ACTUALIDAD ANALÍTICA

SEQA
Sociedad Española de Química Analítica

BOLETÍN

de la

Sociedad Española de Química Analítica

ISSN INTERNATIONAL STANDARD SERIAL NUMBER SPAIN 2444-8818

Número 82, junio, 2023

ÍNDICE 2

EDITORIAL 4

ACTUALIDAD ANALÍTICA

VIII Jornadas sobre estrategias para la innovación de la actividad docente en Química Analítica 5

DOCENCIA

ACTIVIDADES DE APRENDIZAJE AUTÓNOMO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS CLASES DE LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA: VÍDEOS DEMOSTRATIVOS Y CUESTIONARIOS DE FORMACIÓN
Juan Gabriel March, Edwin Palacio, Laura Ferrer
Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universitat de les Illes Balears, Cra. de Valldemossa, km 7,5. 07122 Palma (Illes Balears) 6

INVESTIGACIÓN

EVALUACIÓN ANALÍTICA DEL USO DE NANOESTRUCTURAS PARA MEJORAR EL TRANSPORTE Y LA INCORPORACIÓN CELULAR DE COMPUESTOS DE PLATINO.
Maria Montes Bayón, Lucia Gutierrez Romero, Daniel Turiel Fernández, Elisa Blanco González
Departamento de Química Física y Analítica. Facultad de Química. Universidad de Oviedo. C/Julian Clavería 8, 33006. Oviedo 11

PRIMER USO DE UN MATERIAL MESOPOROSO EN UN MÉTODO MULTIRRESIDUO PARA PRECONCENTRAR 218 PESTICIDAS EN AGUAS. CORRECCIÓN DEL EFECTO MATRIZ Y DE LAS PÉRDIDAS QUE TIENEN LUGAR EN EL PROCESO DE PRECONCENTRACIÓN
M. Martínez Galera[a], M.D. Gil García[a,b]
[a] Departamento de Química y Física, Campus Agroalimentario de Excelencia Internacional (CeiA3). Universidad de Almería 04120 Almería.
[b] Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Residuos de Pesticidas en Frutas y Hortalizas, 04120 Almería. 16

DISPOSITIVOS MÓVILES COMO HERRAMIENTAS PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA
Roberto Sáez-Hernández, M. Luisa Cervera, Adela R. Mauri-Aucejo
Departamento de Química Analítica, Universitat de València, C/ Dr. Moliner, 50, Burjassot, 46100, España 32

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA DETECTAR CAMBIOS EN LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE ARNs LARGOS NO CODIFICANTES ASOCIADOS A CÁNCER
Rebeca Miranda Castro, Raquel Sánchez Salcedo, Noemí de los Santos Álvarez, María Jesús Lobo Castañón
Grupo de Electroanálisis (GEUO). Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo.
Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA) **36**

NUEVOS COMPONENTES FLUÍDICOS PARA HPLC PORTÁTIL CON PREPARACIÓN DE MUESTRA INTEGRADA
David J. Cocovi Solberg
Universidad de las Islas Baleares, Departamento de Química, Grupo FITRACE
Universidad de Ciencias de la Vida y Recursos Naturales en Viena, Departamento de Química, Instituto de Química Analítica **41**

IN MEMORIAM: Profesora MARÍA CRUZ MORENO BONDI
Prof. Elena Benito Peña
Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Químicas . Universidad Complutense de Madrid **46**

ACTUALIDAD ANALÍTICA

COMITÉ EDITORIAL

E. Barrado (UVa) (Coordinador)
C. Barbas Arribas (San Pablo-CEU)
C. Bendicho Hernández (UVigo)
E. Blanco González (Uniovi)
R. Boqué Martí (URV)
A. Chisvert Sanía (UV)
C. Domeño Recalde (Unizar)
T. García Barrera (UHU)
M. A. Goicolea Altuna (EHU)
C. Guiberteau Cabanillas (UCLM)
S. Maspoch Andrés (UAB)
M. Miró Lladó (UIB)
A. Muñoz de la Peña (UEX)
J.A. Ortuño Sánchez Pedreño (UM)
C. Pizarro Millán (URioja)
L. Ramos Rivero (CSIC)
M.A. Rodríguez Delgado (Ull)
C. Santamaría Elola (UNAV)
P. Yáñez-Sedeño Orive (UCM)
A. Zapardiel Palenzuela (UNED)

ISSN 2444-8818

Editado en Madrid por Sociedad Española de Química Analítica

La SEQA no asume responsabilidad sobre las ideas u opiniones de las colaboraciones en Actualidad Analítica

EDITORIAL

Queridos/as socios/as de la SEQA y compañeros/as.

Tal vez ya se nos ha olvidado, pero no hace tanto tiempo vimos alterado el desarrollo normal de nuestra vida diaria y científica. Como resultado se alteraron las fechas de nuestras reuniones, convocatorias de premios etc.

En todo caso y como muestra de la recuperación progresiva y esperamos que definitiva, acaba de finalizar el plazo para optar a los premios SEQA-Miguel Valcárcel a la mejor Tesis Doctoral y Joven Investigador. Además, volvemos a recuperar la Jornada Docente. En la que será su 8ª edición, se tratarán temas de máximo interés, como por ejemplo las estrategias para el aprendizaje en las prácticas de laboratorio, una visión retrospectiva de la evaluación del profesorado o la aparición de la Inteligencia artificial. Nos conviene como profesores estar al día de las capacidades de esta nueva herramienta, tanto para actualizar nuestra docencia como para controlar qué hacen a partir de ahora nuestros estudiantes, no sea que acabemos evaluando la tal inteligencia (o nos evalúe ella a nosotros). Así que aprovechamos este medio para invitaros a Toledo y hacer de la reunión un éxito.

Por lo demás, este número contiene artículos dedicados a la docencia y otros de investigación, de un nivel innegable que permite mantener un interés importante en este medio de comunicación entre la sociedad analítica. Tal vez no lo hagamos con la frecuencia de debíamos, gracias a todos los que hacéis esto posible.

Por el Comité Editorial
E.Barrado

ACTUALIDAD ANALÍTICA

Abierta la inscipción para la VIII Jornada docente SEQA

SEQA
Sociedad Española de Química Analítica

FECHAS CLAVE

Inscripción:
Del **24 de abril** hasta completar aforo

Fin envío de comunicaciones:
~~5 de mayo~~ **NUEVA FECHA 22 de mayo**

Comunicación aceptación comunicaciones: **del 16 al 29 de mayo**

INSCRIPCIÓN Y ENVÍO DE COMUNICACIONES

Las inscripciones deben realizarse mediante formulario ONLINE a través de la Web oficial https://www.seqa.es

La SEQA ofrece 1 ayuda para un representante por Departamento.

Se podrán presentar un máximo de 2 comunicaciones por participante.

DETALLE DE LA INSCRIPCIÓN

La inscripción incluye la documentación de la reunión, cafés de las pausas, cóctel el día 19 de junio y comida el día 20 de junio.

	Hasta 31 de mayo	Después 31 de mayo
Socio numerario SEQA	Gratuito	75 €
Socio adherido o estudiante*	Gratuito	50 €
No socio SEQA	100 €	150 €

* Deberán justificar su condición de estudiante adjuntando documento acreditativo.

Universidad de Castilla-La Mancha

VIII JORNADA SOBRE ESTRATEGIAS

SEQA
Sociedad Española de Química Analítica

para la innovación de la actividad docente en Química Analítica

UNIVERSIDAD DE CASTILLA-LA MANCHA

19-20 de JUNIO de 2023

Edificio Universitario Madre de Dios
C/ Alfonso XII
45002, Toledo

SEQA
Sociedad Española de Química Analítica

JUNTA DIRECTIVA SEQA

Dra. María Montes Bayón
Dra. Lourdes Ramos Rivero
Dra. Beatriz Fernández García
Dr. Miguel del Nogal Sánchez
Dr. Fernando Benavente Moreno
Dr. Javier Galbán Bernal
Dr. Juan Francisco García Reyes
Dra. Antonia Garrido Frenich
Dr. José Manuel Herrero Martínez
Dra. Soledad Munistegui Lorenzo
Dr. José Luis Luque
Dr. Arsenio Muñoz de la Peña Castrillo
Dra. Rosa del Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios

COMITÉ ORGANIZADOR DE LA JORNADA

Dra. María Montes Bayón
Dra. Beatriz Fernández García
Dr. Miguel del Nogal Sánchez
Dra. Soledad Munistegui Lorenzo
Dra. Rosa del Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios

Duración de la Jornada: 10 h

Para más información:
https://www.seqa.es

Universidad de Castilla-La Mancha

PROGRAMA

SEQA
Sociedad Española de Química Analítica

19 de junio

15:00 – 16:00 Recogida documentación
16:00 – 16:30 Apertura jornada
16:30 – 18:30 Taller:
Estrategias para el aprendizaje en las prácticas de laboratorio
Yolanda Díaz de Mera Morales y Alberto Notario Molina
Grupo de Innovación Docente "Aprendiendo" (UCLM)
18:30 – 20:30 Cóctel / Pósteres

20 de junio

10:00 – 10:30 Conferencia invitada:
Evaluación docente del profesorado en retrospectiva: defectos y virtudes de los sistemas existentes
María José Rodríguez Conde
Vicerrectora de Calidad y Enseñanzas de Grado (USAL)
10:45 – 11:45 Comunicaciones orales
11:45 – 12:30 Pausa café / Pósteres
12:30 – 14:00 Mesa redonda

Comida/Pósteres

16:00 – 17:00 Conferencia invitada:
¿Y cómo estaba impartiendo yo mi docencia cuando la Inteligencia Artificial llegó al aula?
Carlos González Morcillo
Director Académico del Vicerrectorado de Transformación y Estrategia Digital (UCLM)
17:00 – 17:30 Clausura

ACTIVIDADES DE APRENDIZAJE AUTÓNOMO PARA LA PREPARACIÓN DE LAS CLASES DE LABORATORIO DE QUÍMICA ANALÍTICA: VÍDEOS DEMOSTRATIVOS Y CUESTIONARIOS DE FORMACIÓN

Juan Gabriel March, Edwin Palacio, Laura Ferrer
Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universitat de les Illes Balears,
Cra. de Valldemossa, km 7,5. 07122 Palma (Illes Balears)

Resumen

En los actuales grados en Química, el número de horas presenciales de trabajo en el laboratorio suele estar muy ajustado. Esta limitación horaria exige organizar y orientar las sesiones presenciales de laboratorio de manera que permitan un óptimo aprovechamiento y asegurar así los objetivos de aprendizaje planteados en cada asignatura.

Así, con el fin de mejorar la impartición de las clases de laboratorio, hemos desarrollado un proyecto de innovación docente basado en la realización por parte de los estudiantes de una actividad pre-laboratorio autónoma consistente en la visualización de unos vídeos demostrativos y en la realización de unos cuestionarios de aprendizaje a responder después de la visualización de los vídeos.

La asignatura seleccionada para llevar a la práctica el proyecto ha sido Experimentación en Química Analítica del Grado en Química de la Universidad de las Islas Baleares durante el curso 2021-22 (30 estudiantes).

Los resultados derivados de la realización de esta actividad pre-laboratorio han sido evaluados mediante encuestas y técnicas de observación.

La actividad ha tenido una buena aceptación por parte de los estudiantes y entendemos que ha sido especialmente positiva para aquellos menos motivados. Se ha conseguido una mayor comprensión de los procedimientos descritos en el guion y ello ha derivado en un mayor aprovechamiento del trabajo presencial.

1. INTRODUCCIÓN

El Espacio Europeo de Educación Superior (EEES) propone un modelo de enseñanza-aprendizaje en el que el estudiante debe ser capaz de generar conocimiento de forma autónoma con el apoyo del profesorado. Para ello, progresivamente, se han ido introduciendo (y adaptando) estrategias didácticas innovadoras que pretenden facilitar el trabajo autónomo del estudiante y la adquisición de competencias. En este contexto, el vídeo educativo se ha convertido en un eficiente recurso didáctico de aprendizaje autónomo que puede facilitar, por una parte, la adquisición de conocimiento por parte de los estudiantes y por otra, la labor del profesor [1]. De hecho, durante los meses de confinamiento del curso 2020-21 decretado para controlar la pandemia de *COVID-19*, el vídeo, conjuntamente con otras estrategias basadas en el uso de Tecnologías de la Información y la Comunicación (TICs), se popularizó en gran medida y se consolidó como herramienta didáctica de alto potencial para fortalecer el proceso de enseñanza-aprendizaje de los estudiantes [2]. Así, las llamadas "píldoras audiovisuales" se utilizaron como material didáctico en asignaturas tanto teóricas como prácticas para facilitar la adquisición de competencias por parte de los estudiantes [3].

Otro recurso de utilidad demostrada que también puede motivar al estudiante en su proceso de aprendizaje es el cuestionario formativo. Este tipo de cuestionarios permiten autoevaluar conocimientos y el ritmo de aprendizaje [4]. Por otra parte, los objetivos de aprendizaje de los grados en ciencias experimentales, en general, y de los grados en Química, en particular, incluyen la adquisición de competencias centradas en la habilidad para el trabajo en el laboratorio, tales como las relacionadas con la realización de procedimientos, la monitorización de propiedades físico-químicas, la utilización de instrumentos y la gestión de riesgos. Para alcanzar estos objetivos, y así asegurar la preparación de los futuros graduados para su ejercicio profesional, las prácticas de laboratorio son imprescindibles.

Aun así, en los actuales grados en Química, el número de horas presenciales de trabajo en el laboratorio suele estar muy ajustado, lo que exige organizar y orientar las sesiones presenciales de trabajo experimental de manera que permitan un óptimo aprovechamiento y asegurar así los objetivos de aprendizaje planteados en cada asignatura.

Habitualmente, para realizar las prácticas, los estudiantes disponen de los correspondientes guiones escritos donde se describen (más o menos detalladamente, dependiendo de las características de cada asignatura) los pasos a seguir para la correcta ejecución de los procedimientos. No obstante, a veces, es difícil transmitir por escrito la realización de determinadas operaciones manuales y, además, los estudiantes menos motivados no suelen preparar adecuadamente la práctica a realizar. Así, se puede dar el caso de que un estudiante inicie la práctica sin tener completamente asimilados los pasos a seguir, el material a utilizar y/o su uso correcto. En estos supuestos, se pueden cometer importantes errores en el desarrollo del trabajo experimental que, además de suponer un desaprovechamiento del tiempo presencial, también pueden comprometer la seguridad en el laboratorio. Así,

es habitual que el profesor deba invertir una parte importante del tiempo (sobre todo en las etapas iniciales de las sesiones) en repetir instrucciones y corregir hábitos de trabajo, lo que acaba restando cierto dinamismo al proceso de enseñanza-aprendizaje y también podría desmotivar a parte del alumnado.

En este contexto, considerando las potencialidades del uso de vídeos demostrativos para la adquisición de habilidades de carácter práctico y con el fin de facilitar la impartición de las clases de laboratorio, hemos desarrollado un proyecto de innovación docente basado en la realización por parte de los estudiantes de una actividad pre-laboratorio de apoyo al guion de prácticas consistente en la visualización de unos vídeos demostrativos, ceñidos al guion escrito, y en la realización de unos cuestionarios de aprendizaje sobre aspectos de los vídeos y de los guiones que los estudiantes deben conocer antes de empezar el trabajo experimental. La evaluación del impacto de la actividad propuesta sobre el desarrollo de las sesiones de laboratorio y sobre la adquisición de habilidades se ha llevado a cabo mediante encuestas y técnicas de observación. Los resultados han permitido concluir que esta actividad previa ha facilitado, por una parte, la adquisición de habilidades prácticas por los estudiantes y, también, la labor docente del profesor.

2. DESARROLLO DEL PROYECTO

La actividad pre-laboratorio en la que se basa el proyecto se llevó a la práctica durante el curso académico 2021-22. Participaron 30 estudiantes matriculados en la asignatura Experimentación en Química Analítica del Grado en Química de la Universidad de las Islas Baleares. Esta es una asignatura de 6 créditos ECTS que se imparte en el segundo cuatrimestre del tercer curso por lo que, si los estudiantes siguen la programación establecida en el Plan de Estudios (lo que lamentablemente no siempre es así), al llegar a esta asignatura ya han cursado todas las asignaturas teóricas del módulo de Química Analítica, y varias asignaturas de laboratorio: dos laboratorios de química general, y los laboratorios específicos de las áreas de conocimiento de Química Inorgánica y Química Orgánica. Así, cabe suponer que los estudiantes ya cuentan con un buen nivel de formación teórico-práctica y, en esta asignatura, se ha optado por reducir al mínimo las explicaciones sobre los fundamentos de los distintos experimentos y potenciar los aspectos prácticos. Para el desarrollo de las sesiones de laboratorio, los estudiantes disponen de un guion que incluye una introducción, donde se recuerdan los aspectos teóricos básicos necesarios para una correcta comprensión e interpretación de los experimentos, y los procedimientos detallados. La asignatura consta de 20 sesiones de cuatro horas, dos de las cuales son de aula y las restantes de laboratorio, en donde los estudiantes realizan 16 prácticas distintas trabajando en grupos de dos. De cada práctica, cada grupo debe presentar un breve informe que incluye, básicamente, resultados experimentales y cálculos. Acabada la asignatura, se realiza un examen escrito.

Por motivos de disponibilidad de recursos, durante una misma sesión de laboratorio, se realizan tantas prácticas distintas como grupos de estudiantes lo que hace impracticable realizar una explicación previa de los contenidos del guion por parte del profesor. Así, se propone al estudiante que prepare la práctica a realizar en el laboratorio como parte de su trabajo autónomo. A pesar de que se insiste mucho en la importancia de esta preparación previa, no todos los estudiantes la llevan a cabo adecuadamente, y ello genera muchas consultas al inicio de cada sesión que, en ocasiones, no pueden ser atendidas con la atención y detalle que corresponde. Por lo expuesto, se considera que esta asignatura constituye un excelente contexto donde plantear una actividad pre-laboratorio que ayude, estimule y motive al estudiante a preparar las sesiones prácticas de forma autónoma.

Recursos preparados para el desarrollo del proyecto: vídeos y cuestionarios

Para el desarrollo del proyecto, se han preparado vídeos demostrativos y cuestionarios formativos sobre las prácticas.

Los vídeos se centran básicamente en la parte procedimental (manipulaciones, montajes e instrumentación) y en aspectos de seguridad de las operaciones que comportan cierto riesgo. Con el fin de no alargar excesivamente los vídeos, los aspectos teóricos que se considera necesario recordar se resumen en la introducción de los guiones escritos y apenas se tratan en los vídeos. Aun así, la duración media de los vídeos ha resultado de unos 10 minutos, que ya excede la duración óptima que, según determinados docentes, deberían tener los vídeos universitarios para favorecer un máximo aprovechamiento por parte de los estudiantes [5].

Las tomas fueron grabadas por los profesores utilizando teléfonos inteligentes en el mismo laboratorio, siguiendo exactamente las instrucciones del guion escrito de la práctica. Posteriormente fueron editadas utilizando el software de postproducción audiovisual DaVinci Resolve. La versión gratuita de este programa (https://www.blackmagicdesign.com/es/products/davinciresolve) es muy completa. Permite trabajar con varias líneas de tiempo, tanto de vídeo como de audio, lo que en nuestro caso ha resultado muy útil por permitir tener en una misma pantalla tomas de distinta perspectiva de una misma escena. También permite fácilmente insertar textos escritos, superponer audios, ajustar el volumen del audio por tramos, cambiar la velocidad de reproducción, insertar fotogramas fijos y efectuar transiciones entre los distintos clips. A cambio, es aconsejable que el ordenador que se utilice disponga de 32 GB de RAM y de una buena tarjeta gráfica. En cuanto al audio, se ha optado por grabarlo después del montaje, ya que de esta manera se pueden preparar y

reflexionar los comentarios y explicaciones del profesor, resultando de esta manera, en nuestra opinión, unos vídeos más instructivos. En la Figura 1 se muestran capturas de pantalla de uno de los vídeos.

Figura 1. Capturas de pantalla de uno de los vídeos.

Los cuestionarios formativos constaban de preguntas teórico-prácticas sobre aspectos del vídeo y del guion que los estudiantes deben conocer y comprender antes de iniciar el trabajo experimental. El objetivo de estos cuestionarios es el aprendizaje (no la evaluación) y por ello los estudiantes debían repetir los intentos hasta conseguir la máxima nota.

Los estudiantes matriculados tenían acceso a ambos recursos (vídeos y cuestionarios) a través de la página de la asignatura en la plataforma Moodle.

3. SEGUIMIENTO Y VALORACIÓN

Las visualizaciones de los vídeos y el número de intentos necesitados para obtener la máxima nota en los cuestionarios se monitorizaron a través de Moodle.

Con el fin de valorar las repercusiones de esta actividad en el proceso de enseñanza-aprendizaje, y conocer la percepción de los estudiantes respecto a su utilidad, en la última sesión de laboratorio, los estudiantes contestaron una encuesta anónima donde indicaban el nivel de acuerdo con una serie de afirmaciones sobre los cuestionarios y los vídeos. El enunciado de las afirmaciones, las 5 opciones de respuesta para cada afirmación y el número de estudiantes que ha optado por cada una de las respuestas se agrupan en la Tabla 1. Además, la encuesta incorporaba una pregunta abierta para que los estudiantes pudieran añadir comentarios. Por otra parte, en el laboratorio, el profesorado realizó un seguimiento sobre la forma de trabajar de los estudiantes y su actitud basado en técnicas de observación.

En cuanto a los resultados de este seguimiento, cabe indicar que todos los estudiantes visualizaron los vídeos antes de la sesión presencial y contestaron la encuesta completa. En cuanto a los cuestionarios de aprendizaje, el nivel de participación también fue elevado, pero no del 100 %. Un 17 % de los estudiantes no contestaron todos los cuestionarios antes de comenzar las clases de laboratorio.

Los datos de la Tabla 1 revelan que casi el 83% de los estudiantes pensaron que los vídeos previos al laboratorio ayudaron a comprender los procedimientos de las prácticas. En cuanto a los cuestionarios de aprendizaje, a pesar de tener un grado considerable de aceptación, no resultaron relevantes para el 10% de los estudiantes encuestados. Un total del 83% de los estudiantes estuvo de acuerdo en que los vídeos previos al laboratorio permiten reducir el tiempo de preparación de la sesión práctica y el 97% estuvo de acuerdo en que el vídeo les permitió trabajar más rápido. Por otro lado, el 73% y el 90% de los estudiantes consideran que, los vídeos y los cuestionarios, respectivamente, ayudan a prevenir errores en el trabajo experimental. En cuanto al impacto sobre la mejora de la seguridad en el laboratorio, el 60% de los estudiantes estuvo totalmente de acuerdo en que los vídeos permiten trabajar de manera más segura, y el 27% estuvo solo parcialmente de acuerdo. Por último, cabe señalar que más del 95% de los estudiantes estuvieron de acuerdo en que esta actividad complementaria mejora la asignatura.

En cuanto al apartado abierto de la encuesta, no hubo comentarios negativos y, entre los positivos, cabe destacar los siguientes:

"Los vídeos previos al laboratorio y los cuestionarios de aprendizaje me ayudaron a preparar la práctica."

"Los vídeos pre-lab son muy explicativos, y los cuestionarios también ayudan, en algunos casos, con cálculos para la preparación de informes."

"Es la primera vez que veo vídeos en una asignatura de laboratorio."

"Los vídeos previos al laboratorio son buenos porque explican las prácticas con algunos detalles más que el guion y esto nos ayuda a la hora de hacer la práctica."

En cuanto al seguimiento realizado por el profesorado, en comparación con los cursos anteriores, se evidenció que, en general, los estudiantes trabajaron con más soltura y autonomía. Se evito el cúmulo de consultas en los primeros momentos de las sesiones que, en ocasiones, impedía atender con inmediatez a los estudiantes, formándose colas de espera que generaban un cierto agobio. Nos ha parecido que esta actividad ha sido especialmente útil para los estudiantes menos motivados y/o inseguros, y ha evitado errores en aquellos estudiantes más resolutivos que rápidamente empiezan a trabajar sin haber interpretado correctamente el guion escrito. En cierta medida se ha evitado el desánimo que padecen algunos estudiantes cuando no saben cómo empezar y, en algunos casos, el trabajo experimental planificado, se ha completado en

menos tiempo. Así, el profesor, al tener que atender menos consultas sobre los procedimientos, ha podido interactuar más con los estudiantes, corrigiendo hábitos o planteando discusiones que han aportado más criterio y dinamismo al trabajo experimental. De esta manera, la actividad propuesta ha resultado positiva para los estudiantes, y también para los profesores que pueden guiar las prácticas de una forma menos estresada y más personalizada. Además, este tipo de materiales de apoyo pueden ser muy útiles para aquellos nuevos profesores o colaboradores que imparten la asignatura por primera vez.

Tabla 1. Respuesta de los estudiantes a las preguntas de la encuesta (n=30).

Afirmación a valorar	Nivel de acuerdo con la afirmación [i]				
	5	4	3	2	1
El vídeo me ha ayudado a entender la parte procedimental de la práctica	25 (83%)	5 (17%)	-	-	-
El cuestionario me ha ayudado a entender la práctica	15 (50%)	10 (40%)	4 (7%)	1 (3%)	-
El vídeo me ha permitido preparar la práctica con menos tiempo de estudio	15 (50%)	10 (33%)	4 (13%)	1 (3%)	-
El vídeo me ha permitido trabajar más rápido	15 (50%)	14 (47%)	1 (3%)	-	-
El vídeo me ha ayudado a no equivocarme	17 (57%)	5 (16%)	8 (27%)	-	-
El cuestionario me ha ayudado a no cometer errores	15 (50%)	12 (40%)	2 (7%)	1 (3%)	-
El vídeo me ha permitido trabajar en el laboratorio de forma más segura	18 (60%)	8 (27%)	4 (13%)	-	-
En general, este tipo de vídeos mejoran la asignatura	25 (83%)	4 (13%)	-	1 (3%)	-
En general, este tipo de cuestionarios mejoran la asignatura	21 (70%)	9 (30%)	-	-	-

[i] 5: Muy de acuerdo. 4: Parcialmente de acuerdo. 3: Indiferente. 2: Parcialmente en desacuerdo. 1: Muy en desacuerdo.

Generalmente, en esta asignatura los estudiantes obtienen notas altas, difícilmente mejorables, y por ello, esta actividad complementaria no ha tenido su correspondiente reflejo en una mejora de las calificaciones (las medias de los últimos años no han sido significativamente distintas).

Con base en todos estos resultados, se puede afirmar que a través de la actividad de apoyo propuesta (vídeos previos a la sesión de prácticas más cuestionarios de aprendizaje) se ha transmitido una mayor comprensión de los procedimientos descritos en el guion y se ha logrado un mayor aprovechamiento del trabajo presencial que ha resultado ser especialmente beneficioso en los momentos iniciales de las sesiones, traduciéndose todo ello en una clara y evidente mejora del proceso de enseñanza-aprendizaje que facilita la consecución de los objetivos de aprendizaje de la asignatura.

4. PERSPECTIVAS DE MEJORA DE LA ACTIVIDAD

Con base en la valoración descrita, en los próximos cursos, vamos a implantar esta actividad como un recurso de apoyo a los guiones de prácticas, e intentar mejorarla para hacerla más eficiente.

