



# MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA: APLICACIONES DE INTERÉS FARMACEÚTICO



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE SEVILLA

MARTA SALAMERO GIL

Trabajo de Fin de Grado:

# Microextracción en Fase Sólida: Aplicaciones de Interés Farmacéutico

Revisión Bibliográfica

Grado en Farmacia

Departamento de Química Analítica

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

**MARTA SALAMERO GIL**

Tutoras:

M<sup>a</sup> Ángeles Herrador Morillo

M<sup>a</sup> Teresa Morales Millán

Sevilla a 7 de Julio del 2017

*Para mi madre, por acompañarme en cada paso que doy.*

*Para mi padre, por enseñarme a ser una luchadora día a día.*

# ÍNDICE

RESUMEN	
1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	1
1.1. Técnicas Analíticas de Separación	1
1.2. Extracción Líquido – Líquido (LLE)	2
1.3. Extracción con Líquidos Presurizados (PLE)	3
1.4. Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE)	4
1.5. Microextracción en Fase Líquida (LPME)	4
2. OBJETIVOS	6
3. METODOLOGÍA	6
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	7
4.1. Microextracción en Fase Sólida (SPME)	7
4.1.1. Generalidades	7
4.1.2. Tipos de Procedimientos de SPME	8
4.1.3. Fundamentos Matemáticos	9
4.1.4. Instrumentación	10
4.1.5. Procedimiento	11
4.1.6. Tipos de Fibras	12
4.1.7. Ventajas e Inconvenientes	14
4.1.8. Variantes de la SPME	14
4.1.8.1. <i>In tube</i> – SPME	15
4.1.8.2. Extracción por Sorción con Barras Agitadoras (SBSE)	16
4.1.8.3. Micoextracción en Fase Sólida Biocompatible (BioSPME)	17
4.1.9. Aplicaciones Generales	18
4.2. Aplicaciones de Interés Farmacéutico	22
4.2.1. Años 1988 a 1999	22
4.2.2. Años 2000 a 2009	23
4.2.3. Años 2010 a 2017	23
4.3. SPME en la Actualidad	27
4.3.1. Desarrollo de Nuevas Fibras	28
4.3.2. SPME Media Ponderada en el Tiempo	29
4.3.3. Nuevas Aplicaciones de SPME	31
5. CONCLUSIONES	32
6. BIBLIOGRAFÍA	32

## RESUMEN

En el campo del análisis de muestras, hay una amplia gama de técnicas y procedimientos por los que puede pasar dicha muestra antes de hacerle la determinación al analito de interés. Las técnicas analíticas de separación son necesarias ya que muchas veces la muestra a analizar es demasiado compleja y necesitamos eliminar interferencias para poder realizar la determinación final. Se puede realizar pues, la extracción del analito en cuestión por medio de varias técnicas como la Extracción Líquido – Líquido (LLE), la extracción con Líquidos Presurizados (PLE), la extracción con Fluidos Supercríticos (SFE), la Microextracción en Fase Líquida (LPME) o la Microextracción en Fase Sólida (SPME). Esta última técnica, al ser el objeto del trabajo, se explica más detalladamente, incluyendo generalidades, tipos y variantes, su procedimiento y modelo matemático y por último ventajas e inconvenientes. Además se comentan las numerosas aplicaciones que tiene la SPME en los campos medioambientales, bromatológico y toxicológico ya que al ser una técnica tan versátil, no se utiliza únicamente en clínica. A continuación de esto, se hace especial hincapié en las aplicaciones farmacéuticas, pero en este caso dividido en décadas, para poder ver el desarrollo que han tenido desde sus inicios. Por último, se hace un breve comentario sobre ciertas novedades respecto al SMPE, para poder conocer su panorama más actual. Se habla sobre una nueva variante, así como de fibras que se han desarrollado para abarcar nuevos tipos de analitos y algunas aplicaciones destacables cuyo desarrollo se han llevado a cabo en estos últimos meses.

Palabras claves: técnicas analíticas de separación, extracción, microextracción en fase sólida, SPME.

## 1. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

La Química Analítica es una ciencia metrológica que desarrolla, optimiza y aplica herramientas de amplia naturaleza, que se concentran en procesos de medida encaminados a obtener información química y bioquímica de calidad, tanto parcial como global sobre materias o sistemas de amplia naturaleza en el espacio y en el tiempo para resolver problemas científicos, técnicos económicos y sociales (Valcárcel, 1999).

En definitiva, la química analítica se dedica a medir y comparar resultados para así valorar los datos obtenidos. El proceso analítico implica varios aspectos como definir el problema analítico, tomar la muestra, prepararla para el proceso de medida y medir. Pero frecuentemente, hay que realizar tratamientos de dicha muestra para aislar los analitos de interés, del resto de la matriz de la muestra. Los objetivos que se pretenden alcanzar con esta etapa de separación son:

- Mejorar la sensibilidad mediante la preconcentración de analitos.
- Mejorar la selectividad mediante la eliminación de interferencias.
- Favorecer la detección de los analitos en el nuevo medio donde se encuentran (Valcárcel, 1999).

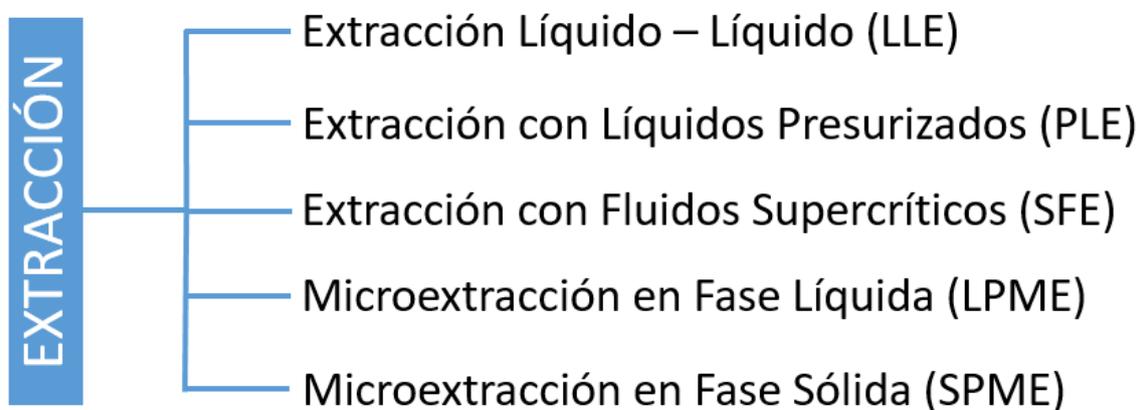
### 1.1. Técnicas Analíticas de Separación

Las técnicas analíticas de separación, y dentro de ellas las técnicas extractivas, se utilizan como una vía para la separación de los analitos y/o las interferencias del resto de la matriz. Se pueden clasificar en dos grandes grupos atendiendo a la naturaleza de la muestra:

- Si la muestra es sólida, el proceso de extracción se denomina lixiviación y se realiza utilizando una fase extractiva líquida o un fluido supercrítico.
- Si la muestra se encuentra en estado líquido, la extracción puede realizarse mediante un disolvente líquido, un fluido supercrítico o mediante una fase sólida, dando lugar respectivamente a las técnicas de extracción líquido – líquido, extracción con fluidos supercríticos o extracción en fase sólida (Fernández y cols., 2004).

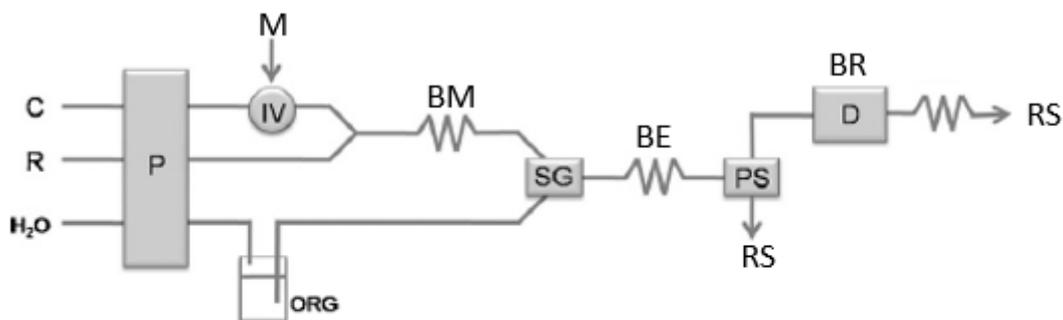
Las técnicas mencionadas en este segundo apartado son ampliamente usadas y a continuación serán descritas brevemente.

El objetivo principal de la etapa de extracción es separar el analito de la matriz a la que está unido. Para ello se pone en contacto la muestra con un extractante en unas condiciones determinadas de manera que se hacen débiles las interacciones analito – matriz, a la vez que aumentan las de analito – extractante. Así el coeficiente de reparto estará a favor del disolvente. En la Figura 1 se muestra un resumen esquematizado de las técnicas de extracción de las que se hablarán a continuación. Estas no son las únicas que hay, pero si las más utilizadas.



**Figura 1.** Esquema de las técnicas de extracción más empleadas

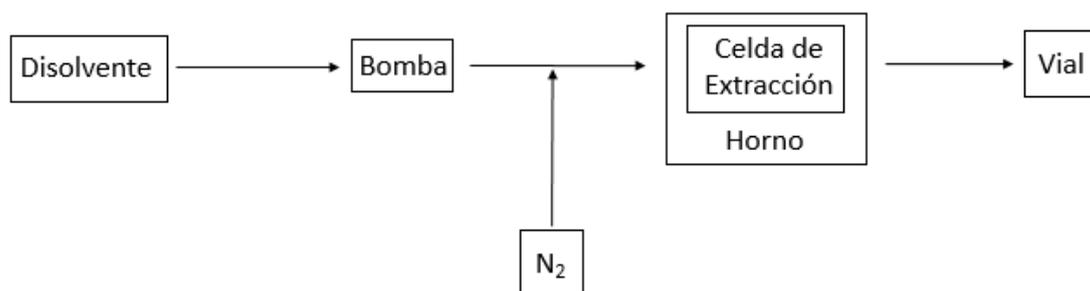
**1.2. Extracción Líquido – Líquido (LLE):** la base de este proceso consiste en separar líquidos de diferentes densidades. Se produce una transferencia de analitos desde una fase, generalmente acuosa, a otra fase, generalmente orgánica. Dicha transferencia está regida por una constante de reparto. La técnica es sencilla, pero resulta un proceso tedioso debido a la gran cantidad de disolventes orgánicos que hay que utilizar, además de lo difíciles que son de eliminar. Por ello, a nivel industrial, se ha automatizado todo el proceso, como se puede observar en la Figura 2. También existe la versión miniaturizada de esta técnica, que se tratará en el punto 1.1.2, que también resuelve los problemas mencionados anteriormente (Silvestre y cols., 2009).



