las conformaron, aunque con energías de interacción probablemente muy variables.

Aceptando la hipótesis anterior, es posible dar una explicación más o menos congruente con los resultados del estudio de análisis frontal. Así, a las concentraciones estudiadas más bajas, predominaban las moléculas monoméricas y diméricas de ETU en la disolución, aunque también coexistían algunas entidades con número de agregación un poco mayor que empezaban a formarse en estas condiciones. Estas últimas se fugaron rápidamente del cartucho porque no había sitios impresos que las reconocieran o bien eran muy limitados; por el contrario, los monómeros y dímeros de ETU dispusieron de abundantes sitios con los cuales interaccionaron fuertemente. A concentraciones intermedias predominaban los agregados pequeños y medianos que por las razones expuestas casi no fueron retenidos; adicionalmente, es posible que persistieran algunos dímeros y que empezaran a formarse agregados mayores, ambas especies representando la

fracción de ETU retenida. Finalmente, a las concentraciones más altas, la proporción de grandes agregados aumentó y con ello la retención. De acuerdo con este esquema, en todo el intervalo de concentraciones estudiado existieron especies poco o no retenidas y especies retenidas con mayor o menor fuerza, dependiendo del número de sitios disponibles según su tamaño y de la energía de interacción en dichos sitios, fenómeno descrito por Sellergren⁽²⁾. Esto explica el perfil de los frentes de migración de la ETU en el PIM (Fig. 5.9), con una zona de transición dispersa, poco definida y más o menos escalonada. Así mismo, aceptando que a concentraciones intermedias predominaban las especies poco retenidas, se explica el máximo y el mínimo en la curva de adsorción al equilibrio del soluto en el PIM (Fig. 5.10).

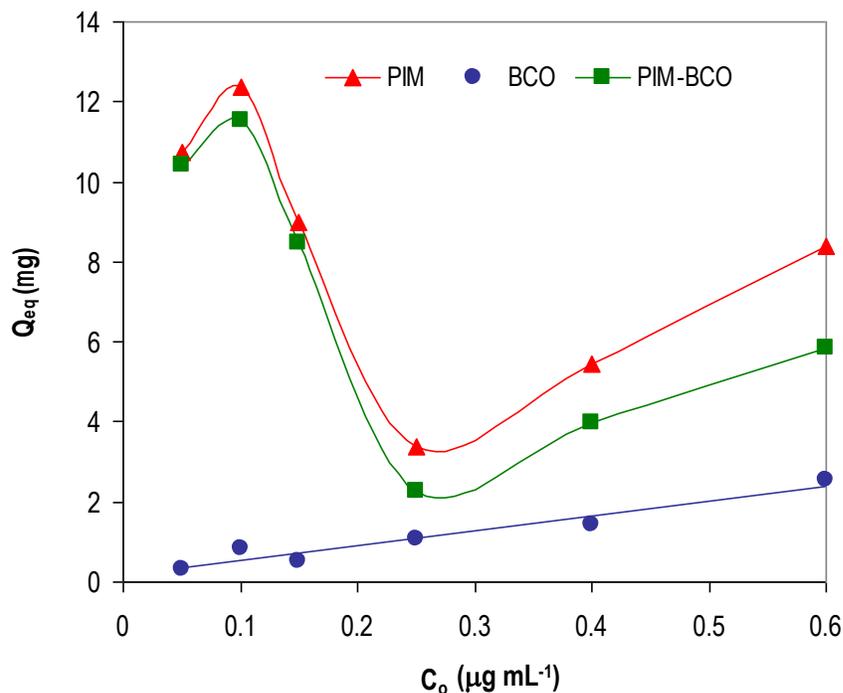


Figura 5.10. Cantidad de ETU adsorbida por el PIM y el polímero blanco (BCO) en condiciones de saturación del cartucho (Q_{eq}), para diferentes concentraciones de ETU en el influente (C_0). La curva PIM-BCO representa la cantidad de ETU retenida específicamente en el polímero impreso.

c) Perfiles de elución

Una vez alcanzado el estado de saturación del cartucho en el estudio de análisis frontal, se decidió examinar el perfil de elución de la ETU retenida para algunos casos. En la Figura 5.11 se muestran los perfiles obtenidos al eluir el cartucho de PIM que había sido cargado a saturación con disoluciones de ETU de concentración 0.05, 0.25 y 0.4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. El disolvente de elución fue $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.5 M en MeOH, similar al que se había estado utilizando en secciones anteriores excepto por la concentración de la sal, que se decidió aumentar buscando mejorar los porcentajes de recobro. Como puede observarse, los perfiles muestran un proceso de elución en varias etapas, delineándose una serie de picos traslapados. Esto indica que la ETU estaba retenida en sitios de diferente energía, lo que es congruente con la propuesta de coexistencia de diferentes especies de ETU en el disolvente de carga.

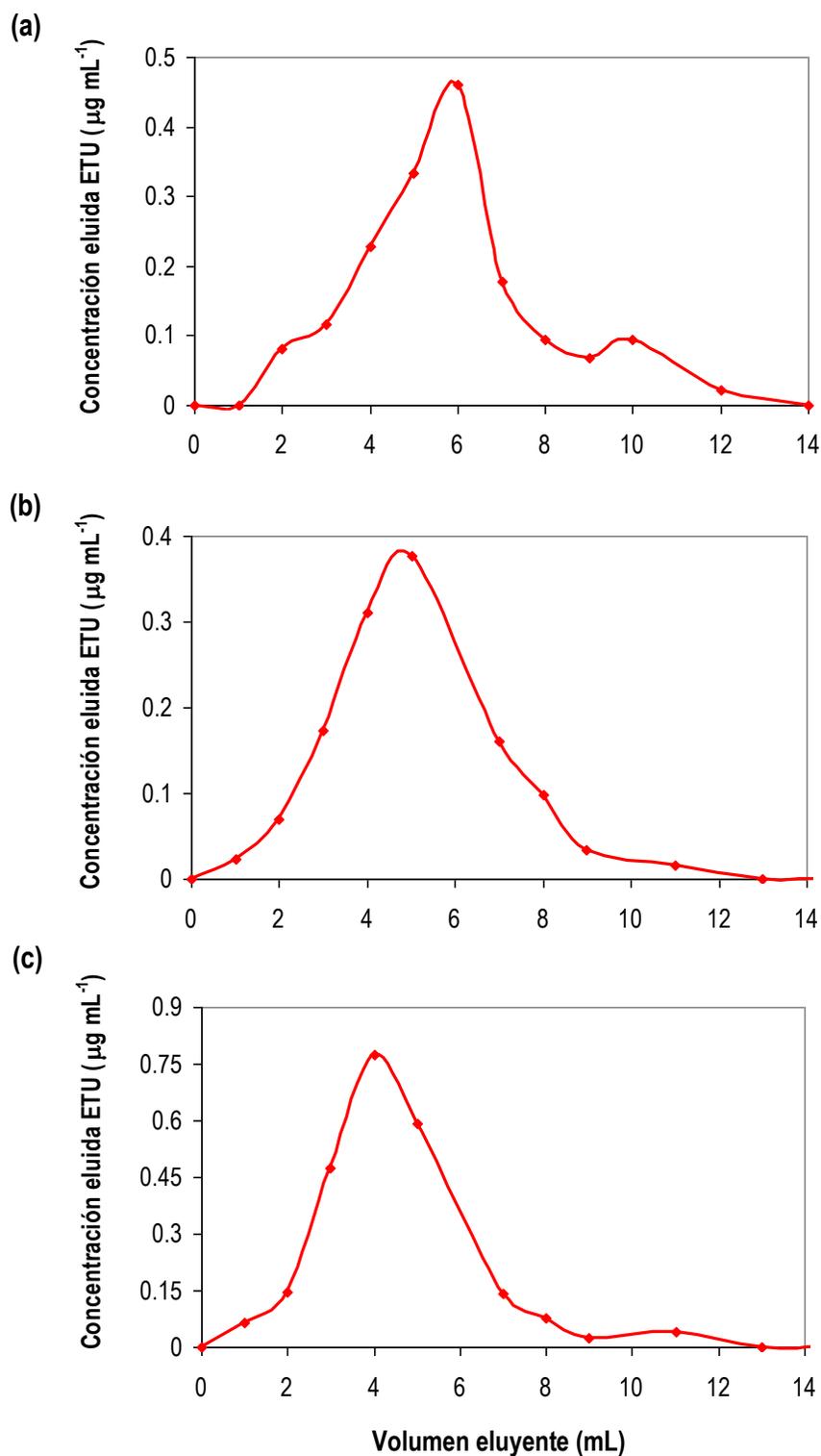


Figura 5.11. Perfiles de elución de la ETU retenida en el cartucho de PIM cargado a saturación. Eluyente: acetato de amonio 0.5 M en metanol, a flujo de 0.6 mL min^{-1} . Concentración de ETU en la carga: (a) $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$, (b) $0.25 \mu\text{g mL}^{-1}$, (c) $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$.

En los tres casos analizados, las curvas de elución terminaron abruptamente después del paso de un volumen de eluyente de ~14 mL; en este punto, la cantidad determinada de ETU eluida era muy inferior a la cantidad que había quedado retenida durante la carga. En la Tabla 5.25 se reportan estas cantidades, así como el porcentaje de recobro global en cada caso. El recobro fue significativamente menor cuando el cartucho fue cargado con una disolución de ETU de concentración $0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$. De acuerdo con nuestra propuesta, en estas condiciones predominaban las especies monoméricas y diméricas de ETU, las cuales se adsorbieron en sitios de muy alta energía. De hecho, el frente de migración correspondiente (ver Fig. 5.9) muestra una pseudo-zona de transición entre 400-600 mL, lo que indica una adsorción irreversible y la presencia de abundantes sitios con esta característica. Por otra parte, el recobro incompleto cuando se cargaron disoluciones más concentradas de ETU en el PIM, también es indicativo de sitios de adsorción de alta energía que, según nuestra propuesta, corresponderían a sitios que interaccionan con agregados conformados por un gran número de moléculas de ETU. Puesto que en los frentes correspondientes, la saturación ocurrió a volúmenes de carga relativamente bajos, el número de este tipo de sitios debió ser mucho más limitado.

Tabla 5.25. Cantidades retenidas a saturación del cartucho de PIM con disoluciones de ETU de diferente concentración en acetonitrilo. Cantidades recuperadas en la elución (μg) y % de Recobro.

Concentración ETU ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Cantidad ETU
0.05	1.7 (15.8%)
0.25	1.4 (42.7%)
0.40	2.5 (46.4%)

La caracterización exhaustiva del comportamiento de retención del polímero dopado 12 y su blanco demostró que se lograron generar, en el primer material, sitios de reconocimiento de la etiléntiurea. En efecto, utilizando como disolvente de carga y lavado al acetonitrilo, la retención de la ETU a partir de disoluciones muy diluidas fue insignificante en el polímero blanco, mientras que el polímero dopado pudo retener cantidades considerables de soluto antes de alcanzar la saturación. Por lo tanto se considera que el polímero dopado 12 es formalmente un polímero impreso con etiléntiurea. Los experimentos realizados también mostraron que las características estructurales, la porosidad y la estabilidad de estos polímeros eran bastante satisfactorias. Estos puntos son relevantes ya que los materiales altamente entrecruzados, sintetizados por la técnica de polimerización en bloque, presentan a menudo problemas de micro y nanoporosidad que redundan en una muy lenta difusión intrapartícula de los solutos, los cuales fácilmente quedan atrapados en los canales porosos. Desafortunadamente, el sistema polímero-ETU estudiado también presentó dos graves inconvenientes. Por una parte, hay fuertes indicaciones de que la ETU en acetonitrilo tiende a formar dímeros y agregados superiores desde muy bajas concentraciones. Esto se tradujo en la formación de sitios muy variados en tamaño y energía de interacción en el polímero impreso, ya que el acetonitrilo fue empleado como disolvente porógeno en el proceso de síntesis. El proceso de extracción en fase sólida también fue afectado por este fenómeno, debido a la coexistencia de diversas especies de ETU en la disolución de carga y al número muy limitado de sitios de reconocimiento en el PIM para varias de ellas. En consecuencia, para algunas de las condiciones experimentales ensayadas, ocurrió una fuga muy temprana de una fracción del analito, mientras que la saturación total del cartucho de PIM requirió de cientos de mililitros de la disolución de carga. Estos problemas no invalidarían del todo la posible aplicación del cartucho de PIM en procesos de EFS si su uso se limitara a la preconcentración de disoluciones muy diluidas de ETU ($\ll 0.05 \mu\text{g mL}^{-1}$), en cuyo caso probablemente sólo existirían moléculas individuales de analito para las cuales

quedó demostrado que se dispone de abundantes sitios de unión en el polímero. El segundo inconveniente, por el contrario, resultó insalvable puesto que fue imposible eluir cuantitativamente al soluto retenido. Más aún, se sospecha que la ETU retenida como molécula individual interaccionó con sitios de muy alta energía y fue esta forma de ETU, principalmente, la que no pudo ser eluida. Por lo tanto, aunque se logró imprimir una molécula tan pequeña como la ETU, el polímero obtenido no presentó propiedades adecuadas para su aplicación con fines analíticos.

5.3 Polímeros impresos para bencimidazoles

Con base en los resultados obtenidos por C. Cacho et al.⁽¹⁵⁸⁾, se pensó en mejorar la accesibilidad de los sitios de impresión del PIM para tiabendazol generado con ácido metacrílico y divinilbenceno, al variar el volumen de disolvente porógeno e incrementar la velocidad de agitación de la mezcla de precipitación. De los tres polímeros preparados en ausencia de molécula plantilla (Tabla 4.10 de la parte experimental), solamente el de 5 mL de porógeno (polímero 2), presentó una consistencia sólida y no coloidal como los otros dos; por ello, este volumen fue seleccionado como el óptimo de trabajo. En cuanto a la variable de velocidad de agitación durante la síntesis, se seleccionó la de 300 rpm, que correspondía a la velocidad máxima permitida por la parrilla de agitación controlada empleada. El polímero impreso y su blanco fueron preparados utilizando las relaciones descritas en la Tabla 4.11 de la parte experimental.

5.3.1 Evaluación del grado de impresión en el polímero

5.3.1.1 Optimización del proceso de extracción fuera de línea.

En la evaluación del PIM para bencimidazoles se utilizó acetonitrilo para el acondicionamiento del cartucho, y como componente de la disolución de lavado, por varias razones. La primera es que este disolvente formó parte de la mezcla usada como porógeno en la síntesis del polímero (mezcla acetonitrilo-tolueno 3:1, v/v). Además, el acetonitrilo es un disolvente polar, en el que los bencimidazoles son bastante solubles, y es miscible con agua en todas proporciones. Esta última propiedad es importante para la aplicación del PIM en la

preconcentración selectiva de bencimidazoles a partir de muestras acuosas. Inicialmente, los cartuchos empacados con 300 mg del PIM y su correspondiente polímero blanco (PB) se cargaron con sólo 2 mL de una disolución acuosa relativamente concentrada ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) del analito-plantilla (tiabendazol). El objetivo de este experimento era evaluar el grado de interacciones no específicas de los polímeros en presencia de agua, optimizar la composición de la disolución de lavado y tener una idea de la capacidad de retención específica del cartucho de PIM. La elución se realizó con 12 mL de la misma mezcla que se había utilizado anteriormente para remover la plantilla del polímero sintetizado, es decir, metanol-ácido acético 1:1 (v/v). El fuerte medio ácido provoca la protonación del tiabendazol (TBZ), lo que unido a la polaridad del metanol logra romper las interacciones entre el analito y el sitio impreso. Cabe mencionar que previamente se verificó la estabilidad del TBZ en este medio.

Los resultados obtenidos al utilizar mezclas acetonitrilo-agua en diferentes proporciones como fase de lavado, mostraron que sólo con acetonitrilo puro se lograba la eliminación completa de las interacciones no específicas que presentaba el blanco de polimerización. En la Tabla 5.26 se reporta el desempeño de los cartuchos empacados con el PIM y el PB durante el proceso de EFSIM. Como puede observarse, ambos cartuchos retienen fuertemente al tiabendazol durante la etapa de carga (pérdidas menores al 5%), ya sea por interacciones específicas o no específicas. Sin embargo, durante el lavado se desaloja todo el TBZ retenido en el PB, mientras que sólo una pequeña proporción del soluto es desalojado del PIM (< 10%). Finalmente, el compuesto que quedó retenido en el PIM (> 90%) fue eluido cuantitativamente durante la última etapa del proceso. Los resultados de la Tabla 5.26 también permiten deducir que la capacidad del cartucho para la retención específica de TBZ es probablemente mayor a $2 \mu\text{g}/300 \text{ mg}$ de PIM.