En este sentido, para el curso siguiente, para algunas prácticas, en lugar de dividir la actividad en dos partes: visualización del vídeo y, separadamente, contestar el cuestionario, se elaborarán vídeos interactivos con el objetivo de integrar en un mismo soporte las dos partes de la actividad, haciéndola más dinámica.

En los vídeos interactivos, las preguntas se insertan en los puntos de la línea de tiempo que se consideran más adecuados. Al llegar a una pregunta el vídeo se detiene y el estudiante debe contestar para continuar la visualización. Si no sabe la respuesta, o ha contestado erróneamente, puede volver atrás.

Estos vídeos se pueden elaborar desde la misma plataforma Moodle. En la página de la asignatura, accedemos al banco de contenidos y añadimos un vídeo interactivo. Así, aparece una interfaz que permite subir el vídeo a modificar y añadirle las interacciones que se consideren oportunas, que en nuestro caso serán preguntas a contestar por los estudiantes. Una vez insertadas las interacciones, el nuevo vídeo se pone a disposición de los estudiantes en la página de la misma asignatura insertándolo como una actividad H5P.

5. CONCLUSIONES

La actividad pre-laboratorio llevada a cabo ha resultado ser un recurso útil para mejorar el ritmo de aprendizaje de los estudiantes y, también en gran medida, ha facilitado la labor docente de los profesores.

La actividad ha tenido una buena aceptación por parte de los estudiantes y entendemos que ha sido especialmente positiva para aquellos menos motivados. Como consecuencia de una mejor preparación de las prácticas con base en esta actividad pre-laboratorio, en las sesiones presenciales de laboratorio, han disminuido notablemente las consultas sobre aspectos de procedimiento y las observaciones a realizar por los profesores sobre hábitos de trabajo a mejorar.

Además, este tipo de materiales didácticos pueden ser de interés para los docentes más noveles y/o colaboradores que tengan que impartir la asignatura por primera vez.

Finalmente, como mejora de esta actividad cabe plantear la posibilidad de integrar las preguntas del cuestionario en los mismos vídeos, transformándolos en vídeos interactivos que aporten un mayor dinamismo al trabajo autónomo del estudiante.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Instituto de Investigación e Innovación Educativa (IRIE) de la *Universitat de les Illes Balears*, la subvención recibida para el proyecto titulado “El uso de vídeos en las clases prácticas de Experimentación en Química y su influencia en la adquisición de las competencias” (referencia del proyecto PID 122113).

REFERENCIAS

[1] L. Morales-Ramos, T. Guzmán-Flores. El vídeo como recurso didáctico para reforzar el conocimiento. Memorias del Encuentro Internacional de Educación a Distancia (2014). doi 10.13140/RG.2.1.3144.7521

[2] K.A.A. Gamage, D.I. Wijesuriya, S.Y. Ekanayake, A.E.W. Rennie, C.G. Lambert, N. Gunawardhana. Online Delivery of Teaching and Laboratory Practices: Continuity of University Programmes during COVID-19 Pandemic. Educ. Sci. 10 (2020) 291. doi.org/10.3390/educsci 10100291

[3] R.A. da Silva, F.C. G. C. de Vasconcelos. Learning through chemistry simulations: an analysis of cognitive skill levels. Educ. Inf. Technol. 27 (2022) 6967–6987. doi: 10.1007/s10639-022-10911-1

[4] M. C. Sáiz-Manzanares, M. A. Queiruga-Dios, R. Marticorena-Sánchez, M. C. Escolar-Llamazares, A. Arnaiz-González. Cuestionarios de e-autoevaluación y e-feedback: una aplicación en Moodle. Eur. J. Health. Research, 4 (2018) 135-148. doi: 10.30552/ ejhr.v4i3.116

[5] G. Philip. Optimal video length for student engagement. https://blog.edx.org/optimal-video-length-student-engagement (último acceso: 16 de marzo de 2023).

EVALUACIÓN ANALÍTICA DEL USO DE NANOESTRUCTURAS PARA MEJORAR EL TRANSPORTE Y LA INCORPORACIÓN CELULAR DE COMPUESTOS DE PLATINO.

Maria Montes Bayón, Lucia Gutierrez Romero, Daniel Turiel Fernández, Elisa Blanco González
Departamento de Química Física y Analítica. Facultad de Química. Universidad de Oviedo. C/Julian Clavería 8, 33006. Oviedo

Introducción

Aunque es cierto que el cisplatino es uno de los fármacos más utilizados para el tratamiento de numerosos tipos de canceres, entre los que se encuentran los de pecho, ovario, testículo o pulmones, entre otros, los mecanismos de resistencia que aparecen como consecuencia del tratamiento, así como sus efectos secundarios (p.e. nefrotoxicidad y ototoxicidad) hacen necesaria la mejora de la quimioterapia con cisplatino para aumentar su efectividad y su especificidad (1). En este sentido, parece que una de las posibilidades vendría asociada al empleo de nanotransportadores, es decir, estructuras nanométricas que transporten el fármaco de forma más efectiva y específica al tumor (2). En ciertas ocasiones se emplean estos nanotransportadores para transportar el cisplatino junto con otro fármaco, de modo que por efecto sinérgico se potencie el efecto antitumoral. Estas nanoestructuras se acumulan en los tumores o bien haciendo uso del efecto de retención y permeabilidad aumentada (EPR del inglés "enhanced permeability and retention") o bien de una administración controlada y específica empleando ligandos o anticuerpos unidos al nanotransportador, de manera que se pueda distinguir entre el tejido sano y el tumoral. Una ventaja adicional de los nanotransportadores es que, permiten en muchas ocasiones una liberación controlada del fármaco (3).

De entre los nanotransportadores más empleados para el transporte de cisplatino destacan, por un lado, aquellos que encapsulan o atrapan el fármaco en su interior como los liposomas. Los liposomas son estructuras esféricas creadas de forma artificial empleando colesterol o fosfolípidos, con la característica de no ser tóxicos. Estas estructuras presentan grandes ventajas a la hora de ser usadas como nanotransportadores ya que son capaces de mejorar la eficacia del cisplatino y por lo tanto su efecto terapéutico. El hecho de poder encapsular el cisplatino en su interior aumenta su estabilidad, mejora su biocompatibilidad, reduce los efectos tóxicos explicados anteriormente y permite una unión específica al tumor si se emplean ligandos en la superficie del liposoma. En nuestro grupo de investigación se ha investigado la posibilidad de encapsular el cisplatino en estructuras proteicas en lugar de fosfolípidos o empleando nanopartículas metálicas como soporte del pro-fármaco que luego se liberará en el citosol celular. En las siguientes secciones se resumirán los resultados obtenidos en cada una de estas investigaciones.

A) La ferritina humana como sistema de encapsulación de cisplatino. La ferritina es una proteína que se encuentra de forma natural en nuestro organismo cumpliendo la función de almacén de hierro y de detoxificación del mismo. Se trata de una proteína formada por 24 subunidades. Estas subunidades se pueden dividir en dos clases, las de tipo H o de tipo L, siendo éstas diferentes entre sí en su peso (pues las H son más pesadas que las de tipo L) y en su función (mientras las subunidades H tienen una función de oxidación frente al hierro, las subunidades L hacen posible la acumulación del hierro en el interior de la proteína). Las 24 subunidades se agrupan entre sí generando una estructura esférica de unos 12 nm con una cavidad interna de 8 nm, en donde el hierro se almacena de forma natural en forma nanopartículada, concretamente en forma de ferrihidrita (complejo de oxi-hidroxi-fosfato férrico), pudiendo almacenar hasta 4500 átomos de hierro en su interior.

La ferritina tiene la asombrosa propiedad de ser capaz de disociarse en las distintas subunidades que la componen cuando el pH del medio se cambia a valores drásticos, bien sean ácidos o básicos. Una vez disociada, estas subunidades son capaces de re-ensamblarse cuando se vuelve al pH inicial de la disolución, adquiriendo la estructura proteica inicial. Aprovechando este fenómeno se han empleado estrategias de encapsulación del cisplatino y oxaliplatino, o bien llevando la proteína inicialmente a pH ácidos o bien llevándola a pH básico, en presencia de una disolución del compuesto de platino de interés (Figura1).

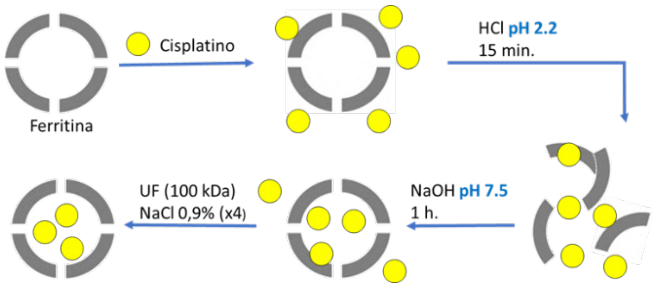


Figura 1. Esquema representativo del desensamblaje y re-ensamblaje de la ferritina en presencia de cisplatino.

Una vez re-ensamblada, la caracterización se llevó a cabo mediante estudios de cromatografía de exclusión por tamaños acoplada en línea al ICP-MS y a la detección UV-VIS donde, en todos los casos, se pudo observar un

pico mayoritario correspondiente al tiempo de retención del patrón de ferritina (aproximadamente 15,5 min) que mostraba absorción a 280 nm así como la presencia de Pt (Figura 2). Pudo observarse, además, la presencia de oligómeros de la proteína (eluyen a unos 10 minutos) que generan fácilmente a partir de la proteína monomérica durante el tratamiento. Igualmente, puesto que la proteína contiene además Fe en su interior en forma nanoparticulada, fue posible llevar a cabo medidas de Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) así como análisis elemental (EDX) del interior de la cápside proteica con los resultados que se muestran en la Figura 3 (a y b) respectivamente.

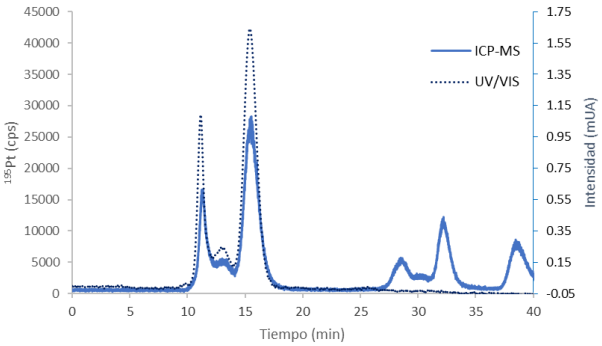


Figura 2. Cromatograma obtenido mediante SEC-UV/ICP-MS de la ferritina después de la incorporación de oxaliplatino en su interior. Los picos de Pt observados a mayores tiempos de retención corresponden al oxaliplatino remanente sin encapsular y a sus productos de hidrólisis.

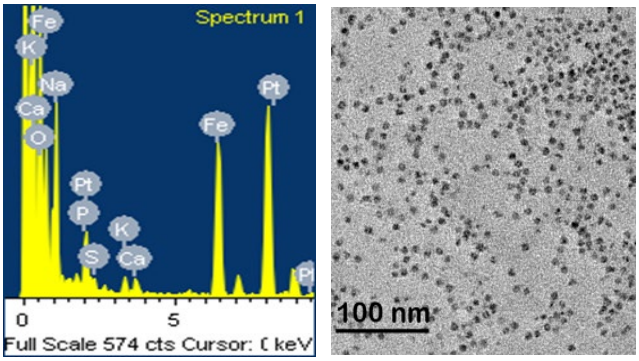


Figura 3. Resultados obtenidos de la proteína re-ensamblada mediante TEM donde se puede observar las nanopartículas esféricas de óxido de Fe (aproximadamente 8 nm) del interior de la misma, así como la presencia de Pt según el análisis elemental por rayos X.

La estequiometría del encapsulado fue estimada calculando mediante ICP-MS la concentración de platino en el pico correspondiente, así como la concentración de ferritina mediante UV/VIS. Así se obtuvieron resultados de una relación molar entre el cisplatino y la ferritina de 2:1, respectivamente y similar en caso de oxaliplatino. Estos resultados están en consonancia con los encontrados en la literatura en estudios similares (4).

Una vez observada la correcta encapsulación del cisplatino en el interior de la proteína se estudió la liberación del fármaco desde su interior. La eficacia de la ferritina como nanotransportador no solo se basa en la posibilidad de encapsular el fármaco sino también en su correcta incorporación al interior celular, la liberación del fármaco una vez incorporada al citosol de la célula y, finalmente, la unión del cisplatino con el ADN para generar los aductos correspondientes que induzcan daño celular. Por ello es preciso verificar la correcta liberación del fármaco mimetizando las condiciones del interior celular. La estrategia consistió en la realización de un estudio *in vitro* incubando la ferritina en cuyo interior se encuentra el cisplatino a diferentes valores de pH y a distintos tiempos. Los pH empleados para las incubaciones se escogieron para intentar imitar diferentes condiciones fisiológicas, así por ejemplo se estudió un pH= 5 para mimetizar el medio ácido de los endolisomas en los que la ferritina se encontrará tras su entrada al citosol celular, un pH= 8,2 que simula las condiciones del jugo pancreático, un pH= 6,5 típico del ambiente tumoral y, finalmente, un pH fisiológico de 7,4. Los resultados obtenidos revelaron una única tendencia a liberar el cisplatino con el tiempo cuando la ferritina se encuentra en el pH ligeramente ácido (pH 5,5). Para el resto de las incubaciones se observó un ligero aumento en el platino libre en las primeras horas, que vuelve a su valor inicial prácticamente al cabo de 48 h. Estos resultados muestran la elevada estabilidad de la ferritina para su empleo como nanotransportador, siendo especialmente importante su comportamiento a pH fisiológico y al pH de los endolisomas celulares ya que deja entrever que el cisplatino se mantendrá en el interior de la ferritina protegido de interacciones inespecíficas tras su administración por vía intravenosa hasta alcanzar e introducirse en las células, en donde el pH ligeramente ácido propiciará su liberación de la ferritina de forma controlada. Así se podría evitar uno de los problemas asociados al cisplatino, su interacción con proteínas del suero y su posterior inactivación.

Estudios posteriores abordaron el empleo de la ferritina encapsulada en células en cultivo. Para ello se estudió un cultivo celular de cáncer de ovario, el sexto más frecuente entre las mujeres con una cifra de nuevos casos anuales de 205.000 mujeres en todo el mundo y ocupando entre un 4 y un 5 % de los tumores femeninos, según la Asociación Española Contra el Cáncer. La línea celular empleada fue la línea de cáncer de ovario sensible al cisplatino A2780 y se trató con la misma concentración del fármaco libre y encapsulado a concentraciones de 1 y 3 µM. Los resultados obtenidos tras la medida de las células se muestran en la Figura 4.

En la Figura 4 se puede observar cómo empleando la misma concentración, el cisplatino en su forma encapsulada tiene una mayor capacidad de incorporación al citosol celular que el cisplatino en su forma libre en un factor de entre 4 y 9 veces.

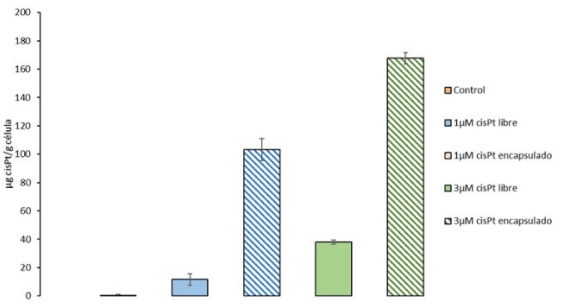


Figura 4. Resultados obtenidos de la incorporación celular de cisplatino en su forma libre y encapsulado en la ferritina a diferentes concentraciones.

Estos resultados concuerdan con el hecho de que los mecanismos de entrada del cisplatino libre son diferentes a los encontrados para el cisplatino en su forma encapsulada. Mientras que el primero presenta mecanismos de entrada mayoritariamente dependientes del receptor de membrana CTR1, el cisplatino encapsulado puede hacer uso de los mecanismos de entrada de la ferritina al citosol mediante receptores específicos de ferritina e incluso, algunas investigaciones apuntan a la posible incorporación vía el receptor de transferrina (TfR1), altamente expresado en células tumorales (5). Es un resultado realmente interesante que muestra como el hecho de encapsular el fármaco permite superar uno de los grandes obstáculos encontrados en el empleo del cisplatino en clínica utilizando la ferritina como caballo de Troya y puede contribuir a la mejora en el transporte intracelular de cisplatino (6).

B) Las nanopartículas de óxido de hierro ultrapequeñas para el transporte de cisplatino. Como se mencionó previamente, existe una gran variedad de nanotransportadores que pueden ser empleados para la mejora del tratamiento con agentes quimioterapéuticos, entre los cuales se encuentran los ya mencionados líposomas, nanoestructuras proteicas, polímeros o nanopartículas. Entre todos estos nanotransportadores las nanopartículas de hierro son una interesante opción por su elevada biocompatibilidad que les confiere unas propiedades muy ventajosas. Sin embargo, estas nanopartículas requieren el empleo de recubrimientos que permitan su estabilización y en algunas ocasiones su funcionalización. En este sentido, en estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación se puso a punto la síntesis y caracterización de nanopartículas de óxido de hierro de tamaño inferior a 10 nm recubiertas de ácido adípico y tartárico, ambos biocompatibles, y con un nucléo metálico que buscaba imitar la estructura de la ferritina (7, 8). Estas nanopartículas, actualmente en ensayo clínico fase III para el tratamiento por vía oral de la anemia mostraron gran estabilidad, así como una eficaz entrada en el citosol celular por endocitosis.

Por tanto, se abordó la posibilidad de emplear dichas nanopartículas como estructuras transportadoras, en este caso, de un fármaco precursor de cisplatino. Estos pro-fármacos están basados en complejos de Pt (IV) que en el interior celular presentan la capacidad de reducirse a Pt (II) con una estructura inicial tal que tras la reducción el compuesto generado sea el cisplatino. Concretamente se empleó el cis-diaminotetracloroplatino (IV), un compuesto similar al cisplatino con la salvedad de tener dos ligandos cloruro adicionales en posición axial que generan una estructura octaédrica en lugar de la plano-cuadrada propia del cisplatino (9). El hecho de emplear dos ligandos cloruros como ligandos adicionales radica en el potencial de reducción del complejo formado, que hace que su reducción intracelular sea mucho más rápida que en el caso del empleo de otros ligandos como acetatos o grupos hidróxidos. Esto es fundamental a la hora del diseño de un pro-fármaco pues éste debe ser "activado" en el interior celular al reducirse en presencia de moléculas tales como el glutatión o al ácido ascórbico, consiguiendo formar así cisplatino.

Una vez sintetizadas las nanopartículas de acuerdo a publicaciones anteriores (7), se conjugaron con el pro-fármaco y se caracterizaron empleando diferentes estrategias. Entre ellas, cabe destacar el empleo de la cromatogafía de líquidos en fase inversa modificada con la adición de tensoactivos (SDS)en la fase móvil, lo que permite una separación de nanopartículas en función de su tamaño y también del exceso de pro-fármaco libre (10). Los cromatogramas obtenidos se muestran en la Figura 5 donde se observa la coelución de Pt y Fe dentro del mismo pico cromatográfico. Además, en la Figura 6 se puede ver la imagen por TEM de las nanoparticulas en estudio y de su análisis elemental obtenida mediante EDX.

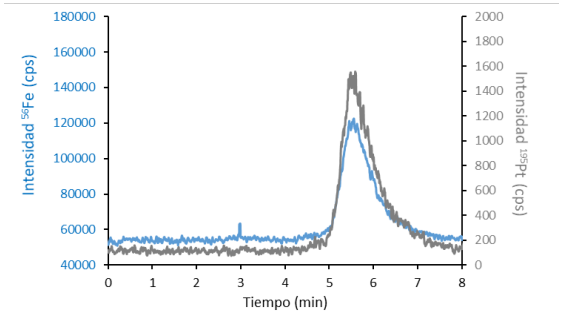


Figura 5. Cromatograma obtenido mediante HPLC-ICP-de las nanopartículas después de ser tratadas para inmovilizar el pro-fármaco sobre la superficie.

A continuación, se evaluó, la eficacia del pro-fármaco nanoestructurado sintetizado en modelos celulares de cáncer de ovario. Para ello, en este caso, a diferencia del anterior, se empleó la estrategia de cuantificación de célula individual con ICP-MS como sistema de detección (sc-ICP-MS). Dos células producidas a partir de la misma célula precursora durante la mitosis pueden mostrar diferencias en sus genomas, transcriptomas y proteomas después de varias divisiones.

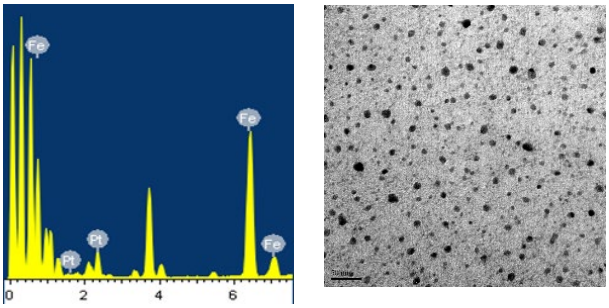


Figura 6. Resultados obtenidos de las nanopartículas mediante TEM donde se puede observar las nanopartículas esféricas de óxido de Fe de aproximadamente 6 nm así como la presencia de Pt en su superficie según el análisis elemental por rayos X.

Esta heterogeneidad puede ser la causa de diferentes enfermedades y se puede apreciar en muchos aspectos de la célula, como puede ser la susceptibilidad al tratamiento con diferentes fármacos. De todo lo anterior deriva el interés en los análisis de células individuales, en contraposición a las medidas globales o en "bulk". En estas últimas, se utilizan muestras celulares de un elevado número de células que se lisan o se digieren para seguidamente cuantificar el contenido de los analitos de interés mediante la técnica adecuada. El resultado de esta determinación se normaliza finalmente al contenido celular de partida utilizando parámetros como el número de células, peso seco o la concentración proteica, determinada previamente. Este tipo de análisis proporciona información del contenido medio de la especie química determinada en la muestra, asumiendo que todas las células de la muestra se comportan de manera homogénea. No obstante, la variabilidad existente entre las células individuales de una muestra implica una pérdida de información sobre la distribución de la especie química en la muestra pudiendo incluso ocultar la existencia de diferentes subpoblaciones en la misma. Mediante estrategias de sc-ICP-MS se puede además conocer la concentración intracelular de Pt llevando a cabo un calibrado del elemento inorgánico y realizando las transformaciones matemáticas correspondientes. Las condiciones para llevar a cabo estudios de sc-ICP-MS implican (11):

- El empleo de suspensiones celulares diluidas.
- El uso de sistemas de introducción de muestras que permiten elevada eficacia de transporte minimizando el riesgo de lisis de las células.
- La medida en el analizador de masas con alta resolución temporal (en los milisegundos o microsegundos).

El uso de patrones elementales líquidos para la cuantificación en células individuales implica la medida de un calibrado externo del elemento en las mismas condiciones experimentales que las células. Tras obtener la recta de calibrado, la masa del elemento en cada célula individual se puede obtener utilizando la ecuación [1]:

$$m_c = \frac{\eta \cdot F \cdot t \cdot I}{b} \qquad [1]$$

Donde m_c es la masa del elemento medido en la célula, η es la eficiencia de transporte del patrón inorgánico (diferente a la eficacia de transporte de las células), F es el flujo de introducción de muestra, t es el tiempo de integración, I es la intensidad del evento (a la que se le resta la intensidad del fondo para evitar cualquier contribución de especies disueltas del elemento en la muestra) y b es la pendiente de la curva de calibración obtenida. Por tanto, las células tratadas con el pro-fármaco libre y conjugado con las nanopartículas así como con cisplatino fueron cuantificadas mediante sc-ICP-MS. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 7 donde se observa de forma cuantitativa un aumento significativo de la incorporación al emplear las nanopartículas como nanotransportadores del pro-fármaco frente a la utilización directa del pro-fármaco o del cisplatino.

Concretamente los valores de platino por célula ascienden a 12 fg/ célula de media, frente a los 2 fg/célula que se obtienen en el caso del empleo del pro-fármaco libre. En otros estudios previos se observó que el propio cisplatino presenta valores de incorporación celular de 3 fg/célula, lo que indica una de las ventajas de este nanotransportador que favorece el aumento de la incorporación al citosol celular. Además, otra conclusión subyace de este resultado puesto que no solo se incorporará más pro-fármaco en las células, sino que se espera que muestre unos niveles de interacciones inespecíficas en el plasma mucho menores que el cisplatino (12).

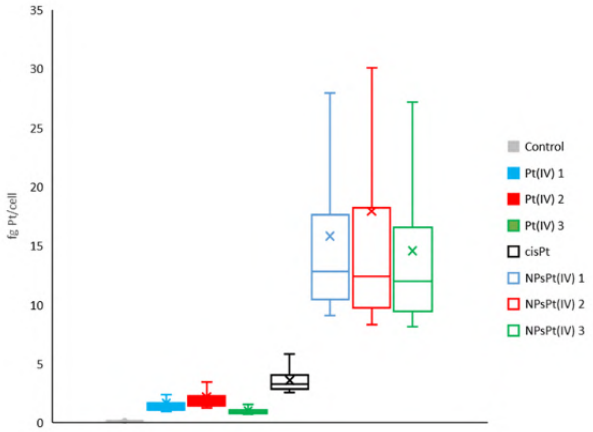


Figura 7. Resultados obtenidos mediante sc-ICP-MS de la incorporación del pro-fármaco de cisplatino (cajas sólidas), cisplatino (negra) y el pro-fármaco conjugado con nanopartículas de óxido de hierro ultrapequeñas (<10 nm). Cada color representa un experimento diferente y en cada caja se muestra la mediana y el recorrido intercuartílico de los datos obtenidos.

CONCLUSIONES

El desarrollo de metodologías analíticas que permitan estudiar los productos de síntesis, así como caracterizar su evolución en medios biológicos es imprescindible en un contexto cada vez más multidisciplinar de la investigación y en particular, en campos como la bio(nano)medicina. El presente resumen muestra que, por un lado, metodologías bien establecidas (como las cromatografías empleando fases estacionarias convencionales) pueden tener una nueva dimensión de aplicabilidad en el campo de los nanomateriales. Paralelamente, la puesta a punto de nuevas estrategias de medida adaptadas a la necesidad creciente de obtener información celular individualizada es imprescindible para contribuir al desarrollo de las terapias personalizadas. Estos ejemplos ponen de manifiesto que desde la química analítica hay muchas aportaciones posibles para la resolución de problemas multidisciplinares donde nuestro conocimiento resulta indispensable.

REFERENCIAS

(1) Song M., Cui M., Liu K., *"Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer"* Eur. J. Med. Chem., 2022, 232,114205.

(2) Farooq M., Aquib M., Farooq A., Khan D., Maviah M., Filli M., Kesse S., Boakye-Yiadom K., Mavlyanova R., Parveen A., Wang B. *"Recent progress in nanotechnology-based novel drug delivery systems in designing of cisplatin for cancer therapy: an overview"* Artif. Cells Nanomed. Biochenol., 2019, 47, 1674-1692.

(3) Huda S., Aftab Alam M., Kumar Sharma P.*"Smart nanocarriers-based drug delivery for cancer therapy: An innovative and developing strategy"* JDDST, 2020, 60, 102018.

