

## TESIS DOCTORALES

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

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

Bajo la denominación de HAPs, se engloba un grupo de compuestos caracterizados por la unión de varios anillos bencénicos. Más de 100 compuestos pertenecientes a esta gran familia son considerados peligrosos contaminantes por sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas, siendo además considerados posibles disruptores endocrinos. La exposición a los HAPs se produce, sobre todo, por inhalación de los mismos presentes en el aire (quema de carbón y madera, emisiones de automóviles, plantas generadores de energía, quema de desperdicios, humo de tabaco...) y la ingestión de alimentos contaminados o alimentos preparados utilizando determinadas prácticas culinarias como el ahumado, el tostado o cocinados en barbacoa.

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

Estos estudios de biovigilancia han hecho crecer la demanda de metodología analítica que proporcione datos fiables de manera rápida y económica atendiendo a la necesidad de controlar y evaluar dicha exposición. En este tipo de análisis, hay que tener en cuenta que las muestras a analizar suelen ser muy pequeñas, únicas, y

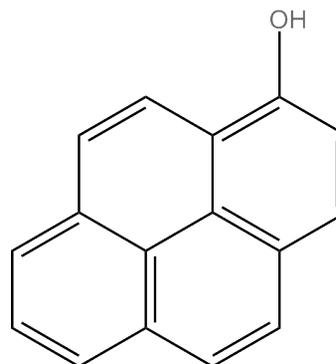


Figura 1. Estructura del 1OHP.

las concentraciones a detectar se encuentran en niveles bajos.

En el caso de los HAPs, la presencia en la orina de 1-hidroxipireno (1OHP), principal producto de la degradación metabólica del pireno, es utilizado como indicador biológico directo de la entrada de pireno en el organismo e indirecto de los demás HAPs. La estructura del 1OHP puede consultarse en la Figura 1.

Como el título de este proyecto indica, el objetivo general de esta Tesis ha sido el desarrollo de nuevos métodos de aislamiento y preconcentración para la determinación de 1OHP en muestras biológicas (orina y leche materna) basados en la utilización de polímeros de impresión molecular (MIP) como soporte de extracción.

Para ello, se ha llevado a cabo, en primer lugar, la síntesis de polímeros de impresión molecular específicos para el hidroxipireno, estudiando su morfología y capacidad de adsorción frente a otros polímeros no impresos.

Las aplicaciones desarrolladas en esta tesis para el 1-OHP han sido: el desarrollo de un procedimiento de extracción en fase sólida (MISPE); el desarrollo de un sistema on-line (FIA-MIP) y varios procedimientos de extracción mediante la dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).

## SÍNTESIS DEL POLIMERO

Los polímeros de impresión molecular (MIP) son receptores moleculares sintéticos, es decir, son matrices sintetizadas artificialmente que presentan propiedades de reconocimiento molecular específico hacia un determi-

nado compuesto, re-produciendo el mecanismo de reconocimiento de algunos sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo, etc). Dicho reconocimiento se basa en la creación, durante el proceso de polimerización de cavidades que son complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química a la molécula de 1-OHP.

Para la síntesis del MIP se necesita básicamente un monómero funcional, un entrecruzante, el iniciador de la polimerización, el disolvente y el analito plantilla (1OHP).

El proceso consta de tres etapas. En la primera de ellas se forma un complejo de prepolimerización en la que se pone en contacto el analito con el monomero funcional formándose el complejo de prepolimerización. En la segunda etapa, se añade el entrecruzante, el iniciador y el disolvente para generar el mecanismo de propagación radicalico. En la última etapa, se extrae el analito del interior de la estructura constituida dejando unas cavidades de reconocimiento complementarias en tamaño, forma y funcionalidad química al analito plantilla. De esta forma, el MIP formado será capaz de reconocerle de forma selectiva cuando vuelva a ponerse en contacto con él.

El procedimiento más utilizado es la síntesis en bloque con la que se obtiene un monolito de polímero insoluble que se muele y tamiza para obtener partículas micrométricas amorfas de tamaño uniforme. Aunque este método es fácil de llevar a cabo, ya que no requiere material específico, presenta una serie de desventajas, como son: grandes pérdidas de material en el proceso de elaboración, baja capacidad de carga y distribución de los sitios de unión muy heterogénea.