Tabla 5.26. Desempeño de los materiales sintetizados en los ensayos de EFSIM fuera de línea. % de tiabendazol (TBZ) recuperado en los efluentes de la carga, el lavado y la elución^a.

Material ^b	Carga (% TBZ)	Lavado (% TBZ) ^c	Elución (% TBZ)	Total
PIM	3.8	8.4	93.3	105.5
PB	4.5	89.3	nd	93.4

^a Cantidad total cargada 2 µg. ^b PIM = polímero impreso molecularmente con tiabendazol. PB = polímero blanco. 300 mg de adsorbente en los cartuchos. ^c Lavado con acetonitrilo puro. nd= no detectable.

5.3.1.2 Isotermas de adsorción. Caracterización físico-química del PIM

La isoterma de adsorción de un compuesto en un adsorbente dado proporciona información importante sobre la termodinámica del proceso y debe por lo tanto ser obtenida bajo estrictas condiciones de equilibrio. En este trabajo, las isotermas de tres bencimidazoles fueron obtenidas por un método estático, utilizando pequeñas cantidades de adsorbente (25 mg) y disolución (2 mL) para alcanzar rápidamente el equilibrio. Los experimentos realizados fueron similares a un proceso de EFS, con el adsorbente empacado en un cartucho, pero la fase de carga con el bencimidazol disuelto no se dejó fluir sino que se mantuvo en contacto con el adsorbente hasta alcanzar el equilibrio y luego fue desalojada. Las siguientes etapas, lavado y elución, se llevaron a cabo como en cualquier ensayo de EFS. El bencimidazol en estudio se determinó en los efluentes de la carga, del lavado y de la elución. El bencimidazol determinado en la carga representa la cantidad no retenida, el determinado en el lavado corresponde a la fracción que quedó retenida por interacciones no específicas y, finalmente, el determinado en la elución es el soluto que fue retenido por interacción específica con los sitios impresos.

5.3.1.2.1 Selección del tiempo de contacto

Una vez transcurrido cada uno de los tiempos de contacto seleccionados entre la fase de carga y el material impreso (0, 15, 30 ó 60 min), la disolución acuosa fue desalojada del cartucho y la concentración de tiabendazol remanente en ésta fue determinada. Debido a las características de cinética que presentan los polímeros impresos, se sabe que conforme se incrementa el tiempo de contacto entre la disolución y el PIM, las moléculas del analito tienen una mayor oportunidad de alcanzar y quedarse retenidas en los sitios de impresión de la matriz polimérica. Por ello se espera que la concentración de analito determinada en la disolución acuosa disminuya en forma gradual al aumentar el tiempo de contacto entre el PIM y la fase de carga, hasta que llega un momento a partir del cual, aunque se siga elevando el tiempo de contacto, la concentración en la disolución permanece constante (condiciones de equilibrio).

Los resultados mostraron que con un tiempo de 15 minutos se alcanzaba el equilibrio de distribución del TBZ entre la disolución de carga y el PIM sintetizado, ya que en los tiempos de 30 y 60 min se determinó la misma concentración de analito en la disolución acuosa.

5.3.1.2.2 Isotermas de adsorción

Puesto que un polímero impreso puede reconocer analitos de estructura similar a la de la molécula plantilla utilizada durante su síntesis, se decidió estudiar el comportamiento de adsorción de tres bencimidazoles en el PIM, por lo que se generaron las isotermas de adsorción para tiabendazol (molécula plantilla), carbendazim (CBZ) y benomil (BEN).

Para trazar el gráfico de las correspondientes isothermas de adsorción, se determinaron los parámetros **F** (concentración de analito en la disolución al equilibrio) y **B** (concentración de analito en el adsorbente al equilibrio). El valor de **B** se obtuvo dividiendo la cantidad de bencimidazol cuantificada en el eluato entre la cantidad de adsorbente empacado, mientras que **F** se calculó dividiendo la cantidad de analito determinada en los efluentes de carga y lavado entre el volumen de la disolución de carga.

Mediante un análisis de regresión no lineal con el programa Origin® versión 6.5, los datos experimentales de **B** y **F** fueron tratados y evaluados con cada uno de los modelos de adsorción descritos en la tabla 3.4 de la parte de antecedentes. Los resultados de los tres bencimidazoles mostraron un ajuste satisfactorio al modelo de Langmuir-Freundlich (Ecuación 6).

$$B = \frac{q K F^m}{1 + K F^m} \quad (\text{Ec. 6})$$

En esta ecuación, **B** y **F** son las concentraciones de equilibrio en el adsorbente y en la disolución, respectivamente, las cuales fueron determinadas experimentalmente. Mientras que las constantes: **q** que corresponde a la densidad de puntos de unión presentes en la matriz polimérica, **K** que es el valor de la constante de afinidad media y **m** que es el índice de heterogeneidad del adsorbente, fueron conocidas a través del mismo análisis de regresión.

En la Figura 5.12 se presentan las isothermas de adsorción de los tres bencimidazoles. Los puntos representan los datos experimentales, mientras que la línea continua corresponde al trazo de la ecuación de la isoterma utilizando los parámetros deducidos del ajuste.

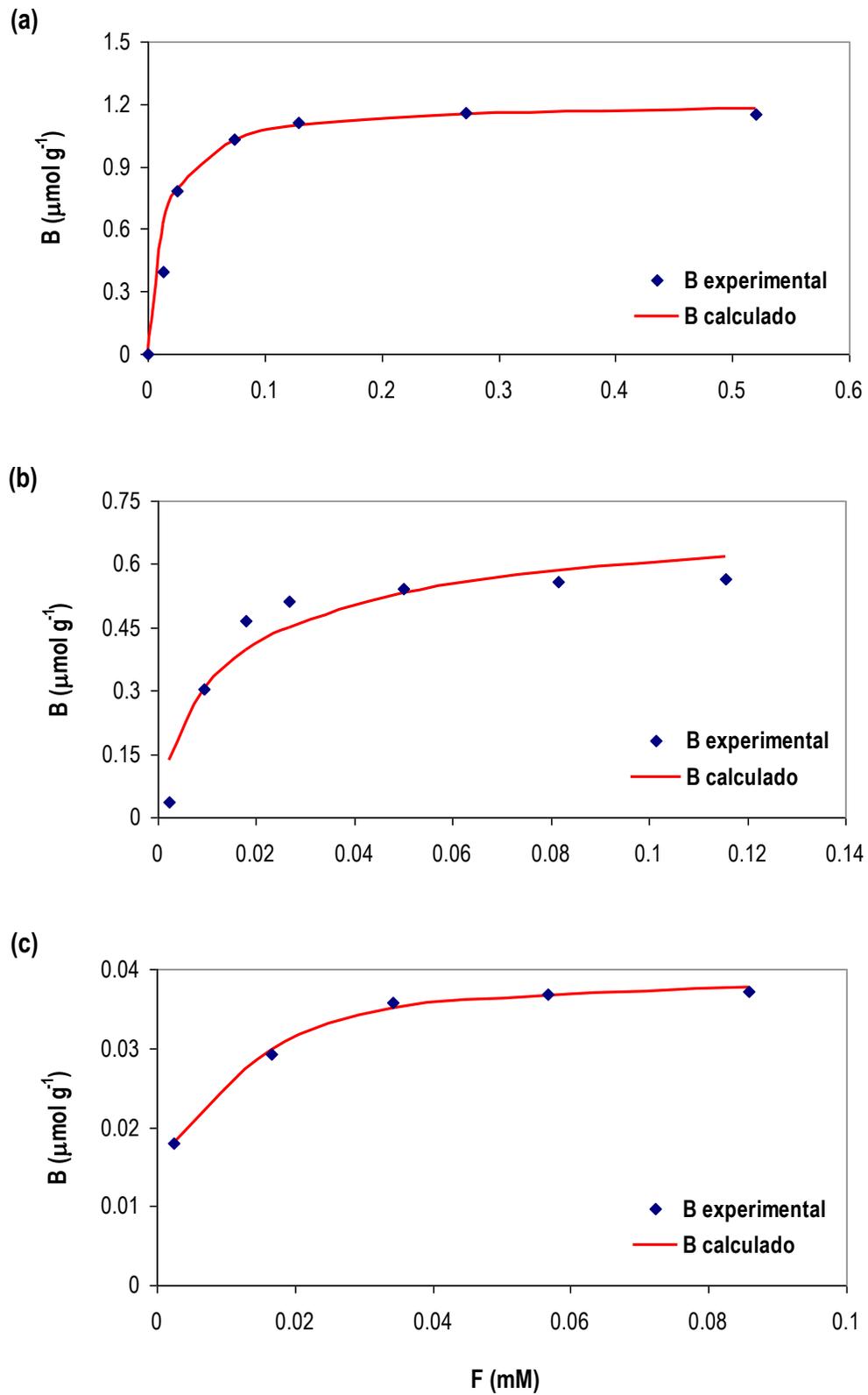


Figura 5.12. Isothermas de adsorción de (a) Tiabendazol, (b) Carbendazim y (c) Benomil en el PIM sintetizado.

En la Tabla 5.27 se resumen los valores obtenidos de los parámetros de la isoterma de Langmuir-Freundlich para cada uno de los bencimidazoles estudiados. Los resultados indican que el polímero impreso presenta afinidad por los tres analitos y que, de acuerdo con los valores de q y K , éste puede distinguir entre compuestos de estructura química semejante, ya que estos parámetros fueron diferentes para cada bencimidazol. Como era de esperarse, los valores de capacidad máxima y de constante de afinidad más grandes exhibidos por el adsorbente, se encontraron cuando el analito utilizado fue tiabendazol (molécula plantilla). Cabe mencionar que, aunque la densidad de sitios impresos es una propiedad del adsorbente que debiera ser independiente del analito, no todos los sitios presentan la configuración adecuada para que puedan interaccionar con compuestos que no tienen exactamente la misma estructura que el analito-plantilla. Por ello, el número de sitios disponibles para carbendazim y benomil es menor que para tiabendazol.

Tabla 5.27. Parámetros derivados del ajuste de los datos experimentales mediante la ecuación de la isoterma de Langmuir-Freundlich*.

Compuesto	q ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	K (mM^{-1})	m	R^2
Tiabendazol	1.20	78.4	1.00	0.9892
Carbendazim	0.76	22.0	0.75	0.9153
Benomil	0.05	11.2	0.50	0.9787

* q : capacidad máxima del adsorbente, K : constante de afinidad, m : índice de heterogeneidad, R^2 : coeficiente de determinación (bondad de ajuste).

Si se comparan las estructuras químicas de estos tres bencimidazoles (Figura 5.13), se observa que el más parecido al TBZ es el CBZ, mientras que el BEN es el que presenta una

estructura con mayores diferencias. En congruencia con esto, tanto los valores de q como de K , van de mayor a menor magnitud en el siguiente orden: TBZ>CBZ>BEN.

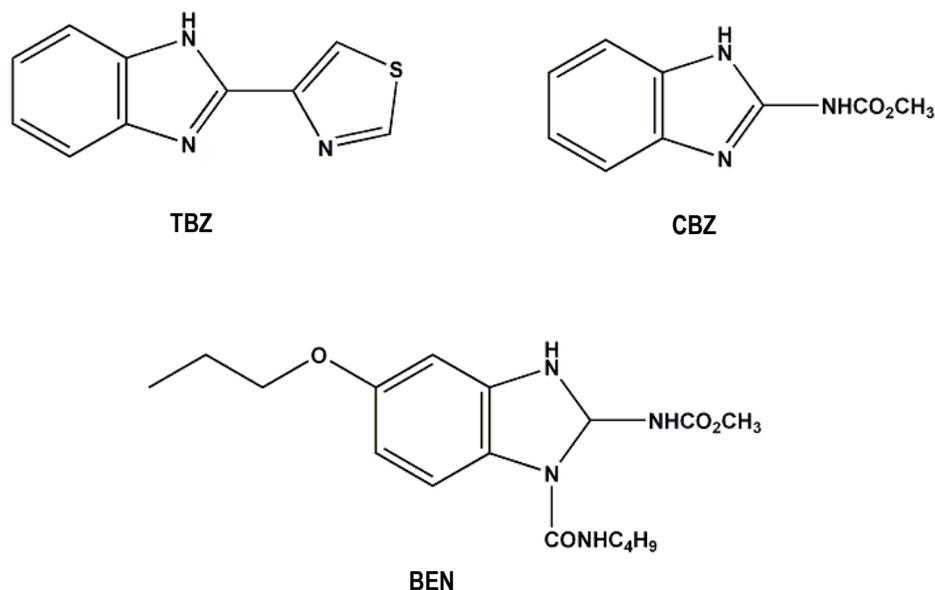


Figura 5.13. Estructuras químicas de los bencimidazoles estudiados.

Aparentemente, la estructura relativamente plana de la molécula plantilla (TBZ) genera cavidades impresas muy homogéneas en cuanto a tamaño y disposición de los grupos funcionales superficiales del polímero (a base de ácido metacrílico) que interactúan con esta molécula. Sin embargo, el entorno de estas cavidades no es idéntico, de modo que sólo un 60% de ellas son accesibles y/o aptas para acomodar la molécula de carbendazim, cuya estructura es espacialmente menos plana (grupo metil carbamato). Además, el carbendazim presenta una función ácida (grupo amida) poco afín a los grupos ácido carboxílico del polímero, lo que también explica su menor constante de afinidad comparada con el TBZ. Esta población de sitios es

heterogénea en lo que respecta a su energía de interacción con el carbendazim. Por otro lado, el benomil es un caso aparte pues su estructura y arreglo espacial presentan diferencias considerables con los de la molécula plantilla. En consecuencia, menos del 5% de las cavidades impresas pueden enlazar al benomil y la energía de interacción con este soluto varía entre sitio y sitio.

De acuerdo con los resultados obtenidos y la discusión anterior, el comportamiento de adsorción del TBZ en el PIM debería poder ajustarse adecuadamente a un modelo de isoterma tipo Langmuir. En la Figura 5.14 se presenta la gráfica de $1/B$ vs. $1/F$, de acuerdo con la ecuación linealizada del modelo Langmuir (Ecuación 7).

$$1/B = 1/q + 1/(q \times K \times F) \quad (\text{Ec. 7})$$

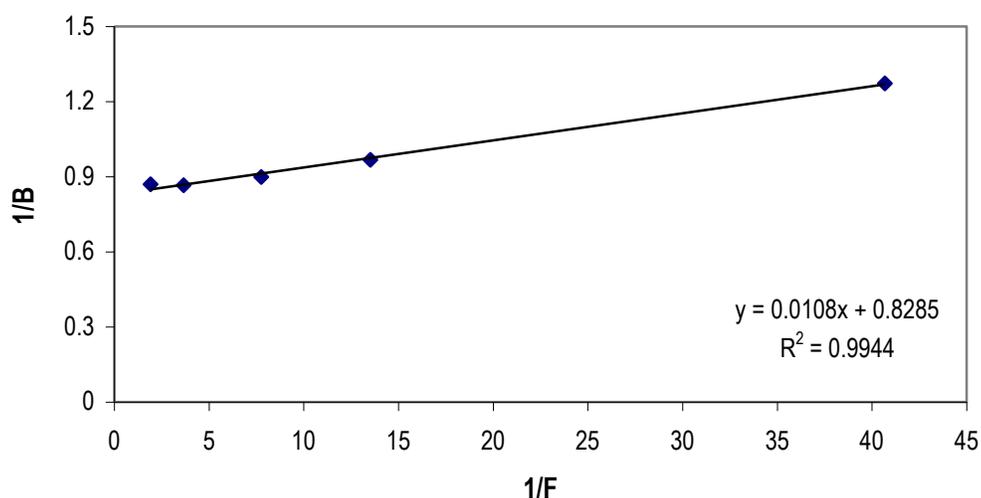


Figura 5.14. Isoterma de adsorción para TBZ representada conforme al modelo de Langmuir.

Los parámetros deducidos del ajuste de los datos a este modelo se reportan en la Tabla 5.28.

Tabla 5.28. Parámetros derivados del ajuste de los datos experimentales mediante la ecuación de la isoterma de Langmuir para tiabendazol*.

Compuesto	q ($\mu\text{mol g}^{-1}$)	K (mM^{-1})	R ²
Tiabendazol	1.21	76.7	0.9944

*q: capacidad máxima del adsorbente, K: constante de afinidad, R²: coeficiente de determinación (bondad de ajuste).

La bondad de ajuste al modelo Langmuir es aceptable por lo que se puede estipular que se ha logrado sintetizar un polímero con sitios impresos homogéneos, en donde el tiabendazol es retenido por un mecanismo de adsorción típico. Como en todos los procesos de adsorción en sitios activos, la afinidad de los compuestos por el adsorbente disminuye a medida que se saturan los sitios de unión.