(4) Yang Z.,Wang X., Diao H., Zhan J., Li H., Sun. H, Guo H. *"Encapsulation of platinum anticancer drugs by apoferritin".* Chem. Com.., 2007, 33 3453-3455.

(5) Calzolari A., Oliviero I. Deaglio S. *"Transferrin receptor 2 is frequently expressed in human cancer cell lines*" Blood Cells Mol. Dis., 2007, 39, 82-91.

6. Turiel Fernández D., Corte-Rodríguez, M., Blanco-González, E., Bettmer, J., Montes-Bayón, M. "*Analytical strategies to study the formation and drug delivery capabilities of ferritin-encapsulated cisplatin in sensitive and resistant cell models".* Anal. Bioanal. Chem., 2020, 412, 6319-6327.

(7). García Fernandez, J., Sanchez-Gonzalez, C., Bettmer, J., Llopis, J., Jakubowski, N., Panne, U. and Montes-Bayon, M. *"Quantitative assessment of the metabolic products of iron oxide nanoparticles to be used as iron supplements in cell cultures"* Anal. Chim. Acta, 2018, 139, 24-30.

(8). Garcia-Fernandez, J., Turiel, D., Bettmer, J., Jakubowski, N., Panne, U., Rivas García, L., Llopis, J., Sánchez González, C., Montes-Bayón, M. "*In vitro and in situ experiments to evaluate the biodistribution and cellular toxicity of ultrasmall iron oxide nanoparticles potentially used as oral iron supplements*", Nanotoxicology, 2020, 14, 388-403.

(9). Shi Y., Liu S., Kerwood D., Goodisman J., Dadrowiak J., *"Pt (IV) complexes as prodrugs for cisplatin"* J. Inor. Biochem., 2012, 107, 6-14.

(10). Montes-Bayón M. and Bettmer J. *"The use of high performance liquid chromatography—Inductively coupled plasma-mass spectrometry in the analysis of inorganic nanomaterials".* Comprehensive Analytical Chemistry. Analysis and Characterization of metal based nanomaterials. Eds. Wilson & Wilson´s, 2021.

(11). Corte-Rodríguez, M., Álvarez-Fernández García, R., Garcia Cancela, P., Bettmer, J., Montes-Bayón, M. *"Single Cell ICP-MS using on-line sample Introduction systems: current developments and remaining challenges".* TRAC, 2020, 132, 116042.

(12). Turiel-Fernández D., Gutiérrez-Romero L., Corte-Rodríguez M., Bettmer J. and Montes-Bayón M. *"Ultrasmall iron oxide nanoparticles cisplatin (IV) prodrug nanoconjugates: ICP-MS based strategies to evaluate the formation and drug delivery capabilities in single cells".* Anal. Chim. Acta, 2021, 1159, 338356.

PRIMER USO DE UN MATERIAL MESOPOROSO EN UN MÉTODO MULTIRRESIDUO PARA PRECONCENTRAR 218 PESTICIDAS EN AGUAS. CORRECCIÓN DEL EFECTO MATRIZ Y DE LAS PÉRDIDAS QUE TIENEN LUGAR EN EL PROCESO DE PRECONCENTRACIÓN

M. Martínez Galera[a], M.D. Gil García[a,b]

[a] Departamento de Química y Física, Campus Agroalimentario de Excelencia Internacional (CeiA3). Universidad de Almería 04120 Almería.

[b] Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Residuos de Pesticidas en Frutas y Hortalizas, 04120 Almería.

RESUMEN

Se utilizó un material mesoporoso (MSU-1), preparado en el laboratorio, como sorbente en fase sólida para preconcentrar 218 pesticidas multiclase en aguas ambientales. Los pesticidas presentes en los extractos de las muestras se determinaron mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem. El ion más intenso se seleccionó como ion precursor. Tras la fragmentación en la cámara de colisión, se utilizó la transición más intensa (SRM1) para la cuantificación y tres puntos para la identificación y confirmación, tal como establece la Directiva 96/23/CE. Se realizó un estudio exhaustivo de las principales variables que afectan a la sorción/desorción de los pesticidas en el MSU-1 utilizando metodologías paso a paso (disolvente de elución, pH de la muestra y contenido en sales) y de superficie multi-respuesta (cantidad de sorbente, volumen de agua y volumen del disolvente de elución), siendo los valores óptimos sin adición de NaCl, 100 mg de sorbente MSU-1, 50 mL de muestra de agua a pH=6.0 y elución de los pesticidas con 5 mL de acetonitrilo. El efecto matriz se comprobó comparando las pendientes de las gráficas de calibración construidas en disolvente y en extracto blanco de matriz. El 80% de los pesticidas mostraron un efecto matriz bajo y el 20% mostraron un efecto matriz medio o alto. Se probaron dos estrategias de calibración para corregir el efecto matriz añadiendo los patrones de los pesticidas antes o después de la etapa de preconcentración. La primera estrategia corregía los errores sistemáticos debidos a la baja adsorción de los pesticidas en el MSU-1 así como el efecto matriz. El método se validó utilizando blancos de agua subterránea fortificados con 0,1, 0,25 y 0,5 µg/L de todos los pesticidas. Se obtuvieron recuperaciones comprendidas entre 54 y 130% (DER≤20%) para la mayoría de los pesticidas (90%), mientras que se obtuvieron recuperaciones ≥130% para 22, 10 y 5 pesticidas a 0,1, 0,25 µg/L y 0,5 µg/L, respectivamente. Se realizó un estudio de seguimiento de trece muestras de aguas subterráneas recogidas en Almería (sur de España) aplicando la metodología propuesta, encontrando 38 plaguicidas diferentes en las muestras analizadas. Sin embargo, la mayoría de ellos se encontraron en concentraciones inferiores a 0,1 µg/L, siendo imidacloprid, hexaflumuron y oxadixyl los más frecuentemente detectados en 7, 6 y 5 muestras, respectivamente. Sólo en 5 muestras, methiocarb (tres muestras), pyrethrin I y pyrethrin II (una muestra) y hexaflumuron (una muestra) se encontraron a niveles superiores a 0,1 µg/L. El perfil ecológico del método se evaluó utilizando el National Environmental Methods Index (NEMI) y Analytical Eco-scale (AES).

Palabras claves: Material mesoporoso, MSU-1; Pesticidas multiclase; UPLC-MS/MS; Adición de patrón; Efecto matriz

1. Introduccion

Para evitar pérdidas económicas e incrementar la actividad agrícola, en el control de plagas en la agricultura intensiva se llevan a cabo tratamientos de los cultivos con diferentes pesticidas [1]. Los pesticidas afectan a los organismos objetivo y a la totalidad del medioambiente, contaminando el ecosistema [2]. Los pesticidas ejercen efectos adversos sobre los ecosistemas y son considerados altamente tóxicos porque persisten en el medioambiente y se acumulan en los organismos [2]. Muchos pesticidas no son biodegradables y no pueden ser eliminados en las plantas de tratamiento de aguas residuales (WWTPs), de tal manera que entran como contaminantes en las aguas medioambientales. Además, los pesticidas pueden evaporarse, filtrarse a través del suelo o fluir hacia los ríos y pueden ser transportados a grandes distancias, impactando el medioambiente en regiones distantes [2]. Por eso, su presencia y efectos adversos sobre organismos no objetivo en diferentes compartimentos medioambientales son de gran preocupación y han sido estudiados en profundidad. Así, estas cuestiones han sido ampliamente revisadas [2,3]. Los datos publicados por la Comisión Europea en 2019 [4] mostraron 1331 tipos de pesticidas, entre los cuales 463 estaban aprobados, 667 no aprobados y 48 se encontraban bajo revisión por la Unión Europea (UE). En consecuencia, es posible usar muchos pesticidas con diferentes mecanismos de acción y efectos adversos y son necesarias estrategias analíticas para su determinación, principalmente en aguas medioambientales.

A tal fin, se han propuestos muchos métodos multirresiduo para mejorar la sensibilidad y selectividad de los existentes, eliminando especies interferentes presentes en la matriz de la muestra y

mejorando la preconcentración [5-9].

En un método multirresiduo, el tratamiento de la muestra es la primera etapa, que normalmente es la más tediosa y la que consume más tiempo. Sin embargo, a pesar de los avances conseguidos en las técnicas de separación y detección, el tratamiento de la muestra es crítico para conseguir resultados fiables. Se han desarrollado numerosas estrategias de preconcentración para aislar y concentrar analitos [10]. Por ejemplo, M.A. Farajzadeh y col. desarrollaron diferentes procedimientos de extracción que implicaban la microextracción en fase sólida dispersiva basada en la formación de eutécticos más ligeros que el agua[11], así como un método de extracción basado en el uso de nanopartículas de carbon amorfo preparadas por ellos y usadas para la extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) acoplada a microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [12] y un método de extracción sólido-líquido dispersivo (DSPE) usando polímeros orgánicos seguida de la elución con disolventes eutécticos [13]. Estos métodos se aplicaron a la extracción de pesticidas de muestras de jugo de frutas y leche, con recuperaciones próximas al 100%. La extracción en fase sólida (SPE) es uno de los métodos de extracción más ampliamente utilizados en el tratamiento de muestras medioambientales [14-16], siendo más versátiles aquellos que utilizan Oasis HLB. Este sorbente ha sido desarrollado para extraer un amplio rango de analitos debido a su equilibrio hidrofílico-lipofílico único [14,16]. Además, se han utilizado los sorbentes poliméricos de intercambio iónico en modo mixto, diseñados para extraer selectivamente analitos con propiedades ácidas o básicas débiles [15]. Aparte de los sorbentes mencionados, un gran número de nuevos sorbentes están siendo estudiados en estrategias de extracción y limpieza, incluyendo los materiales mesoporosos. Estos sorbentes combinan una superficie uniformemente ordenada, elevado volumen de poro, elevada área superficial, tamaño de poro bien definido, composición de las paredes controlable y canales moporosos y propiedades superficiales modificables [17,18]. Estos materiales se han utilizado con éxito en la preparación de muestras de alimentos para determinar xenobióticos [18], pero han sido escasamente aplicados al tratamiento de muestras para la determinación de pesticidas. Además, el número de pesticidas preconcentrados utilizando estos sorbentes es bajo, estando comprendido entre 2 y 13 [19-28]

Este trabajo trata del uso de un material mesoporoso tipo MSU-1 para preconcentrar 218 pesticidas en aguas subterráneas y superficiales y su determinación por cromatografía líquida de ultra-alta resolución y espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS). Para corregir el error sistemático debido a la preconcentración con SPE y el efecto matriz, se aplicó la metodología de la adición de patrón para cuantificar los pesticidas. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que ambos errores pueden corregirse usando la adición de patrón antes de la preconcentración mediante SPE.

2. Experimental

2.1. Compuestos químicos y reactivos

Todos los patrones analíticos (pureza>98%) de los 218 pesticidas (**Tabla S1**, ver ESM) y patrones internos marcados isotópicamente (SIL) (carbendazim-d3, dichlorvos-d6, anthraquinone-d8 and malathion-d10) se compraron en LGC (Teddington, UK), Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) y Riedel de Häen (Seelze, Germany).

Las disoluciones madre de los pesticidas individuales con concentraciones entre 900 y 1200 mg/L se prepararon en acetonitrilo y se almacenaron, protegidas de la luz, a -20°C, siendo estables durante al menos tres meses; las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución de estas, en acetonitrilo:agua ultrapura (20:80, v/v).

Los disolventes orgánicos de grado LC (metanol, acetonitrilo, diclorometano, acetato de etilo, n-hexano y ácido fórmico) se compraron en Fluka Analytical (Steinheim, Germany) y el agua ultrapura de grado LC se compró en Fisher Chemical (Waltham, Ma, USA).

El surfactante Brij® S100 (Polioxietileno (100) estearil éter) y tetraetil ortosilicato (TEOS) se compraron en Sigma-Aldrich. Para preparar los cartuchos SPE se utilizaron jeringas de polipropileno (3 mL) y sus correpondientes frits de polietileno proporcionados por Supelco (España).

2.2. Procedimiento UPLC-MS/MS

Para analizar los pesticidas en muestras de agua se utilizó un UPLC 1290 acoplado a un Triple Quadrupolo (QqQ) 6490 de Agilent Technologies (USA). La separación cromatográfica se realizó en una columna Zorbax Eclipse Plus C8 (1.8 µm × 2.1 mm × 100 mm) de Agilent, mantenida 35°C en un horno. Para el control instrumental y el análisis de datos se utilizó un software Agilent MassHunter QQQ Acquisition and Quantification Analysis B.07.00 provisto de un software Dynamic MRM con una ventana de tiempo de retención de 0.8 min.

El volumen de muestra inyectada fue 5 µL, y todos los pesticidas se separaron en 15 min usando un programa de gradiente binario de fase móvil a un flujo constante de 0.3 mL/min. Después de cada inyección se lavó la columna analítica con un 100% de disolvente B durante 3 min.

El Sistema UPLC-MS incluía una fuente de ionización mediante electrospray (ESI), configurada como sigue: gas de secado a 120°C y 13 L/min, gas super-calentado a 375°C y 10 L/min, y una presión en el nebulizador de 45 psi. Como gas de nebulización y gas de colisión se utilizó N_2 de alta pureza.

El QqQ-MS/MS trabajaba en modo MRM, usando

ionización positiva (PI) and negativa (NI), dependiendo del pesticia. El voltaje de fragmentación fue 400 V y el voltaje del capilar fue 3000 V.

La optimización de la señal MS de cada pesticida (rango de masas de 50–800 m/z) se realizó utilizando disoluciones patrón individuales de cada uno (100 ng/mL en metanol:agua ultrapura 1:1, v/v). Como ion precursor para cada analito se seleccionó el más intenso en Q1 y, después, se seleccionaron las energías de colisión óptimas para las dos transiciones más intensas de cada analito seleccionando el modo ion producto en Q3, siendo la transición más intensa el ion de cuantificación (SRM1) y la menos intensa el ion de confirmación (SRM2).

2.3. Síntesis del sorbente MSU-1, caracterización y estabilidad

El material mesoporoso MSU-1 se sintetizó usando TEOS como precursor de la sílice y el surfactacte no iónico Brij® S100 en medio ácido (1 M HCl) con interacciones por puentes de H [23].

Para caracterizar el material mesoporoso se utilizaron difracción de rayos X de polvo (XRD), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía electrónica de transmisión (TEM) e isotermas de adsorción-desorción de N_2, como en un trabajo previo [23].

El punto isoeléctrico (pI) se midió en un Zeta-meter MALVERN (Mod. Nano-ZS), utilizando 50 mg de muestra sólida y 5mL de 0.1M LiCl en 500 mL de agua ultrapura. El pH de la dispersión se ajustó con HCl 1 M entre pH 5.6 y 2.0.

La estabilidad del sorbente MSU-1 se estudió durante 3 meses y fue satisfactoria.

2.4. Procemiento SPE

Para la preconcentración de los pesticidas en muestras de agua, se prepararon en el laboratorio cartuchos conteniendo el sorbente MSU-1 empacando 100 mg de material mesoposoporoso (previamente activado a 120°C durante 2 h) en una jeringa de 3 mL, entre dos frits de polietileno para conseguir la compactación del material, así como evitar su pérdida durante el proceso de preconcentración.

La preconcentración SPE semiautomática de los pesticidas en muestras de agua se realizó en un dispositivo de extracción de Waters (USA) conectado a una bomba de vacío Büchi Vac V-500 (Flawil, Switzerland), de tal manera que fue possible preconcentrar 12 muestras simultáneamente.

La SPE implicó las siguientes etapas:

(i) Acondicionamiento del sorbente con 5 mL de agua ultrapura

(ii) Carga de la muestra pasando 50 mL de muestra de agua ajustada a pH=6.0±0.1 a través del cartucho a un flujo de aproximadamente 5 mL/min.

(iii) Secado del sorbente sólido pasando, a través de él, aire durante 5 min seguido por N_2 durante otros 5 min.

(iv) Elución de los compuestos retenidos con 5 mL de acetonitrilo

(v) Eliminación del acetonitrilo con un flujo ligero de N_2

(vi) Redisolución del extracto en 0.5 mL de acetonitrilo:agua ultrapura (20:80, v/v) para ser inyectado en el sistema UPLC-MS/MS

2.5. Muestras de agua medioambiental

La validación del método se realizó utilizando dos muestras de agua de pozos próximos a invernaderos (muestras 1 y 2) y dos muestras de agua de río (muestras 3 y 4), todos ellos situados en Almería (sur de España). Además, se tomaron aleatoriamente trece muestras de agua subterránea en las proximidades del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar, un área costera protegida en la esquina sur de España, pero rodeada de invernaderos, donde el agua subterránea se utiliza para riego.

Las muestras de agua se tomaron en botellas de plástico y se filtraron en el laboratorio a través de membranas de celulosa de 25 µm. Finalmente, se almacenaron a 4 °C durante no más de dos días.

3. Resultados y discusion

3.1. Método UPLC-MS/MS

Se puso a punto un método UPLC-MS/MS para determinar 218 pesticidas en aguas medioambientales, basado en un método previamente optimizado para la determinación de 13 pesticidas [23]. La fase móvil consistió en un disolvente A: ácido fórmico al 0.1% y metanol al 2% en agua ultrapura y disolvente B: ácido fórmico al 0.1%, formiato amónico 5 mM y agua ultrapura con un 5% de metanol. El programa de elución comenzó con un gradiente lineal de 100% a 80% de disolvente A en 2 min, después un gradiente lineal hasta 100% de B en 15 min, y, finalmente, 2 min más con un 100% de B para lavar el sistema. El flujo fue constante e igual a 0.3 mL/min y el volumen de muestra inyectada fue 5 µL.

Para el análisis MS/MS, se optimizó la fuente ESI para cada pesticida, operando en modo PI o NI y registrando los iones en modo full-scan (rango de masas de 50–800 m/z). El ion más intenso se seleccionó como ión precursor y, después de la fragmentación en la cámara de colisión, los dos iones producto más abundantes se seleccionaron siguiendo la Guía Eurachem [29]. Para la cuantificación de cada uno de los pesticidas se utilizó la transición más intensa (SRM1) y para su identificación y confirmación se usaron tres puntos, como establece la Directiva 96/23/CE [30]. La **Fig. S1** (ver ESM) muestra el cromatograma de iones totales (TIC) de una disolución patrón de los analitos a un nivel de concentración de 10 µg/L (correspondiente a 0.1 µg/L en las muestras de agua).

3.2. Punto isoeléctrico y estructura superficial del MSU-1

La superficie del material MSU-1 está recubierta de

grupos silanol (-SiOH), que en agua pura están disociados según las siguientes reacciones [31]:

$SiOH + OH^- \leftrightarrow Si\text{-}O^- + H_2O$

$SiOH + H^+ \leftrightarrow Si\text{-}OH_2^+ + H_2O$

Por tanto, la superficie del MSU-1 puede estar cargada negativamente en suspensión acuosa a pH básico y cargada positivamente a pH ácido [31]. El comportamiento de las suspensions de sílice [32] depende del pI del material MSU-1. En este estudio, el pI del MSU-1 fue ~3.8. Por lo tanto, a valores de pH inferiores al pI la superficie del MSU-1 estará cargada positivamente y a valores de pH superiores al pI, el material MSU-1 estará cargado negativamente. Además, como la exposición prolongada de la mesosilica a disoluciones alcalinas causa pérdida de uniformidad de los poros, así como una disminución significativa del tamaño de poro [6], la retención de los pesticidas en el sorbente MSU-1 se estudió entre pH 3 y 8.

3.3. Optimización de la SPE

A fin de establecer las mejores condiciones para la adsorción/desorción de los pesticidas objetivo en el sorbente MSU-1, se llevó a cabo la optimización de los principales parámetros que afectan al procedimiento de SPE (disolvente de elución, pH de la muestra, fuerza iónica, cantidad de sorbente y volumen de elución) usando muestras de agua ultrapura fortificadas con 0.1 µg/L de cada pesticida.

3.3.1. Disolvente de elución

En primer lugar, se seleccionó el disolvente o mezcla de disolventes para eluir completamente los analitos retenidos en el MSU-1. La elección del disolvente de elución depende de la cantidad y el tipo de sorbente y de las propiedades físicoquímicas de los analitos. En este sentido, los disolventes polares (por ejemplo acetonitrilo o metanol) consiguen la elución de los analitos polares mientras que los disolventes no polares (por ejemplo hexano) son recomendados para los analitos no polares. Debido a la diferente polaridad de los pesticidas objeto de estudio (pKow entre -0.81 y 8.1), la desorción de los pesticidas retenidos en el MSU-1 se estudió con cinco disolventes orgánicos que cubrían un amplio rango de polaridad (metanol, acetonitrilo, acetato de etilo, diclorometano y hexano).

Se pasaron 10 mL de agua ultrapura (conteniendo 0.1 µg/L de cada uno de los pesticidas) a través de cartuchos de SPE empacados con 25 mg de MSU-1 a un flujo de unos 5 mL/min. Después de secar el sorbente (5 min aire y 5 min N_2) para eliminar el agua residual, los pesticidas retenidos fueron eluídos con 3 mL de cada uno de los disolventes orgánicos. Finalmente, el extracto se evaporó a sequedad bajo una débil corriente de N_2 y el residuo se disolvió en 0.5 mL de acetonitrilo:agua ultrapura (20:80,v/v) para ser inyectado en el sistema UPLC-MS/MS.

La **Fig. 1(a)** muestra las recuperaciones obtenidas en este estudio. Puede observarse que el diclorometano fue capaz de eluir la mayor parte de los pesticidas (201 pesticidas). Sin embargo, para más del 50% de ellos, las recuperaciones fueron excesivamente altas (>130%), mientras que el hexano eluyó menos del 25% de ellos (52 pesticidas con recuperaciones ≤ 50%). Para el resto de los disolventes estudiados (metanol, acetonitrilo y acetato de etilo) se obtuvieron recuperaciones similares, siendo acetonitrilo el disolvente más adecuado para la desorción (rango de recuperaciones 50-130%) para más del 60% de los pesticidas.

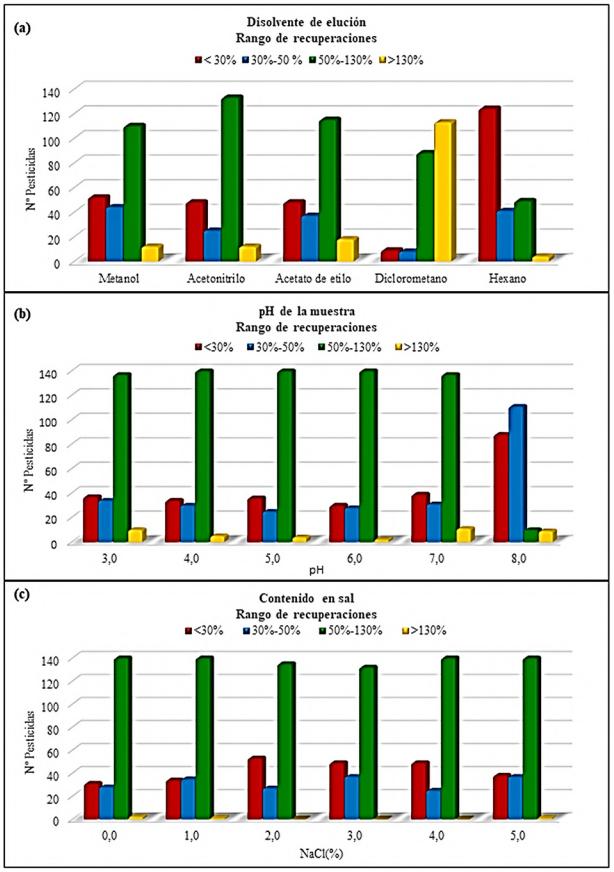


***Fig. 1**. Recuperaciones para los pesticidas, obtenidas en la optimización de: (a) disolvente de elución, (b) pH de la muestra y (c) contenido en sal*

La **Fig. 2** muestra las recuperaciones obtenidas para los pesticidas frente a su polaridad (pKow) para algunos de los disolventes de elución estudiados. En general, los pesticidas polares (pKow<4) eluían completamente con acetonitrilo, mientras que para los pesticidas menos polares (pKow>4) el mejor disolvente de elución fue hexano. Puede observarse que las mejores recuperaciones (próximas al 100%) se obtuvieron utilizando acetonitrilo como disolvente de elución. En consecuencia, el resto de los experimentos se llevaron a cabo usando acetonitrilo como disolvente para la elución de los pesticidas retenidos en el sorbente MSU-1.

Debido a que se encontró que, para algunos pesticidas, las recuperaciones y la polaridad no estaban correlacionadas, deben tenerse en cuenta otros aspectos tales como la solubilidad en agua y las caracteristicas ácido-base de los mismos. Utilizando un disolvente orgánico polar o moderadamente polar,

las recuperaciones para oxasulfuron, uno de los pesticidas más polares (pKow -0.81) fueron buenas. Por el contrario, las recuperaciones fueron <30% para nitenpyram (pKow -0,66) en todos los disolventes orgánicos. Este comportamiento puede explicarse debido a la elevada solubilidad en agua de nitenpyram (590 g/L) [33].

3.3.2. pH de la muestra y contenido en sales

El pH y el contenido en sales de la muestra de agua puede afectar las interacciones entre los analitos y el material mesoporoso [23,34-36].

El pH del agua afecta a la forma de los analitos con propiedades ácido-base y a la carga superficial del sorbente MSU-1. Así, el pH de la muestra de agua determina si los analitos se encuentran en su forma iónica o molecular. Estudios previos mostraron que el pH de la muestra juega un papel importante en la retención de los pesticidas en el sorbente mesoporoso [23,35], principalmente los que presentan propiedades ácido-base. En este trabajo, algunos de los pesticidas presentan propiedades ácidas o básicas con pKa comprendidos entre 0 y 13.1 (**Tabla S1** ver ESM), por lo que se optimizó el pH de la muestra de agua.

El pH de las muestras de agua ultrapura, fortificadas con todos los pesticidas (0.1 µg/L), se ajustó entre 3.0 y 8.0 y se preconcentraron 50 mL de cada una de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente, usando 3 mL de acetonitrilo en la etapa de elución. El rango de pH se seleccionó de acuerdo con el pI y con el hecho de que a valores de pH superiores a 8,5, el material experimenta descomposición [37,38].

La **Fig. 1(b)** muestra los resultados obtenidos para los pesticidas extraídos frente al pH de la muestra de agua. Puede observarse que se obtuvieron recuperaciones similares para la mayoría de los pesticidas entre pH 3 y 7, pero cuando el pH de la muestra se ajustó a 8, las recuperaciones disminuyeron y fueron inferiores al 50% para un 92% de los pesticidas. Este comportamiento puede explicarse porque en condiciones básicas el MSU-1 no es adecuado para la retención o porque algunos pesticidas sufren degradación a ese pH.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el pH de las muestras de agua se ajustó a 6.0 para los siguientes experimentos.

Por otra parte, el contenido en sales del agua puede afectar a la retención de los analitos, aumentando o disminuyendo la eficacia de la extracción en el sorbente SPE. En este estudio, se añadió NaCl sólido, entre un 0 y un 5%, a las muestras de agua ultrapura fortificadas con todos los pesticidas (0.1 µg/L de cada uno), previamente ajustadas a pH=6.0. De acuerdo con el procedimiento de SPE, se preconcentraron alícuotas de 50 mL de agua con 50 mg de MSU-1.