Las nuevas estrategias de polimerización se han dirigido a conseguir la síntesis de partículas de tamaño uniforme (microesferas) con mayor capacidad y mejor distribución de los sitios de unión, que además presentan mejor comportamiento en su incorporación en sistemas en flujo (polimerización por precipitación).

La Figura 2 muestra imágenes SEM de los polímeros sintetizados en esta Tesis tanto en bloque ( $MIP_{bloque}$ ) como por precipitación ( $MIP_{prec}$ ).

## APLICACIONES

### Extracción en fase sólida con polímeros de impresión molecular en muestras de orina (MISPE)

El polímero formado se trasvasa a un cartucho para realizar las extracciones en discontinuo, y se llevan a cabo las etapas características de un proceso de extracción en fase sólida o MISPE.

El proceso incluye el acondicionamiento previo del polímero, la carga de la muestra sobre el polímero y fijación selectiva de los analitos en las cavidades del mismo, el lavado de los compuestos interferentes retenidos de manera inespecífica en el polímero y la elución de los analitos con el disolvente adecuado. De esta forma se reducen los volúmenes de disolvente empleados reduciendo además el tiempo de análisis. En la Figura 3 están representados estos procesos.

Tras el proceso MISPE, la muestra de orina es analizada en el cromatógrafo de líquidos de alta eficacia (HPLC) acoplado a un detector de fluorescencia.

Las recuperaciones obtenidas por este método fueron para el  $MIP_{prec}$  del 78-90% con una RSD < 6.7, mientras

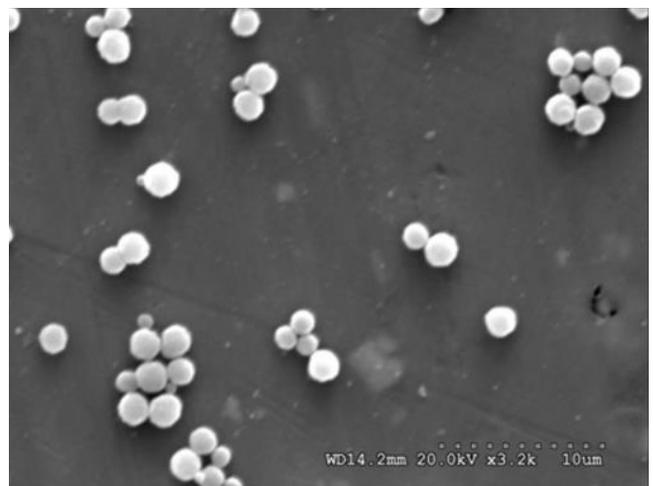
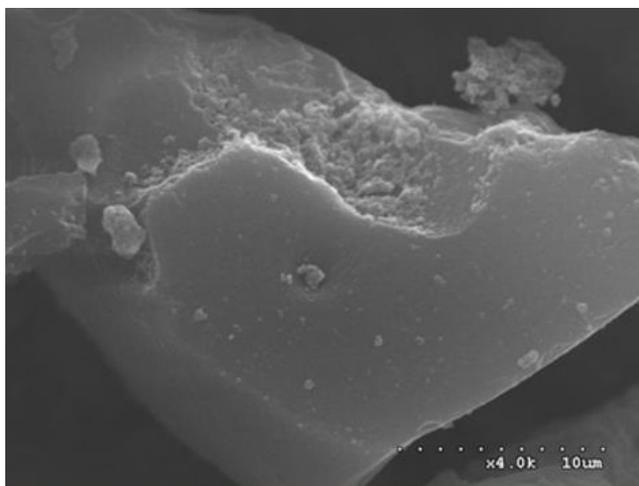


Figura 2. Imágenes SEM de ambos polímeros:  $MIP_{bloque}$  (izquierda) y  $MIP_{prec}$  (derecha).

