

EMPLEO DE POLÍMEROS DE IMPRESIÓN MOLECULAR (MIPs) EN TÉCNICAS DE MICRO-EXTRACCIÓN

Myriam Díaz-Álvarez, Esther Turiel, Antonio Martín-Esteban

Departamento de Medio Ambiente. INIA. Madrid

Email: amartin@inia.es

Introducción

Durante las últimas décadas, el desarrollo de la instrumentación analítica ha sido enorme permitiendo la determinación de prácticamente cualquier compuesto en cualquier tipo de muestra. En general, compuestos orgánicos se determinan mediante técnicas cromatográficas acopladas a detectores tradicionales (espectrofotómetros UV-vis, espectrofluorímetros) o, más recientemente, a la espectrometría de masas (MS o MS/MS). Sin embargo, incluso con detectores tan selectivos como la MS, no se recomienda la inyección directa de las muestras ya que los componentes de la matriz pueden influir en la ionización del compuesto objeto de análisis y por tanto afectando a su cuantificación final. Por ello, incluso hoy en día, la preparación de la muestra sigue siendo una etapa clave del proceso analítico.

Los principales objetivos de la preparación de muestra son la eliminación de potenciales interferencias, la pre-concentración de los analitos, y proporcionar en último término un método de análisis robusto y reproducible independiente de la matriz. Más recientemente, se han establecido nuevos objetivos tales como el empleo de tamaños de muestras más pequeños, la mejora de la selectividad en la extracción, así como la minimización del empleo de disolventes orgánicos [1]. Dichos objetivos pueden ser alcanzados empleando técnicas de micro-extracción como la micro-extracción en fase sólida (SPME) o la micro-extracción en fase líquida (LPME), entre otras.

Sin embargo, ninguna de estas técnicas de micro-extracción ofrece la selectividad requerida que permita alcanzar los cada vez más exigentes límites de detección establecidos por distintas regulaciones en distintos ámbitos (medio ambiental, sanitario, seguridad alimentaria, etc.).

Los polímeros de impresión molecular (MIP) son materiales sintéticos capaces de reconocer específicamente un determinado compuesto con preferencia sobre otros compuestos similares. Los MIPs se obtienen mediante polimerización de monómeros funcionales y entre-cruzantes alrededor de una molécula plantilla, como se muestra esquemáticamente en la Figura 1. La selección de los monómeros a utilizar se basa en su capacidad para interactuar con la molécula plantilla, dando lugar así a complejos monómero: plantilla estable durante la polimerización. Posteriormente, una vez realizada la polimerización, se extrae la plantilla dejando libres cavidades complementarias a ésta en tamaño, forma

y orientación de grupos funcionales. De esta manera, los MIPs pueden emplearse como materiales absorbentes selectivos en la preparación de muestras. Así, su uso en extracción en fase sólida (SPE) está bastante extendido y ya son varias las compañías que comercializan actualmente cartuchos de SPE empaquetados con MIPs para varias familias de compuestos [2]. La incorporación de los MIPs a otras técnicas de preparación de muestra es sin embargo bastante más reciente y todavía no ha sido completamente explotada. Así, el presente mini-review pretende proporcionar una visión general de la incorporación de MIPs a las técnicas de micro-extracción a través de algunos ejemplos relevantes.

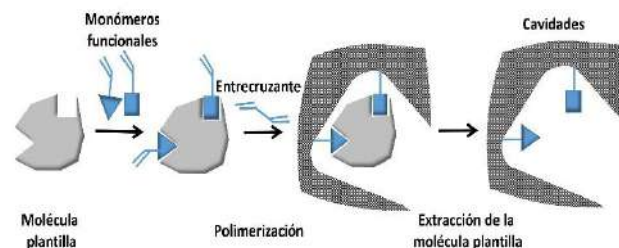


Figure 1.- Esquema del proceso de preparación de un polímero de impresión molecular.