C: cargador; R: reactivos; P: unidad de propulsión; M: muestra; IV: válvula de inyección; BM: bobina de mezcla; ORG: disolvente orgánico; SG: segmentador; BE: bobina de extracción; PS: separador de fases; D: detector; BR: bobina de restricción; RS: residuo.

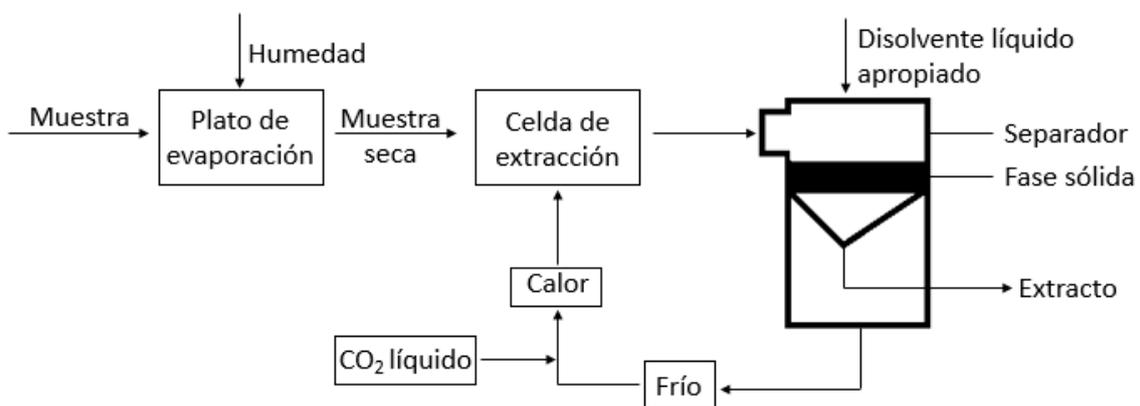
**Figura 2.** Esquema del sistema de LLE automatizado

**1.3. Extracción con Líquidos Presurizados (PLE):** se emplea un sistema de flujo cerrado que utiliza disolventes orgánicos convencionales a temperatura y presión elevados para conseguir la extracción de los compuestos. Las altas temperaturas aceleran la cinética de extracción, mientras que la alta presión mantiene al disolvente en estado líquido (mayor poder de solvatación y menor viscosidad) permitiendo así extracciones rápidas y seguras. En la Figura 3 se muestra un esquema del método, en el que la celda de extracción se llena primero con la muestra y segundo con el disolvente. Se calienta y presuriza la celda, manteniendo la temperatura y presión altos durante unos minutos. Tras esto, el extracto obtenido se transfiere a un vial para que pueda ser analizado y se purga con nitrógeno ( $N_2$ ) para eliminar el disolvente. PLE tiene ventajas sobre otros métodos como por ejemplo, mejor reproducibilidad, reducción del uso de disolvente de extracción y reducción del tiempo de preparación de la muestra. Los extractos obtenidos generalmente están mucho más concentrados que utilizando los métodos de extracción convencionales (Pörschmann y cols., 2001).



**Figura 3.** Esquema de proceso de PLE

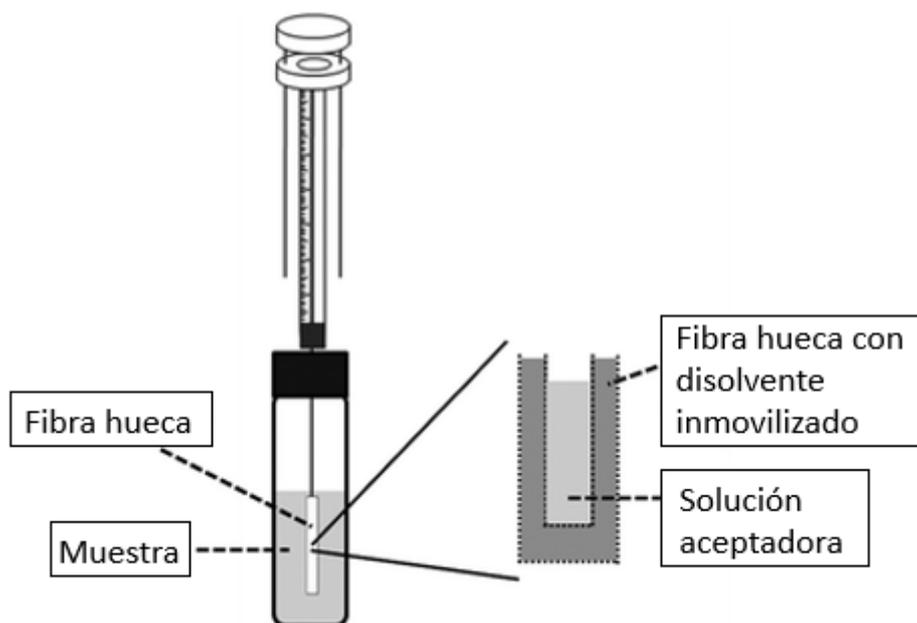
**1.4. Extracción con Fluidos Supercríticos (SFE):** se dice que un fluido está en estado supercrítico cuando se encuentra a temperatura y presión por encima de sus valores críticos. Los fluidos supercríticos incluyen propiedades de líquidos y sólidos, mientras que su densidad es correlativa con su temperatura y presión. Son un medio muy útil para el aislamiento selectivo de los compuestos en matrices complejas. La ventaja inicial es su bajo coste. Además los analitos se extraen de manera más rápida y la técnica es mejor para el medioambiente ya que no usa disolventes orgánicos. El dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) es el más utilizado ya que es químicamente inerte, inocuo, no es inflamable y su punto crítico ( $T^{\text{c}}\text{C: } 31.1^{\circ}\text{C}$  y  $\text{PC: } 72.9 \text{ atm}$ ) es fácilmente accesible. Otros fluidos menos usados son el óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ), xenón ( $\text{Xe}$ ), amoníaco ( $\text{NH}_3$ ) y agua ( $\text{H}_2\text{O}$ ), entre otros. Uno de los inconvenientes principales de su utilización surge a causa de la polaridad del  $\text{CO}_2$ , ya que tiene un marcado carácter apolar y por tanto su empleo está limitado a la extracción de analitos de baja polaridad unidos débilmente a la muestra. Para resolver este problema, se añaden los llamados modificadores, como el metanol por ejemplo, cambiando así la polaridad del  $\text{CO}_2$  que conlleva la apertura del abanico de muestras en las que se puede utilizar esta técnica (Huang y cols., 2012). La Figura 4 muestra un esquema resumido del proceso (Pavlovic y cols., 2007).



**Figura 4.** Esquema del proceso SFE

**1.5. Microextracción en Fase Líquida (LPME):** como ya se ha mencionado anteriormente, este es el nombre que recibe la técnica de la LLE miniaturizada, muy reciente. Normalmente se utiliza una membrana como interfaz entre la muestra (donador) y el disolvente orgánico (aceptor), lo que impide que se mezclen las dos fases.

La principal ventaja es requerir de muy poca cantidad de disolvente orgánico, su bajo coste y la alta pureza de los extractos obtenidos. La modalidad más utilizada es la que utiliza fibras huecas de polipropileno poroso (*Hollow Fiber LPME*), que se colocaba en la muestra acuosa. En la Figura 5 se muestra un esquema del montaje (Leong y cols., 2014).



**Figura 5.** Esquema del *Hollow Fiber LPME*

Lo anteriormente expuesto pone de manifiesto la gran variabilidad de técnicas analíticas disponibles para realizar la extracción del analito/s de interés. Las técnicas mencionadas anteriormente se utilizan según las necesidades de cada muestra. Aun cubriendo la mayor parte de los casos, hay más técnicas adecuadas, entre las que se encuentra la Microextracción en Fase Sólida (SPME) que se desarrolla para ser utilizada con aquellas muestras o tipos de analitos que no se puedan extraer, de manera eficaz con las técnicas citadas anteriormente. La SPME será descrita ya que es el objetivo de esta memoria, detalladamente y de manera independiente en el punto 4.

## 2. OBJETIVOS

- Poner de manifiesto la necesidad de los procedimientos de separación de los analitos y su importancia para mejorar la selectividad y sensibilidad de los métodos analíticos sobre todo cuando se trata de analizar muestra complejas.
- Destacar, dentro de los diferentes métodos de separación, los procedimientos de extracción más comúnmente utilizados.
- Describir detalladamente la SPME: fundamento, instrumentación, procedimiento, ventajas e inconvenientes, aplicaciones y variantes de la misma.
- Hacer una revisión crítica de las aplicaciones de esta técnica en los últimos años centrada principalmente en áreas de interés farmacéutico, medioambiental, bromatológico y toxicológico, destacando su potencial de futuro.

## 3. METODOLOGÍA

La realización de este trabajo, al ser de carácter bibliográfico, se ha podido llevar a cabo gracias a la utilización de numerosas fuentes de información como bases de datos, libros, artículos científicos, tesis doctorales o informes científicos. Según la parte del trabajo, cabe destacar unos u otros en concreto.