Para cualquier compuesto cuyo comportamiento de adsorción se ajuste al modelo Langmuir, los parámetros de la isoterma permiten estimar el valor del coeficiente de distribución (K_D) en disoluciones muy diluidas, de acuerdo con el siguiente equilibrio y las relaciones correspondientes (Ecuaciones 8 y 9):



$$K_D (\text{mL g}^{-1}) = \frac{[PS]_{\text{ads}}}{[P]_{\text{disol}}} = K \cdot q \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde: PS_{ads} representa al soluto adsorbido en los sitios activos del adsorbente, S_{ads} son los sitios activos libres en el adsorbente y P_{disol} es el soluto remanente en la disolución; K es la constante de afinidad expresada en función de las concentraciones al equilibrio de la “especie” y q es la densidad de sitios de adsorción, es decir la concentración de todos los sitios, libres y ocupados, en el adsorbente. La concentración en el adsorbente está dada en $\mu\text{mol g}^{-1}$ y en la disolución en mM ($\mu\text{mol mL}^{-1}$). En la tabla 5.29 se presenta el coeficiente de distribución del TBZ entre la disolución acuosa y el PIM, estimado a partir de los parámetros de la isoterma Langmuir (Tabla 5.28). Este coeficiente representa el equilibrio de distribución del soluto bajo condiciones de alta dilución, es decir, en la parte lineal de la isoterma.

Tabla 5.29. Coeficiente de distribución entre la disolución acuosa y el PIM sintetizado determinado para TBZ.

Compuesto	K_D (mL g^{-1})
Tiabendazol	92.6

Como puede observarse en la Tabla 5.29, el coeficiente de distribución del TBZ es lo suficientemente alto como para garantizar la exitosa aplicación del polímero sintetizado en la preconcentración de este bencimidazol a partir de muestras acuosas. En los casos del carbendazim y benomil no fue posible estimar sus respectivos valores de coeficiente de distribución puesto que la ecuación de Freundlich (y por lo tanto la de Langmuir-Freundlich) es

una relación empírica, es decir, describe razonablemente bien el comportamiento de adsorción en sitios de diferente energía pero no deriva del tratamiento teórico de un equilibrio.

Con base en los valores reportados en la Tabla 5.27, se estimó que el carbendazim y el benomil también podrían ser preconcentrados en el cartucho de PIM. En efecto, un cartucho empacado con, por ejemplo, 100 mg de adsorbente podrían retener a saturación 14.5 µg de carbendazim ó 1.5 µg de benomil, cantidades que son lo suficiente grandes para su posterior determinación por CLAR.

5.3.2 Capacidad del polímero impreso para preconcentrar a los analitos en muestras acuosas

Estos experimentos se realizaron conectando en línea una columna empacada con el PIM (300 mg) y el detector UV del sistema cromatográfico. La columna fue alimentada con las disoluciones de carga, lavado y elución mediante una bomba auxiliar.

En ensayos anteriores con los cartuchos (fuera de línea), se había utilizado una disolución metanol-HAcO (ácido acético concentrado) 1:1 (v/v) en la etapa de elución para asegurar la completa remoción de los bencimidazoles. Sin embargo, esta mezcla es muy agresiva y podría dañar al detector en el sistema en línea, por lo que se buscó un eluyente más suave. Después de algunos ensayos se encontró que bastaban 10 mL de una disolución acuosa al 2% de ácido acético para recuperar cuantitativamente al TBZ en el eluato. Por lo tanto, esta condición se usó en los ensayos posteriores.

Para determinar si la columna de PIM era capaz de alcanzar un alto factor de preconcentración se efectuaron dos ensayos, cargando en cada uno la misma cantidad de bencimidazol (1 μg). En el primero, el analito se cargó disuelto en 1 mL de agua y en el segundo se disolvió en 100 mL de agua. Bajo condiciones de no saturación, si la constante de afinidad es suficientemente grande y la cinética del proceso no es demasiado lenta, el frente de migración permanece íntegramente dentro de la columna y por lo tanto no se detecta analito a la salida de ésta. Sin embargo, en disoluciones muy diluidas, la sensibilidad del detector no es suficiente para determinar con certitud si el analito aparece o no en el efluente de la carga. Por tal razón, el método que consiste en trazar los frentes de migración para determinar volúmenes de fuga no es adecuado en el caso de disoluciones a muy baja concentración del compuesto de interés. Por el contrario, en la elución, el compuesto que ha sido cargado se preconcentra en la columna y es desalojado con un volumen más o menos pequeño de disolvente, siendo entonces fácilmente detectable. Así, al conectar en línea la columna empacada con el PIM y el detector UV fue posible determinar en continuo los perfiles de elución para los tres bencimidazoles, comparando el perfil obtenido en el ensayo con carga de 1 mL y en el ensayo con carga de 100 mL. En la Figura 5.15 se presentan los perfiles de elución correspondientes a las dos condiciones para cada analito. Como puede observarse, el comportamiento de desorción es idéntico, es decir, la misma forma y área de pico, y el mismo tiempo requerido para la elución del máximo (Tabla 5.30), lo cual indica que el polímero retuvo la misma cantidad del analito independientemente del volumen de carga. Cabe señalar que la detección de los bencimidazoles se llevó a cabo a longitudes de onda correspondientes a uno de sus máximos de absorción, descartando la región de bajas longitudes de onda (200-230 nm) donde el ácido acético presente en el eluyente genera mayor interferencia.

Debido a que la relación de concentración entre las dos disoluciones cargadas en estos experimentos fue de 100:1, se demuestra que el material sintetizado permite preconcentrar a los 3 bencimidazoles de interés en un factor de hasta 100 veces. Por otra parte, la señal generada por la desorción de los tres compuestos presenta la forma de un pico ancho y coleado, lo que indica una lenta cinética de desorción, muy característica de los materiales poliméricos.

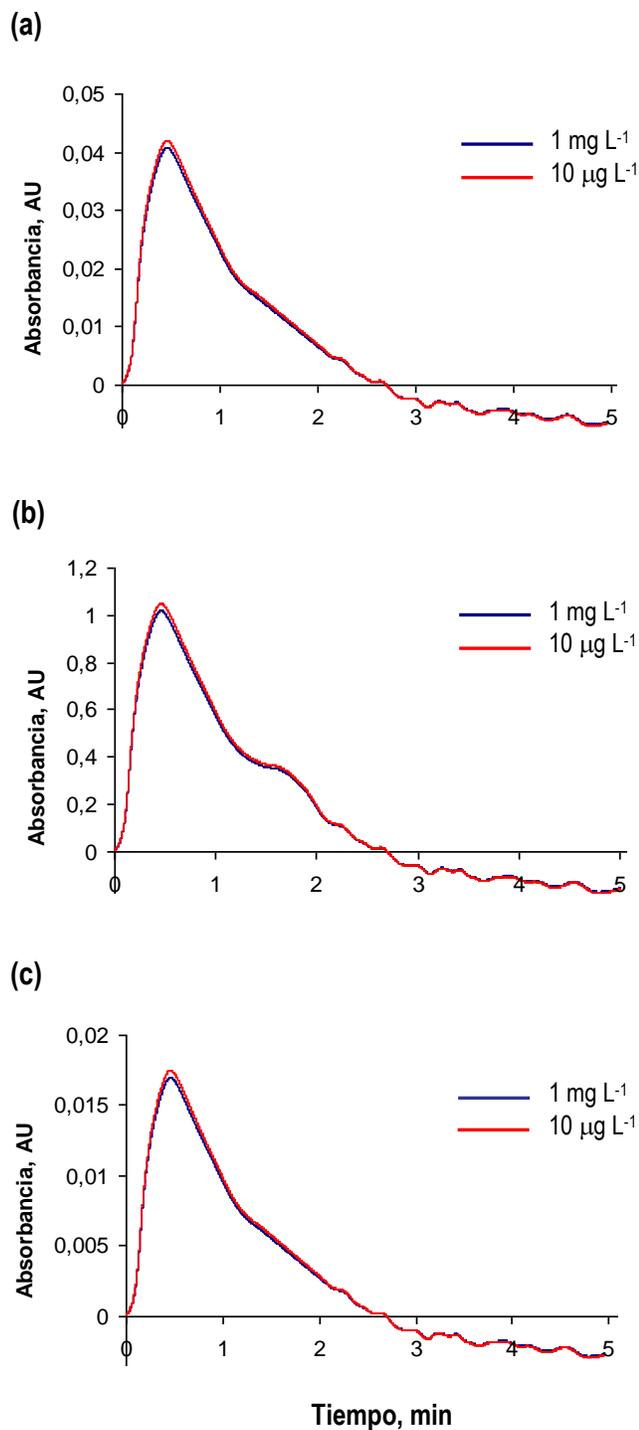


Figura 5.15. Perfiles de elución obtenidos para: (a) TBZ. (b) CBZ y (c) BEN. Carga de 1 µg de bencimidazol disuelto en 1 mL (1 mg L^{-1}) o en 100 mL (10 µg L^{-1}) de agua, lavado con 5 mL de acetonitrilo. Cartucho empacado con 300 mg de PIM.

Tabla 5.30. Longitud de onda de detección y tiempo de elución del máximo para cada bencimidazol.

Compuesto	λ (nm)	$t_{\text{elución}}$ (min)
TBZ	305	0.52
CBZ	240	0.51
BEN	240	0.51

5.3.3 Diseño del sistema de preconcentración y determinación en línea

El arreglo experimental examinado en la sección anterior no permite la determinación conjunta de los tres bencimidazoles pues todos eluyen al mismo tiempo y, además, generan un pico muy ancho. Por ello, la columna de PIM se conectó a una columna analítica de separación C_{18} mediante una válvula de conmutación (ver diagrama en la parte experimental, Figura 4.1), conformando de esta manera un sistema EFSIM-CLAR-UV en línea.

De acuerdo con los perfiles de elución (Figura 5.15), los tres bencimidazoles pueden ser cuantitativamente desorbidos de la columna de PIM con sólo 5 mL de una disolución de ácido acético al 2% en agua. Mediante la operación de la válvula de conmutación como se indicó en la parte experimental (sección 4.4.2.4), el eluyente con los analitos desorbidos es transferido en línea a la columna C_{18} . Esta disolución acuosa acidificada constituye una fase móvil extremadamente débil con respecto a una columna de fase reversa C_{18} , por lo que los analitos no migran sino que son retenidos prácticamente al inicio de la columna. De esta manera, el pico ancho en el que eluyen los solutos de la columna de PIM se enfoca a la entrada de la columna C_{18} , desapareciendo el problema de dispersión y coleo ocasionado por la lenta cinética de

desorción propia de las fases poliméricas altamente entrecruzadas. Finalmente, los tres bencimidazoles se separan en la columna analítica mediante un gradiente de elución optimizado (parte experimental, Tabla 4.3), usando una disolución acuosa de ácido acético al 2% como fase móvil débil (fase A) y acetonitrilo como fase móvil fuerte (fase B). En la Tabla 5.31 se presenta la “tabla de tiempo” del método completo, indicando la operación que se realiza en cada paso y algunos otros datos experimentales.

Tabla 5.31. Tabla de tiempo, operaciones y parámetros experimentales del método EFSIM-CLAR-UV en línea para la determinación de tres bencimidazoles en muestras acuosas.

Tiempo (min)	Operación	Posición válvula de conmutación	Bomba _{aux} ^a (Flujo, mL min ⁻¹)	Bomba _{CLAR} ^b (Flujo, mL min ⁻¹)
0-10	Acondicionamiento PIM	Carga	10 mL agua (1)	HAcO 2% (1)
10-110 ^c	Carga PIM	Carga	100 mL muestra (1)	HAcO 2% (1)
110-115	Lavado PIM	Carga	5 mL AcCN (1)	HAcO 2% (1)
115-120	Elución PIM	Inyección	Apagada	HAcO 2% (1)
120-146	Separación y análisis	Carga	Apagada	Gradiente (1)

^a Composición de la disolución enviada por la bomba auxiliar.

^b Fase móvil enviada por la bomba del cromatógrafo, HAcO 2% es una disolución acuosa de ácido acético al 2%, gradiente HAcO 2% - acetonitrilo (AcCN) como en la Tabla 4.10.

^c El tiempo en este paso depende del volumen de muestra a preconcentrar.

En la Figura 5.16 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar una muestra blanco preparada solo con agua desionizada y una muestra sintética de agua dopada con los 3 bencimidazoles a concentración de 10 µg L⁻¹, usando el método en línea EFSIM-CLAR-UV/DAD. El volumen de muestra preconcentrada en el PIM fue de 100 mL. La detección se llevó a cabo

con un detector de arreglo de diodos (DAD), programado para el trazo del cromatograma a diferentes longitudes de onda.

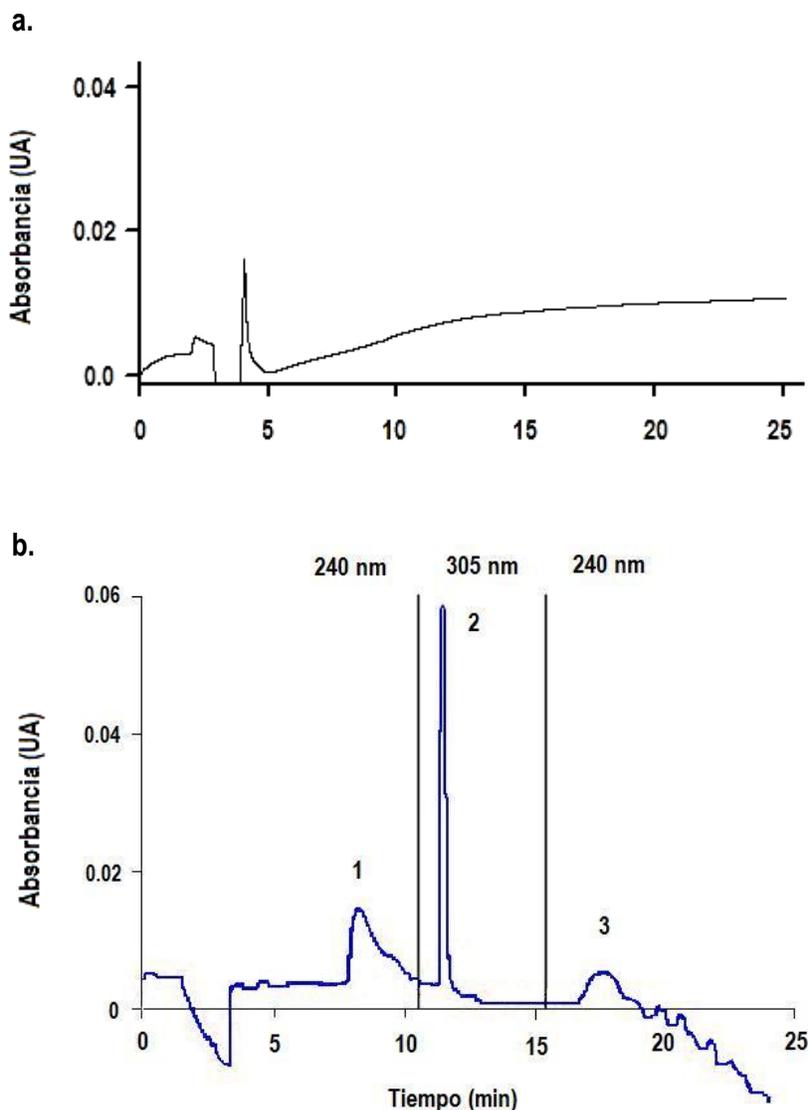


Figura 5.16. Cromatogramas obtenidos del análisis de muestras: a. Agua grado reactivo sin fortificar. b. Agua grado reactivo fortificada con: (1) Carbendazim ($t_r = 8.2$ min), (2) Tiabendazol ($t_r = 11.6$ min), y (3) Benomil ($t_r = 18$ min) a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ cada uno. Cada muestra (100 mL) se preconcentró y purificó en una columna de PIM, se transfirió en línea a una columna analítica C_{18} y se separó mediante un gradiente de elución. Detección UV a varias longitudes de onda mediante un detector de arreglo de diodos.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que, a pesar de la baja eficiencia de los polímeros impresos, es posible acoplarlos en línea con un sistema de cromatografía de líquidos para la preconcentración, purificación y análisis de muestras acuosas. En el caso presente, utilizando el polímero impreso con TBZ para el tratamiento de la muestra, acoplado en línea con CLAR-UV/DAD, fue posible determinar en un mismo análisis concentraciones del orden de las partes por billón de tiabendazol, carbendazim y benomil en muestras acuosas.