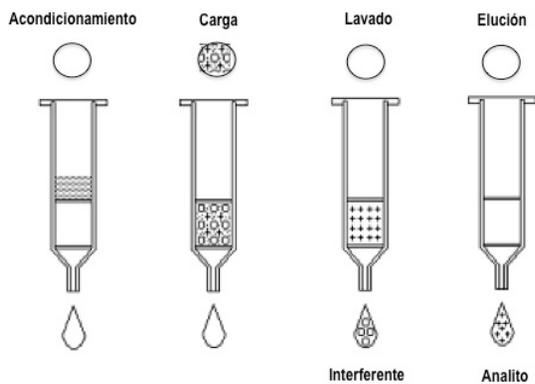


Figura 3. Etapas de un proceso MISPE.

que las recuperaciones con el MIP<sub>bloque</sub> fueron del 71-83% con una RSD < 8.8.

### Análisis por inyección en flujo (FIA-MIP) en muestras de orina

Los métodos de inyección en flujo o FIA son métodos automáticos en flujo continuo no segmentado que se basan en la introducción y el procesamiento de la muestra en una corriente continua de una fase líquida en la que ésta se introduce. La corriente se mantiene con la ayuda de un módulo de impulsión del fluido. Esta corriente portadora confluye con la corriente de reactivo transportándose a través de un sistema de conducciones de pequeño diámetro hasta llegar al detector. El esquema del sistema FIA puede consultarse en la Figura 4.

La microcolumna se rellena con los MIP obteniéndose unas recuperaciones del 74-85 % con una RSD < 4.6.

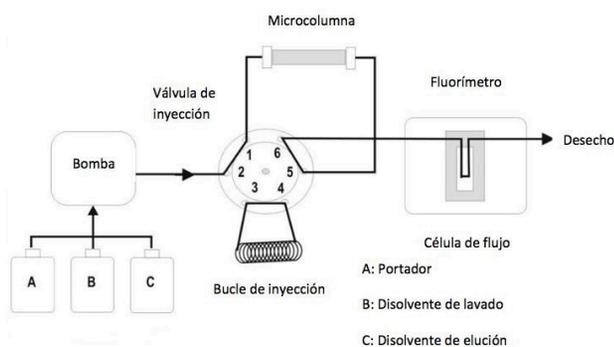


Figura 4. Esquema del sistema FIA.

### Dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD) en muestras de leche materna

Aunque las principales rutas de eliminación de los HAPs son la orina y las heces, también son excretas en la leche.

Por otro lado, a diferencia de la orina, la leche es una matriz mucho más compleja que contiene un gran número de sustancias que pueden interferir en el análisis instrumental, principalmente proteínas y materia grasa.

Para este tipo de muestras, el uso de la MSPD ofrece una alternativa efectiva a los métodos tradicionales de preparación de muestra.

La MSPD se basa en la completa disrupción de la muestra, lo que permite a los componentes dispersarse dentro de un adsorbente sólido adecuado. La muestra se dispone en un mortero y se disgrega con el adsorbente hasta la completa disrupción y dispersión de la misma. La mezcla posteriormente se empaqueta en un cartucho de SPE eluyendo los analitos con los disolventes adecuados para eliminar interferentes. A la vez que se produce la disrupción de la muestra, se genera un material que posee un carácter cromatográfico único, lo que permite la separación de los analitos de interés. La Figura 5 muestra un esquema del procedimiento llevado a cabo.

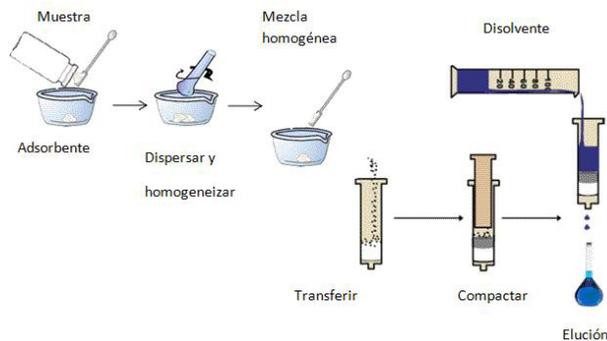


Figura 4. Esquema del proceso MSPD.

La inclusión del MIP como material adsorbente dispersante en una MSPD convencional dio como resultado una recuperación del 91-99 % con una RSD < 8

Se puede concluir, por tanto, que con estos métodos, se han desarrollado nuevos procedimientos para la extracción, aislamiento y análisis del 10HP en muestras biológicas humanas, siendo éste un biomarcador representativo, sensible y fiable de la exposición a los HAPs.

Monserrat Serrano Valenciano  
Dpto. de Ciencias Analíticas