2. Extracción en fase sólida magnética (*magnetic solid-phase extraction, MSPE*)

En los últimos años, la aplicación de (nano)-partículas magnéticas modificadas superficialmente para la extracción de diferentes analitos en varios tipos de muestras está siendo un área de gran actividad. Dichas partículas presentan buena dispersión en disolventes y se pueden separar fácilmente del medio mediante el empleo de un simple imán, evitando otros pasos de separación adicionales como la filtración o la centrifugación además de reducir considerablemente la cantidad de disolventes orgánicos a emplear en las distintas etapas de extracción. En este sentido, el empleo de nanopartículas magnéticas modificadas superficialmente con una fina capa de MIP se presenta como una alternativa prometedora para proporcionar selectividad a la extracción [3]. A modo de ejemplo, en la Figura 2 se muestra esquemáticamente el proceso de formación de una capa de MIP sobre nanopartículas magnéticas para ser usadas en la extracción de herbicidas triazínicos [4]. En un primer paso, las nanopartículas magnéticas (magnetita) se recubren con sílice siguiendo un típico proceso de sol-gel. Posteriormente, se introducen grupos funcionales polimerizables en la superficie donde se podrá anclar el

MIP en la etapa de polimerización final. Una vez eliminada la molécula plantilla (en este caso propazina), las nuevas partículas híbridas MIP-magnetita estarían listas para ser usadas en la extracción en fase sólida magnética de herbicidas triazínicos.

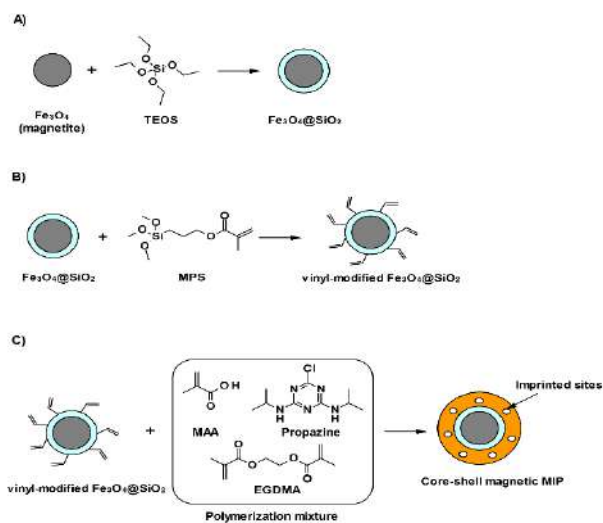


Figura 2.- Representación esquemática de la preparación de partículas híbridas MIP-magnetita. Adaptada de [4] con permiso de John Wiley & Sons.

Así, la Figura 3 muestra el cromatograma obtenido para un extracto de muestra de suelo enriquecido ($6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) después de realizar la extracción con las partículas híbridas MIP-magnetita (Figura 3A) comparado con el cromatograma obtenido para un estándar de triazinas de concentración equivalente (Figura 3B). A la vista de los cromatogramas es evidente el grado de limpieza del extracto proporcionado lo que permitió la determinación de los analitos a muy bajos niveles de concentración empleando un detector convencional. Además, es importante destacar que el volumen total de disolventes orgánicos empleados por muestra en las distintas etapas de extracción y limpieza fue de 5 mL, mucho más bajo que el empleado en otras técnicas convencionales de extracción.

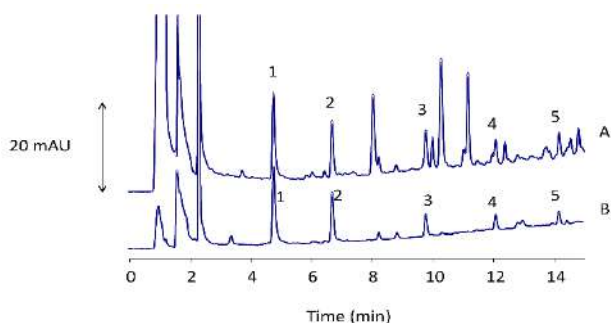


Figura 3.- Cromatogramas LC-DAD (268 nm) obtenidos para un extracto de muestra de suelo enriquecido con triazinas ($6 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$) (A) y una disolución estándar de triazinas de concentración equivalente (B) después de la extracción con partículas híbridas MIP-magnetita. Números de pico: (1) desisopropilatrazina, (2) desetilatrastazina, (3) simazina, (4) atrastazina, y (5) propazina. Adaptada de [4] con permiso de John Wiley & Sons.