La primera parte es una introducción a las técnicas de separación analíticas, ofreciendo una visión global de las mismas. Para completar esta parte se han utilizado prioritariamente dos libros “Principios de Química Analítica” de M. Valcárcerl y “Toma y Tratamiento de Muestra” de P. Fernández y cols. para la parte más general, que luego se ha ido completando con información adicional tomada de numerosos artículos que forman parte de la base de datos llamada *PubMed*. La criba de artículos se realizaba utilizando como palabra clave el nombre de la técnica analítica, tanto en español como en inglés, siendo este idioma el que dio resultados más satisfactorios.

La segunda parte engloba el grosso del trabajo, ya que trata de llenar la técnica de la Microextracción en Fase Sólida (SPME). Para esta parte ha sido fundamental la ayuda de la tesis doctoral “Aplicación de la Microextracción en Fase Sólida al Análisis Medioambiental” de A. M. Peñalver. Al igual que en la parte anterior, se complementó

con numerosos artículos sacados de distintas bases de datos, entre las que destaca nuevamente *PubMed*, gracias a que las opciones de cribado de búsqueda, permite realizarla de manera más concreta y rápida.

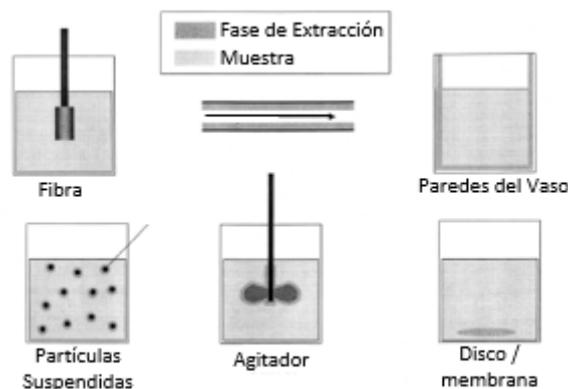
## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Microextracción en Fase Sólida (SPME)**

#### **4.1.1. Generalidades**

El fundamento de la Extracción en Fase Sólida (SPE) se basa en la diferente afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida. De modo que cuando se hace pasar la muestra a través de la fase sólida, algunos compuestos quedaran retenidos en ella mientras que otros pasan inalterados. Las características de este método lo hacen muy adecuado para la eliminación de interferencias, la preconcentración de analitos, el cambio de fase (cuando el analito está en una emulsión o suspensión) y la conservación y transporte de la muestra (Fernández y cols., 2004). Dentro de las técnicas de SPE se incluyen dos variantes: la extracción con cartuchos y la microextracción en fase sólida. Esta última es la más utilizada y será objeto de mayor desarrollo.

La Microextracción en Fase Sólida o SPME (Solid – Phase Microextraction) fue desarrollada para facilitar la preparación de muestras de manera más rápida, tanto en el laboratorio como donde esté localizada el lugar de la toma de muestra (Pawliszyn, 1997). En esta técnica, una pequeña cantidad de fase de extracción, que está dispersa en un soporte sólido, es expuesta a la muestra durante un periodo de tiempo bien definido. El planteamiento principal consiste en que se produzca un equilibrio entre la matriz de la muestra y la fase de extracción. En este caso, las condiciones de extracción no afectan a la cantidad extraída. Se sabe que si se adiciona convección, agitación o ambos en la muestra, el tiempo puede reducirse y la cantidad de analito extraído estará relacionado con dicho tiempo. En la Figura 6 se muestran diferentes formas de poner en práctica la técnica de SPME.



**Figura 6.** Distintas configuraciones de SPME (Pawliszyn, 2000)

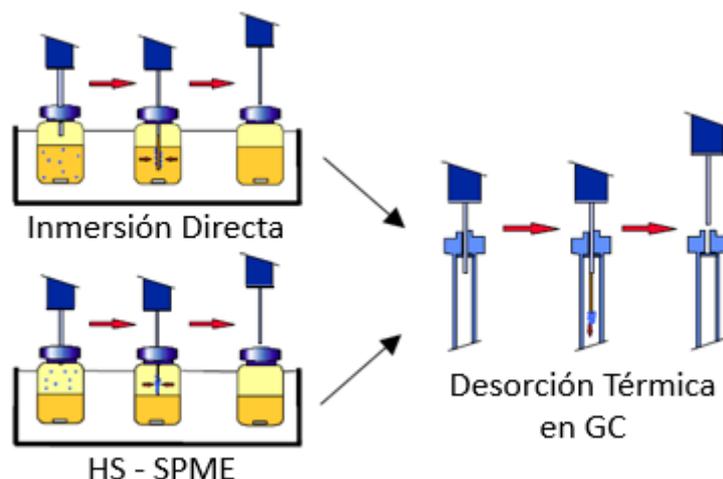
La naturaleza de los analitos de interés y la complejidad de la matriz de la muestra, determinan el nivel de dificultad para poder llegar a una extracción de calidad. La simplicidad, velocidad y elección de los equipos de extracción más convenientes, tienen un impacto en el coste de la parte práctica y de la automatización de los métodos desarrollados (Pawliszyn, 1999).

La SPME se basa en el principio de que los analitos se distribuyen entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra. Dicha fibra es de sílice fundida y está recubierta de un sorbente (materiales poliméricos idénticos a los empleados como fase estacionaria en las columnas de cromatografía de gases). El transporte de los analitos desde la matriz de la muestra hasta la fibra, empieza al entrar en contacto la fibra con la muestra. Seguidamente se produce la desorción de los analitos mediante temperatura o con un disolvente orgánico. La extracción es completa y satisfactoria cuando el analito ha alcanzado una concentración de equilibrio de distribución entre la muestra y la fibra (Pawliszyn, 2000).

#### 4.1.2. Tipos de Procedimientos de SPME

La extracción se puede llevar a cabo tanto en espacio de cabeza o *headspace* (HS) que sirve para analitos volátiles en muestras líquidas y sólidas o por inmersión directa, también llamada por inmersión de la fibra en la muestra, para muestras líquidas o

extractos orgánicos de muestras sólidas. En la Figura 7 se muestra un esquema resumido de ambos procesos (Lord y col., 2000).



**Figura 7.** Esquema del proceso de SPME – GC (cromatografía de gases) directa y HS

Hay una tercera forma no muy aplicada aun, denominada SPME con protección de membrana, en la que se coloca una membrana semipermeable alrededor de la fibra para evitar que compuestos de elevado peso molecular (ácidos o proteínas) que pueden estar presentes en la matriz de la muestra, dañen la fibra. Adicionalmente, la HS – SPME también protege del mismo tipo de compuestos de alto peso molecular y permite modificar la matriz de la muestra sin dañar la fibra. Por lo tanto, esta técnica es la más idónea para el análisis de muestras sólidas (alimentos, sedimentos) y muestras biológicas donde la interferencia de la matriz es muy alta. El principal problema es que está restringido a compuestos volátiles o semivolátiles (Lord y col., 2000).

#### 4.1.3. Fundamentos Matemáticos

El modelo matemático referente al primer caso, inmersión directa, confirma la relación lineal que existe entre la cantidad de analito adsorbida por la fibra en el estado de equilibrio y la concentración del mismo en la muestra. Este hecho queda reflejado en la ecuación siguiente (Eisert y cols., 1995):

$$n = \frac{K_{fs}V_f C_o V_s}{K_{fs}V_f + V_s}$$

donde  $n$  son los moles del analito absorbidos por la fibra,  $V_s$  y  $V_f$  son los volúmenes de la muestra y fibra respectivamente,  $C_o$  es la concentración inicial del analito en la muestra y  $K_{fs}$  es el coeficiente de partición del analito entre la fibra y la muestra. En la ecuación anterior la matriz de la muestra es una única fase homogénea, sin considerar el espacio de cabeza.

El modelo matemático referente al proceso de la SPME cuando se utiliza la técnica de espacio de cabeza o *headspace* (HS) tiene ecuaciones y conclusiones similares a la del tipo de la SPME anterior teniendo en cuenta una tercera fase gaseosa y un tercer equilibrio (muestra – fase gaseosa – fibra) (Zhang y col. 1993).

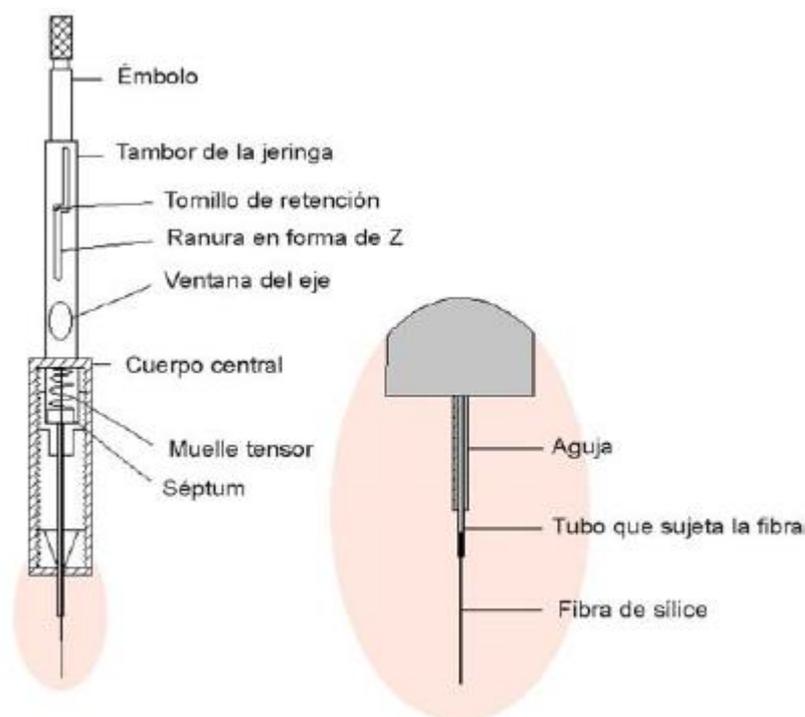
De manera general, cuando se trabaja con la técnica de la SPME, el volumen de la muestra es muy grande, de modo que  $V_s \gg V_f K_{fs}$ , por lo que se puede realizar una simplificación de la ecuación anterior, quedando como resultado la siguiente:

$$n = K_{fs}V_f C_o$$

En esta segunda ecuación, la cantidad de analito ( $n$ ), es directamente proporcional a la concentración de analito en la muestra e independiente del volumen de la misma. Esta aproximación se puede realizar siempre y cuando la  $K_{fs}$  no tenga valores muy altos (gran afinidad por la fibra) y se estén utilizando volúmenes de muestra muy pequeños (Eisert y cols., 1995).