Los resultados obtenidos (**Fig. 1(c)**) mostraron que un incremento en el contenido en sales en la muestra de agua no afectaba significativamente la extracción de la mayoría de los pesticidas. Además, el alto contenido de sal en el agua mejoró la retención de algunos pesticidas (los más polares y los muy solubles en agua). Por ejemplo, dicrotophos (pKow = 0.5 y una solubilidad en agua de 1000 g/L) incrementó la recuperación de un 8 a un 41% cuando la muestra de agua contenía un 1% de NaCl, y la recuperación permaneció constante incluso para un 5% de NaCl. Sin embargo, para los pesticidas no polares y menos solubles en agua, las sales presentes en el agua afectaron negativamente a su retención en el sorbente MSU-1. Ejemplos de este último comportamiento son pyridalyl (pKow = 8), tebufenpyrad (pKow = 4.9) y teflubenzuron (pKow = 4.3), cuyas recuperaciones eran próximas al 80% en agua ultrapura, pero cuando el contenido en sal aumentó hasta el 2% o superior, sus recuperaciones disminuyeron por debajo del 50%. Para el resto de los pesticidas (los de polaridad intermedia) su retención en el sorbente MSU-1 no se vio afectada por el contenido en sales.

El incremento en las recuperaciones para los pesticidas muy polares en aguas con elevado contenido en sales fue observado por E. Turiel y col. [39] para una de las dos triazinas estudiadas (altamente polares) (de-ethylatrazine), justificándolo mediante el efecto "salting-out". En otro trabajo, H. Lord y col. [40] también usaron este enfoque para justificar el incremento en la recuperación de los analitos. De acuerdo con estos autores, el efecto "salting-out" conlleva la formación de esferas de hidratación alrededor de las moléculas iónicas de la sal, de tal manera que este proceso de hidratación, que implica a moléculas de agua, disminuye la concentración del agua disponible para disolver las moléculas de analito. Sin embargo, este hecho puede afectar negativamente la retención de los analitos solubles en agua con valores elevados de pKow [40]. Por otra parte, aunque la presencia de sales en las muestras de agua mejora la retención de los pesticidas polares, también puede conducir a una mejora o una disminución de las señales en MS, conocidas como "efecto matriz", causando errores en la cuantificación en las muestras reales.

Teniendo en cuenta que las aguas naturales tienen concentraciones variables de sales y el comportamiento descrito anteriormente, no se adicionó NaCl a las muestras. Por eso se estudiaron otras estrategias adicionales para mejorar la retención de los pesticidas polares.

3.3.3. Otros factores que afectan a la SPE

Para mejorar la retención, principalmente de los pesticidas polares, deben optimizarse otros factores que afectan a la etapa de SPE, tales como la cantidad de sorbente MSU-1 en el cartucho, ya que el aumento en la cantidad de sorbente puede causar dos efectos opuestos.

Cuando se incrementa la cantidad de sorbente en el cartucho de SPE, su capacidad de retención aumenta y no tienen lugar pérdidas de los pesticidas más polares durante el proceso de preconcentración de la muestra

de agua. Sin embargo, los pesticidas más apolares son fuertemente retenidos y se necesita un mayor volumen de disolvente orgánico para su desorción completa durante la etapa de elución. Por eso, ambos factores (cantidad de sorbente y volumen de elución) están relacionados y deben optimizarse simultáneamente.

Además, la sensibilidad del procedimiento de SPE depende del factor de preconcentración. Así, si la cantidad de sorbente aumenta, es posible preconcentrar un mayor volumen de agua, el factor de preconcentración es mayor y menores cantidades de pesticidas pueden detectarse en el agua. Por el contrario, si el volumen de agua preconcentrada aumenta pueden ocurrir pérdidas de los pesticidas más polares en el proceso de preconcentración, un efecto conocido como "breakthrough" o "rotura". Como puede observarse, la cantidad de sorbente y el volumen de muestra también están relacionados.

Por eso, debe utilizarse un diseño experimental para optimizar simultáneamente los tres factores.

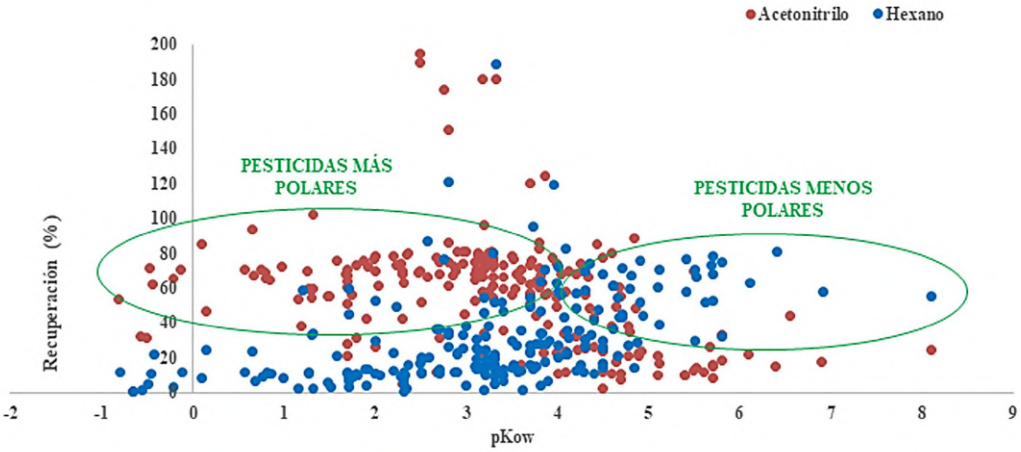


Fig. 2. *Relación entre las recuperaciones y la polaridad de los pesticidas utilizando acetonitrilo y hexano como disolventes de elución*

3.2.3.1. Metodología de la superficie de respuesta

La metodología de la superficie de respuesta (RSM) se aplicó para optimizar tres de los factores que afectan a la absorción y desorción de los pesticidas en el sorbente MSU-1. Se utilizó el diseño experimental de Box-Behnken (BBD) para tres factores y tres niveles, incluyendo tres réplicas para el valor central. La **Tabla S2** (ver ESM) muestra los valores de los tres factores a los tres niveles seleccionados en los quince experimentos. De acuerdo con estudios previos, se seleccionaron los siguientes niveles para los factores: cantidad de sorbente entre 25 y 100 mg, volumen de agua entre 50 y 100 mL y volumen de disolvente de elución entre 3 y 5 mL.

Se preconcentraron muestras de agua ultrapura (pH=6.0±0.1), conteniendo la misma cantidad de pesticidas (5 ng de cada uno) y fijando los valores de los factores de acuerdo con el diseño experimental. Los extractos de las muestras se analizaron en el sistema UPLC-MS/MS y los analitos se cuantificaron usando curvas de calibrado con los patrones preparados en disolvente (*solvent-based calibration curves*). Para encontrar las condiciones óptimas para los tres factores se empleó la optimización multi-respuesta, usando la función de "desirability".

Puesto que este trabajo implicaba la SPE de 218 pesticidas, se utilizaron 14 conjuntos de 16 pesticidas cada uno (**Tabla S3,** ESM), que se establecieron de acuerdo con sus polaridades (pKow).

3.2.3.2. Analisis ANOVA

La significación estadística del efecto de los tres factores en el procedimiento SPE se evaluó mediante el análisis de la varianza (ANOVA, p-value<0.05) y su influencia positiva o negativa sobre la respuesta se mostró en diagramas de Pareto.

El test ANOVA mostró resultados estadísticamente significativos de los factores SPE para 89 pesticidas (**Tabla S3**, ESM). Así, un incremento en la cantidad de MSU-1 afectó a la preconcentración de 62 pesticidas (aumentando las recuperaciones para 51 de ellos). En comparación, el uso de un mayor volumen de disolvente de elución mejoró la elución de 22 pesticidas.

Hay que destacar que uno o más factores SPE afectaron a las respuestas de la mayoría de pesticidas muy polares (correpondientes a los conjuntos 1-3 de la **Tabla S3**, ESM) y a los pesticidas poco polares (correspondientes a los conjuntos 11-14 de la **Tabla S3**, ESM). De acuerdo con estos resultados, los factores más significativos para los pesticidas muy polares fueron la cantidad de sorbente (influencia positiva) y el volumen de muestra (influencia negativa).

Por eso, los pesticidas más polares fueron más retenidos a medida que aumentaba la cantidad de

sorbente, pero eluían durante el proceso de preconcentración si el volumen de muestra aumentaba.

Por el contrario, el factor más significativo que afectaba a las recuperaciones de los pesticidas menos polares fue la cantidad de sorbente MSU-1, que influyó negativamente a la etapa de preconcentración. Así, los pesticidas menos polares fueron fuertemente retenidos y una mayor cantidad de sorbente dificultaba la etapa de elución.

Por ejemplo, en la **Fig. S2** (ver ESM) se muestra el diagrama de Pareto para aldicarb sulfone (conjunto 1) y spirodiclofen (conjunto 14). En el caso de aldicarb sulfone (**Fig. S2(a)**), los tres factores afectan a la preconcentración, siendo el volumen de muestra el más significativo. Simultáneamente, la cantidad de MSU-1 es la única variable significativa que afecta a la preconcentración de spirodiclofen (**Fig. S2(b)**).

3.2.3.3. Optimización multi-respuesta

Una vez evaluada la significación estadística de las tres variables SPE, se optimizaron modelos multi-respuesta para cada conjunto de pesticidas [41]. La **Tabla S3** (ver ESM) muestra los valores óptimos obtenidos para los tres factores en cada conjunto de pesticidas.

Para los conjuntos 1 y 2 (pesticidas más polares) las condiciones óptimas son 100 mg de sorbente MSU-1, 50 mL de muestra de agua y elución con 4 mL de acetonitrilo. Para el resto de pesticidas, los valores óptimos para los tres factores son similares, oscilando la cantidad de MSU-1 entre 50 y 65 mg, el volumen de muestra entre 70 y 84 mL y el volumen de acetonitrilo para la elución entre 3.7 y 5 mL. Estos valores están de acuerdo con los resultados obtenidos en el test ANOVA.

La **Fig. S3** (ver ESM) muestra las representaciones 3D de las superficies de respuesta obtenidas para el conjunto 14.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el estudio de optimización múltiple, puede concluirse que 100 mg de MSU-1, 50 mL de muestra de agua y 5 mL de acetonitrilo para la elución son las mejores opciones para la preconcentración de todos los pesticidas mediante SPE con el sorbente MSU-1.

3.3. Efecto matriz

Un problema importante en el análisis de pesticidas en muestras medioambientales mediante HPLC-ESI-MS/MS es la supresión o el incremento en la señal del analito debido a componentes de la matriz (es decir, el llamado "efecto matriz"). De acuerdo con la IUPAC el efecto matriz (EM) se define como los "efectos combinados de todos los componentes de la muestra, aparte del analito, sobre la medida del analito. Si puede identificarse un componente específico como causante de un efecto sobre la señal analítica, este se denomina "interferencia" [42]. El EM puede ser particularmente marcado en muestras complejas, cuando el analito co-eluye con otros componentes de la matriz, lo que altera cuantitativamente los resultados del análisis, en detrimento de la validación del método ya que afecta a la reproducibilidad, linealidad, selectividad, exactitud y sensibilidad [42].

Debido a que el mismo analito puede responder de diferente manera en diferentes muestras y una muestra puede afectar a las señales de diferentes analitos de diferente forma, el EM es una variable fundamental [42]. Por eso, la evaluación del EM en muestras de diferentes tipos tiene que formar parte del proceso de validación de cualquier método analítico.

3.3.1 Evaluación del efecto matriz

El efecto de los componentes de la matriz que coeluyen con los pesticidas se estudió comparando las pendientes de las gráficas de calibrado obtenidas con los patrones preparados en disolvente (*solvent based calibration graphs*) y las gráficas de calibrado obtenidas con los patrones preparados en extracto blanco de matriz *(matrix-matched calibration graphs*) de acuerdo con la ecuación:

$$EM(\%) = \left[\left(\frac{Pendiente\ de\ la\ curva\ de\ calibrado\ en\ blanco\ de\ matriz}{Pendiente\ de\ la\ curva\ de\ calibrado\ en\ disolvente}\right) - 1\right] x100$$

Valores de EM>|±20 %| reflejan una supresión (EM<-20%) o incremento (EM>20%) de la señal debido a otros componentes de la muestra.

Se obtuvieron curvas de calibrado en disolvente usando cuatro disoluciones patrón de los pesticidas preparados en el disolvente de inyección (1-100 µg/L) y la pendiente para cada pesticida se comparó con la pendiente de la curva de calibrado obtenida usando disoluciones patrón de los pesticidas preparados en extracto SPE de matriz de cuatro muestras de aguas reales. En la **Fig. 3** puede observarse que aproximadamene un 80% de los pesticidas presentaban un EM (%) bajo (≤|20%|) en las cuatro muestras de agua estudiadas, mientras que para el resto de pesticidas, los valores de EM (%) fueron diferentes, dependiendo del tipo de agua y solo methiocarb sulfoxide presentó un EM(%) medio o alto en todos los tipos de aguas .

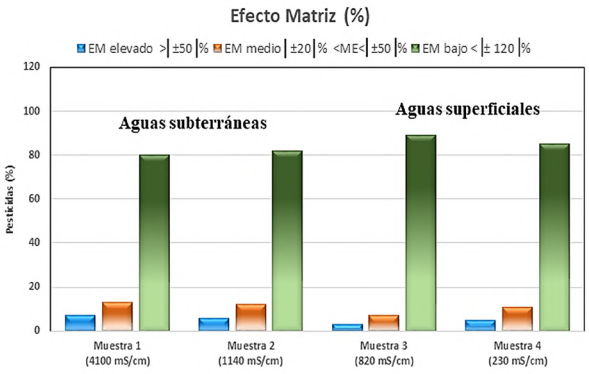


Fig. 3. *Estudio del efecto matriz realizado en muestras de agua con diferente concentración de sales (diferente conductividad) y diferente naturaleza (dos aguas superficiales y dos aguas subterráneas)*

Por otra parte, se observó que había relación entre el EM y el contenido en sales de la muestra de agua, de manera que cuando la conductividad del agua era mayor (mayor contenido en sales), un mayor número de analitos presentaron EM significativo, siendo mayor en las dos muestras de agua subterránea (muestra 1 y muestra 2).

De acuerdo con estos resultados, es necesario aplicar estrategias para corregir el efecto de los componentes de la matriz sobre la cuantificación de los pesticidas en las muestras de agua.

3.3.2 Corrección del efecto matriz

Se han propuesto algunas estrategias para corregir o disminuir el EM. Una de ellas es reducir el número de componentes de la matriz que entran en el MS/MS junto con el analito. Esto puede conseguirse mejorando la preparación de la muestra mediante una extracción más selectiva [43] y una limpieza más exhaustiva [44] o mejorando la separación cromatográfica [45-48]. Sin embargo, además de consumir mucho tiempo, el riesgo de pérdida de analitos o de contaminación de la muestra aumenta con cada etapa adicional de limpieza. Para la mejora de la separación cromatográfica se emplean tiempos de análisis mayores, asociados con picos más anchos y sensibilidades decrecientes. Otra opción es diluir la muestra e inyectar menos cantidad de ella, aunque esto puede tener como resultado una reducción en la sensibilidad [45].

Si estas estrategias no pueden eliminar el EM, este puede ser compensado frente a errores sistemáticos [49]. La estrategia más versátil es utilizar patrones marcados isotópicamente, pero son caros y, a menudo, no están disponibles para todos los analitos objeto de estudio, principalmente en métodos multirresiduo. También se ha utilizado la calibración usando patrones preparados en blancos de matriz; sin embargo, es muy difícil encontrar una matriz similar a la de la muestra que no contenga los analitos objeto de estudio, principalmente en análisis medioambiental. Recientemente, se ha propuesto la técnica "echo-peak", que usa patrones no marcados, para compensar el EM, pero esta estrategia requiere que los analitos se encuentren muy bien separados. Por otra parte, cuando no se encuentra disponible un blanco de matriz, el método de la adición de patrón es probablemente la herramienta más adecuada para compensar los errores causados por el EM [49], aún consumiendo mucho tiempo y siendo muy laboriosa ya que para cada muestra problema es necesario analizar porciones fortificadas de esta.

De acuerdo con esta estrategia, cada extracto de muestra se fortifica con diferentes niveles de concentración de analito (es decir, antes de la inyección) para construir una curva de calibrado para cada muestra, de tal manera que la variabilidad de la matriz no es un punto crucial. M. Srüber y col. [49] estudiaron tres estrategias de calibración para compensar los errores debidos al EM de siete derivados del naftaleno en diferentes muestras, encontrando que la adición de patrón para cada analito en cada muestra proporcionaba concentraciones exactas.

También es posible compensar la eficacia de la extracción y la supresión o incremento de la señal, es decir, la combinación entre EM y efectividad de la etapa de extracción. La Guía SANTE [50] tiene en cuenta los dos enfoques en relación a la adición de patrón: (i) fortificación de la muestra antes del proceso de extracción y (ii) fortificación del extracto obtenido después de la extracción.

Además, la fortificación de la muestra antes de la extracción también considera posibles interacciones entre los analitos y los componentes de la muestra [51].

Se realizaron dos experimentos usando la adición de patrón para obtener los mejores resultados en la determinación de pesticidas mediante SPE-UPLC-MS/MS. Este estudio se llevó a cabo con un blanco de agua subterránea (muestra 1) fortificada con todos los pesticidas a un nivel de concentración de 0.1 µg/L de cada uno.

En primer lugar, se preconcentraron tres alícuotas de una muestra de agua subterránea fortificada y dos extractos SPE se fortificaron con todos los pesticidas a dos niveles de concentración (adición de patrón después de la extracción mediante SPE). Así, las concentraciones de cada pesticida en las tres disoluciones patrón de calibrado fueron 0, 10 and 20 µg/L.

En segundo lugar, se añadieron diferentes cantidades de la disolución patrón de los pesticidas a las muestras de agua fortificadas y, tras la preconcentración SPE, se obtuvieron tres disoluciones patrón de calibrado con niveles de concentración de los plaguicidas de 0, 10 and 20 µg/L de cada pesticida (adición de patrón antes de la extracción mediante SPE).

En ambos experimentos, la cuantificación de los pesticidas en la muestra de agua subterránea fortificada se calculó por extrapolación en las curvas de calibrado. La **Fig. 4** muestra las recuperaciones obtenidas en ambos experimentos (detalles en la **Tabla S4**, ESM). Puede observarse que cuando la cuantificación se realiza con adición de patrón antes de la SPE, las recuperaciones mejoran para la mayoría de los pesticidas, y se encuentran entre el 50 y el 130%, siendo oxyfluorofen la excepción con recuperaciones <30%. Por el contrario, se obtuvieron bajas recuperaciones (<50%) para el 42% de los pesticidas cuando la adición de patrón se llevó a cabo después de realizar la extracción SPE.

A la vista de estos resultados, puede concluirse que la aplicación del método de la adición de patrón, adicionando los patrones de los pesticidas a la muestra antes de la preconcentración, proporciona mejores resultados que el procedimiento más frecuente, consistente en adicionar los patrones a los extractos después de la preconcentración mediante

SPE [52]. Esto es debido a que, de esta manera, los patrones de calibración están sometidos al mismo efecto debido al proceso completo que los analitos contenidos en la muestra. Además, también se corrigen los errores inherentes al proceso experimental.

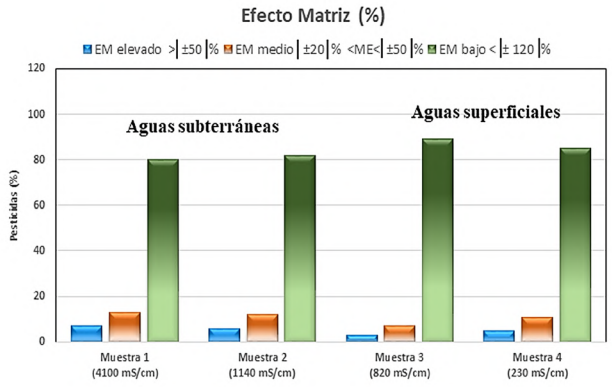


Fig. 4. *Rango de recuperaciones obtenidas frente al porcentaje de pesticidas usando cuantificación mediante adición de patrón antes y después de la preconcentración*

Tabla 1. Puntos de penalización (pp) de los reactivos utilizados en el método analítico

	Reactivos	Sub-total pp	Total pp
Cantidad	<10 mL (acetonitrilo)	1	1
	10-100 mL (metanol)	2	2
Peligrosidad	Menos peligroso (acetonitrilo)	1	2
(física, química, medioambiental, salud)	Más peligroso (metanol)	2	6
Energía	<0.1 Kwh por muestra (UPLC)	0	
Riesgos laborales	Emisión de vapor y gas al aire:		
	Acetonitrilo		
	Metanol	3	
	Ácido formico	3	
		3	
Desecho	1-10 mL (UPLC)	3	

3.4. Seguimiento del perfil ecológico del método desarrollado

Se utilizaron dos herramientas para evaluar el perfil ecológico del método: National Environmental Methods Index (NEMI) y Analytical Eco-scale (AES). NEMI se representa mediante un pictograma que contiene cuatro campos, estando los criterios resumidos en cuatro términos clave: PBT, Peligrosos, Corrosivos y Residuos.

Los respectivos cuadrantes del pictograma NEMI estarán coloreados de verde si los reactivos usados no son PBT (persistentes, bioacumulativos o tóxicos), no peligrosos, no corrosivos (12>pH>2) y la cantidad de residuo generado es <50 mL [53,54]. En este caso, (**Fig. 5**), el cuadrante correspondiente a peligrosos no es verde porque tanto el disolvente de elución (acetonitrilo) como los modificadores orgánicos de la fase móvil (metanol y ácido fórmico) están incluidos en la lista EPA's TRI [55] y en las listas de Resource Conservation and Recovery Acts [56]. Los otros tres cuadrantes son verdes porque el acetonitrilo, el metanol y el ácido fórmico son no PBTs, no peligrosos y no corrosivos (trabajando a pH=6.0), y la cantidad de residuo generado es de 3.5 mL (<50 mL).

Como el pictograma NEMI no proporciona suficiente información, se aplicó también la metodología AES Esta estrategia asigna puntos de penalización a cada reactivo, energía consumida y residuo generado, y los puntos de penalización se restan a 100. El método analítico se considera excelente si el valor Eco-Scale es >75, aceptable si el valor es >50 e inadecuado si el valor es <50 [53]. Los puntos de penalización se calcularon de acuerdo con un trabajo previo [54, 57] y la asignación de los puntos de penalización se muestra en la **Tabla 1**. Puede observarse que el método propuesto alcanzó una puntuación Eco-Scale de 80 sobre 100, por lo que puede considerarse una excelente alternativa verde

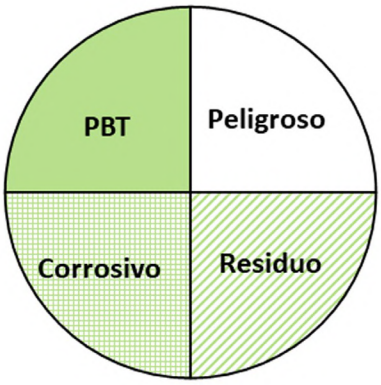


Fig. 5. *Pictograma NEMI. El campo es verde si se cumple el requerimiento correspondiente*

3.5. Validación: exactitud, precisión y selectividad

Una vez establecido que las mejores recuperaciones se consiguieron fortificando la muestra con los patrones de calibración antes del proceso de preconcentración, el método SPE-UPLC-MS/MS se validó en cuanto a exactitud, precisión y selectividad utilizando la muestra 1 (muestra de agua subterránea). La validación se llevó a cabo a tres niveles de concentración de los pesticidas en la muestra de agua subterránea (0.1, 0.25 y 0.5 µg/L).

A tal fin, a tres alícuotas de 50 mL de la muestra 1, fortificadas a los tres niveles de concentración, se adicionaron cantidades crecientes de los patrones de los pesticidas (0, 0.1, 0.2 y 0.4 µg/L). Todas las muestras (por triplicado) se preconcentraron de acuerdo con el método SPE propuesto y se cuantificaron utilizando el método de la adición de patrón antes de la SPE. La **Tabla 2** muestra las recuperaciones de los pesticidas (%) y la DER (%) obtenida para los tres niveles de concentración. Se obtuvieron recuperaciones entre 54 y 130% y DER=±20 % para la mayoría de los pesticidas, pero para 22 pesticidas a 0.1µg/L, 10 pesticidas a 0.25 µg/L y 5 pesticidas a 0.5 µg/L, las recuperaciones fueron

superiores al 130%.
La selectividad del método propuesto se estudió utilizando el criterio establecido en la Directiva 96/23/CE [30]. En ninguna de las muestras reales se encontraron componentes de la matriz coeluyentes con los analitos y las ratios SRM2/SRM1 para todos los pesticidas estuvieron dentro de los intervalos de confianza establecidos para los pesticidas en disolvente (±30%).

3.6. Aplicación del método propuesto a muestras de aguas subterráneas reales

El método SPE-UPLC-MS/MS propuesto se aplicó a la determinación de los 218 pesticidas seleccionados en trece muestras de agua subterránea recogidas en las proximidades del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar, algunas de ellas de pozos cercanos a invernaderos. Para contolar la efectividad del procedimiento de SPE, junto con las muestras reales, se sometió al método propuesto una muestra de control (QC) fortificada con 0.1 µg/L de cada pesticida.

La **Tabla 3** muestra los pesticidas encontrados en las muestras reales y detectados de acuerdo con los tres puntos de identificación establecidos por la Guía de UE [27], así como las recuperaciones obtenidas para estos pesticidas en la muestra QC, siendo todos ellos satisfactorios (recuperaciones entre 54 y 130%). Puede observarse que se identificaron en las muestras 38 pesticidas, pero la mayoría de ellos se encontraban a niveles de concentración inferiores a 0.1 µg/L (valores semicuantitativos). La mayoría de los pesticidas detectados frecuentemente en agua subterránea fueron imidacloprid, hexaflumuron y oxadixyl en 7, 6 y 5 muestras, respectivamente. Por ejemplo, la **Fig. 6(a)** muestra las señales de MS/MS obtenidas para imidacloprid en la muestra QC (0.1 µg/L) y en la muestra M3 (nivel de concentración de 0.055 µg/L). Puede observarse que la ratio SRM2/SRM1 es la misma para ambas muestras, independientemente de la concentración de analito.

Por otra parte, los valores más altos (>0.1 µg/L) se encontraron para methiocarb en tres muestras a 1.150, 0.393 y 0.221 µg/L, para pyrethrin II en una muestra a 0.405 µg/L y hexaflumuron en otra muestra a 0.120 µg/L, siendo todos ellos insecticidas. La **Fig. 6(b)** muestra las señales MS/MS para methiocarb en la muestra QC y en la muestra M7, que tenía el nivel de concentración más elevado (100 veces mayor que el máximo nivel permitido en agua potable por la UE). Puede observarse en este caso que la ratio SRM2/SRM1 de la muestra M7 (105.5%) es ligeramente menor que el de la muestra QC (110.8%) pero de acuerdo con el criterio establecido por la Directiva 96/23/CE [30].