3. Micro-extracción en fase sólida (*solid-phase microextraction, SPME*)

Desde su introducción a principios de los años 90 [5], la micro-extracción en fase sólida (SPME) se ha establecido como una herramienta fundamental en los laboratorios analíticos. Sin embargo, al igual que ocurre en otras técnicas de extracción, su selectividad es limitada. Aunque existen una gran variedad de fibras disponibles en el mercado, estas sólo cubren distintos rangos de polaridad haciendo que especies de la matriz sean co-extraídas con los analitos dificultando su determinación final.

La preparación de fibras MIPs fue abordada por primera vez por Koster y col. [6]. Estos investigadores prepararon fibras mediante recubrimiento de fibras de sílice con una fina capa de MIP y se aplicaron con éxito a la extracción selectiva de brombuterol en muestras de orina. Siguiendo una estrategia similar, varias fibras MIP-sílice han sido propuestas y empleadas con éxito a la SPME con fibras MIP (*molecularly imprinted-solid-phase microextraction, MI-SPME*) de triazinas [7], tetraciclinas [8] y β -bloqueantes [9], entre otros, en diferentes tipos de muestras. Sin embargo, este procedimiento presentan ciertas dificultades a la hora de controlar el grosor del recubrimiento de MIP y las fibras así obtenidas son frágiles dificultando su uso rutinario en el laboratorio. Como una alternativa, nuestro grupo propuso un proceso mucho más simple para la preparación fibras de MIP para SPME empleando capilares de sílice como molde [10]. En este procedimiento, los capilares de sílice se cortan en piezas de aproximadamente 30 cm de largo. Posteriormente, a intervalos de unos 5 cm, se elimina 1 cm del material protector del capilar con la llama de un mechero convencional. A continuación, se rellena el capilar con la mezcla de polimerización, se cierran ambos extremos y se introduce en un horno para llevar a cabo la polimerización a 60°C durante un determinado periodo de tiempo. Finalmente, los capilares se cortan y se sumergen en una disolución diluida de NH_4HF_2 bajo agitación permitiendo la disolución de las paredes de sílice del capilar. De esta manera, se obtienen monolitos MIP de 1 cm de longitud, cuyo espesor depende del diámetro interno del capilar utilizado. En la Figura 4A se muestran fotos de las fibras obtenidas las cuales presentan cierta flexibilidad facilitando el manejo de las mismas. Las fibras obtenidas se emplearon en la MI-SPME de triazinas en extractos de suelo. Como se puede observar en la Figura 4B, la selectividad proporcionada por la fibra MIP permitió extraer los analitos seleccionados prácticamente libres de interferentes dando lugar a un cromatograma con una línea base libre de picos interferentes y comparable al cromatograma obtenido en el análisis de una disolución patrón de triazinas.

Uno de los mayores inconvenientes atribuidos a los MIPs ha sido su limitada capacidad de reconocimiento selectivo en medios acuosos. Sin embargo, dicho inconveniente se puede evitar mediante la combinación de la micro-extracción en fase líquida (*liquid phase microextraction, LPME*) y la SPME. Esta estrategia fue propuesta por Hu y col. [11], en donde una fibra MIP se introduce en el interior

de una fibra hueca (*hollow fiber*, HF) de polipropileno (PP) previamente rellena con un disolvente orgánico inmiscible con el agua, el cual también impregna las paredes (y rellena los poros) de la HF. El sistema completo se introduce en la muestra acuosa lo que permite realizar una primera extracción líquido-líquido, donde los analitos son extraídos desde la muestra al disolvente presente en los poros de la HF para posteriormente difundir a su interior, donde finalmente se produce el reconocimiento selectivo en la fibra MIP. Dicho procedimiento ha sido aplicado con éxito a la determinación de triazinas en diferentes muestras acuosas [11], y de tiabendazol en zumos de cítricos [12].