Con la finalidad de mejorar la forma de los picos cromatográficos de carbendazim y benomil, se adicionó un modificador a la fase móvil, sulfato ácido de tetrabutilamonio ($\text{NBut}_4\text{HSO}_4$) en concentración igual a 25 mM, con el cual se logró minimizar la interacción de estos bencimidazoles y los grupos silanol residuales de la fase estacionaria, cuyo efecto provocaba el ensanchamiento de las señales correspondientes.

Una vez mejorada la detección de CBZ y BEN, se realizó la determinación de los 3 bencimidazoles en una muestra real. Para ello, una muestra de agua de río fue dopada con TBZ, CBZ y BEN a concentración de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno y posteriormente analizada utilizando el método en línea EFSIM-CLAR-UV/DAD desarrollado. El volumen de muestra preconcentrada en el PIM fue de 50 mL. El cromatograma obtenido se presenta en la Figura 5.17.

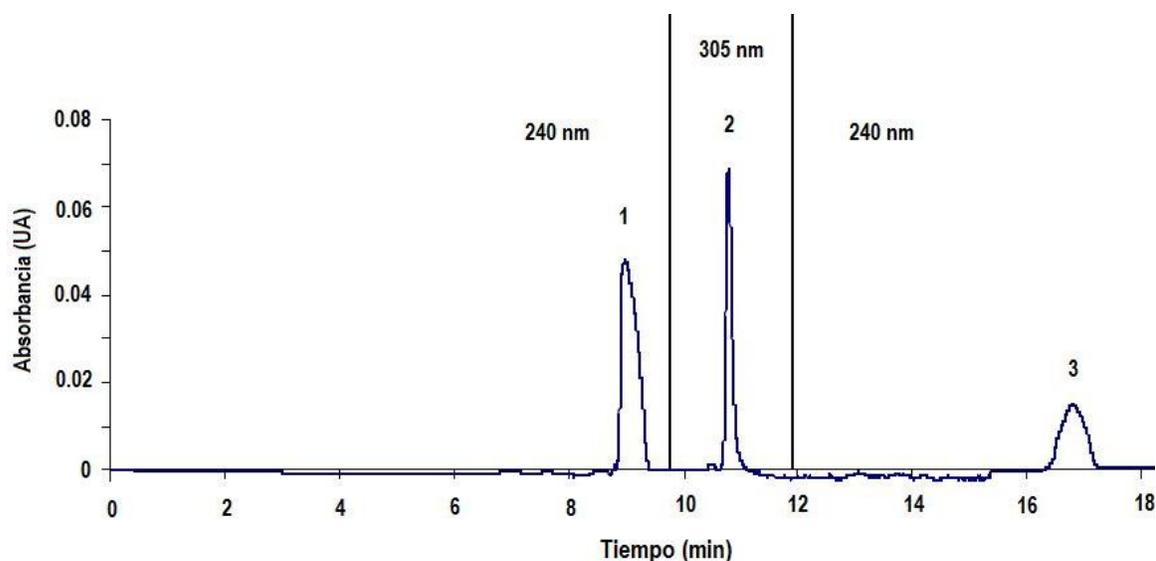


Figura 5.17. Cromatograma obtenido del análisis de una muestra real de agua de río fortificada con: (1) Carbendazim, (2) Tiabendazol, y (3) Benomil a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ cada uno. La muestra (50 mL) se preconcentró y purificó en una columna de PIM, se transfirió en línea a una columna analítica C_{18} y se separó mediante un gradiente de elución. Detección UV a varias longitudes de onda mediante un detector de arreglo de diodos.

Como puede observarse este cromatograma solo presenta las señales correspondientes a los bencimidazoles, con lo que se demuestra la alta selectividad del PIM hacia moléculas con estructura similar al tiabendazol (molécula-plantilla). Los valores de % de recobro determinados para CBZ, TBZ y BEN fueron del 97.3, 91.9 y 89.5 respectivamente, con lo cual es posible decir que se logró desarrollar un método selectivo y confiable para la determinación de estos bencimidazoles en muestras acuosas reales.

VI CONCLUSIONES

- ☞ Mediante la técnica de polimerización en bloque vía radicales libres, se buscó imprimir en la matriz polimérica una molécula muy pequeña, la etiléntiurea. El estudio sistemático del efecto de la naturaleza y proporción de los componentes de la mezcla de reacción, permitió desarrollar materiales con sitios de reconocimiento específico para esta molécula. El mejor PIM para este compuesto se obtuvo utilizando acrilamida y 4-vinilpiridina como monómeros funcionales, etilenglicol dimetacrilato como entrecruzante y acetonitrilo como disolvente porógeno. Las proporciones de los reactivos se ajustaron para optimizar la porosidad y grado de entrecruzamiento del material, a modo de disminuir los problemas de difusión intrapartícula, manteniendo la integridad de las cavidades impresas. La completa caracterización del proceso de retención de etiléntiurea en el PIM sintetizado mostró que, debido en gran medida al comportamiento del soluto en el disolvente orgánico (tendencia a la autoasociación), se generaron sitios de impresión de diferente tamaño y energía de enlace. Algunos de estos sitios presentaron una muy alta energía de enlace, lo que condujo a una retención prácticamente irreversible de una fracción importante de la ETU. En consecuencia, no fue factible la aplicación de este PIM en sistemas de extracción en fase sólida con fines cuantitativos, pues el recobro del analito de interés durante la elución sería sólo parcial. Sin embargo, el PIM desarrollado es capaz de retener y preconcentrar cantidades importantes de ETU (>10 µg) a partir de disoluciones orgánicas (acetonitrilo) muy diluidas, por lo que eventualmente podría ser utilizado como un sensor de la presencia

de este metabolito en extractos de algunas matrices ambientales (suelos, sedimentos, tejido biológico).

Adicionalmente, se logró sintetizar un nuevo material impreso con el fungicida tiabendazol (molécula plantilla) mediante la técnica de polimerización por precipitación, utilizando ácido metacrílico como monómero funcional, divinilbenceno como entrecruzante y una mezcla acetonitrilo-tolueno 3:1 v/v como porógeno. La caracterización del proceso de retención de tres bencimidazoles en el material sintetizado, permitió obtener las correspondientes constantes de afinidad y determinar la capacidad de adsorción máxima para cada soluto. Estos resultados pusieron de manifiesto que el polímero impreso con tiabendazol también es capaz de reconocer, diferenciar y retener en su superficie a los pesticidas carbendazim y benomil, cuya estructura es parecida a la de la molécula plantilla. Con base en las excelentes propiedades mostradas por este polímero impreso, se desarrolló una metodología analítica simple, robusta y fácilmente automatizable para la determinación de estos bencimidazoles a niveles de concentración del orden de las partes por billón ($\mu\text{g L}^{-1}$) en muestras de agua. La metodología se basa en el acoplamiento en línea del proceso de extracción en fase sólida impresa molecularmente (EFSIM), con el proceso de separación y análisis por cromatografía de líquidos en fase reversa C_{18} con detección UV. La aplicación del método en línea EFSIM-CLAR-UV/DAD en el análisis de una muestra de agua de río, fortificada con los tres bencimidazoles a concentración de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, dio como resultado un cromatograma extraordinariamente limpio, donde los analitos pudieron ser cuantificados con alta confiabilidad.

VII BIBLIOGRAFÍA

1. C. Cacho, 2009. ***Polímeros de impresión molecular para la determinación de pesticidas***. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Madrid España.
2. B. Sellergren 2003, ***Molecularly Imprinted Polymers: Man-Made Mimics of Antibodies and their Application in Analytical Chemistry***, Elsevier, Amsterdam, 2da. edición.
3. C. Cacho, 2004. ***Determinación de triazinas en muestras vegetales mediante extracción en fase sólida con polímeros generados por impresión molecular (MISPE)***, Diploma de Estudios Avanzados, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, Madrid España.
4. E. Turiel, A. Martín-Esteban, 2004. ***Molecularly imprinted polymers: Towards highly selective stationary phases in liquid chromatography and capillary electrophoresis***, Anal. Bioanal. Chem. 378: 1876-1886.
5. N.P. Moral, A.G. Mayes, 2004. ***Comparative study of imprinted polymer particles prepared by different polymerisation methods***, Anal. Chim. Acta 504: 15-21.
6. V. T. Remcho, Z. J. Tan, 1999. ***MIPs as chromatographic stationary phases for molecular recognition***, Anal. Chem. News & Features April: 248-255.
7. L. Schweitz, L. I. Andersson, S. Nilsson, 1997. ***Capillary Electrochromatography with Predetermined Selectivity Obtained through Molecular Imprinting***, Anal. Chem. 69: 1179-1183.

8. C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, C. Cámara, 2004. ***Characterization and quality assessment of binding sites on a propazine-imprinted polymer prepared by precipitation polymerisation***, J. Chrom. B 802: 347-353.
9. H. Sambe, K. Hoshina, R. Moaddel, I. W. Wainer, J. Haginaka, 2006. ***Uniformly-sized, molecularly imprinted polymers for nicotine by precipitation polymerization***. J. Chromatogr. A 1134: 88-94.
10. L. Ye, P. Cormack, K. Mosbach, 2001. ***Molecular imprinting on microgel spheres***, Anal. Chim. Acta 435: 187-196.
11. R. Arshady, K. Mosbach, 1981. ***Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization***, Makromol. Chem. 182: 687-692.
12. M. T. Muldoon, L. H. Stanker, 1997. ***Molecularly Imprinted Solid Phase Extraction of Atrazine from Beef Liver Extracts***, Anal. Chem. 69: 803-808.
13. L. I. Andersson, 2000. ***Efficient sample pre-concentration of bupivacaine from human plasma by solid-phase extraction on molecularly imprinted polymers***, Analyst 125: 1515-1517.
14. E. Turiel, A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara, 2001. ***Molecular Recognition in a Propazine-imprinted Polymer and Its Application to the Determination of Triazines in Environmental Samples***, Anal. Chem. 73: 5133-5141.
15. C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, C. Cámara, 2003. ***Clean-up of triazines in vegetable extracts by molecularly-imprinted solid-phase extraction using a propazine-imprinted polymer***, Anal. Bioanal. Chem. 376: 491-496.
16. G. Theodoridis, P. Manesiotis, 2002. ***Selective solid-phase extraction sorbent for caffeine made by molecular imprinting***, J. Chromatogr. A 948: 163-169.

-
17. F. G. Tamayo, J. L. Casillas, A. Martín-Esteban, 2005. ***Clean up of phenylurea herbicides in plant sample extracts using molecularly imprinted polymers***, Anal. Bioanal. Chem. 381: 1234-1240
 18. G. Wulff, A. A. Sarchan, 1972. ***Macromolecular Colloquium***, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 11: 334-342.
 19. M. J. Whitcombe, M.E. Rodríguez, P. Villar, E. Vulfson, 1995. ***A New Method for the Introduction of Recognition Site Functionality into Polymers Prepared by Molecular Imprinting: Synthesis and Characterization of Polymeric Receptors for Cholesterol***, J. Am. Chem. Soc. 117: 7105-7111.
 20. Umpleby RJ, Bode M, Shimizu KD, 2000. ***Measurement of the continuous distribution of binding sites in molecularly imprinted polymers***, Analyst 125: 1261-1265.
 21. M. Petcu, J. Cooney, C. Cook, D. Lauren, P. Schaare, P. Holland, 2001. ***Molecular imprinting of a small substituted phenol of biological importance***, Anal. Chim. Acta 435: 49-55.
 22. N. Sneschkoff, K. Crabb, J.J. BelBruno, 2002. ***An improved molecularly imprinted polymer film for recognition of amino acids***, J. Appl. Polym. Sci. 86: 3611-3615.
 23. E. Caro, N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, 2002. ***Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples***, J. Chromatogr. A 963: 169-178.
 24. S.E. Byström, A. Börje, B.A. Kermack, 1993. ***Selective reduction of steroid 3- and 17-ketones using LiAlH₄ activated template polymers***, J. Am. Chem. Soc. 115: 2081-2083.

-
25. S.I. Chianella, M. Lotierzo, S.A. Piletsky, I.E. Tothill, B.N. Chen, K. Karim, A.P.F. Turner, 2002. ***Rational Design of a Polymer Specific for Microcystin-LR Using a Computational Approach***, Anal. Chem. 74: 1288-1293.
 26. B. Sellergren, 1999. ***Polymer and template related factors influencing the efficiency in molecularly imprinted solid-phase extractions***, Trends in Anal. Chem. 18: 164-174.
 27. T. Takeuchi, D. Fukuma, J. Matsui. 1999. ***Combinatorial Molecular Imprinting: An Approach to Synthetic Polymer Receptors***, Anal. Chem., 71, 285-290.
 28. F. Lanza, B. Sellergren. 1999. ***Method for Synthesis and Screening of Large Groups of Molecularly Imprinted Polymers***, Anal. Chem., 71, 2092-2096.
 29. S.A. Piletsky, K. Karim, E.V. Piletskaya, C.J. Day, K.W. Freebaim, C. Leege, A.P.F. Turner. 2001. ***Recognition of ephedrine enantiomers by molecularly imprinted polymers designed using a computational approach***. Analyst, 126, 1826-1830.
 30. S.I. Chianella, M. Lotierzo, S.A. Piletsky, I.E. Tothill, B.N. Chen, K. Karim, A.P.F. Turner. 2002. ***Rational Design of a Polymer Specific for Microcystin-LR Using a Computational Approach***, Anal. Chem., 74, 1288-1293.
 31. M. Komiyama, T. Takeuchi, T. Mukawa and H. Asanuma, 2003. ***Molecular Imprinting. From fundamentals to applications***, Wiley-VCH.
 32. Shea KJ., Thompson EA., 1978. ***Template synthesis of macromolecules. Selective functionalization of an organic polymer***, J. Org. Chem. 43: 4253-4255.
 33. Shea KJ., Thompson EA., Pandey SD., Beauchamp PS., 1980. ***Template synthesis of macromolecules. Synthesis and chemistry of functionalized macroporous polydivinylbenzene***, J. Am. Chem. Soc. 102: 3149-3155.

-
34. Wulff G., Best W, Akelah A., 1984. ***Enzyme-analogue built polymers-17: investigations on the racemic resolution of amino-acids***, React. Polym. Ion Exch. Sorb. 2: 167-174.
 35. Wulff G., Vietmeier J., 1989. ***Enzyme-analogue built polymers-26: enantioselective synthesis of amino-acids using polymers possessing chiral cavities obtained by an imprinting procedure with template molecules***, Makromol. Chem. 190: 1727-1735.
 36. Wulff G., Heide B., 1986. ***Molecular recognition through the exact placement of functional-groups on rigid matrices via a template approach***, J. Am. Chem. Soc. 108: 1089-1091.
 37. Shea KJ, Stoddard GJ., Shavelle DM., Wakui F, Choate RM., 1990. ***Synthesis and characterization of highly crosslinked polyacrylamides and polymethacrylamides, a new class of macroporous polyamides***, Macromolecules 23: 4497-4507.
 38. Wulff G, Sarhan A, Zabrocki K., 1973. ***Enzyme-analogue built polymers and their use for the resolution of racemates***, Tet. Lett. 14: 4329-4332.
 39. Sarhan A, Wulff G., 1982. ***Enzyme-analog built polymers-13: on the introduction of amino and boronic acid groups into chiral polymer cavities***, Makromol. Chem. 183: 85-92.
 40. Wulff G, Stellbrink H., 1990. ***On the chemistry of bindingsites-7: enantioselective binding using chiral boronic acid***, Journal Of The Royal Netherlands Chemical Society 109: 216-221.
 41. Wulff G, Vietmeier J., 1989. ***Enzyme-analogue built polymers-25: synthesis of macroporous copolymers from amino acid based vinyl compounds***, Makromol. Chem. 190: 1717-1726.

-
42. Wulff G, Poll HG., 1987. ***Enzyme-analog built polymers-23: influence of the structure of the binding-sites on the selectivity for racemic-resolution***, Makromol. Chem. 188: 741-748.
 43. Wulff G, Vesper R, Grobe-Einsler R, Sarhan A., 1977. ***Enzyme-analogue built polymers-4: on the synthesis of polymers containing chiral cavities and their use for the resolution of racemates***, Makromol. Chem. 178: 2799-2816.
 44. Wulff G, Haarer J. 1991. ***Enzyme-analog built polymers-29: the preparation of defined chiral cavities for the racemic-resolution of free sugars***, Makromol. Chem. 192: 1329-1338.
 45. Wulff G, Schauhoff S., 1991. ***Enzyme-analog-built polymers-27: racemic-resolution of free sugars with macroporous polymers prepared by molecular imprinting-selectivity dependence on the arrangement of functional-groups versus requirements***, J. Org. Chem. 56: 395-400.
 46. Alexander C, Smith CR, Whitcombe MJ, Vulfson EN. 1999. ***Imprinted polymers as protecting groups for regioselective modification of polyfunctional substrates***, J. Am. Chem. Soc. 121: 6640-6651.
 47. Sarhan A., 1982. ***Racemic separation of amygdalinic acid on polymers with chiral spaces-1: the synthesis of suitable polymers with phenylboronic acid as a bound group***, Makromol. Chem. Rapid Commun. 3: 489-493.
 48. A.G. Mayes, M.J. Whitcombe, 2005. ***Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers***, Adv. Drug Deliv. Rev. 57, 1742-1778
 49. Dong H, Tong AJ, Li LD., 2003. ***Syntheses of steroid based molecularly imprinted polymers and their molecular recognition study with spectrometric detection***, Spectrochim. Acta, A 59: 279-284.