#### 4.1.4. Instrumentación

En la Figura 8 se muestra el dispositivo comercial más simple de la SPME. Consiste en una fibra larga de sílice fundida recubierta con un sorbente. La fibra está unida a un pistón de acero inoxidable cubierto por una aguja protectora, adaptada a un cuerpo de jeringuilla, pero en este caso el embolo no va a aspirar la muestra, sino que solo se va a encargar de hacer salir la fibra al exterior o de introducirla en el interior del dispositivo (Fernández y cols., 2004).



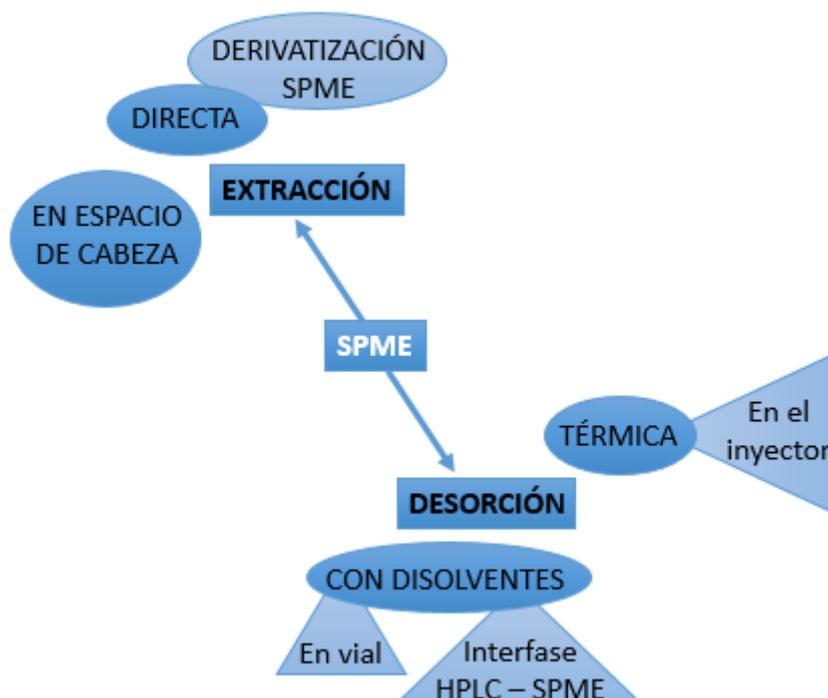
**Figura 8.** *Dispositivo comercial de la SPME (Lord y col., 2000)*

#### 4.1.5 Procedimiento

El procedimiento de la SPME puede dividirse en dos etapas:

- Primera etapa → Extracción: la fibra está recubierta por un sorbente que se pone en contacto con la muestra, con tiempo y temperatura controlados y predeterminados. En esta etapa se produce la migración de los analitos desde la disolución hasta la fibra, concluyendo cuando se produce el equilibrio entre ambos.
- Segunda etapa → Desorción: se retiran los analitos retenidos en la fibra. Se puede realizar térmicamente o por adición de un disolvente orgánico según la técnica que se vaya a utilizar posteriormente. De modo que si la SPME se une a la cromatografía de gases (CG), se empleará la desorción térmica. En cambio si la SPME se acopla a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se lleva a cabo el uso de un disolvente orgánico, utilizando una interfase (Walles y col., 2002).

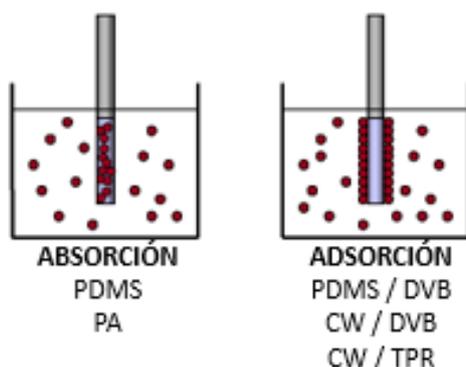
En la Figura 9 se muestra un esquema que indica los distintos tipos de extracción y desorción que pueden hacerse en la SPME.



**Figura 9.** Formas de trabajo en la SPME (Hernández y cols., 2004)

**4.1.6. Tipos de Fibras:** la naturaleza del analito determina la fibra a utilizar en cada caso. Las fibras tienen distintos tipos de recubrimientos, de manera que la SPME se puede utilizar para separar un amplio grupo de compuestos. Los comercializados inicialmente fueron los de poliacrilato (PA) y polidimetilsiloxano (PDMS). En general se utilizan recubrimientos polares como PA o carbowax (CW) para analitos polares (fenoles) y recubrimientos apolares como PDMS para analitos apolares (tolueno, benceno y etilbenceno) (Diwan A., 2014). Además de las fibras comerciales, hay autores que crean y construyen sus propias fibras para aplicaciones más específicas. Por ejemplo fibras de carbón (Aranda y cols., 2000), polipirrol (Yuan y cols., 2001) o fibras recubiertas con polímeros de huella molecular (MIPs) (Hu y cols., 2012). Se han llegado a desarrollar también recubrimientos para la extracción de compuestos organometálicos y compuestos inorgánicos que no se extraen de manera fácil con las fibras comerciales (Gbatu y cols., 1999). Esto hace que haya fibras muy selectivas.

La utilización de PA y de PDMS, las más comunes al ser de las primeras introducidas, para la extracción de los analitos en muestras, se debe prioritariamente a un fenómeno de absorción. Secundariamente se ha visto que en la extracción de analitos muy polares, también se da la vía de la adsorción pero produciéndose una cierta competitividad entre ambos efectos. En la Figura 10 se muestran los dos tipos de fenómenos y las fibras clasificadas según el proceso que se desarrolle mayoritariamente. Las fibras en las que se combinan más de un polímero (mixtas), como por ejemplo PDMS / DVB (polidimetilsiloxano / divinilbenceno), CW / DVB (carbowax / divinilbenceno) o CW / TPR (carbowax / templated resin), son más adecuadas para analitos volátiles debido a que la principal interacción entre la fibra y los analitos se da por la vía de la adsorción al ser polímeros sólidos (los coeficientes de distribución de los analitos son mayores) (Shirey et col., 1999).



**Figura 10.** Clasificación de las fibras de la SPME según si la extracción se produce por absorción o adsorción

La forma habitual de llevar a cabo la desorción de los analitos cuando se emplea esta técnica es térmicamente en el inyector de un cromatógrafo de gases. Cuando se aumenta la temperatura, la afinidad de los compuestos por la fibra baja de manera que los analitos son introducidos en la columna analítica por el flujo del gas portador. Los puertos de inyección de los cromatógrafos de gases son muy adecuados para llevar a cabo la desorción de los analitos de la fibra. Aunque se haya mencionado anteriormente que la desorción térmica es la más adecuada, hay compuestos como los analitos termolábiles o poco volátiles, que no se pueden determinar directamente por

cromatografía de gases. De manera que cuando existan compuestos de este tipo, se debe utilizar la combinación de SPME con HPLC, siendo necesaria la utilización de un disolvente orgánico para desorber el analito (Negao y col., 1998).

#### **4.1.7. Ventajas e Inconvenientes**

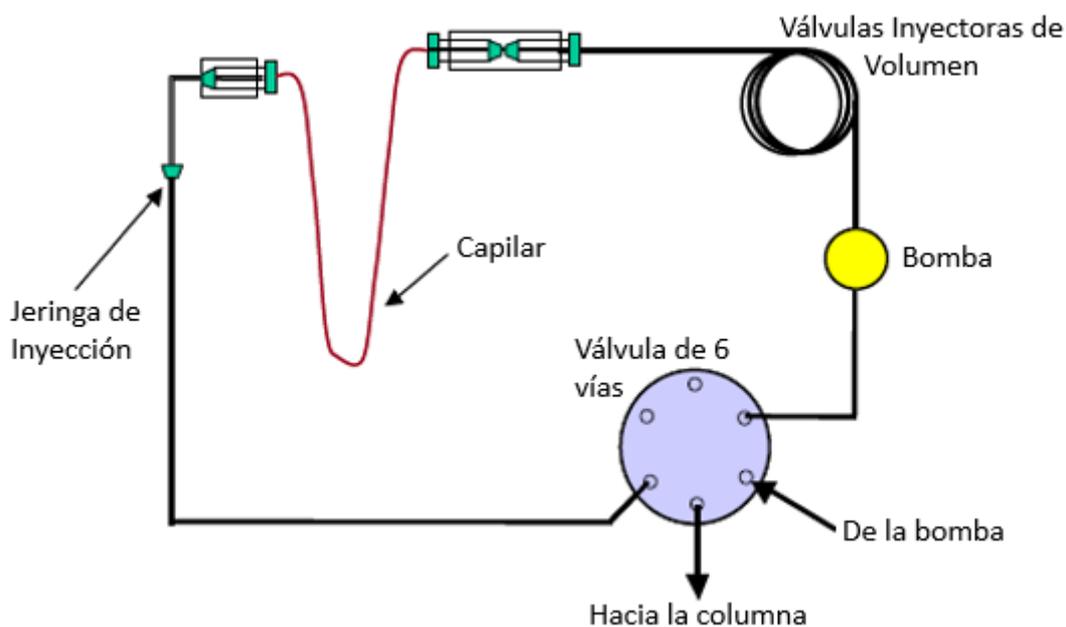
Esta técnica presenta una serie de ventajas que hacen que su utilidad sea muy alta. Es una técnica simple, de bajo coste, que puede ser automatizada, se puede utilizar con pequeños volúmenes de muestra y generalmente no requiere el uso de disolventes orgánicos para llevar a cabo la preconcentración, hecho que sí sucede en el caso de otras técnicas como la extracción en fase sólida, por ejemplo. Su diseño ligero y portátil, lo hace muy útil en el caso de realizar análisis de campo. Además se puede utilizar en muestras de diferente naturaleza como gaseosas (aire o aliento), líquidas (agua o bebidas) y sólidas (sedimentos, alimentos). Otra ventaja es que se puede aplicar a la extracción de compuestos de diferente volatilidad (Koziel y cols., 2001).