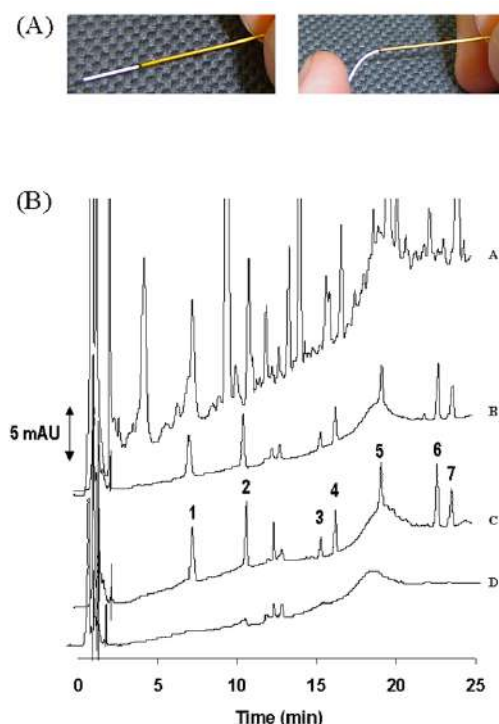


Figure 4.- (A) Fibras MIP flexibles; (B) Cromatogramas LC-UV obtenidos a 220 nm en el análisis de (A) un extracto de muestra de suelo sin limpieza previa, (B) un extracto de suelo enriquecido con triazinas ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) después de MI-SPME, (C) una disolución patrón de triazinas ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) después de MI-SPME, y (D) un extracto de suelo sin enriquecer después de MI-SPME. Números de pico: (1) desisopropilatrazina; (2) desetilatrazina; (3) simazina; (4) cianazina; (5) atrazina; (6) propazina; (7) terbutilazina. Adaptada de [10] con permiso de la American Chemical Society.

Uno de los puntos débiles de las fibras MIP es su baja capacidad, la cual suele provocar que las recuperaciones obtenidas sean bastante bajas. Sin embargo, las HF mencionadas presentan una elevada porosidad por lo que la preparación de MIP dentro de los poros de las HF incrementaría considerablemente la capacidad comparada con las fibras MIP descritas anteriormente. La Figura 5 muestra el procedimiento para la preparación de una MIP-HF, así como las imágenes SEM de la superficie de la pared de la fibra hueca de polipropileno utilizada antes y después de la polimerización. Este tipo de fibras han sido aplicadas a la micro-extracción de triazinas [13] en aguas y de fluoroquinolonas [14] en aguas y de orina.

Como una alternativa a la MI-SPME, y con el fin de evitar los riesgos de rotura de las fibras empleadas, se ha propuesto la denominada MI- μ -SPE empleando fibras huecas de (PP) [15, 16] o bien pequeñas “bolsas” o “sobres” del mismo material rellenas con una determinada cantidad de partículas de MIP [17, 18]. El principio seguiría siendo el mismo, combinando una primera extracción desde la muestra a las paredes de la fibra hueca, difusión de los analitos al interior de la fibra e interacción final con los puntos de unión selectivos presentes en las partículas de MIP. El empleo de esta metodología ha permitido la determinación de sulfonamidas [15], triazinas [16] y compuestos fenólicos [17] en aguas o cocaína y sus metabolitos en orina [18].

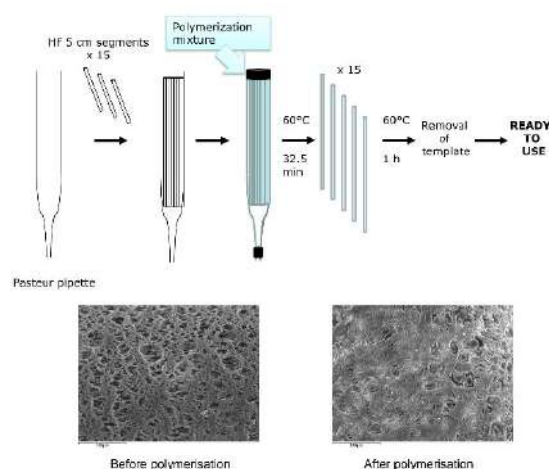


Figure 5. Esquema del proceso de polimerización para la preparación de HF-MIP y micrografías electrónicas de barrido (300 x) de la superficie de la pared de la HF original y de la HF-MIP obtenida. Adaptada de [13] con permiso de Elsevier.