50. Spivak DA, Shea KJ., 1998. ***Binding of nucleotide bases by imprinted polymers***, *Macromolecules* 31: 2160-2165.
51. Kempe M., 2000. ***Oxytocin receptor mimetics prepared by molecular imprinting***, *Lett. Pept. Sci.* 7: 27-33.
52. C. Cacho, E. Turiel, A. Martín-Esteban, D. Ayala, C. Pérez-Conde, 2006. ***Semi-covalent imprinted polymer using propazine methacrylate as template molecule for the clean-up of triazines in soil and vegetables samples***, *J. Chromatogr. A* 1114: 255-262.
53. Andersson L, Sellergren B, Mosbach K., 1984. ***Imprinting of amino-acid derivatives in macroporous polymers***, *Tet. Lett.* 25: 5211-5214.
54. Sellergren B, Ekberg B, Mosbach K., 1985. ***Molecular imprinting of amino-acid derivatives in macroporous polymers-demonstration of substrate-selectivity and enantio-selectivity by chromatographic resolution of racemic mixtures of amino-acid derivatives***, *J. Chromatogr. A* 347: 1-10.
55. Ekberg B, Mosbach K., 1985. ***Synthesis of a new amino-acid based cross-linker for preparation of substrate selective acrylic polymers***, *Tet. Lett.* 26: 3623-3624.
56. Suedee R, Songkram C, Petmoreekul A, Sangkunakup S, Sankasa S, Kongyarit N. 1999. ***Direct enantioseparation of adrenergic drugs via thin-layer chromatography using molecularly imprinted polymers***, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19: 519-527.
57. Kempe M., Fischer L., Mosbach K., 1993. ***Chiral separation using molecularly imprinted heteroatomic polymers***, *J. Mol. Recogn.* 6: 25-29.

58. Haginaka J., Sanbe H., 1999. ***Uniform-sized molecularly imprinted polymers for bisphenol A***, Chem. Lett. 28: 757-758.
59. Chen W., Liu F., Li KA., Yang YH., Tong SY., 2000. ***A hydrochlorothiazide-imprinted polymer***, Anal. Lett. 33: 809-818.
60. Tarbin JA., Sharman M., 1999. ***Synthesis and preliminary evaluation of a molecularly imprinted polymer selective for artificial phenolic estrogenic compounds***, Anal. Commun. 36: 105-107.
61. Tarbin JA., Sharman M., 2001. ***Development of molecularly imprinted phase for the selective retention of stilbene-type estrogenic compounds***, Anal. Chim. Acta, 433: 71-79.
62. Ju JY., Shin CS., Whitcombe MJ., Vulfson EN., 1999. ***Imprinted polymers as tools for the recovery of secondary metabolites produced by fermentation***, Biotechnol. Bioeng. 64: 232-239.
63. Ju JY., Shin CS., Whitcombe MJ., Vulfson EN., 1999. ***Binding properties of an aminostyrene-based polymer imprinted with glutamylated monascus pigments***, Biotechnol. Tech. 13: 665-669.
64. Kempe M., Fischer L., Mosbach K., 1993. ***Chiral separation using molecularly imprinted heteroatomic polymers***, J. Mol. Recogn. 6: 25-29.
65. Mathew J., Buchardt O., 1995. ***Molecular imprinting approach for the recognition of adenine in aqueous-medium and hydrolysis of adenosine 50-triphosphate***, Bioconj. Chem. 6: 524-528.

-
66. Yu C., Mosbach K., 1997. ***Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers***, J. Org. Chem. 62: 4057-4064.
67. Zhou J., He XW., Li YJ., 1999. ***Binding study on 5,5-diphenylhydantoin imprinted polymer constructed by utilizing an amide functional group***, Anal. Chim. Acta 394: 353-359.
68. Zhang TL., Liu F., Chen W., Wang J., Li K., 2001. ***Influence of intramolecular hydrogen bond of templates on molecular recognition of molecularly imprinted polymers***, Anal. Chim. Acta 450: 53-61.
69. Takagishi T., Sugimoto T., Hamano H., Lim YJ., Kuroki N., 1984. ***Thermodynamics of binding of methylorange by crosslinked vinylpyrrolidone-divinylbenzene copolymers-template effect***, J. Polym. Sci., 22: 4035-4039.
70. Takagishi T., Hamano H., Shimokado T., Kuroki N., 1985. ***Binding of anthraquinone sulfonate by crosslinked vinylpyrrolidone divinylbenzene copolymers-template effect***, J. Polym. Sci., 23: 545-548.
71. Kozuka H., Takagishi T., Yoshikawa K., Kuroki N., Mitsuishi M., 1986. ***Binding of anthraquinone dyes by cross-linked polyvinylpyrrolidone***, J. Polym. Sci., 24: 2695-2700.
72. Sreenivasan K., 1997. ***On the feasibility of using molecularly imprinted poly (HEMA) as a sensor component***, Talanta 44: 1137-1140.
73. Sreenivasan K., Sivakumar R., 1999. ***Imparting recognition sites in poly (HEMA) for two compounds through molecular imprinting***, J. Appl. Polym. Sci. 71: 1823-1826.

-
74. Sreenivasan K., 1999. ***On the application of molecularly imprinted poly (HEMA) as a template responsive release system***, J. Appl. Polym. Sci. 71: 1819-1822.
75. C. Yu, K. Mosbach, 1998. ***Insights into the origins of binding and the recognition properties of molecularly imprinted polymers prepared using an amide as the hydrogen-bonding functional group***, J. Mol. Recognit. 11: 69-74.
76. Kugimiya A, Takeuchi T. 1999. ***Effects of 2-hydroxyethyl methacrylate on polymer network and interaction in hydrophilic molecularly imprinted polymers***, Anal. Sci. 15: 29-33.
77. Kugimiya A, Takeuchi T. 2002. ***Molecular recognition by indoleacetic acid-imprinted polymers—effects of 2-hydroxyethyl methacrylate content***, Anal. Bioanal. Chem. 372: 305-307.
78. Ramström O, Andersson LI, Mosbach K. 1993. ***Recognition sites incorporating both pyridinyl and carboxy functionalities prepared by molecular imprinting***, J. Org. Chem. 58: 7562–7564.
79. Ramström O., Ye L., Gustavsson P.E., 1998. ***Chiral recognition by molecularly imprinted polymers in aqueous media***, Chromatographia 48: 197-202.
80. Baggiani C., Trotta F., Giraudi G., Giovannoli C., Vanni A., 1999. ***A molecularly imprinted polymer for the pesticide betazone***, Anal. Commun. 36: 263-266.
81. Venn RF., Goody RJ., 1999. ***Synthesis and properties of molecular imprints of darifenacin: the potential of molecular imprinting for bioanalysis***, Chromatographia 50: 407-414.
82. Tan YG., Zhou ZL., Wang P., Nie LH., Yao SZ., 2001. ***A study of a bio-mimetic recognition material for the BAW sensor by molecular imprinting and its***
-

-
- application for the determination of paracetamol in the human serum and urine*, Talanta 55: 337-347.
83. Meng ZH., Wang JF., Zhou LM., Wang QH., Zhu DQ., 1999. ***New cocktail functional monomers in making molecule imprinting polymer with high chiral selectivity***, Prog. Nat. Sci. 9: 792-795.
84. Meng ZH., Zhou LM., Wang JF., Wang QH., Zhu DQ., 1999. ***Molecule imprinting chiral stationary phase***, Biomed. Chromatogr. 13: 389-393.
85. Meng ZH., Wang JF., Zhou LM., Wang QH., Zhu DQ., 1999. ***High performance cocktail functional monomer for making molecule imprinting polymer***, Anal. Sci. 15: 141-144.
86. Shea K. J., Thompson E. A., Pandey S. D., Beauchamp P. S., 1980. ***Template synthesis of macromolecules. Synthesis and chemistry of functionalised macroporous polydivinylbenzene***, J. Am. Chem. Soc. 102: 3149-3155.
87. Damen J., Neckers DC., 1980. ***Stereoselective synthesis via a photochemical template effect***, J. Am. Chem. Soc. 102: 3265-3267.
88. Wulff G, Akelah A. 1978. ***Enzyme-analogue built polymers, 6) Synthesis of 5-vinylsalicaldehyde and a simplified synthesis of some divinyl derivatives***, Makromol. Chem. 179: 2647-2651.
89. Wulff G., Vietmeier J., Poll HG., 1987. ***Enzyme-analog built polymers-22: influence of the nature of the cross-linking agent on the performance of imprinted polymers in racemic-resolution***, Makromol. Chem. 188: 731-740.
90. A. Ellwanger, C. Berggren, S. Bayoudh, C. Crecenzi, L. Karlsson, P. K. Owens, K. Ensing, P. Cormack, D. Sherrington and B. Sellergren. 2001. ***Evaluation of methods***
-

- aimed at complete removal of template from molecularly imprinted polymers*, Analyst, 126, 784-792.
91. T. Papa, V. Horvatha, A. Tolokanb, G. Horvaib, Börje Sellergren. 2002. ***Effect of solvents on the selectivity of terbutylazine imprinted polymer sorbents used in solid-phase extraction***, Journal of Chromatography A, 973, 1-12.
92. Z.S. Liu, Y.L. Xu, C. Yan, R.Y. Gao. 2005. ***Mechanism of molecular recognition on molecular imprinted monolith by capillary electrochromatography***, J. Chromatogr. A, 1087, 20-28.
93. O'Shannessy DJ., Ekberg B., Mosbach K., 1989. ***Molecular imprinting of amino-acid derivatives at low-temperature (0 °C) using photolytic homolysis of azobisnitriles***, Anal. Biochem. 177: 144-149.
94. Sellergren B., Shea KJ., 1993. ***Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers***, J. Chromatogr. A 635: 31-49.
95. Wulff G., Haarer J., 1991. ***Enzyme-analog built polymers-29: the preparation of defined chiral cavities for the racemic-resolution of free sugars***, Makromol. Chem. 192: 1329-1338.
96. Sellergren B., 1989. ***Molecular imprinting by noncovalent interactions-tailor-made chiral stationary phases of high selectivity and sample load-capacity***, Chirality 1: 63-68.
97. Piletsky SA., Piletska EV., Karim K., Freebairn KW., Legge CH., Turner APF., 2002. ***Polymer cookery: influence of polymerization conditions on the performance of molecularly imprinted polymers***, Macromolecules 35: 7499-7504.

-
98. Sellergren B., Dauwe C., Schneider T., 1997. ***Pressure-induced binding sites in molecularly imprinted network polymers***, *Macromolecules* 30: 2454-2459.
99. R.J. Umpleby II, S.C. Baxter, M. Bode, J.K. Berch Jr., R.N. Shah, K.D., Shimizu, 2001. ***Application of the Freundlich adsorption isotherm in the characterization of molecularly imprinted polymers***, *Anal. Chim. Acta* 435: 35-42.
100. M. Lehmann, M. Dettling, H. Brunner, G.E.M. Tovar, 2004. ***Affinity parameters of amino acid derivative binding to molecularly imprinted nanospheres consisting of poly[(ethylene glycol dimethacrylate)-co-(methacrylic acid)]***, *J. Chromatogr. B* 808: 43.
101. H. Kim, K. Kaczmarek, G. Guiochon, 2005. ***Mass transfer kinetics on the heterogeneous binding sites of molecularly imprinted polymers***, *Chem. Engn. Sci.* 60: 5425-5444.
102. R.J. Umpleby, I. Sarah, C. Baxter, Y. Chen, N. Shah, K.D. Shimizu, 2001. ***Characterization of Molecularly Imprinted Polymers with the Langmuir-Freundlich Isotherm***, *Anal. Chem.* 73: 4584-4591.
103. I. Quiñones, B. Stanley, G. Guiochon, 1999. ***Estimation of the adsorption energy distributions for the Jovanovic-Freundlich isotherm model with Jovanovic local behavior***, *J. Chromatogr. A* 849: 45-60.
104. V. Pichon, K. Haupt, 2006. ***Affinity Separations on Molecularly Imprinted Polymers with Special Emphasis on Solid Phase Extraction***, *J. Liq. Chromatogr. & Rel. Technol.* 29: 989-1023.
105. E. Caro, R.M. Marcé, F. Borrull, P.A.G. Cormack, D.C. Sherrington, 2006. ***Application of molecularly imprinted polymers to solid-phase extraction of compounds from environmental and biological samples***, *Trends in Anal. Chem.* 25: 143-154.

106. J. Haginaka, 2005. **Selectivity of affinity media in solid-phase extraction of analytes**, Trends in Anal. Chem. 24: 407-415.
107. M.C. Hennion, V. Pichon, 2003. **Immuno-based sample preparation for trace analysis**, J. Chromatogr. A 1000: 29-52.
108. H.F. Zou, X.D. Huang, M.L. Ye, Q.Z. Luo, 2002. **Monolithic stationary phases for liquid chromatography and capillary electrochromatography**, J. Chromatogr. A 954: 5-32.
109. L. I. Andersson, 2000. **Molecular imprinting: developments and applications in the analytical chemistry field**, J. Chromatogr. B 745: 3-13.
110. B. Sellengren, 2001. **Imprinted chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography**, J. Chromatogr. A 906: 227-252.
111. D. Wistuba, V. Schurig, 2000. **Enantiomer separation of chiral pharmaceuticals by capillary electrochromatography**, J. Chromatogr. A 875: 255-276.
112. G. Gubitz, M.G. Schmid, 2000. **Recent progress in chiral separation principles in capillary electrophoresis**, Electrophoresis 21: 4112-4135.
113. Wistuba, V. Schurig, 2000. **Recent progress in enantiomer separation by capillary electrochromatography**, Electrophoresis 21: 4136-4158.
114. Luo CH, Liu MQ, Mo YC, Qu JN, Feng YL. 2001. **Thicknessshear mode acoustic sensor for atrazine using molecularly imprinted polymer as recognition element**, Anal. Chim. Acta 428: 143-148.

115. Shoji R, Takeuchi T, Kubo I. 2003. ***Atrazine sensor based on molecularly imprinted polymer-modified gold electrode***, Anal. Chem. 75: 4882-4886.
116. Amanda L. Jenkins, Ray Yin and Janet L. Jensen. 2001. ***Molecularly imprinted polymer sensors for pesticide and insecticide detection in water***, Analyst, 126, 798-802.
117. M. C. Hennion, C. Cau-Dit-Coumes, V. Pichon. 1998. ***Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples Tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters***, Journal of Chromatography A, 823, 147-161.
118. S. L. Moullec, L. Truong, C. Montauban, A. Begos, V. Pichon, B. Bellier. 2007. ***Extraction of alkyl methylphosphonic acids from aqueous samples using a conventional polymeric solid-phase extraction sorbent and a molecularly imprinted polymer***, Journal of Chromatography A, 1139, 171-177.
119. Susanne Striegler. 2004. ***Designing selective sites in templated polymers utilizing coordinative bonds***, Journal of Chromatography B, 804, 183-195.
120. A.G. Maye, M.J. Whitcombe. 2005. ***Synthetic strategies for the generation of molecularly imprinted organic polymers***, Advanced Drug Delivery Reviews, 57, 1742-1778.
121. Karsten Haupt. 2001. ***Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry***, Analyst, 126, 747-756.
122. Michael R. Buchmeiser. 2001. ***New synthetic ways for the preparation of high-performance liquid chromatography supports***, Journal of Chromatography A, 918, 233-266.