El principal inconveniente que presenta es la limitada capacidad de las fibras, ya que la cantidad de recubrimiento es muy pequeña. Como consecuencia de ello no se obtienen unos límites de detección bajo (pobre sensibilidad), sobre todo si se combina la SPME con la cromatografía líquida (Koziel y cols., 2001).

#### **4.1.8. Variantes de la SPME**

En sus más de 20 años de existencia, la SPME ha experimentado un desarrollo espectacular y ha sido aplicada a una gran variedad de analitos en distintos tipos de muestras, consiguiendo límites de detección más bajos (alta sensibilidad). De modo que se han determinado pesticidas, fenoles, compuestos orgánicos volátiles, drogas ilegales, etc. en muestras como suelo, agua, bebidas, sangre... previa extracción con la SPME. Como consecuencia de la gran variedad de analitos y muestras, se han desarrollado variantes de la técnica original de la SPME para poder hacer más rápida y efectiva, la extracción del analito. A continuación se describen las variantes más importantes.

**4.1.8.1. *In tube* – SPME:** esta variable de la técnica es bastante reciente. Se realiza en el interior de un fragmento de columna capilar de GC o micro – LC (cromatografía líquida). Se suele aplicar en línea con la HPLC, como muestra la Figura 11, conectándose con el automuestreador del cromatógrafo de líquidos, el capilar (que será el que realice la preconcentración) y el sistema cromatográfico. Gracias a este acoplamiento, se puede llevar a cabo la extracción, concentración, desorción e inyección de los analitos de forma automatizada, siendo bastante más útil que el acoplamiento convencional de SPME – HPLC (Kataoka, 2002).

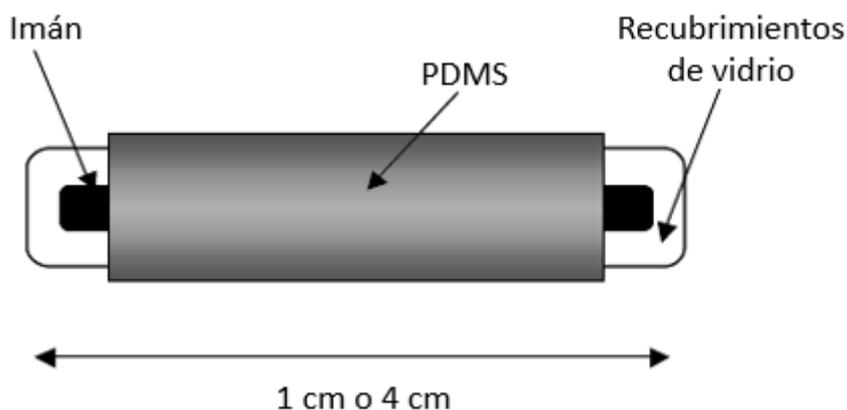


**Figura 11.** Esquema de *in – tube* SPME – HPLC

Durante la etapa de extracción la muestra se aspira desde el vial en el que se encuentra hasta el capilar y luego vuelve de nuevo hacia el vial. Este proceso se repite hasta que se produce el equilibrio o hasta que se tiene suficiente analito extraído en función de la sensibilidad deseada. La situación de equilibrio se consigue tras un número determinado de ciclos, a partir del cual ya no aumenta la cantidad de analito. La desorción de los analitos retenidos en el interior de la columna capilar del CG se realiza pasando una fase móvil o un disolvente por el capilar para que los analitos lleguen a la columna analítica (Gou y cols., 2000).

Esta modalidad de SPME tiene como ventaja fundamental el poder automatizar todo el proceso de SPME – HPLC de una manera rápida y sencilla. Los límites de detección son inferiores a los del acoplamiento con fibras. Otra ventaja es que todas las columnas comercializadas para CG se pueden utilizar en el *in – tube* SPME. El inconveniente principal es que hay que utilizar muestras muy limpias ya que de lo contrario el capilar se puede obstruir muy fácilmente (Arthur y cols., 1992).

**4.1.8.2. Extracción por Sorción con Barras Agitadoras (SBSE):** también se le puede llamar *Stir Bar Sorptive Extraction*. Es una técnica basada en los mismos principios de extracción que la SPME ya que también se busca un equilibrio entre la muestra y el sorbente polimérico. En esta técnica, el sorbente (capa de 1 mm de polidimetilsiloxano o PDMS) recubre una barra magnética agitadora, que se encuentran a la venta ya recubiertas y se denominan Twister®. Estas barras pueden ser de 10 mm para volúmenes de entre 1 y 50 mL y de 40 mm para volúmenes de entre 100 y 250 mL. En la Figura 12 se muestra un esquema de estas barras agitadoras (Soini y cols., 2004).

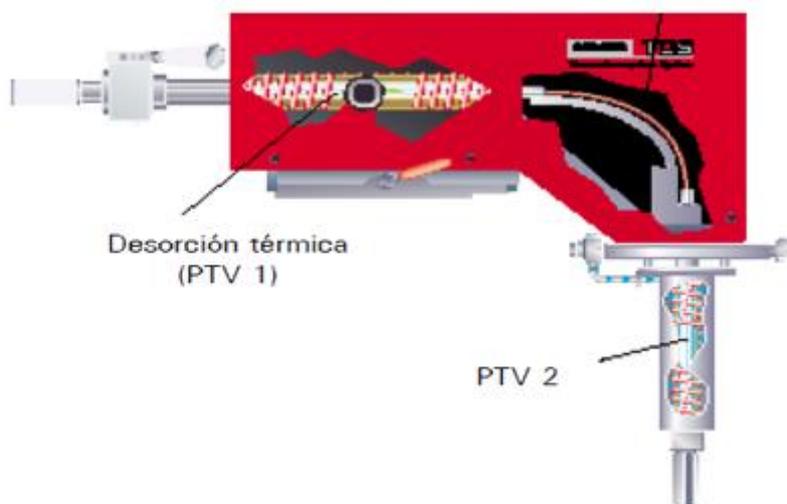


**Figura 12.** Esquema de las barras magnéticas agitadoras recubiertas de PDMS usadas en SBSE

El proceso es sencillo, los analitos son extraídos introduciendo la barra magnética recubierta de PDMS en la muestra directamente o en el espacio de cabeza. A continuación, la barra se retira de la muestra, se limpia con agua y se seca. Los compuestos extraídos por la barra son desorbidos térmicamente y se introducen en el cromatógrafo de gases. También se puede usar un disolvente orgánico para inyectarlo

posteriormente en HPLC o CG. La diferencia principal del SBSE y la SPME es la cantidad de sorbente de las barras con PMDS y las fibras en SPME. La cantidad de PDMS en las barras agitadoras es de 55 a 300  $\mu\text{L}$  (según el tipo de barra), mientras que la cantidad en las fibras es de 100  $\mu\text{L}$ , de este modo la eficiencia de la extracción se ve aumentada en SBSE (Cháfer, 2006).

En las aplicaciones de SBSE se utiliza la desorción térmica, ya que se ha desarrollado un sistema acoplado al lugar de inyección del cromatógrafo de gases. En la Figura 13 se muestra el dispositivo comercial esquematizado, que consiste básicamente en la combinación de dos inyectores en serie. El primero introduce la barra magnética agitadora donde se lleva a cabo la desorción propiamente dicha. El segundo es el lugar al que son arrastrados los analitos desorbidos. También podría combinarse con HPLC si la desorción se realiza con un disolvente orgánico. Los parámetros a optimizar son similares a los de la SPME tradicional: condiciones de la muestra, tiempo y temperatura de absorción.

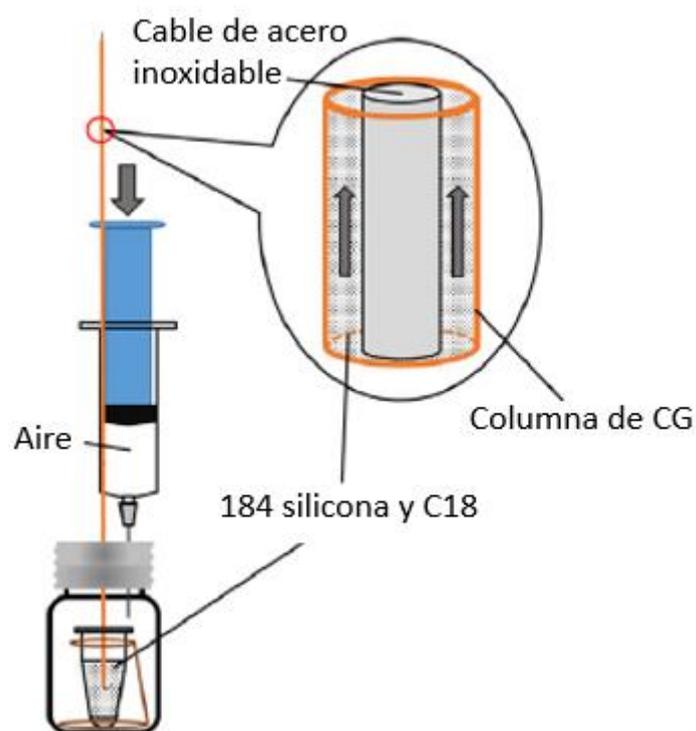


**Figura 13.** Unidad de desorción térmica comercializada para SBSE

**4.1.8.3. Microextracción en Fase Sólida Biocompatible (BioSPME):** es un tipo de SPME con fibras muy particular, por ello es necesario comentarlo aparte. Las fibras utilizadas en este caso son biocompatibles para el análisis *in vivo*. Consiste en una aguja hipodérmica y una fibra de sílice C18 (fase estacionaria), como se muestra en la Figura

14. La aplicación se restringe al ámbito de la biotecnología, ya que solo se puede llevar a cabo en el laboratorio. Es útil en la toma de muestras de animales sin tener la necesidad de sacrificarlos. Se pincha el animal insertando directamente la aguja en el flujo sanguíneo y la medición se hace de manera continua. Se utiliza para medir drogas o metabolitos en dichos animales de laboratorio. Tiene numerosas ventajas, como la reducción del número de animales que se necesitaría para la toma de muestra, abaratando todo el proceso, además, se obtienen un mayor número de datos lo que hace que aumente el nivel de confianza de los resultados.