4. Micro-extracción sobre barras agitadoras (*stir-bar sorptive extraction*, SBSE)

La SBSE fue propuesta en 1999 [19] como una alternativa a la SPME con el fin de aumentar la baja capacidad típica de las fibras utilizadas en SPME. La SBSE se basa en la partición de los analitos entre la muestra (principalmente muestras líquidas acuosas) y una barra magnética de agitación recubierta con una fase estacionaria. Durante años, sólo se comercializaron barras de agitación magnética recubiertas con polidimetilsiloxano (PDMS), lo que ha limitado su aplicación a la extracción de compuestos hidrofóbicos. En este sentido, el desarrollo de nuevas barras magnéticas recubiertas con fases más polares y selectivas ha sido objeto de investigación durante los últimos 15 años [20]. En este sentido, la combinación de la impresión molecular y la SBSE podría ser una buena alternativa que proporcionase sencillez y selectividad al proceso de extracción y se han publicado varios trabajos en esa dirección en los últimos años. En la mayoría de dichos trabajos, se han empleado capilares de vidrio o imanes recubiertos de vidrio como soporte para el posterior recubrimiento con una capa de MIP. Las barras magnéticas MIP así obtenidas han sido aplicadas a la SBSE de ractopamina [21], sulfamidas [22] y tiabendazol [23],

entre otros, en diferentes tipos de muestras. Sin embargo, el procedimiento seguido de preparación implica varias etapas tediosas, como proporcionar una superficie rugosa al soporte de vidrio, tratar con NaOH para aumentar la cantidad de grupos de silanol disponibles, y finalmente llevar a cabo una silanización para permitir el anclaje del MIP a la superficie. Como una alternativa mucho más sencilla y directa, nuestro grupo recientemente propuso la preparación de barras magnéticas MIP mediante el atrapamiento de nanopartículas magnéticas modificadas en el interior de un monolito de MIP mediante polimerización en bloque tradicional utilizando como molde un inserto de vidrio convencional para viales. Dicho procedimiento se muestra esquemáticamente en la Figura 6, junto con una foto de la barra magnética MIP obtenida.

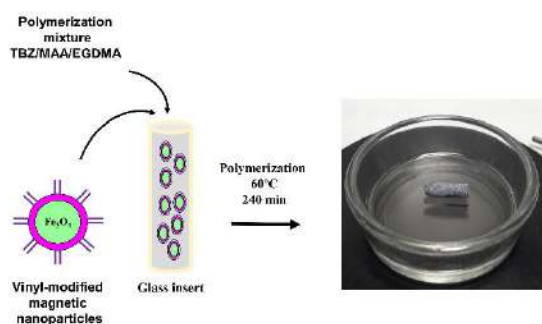


Figura 6.- Esquema de preparación de barras magnéticas MIP para SBSE.

El monolito MIP así obtenido presenta propiedades magnéticas y permite la agitación de la muestra con la simultánea extracción selectiva. A pesar que son varias las variables que pueden afectar a su rendimiento (ej. cantidad de nanopartículas magnéticas empleadas, tiempo de polimerización, etc), estas nuevas barras magnéticas resultan muy prometedoras y ya han sido aplicadas con éxito a la SBSE de triazinas en extractos de suelo [24], alfatoxinas en alimentos infantiles [25] y carbendazim y tiabendazol en cítricos [26].