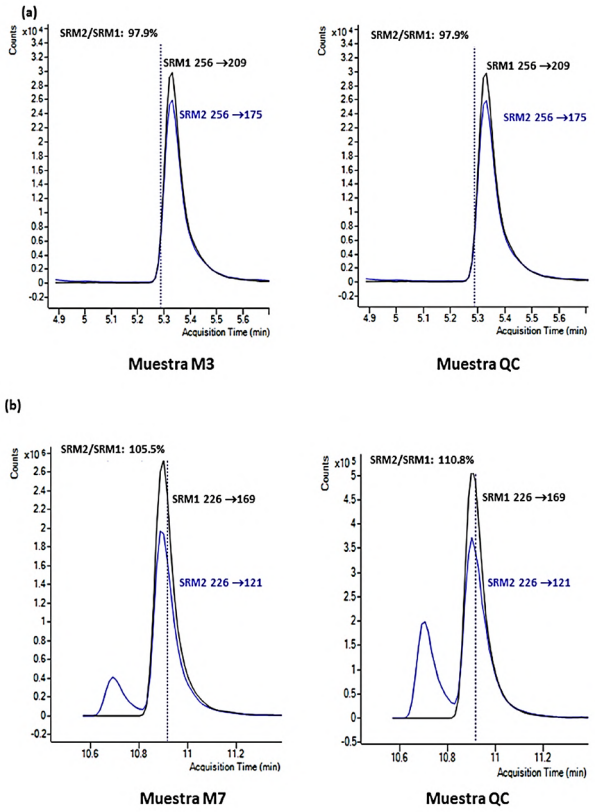


Fig. 6. Señales de MS para SRM1 y SRM2 de: (a) imidacloprid en la muestra M3 y en la muestra QC y (b) methiocarb en la muestra M7 y en la muestra QC

4. Conclusiones

En este trabajo, un material mesoporoso MSU-1 se sintetizó en el laboratorio y se usó para preconcentrar 218 pesticidas de diferente naturaleza.
Para optimizar los factores clave que afectan a la absorción/desorción de los pesticidas en el sorbente se utilizaron la metodología paso a paso (disolvente de elución, pH de la muestra y concentración de sales) y la metodología de la superficie multi-respuesta (cantidad de sorbente, volumen de agua y volumen del disolvente de elución, es decir, los factores que están relacionados).
Los analitos se determinaron por UPLC-MS/MS y se observó efecto matriz para un 20% de los pesticidas; por eso, para la cuantificación se utilizó la calibración mediante adición de patrón. En este sentido, se estudiaron dos estrategias, adicionando los patrones de pesticidas antes y después del proceso de preconcentración, es decir en la muestra blanco de agua y sobre el extracto blanco, respectivamente. Los resultados obtenidos fueron mejores cuando se realizó la fortificación antes de la SPE, es decir, fortificando el blanco de agua; esto es debido a que, de esta manera, los patrones de calibración y los analitos

contenidos en la muestra están sometidos al mismo efecto, debido a la muestra completa, y, además, también se corrigen los errores debidos al proceso experimental.

El método se validó utilizando un blanco de muestra de agua subterránea con alto contenido en sales y, después, se aplicó para analizar trece muestras colectadas en las proxiidades del Parque Natural de Cabo de Gata-Níjar. Se encontraron 38 pesticidas diferentes con concentraciones inferiors a 0.1 µg/L para la mayoría de ellos. Sin embargo, tres insecticidas (methiocarb, hexaflumuron y pyrethrin II) se encontraron a niveles de concentración superiores a 0.1 µg/L, presentando methiocarb las concentraciones más elevadas en tres de las muestras analizadas (M5. M6 y M7).

El sorbente MSU-1, fue sintetizado por primera vez en nuestro laboratorio siguiendo un método barato y con alto rendimieno y se utilizó por primera vez para preconcentrar un elevado número de analitos (218 pesticidas en este caso) con excelente rendimiento.

Financiación

Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades español (MICINN) y por el Gobierno Andaluz (FEDER 2014-202) para realizar los proyectos "CERTAIN" (PID2020-116230RB-I00) y "ARCO" (UAL2020-FQM-B2087)

Agradecimientos

Los autores agradecen al Campus Agroalimentario de Excelencia Internacional (CeiA3) y al Laboratorio de Referencia de la Unión Europea para Residuos de Pesticidas en Frutas y Hortalizas de la Universidad de Almería.

Referencias

[1] M. LeDoux, Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades, J Chromatogr. A 1218 (2011) 1021–1036, doi:10.1016/j.chroma.2010.12.097

[2] R.M. de Souza, D. Seiberta, H.B. Quesada, F. de Jesus Bassetti, M.R. Fagundes-Klen, R. Bergamasco, Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surfacewater: A review, Process Saf. Environ. Prot. 135 (2020) 22–37, https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.12.035

[3] T. Lu, Q. Zhang, Z. Zhang, B. Hu, J. Chen, J. Chen, H. Qian, Pollutant toxicology with respect to microalgae and cyanobacteria, J. Environ. Sci. 99 (2021) 175–186, https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.06.033

[4] European Commission, 2019. EU Pesticides Database, https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/eu-pesticides-database_es, accessed on 21 december 2021

[5] L. Pareja, M.J. Martínez-Bueno, V. Cesio, H. Heinzen, A.R. Fernández-Alba, Trace analysis of pesticides in paddy field water by direct injection using liquid chromatography–quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 4790–4798, doi: 10.1016/j.chroma.2011.02.044

[6] M.J. Gómez, S. Herrera, D. Solé, E. García-Calvo, A.R. Fernández-Alba, Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformationproducts along a river basin affected by urban, agricultural and industrial pollution, Sci. Total Environ. 420 (2012) 134–145, doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.01.029

[7] A. Masiá, J. Campo., Al. Navarro-Ortega, D. Barceló, Y. Picó, Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data, Sci. Total Environ. 503–504 (2015) 58–68, http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.095

[8] A. Ccanccapa, A. Masia a, A. Navarro-Ortega, Y. Picó, D. Barceló, Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment, Environ. Pollut. 211 (2016) 414-424, http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.12.059

[9] M. Köck-Schulmeyer, C. Postigo, M. Farré, D. Barceló, M. López de Alda, Medium to highly polar pesticides in seawater: Analysis and fate in coastal areas of Catalonia (NE Spain), Chemosphere 215 (2019) 515-523, https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.049

[10] M. Nasiri, H. Ahmadzadeh, A. Amiri, Sample preparation and extraction methods for pesticides in aquatic environments: A review, Trends Anal. Chem. 123 (2020) 115772, https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115772

[11] A. Jouyban, M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, A lighter-than-water deep eutectic-solvent-based dispersive liquid-phase microextraction method in a U-shaped homemade device, New J. Chem. 42 (2018) 10100-10110, DOI: 10.1039/c8nj00597d

[12] M.A. Farajzadeh, A. Mohebbi, H. Fouladvand, M.R.A. Mogaddam, A new and facile method for preparation of amorphous carbon nanoparticles and their application as an efficient and cheap sorbent for the extraction of some pesticides from fruit juices, Microchem J. 155 (2020) 104795, https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104795

[13] M. Nemati, M.Tuzen, M.A. Farazajdeh S. Kaya, M.R.A. Mogaddam, Development of dispersive solid-liquid extraction method based on organic polymers followed by deep eutectic solvents elution; application in extraction of some pesticides from milk samples prior to their determination by HPLC-MS/MS, Anal. Chim. Acta 1199 (2022) 339570, https://doi.org/10.1016/j.aca.2022.339570]

[14] M. Kuster, M. López de Alda, D. Barceló, Liquid chromatography–tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 520–529, doi: 10.1016/j.chroma.2008.08.031

[15] N. Fontanals, P.A.G. Cormack, R. M. Marcé, Francesc Borrull, Mixed-mode ion-exchange polymeric sorbents: dual-phase materials that improve selectivity and capacity, Trends Anal. Chem. 29 (2010) 765-779, doi: 10.1016/j.trac.2010.03.015

[16] N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. Marcé, Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis, Trends Environ. Anal. Chem. 1 (2014) e8–e18, http://dx.doi.org/10.1016/j.teac.2013.11.002

[17] L. Zhao, H. Qin, R. Wu, H. Zou, Recent advances of mesoporous materials in mple preparation, J. Chromatogr. A 1228 (2012) 193– 204, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.051

[18] N. Casado, D. Pérez-Quintanilla, S. Morante-Zarcero, I. Sierra, Current development and applications of ordered mesoporous silicas and other solegel silica-based materials in food sample preparation for xenobiotics analysis, Trends Anal. Chem. 88 (2017) 167-184, http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2017.01.001

[19] M. Zhang, H. Chen, L. Zhu, C. Wang, G. Ma, X. Liu, Solid-phase purification and extraction for the determination of trace neonicotinoid pesticides in tea infusión, J. Sep. Sci. 39 (2016) 910–917, doi: 10.1002/jssc.201501129

[20] A. Bazmandegan-Shamili, A.M.H. Shabani, S. Dadfarnia, M.R. Moghadam, M. Saeidi, Preparation of magnetic mesoporous silica composite for the solid-phase microextraction of diazinon and malathion before their determination by high-performance liquid chromatography, J. Sep. Sci. 40 (2017) 1731–1738, doi: 10.1002/jssc.201601339

[21] J E. Pellicer-Castell, C. Belenguer-Sapiña, P. Amorós, J. El Haskouri, J.M. Herrero-Martínez, A. Mauri-Aucejo, Study

of silica-structured materials as sorbents for organophosphorus pesticides determination in environmental water samples, Talanta 189 (2018) 560–567, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.044

[22] J. Valimaña-Traverso, S. Morante-Zarcero, D. Pérez-Quintanilla, M.A. García, I. Sierra, M.L. Marina, Cationic amine-bridged periodic mesoporous organosilica materials for off-line solid-phase extraction of phenoxy acid herbicides from water samples prior to their simultaneous enantiomeric determination by capillary electrophoresis, J. Chromatogr. A 1566 (2018) 146–157, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.06.042

[23] L. Kharbouche, M.D. Gil García, A. Lozano, H. Hamaizi, M. Martínez Galera, Solid phase extraction of pesticides from environmental waters using an MSU-1 mesoporous material and determination by UPLC-MS/MS, Talanta 199 (2019) 612–619, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.092

[24] M.A. Florea, B. Purcareanu, A. Bicu, V. Drumea, C.E. Gird, M. Grigoroscuta, D.E. Mihaiescu, G. Vasilievici, L. Olariu, Extraction of pesticide residues from plant extracts using regenerative MCM41 mesoporous materials, IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering 572 (2019) 012008, doi: 10.1088/1757-899X/572/1/012008

[25] L. Fabrício S. Santosa, R. Anjos de Jesus, J.A. Santana Costa, L.G. Teixeira Gouveia, M.E. de Mesquita, S. Navickiene, Evaluation of MCM-41 and MCM-48 mesoporous materials as sorbents in matrix solid phase dispersion method for the determination of pesticides in soursop fruit (Annona muricata), Inorg. Chem. Commun. 101 (2019) 45–51, https://doi.org/10.1016/j.inoche.2019.01.013

[26] H. Zhang, D. Zheng, Y. Zhou, H. Xia, X. Peng, Multifunctionalized magnetic mesoporous silica as an efficient mixe d-mode sorb ent for extraction of phenoxy carboxylic acid herbicides from water samples followed by liquid chromatography-mass spectrometry in tandem, J. Chromatogr. A 1634 (2020) 461645, https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461645

[27] E. Pellicer-Castell, C. Belenguer-Sapiña, Pedro Amorós, J. El Haskouri, J.M. Herrero-Martínez, A.R. Mauri-Aucejo, Comparison of silica-based materials for organophosphorus pesticides sampling and occupational risk assessment, Anal. Chim. Acta 1110 (2020) 26-34, https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.03.008

[28] L.A. Fonseca Dinali, H. Leijoto de Oliveira, L. Suleimara Teixeira, W. de Souza Borges, K. Bastos Borges, Mesoporous molecularly imprinted polymer core@shell hybrid silica nanoparticles as adsorbent in microextraction by packed sorbent for multiresidue determination of pesticides in apple juice, Food Chem. 345 (2021) 128745, https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128745

[29] Commission Decision 2002/657/EC of 12th August 2002, Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Commun. L221, Brussels, Belgium, (2002) 8–36

[30] Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/49/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, Off. J. Eur. Commun. L125/10, Brussels, Belgium, (1996) 10-32

[31] J.A. Alves Júnior, J.B. Baldo, The behavior of silica suspensions, New Journal of Glass and Ceramics 4 (2014) 29-37, http://creativecommons.org/licences/by/4.0

[32] New Journal of Glass and Ceramics 4 (2014) 29-37, http://creativecommons.org/licences/by/4.0

[33] Pesticide Properties DataBase (PPDB), Agriculture and Environment Research Unit (AERU). University of Hertfordshire. http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/

[34] L. Kharbouche, M.D. Gil García, A. Lozano, H. Hamaizi, M. Martínez Galera, Determination of personal care products in water using UHPLC–MS after solid phase extraction with mesoporous silica-based MCM-41 functionalized with cyanopropyl groups, J. Sep. Sci. 43 (2020) 2142-2153

[35] M.D. Gil García, S. Dahane, F.M. Arrabal-Campos, M.M. Socías Viciana, M.A. García, I. Fernández, M. Martínez Galera, MCM-41 as novel solid phase sorbent for the pre-concentration of pesticides in environmental waters and determination by microflow liquid chromatography-quadrupole linear ion trap mass spectrometry, Microchem. J. 134 (2017) 181-190, https://doi.org/10.1016/j.microc.2017.06.008

[36] S. Dahane, M. Martínez Galera, M.E. Marchionni, M.M. Socías Viciana, A. Derdour, M.D. Gil García, Mesoporous silica based MCM-41 as solid-phase extraction sorbent combined with micro-liquid chromatography–quadrupole-mass spectrometry for the analysis of pharmaceuticals in waters, Talanta 152 (2016) 378-391, https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.02.013

[37] S. Hudson, E. Magner, J. Cooney, B.K. Hodnett, Methodology for the Immobilization of Enzymes onto Mesoporous Materials, J. Phys. Chem. B 109 (2005) 19496-19506, DOI: 10.1021/jp052102n

[38] L.T. Gibson, Mesosilica materials and organic pollutant adsorption: PartB removal from aqueous solution, Chem. Soc. Rev. 43 (2014) 5173–5182, http://dx.doi.org/10.1039/c3cs60095e

[39] E. Turiel, P. Fernández, C. Pérez-Conde, C. Cámara, Trace-level determination of triazines and several degradation products in environmental waters by disk solid-phase extraction and micellar electrokinetic chromatography, J. Chromatogr. A 872 (2000) 299–307, PII: S0021-9673(99)01298-4

[40] H. Lord, J. Pawliszyn, Microextraction of drugs, J. Chromatogr. A 902 (2000) 17–63, PII: S0021-9673(00)00836-0

[41] L. Vera-Candioti, M.D. Gil García, M. Martínez Galera, H.C. Goicoechea, Chemometric assisted solid-phase microextraction for the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river water by liquid chromatography–diode array detection, J. Chromatogr. A 1211 (2008) 22–32, doi:10.1016/j.chroma.2008.09.093

[42] M. Cortese, M.R. Gigliobianco, F. Magnoni, R. Censi, P. Di Martino, Compensate for or minimize matrix effects? Strategies for overcoming matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry technique: A tutorial review, Molecules 25 (2020) 3047, doi: 10.3390/molecules25133047

[43] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations, Anal. Chem. 70 (1998) 882-889, https://doi.org/10.1021/ac971078

[44] D.L. Buhrmann, P.I. Price, P.J. Rudewicz, Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7 (1996) 1099-1105, https://doi.org/10.1016/S1044-0305(96)00072-4

[45] B.K. Choi, D.M. Hercules, A.I. Gusev, Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography–tandem mass spectrometry signal suppression, J. Chromatogr. A 907 (2001) 337-342, https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)01052-9

[46] B.K. Choi, D.M. Hercules, LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices, A.I. Gusev, Fresenius J. Anal. Chem. 369 (2001) 370-377, https://doi.org/10.1007/s002160000661

[47] R. Pascoe, J.P. Foley, A.I. Gusev, Reduction in matrix-related signal suppression effects in electrospray ionization mass spectrometry using on-line two-

dimensional liquid chromatography, Anal. Chem. 73 (2001) 6014-6023, https://doi.org/10.1021/ac0106694

[48] E. Dijkman, D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, E. Hogendoorn, J.-V.Sancho, O. Pozo, F. Hernández, Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection, J. Chromatogr. A 926 (2001) 113-125, https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01040-8

[49] M. Stüber, T. Reemtsma, Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 910–916, doi: 10.1007/s00216-003-2442-8

[50] European Commission, Safety of the food chain pesticides and biocides. SANTE/12682/2019, in: Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, 2019.

[51] S. Dahane, M.D. Gil García, A. Uclés Moreno, M. Martínez Galera, M.M. Socías Viciana, A. Derdour, Determination of eight pesticides of varying polarity in Surface waters using solid phase extraction with multiwalled carbon nanotubes and liquid chromatography-linear ion trap mass spectrometry, Microchim. Acta 182 (2015) 95–103, doi: 10.1007/s00604-014-1290-x

[52] F. Raposo, D. Barceló, Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints, Trends Anal. Chem., 134 (2021), 116068. https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116068

[53] H. Shaaban, A. Mostafa, W. Alhajri, L. Almubarak, K. AlKhalifah, Development and validation of an eco-friendly SPE-HPLC-MS method for simultaneous determination of selected parabens and bisphenol A in personal care products: Evaluation of the greenness profile of the developed method, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 41 (2018) 621–628, https://doi.org/10.1080/10826076.2018.1499527

[54] A. Gałuszka, P. Konieczka, Z.M. Migaszewski, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, TrAC,-Trends Anal. Chem. 37 (2012) 61-72, doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.03.013

[55] https://dec.vermont.gov/sites/dec/files/ead/documents/Forms/EPA%20Toxic%20Release%20Inventory%202020.pdf

[56] https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter/part261#subpart-D

[57] H.K. Chanduluru, A. Sugumaran, Assessment of greenness for the determination of voriconazole in reported analytical methods, RSC Adv.12 (2022) 6683-6703. DOI: 10.1039/d1ra08858k.

Tabla 2. *Recuperaciones (%) y DER (%) obtenidos usando la calibración mediante la adición de patrón sobre una muestra blanco de agua subterránea fortificada a tres niveles de concentración*

Pesticida	0.1 mg/L		0.25 mg/L		0.5 mg/L	
	Recuperación (%)*	DER (%)	Recuperación (%)*	DER (%)	Recuperación (%)*	DER (%)
Acetamiprid	100	12	88	14	87	8
Alachlor	117	10	102	16	96	13
Albendazole	100	5	112	15	105	16
Aldicarb	105	18	84	12	82	9
Aldicarb-sulfone	107	16	98	12	91	13
Ametoctradin	97	21	115	12	87	10
Anilofos	104	21	103	16	95	15
Atrazine	103	7	85	11	89	7
Avermectin B1a	117	18	107	17	108	15
Azinphos-ethyl	128	16	133	10	117	17
Azinphos-methyl	127	18	98	18	104	12
Azoxystrobin	108	11	79	2	92	7
Benalaxyl	118	21	98	13	106	15
Bendiocarb	102	4	85	13	81	8
Bitertanol	94	16	84	14	90	12
Boscalid	112	21	93	11	95	11
Bromacil	162	19	124	16	116	10
Bromuconazole	113	23	114	21	107	18
Bupirimate	112	12	111	23	99	14
Buprofezin	124	23	89	19	86	17
Carbaryl	111	22	104	25	91	21
Carbendazim	91	10	91	21	86	14
Chlorantraniliprole	103	22	106	17	101	11
Chlorbromuron	103	9	95	13	109	9
Chlorfenvinphos	105	10	80	14	85	11
Chlorfluazuron	91	23	74	15	83	16
Chlorotoluron	130	19	96	10	102	13
Chloroxuron	113	16	78	9	76	7
Chlorpropham	99	12	95	20	89	14
Chlorpyrifos	156	27	101	17	110	14
Chlorpyrifos-methyl	100	28	114	14	94	16
Chromafenozide	93	21	128	21	114	18
Clofentezine	144	18	121	19	99	15
Clomazone	95	13	87	15	80	9
Coumaphos	130	16	131	10	118	7
Cyazofamid	142	22	119	18	112	21
Cyflufenamid	126	31	91	5	85	7
Cyhalofop-butyl	127	33	82	14	95	12
Cymoxanil	112	13	110	19	104	9

Cyproconazole	114	16	91	21	88	12
Cyprodinil	107	20	74	9	83	10
DEET	109	10	80	16	95	13
Demeton-S-methyl	100	22	103	11	91	8
Demeton-S-methylsulfone	87	21	86	12	76	5
Demeton-S-methylsulfoxide	84	21	86	10	89	8
Desethylterbuthylazine	113	5	104	16	95	14
Diazinon	115	23	81	9	75	9
Dichlorvos	78	15	112	17	94	7
Dicrotophos	96	14	87	17	80	15
Diethofencarb	104	22	118	11	101	8
Difenoconazole	117	23	107	19	96	17
Difenoxuron	108	10	99	10	105	13
Diflubenzuron	134	17	97	12	98	12
Dimethoate	107	5	111	15	103	9
Dimethomorph	106	8	92	16	109	7
Dimethylvinphos	107	17	100	12	95	14
Diniconazole	129	13	109	15	112	17
Diuron	116	12	96	15	90	9
Edifenphos	117	6	77	15	76	10
Epoxiconazole	110	22	84	16	94	21
Ethiofencarb	94	22	97	12	86	8
Ethiprole	100	18	114	19	101	12
Ethirimol	86	13	92	20	90	15
Ethoprophos	161	23	89	15	95	15
Etofenprox	127	17	100	12	86	8
Etoxazole	127	14	121	17	106	12
Famoxadone	152	26	143	25	125	23
Fenamidone	102	10	92	11	86	15
Fenamiphos	100	22	107	17	99	16
Fenamiphos-sulfone	96	9	96	18	84	9
Fenamiphos-sulfoxide	90	16	89	11	92	9
Fenarimol	113	18	106	17	110	14
Fenazaquin	148	23	163	21	134	23
Fenbendazole	114	13	111	9	99	7
Fenbuconazole	139	32	97	18	112	17
Fenhexamid	102	26	100	18	92	19
Fenoxycarb	128	22	115	10	117	8
Fenpropimorph	112	16	104	19	111	17
Fenpyrazamine	106	11	105	17	98	15
Fenpyroximate (E)	145	21	150	18	147	15
Fenthion	99	12	126	17	107	11
Fenthion-sulfone	99	7	95	7	102	14
Fenthion-sulfoxide	94	12	91	15	83	12
Fenuron	99	10	93	19	101	8
Fipronil	101	4	89	21	99	13
Fluacrypyrim	128	21	106	18	113	16
Fluazifop	95	16	69	15	75	12
Flubendiamide	96	12	114	25	105	14
Fludioxonil	137	16	88	13	94	7
Flufenoxuron	106	10	89	10	79	5
Fluometuron	107	17	100	21	119	23
Fluopicolide	110	7	94	15	97	11
Fluopyram	117	10	93	16	102	12
Fluquinconazole	131	21	105	20	84	14
Flusilazole	96	10	81	7	89	10
Flutriafol	107	13	104	9	96	12
Fluxapyroxad	117	15	130	20	115	15
Fosthiazate	111	12	107	16	91	12
Haloxyfop	89	7	90	12	84	14
Hexaconazole	95	8	87	14	79	6
Hexaflumuron	106	14	105	18	114	22
Hexythiazox	116	13	102	6	96	8
Imidacloprid	86	17	83	14	80	9
Indoxacarb	126	18	133	14	119	14
Iprovalicarb	101	9	88	20	96	10
Isocarbophos	116	20	94	12	83	9
Isofenfos-methyl	124	22	84	16	98	15
Isoprocarb	125	16	82	23	92	18
Isoprothiolane	136	17	151	19	131	15
Isoproturon	105	13	96	17	104	12
Isoxaflutole	95	8	97	12	84	10
Kresoxim-methyl	101	12	113	13	108	11
Lenacil	129	22	104	17	95	14
Linuron	104	5	89	17	113	11
Lufenuron	93	18	90	11	86	14

Malathion	111	13	98	10	108	7
Mandipropamid	103	28	80	9	89	11
MCPB	89	9	95	13	81	10
Mebendazole	103	13	99	17	87	15
Mepanipyrim	105	20	128	16	101	14
Meptyldinocap	92	17	70	19	89	22
Metaflumizone (E)	100	20	66	19	75	14
Metalaxyl	107	13	94	16	86	13
Metamitron	106	19	90	21	109	16
Metconazole	98	11	70	18	78	14
Methidathion	106	15	94	14	101	17
Methiocarb	103	9	99	16	88	15
Methiocarb-sulfone	106	18	93	17	97	18
Methiocarb-sulfoxide	100	16	91	16	84	11
Methomyl	130	5	121	18	114	15
Methoxyfenozide	139	17	108	13	93	10
Metobromuron	107	16	95	21	79	9
Metolachlor	117	17	102	20	109	9
Metolcarb	135	20	102	17	110	19
Metrafenone	102	13	79	13	81	8
Monocrotophos	87	11	86	10	75	9
Monolinuron	102	13	83	19	89	11
Monuron	109	17	91	15	103	18
Myclobutanil	126	17	96	10	82	10
Neburon	112	9	98	14	105	6
Nitenpyram	61	14	91	13	90	11
Novaluron	119	19	107	14	113	17
Oxadiargyl	111	11	69	16	76	13
Oxadixyl	94	13	77	18	69	9
Oxamyl	95	2	90	18	103	16
Oxasulfuron	94	11	86	21	79	15
Oxfendazole	101	16	104	12	91	16
Oxyfluorfen	85	10	67	15	71	18
Paclobutrazol	94	16	80	22	87	18
Penconazole	86	19	95	20	103	14
Pencycuron	120	20	101	15	88	10
Penflufen	114	13	90	3	88	8
Penthiopyrad	107	17	103	20	109	14
Permethrin	65	21	67	12	65	11
Phenthoate	120	17	96	6	86	9
Phosalone	141	7	77	15	81	13
Phosmet	98	16	93	18	89	13
Phoxim	119	19	54	18	64	21
Pirimicarb	112	18	97	17	88	14
Pirimiphos-methyl	101	11	70	21	85	18
Prochloraz	120	13	118	19	123	22
Profenofos	111	18	97	18	102	14
Promecarb	117	9	121	16	116	12
Prometryn	103	11	85	12	92	7
Propaquizafop	84	20	93	14	86	16
Propargite	106	12	110	11	99	15
Propazine	100	8	86	22	79	11
Propiconazole	101	17	83	22	68	11
Propoxur	112	9	85	19	82	15
Propyzamide	119	14	129	19	115	13
Proquinazid	112	19	101	4	97	12
Prosulfocarb	116	13	110	22	119	13
Prothiofos	123	19	164	27	152	18
Pyraclostrobin	99	14	106	13	89	6
Pyrethrin I	117	15	102	21	114	15
Pyrethrin II	109	6	111	13	102	5
Pyridaben	113	15	139	12	121	10
Pyridalyl	76	10	58	16	65	10
Pyridaphenthion	110	9	105	18	114	16
Pyridate	113	17	70	16	86	16
Pyrimethanil	110	19	114	27	97	23
Pyriofenone	108	20	85	19	79	14
Pyriproxyfen	142	25	119	11	99	8
Quinalphos	112	20	86	9	96	10
Quinoclamine	104	9	93	20	87	15
Quinoxyfen	129	21	115	7	102	13
Quizalofop	104	19	104	20	96	13
Quizalofop-ethyl	109	24	90	21	84	16
Rotenone	115	8	92	18	104	16
Simazine	103	6	94	17	111	9
Spirodiclofen	83	11	107	14	88	7