123. S. G. Dmitrienko, V. V. Irkha, A. Yu. Kuznetsova, and Yu. A. Zolotov. 2004. ***Use of Molecular Imprinted Polymers for the Separation and Preconcentration of Organic Compounds***, Journal of Analytical Chemistry, 59, 808-817.
124. V. B. Kandimalla, H. Ju. 2004. ***Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry***, Anal. Bioanal. Chem, 380, 587-605.
125. Tesis de Maestría. Erika García Salgado. 2005. ***Preparación y caracterización de un biogel con albúmina de suero bovino inmovilizada por el método de sol-gel y su estudio preliminar en sistemas en flujo por CLAR***. Facultad de Química, UNAM.
126. <http://www.cepis.ops-oms.org/tutorial2/e/unidad7/index.html>. Página consultada en diciembre del 2007.
127. United States Environmental Protection Agency Office of Drinking Water Health Advisories, 1989. ***Drinking Water Health Advisory Pesticides***, Lewis Publishers.
128. Fichas Internacionales de Seguridad Química. Maneb. ICSC: 0173
129. Hoja de datos de seguridad. Agri Star.
130. Fichas Internacionales de Seguridad Química. Mancozeb. ICSC: 0754.
131. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc78.htm>. Página consultada en diciembre del 2007.
132. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/1101a1200/nspn1148.pdf>. Página consultada en diciembre del 2007.
133. <http://www.epa.gov/pesticides/cumulative/dithiocarb.pdf>. Página consultada en diciembre del 2007.

-
134. <http://www.bolsamza.com.ar/mercados/uvas/pesticidas.pdf>. Página consultada en diciembre del 2007.
135. ***Disrupting a delicate balance environmental effects on the thyroid***, Environmental health perspectives 2003, 111, A 642-A 649.
136. C. Apreaa, A. Bettab, G. Catenaccic, A. Lottid, C. Minoia, W. Passinif, I. Pavanf, F. S. Robustelli della Curia, C. Roggig, R. Ruggerih, C. Soave, G. Sciarra, P. Vanninih, V. Vitaloned, 1996. ***Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study)***, The Science of the Total Environment 192:83-93.
137. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc78.htm>. Página consultada en diciembre del 2007.
138. S. E. Balkhi, P. Sandouk, M. Galliot-Guilley, 2005. ***Determination of ethylenethiourea in urine by HPLC-DAD***, Journal of Analytical Toxicology 29.
139. R. M. Garcinuño, L. Ramos, P. Fernández-Hernando, C. Cámara, 2004. ***Simultaneous determination of maneb and its main metabolites in tomatoes by liquid chromatography using diode array ultraviolet absorbance detection***, J. Chromatogr. A 1043: 225-229.
140. J. K. Dubey, T. H. Heberer, H. J. Stan, 1997. ***Determination of ethylenethiourea in food commodities by a two-step derivatization method and gas chromatography with electro-capture and nitrogen-phosphorus detection***, J. Chromatogr. A 7653: 31-38.
141. S. Fustinoni, L. Campo, C. Colosio, S. Birindelli, V. Foa, 2005. ***Application of gas chromatography-mass spectrometry for the determination of urinary ethylenethiourea in humans***, J. Chromatogr. B 814: 251-258.

-
142. AOAC Official Method 992.31. **Ethylenethiourea (ETU) in residues in water** (1995) USA Virginia, volume 1, 16th edition. Chapter 10 pp 64-67.
143. C. Blasco, G. Font, Y Picó, 2004. **Determination of dithiocarbamates and metabolites in plants by liquid chromatography-mass spectrometry**, J. Chromatogr. A 1028: 267-276.
144. C. Colosio, S. Fustinoni, S. Birindelli, I. Bonomi, G. De Paschale, T. Mamone, M. Tiramani, F. Vercelli, S. Visentin, M. Maroni, 2002. **Ethylenethiourea in urine as an indicator of exposure to mancozeb in vineyard workers**, Toxicology Letters 134: 133-140.
145. R. M. Garcinuño, L. Ramos, P. Fernández-Hernando, C. Cámara, 2004. **Optimization of a matrix solid-phase dispersion method with subsequent clean-up for the determination of ethylene bisdithiocarbamate residues in almond samples**, J. Chromatogr. A 1041: 35-41.
146. <http://ntp.niehs.nih.gov/index.cfm?objectid=03E85018-AED3-AA12-E6B57A8A524234B>.
Página consultada en diciembre de 2007.
147. A. EL- Makawy, H. A. Radwan, I. S. Ghaly, A. A. EL-Raouf, 2006. **Genotoxic, teratological and biochemical effects of anthelmintic drug oxfendazole Maximum Residue Limit (MRL) in male and female mice**, Reprod. Nutr. Dev. 46: 139-156.
148. <http://es.wikipedia.org/wiki/Benzimidazol>. Página consultada en diciembre de 2007.
149. A. Abad, J. J. Manclús, M. J. Moreno, A. Montoya, 2001. **Determination of Thiabendazole in Fruit Juices by a New Monoclonal Enzyme Immunoassay**, J. AOAC 84: 156-161.

150. A.M. Marti, A.E. Mooser, H. Koch, 1990. **Determination of benzimidazole anthelmintics in meat samples**, J. Chromatogr. A 498: 145-157.
151. W.H.H. Farrington, S. Chapman, D. Tyler, N. Haagsma, A. Ruiter, P.B. Czedik-Eysenberg, 1990. **Proceedings of EuroResidue Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, Noordwijkerhout**, The Netherlands, Faculty of Veterinary Medicine, University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands, p. 185.
152. G. Domany, L. Kovacsics, L.A. Van Ginkel, A. Ruiter, 2000. **Proceedings of EuroResidue IV Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food, Veldhoven, The Netherlands**, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands, p. 361.
153. B. Roudaut, M. Garnier, L.A. Van Ginkel, A. Ruiter, 2000. **Proceedings of Euro Residue IV Conference on Residues of Veterinary Drugs in Food**, Veldhoven, The Netherlands, National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, The Netherlands, p. 950.
154. S.A. Barker, A.R. Long, C.R. Short, 1989. **Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion**, J. Chromatogr. A. 475: 353-361.
155. M. S. Young, D. J. Phillips, P. C. Iraneta, 2001. **Mixed-Mode Solid-Phase Extraction and Cleanup Procedures for the Liquid Chromatographic Determination of Thiabendazole and Carbendazim in Fruit Juices**, J. AOAC 84: 556-561.
156. C. Cacho, L. Schweitz, E. Turiel, C. Pérez-Conde, 2008. **Molecularly Imprinted Capillary Electrochromatography For Selective Determination Of Thiabendazole In Citrus Samples**, J. Chromatogr. A 1179: 216-223.

157. C. Cacho, E. Turiel, C. Pérez-Conde, 2009. ***Molecularly imprinted polymers: An analytical tool for the determination of benzimidazole compounds in water samples***, Talanta. doi:10.1016/j.talanta.2009.01.007
158. J. Miller, J. Miller, 2002. ***Estadística y Quimiometría para Química Analítica***. Prentice Hall, España.
159. Vázquez Lira Juan Carlos, 2003. ***Desarrollo, evaluación y caracterización de inmunoabsorbentes para la extracción en fase sólida de pesticidas a partir de muestras acuosas y su determinación por cromatografía de líquidos***, tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM.
160. J. C. Vázquez-Lira, E. Camacho-Frías, A. Peña-Alvarez and L. E. Vera-Ávila 2003. ***Preparation and characterization of a sol-gel immunosorbent doped with 2, 4-D antibodies***, Chem. Mater. 15: 154-161.
161. Z. Ning, L. Yuan-Zong, C. Wen-Bao, W. Zong-Mu and L. Tie-Jin, 2002. ***Sulfonamide imprinted polymers using co-functional monomers***, Anal. Chim. Acta 452: 277.
162. Z. Ning, L. Yuan-Zong and W. Mei-Juan, 2004. ***Sulfamethoxazole-imprinted polymer for selective determination of Sulfamethoxazole in tablets***, J. Chromatogr. A 1033: 179-182.
163. B. Sellergren, 1997. ***Noncovalent molecular imprinting: antibody-like molecular recognition in polymeric network materials***, TrAC 16: 310-320.

Anexo 1

Listado de ecuaciones estadísticas⁽¹⁵⁸⁾

Parámetro	Ecuación	Componentes
<p>Media aritmética (\bar{x} es el estimador de la media poblacional (μ) obtenido a partir de una muestra)</p>	$\hat{\mu} = \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	<p>x_i, representa cada una de las medidas</p> <p>n, es el número de datos</p>
<p>Varianza poblacional (s^2 es el estimador de la varianza poblacional (σ^2) obtenido a partir de una muestra)</p>	$\hat{\sigma}^2 = s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}$	<p>x_i, representa cada una de las medidas</p> <p>n, es el número de datos</p> <p>\bar{x}, es el estimador de la media poblacional obtenido a partir de una muestra</p>
<p>Desviación estándar poblacional (s es el estimador de la desviación estándar poblacional (σ) obtenido a partir de una muestra)</p>	$\hat{\sigma} = s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$	<p>x_i, representa a cada una de las medidas</p> <p>n, es el número de datos</p> <p>\bar{x}, es el estimador de la media poblacional obtenido a partir de una muestra</p>
<p>Coefficiente de variación porcentual, o desviación estándar relativa</p>	$RSD\% = CV\% = 100 * \frac{s}{\bar{x}}$	<p>s, es el estimador de la desviación estándar poblacional obtenido a partir de una muestra</p> <p>\bar{x}, es el estimador de la media poblacional obtenido a partir de una muestra</p>

Parámetro	Ecuación	Componentes
Distribución muestral de la media (Intervalo de confianza sobre la media)	$\mu = \bar{x} \pm t_{\alpha/2}^{\phi=n-1} * \frac{s}{\sqrt{n}}$	n , es el número de datos experimentales, \bar{x} y s , son la media y desviación estándar estimadas y $t_{\alpha/2}^{\phi=n-1}$ es la variable de la distribución t de student con un riesgo α y $n-1$ grados de libertad
Análisis de regresión lineal	$y = m * x + b$	m , es la constante llamada pendiente. b , es la constante llamada ordenada al origen.
Intervalo de confianza sobre la ordenada	$\beta = b \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}$	$t_{\alpha/2}$ es el valor de la función t de Student, con un riesgo α y $n-2$ grados de libertad.
Intervalo de confianza sobre la pendiente	$\mu = m \pm t_{\alpha/2} \cdot s_e \frac{1}{\sqrt{S_{xx}}}$	

Los parámetros S_{xx} S_{yy} S_{xy} S_e se calcularon de acuerdo con:

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}$$

$$S_{yy} = \sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n}$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{n}$$

$$s_e^2 = \frac{S_{yy} - \frac{(S_{xy})^2}{S_{xx}}}{n - 2}$$

Parámetro	Ecuación	Componentes
Hipótesis sobre ordenada al origen	$t_{\text{exp}} = \frac{(b - \beta)}{s_e \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}}$ <p>Hipótesis nula $H_0: b = 0$ Hipótesis alterna $H_1: b \neq 0$</p>	Estadístico de prueba t Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ se acepta H_0 Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ se acepta H_1
Hipótesis sobre pendiente	$t_{\text{exp}} = \frac{(m - \mu)}{s_e} \sqrt{S_{xx}}$ <p>Hipótesis nula $H_0: m = 0$ Hipótesis alterna $H_1: m > 0$</p>	Estadístico de prueba t Si $t_{\text{exp}} < t_{\text{tablas}}$ se acepta H_0 Si $t_{\text{exp}} > t_{\text{tablas}}$ se acepta H_1
Parámetro	Ecuación	
Error relativo	$\left[\frac{\text{Valor}_{\text{real}} - \text{Valor}_{\text{medido}}}{\text{Valor}_{\text{real}}} \right] \times 100\%$	
Parámetro	Ecuación	Componentes
Límite de detección (LOD)	$LOD = y_B + 3s_B$	y_B Señal del blanco s_B Desviación estándar del blanco

Determination of benzimidazole fungicides in water samples by on-line MISPE–HPLC

O. Zamora · E. E. Paniagua · C. Cacho ·
L. E. Vera-Avila · C. Perez-Conde

Received: 2 December 2008 / Revised: 12 January 2009 / Accepted: 16 January 2009 / Published online: 1 February 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract An analytical methodology based on an on-line sample enrichment of water samples by means of an imprinted polymer, and the separation of benzimidazole compounds within a C₁₈ column by ion-pair reversed-phase liquid chromatography, has been developed. The molecularly imprinted polymer has been synthesized by precipitation polymerization using thiabendazole as template molecule, methacrylic acid as functional monomer, and divinylbenzene as cross-linker. Initial experiments carried out by solid-phase extraction on cartridges demonstrated a clear imprint effect for thiabendazole, as well as the ability of the imprinted polymer to selectively rebind several benzimidazole compounds. The developed methodology has been applied to the quantification of thiabendazole, carbendazim, and benomyl in river, tap, and well water samples within a single analytical run at concentration levels below the legislated maximum concentration levels. In this sense, detection limits of 2.3–5.7 ng·L⁻¹ have been obtained for the analysis of benzimidazole fungicides in different water matrices. Recoveries obtained for the determination of benzimidazole fungicides in spiked samples ranged from 87% to 95%, with RSD below 5% in all cases.

Keywords Benzimidazole fungicides · Molecularly imprinted polymers · On-line SPE · Ion-pair HPLC · Water samples

O. Zamora · L. E. Vera-Avila
Analytical Chemistry Department, Faculty of Chemistry,
Universidad Nacional Autónoma de México,
04510 México DF, Mexico

E. E. Paniagua · C. Cacho · C. Perez-Conde (✉)
Analytical Chemistry Department, Faculty of Chemistry,
Universidad Complutense de Madrid,
28040 Madrid, Spain
e-mail: cpconde@quim.ucm.es

Introduction

Benzimidazole compounds are widely used both as anthelmintic drugs in the treatment and prevention of parasitic infections and as fungicides to prevent crop spoilage. Although many public benefits have been realized by the use of benzimidazole compounds, their potential impact in both the environment and public health cannot be disregarded. Even if acute toxic effects of benzimidazole compounds are scarce due to their high lethal dose 50 values, several toxic effects have been associated to a chronic exposure to benzimidazole compounds, such as teratogenicity, congenic malformations, polyploidy, diarrhea, anemia, pulmonary edemas, or necrotic lymphadenopathy [1].

In order to control the amount of benzimidazole derivatives that can be used under certain circumstances and the maximum amounts that can be tolerated in drinking water or food, legislation is under continuous revision by environmental protection agencies worldwide, so that exposure to benzimidazole compounds can be minimized as much as possible. In this sense, the European Water Framework Directive has established a maximum concentration level (MCL) of 0.1 µg L⁻¹ for most benzimidazole compounds present in natural waters and a total concentration of all pesticides of 0.5 µg L⁻¹ [2].

A large amount of effort has been invested in the past few decades to develop and validate analytical methodologies able to quantify benzimidazole compounds and their metabolites in water samples at concentration levels below the legislated MCLs. An enrichment step of the water samples is usually required in order to diminish the detection limits of the analytical method and, thus, enable the quantification of benzimidazole compounds at concentration levels below the MCL. Additionally, as most detection systems are nonselective, a clean-up of the samples prior to

their analysis must usually be carried out in order to isolate the analytes from matrix components that could otherwise interfere in the analysis.

In recent years, solid-phase extraction has proven to be a very valuable technique for the simultaneous enrichment and clean-up of several samples. In this sense, the high breakthrough volumes of materials such as C_{18} [3–5], polystyrene-divinylbenzene [6], ethylvinylbenzene-divinylbenzene [7], polystyrene [8], and active carbon [3] make them ideal for the enrichment of water samples. A further increase in the breakthrough volume can be achieved by the addition of surfactants as oligoethyleneglycol monoalkylether (Genapol X-080) [9], polyoxyethylenelauryl ester [9], or sodium dodecylsulfate [10]. Under these conditions, detection limits as low as 4 ng L^{-1} can easily be achieved.

However, the lack of selectivity of these materials usually leads to the coextraction of several matrix components that can interfere in the analysis of benzimidazole compounds. A set of clean-up procedures must then be applied in order to isolate the benzimidazole compounds, considerably increasing the analysis time [1].

In recent years, molecularly imprinted polymers have successfully been applied as highly selective sorbents for the determination of benzimidazole compounds in an organic media [11–13]. However, coelution of the different benzimidazole compounds has been described when using these imprinted polymers as selective stationary phases [14]. By coupling the molecularly imprinted solid-phase extraction (MISPE) procedure to a high-performance liquid chromatography (HPLC) system, enrichment, separation, and quantification of benzimidazole fungicides could be carried out. This approach has previously shown satisfactory results for the separation of chlorophenols [15], fluoroquinolones [16], and nitrophenolic acids [17].

Taking all these comments in mind, the main aim of the present work was the development of an on-line MISPE–HPLC procedure for the enrichment of the most common benzimidazole fungicides [benomyl, carbendazim, and thiabendazole (TBZ)] in tap, river, and well water samples at concentration levels below the legislated MCLs.