Mediante esta técnica también se analizan árboles, plantas, peces, cultivos celulares, entre otros, para obtener diversos parámetros en función del tiempo o el estrés por ejemplo (Li y cols., 2015).



**Figura 14.** Preparación de la fibra de C18 para la SPME

#### 4.1.9. Aplicaciones Generales

Como ya se ha visto a lo largo del trabajo, la Microextracción en Fase Sólida (SPME) es una técnica de adsorción y desorción muy simple y efectiva, que sin la utilización de

equipos complicados o disolventes, te permite concentrar compuestos tanto volátiles como no volátiles, en muestras líquidas (directa) o gaseosas (espacio de cabeza). Además variando el tipo y grosor de fibra y la técnica de análisis posterior, normalmente cromatografía de gases (CG) o líquida de alta resolución (HPLC), se puede identificar gran cantidad de analitos, de distinta naturaleza química.

El campo en el que más se ha empleado sin duda esta técnica es en del análisis de muestras medioambientales (Alpendurada, 2000). Esto se debe a que las muestras de suelo, aguas residuales, aire, agua de mar, etc. son muestras muy complejas y con otras técnicas habría que eliminar muchas interferencias. En este caso, pese a no conseguir la eliminación completa de los analitos de la muestra matriz, como la capacidad de concentración y selectividad de esta técnica es tan alta, nos permite conseguir un resultado directo y con alta sensibilidad de nuestro analito. Además, el hecho de que sea un dispositivo portátil, lo hace muy útil a la hora de realizar análisis de campo. La Tabla 1 muestra ejemplos de análisis en varios tipos de muestras ambientales con diferentes fibras.

Además de las muestras ambientales, en los últimos años se ha incrementado el uso en muestras bromatológicas y toxicológicas (Theodoridis y cols., 2000), por las mismas razones mencionadas anteriormente, su alta sensibilidad y sencillez principalmente. En la Tabla 2 se pueden ver ejemplos en ambos campos.

Todo esto nos deja ver la gran versatilidad que tiene la técnica, lo que la hace asegurarse un puesto en el futuro en el análisis de muestras a cualquier nivel.

Tabla 1. Aplicaciones de la SPME en la extracción de compuestos previa a su determinación en el ámbito medioambiental

Compuestos	Muestra	Tipo de Fibra	Tipo de Extracción (AD)	Tiempo de Extracción	Tipo de Desorción	Análisis	Detector	Referencias
Gas Mostaza	Agua	PA						
	Aire	PDMS	Directa	25 min	T: 150°C 3 min	CG	EM	Popiel y col., 2001
	Suelo	CAR / PDMS	(MTBSTFA)					
	Ropa	PDMS / DVB						
Óxido de Etileno (EtO)	Aire	CAR / PDMS + HBr	Espacio de cabeza	30 min	D: cloruro de metileno en metanol	CG	EM	Tsai y cols., 2004
Compuestos Sulfurosos Malolientes	Aguas residuales	PDMS / DVB	Espacio de cabeza	35 min	T: 250°C 2 min	CG	PFPD	Lestremann y cols., 2004
		PDMS / CW						
Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (PAHs)	Aire	PDMS	Espacio de cabeza	30 min	T: 250°C 6 min	CG	EM	Kolár y cols., 2004
Sulfodiácina, Sulfatiácina, Sulfapiridina	Aguas residuales	CW / DVB	Directa	50 min	D: metanol (100 µL)	CL	EM/EM	Balakrishnan y cols., 2006
Ácido Tolfenánico	Aguas residuales	PDMS	Directa (Dimetilsulfato)	45 min	T: 250°C 3 min	CG	EM	Araujo y cols., 2008
Ácido Meclofenámico	Aguas residuales	PDMS / DVB	Directa (MTBSTFA)	30 min	T: 250°C 1 min	CG	EM	Peña – Álvarez y col., 2015

AD: agente derivatizante; PDMS: poli (dimetilsiloxano); CG: cromatografía de gases; EM: espectrometría de masas; CW: carbowax; DVB: divinilbenceno; CL: cromatografía líquida; MTBSTFA: N – metil – N – t – butildimetilsililtrifluoroacetamida; PFPD: pulsed flame photometric detector; CAR: carboxeno; D: desorción con disolventes; T: desorción térmica; HBr: Bromuro de hidrógeno.

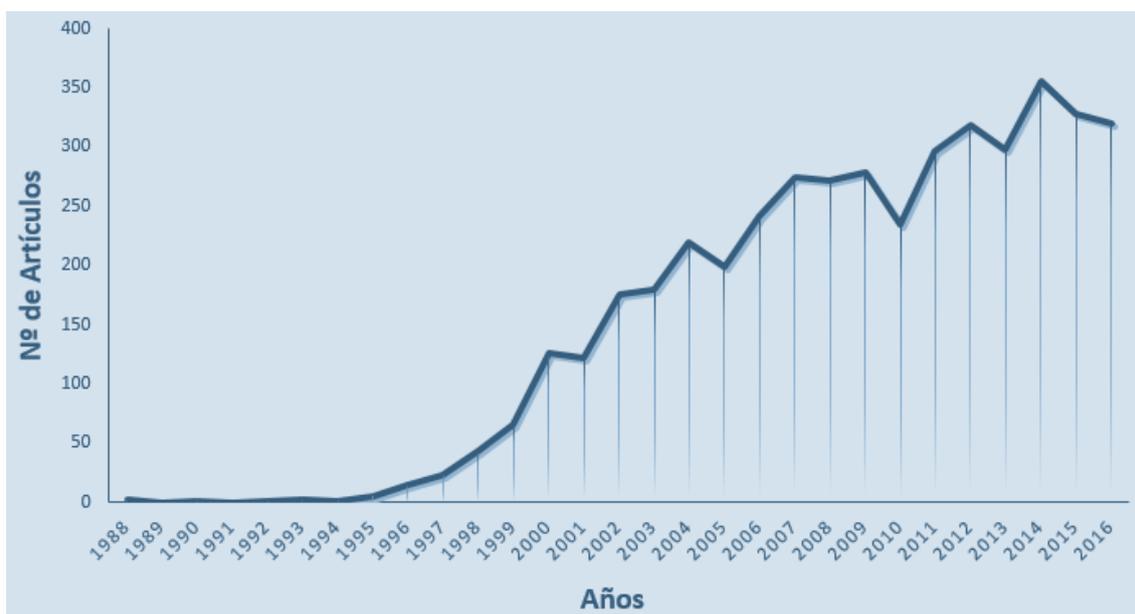
Tabla 2. Aplicaciones de la SPME en la extracción de compuestos previa a su determinación en los ámbitos bromatológico y toxicológico

Compuestos	Muestra	Tipo de Fibra	Tipo de Extracción (AD)	Tiempo de Extracción	Tipo de Desorción	Análisis	Detector	Referencias
Micotoxina y Ácido Ciclopiazónico	Queso	CW – TPR	Directa	30 min	Cámara de desorción (estática/dinámica)	HPLC	UV	Zambonin y cols., 2001
Compuestos Volátiles (linalol, hexanal...)	<i>Ocimum basilicum</i> (albahaca)	PDMS / DVB CW / DVB	Espacio de cabeza	30 min	T: 190°C 5 min	CG	EM	Andrade – Glez y cols., 2001
Triazina	Hígado de Buey	CW / DVB	Directa	25 min	T: 250°C 5 min	CG	EM	Curren y col., 2001
Volátiles de Selenio	<i>Allium</i> sp (ajo)	PDMS PA	Espacio de cabeza	25 min	T: 235°C 5min	CG	EM	Dietz y cols., 2003
Quercitina y Miricetina (flavonoides)	Frutas y vegetales	PDMS / DVB	Directa (Trimetilsilil, TMS)	30 min	T: 280° 3 min	CG	EM	Chu, 2008
Anfetaminas	Saliva	PDMS	Directa (Butilcloroformiato)	20 min	T: 250°C 15 min	CG	FID	Yonamine y cols., 2003
MDA	Pelo	PDMS	Espacio de cabeza	25 min	T: 260°C 15 s	CG	EM	Musshoff y cols., 2003
Diclorometano Tricloroetileno	Orina	CAR / PDMS	Espacio de cabeza	30 min	T: 280°C 5 min	CG	EM	Poli y cols., 2005
Tolueno	Sangre	CAR / PDMS	Espacio de cabeza	10 min	T: 220°C 30 s	CG	EM	Marchand y cols., 2015

AD: agente derivatizante; PA: poliacrilato; PDMS: poli (dimetilsiloxano); DVB: divinilbenceno; CG: cromatografía de gases; EM: espectrometría de masas; CW: carbowax; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; UV: luz ultravioleta. CAR: carboxeno; FID: flame ionization detector; MDA: 3, 4 – metilendioxianfetamina. D: desorción con disolventes. T: desorción térmica. TPR: resina templada

## 4.2. Aplicaciones de Interés Farmacéutico

Como ya se ha dicho anteriormente la SPME es una técnica que se ha desarrollado enormemente en los últimos años debido a su gran abanico de posibilidades a la hora de analizar muestras de diferentes tipos. La Figura 15 nos deja ver de manera gráfica el número de artículos por años que ha tenido esta técnica. Se puede decir claramente que la SPME tiene un aumento anual ya que se descubren nuevas fibras y variantes que ayudan a analizar más tipos de muestras.



**Figura 15.** Número de artículos por año sobre SPME en Pubmed

A continuación se muestra el desarrollo que ha tenido la técnica en las últimas tres décadas en el campo farmacéutico. En sus inicios no fueron las muestras más explotadas, pero en la actualidad debido a los numerosos avances, se está convirtiendo en un indispensable a la hora de análisis de laboratorio.