Spiromesifen	96	22	114	19	105	10
Spirotetramat	94	17	82	19	76	14
Sulfoxaflor	101	4	88	16	95	9
Tebuconazole	108	19	95	7	112	17
Tebufenozide	125	7	119	12	103	14
Tebufenpyrad	145	27	82	15	75	6
Teflubenzuron	71	11	128	3	117	15
Terbuthylazine	98	8	89	12	80	12
Terbutryn	132	3	120	18	117	13
Tetraconazole	128	18	102	21	93	16
TFNG	87	19	90	21	85	18
Thiacloprid	95	4	88	14	80	8
Thiamethoxam	98	10	83	19	89	16
Thiobencarb	113	21	83	20	102	23
Tolclofos-methyl	114	15	89	14	91	9
Tolfenpyrad	134	26	158	10	127	10
Triadimenol	111	18	91	15	104	9
Triallate	116	16	102	16	93	12
Triazophos	118	25	112	22	100	19
Triclorcarban	64	12	68	15	72	7
Tricyclazole	99	4	85	17	101	12
Trifloxystrobin	122	13	100	19	95	8
Triflumizole	134	18	128	17	131	15
Triflumuron	124	15	63	18	68	11
Triticonazole	94	22	95	21	87	15
XMC	114	8	79	11	83	15
Zoxamide	131	21	102	17	113	14
Media	**110**	**15**	**98**	**16**	**96**	**13**

Tabla 3. *Pesticidas detectados en muestras de agua subterránea colectadas en el sur de España (Almería)*

Pesticida	**QC****	**Concentración de pesticida (µg/L)**												
		M1	**M2**	**M3**	**M4**	**M5**	**M6**	**M7**	**M8**	**M9**	**M10**	**M11**	**M12**	**M13**
Azoxystrobin	73												0.004	0.044
Chlorfenvinphos	111												0.012	
Chlorfluazuron	54	0.039				0.037								
Chlorpropham	111										0.002			
Cyhalofop-butyl	96						0.015							
Cymoxanil	102										0.011		0,017	0.009
Dichlorvos	62											0.002		
Dicrotophos	95										0.017			
Diethofencarb	106										0.010			
Difenoconazole	88								0.007				0.010	
Epoxiconazole	102												0.003	
Famoxadone	78											0.027		
Fenamidone	90									0.003				
Fenbendazole	69											0.012		
Fenhexamid	120												0.006	0.004
Fenthion-sulfoxide	98												0.019	
Hexaflumuron	104	**0.120***		0.020	0.015	0.022	0.028						0.010	
Imidacloprid	96		0.023	0.055	0.003		0.009	0.008	0.014		0.016			
Indoxacarb	123												0.011	
Meptyldinocap	130													0.041
Metamitron	101											0.003		0.005
Methiocarb	105					**0.393***	**0.221***	**1.150***						
Methomyl	109											0.004		
Myclobutanil	116									0.008	0.002		0.008	
Novaluron	95						0.036	0.013					0.012	
Oxadixyl	103		0.008	0.054			0.015		0.018		0.039			
Oxyfluorfen	97				0.023									
Penconazole	112										0.002	0.005	0.012	0.006
Penflufen	109												0.011	
Permethrin	58								0.010		0.018			0.020
Propaquizafop	82												0.013	
Pyrethrin I	120								0.006				0.063	
Pyrethrin II	81											0.005	**0.405***	0.008
Quizalofop	115										0.005			
Tebuconazole	116										0.012		0.005	0.008
Tebufenozide	71												0.017	
Trifloxystrobin	85												0.012	
Triflumuron	115												0.012	

DISPOSITIVOS MÓVILES COMO HERRAMIENTAS PARA LA SEGURIDAD ALIMENTARIA

Roberto Sáez-Hernández, M. Luisa Cervera, Adela R. Mauri-Aucejo
Departamento de Química Analítica, Universitat de València, C/ Dr. Moliner, 50, Burjassot, 46100, España

Los dispositivos de análisis *point of care* (POC, por sus siglas en inglés) en el ámbito de la salud han tomado protagonismo durante los últimos años, y por todos/as es conocido su existencia, utilidad y limitaciones. Sin embargo, en el ámbito de la seguridad alimentaria, su desarrollo y transferencia a la sociedad no se encuentra todavía a niveles comparables.

Una de las estrategias para acercar los análisis al usuario son los teléfonos móviles: estos, en tanto que dispositivos equipados de diferentes sistemas electrónicos, permiten hacer uso de ellos (a veces con las debidas modificaciones) para realizar análisis químicos, bien sean electroquímicos u ópticos (*1*). En este artículo, nos centraremos en la segunda posibilidad: la aplicación de las cámaras móviles para análisis de parámetros químicos de interés, poniendo el foco en un caso concreto del análisis alimentario.

Acrilamida en alimentos

La acrilamida (2-propenamida) es un compuesto orgánico sencillo que encuentra usos en diferentes ámbitos como reactivo de síntesis en la preparación de compuestos como copolímeros, siendo la poliacrilamida el ejemplo más característico. Dada su naturaleza relativamente polar, es un compuesto soluble en agua, así como en disolventes orgánicos polares, tales como el metanol o la acetona.

Pese a ser un compuesto cuya síntesis se describió por primera vez en 1949 (*2*), su interés en el ámbito de la salud y la seguridad alimentaria no surgió hasta el año 2002, a raíz de un estudio llevado a cabo en Suecia por investigadores/as y publicado en la revista *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (*3*) en el que se demostraba cómo la técnica de cocinado y la naturaleza del alimento eran factores clave en la mayor presencia de acrilamida, y se alertaba acerca de la influencia que la dieta y las técnicas de calentamiento podían tener sobre la ingesta de productos sobre los cuales ya sobrevolaba una sospecha. Los resultados de la investigación, que fueron objeto de gran interés mediático (*4*) (incluyendo filtraciones, intereses comerciales, científicos y políticos), generaron por primera vez la necesidad de someter a mayor control la presencia de acrilamida en alimentos.

Como quedó expresado en la opinión científica redactada por la Comisión Europea, este descubrimiento no suponía un riesgo nuevo para la seguridad alimentaria, sino más bien una ampliación del conocimiento acerca de los riesgos asociados al consumo de ciertos alimentos (*5*). Además, derivado del recién publicado artículo, quedaba claro que el modo de preparación de los alimentos constituía una de las variables de mayor significancia a la hora de reducir los riesgos asociados al consumo de sustancias peligrosas.

En esta dirección, se comenzó a investigar acerca de diferentes estrategias y metodologías para reducir la formación de acrilamida en diferentes alimentos. Por ejemplo, el escaldado previo a la preparación de patatas fritas demostró utilidad para reducir la formación de dicho compuesto en este alimento (*6*). Asimismo, el uso de técnicas de cocina como el microondas o el hervido también se han mostrado eficientes para la preparación de alimentos de manera que la cantidad de acrilamida sea menor. En general, las metodologías de cocinado que involucran temperaturas más suaves favorecen la mitigación en la producción. El pH también es un factor importante, siendo un pH neutro el que favorece la aparición de mayores cantidades de acrilamida en alimentos (*7*). Este tipo de buenas prácticas se recogen en el *Acrylamide Toolbox*, un informe en que se recomiendan estrategias para diferentes tipos de alimentos con el fin de minimizar el contenido de acrilamida (*8*).

Los alimentos que presentan mayor probabilidad de contener acrilamida son, por tanto, aquellos que tengan elevados contenidos de carbohidratos, aminoácidos (especialmente asparagina), y que sean sometidos a procesos de calentamiento a elevadas temperaturas. Destacan, por tanto, el café, el pan, galletas, los productos fritos como las patatas y los alimentos infantiles a base de cereales.

A día de hoy, la evidencia en animales apunta hacia el efecto neurotóxico y carcinogénico de la acrilamida, aunque este último no queda claro para el caso de los humanos (*9*, *10*). Sin embargo, dada la incertidumbre y el potencial peligro en este sentido, la Agencia Internacional para la

Investigación del Cáncer (IARC, de sus siglas en inglés) la clasifica dentro del grupo 2A (*11*), como "probablemente carcinogénico para humanos". En la base de datos de la ECHA (European Chemicals Agency), aparece como sustancia posiblemente carcinogénica, mutagénica y peligrosa para la piel (*12*).

En este contexto, es evidente que la presencia de acrilamida en alimentos preparados es un parámetro de obligado control. Como tal, y según se desprende de la normativa europea (*13*), existe un valor límite para una serie de alimentos (productos de panadería, café y derivados, comidas infantiles…) así como una colección de prácticas de producción, desde la agronomía hasta el preparado, pasando por la formulación. Para el caso particular del pan, se recomienda mantener los cultivos libres de infecciones por hongos, la sustitución de fructosa por glucosa, o la optimización de los procesos de cocción del pan para disminuir, en la medida de lo posible, la formación de acrilamida.

Sin embargo, esta normativa encuentra su límite en los hogares. Si bien algunos productos que tienen prevista su finalización en casa (como podría ser algunos panes que se terminan de cocer en el hogar) sí están incluidos en la normativa europea y por tanto contienen instrucciones y recomendaciones, existen otros que escapan completamente de su alcance. Es el caso, por ejemplo, de las tostadas de pan. En este sentido, el Ministerio de Sanidad publicó en el 2019 una campaña titulada "con la acrilamida, no desentones. Elige dorado, elige salud" (*14*) con el objetivo de concienciar al consumidor final de la importancia de la minimización del contenido de acrilamida. En ella, se hace énfasis en la importancia del color como aproximación al nivel de esta sustancia en el producto final.

Dispositivos móviles para el control de parámetros químicos de interés

A modo de aproximación sencilla, *in situ* y conocida por el consumidor, los móviles se presentan como una herramienta adecuada para la determinación de ciertos parámetros químicos de interés. En este caso, el objetivo del trabajo (*15*) pasó por determinar la posibilidad de hacer uso de un teléfono móvil como herramienta de captura del color con el fin de establecer una correlación entre acrilamida y color final de la tostada.

Utilizando pan de molde a base de harina de trigo refinada, se prepararon tostadas mediante una tostadora comercial, y se sometieron a diferentes tiempos de calentamiento para obtener una graduación de color. A continuación, se fotografiaron las muestras antes de ser analizadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Para ello, se hizo uso de una cabina de luz portátil que proporcionara una iluminación constante a las muestras, que se introducían en la cabina junto con un blanco de referencia para contrarrestar pequeños cambios en la iluminación. Haciendo uso de un dispositivo móvil, se capturaron las imágenes y mediante tratamiento de imagen haciendo uso del *toolbox* "colorlab" (*16*) se extrajeron parámetros de color RGB y CIEL*C*h*.

De esta manera, los resultados de color se hicieron corresponder con las concentraciones observadas mediante LC-MS para estudiar las posibles correlaciones.

En este punto, cabe mencionar la colorimetría y el concepto de espacio de color, dado que son las herramientas utilizadas en la aplicación de dispositivos móviles como instrumentos de análisis del color. El archivo de imagen codifica la información referente al color en una serie de parámetros a los que habitualmente se les conoce como canales. Éstos, generalmente, vienen en tríadas: por ejemplo, el espacio de color RGB, está compuesto por R, G y B, que hacen referencia a los canales que representan rojo, verde y azul, respectivamente. Así, un color vendrá representado por un vector de dimensión 3x1, de los cuales el (255, 255, 255) o su versión normalizada (1, 1, 1) representan el blanco, y el (0, 0, 0) representa el negro.

Sin embargo, existen otros sistemas alternativos de codificación del color, como el CIE L*C*h*, que funcionan de manera similar: un canal, el L* (luminancia) representa la cantidad de luz que tiene dicho color, tomando valores más elevados para colores más claro, y valores menores para colores oscuros; y dos canales (C* y h*) que representan el color en coordenadas cilíndricas. Por un lado, la cromaticidad (C*) representa la *cantidad* de color, y sería el módulo del vector; por otro lado, el tono (h*), que representa la *naturaleza* de dicho color, y sería el ángulo de dicho vector.

Los resultados obtenidos permitieron observar correlación entre el parámetro R con respecto al contenido global de acrilamida en la tostada, como se puede observar en la **Figura 1**. Como se aprecia, los valores R van en decrecimiento a medida que aumenta la concentración de acrilamida debido al hecho de que el color global de la tostada se oscurece con el calentamiento (*15*). La tendencia, en el caso del parámetro que indica el tono (h*), es

también descendente, pero en este caso no sigue un comportamiento lineal. La variación de este último parámetro indica que el color de la tostada pasa desde un amarillo inicial hacia el rojo.

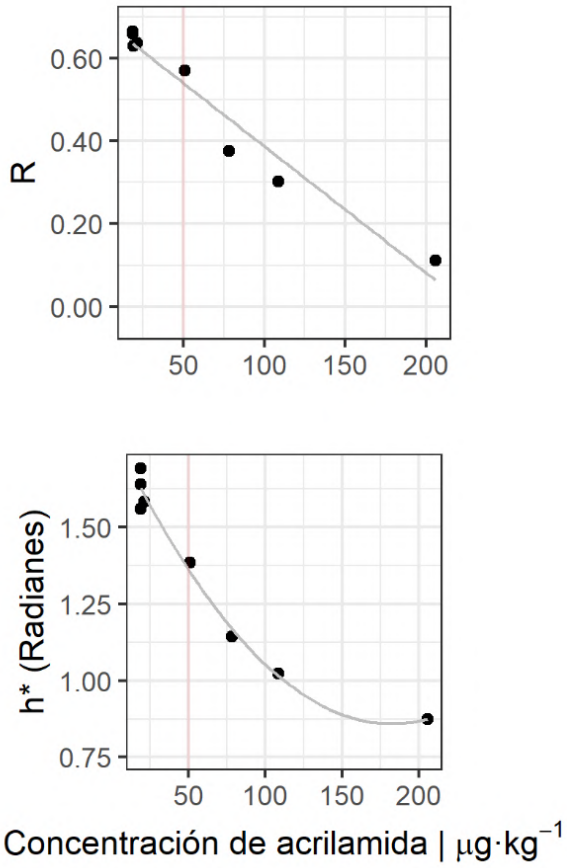


Figura 1: Correlación entre los parámetros R y h* y la concentración promedio de acrilamida en las tostadas. Los ajustes se realizaron mediante un modelo lineal y un polinómico, respectivamente.

Mediante esta aproximación se observa que los límites marcados en rojo, correspondientes al valor máximo recomendado en la Directiva 2017/2158, quedan delimitados en términos de color en las condiciones de trabajo estudiadas. Así, es sencillo discriminar una tostada que supere el contenido promedio máximo simplemente en base al color que presenten sus caras.

En la Figura 2 se presenta de manera visual la relación entre la concentración global de acrilamida, el valor de tono (en radianes) y el color de una de las caras de algunas de las muestras.

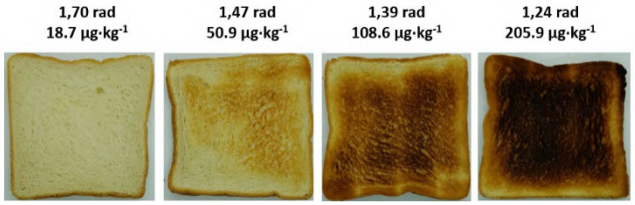


Figura 2: Valores de tono (h*), concentraciones globales de acrilamida encontradas y aspecto de la tostada.

En resumen

De los resultados de la investigación se desprende que existe un potencial desarrollo de herramientas *in situ* para la determinación de acrilamida en tostadas, que permitiría al usuario final establecer, de manera cuantitativa, si el alimento se encuentra dentro de los márgenes considerados como seguros para el consumo.

Este tipo de aproximaciones analíticas han de tomarse, en todo caso, con las precauciones pertinentes. A saber, se trata de dispositivos que no fueron originalmente diseñados con tal fin, de manera que los resultados son fiables siempre que se trabaje en las condiciones en las que se ha desarrollado la optimización.

En este sentido, las condiciones de iluminación suponen un factor crucial a la hora de asegurar, por un lado, la repetibilidad de los resultados. Por otro lado, existe el factor de la variabilidad entre dispositivos. Dado que los fabricantes de dispositivos móviles aplican diferentes filtros y procesos automáticos de modificación y mejora de la imagen, el color final que representa la imagen no tiene por qué corresponderse con el color real de la muestra. Para ello, y en función de cuál sea el objetivo final de la investigación, es necesaria una caracterización de la respuesta de la cámara en las condiciones de trabajo.

En esta dirección se centra una parte de la investigación del grupo, en colaboración con el departamento de Óptica, Optometría y Ciencias de la Visión de la Universitat de València, poniendo el foco en el análisis de muestras de carácter alimentario con casos de estudio particulares como el presentado en este breve resumen, o en la lucha del fraude alimentario (*17*), así como en el estudio de muestras patrimoniales y arqueológicas (*18*).

Agradecimientos

Roberto Sáez-Hernández agradece al Ministerio de Universidades por un contrato FPU19/02304. El trabajo fue financiado por el proyecto PROMETEO/2019/056. Este trabajo fue llevado a cabo en colaboración con el Laboratorio de Salud Pública de Valencia.

Referencias

1. S. E. Seo, F. Tabei, S. J. Park, B. Askarian, K. H. Kim, G. Moallem, J. W. Chong, O. S. Kwon, Smartphone with optical, physical, and

electrochemical nanobiosensors. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. **77**, 1–11 (2019).

2. Molecule of the week - Acrylamide. *American Chemical Society*, (available at https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/a/acrylamide.html).
3. E. Tareke, P. Rydberg, P. Karlsson, S. Eriksson, M. Törnqvist, Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**, 4998–5006 (2002).
4. R. E. Löfstedt, Science Communication and the Swedish Acrylamide "Alarm." *Journal of Health Communication*. **8**, 407–432 (2003).
5. Opinion of the Scientific Committee on Food on new findings regarding the presence of acrylamide in food. Health & Consumer Protection Directorate-General. European Commission, 2002.
6. F. Pedreschi, P. Moyano, K. Kaack, K. Granby, Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Research International*. **38**, 1–9 (2005).
7. J. Keramat, A. LeBail, C. Prost, N. Soltanizadeh, Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. *Food and Bioprocess Technology*. **4**, 340–363 (2011).
8. Food Drink Europe, "Acrylamide Toolbox" (Brussels, 2019). https://www.fooddrinkeurope.eu/wp-content/uploads/2021/05/FoodDrinkEurope_Acrylamide_Toolbox_2019.pdf
9. S. F. Fernández, O. Pardo, C. Coscollà, V. Yusà, Exposure assessment of Spanish lactating mothers to acrylamide via human biomonitoring. *Environmental Research*. **203**, 111832 (2022).
10. G. Eisenbrand, Revisiting the evidence for genotoxicity of acrylamide (AA), key to risk assessment of dietary AA exposure. *Archives of Toxicology*. **94**, 2939–2950 (2020).
11. Acrylamide – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans, (available at https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/).
12. Substance Information - Acrylamide, (available at https://echa.europa.eu/substance-information/-/substanceinfo/100.001.067).
13. European Comission, *Comission regulation (EU) 2017/ 2158 of 20 November 2017 - establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food* (http://data.europa.eu/eli/reg/2017/2158/oj).
14. *Con la acrilamida no desentones. Elige dorado, elige salud* (2018; https://www.youtube.com/watch?v=tcuu2zz3hXo).
15. R. Sáez-Hernández, P. Ruiz, A. R. Mauri-Aucejo, V. Yusa, M. L. Cervera, Determination of acrylamide in toasts using digital image colorimetry by smartphone. *Food Control*. **141**, 109163 (2022).
16. J. Malo, M.J. Luque, ColorLab: the Matlab toolbox for Colorimetry and Color Vision (2002), (available at http://isp.uv.es/code/visioncolor/colorlab.html).
17. R. Sáez-Hernández, K. U. Antela, A. R. Mauri-Aucejo, A. Morales-Rubio, M. L. Cervera, Smartphone-based colorimetric study of adulterated tuna samples. *Food Chemistry*. **389**, 133063 (2022).
18. M. Ramacciotti, G. Gallello, M. Lezzerini, S. Pagnotta, A. Aquino, L. Alapont, J. A. Martín Ruiz, A. Pérez-Malumbres Landa, R. Hiraldo Aguilera, D. Godoy Ruiz, A. Morales-Rubio, M. L. Cervera, A. Pastor, Smartphone application for ancient mortars identification developed by a multi-analytical approach. *Journal of Archaeological Science: Reports*. **43**, 103433 (2022).

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS PARA DETECTAR CAMBIOS EN LOS PERFILES DE EXPRESIÓN DE ARNs LARGOS NO CODIFICANTES ASOCIADOS A CÁNCER

Rebeca Miranda Castro, Raquel Sánchez Salcedo, Noemí de los Santos Álvarez, María Jesús Lobo Castañón
Grupo de Electroanálisis (GEUO). Dpto. Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo.
Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias (ISPA)

1. Introducción

Como resultado del envejecimiento demográfico y la globalización de estilos de vida poco saludables, la incidencia del cáncer a nivel mundial aumenta de forma constante, y ni siquiera una pandemia ha conseguido reducir su prevalencia [1]. La mayoría de los cánceres se detectan cuando los síntomas se hacen evidentes; sin embargo, los beneficios de la terapia médica son más limitados en los cánceres en estado avanzado. Por el contrario, una detección temprana del cáncer suele ofrecer una alta probabilidad de ser tratado y curado.

Para optimizar los programas de detección y desarrollar enfoques novedosos para el diagnóstico temprano, resulta necesario disponer de nuevos biomarcadores para la detección fiable y eficiente de los primeros signos del cáncer, especialmente en los tipos de tumores que suelen diagnosticarse en etapas tardías como el cáncer de páncreas o de pulmón, así como en aquellos tumores cuyos biomarcadores actuales se ven alterados no solo cuando se produce una proliferación maligna de células sino también cuando se desarrollan lesiones benignas como el cáncer de próstata y el colorrectal. Además, debido a la diversidad molecular del cáncer, un único biomarcador suele mostrar un potencial diagnóstico limitado. Por ello, resulta más efectivo el empleo de un panel de biomarcadores circulantes, lo que exige el desarrollo de ensayos multianalito.

En este contexto, el transcriptoma circulante ha despertado grandes expectativas entre los investigadores. El desciframiento del genoma humano trajo consigo importantes hitos, algunos de los cuales fueron tan llamativos como que la mayor parte del ADN genómico se transcribe a ARN (al menos el 90%), aunque los genes que codifican proteínas representan menos del 2% del genoma humano completo. Estos resultados chocan con la tendencia a considerar las proteínas como los principales actores en las funciones celulares y el ARN como un simple intermediario en la maquinaria de síntesis proteica. La pregunta que surgió a partir de estos hallazgos fue la siguiente: ¿tiene el transcriptoma humano no codificante un significado biológico o, por el contrario, es un mero "turista" en el camino evolutivo? Aunque inicialmente se descartó como simple ruido transcripcional, considerando el gasto energético que supone para las células, cabría esperar que al menos parte de este ARN no codificante desempañase alguna función en el organismo. La exploración profunda del transcriptoma humano ha señalado la necesidad de reconsiderar la idea inicial.

2. ARNs largos no codificantes: nuevos actores en la investigación del cáncer

Recientemente, con los avances en la tecnología de secuenciación de ARN, una nueva categoría de transcritos no codificantes se ha convertido en el centro de atención, los llamados ARNs largos no codificantes, abreviados como lncRNAs, por sus siglas en inglés. Los lncRNAs constituyen un subconjunto extenso y heterogéneo de transcritos celulares, incapaces de codificar proteínas, con una longitud superior a 200 nucleótidos. Están implicados en un amplio repertorio de procesos biológicos [2] y sus alteraciones se han asociado a numerosas enfermedades humanas entre las que se incluye el cáncer. En el contexto del cáncer, los lncRNAs pueden funcionar como oncogenes o supresores de tumores. En consecuencia, los lncRNAs podrían utilizarse como herramientas de diagnóstico e incluso como dianas terapéuticas [3]. En el Grupo de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo estamos interesados en aprovechar su potencial diagnóstico.

Muchos estudios han demostrado la relevancia clínica del perfil de expresión alterado de ciertos lncRNAs en el cáncer. En consecuencia, sus niveles de expresión podrían emplearse para el diagnóstico de esta enfermedad, e incluso el pronóstico y la recidiva [4]. Gran parte de estas investigaciones se ha llevado a cabo con muestras de tejidos tumorales; pero también se ha explorado la relación entre los lncRNAs circulantes y el cáncer, encontrando cambios sustanciales en la abundancia de ciertos lncRNAs entre pacientes con cáncer e individuos sanos.

La importancia de los lncRNAs en el cáncer se ha investigado fundamentalmente mediante la secuenciación del ARN [5]; sin embargo, este método es muy laborioso y sigue siendo caro de implementar como prueba molecular de rutina. Alternativamente, se han descrito algunos métodos analíticos para la determinación de lncRNAs asociados al cáncer [6] y estos implican procedimientos de varias etapas que requieren tiempos largos. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de disponer de dispositivos que sean muy sensibles y selectivos, para minimizar falsos negativos y falsos positivos, además de rápidos, con un precio asequible, fáciles de utilizar y con capacidad de multiplexado para la detección de lncRNAs asociados a cáncer.

Los dispositivos de bioanálisis electroquímico, también conocidos como genosensores y genoensayos electroquímicos, tienen el potencial para abordar este desafío y se han logrado grandes avances en este campo.

Estos utilizan la reacción de hibridación, es decir, el emparejamiento de hebras complementarias de ácidos nucleicos de acuerdo con las reglas de Watson-Crick, como reacción de reconocimiento biomolecular, la cual exhibe una enorme selectividad. Además, la transducción electroquímica ha demostrado ser particularmente adecuada para el desarrollo de dispositivos analíticos portátiles de bajo coste y consumo energético [7]. Las ventajas de la miniaturización (volúmenes de muestra reducidos, tiempos de reacción más rápidos y la posibilidad de detección multiplexada, es decir, la capacidad de interrogar varias dianas a la vez) son de particular interés en el diagnóstico clínico y, específicamente, en el manejo del cáncer.

3. Detección de lncRNAs asociados a CCR

En nuestro grupo de investigación nos hemos centrado en el cáncer colorrectal (CCR) que se origina en el epitelio intestinal, representa la segunda causa de mortalidad asociada a cáncer en el mundo y ocupa el tercer lugar en términos de incidencia [1]. Se han descrito varios lncRNAs como potenciales marcadores de este tipo de cáncer entre los que destaca el transcrito 1 asociado a cáncer de colon o CCAT1, cuya expresión se encuentra alterada tanto en tejidos como en fluidos biológicos de pacientes con CCR [8]. Por ello, nos hemos propuesto desarrollar genosensores electroquímicos para el lncRNA CCAT1 como prueba de biopsia líquida para la detección precoz de este tipo de cáncer [9].