Materials and methods

Reagents

Analytical-grade benzimidazole fungicides (benomyl, carbendazim, and TBZ) were purchased from Sigma-Aldrich (Fig. 1). The corresponding stock standard solutions (0.5 g L^{-1}) were prepared in acetonitrile and stored at $-18 \text{ }^\circ\text{C}$. Purum methacrylic acid (MAA, 98%) and 2,2'-azo-bis-isobutyronitrile (AIBN, $\geq 98\%$) were purchased from Sigma-Aldrich. The ion-pair-forming agent tetrabutylammonium bisulfate,

(NBut₄)HSO₄, was purchased from Sigma-Aldrich. AIBN was recrystallized in methanol prior to use. Technical-grade divinylbenzene (DVB, 80%) was purchased from Sigma-Aldrich and purified by filtration through alumina. All other reagents were used as supplied without a further purification step. HPLC-grade solvents (toluene, acetonitrile, methanol, acetic acid, and trifluoroacetic acid) were purchased from Scharlab.

Materials

The preparation of the polymers was performed by the simultaneous heating and stirring of the polymerization mixture on a hot magnetic plate stirrer (PSelecta) purchased from Scharlab. All measurements were performed in an HPLC system from Thermo Separation Products consisting of a ConstaMetric 4100 Series high-pressure pump, a SpectroMonitor 5000 photo diode-array detector, and a Rheodyne 7010 injection valve.

Preparation of polymers

TBZ-imprinted polymers were prepared by adapting a procedure previously developed by Turiel et al. [12]. In this sense, TBZ as template molecule (0.17 mmol), MAA as functional monomer (0.68 mmol), DVB as cross-linker (3.40 mmol), and AIBN as initiator (0.25 mmol) were dissolved in a mixture of acetonitrile and toluene [12.5 mL, 75/25 volume to volume (v/v)]. The solutions were

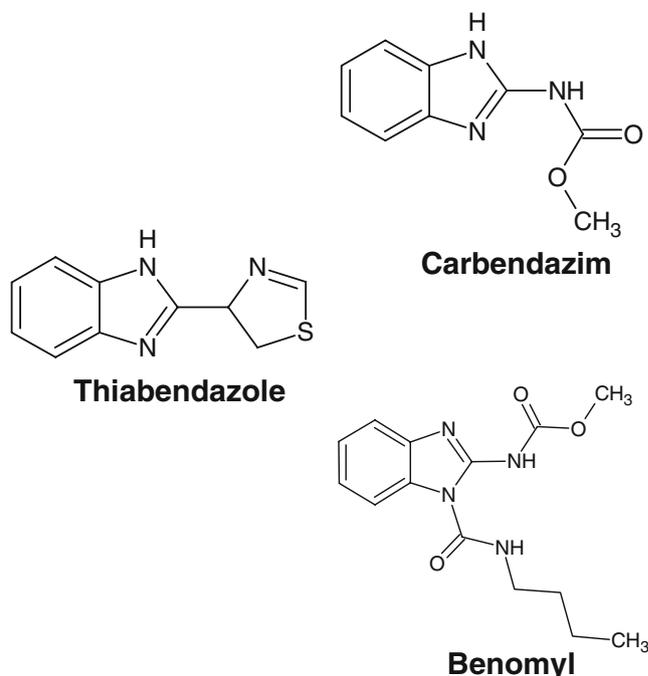


Fig. 1 Benzimidazole fungicides

deoxygenated with oxygen-free argon for 10 min while cooling on an ice bath. Polymerization was carried out by heating at 60 °C for 24 h in a hot magnetic plate with a controlled stirring of 300 rpm. The polymer particles were separated from the reaction mixture by vacuum filtration on a nylon membrane filter and were washed with 200 mL of a methanol/acetic acid solution (50/50 v/v) to remove both the template molecule and residual monomers. Nonimprinted polymers were prepared in the same manner but without the addition of the template molecule.

On-line enrichment of the water samples

Around 300 mg of MIP-TBZ was packed into a stainless steel HPLC column (50×4.6 mm inner diameter). The column was then placed in the loop of an injection valve and connected to an HPLC system from Thermo Separation Products (Fig. 2).

With the injection valve placed in the “load” position, 50 ml of standard solutions with concentrations ranging from 0.01 to 3.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ were loaded on the MIP column at a flow rate of 2 ml min^{-1} . The imprinted polymer was subsequently washed with 6 ml of methanol and 5 ml of MilliQ water at 1 ml min^{-1} . Subsequently, the injection valve was changed to the “inject” position, and benzimidazole

fungicides were eluted from the MIP column with 10 ml of water containing 25 mM (NBut₄)HSO₄ and 4% HAc (v/v) (mobile phase A) at a flow rate of 1 ml min^{-1} , which enabled the retention of benzimidazole compounds by the C₁₈ column. A similar procedure was applied for the enrichment of river, tap, and well water samples.

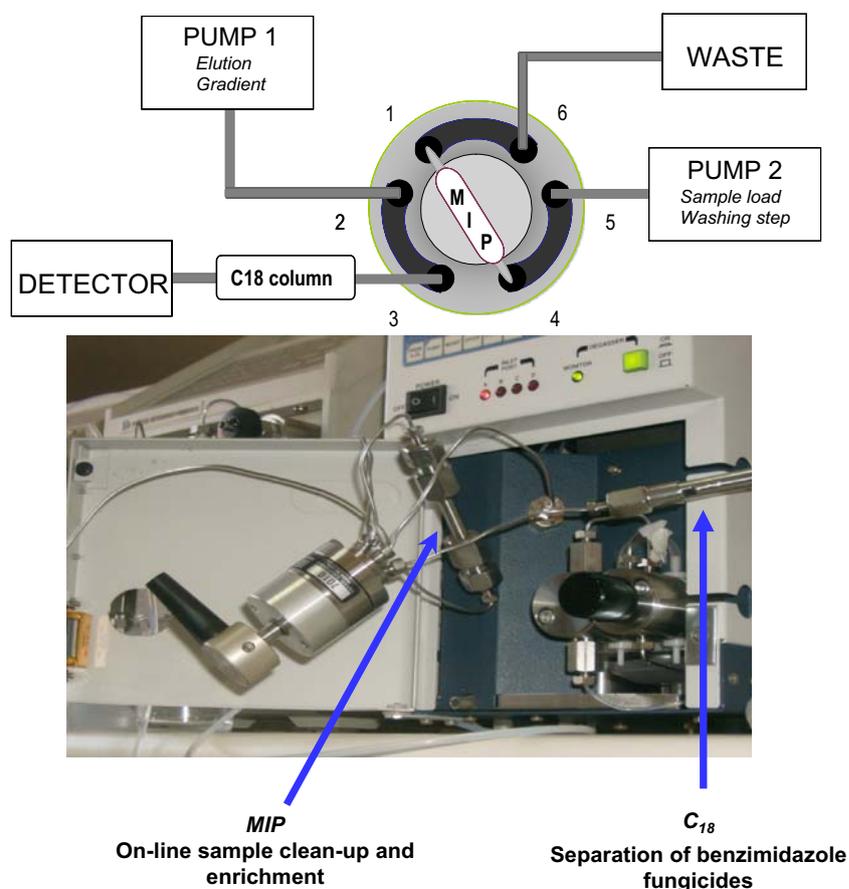
Separation of benzimidazole compounds in the C₁₈ column was achieved by means of a gradient from mobile phase A to an acetonitrile solution containing 25 mM (NBut₄)HSO₄ and 4% HAc (v/v) (mobile phase B) in 11 min and an isocratic elution with mobile phase B for 9 min. Flow rate during the separation step was maintained at 1 ml min^{-1} . Benzimidazole fungicides were monitored at 240 and 305 nm and quantified by external calibration using peak area measurements.

Results and discussion

Synthesis of the imprinted polymers

Precipitation polymerisation enables the preparation of spherical polymer beads in a simple manner. The control of the polymerization conditions has proven to be a very valuable tool for the preparation of polymer beads of the

Fig. 2 Schematic figure of the experimental setup



desired particle size. In this sense, an adequate match between the solubility parameters of the developing polymer network and the polarity of the porogenic solvent enables the preparation of polymer beads with permanent pore structures and high average particle sizes.

According to classical fluid mechanics, a further increase in particle size should be obtained by stirring the solution during polymerization. In this sense, Navier–Stokes' law predicts that a direct relationship can be established between the limit sedimentation speed (V_{lim}) and the size of the sedimented particles. Taking into account that V_{lim} values increase with increasing fluid speeds in a turbulent regime, a direct corelationship should be expected between the stirring speed and the mean diameter size of the sedimented polymer particles.

Initially, the imprinted polymer was prepared by stirring the solution at 30 rpm, as previously described by Turiel et al. [12]. The obtained polymer particles were vacuum-dried and sieved, and the different fractions were evaluated for backpressure in the on-line MISPE–HPLC system. In order to minimize such backpressure, polymer particles bigger than 50 μm should be used, and thus, the 50–100- μm fraction was selected for further studies.

However, when following this polymerization protocol, a very low polymerization yield of the 50–100- μm fraction was obtained, being the mean diameter of the polymer particles below 5 μm . In order to further increase the size of the obtained particle beads, different imprinted polymers were prepared with increasing stirring speeds (30–450 rpm). As expected, an increase in the stirring speed considerably increased the amount of bigger-sized polymer particles. Thus, the highest yield (80%) of the desired particle size was obtained when polymerization was performed by stirring at 300 rpm.

Different TBZ-imprinted polymers were prepared by precipitation polymerization of an acetonitrile–toluene (75:25, v/v) solution containing TBZ (0.17 mmol), MAA (0.68 mmol), DVB (3.40 mmol), and AIBN (0.25 mmol) [12]. Previous experiments [14] had demonstrated the importance of an adequate selection of the nature of the cross-linker, as it has been proven to have a considerable influence on the obtained breakthrough volume. In this sense, both DVB and ethyleneglycol dimethacrylate were used for the synthesis of different imprinted polymers. A much higher breakthrough volume (500 mL) was obtained for DVB-based MIPs.

Optimization of the MISPE procedure

Batch rebinding experiments demonstrated that the imprinted polymer was able to selectively rebind benzimidazole compounds in an aqueous media. In this sense, both acetonitrile and methanol were able to remove nonspecific

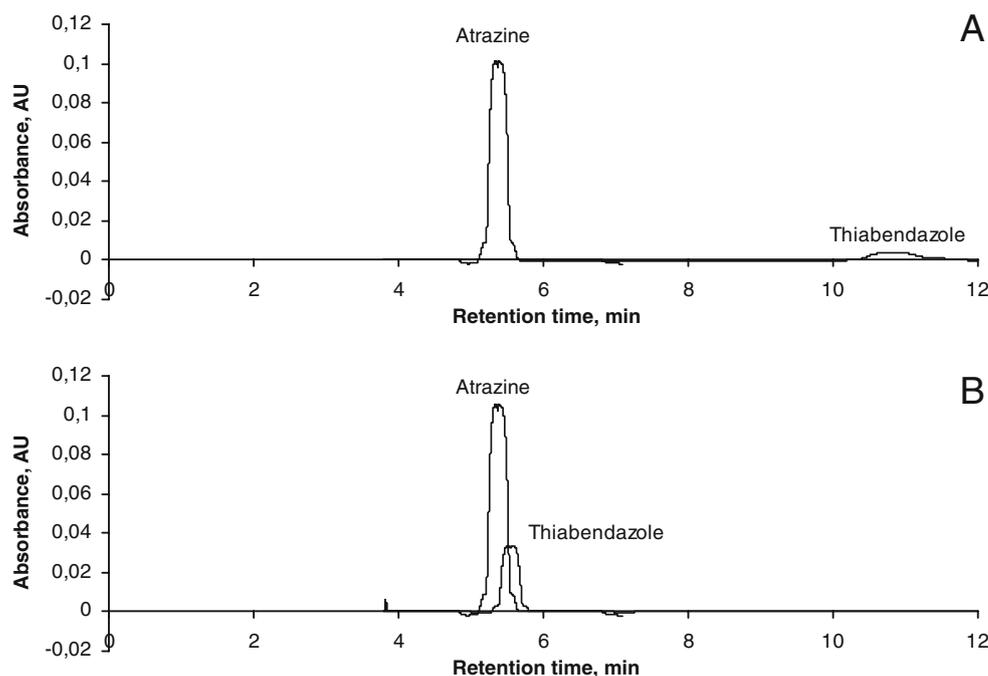
ically bound compounds from the imprinted polymer. According to these results, both methanol and acetonitrile were evaluated for the selective removal of nonspecifically bound compounds from an imprinted column on an on-line solid-phase extraction (SPE) procedure. For this purpose, about 300 mg of both the imprinted and nonimprinted polymers were slurry packed into stainless steel HPLC columns (50×4.6 mm) and connected to the ultraviolet detector in order to monitor the elution of benzimidazole compounds.

Two milliliters of an aqueous solution containing 1 mg L⁻¹ of TBZ was loaded on both the imprinted and nonimprinted columns at a flow rate of 1 mL min⁻¹, and methanol and acetonitrile were evaluated as mobile phases for the elution of TBZ from both polymers. As expected, the performance of the imprinted column greatly differed from that of the corresponding NIP column in either case, with the imprinting factor (calculated as the ratio between the retention factors of TBZ on the imprinted and nonimprinted polymer columns) being higher than 10 in both cases, thus confirming the selective retention of benzimidazole compounds by the imprinted column. However, even if the highest imprinting factor was obtained by using acetonitrile as mobile phase, the retention time in methanol was considerably shorter and, thus, was selected for further experiments.

In order to confirm the complete removal of nonspecific interactions from the imprinted column under these conditions, and thus ensure an adequate sample clean-up to be achieved, the retention of atrazine on both MIP and NIP columns has been evaluated. This compound has a similar polarity to that of TBZ but a completely different chemical structure, and thus, it can only interact with the imprinted polymer by means of nonspecific binding. For this purpose, 2 mL of an aqueous solution containing 1 mg L⁻¹ of atrazine and TBZ was loaded on both columns and eluted with methanol. As can be observed from the chromatograms shown in Fig. 3, atrazine could only be separated from TBZ by means of the imprinted column, thus demonstrating the suitability of methanol as a mobile phase for the selective recognition of TBZ in the imprinted column. According to the obtained retention times for atrazine and TBZ, a volume of 6 mL of methanol was selected in order to remove interfering compounds from the imprinted polymer without eluting TBZ.

It is generally known that molecularly imprinted polymers are not only able to selectively rebind the template molecule, but they can recognize structural analog compounds as well. In this sense, the ability of the imprinted column to rebind other benzimidazole fungicides commonly used such as benomyl or its major metabolite carbendazim under the developed MISPE procedure has been evaluated. In this sense, different standard solutions containing 1 mg L⁻¹ of benomyl and carbendazim were loaded

Fig. 3 Chromatograms obtained for the elution of atrazine and TBZ from the imprinted (a) and nonimprinted (b) column using methanol as mobile phase



onto the imprinted and nonimprinted columns. They were subsequently eluted with methanol and monitored at 240 nm. Imprinting factors obtained for benomyl or carbendazim are similar to those obtained for TBZ.

Results from these experiments are summarized in Table 1. These results confirm that the imprinted column was able to selectively rebind the evaluated benzimidazole compounds, thus indicating that the imprinted polymer is able to recognize the benzimidazole moiety, regardless of its substituents.

Optimization of the on-line MISPE–HPLC procedure

The above experiments demonstrate the ability of the imprinted column to selectively rebind different benzimidazole fungicides present in water samples. However, as they coelute from the imprinted polymer, quantitation of the amount of each benzimidazole compound requires their separation. For this purpose, the imprinted column was

coupled to an HPLC system by placing it in the loop of an injection valve, as schematized in Fig. 2. Thus, the MIP column would ensure the selective enrichment of the benzimidazole compounds present in water samples and, after a washing step to remove matrix interferences, the eluted analytes would be separated by means of a reversed-phase chromatographic column and monitored at 240 and 305 nm.

However, the effective coupling of the MISPE procedure with the chromatographic separation of benzimidazole compounds is not a straightforward task, and thus, a thorough optimization of the system is required in order to find a mobile phase that enables both the quantitative elution of benzimidazole compounds from the imprinted column and their interaction with the reversed-phase chromatographic column.