### 4.2.1. Años 1988 a 1999

El primer artículo conocido sobre la microextracción en fase sólida fue en el año 1988. Esta década solo contiene el 3.47% de los artículos (157) sobre SPME ya que la técnica no estaba desarrollada aun. Comienzan los análisis de antidepresivos, drogas como las

anfetaminas, plaguicidas en sangre, etc. Poco a poco se va perfeccionado el análisis en las muestras biológicas, ya que en un inicio se utilizaba mayoritariamente en muestras ambientales, como ya se ha mencionado anteriormente. La Tabla 3 nos muestra ejemplos de varios tipos de analitos y muestras que fueron estudiados estos años.

#### **4.2.2. Años 2000 a 2009**

En esta década es sin duda donde se produce el auge de la SPME ya que sufre un desarrollo meteórico que permite perfeccionar la técnica hasta niveles muy altos. En estos años se concentran el 46.11% de los artículos (2086) y sobretodo crece aquellos relacionados con el ámbito farmacéutico, ya que cada vez es más preciso y eficaz. La Tabla 4 nos muestra varios ejemplos de compuestos analizados por esta técnica.

#### **4.2.3. Años 2010 a 2017**

Durante estos años se sigue la misma tendencia de aumento, solo que con aun más velocidad, porque en tan solo 7 años hay más artículos que en toda la década pasada (2339), conteniendo el 51.7% de los artículos. Cabe destacar el desarrollo de nuevas aplicaciones tanto fuera como dentro del campo farmacéutico, aunque son estas últimas las que más nos interesan. En la Tabla 5, se pueden ver ejemplos con muestras muy complejas cuyos resultados son muy satisfactorios, ya que con las técnicas tradicionales se hubieran empleado más tiempo y recursos para obtener un resultado similar.

En el apartado siguiente, se analiza cual es la situación de la SPME en la actualidad, haciendo hincapié en sus novedades y nuevas aplicaciones.

**Tabla 3.** Aplicaciones de la SPME en la extracción de compuestos previa a su determinación en el ámbito farmacéutico por SPME desde 1988 a 1999

Compuestos	Muestra	Tipo de Fibra	Tipo de Extracción	Tiempo de Extracción	Tipo de Desorción	Análisis	Detector	Referencias
Corticoides (prednisona, cortisona, hidroclotisona...)	Orina	PDMS / DVB PA CW / DVB CW / TPR	Directa	10 a 60 min	D: metanol en agua (50:50)	HPLC	ES / EM	Dietrich A y cols. 1997
Amitriptilina, Clorimipramina, Imipramina, Trimipramina	Sangre completa	PDMS	Espacio de cabeza	1h	T: 280°C 1, 3, 5 min	CG	FID	Xiao – Pen y cols., 1997
Etanol Acetona Isopreno	Aire respirado	PDMS PDMS / DVB CW / DVB	Espacio de cabeza	30 min	T: 200°C 15s	CG	EM	Grote C y col. 1997
Anfetamina, Metanfetamina, Efedrina, Norefedrina	Orina	PDMS	Espacio de cabeza	30 min	T: 200°C 2 min	CG	EM	Battu y cols., 1998

PDMS: polidimetilsiloxano; CG: cromatografía de gases; EM: espectrometría de masas; T: desorción térmica; D: desorción con disolvente; FID: flame ionitation detection; ES: electrospray; TPR: resina templada; CW: carbowax; DVB: divinilbenceno; PA: poliacrilato.

**Tabla 4.** Aplicaciones de la SPME en la extracción de compuestos previa a su determinación en el ámbito farmacéutico por SPME desde 2000 a 2009

Compuestos	Muestra	Tipo de Fibra	Tipo de Extracción	Tiempo de Extracción	Tipo de Desorción	Análisis	Detector	Referencias
Fenotiacinas	Sangre completa Orina	PDMS PA PDMS / DVB	Directa	60 min	D: agua / acetoneitrilo	LC	EM	Kumazawa y cols., 2000
Prazepam	Orina Sangre Plasma	PDMS PA PDMS / DVB CAR / PDMS	Directa	45 min	T: 250°C 1 min	CG	EM	Mosaddegh y cols., 2001
Verapamilo Norverapamilo Galopamilo	Orina	Capilar recubierto con PPY	<i>In tube</i> – SPME	34 min	-	LC	EM	Walles y cols., 2002
Ácido Retinóico (RA)	Disolución de RA	Tubo de PTFE	Directa	3.3 – 3.7 min	-	EC	UV	Fang M y col., 2003
Candersartán Losartán Irbesartán Valsartán	Plasma Orina	Capilar recubierto con MMA - EGDMA	<i>In tube</i> – SPME	10 min	-	HPLC	UV	Nie y cols., 2005

LC: cromatografía líquida; EM: espectrometría de gases; PPY: polipirrol; EC: electroforesis capilar; UV: luz ultravioleta; PTFE: politetrafluoretileno; CG: cromatografía de gases; PDMS: polidimetilsiloxano; CW: carbowax; DVB: divinilbenceno; PA: poliacrilato; T: desorción térmica; D: desorción con disolvente; HPLC: cromatografía de alta resolución; MMA – EGDMA: poli (ácido metacrílico – polietilenglicol dimetacrilato).

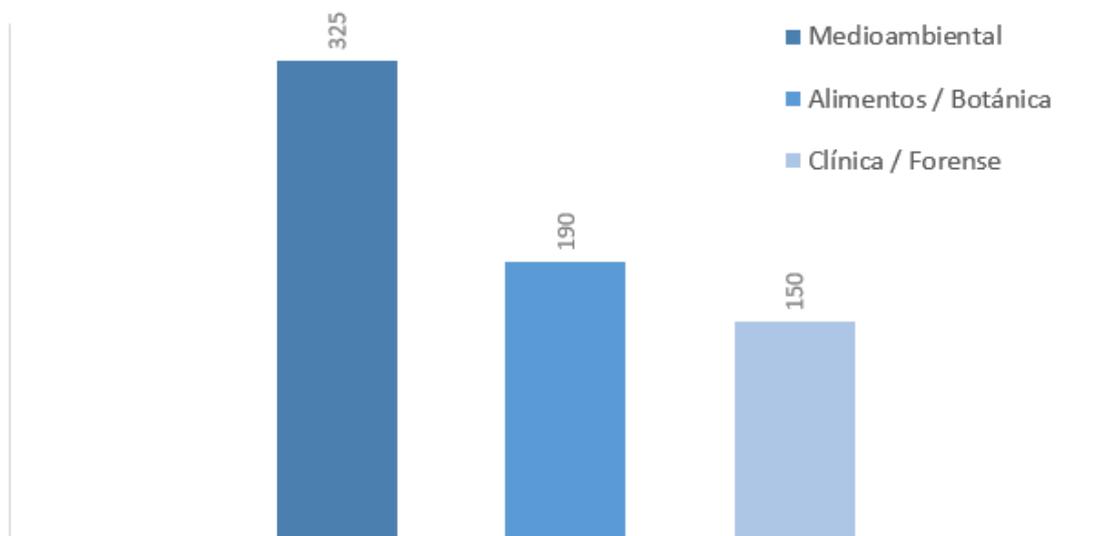
**Tabla 5. Aplicaciones de la SPME en la extracción de compuestos previa a su determinación en el ámbito farmacéutico por SPME desde 2010 a 2017**

Compuestos	Muestra	Tipo de Fibra	Tipo de Extracción	Tiempo de Extracción	Tipo de Desorción	Análisis	Detector	Referencias
Diversos metabolitos producidos por probióticos	Heces	PDMS / DVB	Directa	-	-	CG	EM	Vitali y cols., 2012
PBP2a generada por MRSA	Solución que contiene la proteína PBP2a	Fibras de inmunoespecificidad ligadas a Ac	Directa	1h	D: 6 diferentes	CL	EM / EM	Liu y cols., 2014
Metabolitos volátiles generados por <i>Clostridium difficile</i>	Heces	DVB / CAR / PDMS	Espacio de cabeza	-	T: 260°C 180s	CG x CG	TOFMS	Reess y cols., 2016
Biomarcadores del cáncer de estómago	Aire respirado	CAR / PDMS	Espacio de cabeza	-	-	CG	EM	Chen y cols., 2016
Metadona	Orina	Recubrimiento de nanocompuestos sol – gel / Cu	Directa	10 min	D: acetronitrilo	HPLC	UV	Mohammadiazar y cols. 2017

CG: cromatografía de gases; EM: espectrometría de masas; PDMS: polidimetilsiloxano; DVB: divinilbenceno; HPLC: cromatografía líquida de alta eficiencia; UV: radiación ultravioleta; TOFMS: espectrometría de masas de tiempo de vuelo; PBP2a: proteína 2a de unión a la penicilina; MRSA: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente; Ac: anticuerpos; CL: cromatografía líquida.

### 4.3. SPME en la Actualidad

Como ya se ha comentado en numerosas ocasiones, la SPME es una técnica que se aplica en numerosos campos, siendo el medioambiental es más explotado hasta el momento. En la Figura 16 se ve de manera esquematizada una clasificación de las publicaciones en revistas científicas internacionales sobre la SPME hasta julio del 2002, según el campo de aplicación (Pawliszyn, 2009).



**Figura 16.** Clasificación por campos de aplicación de las publicaciones relacionadas con SPME

Aunque haya pasado más de una década, el número de artículos ha crecido pero manteniendo más o menos las mismas proporciones ya que aunque han aumentado sobre todo los artículos de SPME en ámbito farmacéutico, no han sobrepasado aun al campo medioambiental debido a que es la principal técnica de preconcentración de este tipo de muestras (Beltrán y cols., 2000).

Hay algunas aplicaciones puntuales reseñables en este campo por su originalidad como por ejemplo, la determinación de la influencia del pH en la concentración libre de quinolonas en muestras acuosas (Lützhof y cols., 2000) o el estudio de mecanismos de fotodegradación de algunos compuestos como los bifenilos policlorados (Lores y cols., 2002).