Los sensores de hibridación tipo sándwich han demostrado ser de gran utilidad para detectar secuencias de ADN y ARN. Sin embargo, para aplicar esta tecnología al desarrollo de pruebas mínimamente invasivas basadas en la detección del lncRNA CCAT1, es necesario tener en cuenta algunas consideraciones. En primer lugar, el ensayo debe permitir la determinación precisa del lncRNA a niveles muy bajos en una muestra compleja como suero o plasma. La longitud de la secuencia diana y su fuerte estructura secundaria interna son factores cruciales que deben considerarse para minimizar la pérdida de sensibilidad. Además, el ARN debe extraerse de la muestra, y se necesita una cuantificación relativa para reducir errores debidos a variaciones en la calidad y cantidad del ARN extraído. Esto implica determinar los cambios en la expresión del lncRNA CCAT1 relativos a los niveles de un control interno de ARN, que se expresa de manera estable en las muestras evaluadas.

Para superar estos retos, hemos desarrollado dos sensores para la detección de fragmentos específicos de CCAT1, potencial biomarcador de CCR, y GAPDH, un gen endógeno comúnmente empleado como referencia. El diseño se basa en una estrategia general para maximizar la sensibilidad de los genosensores tipo sándwich [10]. Seleccionando una secuencia diana de longitud suficiente, es posible diseñar varias sondas de detección (DP), que se hibridan simultáneamente con las regiones complementarias de la diana. De esta forma, una vez atrapado el dúplex sobre la fase sensora, una única molécula diana se unirá a múltiples enzimas rédox utilizadas como moléculas indicadoras, con la consiguiente amplificación de la señal.

3.1. Diseño de genosensores para CCAT1 y GAPDH

Una etapa crítica en el diseño de un genosensor es la selección *in silico* de la secuencia diana y de las correspondientes sondas complementarias que determinarán la sensibilidad y la selectividad de la plataforma de detección. La longitud de la diana también es clave. Habitualmente oscila entre 65 nt y 200 nt, lo suficientemente larga como para permitir el diseño de múltiples DPs y lo suficientemente corta para hacer posible la formación de un dúplex ADN/ARN en superficie tras la hibridación con la sonda de captura y las sondas de detección. A partir de la base de datos GenBank se obtiene la secuencia de bases completa de los transcritos CCAT1 y GAPDH. Empleando la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST se identifican fragmentos específicos del tamaño deseado para cada transcrito. Con la ayuda del programa Mfold se analizan las distintas opciones y se escoge aquella con menor estructura secundaria.

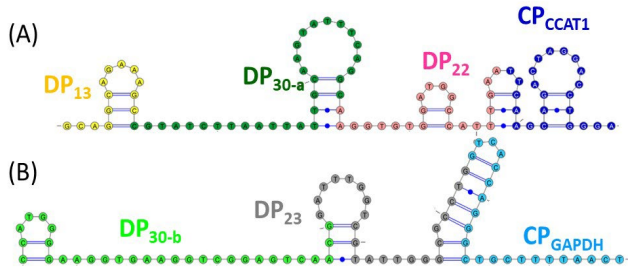


Figura 1. *Estructura secundaria más estable para la secuencia específica del transcrito (A) CCAT1 (88 nucleótidos) y (B) GAPDH (75 nucleótidos) a 25°C y 0,3 M de Na^+ obtenida con el programa Mfold. Las regiones coloreadas son complementarias a la sonda de captura (CP) o a las sondas de detección (DP) indicadas.*

Cumpliendo con los criterios anteriores, se seleccionó un fragmento de 88 nt como diana para detectar el lncRNA CCAT1, y un fragmento de 75 nt para la detección del transcrito GAPDH. La estructura secundaria de ambos fragmentos se muestra en la Figura 1. A continuación se diseñó una sonda de captura complementaria al extremo 3' de la secuencia diana y varias sondas de detección (3 para CCAT1 y 2 para GAPDH) complementarias al resto de la secuencia para romper el plegamiento interno del analito, asegurando la formación de un dúplex perfecto tras la hibridación con la consiguiente mejora de la sensibilidad.

3.2. Desarrollo y optimización de los genosensores

La fase sensora selectiva al CCAT1 se construye sobre electrodos serigrafiados de oro mediante quimisorción de la sonda de captura tiolada, y el oro que queda sin recubrir se bloquea con *p*-aminotiofenol (Figura 2). Esta fase sensora hibrida con el dúplex generado en

disolución entre la secuencia diana y las 3 sondas de detección modificadas con fluoresceína mediante choque térmico. El complejo resultante se incuba con la enzima peroxidasa conjugada al fragmento Fab del anticuerpo antifluoresceína. Mediante la interacción de afinidad fluoresceína-antifluoresceína se fijan múltiples moléculas de enzima por cada híbrido formado sobre la superficie sensora. Finalmente, se añaden los sustratos de la enzima (peróxido de hidrógeno y 3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para medir la actividad enzimática inmovilizada mediante cronoamperometría. La intensidad de corriente eléctrica registrada es directamente proporcional a la concentración de CCAT1 presente en la muestra.

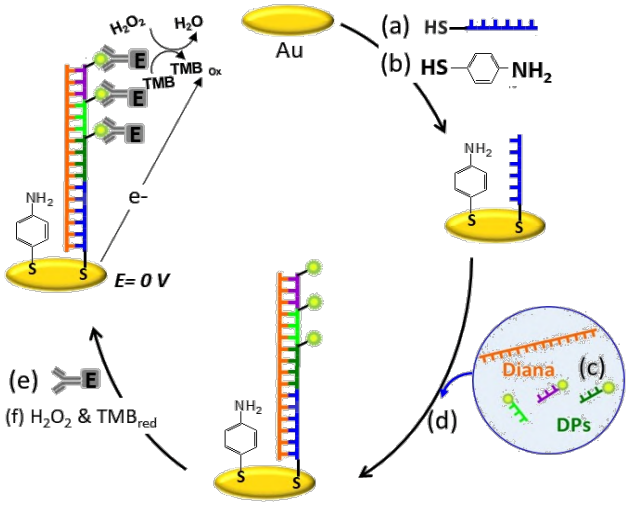


Figura 2. *Diseño de los genosensores electroquímicos: (a) quimisorción de la sonda de captura tiolada, (b) bloqueo con p-aminotiofenol, (c) hibridación homogénea entre la secuencia diana y las sondas de detección funcionalizadas con fluoresceína, (d) hibridación heterogénea, (e) marcaje enzimático, (f) reacción enzimática y detección cronoamperométrica.*

Para evitar conclusiones equivocadas derivadas de la inestabilidad del ARN, el desarrollo y optimización del genosensor electroquímico se llevó a cabo empleando un fragmento de ADN cuya secuencia de bases coincide con la del ARN de interés. Este genosensor presenta un intervalo de respuesta lineal comprendido entre 5 y 500 pM de CCAT1 (I_{net} (μA) = (9,7 ± 0,4) [CCAT1] (nM) + (0,10 ± 0,07); r = 0,996), con un límite de detección estimado de 990 fM, y una reproducibilidad promedio del 21%.

A continuación, se construyó un genosensor para detectar el fragmento de 75 nucleótidos específico de GAPDH, aplicando una estrategia equivalente a la descrita para el CCAT1. De esta forma, se busca normalizar la señal registrada para el CCAT1 y lograr su cuantificación fiable, excluyendo cualquier variación inespecífica. Para el control endógeno se diseñaron 2 sondas de detección marcadas con fluoresceína, pues su cantidad en la muestra se espera que sea superior a la del lncRNA CCAT1. Este genosensor permite detectar GAPDH sintético con un intervalo de respuesta lineal comprendido entre 10 pM y 1 nM (I_{net} (μA) = (7,3 ± 0,1) [GAPDH] (nM) + (0,04 ± 0,05); r = 0,9995), una reproducibilidad media del 18,5% y un límite de detección de 1,83 pM.

Comparando las características analíticas de ambos genosensores, observamos que la sensibilidad para detectar CCAT1 es 1,34 veces superior a la obtenida para GAPDH, lo que concuerda con la diferencia en el número de sondas de detección empleadas en ambos genosensores: 3 para CCAT1 y 2 para GAPDH. De esta forma, teóricamente, se incorporan 1,5 veces más moléculas de enzima por evento de hibridación en el caso del CCAT1, con el consiguiente aumento de la señal analítica. Estos resultados respaldan la posibilidad de regular la sensibilidad del ensayo ajustando el número de sondas de detección al nivel de expresión del ácido nucleico diana en la muestra.

3.3. Detección de CCAT1 en líneas celulares tumorales

Una vez evaluadas las características analíticas de los genosensores electroquímicos, el siguiente paso consistió en detectar ambos transcritos (CCAT1 y GAPDH) en líneas celulares tumorales. Para ello, seleccionamos la línea celular HT29 derivada de adenocarcinoma de colon humano. Tras extraer el ARN total, comenzamos estimando la abundancia relativa de CCAT1 con respecto a GAPDH mediante PCR cuantitativa con una etapa previa de transcripción inversa (RT-qPCR). Para esta relación se obtuvo un valor de 0,040 ± 0,001 que evidencia la necesidad de disponer de un método más sensible para detectar CCAT1 que para determinar GAPDH. En el presente trabajo, se trató de satisfacer este requisito utilizando un número diferente de sondas de detección y, en consecuencia, distinto número de marcadores enzimáticos por molécula diana.

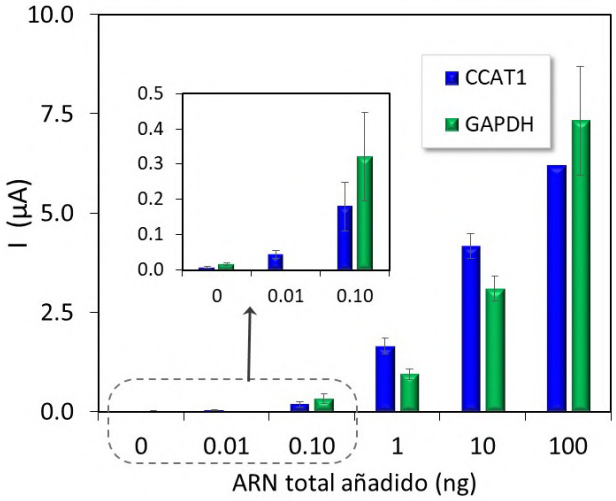


Figura 3. *Respuesta de los sensores de CCAT1 (azul) y GAPDH (verde) a los productos de amplificación obtenidos mediante RT-PCR, a partir de diferentes cantidades de ARN total extraído de células HT29.*

A continuación, enfrentamos el genosensor desarrollado para CCAT1 con ARN total extraído de la línea celular HT29, obteniendo señales que son significativamente

distintas de la registrada para el blanco del calibrado; mientras que para la línea celular LNCaP, que no expresa CCAT1, registramos señales similares a la del blanco, concluyendo que los genosensores son selectivos a la diana para la que fueron diseñados. Sin embargo, encontramos limitaciones de sensibilidad pues el genosensor de CCAT1 permite detectar el lncRNA CCAT1 presente en varios millones de células HT29; pero cabría esperar que los niveles de este lncRNA circulante en plasma humano sean menores que en la línea celular tumoral. Por este motivo, se decidió acoplar los genosensores desarrollados con una etapa previa de transcripción inversa seguida de una PCR de punto final.

Para garantizar la cuantificación fiable de las copias de CCAT1 y GAPDH y, a su vez, la relación entre la cantidad inicial de transcrito y la señal electroquímica obtenida para los productos de PCR, se llevó a cabo la reacción de amplificación en su fase de crecimiento exponencial, evitando que la PCR alcance su fase de saturación. Basándonos en los resultados de RT-qPCR y tratando de detectar la cantidad de lncRNA más baja posible, seleccionamos 30 y 27 ciclos de amplificación para CCAT1 y GAPDH, respectivamente. De esta forma fue posible la cuantificación individual de CCAT1 y GAPDH en un número de células mucho menor (Figura 3).

3.4. Detección de CCAT1 en muestras de plasma

Tras demostrar la capacidad para detectar el lncRNA CCAT1 en las células tumorales HT29 y teniendo en cuenta la falta de patrones para este transcrito, analizamos muestras de plasma de individuos sanos suplementadas con 10 ng de ARN total extraído de las células tumorales.

Para evitar la necesidad de realizar dos amplificaciones independientes, una para cada transcrito, realizamos 28 ciclos de RT-PCR de punto final después de la extracción de ARN de muestras de plasma enriquecidas con diluciones seriadas de 10 ng a 0,01 ng del ARN celular tumoral. Posteriormente, los genosensores para CCAT1 y GAPDH se incubaron con los correspondientes amplicones tras una dilución 1:100 (Figura 4A). La señal neta, restando la obtenida para el plasma, aumenta con la cantidad inicial de ARN total añadida hasta alcanzar la saturación (Figura 4B). Las curvas de respuesta resultantes se ajustan al modelo de Langmuir, ($I = \frac{I_{max}\ m_{total\ RNA}(ng)}{K + m_{total\ RNA}(ng)}$), obteniendo las siguientes ecuaciones:

-para CCAT1:

$$I_{neta}\ (\mu A) = \frac{1{,}92(\pm 0{,}17)\cdot m_{total\ RNA}(ng)}{2{,}31(\pm 0{,}51) + m_{total\ RNA}(ng)};\ R^2 = 0{,}993$$

-para GAPDH:

$$I_{neta}(\mu A) = \frac{2{,}29(\pm 0{,}32)\cdot m_{total\ RNA}(ng)}{0{,}11(\pm 0{,}08) + m_{total\ RNA}(ng)};\ R^2 = 0{,}994$$

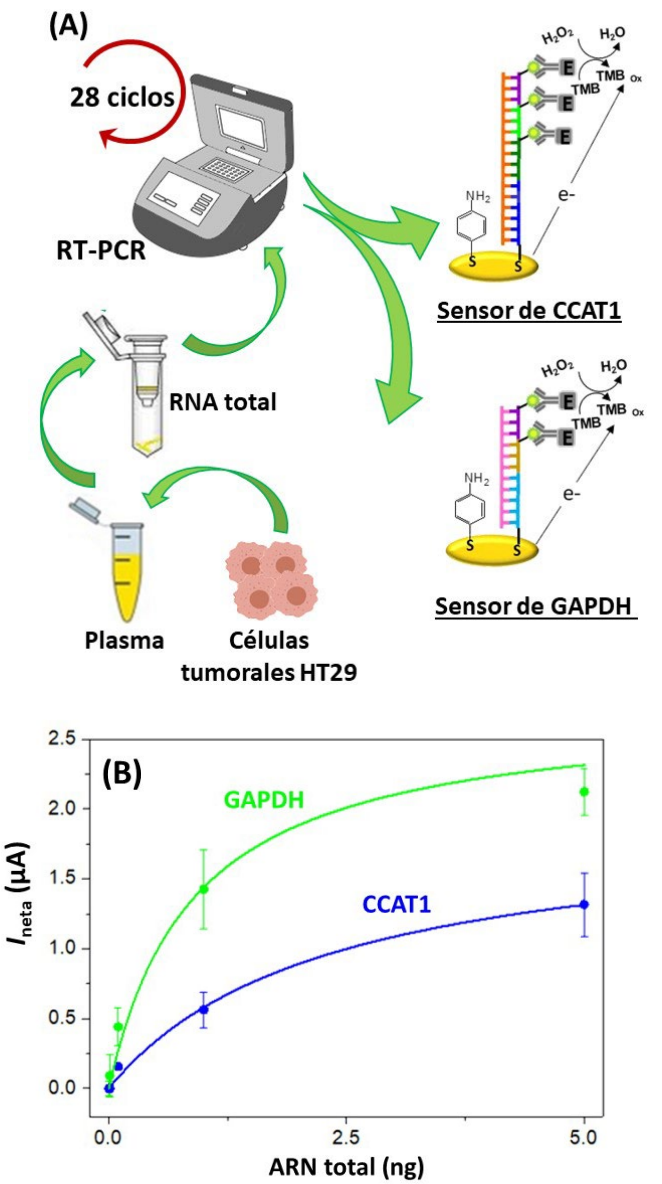


Figura 4. *(A) Representación esquemática de la metodología empleada para cuantificar CCAT1 en muestras de plasma. (B) Señales registradas con los genosensores de CCAT1 (azul) y GAPDH (verde) tras una etapa de amplificación mediante RT-PCR (28 ciclos) de muestras de plasma suplementadas con diferentes cantidades de ARN.*

La señal de saturación es 1,2 veces mayor para el transcrito de referencia, lo que puede atribuirse a una menor longitud del dúplex anclado en superficie. En cambio, en la región lineal de la curva de respuesta, la pendiente (I_{max}/K) es 25 veces mayor para GAPDH, de acuerdo con un mayor nivel de expresión del transcrito de referencia que de CCAT1 en las células. Esto conduce a una cantidad relativa de CCAT1 respecto a GAPDH en las células HT29 de 0,04, similar al valor obtenido mediante RT-qPCR. Por lo tanto, empleando la relación de señales de ambos sensores, y siempre que las medidas se realicen en la zona de respuesta lineal, es posible estimar la expresión relativa del transcrito diana en relación con el de referencia.

Finalmente, para ilustrar la utilidad de una plataforma electroquímica dual que integra ambos sensores, realizamos la amplificación por RT-PCR (28 ciclos) de las dos dianas simultáneamente en una misma reacción. La respuesta de los genosensores a la mezcla de amplicones no difiere significativamente de la observada para los productos de amplificación obtenidos de forma individual. Estos datos ponen de manifiesto el potencial de los sensores electroquímicos desarrollados para la cuantificación relativa de los niveles de expresión de CCAT1 en muestras de plasma.

Conclusiones

En este estudio presentamos una plataforma electroquímica para la cuantificación relativa de lncRNAs integrada por dos genosensores para detectar un transcrito específico y una secuencia de referencia. Esta plataforma se ha aplicado al análisis del lncRNA CCAT1, un biomarcador específico de cáncer colorrectal, y el ARN mensajero GAPDH que actúa como control interno, en muestras de plasma enriquecidas con ARN extraído de una línea celular tumoral de cáncer colorrectal. Su acoplamiento con RT-PCR de punto final permitió calcular el nivel de expresión de CCAT1 mediante la relación de señales electroquímicas de los transcritos diana (CCAT1) y referencia (GAPDH). Aunque nos centramos en el CCAT1, nuestro método podría aplicarse a otros lncRNAs asociados a diferentes tumores malignos para los que se ha descrito un nivel de expresión alterado.

Agradecimientos

Las autoras agradecen al Dr. Luis J. García Flórez y al Dr. Daniel Fernández Martínez del Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) por las muestras de plasma proporcionadas.
Este trabajo está financiado en la actualidad por el Ministerio de Ciencia y Universidades a través del proyecto RTI-2018-095756-B-I00. Raquel Sánchez Salcedo agradece al Gobierno de España su contrato predoctoral (MCIU-20-PRE2019–087618).

Referencias

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F, Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J. Clin. 2021; 71:209-249.

[2] Wang KC, Chang HY, Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. Mol. Cell. 2011; 43(6):904-14.

[3] (a) Chandra Gupta S, Nandan Tripathi Y, Potential of long non-coding RNAs in cancer patients: From biomarkers to therapeutic targets. Int. J. Cancer 2017; 140(9):1955-1967. (b) Renganathan A, Felley-Bosco E, Long noncoding RNAs in cancer and therapeutic potential. Chapter 7 in Long Non Coding RNA Biology, 2017. Springer. Ed: Rao, M.R.S.

[4] Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D, Long noncoding RNAs as biomarkers in cancer. Dis. Markers. 2017; 2017:7243968.

[5] Yamada A, Yu P, Lin W, Okugawa Y, Boland CR, Goel A, A RNA-sequencing approach for the identification of novel long non-coding RNA biomarkers in colorectal cancer. Scientific Reports. 2018; 8:575.

[6] Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ, Long noncoding RNAs: from genomic junk to rising stars in the early detection of cancer. Anal. Bioanal. Chem. 2019; 411(19):4265-4275.

[7] Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR, Electrochemical biosensors. Chem. Soc. Rev. 2010; 39(5):1247-63.

[8] (a) Alaiyan B, Ilyayev N, Stojadinovic A, et al. Differential expression of colon cancer associated transcript1 (CCAT1) along the colonic adenoma-carcinoma sequence. BMC Cancer. 2013; 13:196. (b) Zhao W, Song M, Zhang J, Kuerban M, Wang H, Combined identification of long non-coding RNA CCAT1 and HOTAIR in serum as an effective screening for colorectal carcinoma. Int. J. Clin. Exp. Pathol. 2015; 8:14131-14140.

[9] Sánchez-Salcedo R, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Fernández-Martínez D, García-Flórez LJ, Lobo-Castañón MJ, An electrochemical genosensing platform for the relative quantification of the circulating long noncoding RNA CCAT1 to aid in the diagnosis of colorectal cancer. Sens. Actuators B Chem. 2023; 376:132940.

[10] Sánchez-Salcedo R, Miranda-Castro R, de-los-Santos-Álvarez N, Lobo-Castañón MJ, Dual electrochemical genosensor for early diagnosis of prostate cancer through lncRNAs detection. Biosens. Bioelectron. 2021; 192:113520.

NUEVOS COMPONENTES FLUÍDICOS PARA HPLC PORTÁTIL CON PREPARACIÓN DE MUESTRA INTEGRADA

David J. Cocovi Solberg
Universidad de las Islas Baleares, Departamento de Química, Grupo FITRACE
Universidad de Ciencias de la Vida y Recursos Naturales en Viena, Departamento de Química, Instituto de Química Analítica

El objetivo de esta contribución es presentar la evolución y prospección de la línea de investigación compartida entre la Universidad de las Islas Baleares (UIB) y la Universidad de Ciencias de la Vida y Recursos Naturales de Viena (BOKU). La UIB tiene una larga historia en el desarrollo de técnicas de flujo, originándose en el grupo de Química Analítica, Automatización y Medio Ambiente, y posteriormente en el grupo de Análisis por Inyección en Flujo y Análisis de Trazas (FI-TRACE), creado en 2012. Una de las técnicas de flujo más populares es el Análisis por Inyección Secuencial (SIA), desarrollado en 1990 por Růzicka y Marshall[1], que consigue automatizar de manera flexible la mayor parte de las operaciones llevadas a cabo por el analista. Como muchos de los lectores de Actualidad Analítica saben, este método se basa en el uso de una bomba bidireccional y un selector, conectados por una determinada longitud de tubo (holding coil, HC) cuya función es la de impedir que los líquidos manipulados en el selector se introduzcan en la bomba y subsecuentemente la contaminación cruzada. Las muestras y reactivos se aspiran secuencialmente y reaccionan por contacto directo en el interior del HC. La difusividad de muestras y reactivos a través de la interfaz de área igual a la sección del tubo es el motivo por el cual la cinética de las reacciones es más lenta que en el Análisis por Inyección en Flujo, y el inconveniente más importante del SIA, para el que se han propuesto muchas soluciones. Una de las técnicas con mayor potencial que permite el SIA es el Bead Injection (BI), que consiste en la manipulación de sorbentes de fase solida en el interior del circuito fluídico tras suspenderlos en un disolvente apropiado. La suspensión se manipula como si fuera cualquier otro liquido; incluimos fritas en línea que permiten a los líquidos pasar a través, pero que impiden el movimiento del sorbente, por lo que este se compacta formando pequeñas columnas de extracción en fase sólida en línea. A continuación, la muestra se carga en la columna, esta se lava, y los analitos se miden directamente sobre el sorbente mediante técnicas ópticas, se eluyen offline y reservan para análisis mediante otra técnica, o se eluyen en línea a HPLC.

Métodos inteligentes

Uno de los recientes desarrollos entre las universidades de BOKU y UIB es el uso de métodos inteligentes para control de BI. La descarga del sorbente en el método de BI es el paso más complicado, puesto que este puede quedarse atascado tras ser compactado a elevadas presiones o ser perfundido por una muestra con materia particulada, sustancias de elevado peso molecular, o que se retienen irreversiblemente sobre él. Además, mientras que la carga se puede llevar a cabo a cualquier caudal, el caudal de descarga está limitado por la cavitación del disolvente, esto es, aspirar a caudales más elevados originara cavitación en vez de descarga. En una publicación reciente hemos utilizado las medidas de presión como indicador del estado de la microcolumna SPE[2] y un método inteligente para toma de decisiones a tiempo real. En primera instancia se calibra la presión del sorbente en el tubo frente a la masa de este que se recupera y la pendiente se introduce en el software. Para la aplicación, el usuario selecciona que masa de sorbente se requiere. El programa calcula automáticamente el volumen de suspensión que debe ser aspirada y empaqueta la columna SPE. En caso de que la presión sea inferior a la que corresponde a la masa deseada, el paso de carga se repite para la diferencia de masa, es decir, es un método de control proporcional. De igual manera para la descarga: si al final del paso de descarga la presión no corresponde a la del tubo vacío, el paso de descarga se repetirá hasta que el criterio de presión se cumpla dentro de una tolerancia especificada por el usuario.

Cromatografía de flujo turbulento

La cromatografía de flujo turbulento (TFC) es un modo de SPE patentado por Thermo como un método universal de preparación de muestra para muestras clínicas. Se basa en la diferente transferencia de masa entre compuestos de diferente peso molecular al ser cargados en la SPE a elevadas velocidades lineales: Los compuestos de bajo peso molecular entran en los poros del sorbente porque su transporte está dominado por difusión, mientras que los compuestos de elevado

peso molecular atraviesan la columna sin ser retenidos, independientemente de la química del sorbente porque su transporte está dominado por advección: debido a difusividades más pequeñas, no tienen tiempo de difundir hasta el sorbente y atraviesan la columna atrapadas en el flujo turbulento. Desde el punto de vista fluídico, este principio es muy conveniente puesto que usa las mismas fases y tamaños de partícula (hasta 60 µm) que el BI.

Hemos aplicado el principio de TFC en BI y caracterizado la retención de componentes en función del peso molecular utilizando globulinas como modelos (figura 1).

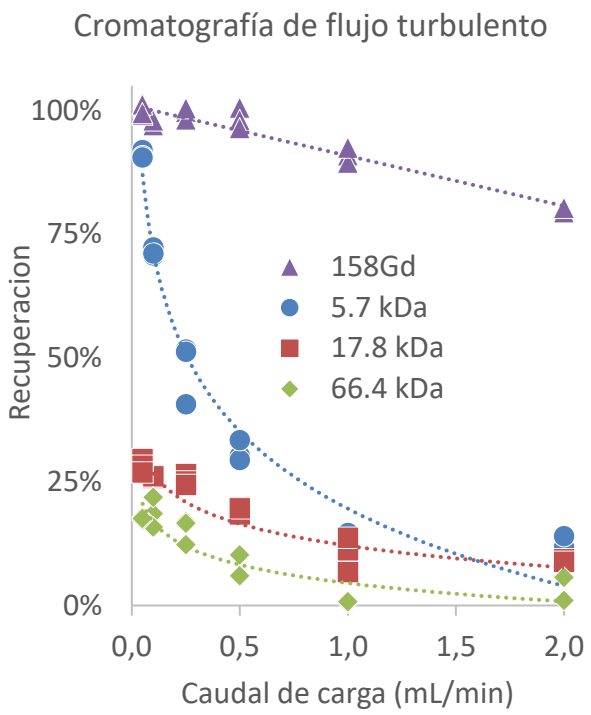


Figura 1. *Recuperacion de analitos de diferente peso molecular en funcion del caudal de carga.*

El límite entre el transporte dominado por difusión y advección depende del peso molecular del analito, pero tomado como referencia que un compuesto se retiene cuando su recuperación es mayor que 80% y que se excluye cuando esta es menor de 20%, se pueden tomar como caudales representativos 100 µL/min para el 'modo SPE', y 1 mL/min para el 'modo TFC', en el que las sustancias de elevado peso molecular se excluirán de la columna. Este modo tiene un elevado potencial de aplicación en muestras ambientales y clínicas, donde p. ej. los ácidos húmicos o proteínas, respectivamente, son interferentes potenciales.