In this sense, even if the above experiments had demonstrated the suitability of methanol-based mobile phases for the quantitative elution of benzimidazole compounds from the imprinted column, its high eluting strength impels the

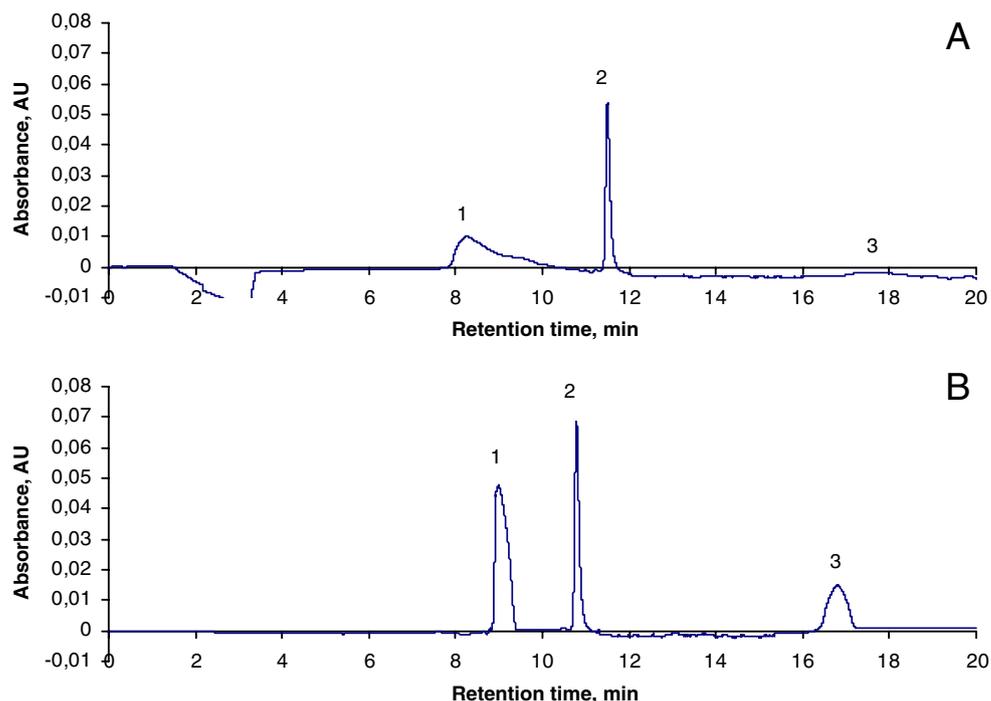
Table 1 Kd values and imprinting factors obtained for the retention of different analytes by the imprinted and nonimprinted columns

Analyte	Kd MIP	Kd NIP	Imprinting factor	Retention time (MIP), min
Atrazine ^a	0.96	0.92	1.04	5.4
Benomyl ^a	10.39	0.98	10.6	10.7
Carbendazim ^a	10.46	0.96	10.9	10.9
TBZ ^a	10.16	0.95	10.7	10.8
TBZ ^b	39.70	3.22	12.3	53.2

^a Methanol

^b Acetonitrile

Fig. 4 Chromatograms obtained after the enrichment of a mixture of benzimidazole compounds. **a** Mobile phase without $(\text{NBut}_4)\text{HSO}_4$. **b** Mobile phase with 25 mM $(\text{NBut}_4)\text{HSO}_4$; 1 carbendazim, 2 TBZ, 3 benomyl



retention of benzimidazole fungicides by the C_{18} column, and thus, they coelute in the void volume. On the contrary, aqueous mobile phases are the most suitable in order to assure the retention of benzimidazole compounds by the chromatographic column, but they are not able to elute them from the imprinted column.

As benzimidazole fungicides are much more soluble in an acidic media, the effect that the addition of different amounts of either phosphoric or acetic acid had on the recoveries of benzimidazole compounds eluted from the imprinted column has been evaluated. Of the different mobile phases evaluated, those aqueous solutions containing at least 4% acetic acid (v/v) are able to quantitatively elute benzimidazole compounds from the imprinted column without hampering their interaction with the chromatographic column.

Once benzimidazole compounds have been eluted from the imprinted polymer in a mobile phase, which enables their

retention by the chromatographic column, their separation has been carried out by means of a gradient elution profile increasing the acetonitrile content, as described elsewhere. Thus, a linear gradient to a mobile phase consisting on an acetonitrile–acetic acid (96:4, v/v) mixture in 11 min enables the baseline separation of the different benzimidazole fungicides. However, as can be observed by the chromatogram shown in Fig. 4a, extremely broad peaks are obtained for benomyl and carbendazim residues under these conditions. In order to increase the efficiency of the separation, different ion-pair-forming agents (trifluoroacetic acid, heptafluorobutyric acid, or tetrabutylammonium bisulfate) have been added to the mobile phase. Among them, $(\text{NBut}_4)\text{HSO}_4$ provided the optimum results. In this sense, the addition of 25 mM $(\text{NBut}_4)\text{HSO}_4$ to the mobile phase considerably increased both peak efficiencies and the sensibility (Fig. 4b).

Finally, it is important to stress that, in case a washing step of the imprinted column is used for the removal of

Fig. 5 Breakthrough volume of the imprinted column

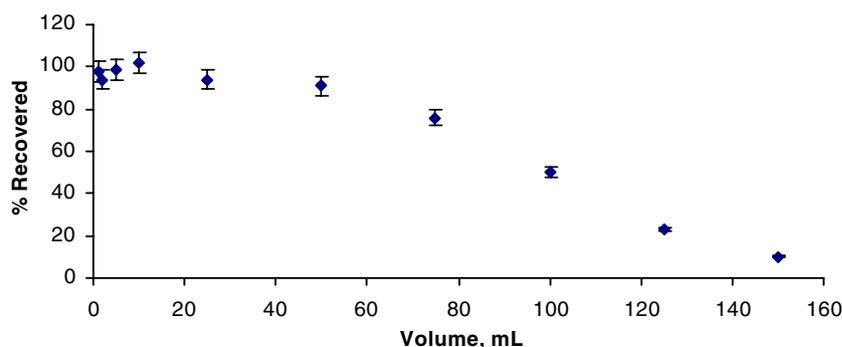
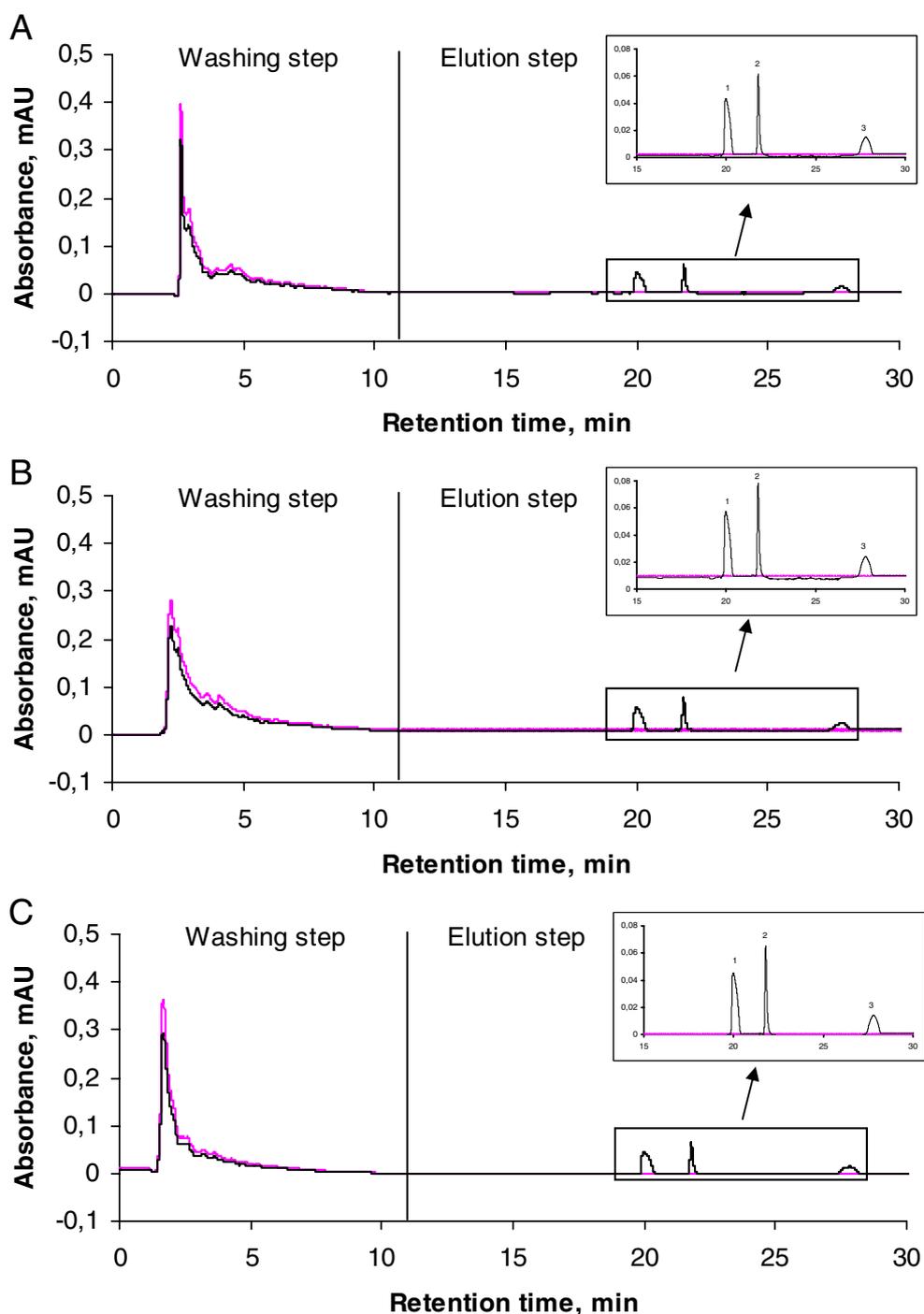


Fig. 6 Chromatograms obtained for the analysis of benzimidazole compounds in river (a), tap (b), and well (c) water samples; 1 carbendazim, 2 TBZ, 3 benomyl. Black lines, imprinted polymer; purple lines, nonimprinted polymer



matrix-interfering compounds, the remaining methanol should be removed by pumping MilliQ water through the system prior to the elution of benzimidazole compounds, as it will otherwise impel their retention by the chromatographic column. For this purpose, both the amount and flow rate of water required for the complete removal of methanol from the imprinted column had been evaluated. Results from these experiments (data not shown) demonstrated that pumping 5 mL of MilliQ water at a flow rate of 1 mL min⁻¹

is able to completely remove methanol from the system prior to the elution of benzimidazole compounds.

Method application

Benomyl residues are known to rapidly hydrolyze into several compounds in both protic organic solvents and aqueous media [18]. Taking into account that abiotic hydrolysis degradation processes are hampered by low

Table 2 Percent recovered and detection limits (ng L^{-1}) obtained for the determination of benzimidazole fungicides in water samples

Analyte	River water		Tap water		Well water	
	% Rec	DL	% Rec	DL	% Rec	DL
Benomyl	89	4.9	87	5.7	92	5.3
Carbendazim	89	2.6	91	2.5	95	2.5
TBZ	92	2.4	91	2.9	93	2.3

Spiking level: $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$. Sample volume: 50 mL. RSD ($n=5$) $<5\%$

temperatures, samples have been stored at -18°C . Under these conditions, benomyl is stable for about 24 h.

In order to ensure the absence of any washing effect that would affect the recoveries obtained for the benzimidazole fungicides, the breakthrough volume of the imprinted column has been evaluated. For this purpose, increasing volumes of aqueous solutions of benzimidazole fungicides (containing a total amount of $1 \mu\text{g}$) were loaded onto the MIP column at a flow rate of 1 mL min^{-1} . The retained benzimidazole compounds were quantified by applying the optimized on-line MISPE–HPLC procedure. As can be observed from data shown in Fig. 5, a breakthrough volume of 50 mL was obtained.

The developed on-line MISPE–HPLC procedure has been applied to the quantification of benomyl, carbendazim, and TBZ present in water samples by following the experimental procedure in section **Materials and methods**. Figure 6 shows the chromatograms obtained for the analysis of $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ spiked river (A), tap (B), and well (C) water samples, obtained after their enrichment by means of both the imprinted and nonimprinted columns. As can be observed from the chromatograms corresponding to the enrichment of water samples on the nonimprinted polymer, benzimidazole compounds coelute with several matrix interferences during the washing step and, thus, cannot be quantified. On the other hand, the high selectivity of the imprinted polymer enables the separation of benzimidazole fungicides from matrix components, which are subsequently separated by means of the C_{18} chromatographic column. The developed methodology enables the simultaneous enrichment and clean-up of the water samples within a single analytical run.

As can be observed from data in Table 2, the obtained recoveries for the quantification of benomyl, carbendazim, and TBZ in spiked river, tap, and well water samples range from 87% to 95%. For the proposed MISPE–HPLC method, the linearity between responses (peak area) and concentration was found over the range $2.3\text{--}500 \text{ ng L}^{-1}$ with a linear regression coefficient (R^2) of 0.9981.

Although very clean chromatograms had been obtained for the determination of benzimidazole fungicides in spiked water samples, matrix compounds could affect their

retention by the imprinted column. Accordingly, a comparison of the calibration plots of standard solutions and those obtained in the presence of the different water matrices has been performed. Results from these experiments demonstrated the absence of a matrix effect for all the water matrices evaluated. The high enrichment factors (about 1,300) allow us to obtain detection limits of $2.3\text{--}5.7 \text{ ng L}^{-1}$, which are below the legislated MCLs in all cases.

Conclusions

An imprinted polymer has been synthesized using TBZ as template molecule, MAA as functional monomer, and DVB as cross-linker. This imprinted polymer has been used as selective sorbent for the on-line SPE of benzimidazole fungicides. The high selectivity and breakthrough volume of the imprinted column enables the simultaneous enrichment and clean-up of water samples. After the elution of benzimidazole compounds from the imprinted column, their separation is achieved by means of ion-pair reversed-phase chromatography, using $(\text{NBut}_4)\text{HSO}_4$ as an ion-pair-forming agent, as this compound has been proven to considerably increase the efficiency of the chromatographic separation.

The developed on-line MISPE–HPLC enrichment procedure has been successfully applied to the quantification of benomyl, carbendazim, and TBZ in river, tap, and well water samples. Coupling both the sample treatment and the separation of benzimidazole compounds in a single step considerably shortens analysis time from 6–8 h to about 1 h. The detection limits achievable by this methodology ($2.3\text{--}5.7 \text{ ng L}^{-1}$) allow the determination of benzimidazole fungicides at concentration levels below the legislated MCLs.

Acknowledgements The authors wish to thank CONACyT (46558-Y, Mexico), DGICYT (CTQ2005-02281), *Comunidad de Madrid* (S-0505/AGR/0312), and *Universidad Complutense de Madrid* for financial support.

References

1. Danaher M, De Ruyck H, Crooks SRH, Dowling G, O'Keeffe M (2007) *J Chromatogr B* 845:1
2. European Parliament (2006) 2006/11/CE Directive
3. Jeannot R, Sabik H, Sauvard E, Gessin E (2000) *J Chromatogr A* 879:51
4. Zamora DP, Vidal JLM, Galera MM, Frenich AG, Gonzalez JLL, Arahal MR (2003) *Talanta* 60:335
5. Frenich AG, Zamora DP, Vidal JLM, Galera MM (2003) *Anal Chim Acta* 477:211
6. Hogendoorn EA, Westhuis K, Dijkman E, Eusingkweld EAG, Chauvaskul P, Biadul P, Baumann RA, Cornelese AA, van der Linden MA (2000) *Int J Environ Anal Chem* 78:67
7. JunkerBuchheit A, Witzenbacher M (1996) *J Chromatogr A* 737:67

8. Shimamura Y, Tomiyama N, Murakoshi M, Kobayashi M, Matano O (1998) *J Pest Sci* 23:241
9. Halko R, Sanz CP, Ferrera ZS, Rodriguez JJS (2004) *Chromatographia* 60:151
10. Moral A, Sicilia MD, Rubio S, Perez-Bendito D (2006) *Anal Chim Acta* 569:132
11. de Prada AGV, Loaiza OA, Serra B, Morales D, Martinez-Ruiz P, Reviejo AJ, Pingarron JM (2007) *Anal Bioanal Chem* 388:227
12. Turiel E, Tadeo JL, Cormack PAG, Martin-Esteban A (2005) *Analyst* 130:1601
13. Cacho C, Schweitz L, Turiel E, Perez-Conde C (2008) *J Chromatogr A* 1179:216
14. Cacho C, Turiel E, Perez-Conde C (2009) *Talanta* (in press)
15. Caro E, Marce EM, Cormack PAG, Sherrington DC, Borrull F (2003) *J Chromatogr A* 995:233
16. Benito Peña E, Urraca JL, Sellergren B, Moreno-Bondi MC (2008) *J Chromatogr A* 1208:62
17. Yin J, Wang S, Yang G, Yang G, Chen Y (2006) *J Chromatogr B* 844:142
18. Mallat E, Barcelo D, Tauler R (1997) *Chromatographia* 46:342