5. Conclusiones

De acuerdo con todo lo expuesto, resulta evidente que los MIPs son claramente compatibles con las técnicas actuales de pretratamiento de la muestra, lo que proporciona una selectividad sin precedentes al proceso de extracción. Los MIPs son capaces de limpiar muestras complejas, lo que lleva a métodos analíticos selectivos, sensibles, rápidos y robustos sin la necesidad de utilizar detectores costosos. La síntesis de fibras para SPME, las nuevas barras magnéticas para SBSE o la incorporación de MIPs a otras técnicas de extracción demuestran la adaptabilidad de los mismos a casi cualquier técnica de extracción. En este sentido, hay margen para mejorar su uso en estas técnicas, su combinación con otras y el desarrollo de dispositivos de μ -SPE. Todo ello contribuirá al desarrollo de nuevos métodos analíticos selectivos y sencillos que harán de los MIPs, en nuestra opinión, una de las tecnologías más avanzadas en la preparación de muestras en los próximos años.

Referencias

- [1] R.M. Smith, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 3.
- [2] B. Sellaergren; A. Martín-Esteban, Chapter 23, "Handbook of sample preparation" (Editors: J. Pawliszyn, H.L. Lord), 2010, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- [3] M. Niu, C. Pham-Huy, H. He, H., *Microchim. Acta*, 183 (2016) 2677.
- [4] M. J. Patiño-Roper, M. Díaz-Álvarez, A. Martín-Esteban, *J. Mol. Recognit.*, 30 (2017) e2593.
- [5] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2145.
- [6] E.H.M. Koster, C. Crescenzi, W. Den Hoedt, K. Ensing, G.J. de Jong, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3140.
- [7] X. Hu, Y. Hu, G. Li, *J. Chromatogr. A*, 1147 (2007) 1.
- [8] X. Hu, J. Pan, Y. Hu, Y. Huo, G. Li, *J. Chromatogr. A*, 1188 (2008) 97.
- [9] X. Hu, J. Pan, Y. Hu, G. Li, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 190.
- [10] E. Turiel, J.L. Tadeo, A. Martín-Esteban, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 3099.
- [11] Y.L. Hu, Y.Y. Wang, Y.F. Hu, G.K. Li, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 8304.
- [12] F. Barahona, E. Turiel, A. Martín-Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 694 (2011) 83.
- [13] F. Barahona, M. Díaz-Álvarez, E. Turiel and A. Martín-Esteban, *J. Chromatogr. A*, 1442 (2016) 12.
- [14] F. Barahona, B. Alberro, J.L. Tadeo, A. Martín-Esteban, *J. Chromatogr. A*, (2018), <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.12.015>.
- [15] M. Díaz-Álvarez, F. Barahona, E. Turiel, A. Martín-Esteban, *J. Chromatogr. A*, 1357 (2014) 158.
- [16] E. Turiel, M. Díaz-Álvarez, A. Martín-Esteban, *J. Chromatogr. A*, 1432 (2016) 1.
- [17] Q. Feng, L. Zhao, J. Lin, *Anal. Chim. Acta*, 650 (2009) 70.
- [18] J. Sanchez-Gonzalez, M. Taberero, A. Bermejo, P. Bermejo-Barrera, A. Moreda-Pineiro, *Anal. Chim. Acta*, 898 (2015) 50.
- [19] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, *J. Microcolumn Sep.*, 11 (1999) 737.
- [20] J. Nogueira, *Trac-Trends Anal. Chem.*, 71 (2015) 214.
- [21] Z. Xu, Y. Hu, Y. Hu, G. Li, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 3612.
- [22] Z. Xu, C. Song, Y. Hu, G. Li, *Talanta* 85 (2011) 97.
- [23] E. Turiel, A. Martín-Esteban, *J. Separ. Sci.* 35 (2012) 2962.
- [24] M. Díaz-Álvarez, E. Turiel, A. Martín-Esteban, *J. Chromatogr. A*, 1469 (2016) 1.
- [25] M. Díaz-Bao, P. Regal, R. Barreiro, C.A. Fente, A. Cepeda, *J. Chromatogr. A*, 1471 (2016) 51.
- [26] M. Díaz-Álvarez, E. Turiel, A. Martín-Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 1045 (2019) 117.