Convolución de válvulas

Una mejora respecto a las autoburetas utilizadas inicialmente es la inclusión de una válvula en la cabeza de la jeringa, que permite rellenar la misma directamente desde un reservorio de portador, lo que acorta los tiempos de limpieza y mejora su eficiencia. Durante el desarrollo de software para control de equipos SIA[3] y en un intento de hacer los métodos más fáciles de programar y usar, nos dimos cuenta de la convolución de las posiciones de ambas válvulas. Para rellenar la jeringa la válvula cabezal debe conectar con el portador, mientras que la posición del selector no es importante, mientras que para seleccionar cualquiera de los líquidos, el cabezal debe conectar con el HC.

Esta convolución de las posiciones de las válvulas permite que ambas válvulas sean actuadas con un solo motor, y por extensión, permite que una sola válvula con un rotor y estator suficientemente complejos mimetice la función de ambas válvulas. Gracias a las posibilidades que la impresión 3D brinda, en 2017 diseñamos y fabricamos un prototipo de válvula con el que sustituimos la válvula cabezal incorporada en la bomba de jeringa Cavro XP3000[4] (figura 2).

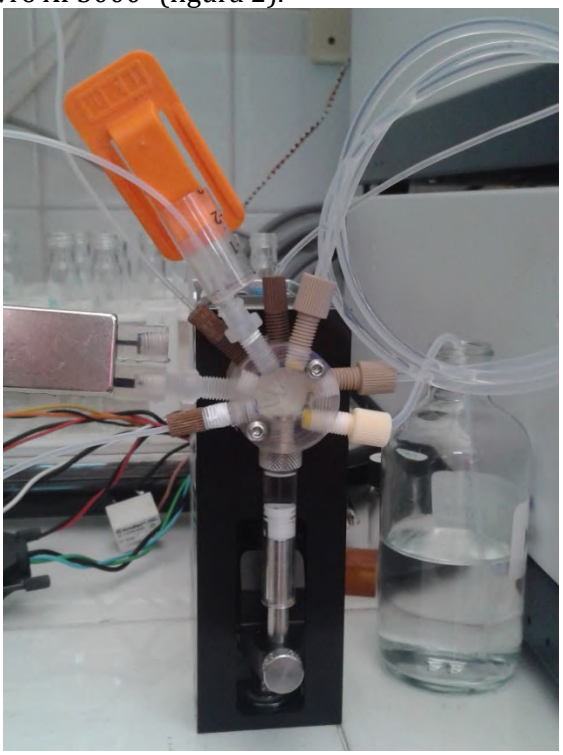
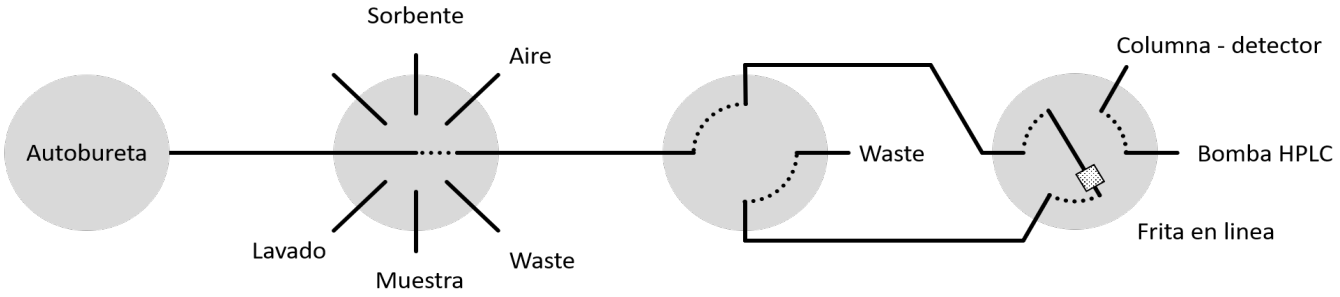


Figura 2. *Fotografia del prototipo de valvula montado sobre la bureta automatica Cavro XP3000 y que integra la funcionalidad completa del SIA (El HC puede verse en la parte superior derecha de la foto).*

A pesar del éxito fluídico de la válvula, la resina en la que estaba impresa tenía una compatibilidad química limitada, y el contacto constante con acetonitrilo prevenía su uso durante más de dos semanas. A un precio de 2.24 € por válvula, el estator podría haberse considerado un



consumible y ser reemplazado regularmente, pero preferimos fabricar un modelo permanente en un plástico como ULTEM o PEEK con mayor tolerancia a la presión y a disolventes. Nótese que un sistema SIA comercial cuesta cerca de 15000 €; los componentes individuales aprox. 1000 € por una bureta automática y 2500 € por un selector. El uso del prototipo presentado abarata el hardware de la técnica significativamente.

sorbente SPE es significativamente más grande, la transferencia de masa en el sorbente dominará el mínimo de Van Deemter y la banda de analitos entrará ensanchada en la columna cromatográfica, llevando a una disminución de la resolución.

Muchos hemos intentado hacer lo que los iniciados en el arte conocerán como 'bead injection con los beads en el bucle de inyección'. El primer inconveniente es que el sorbente no fluye

Figura 3. *Esquema de una autobureta y 3 válvulas para BI con eliminación del sorbente por presión positiva.*

En el grupo FITRACE hemos desarrollado varios métodos de bead injection utilizando diferentes plataformas fluídicas, tanto comerciales como fabricadas mediante impresión 3D. Aunque BI es una pareja perfecta para la cromatografía liquida, tanto por la versatilidad en la preparación de muestra como por la naturaleza de la interfaz fluídica, la elución convencional mediante heartcut presenta las desventajas de que (i) el eluato de alto poder eluotrópico originará ensanchamiento de bandas en LC a menos que la química de las columnas SPE y cromatográfica sean ortogonales, (ii) diferentes analitos presentan diferente enriquecimiento en diferentes fracciones del corte, y por lo tanto se requiere una exactitud exquisita en el corte para estudios cuantitativos y (iii) debido al corte, la transferencia del analito a la columna cromatográfica no es cuantitativa, por lo que la sensibilidad del método se ve mermada.

El uso del sorbente en el interior del bucle de inyección del HPLC soluciona los tres problemas anteriores, puesto que la elución del sorbente SPE se llevará a cabo mediante la misma fase móvil cromatográfica: las dos químicas no tienen que ser ortogonales, no se necesita calcular ningún corte y la transferencia de analito es cuantitativa por lo que la sensibilidad es óptima. Más aún, si el tamaño de partícula no es significativamente mayor en el sorbente SPE que en la columna LC, la resolución cromatográfica aumentará debido al volumen de fase estacionaria adicional (al igual que lo hará la presión de separación). Si por el contrario el

apropiadamente a través del inyector de HPLC. Los osados que han ensanchado el puerto del estator y el surco del rotor han descubierto el segundo problema: la reaspiración del sorbente es muy complicada debido a compactación tras someterlo a la alta presión del HPLC, incluso aunque dispongamos de control inteligente descrito en la sección anterior. La solución pasa por añadir una tercera válvula que invierte el flujo en el inyector del HPLC, para que tanto la carga y descarga del sorbente se lleven a cabo mediante presión positiva, como puede verse en la figura 3.

Contactamos a diferentes fabricantes de componentes fluídicos para explorar la fabricación de nuestro prototipo. VICI AG internacional se interesó por las posibilidades de diseñar válvulas dedicadas, lo que desemboco en una colaboración que dura hasta hoy en día. En principio el objetivo era diseñar una válvula capaz de realizar BI, con elución sin heartcut, 'heartcutless', es decir, con el sorbente en el bucle de inyección, y que fuera capaz de eliminar el sorbente mediante presión positiva. En 2021 obtuvimos un prototipo funcional que tolera hasta 120 bares y que es comercializado por VICI con numero de modelo C5-2359D-CU. La figura 4 muestra su estator asimétrico.

Esta válvula permite preparar la muestra mediante SPE (preconcentración, limpieza, cambio de matriz y cromatografía de flujo turbulento) a tiempo real, así como técnicas derivas (p. ej. derivatización sobre soporte solido) sin fases separadas de tratamiento de muestra e inyección online. La

cantidad de puertos accesorios mantiene la flexibilidad del SIA, tal como demostramos en una publicación que se encuentra en preparación[5] en la que muestras de suelo son extraídas en la propia válvula a tiempo real utilizando hidroxipropil-β-ciclodextrina en un test de bioaccesibilidad para determinar la fracción biodegradable de hidrocarburos aromáticos policíclicos así como su distribución entre diversas fases mineralógicas y las constantes cinéticas para su extracción de cada una de ellas.

Figura 4. *Estator de la válvula C5-2359D-CU. Nótese el diseño no convencional altamente asimétrico, así como los puertos dedicados para la bomba (P), detector (D), bucle de inyección (L1, L2) y Waste (W).*

Portabilidad, electrónica y software

La adición de una derivación entre el puerto dedicado a la bomba HPLC y uno de los puertos del selector, permite que la propia autobureta dispense la fase móvil. Se usó una bomba M6HP de VICI, que es capaz de ejercer hasta 100 bares de presión. Junto con la tolerancia del prototipo C5-2359D-CU permite la cromatografía con columnas monolíticas o columnas cortas core-shell, borrando las fronteras entre el SIA para la preparación de muestra y un cromatógrafo isocrático.

Para aumentar la portabilidad del SIA formado por la bomba M6HP y la válvula C5-2359D-CU, se eliminaron las carcasas y los controladores de los motores, consiguiendo un peso total por debajo de dos kilos. Una sola fuente de alimentación es suficiente para los dos motores puesto que en ningún caso se mueven simultáneamente: la válvula no se mueve mientras la bomba está en funcionamiento. Esta fuente original de 24 V y 2.4 A, se sustituyó por un microcontrolador STUSB4500 capaz de negociar la demanda de energía desde una interfaz USB-C, que se configuró a 20 V y 3 A. El efecto de la diferencia de 24 a 20 V es despreciable puesto que el sobrevoltaje desde el valor de alimentación continua (3 V) solo se utiliza para alcanzar la saturación magnética de las bobinas en un tiempo inferior a la diferencia entre dos micropasos consecutivos. No se observó ningún efecto adverso por debajo de 2 mL/min. Es decir, el cromatógrafo isocrático con preparación de muestra integrada se alimenta por USB-C. Todos los experimentos ulteriores se llevaron a cabo con una fuente de alimentación por baterías USB-C de 60 W, que aumenta el peso del prototipo hasta 2.5 kg, como se muestra en la figura 5.

Los controladores de los motores de pasos se sustituyeron por un microcontrolador Adafruit STM32F405 y dos drivers TMC2209 controlados por código abierto en CircuitPython. Estos drivers se encargan de controlar la velocidad, aceleración y posición de los motores. En cuanto a la ejecución del método SIA o cromatográfico, a los chips anteriores se añadió una pantalla táctil y un sistema operativo dedicado almacenado en la memoria flash. Este sistema permite guardar los métodos, así como los datos adquiridos en una tarjeta SD. La ejecución del método se basa al igual que en el SIA convencional en seleccionar una posición de la válvula y aspirar o dispensar un determinado volumen a un determinado caudal. La adición de tiempos muertos, bucles y condicionales permite la ejecución de métodos inteligentes.

Figura 5. *Fotografia del prototipo de HPLC portatil formado por la bomba de pistones axiales M6HP y la valvula C5-2359D-CU; controlador con pantalla tactil y power bank. El peso total esta por debajo de 2.5 kg.*

Generación de gradiente

La investigación actual se centra en la generación de gradiente en el sistema anterior que utiliza una sola bomba de 100 bares. La bomba de pistones axiales M6HP rellena los pistones síncronamente

con su descarga, es decir, dispensa el volumen de líquido que contiene en sus 100 µL de volumen interno, al mismo tiempo que rellena este volumen desde el puerto de aspiración. Los resultados de generación de un gradiente mediante válvula solenoide pre-M6HP, es decir, el mismo sistema que en una bomba de HPLC con gradiente de baja presión puede verse en la figura 6.

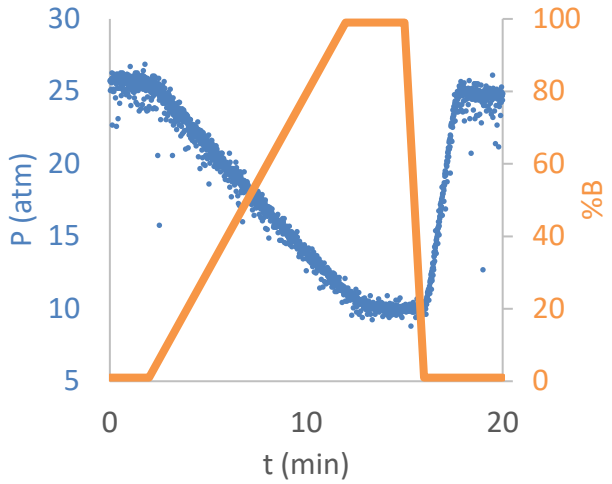


Figura 6. *Gradiente generado mediante mezcla a baja presion y compresión con la bomba M6HP.*

El consumo energético de la válvula solenoide y las perdidas óhmicas asociadas hace esta solución poco atractiva cuando no se dispone de circuitos para reducir el voltaje cuando la válvula ha sido activada. Por otro lado, el uso de esos circuitos hace imposible tiempos de conmutación rápidos, como los que se necesitan cuando se requieren gradientes con composición muy baja de uno de los componentes. El impase puede solucionarse recurriendo a bombas piezoeléctricas. Estas operan bajo el mismo principio que las válvulas solenoides, con la salvedad de que el diafragma no se deforma por el desplazamiento de un núcleo magnético, sino por sus propiedades piezoeléctricas: el trabajo eléctrico es despreciable y gradientes entre 5 y 95 % pueden desarrollarse con ciclos de conmutación de la bomba piezoeléctrica de 0.5 s. Esta aproximación es adecuada para columnas cromatográficas de entre 4.6 y 1 mm de diámetro interno, es decir, a caudales de entre 1 mL/min y 50 µL/min.

Conclusión

Hasta aquí se han presentado los desarrollos llevados a cabo entre las universidades de BOKU y UIB referentes a cromatografía liquida portátil. Como trabajo futuro está la selección de un detector adecuado para uso en el campo. Los primeros datos se han obtenido mediante fotometría, pero las lámparas de deuterio tienen un elevado gasto energético. Los detectores amperométricos se están considerando a medio plazo debido a su sensibilidad y facilidad de fabricación e integración, pero su selectividad puede resultar insuficiente para teniendo en cuenta la flexibilidad esperada de esta plataforma. Estamos preparando un proyecto en colaboración con el instituto ISAS de Dortmund (Alemania) para caracterizar un detector de movilidad iónica como candidato a detector de campo. Entre las ventajas están el bajo consumo energético, la sensibilidad en el rango de µg/L, la portabilidad, que reporta identificadores moleculares de los analitos (movilidad reducida), que añade una dimensión de separación adicional a la cromatografía y que la retención en fase reversa es más ortogonal a la movilidad reducida que a la espectrometría de masas[6].

Agradecimientos

Estamos agradecidos a VICI AG International y a BMT Fluid Control Solutions GmbH por la provisión de los componentes fluídicos utilizados para obtener los datos aquí presentados. También al proyecto M2579 del Fondo Científico Austriaco y al Ministerio de Ciencia e Innovación a través del proyecto PID2020-117686RB-C33.

Referencias

(1) Ruzicka, J.; Marshall, G. D. Sequential Injection: A New Concept for Chemical Sensors, Process Analysis and Laboratory Assays. *Anal. Chim. Acta* **1990**, *237*, 329–343.

(2) Cocovi-Solberg, D. J.; Schnidrig, S.; Hann, S. Sample Preparation under Turbulent Flow with Renewable Sorbent. *J. Anal. At. Spectrom.* **2021**, *36* (11), 2306–2311.

(3) Cocovi-Solberg, D. J.; Miró, M. CocoSoft: Educational Software for Automation in the Analytical Chemistry Laboratory. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (21), 6227–6233.

(4) Wang, H.; Cocovi-Solberg, D. J.; Hu, B.; Miró, M. 3D-Printed Microflow Injection Analysis Platform for Online Magnetic Nanoparticle Sorptive Extraction of Antimicrobials in Biological Specimens as a Front End to Liquid Chromatographic Assays. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (22), 12541–12549.

(5) Cocovi-Solberg, D. J.; Schnidrig, S.; Miró, M.; Hann, S. Fluidic Platform for Renewable Solid Phase Extraction and Automatic Bioaccessibility Assessment in Solids, Inline Hyphenated to Liquid Chromatography. *Prep.*

(6) Hernández-Mesa, M.; Ropartz, D.; García-Campaña, A. M.; Rogniaux, H.; Dervilly-Pinel, G.; Le Bizec, B. Ion Mobility Spectrometry in Food Analysis: Principles, Current Applications and Future Trends. *Molecules* **2019**, *24* (15), 1–28.

IN MEMORIAM
Profesora MARÍA CRUZ MORENO BONDI

Conocí a Mª Cruz allá por el año 1999. Yo acababa de terminar la carrera y ella era una joven Profesora Titular de Universidad de 38 años en el Dpto. de Química Analítica de la Universidad Complutense de Madrid (UCM). Me recibió en su despacho y, tras decirle quién era, pues no nos conocíamos, se apresuró hacia el laboratorio para presentarme a su grupo de investigación. Mientras, yo procuraba no perderla de vista e intentaba comprender algo de lo que me iba explicando: fibras ópticas, inmunosensores, tiempos de vida, medidas en fase… ¡no entendía nada! Pero me cautivó el entusiasmo y pasión con las que me lo contaba. Y después de este inolvidable día, vinieron 23 años más: Mª Cruz fue mi directora de tesis y la maestra que me enseñó a subir y observar sobre hombros de gigantes.

Como dice Sonia Herranz, antigua doctoranda suya, la "jefa" era muy intensa. Cualidad que le facilitaba asumir los numerosos retos profesionales y personales que le ofrecía la vida. Ejemplo de ello es su trayectoria docente. Recién licenciada en Ciencias Químicas en el año 1985, en la especialidad de Bioquímica, fue Profesora encargada de curso en la Escuela Universitaria de Óptica de la UCM durante dos años. En 1987 obtuvo una plaza de Ayudante LRU en el mismo centro y, un año después, empezó a desempeñar dicho puesto en la Facultad de Ciencias Químicas en la misma Universidad, donde realizaba su tesis doctoral bajo la dirección de la Prof. Carmen Cámara.

En 1990 obtuvo el Título de doctora y, poco después, una plaza de Prof. Titular Interina en dicha Facultad. Personalmente, destacaría dos

cualidades de la Profesora Moreno-Bondi. La primera, su interés por el emprendimiento a nivel educativo. Como ejemplos relevantes, Mª Cruz participó y coordinó más de doce proyectos de innovación docente, organizó cursos de prestigio internacional como el "Advanced Study Course on Optical Chemical Sensors (ASCOS)" y consiguió que el Dpto. de Química Analítica de la UCM participara en el prestigioso Máster Erasmus-Mundus "Monabiphot". La segunda, y quizás la más importante, su respeto hacia la labor docente y hacia los estudiantes, motivo por el que cada una de sus clases se las preparaba con tremenda minuciosidad.

No me quiero olvidar de sus numerosos cargos de gestión académica en la Facultad de Química, donde fue durante los últimos 8 años directora del Dpto. de Química Analítica. Verla trabajar como directora ha sido una experiencia de aprendizaje enorme, y el mejor ejemplo de cómo el poder que te ofrece un cargo nunca se utiliza en tu propio beneficio sino en el de aquellos que uno representa. Mª Cruz, junto a la subdirectora de Dpto. y amiga, la Prof. María Pedrero, consiguieron logros para el departamento que, a priori, se antojaban imposibles. Otro hito admirable de Mª Cruz fue su habilitación a catedrática en el año 2007. La preparó en los últimos coletazos de su primera —y muy dura— batalla contra el cáncer y lo consiguió quedando además en primera posición.

Por otro lado, Mª Cruz fue una científica sobresaliente, extraordinaria diría yo, destacando por la calidad e innovación de su trabajo, así como por otras facetas que brotaban de su fuerza, determinación y principios éticos. Mª Cruz siempre decía que el camino en ciencia nunca se hace solo. Para ella hubo dos personas que marcaron su vida investigadora: por un lado, la Prof. Carmen Cámara, su directora de tesis, que cuando regreso de su estancia postdoctoral en Londres con fibras ópticas literalmente "debajo del brazo" le ofreció investigar en ese campo pionero en España. Para ella, Carmen ha sido un referente en su vida, su "madre científica", como ella cariñosamente le llamaba; por otro lado, el Prof. Guillermo Orellana, del Dpto. de Química Orgánica de la UCM. Trabajaron toda la vida juntos y crearon el Grupo Interdepartamental UCM de Sensores Químicos Ópticos y Fotoquímica Aplicada (GSOLFA, https://www.gsolfa.info/) calificado como Grupo de Excelencia por la ANECA (2018 y 2023).

A Mª Cruz le apasionaban los retos científicos. De hecho, la búsqueda de líneas de investigación rompedoras que pudieran aplicarse al desarrollo de nuevas metodologías analíticas era algo que consideraba fundamental y muy motivador. Para ello, contaba con dos cartas ganadoras: la primera, sus incansables ansias de conocimiento y su curiosidad científica; la segunda, su asombrosa facilidad para establecer nuevas colaboraciones, algo natural en una persona que había realizado múltiples estancias de investigación en el extranjero y había sido investigadora principal de ocho proyectos nacionales (el último concedido el mismo día de su fallecimiento), siete proyectos europeos, tres de cooperación internacional y varios contratos con empresas. De sus estancias destacaría las predoctorales con el Prof. Turro (U. Columbia, Nueva York) con el que trabajó en la caracterización y aplicaciones de polímeros dendrímeros y con el Prof. O. Wolfbeis (U. Karl-Franzens, Graz, Austria), desarrollando sensores ópticos y biosensores. También realizó estancias siendo ya profesora, por ejemplo, en el Oak Ridge National Laboratory, con el Prof. Vo Dihn, en el Naval Research Laboratory, con la Prof. Ligler y la última en el 2013, nuevamente en la Universidad de Columbia.

Personalmente añadiría una tercera carta ganadora que, en los últimos años, fue fundamental para los que trabajábamos con ella. Apostó firmemente por nuestras propuestas (y no valía cualquiera, era una evaluadora muy exigente y crítica). Era muy motivador por el respeto e interés que mostraba. Sinceramente, discutir Ciencia con Mª Cruz era más que gratificante, sin importar el cómo, el cuándo o el dónde.

Su fructífera carrera le permitió publicar más de 200 artículos en revistas de reconocido prestigio internacional, 11 patentes con su coautoría (tres de ellas copropiedad de empresas) así como numerosos libros y capítulos, tanto de autora como editora. Sus intereses de investigación se centraron en el desarrollo de (bio)sensores químico-ópticos y sensores bio(miméticos) basados en (nano)materiales, polímeros de impronta molecular (MIPs), *Phage Display* (despliegue en fagos), péptidos miméticos de epítopos, producción de anticuerpos recombinantes y sus aplicaciones a los análisis de alimentos, clínicos y medioambientales. De estas investigaciones, destacaría su reputada y muy valorada experiencia en MIPs. Una de sus últimas alegrías fue descubrir que figuraba en el "top 5" de expertos internacionales en este campo.

Su labor científica tuvo un merecido reconocimiento. Fue galardonada con el Premio Joven Investigador de la Sociedad Española de

Química Analítica en 1993 y con el Premio al Investigador en Química Analítica de la Real Sociedad Española de Química en 2010.

La gestión en el ámbito científico desarrollada por Mª Cruz no fue menos importante y extensa. En su aceptación de los diferentes cargos siempre sopesaba que éste fuese compatible con el desarrollo de su actividad docente e investigadora. Fue nombrada editora de la revista *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (ABC) en 2018, fue miembro del Consejo Asesor Internacional de ABC (2008-2018) y de ACS Omega (2018-2022). Fue presidenta de la Sociedad de Espectroscopía Aplicada (SEA, 2012-2021), miembro de la Junta Directiva de la RSEQ (2018-2021) y secretaria de la Sección Territorial de Madrid de la RSEQ (2010-2016). Fue miembro del Comité Directivo Permanente de ASCOS (Cursos de Estudios Avanzados sobre Sensores Ópticos) y del Comité Asesor de la Serie Internacional de Conferencias sobre Impronta Molecular (2007-2022).

En fin, podría estar horas, días, hablando de Mª Cruz pero me es difícil separar las experiencias profesionales de las personales que he vivido con ella. Para Mª Cruz, convivir con alguien cada día y no poder compartir nada más que el trabajo se le hacía muy duro. En el trato más cercano, Mª Cruz era una persona culta, cálida, dedicada, amiga y colega maravillosa, incansable, pero, ante todo, era una buena persona.

Los últimos años, ya en pandemia, fueron bastante duros, pero nunca, nunca, tiró la toalla. Casi siempre era ella la que daba ánimos al resto y era capaz de hacerte reír a costa de sus achaques.

Para finalizar, como ya he hecho en otras ocasiones, voy a compartir con vosotros un fragmento del discurso de agradecimiento de Mª Cruz cuando la Real Sociedad Española de Química le otorgó el premio de investigación en Química Analítica en el año 2010. Creo que refleja inequívocamente como fue y será para siempre mi querida amiga, mi "segunda madre":

"En los últimos años la vida me ha enseñado que hay que vivir cada momento intensamente y doy gracias porque he tenido la suerte de trabajar en algo que me apasiona y que me motiva a seguir adelante cada mañana. Nada se consigue en la vida sin esfuerzo y profesionalidad. Así es como se lo transmito a mis estudiantes y, sin duda, una de mis mayores satisfacciones es verles crecer científica y profesionalmente y comprobar que nuestra pasión, esfuerzo y trabajo sirve para mejorar la vida de todos".

Prof. Elena Benito Peña
Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Químicas
Universidad Complutense de Madrid

Desde SEQA fomentamos la relación y cooperación entre nuestros miembros y coordinamos sus esfuerzos en los campos de la enseñanza, de la investigación y de las aplicaciones de la Química Analítica.

La SEQA es miembro de la *Division of Analytical Chemistry of the European Association for Chemical and Molecular Sciences* EuCheMS .

CONGRESOS

Más información:

https://conferenceindex.org/conferences/analytical-chemistry

ACTUALIDAD ANALÍTICA

ISSN INTERNATIONAL STANDARD SERIAL NUMBER SPAIN

2444-8818

Número 82, junio, 2023