### 4.3.1. Desarrollo de Nuevas Fibras

A lo largo del trabajo se han mencionado numerosas fibras como PDMS o PA y fibras mixtas como PDMS/DVB, CAR/PDMS, CW/DVB, etc. Estas fibras pueden llegar a cubrir gran parte de las necesidades analíticas que puedan surgir pero tienen una serie de inconvenientes (interacción baja entre analito y fibra, problemas de contaminación en la fabricación de la fibra, poco uso de fibras comerciales con HPLC, baja estabilidad en presencia de disolventes orgánicos fuertes) (Haberhauer – Troyer y cols., 2000) que hacen que sea necesaria la creación y el desarrollo de nuevas fibras, como las que se muestran en la Tabla 6, con el fin de abarcar aún más tipos de analitos que se puedan analizar.

**Tabla 6.** *Nuevas fibras para uso en la SPME*

<b>Fibra</b>	<b>Muestra</b>	<b>Analito</b>	<b>Referencia</b>
Poli (3 – metiltiofeno)	Agua	Arsenito, arsenato y compuestos organometalicos del arsénico	Gbatu y cols. 1999
Polisilicona fullereno C <sub>60</sub> (PF)	Aire	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	Xiao y cols., 2001
Polímeros de inmutioafinidad Huella molecular (MIPs)	Suero	Teofilina	Yuan y cols. 2001
Combinación de grupos hexafluorobisfenol unidos por puentes de hidrogeno con segmento de oligo (dimetilsiloxano) o BSP3	Aire	Sarín (GB) (organofosforado)	Harvey y cols. 2002
Fibras recubiertas de materiales de acceso restringido (RAM) como alquil – diol – sílice (ADS)	Fluidos biológicos	Benzodicepinas	Mullet y col. 2002

Cabe destacar a parte una nueva fibra que se ha desarrollado hace pocos meses y cuya estructura está representada en la Figura 17. Este nuevo revestimiento se compone de fluoroplásticos amorfos de politetrafluoroetileno (PTFE AF) y partículas adsorbentes con

equilibrio hidrófilo – lipófilo (HLB), para estudios complementarios de cromatografía de gases y líquida gracias a una única fase de extracción fiable y versátil. Se concluyó que la amplia gama de analitos extraídos por partículas de HLB complementado con el polímero PTFE AF como inmovilizador de partículas, era un revestimiento de SPME valido para el análisis de matrices complejas (Gionfriddo y cols., 2017).

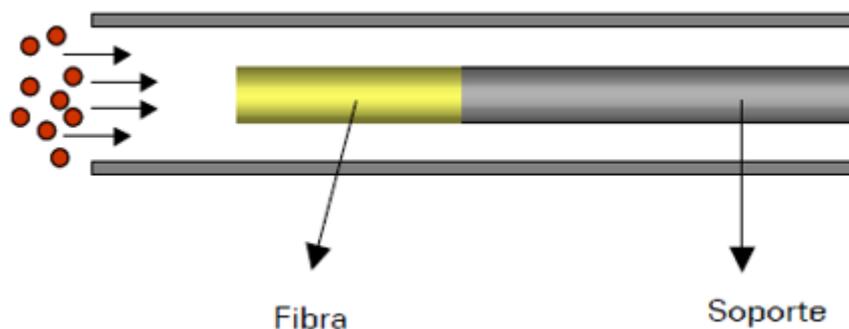


Figura 17. Modelo de fibra de PTFE AF / HLB

#### 4.3.2. SPME Media Ponderada en el Tiempo

Esta nueva variante también llamada *Time – Weighted Average Sampling* SPME (TWA – SPME), permite realizar análisis a lo largo del tiempo. Se aplica a muestras de aire y se acopla al cromatógrafo de gases.

Se basa en que la fase estacionaria (recubrimiento de la fibra) no se expone de manera directa a la muestra, que en este caso sería el aire, sino que se queda retraída en el interior de la aguja del dispositivo de SPME. La extracción de los analitos se produce por difusión por la fase estática del interior de la aguja (Batlle y cols. 2001). De esta manera, a medida que va pasando la muestra por la fibra unida al soporte, la concentración va disminuyendo, ya que se va quedando adherida a la fibra. En la Figura 18 se puede ver este hecho de manera gráfica (Martos y col., 1999).



**Figura 18.** Esquema de la técnica TWA – SPME

Los fundamentos teóricos de esta técnica se basan en la siguiente ecuación:

$$n = D_g \frac{A}{Z} \int C(t) dt$$

donde  $n$  es la cantidad de analito extraída,  $D_g$  es el coeficiente de difusión de los analitos en la fase gaseosa,  $A$  es la superficie de la sección transversal de la aguja,  $Z$  la distancia de la fibra al final de la aguja y  $C(t)$  es la concentración del analito en la entrada de la aguja. Según la ecuación, la respuesta de los analitos es proporcional a la integral de la concentración de analito a lo largo del tiempo, siendo  $A$ ,  $Z$  y  $D_g$  constantes (Martos y col., 1999).

Entre las ventajas que presenta esta técnica son que se puede utilizar en un amplio intervalo de concentraciones y diferentes tiempos de muestreo gracias a:

- Alejar más la fibra del final de la aguja (aumentar  $Z$ ).
- Disminuir el diámetro de la aguja en la entrada (disminuir  $A$ ).
- Utilizar sobrentes de mayor capacidad (Batlle y cols., 2001).

La TWA – SPME se utiliza principalmente con muestras de aire como se ha dicho antes, pero también se puede utilizar en muestras de agua. Ejemplos de sustancias que se han extraído por esta técnica son hidrocarburos (Khaled y col., 2000), isocianatos (Batlle y cols., 2001),  $n$  – valeraldehído (Tsai y col., 2002) y formaldehído (Koziel y cols., 2001).

### 4.3.3. Nuevas Aplicaciones en SPME

En este apartado se mencionan algunos artículos con avances destacables de los últimos años.

Se destaca el uso de la SPME en análisis de muestras biológicas *in vivo*. Se sabe que la SPME se ha utilizado siempre para análisis *in vivo* invasivos y no invasivos. Al desarrollar nuevas fases de extracción biocompatibles se ha mejorado la sensibilidad, selectividad y compatibilidad de la SPME con aplicaciones *in vivo*. Un ejemplo concreto es el uso de la SPME para el muestreo de tejido cerebral cuando se acopla a CL – EM. La introducción de nuevos revestimientos de la SPME de tipo mixto biocompatibles deja ver el potencial de la técnica para la monitorización simultánea de cambios en las concentraciones de múltiples neurotransmisores dentro del fluido extracelular cerebral. Este hecho ofrece unas perspectivas muy interesantes para poder realizar estudios del cerebro en profundidad en un futuro (Cudjoe y cols., 2012).

En segundo lugar hay que centrarse en un tipo de revestimiento que permite una mejor utilización de la SPME en matrices biológicas complejas como sangre completa y orina. Se consigue realizar un análisis rápido de dichas muestras sin tratamiento, gracias al desarrollo de un dispositivo *in tube* – SPME biocompatible. Para ello se crea una fibra de polipirrol (PPY) en presencia de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) que actúa de tensioactivo. Como resultado se obtiene una red homogénea con una nanoestructura cuyo tamaño de poro es lo suficientemente pequeño para que queden retenidos únicamente los compuestos que nos interesan (Piri – Moghadam y cols., 2016).

Por último, mencionar la utilización de la SPME como método de estudio del perfil lipodómico (cantidad de grasas) en línea de cultivo celulares. También se realiza una comparación con la técnica convencional de Bligh y Dyer. Este nuevo método consiste en el uso de la técnica de la SPME como método de extracción de los distintos tipos de grasas. Se utilizó para ello una línea celular de carcinoma hepático humano (HCC) como modelo y se concluyó que esta técnica tiene un gran potencial en el futuro. Esto se debe a la simplicidad del modelo propuesto ya que impide interferencias provocadas por la matriz (inconveniente principal de los métodos tradicionales) y ofrece la extracción de

una gran cantidad de lípidos (incluyendo los menos abundantes), gracias a que el método se basa en el equilibrio (Birjandi y cols., 2017).

## 5. CONCLUSIONES

- La microextracción en fase sólida es una técnica muy útil como alternativa válida a los métodos de separación y preconcentración de analitos utilizados tradicionalmente.
- El tipo de fibra según las características del analito que se quiera medir es el parámetro más importante para que la medida sea la más eficaz posible.
- La microextracción en fase sólida se acopla principalmente a la cromatografía de gases debido a la facilidad de conectarlos en línea y automatizar el proceso, dando muy buenos resultados.
- El ámbito farmacéutico, pese a no ser en el que más se utiliza, es el que está teniendo mayor auge, ya que gracias a las nuevas fibras, se pueden abarcar analitos de muestras biológicas.
- El desarrollo de esta técnica de manera biocompatible es una clara línea de futuro, debido a su gran demanda y sus buenos resultados hasta la fecha.
- La microextracción en fase sólida seguirá creciendo y perfeccionándose con los años debido a su versatilidad, simpleza y alta eficacia.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

Alpendurada M F. Solid phase microextraction: a promising technique for simple preparation in environmental analysis. *J Chromatog A*. 2000; 889: 3 – 4.

Andrade – González I, González – Zúñiga J A. González – Sánchez H M, González – Plomares S, Rosales – Reyes T. Microextracción en fase solida de compuesto volátiles en albahaca (*Ocimum basilicum L.*). *Acta Universitaria (Guanajuato, Mexico)*. 2011: 21 (1); 17 – 22.

- Aranda R, Kruus P, Burk R C. Assessment of polycrystalline graphites as sorbents for solid – phase microextraction of nonionic surfactants. *J Chromatogr A*. 2000; 888 (1 – 2): 35 – 41.
- Araujo L, Wild J, Villa N, Camargo N, Cubillan D, Prieto A. Determination of antiinflammatory drugs in water samples, by in situ derivatization, solid phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. *Talanta*. 2008; 75 (1): 111 – 115.
- Arthur C L, Killam L M, Buchholz K D, Pawliszyn J, Berg J R. Automation and optimization of solid – phase microextraction. 1992; 64 (17): 1960 – 1966.
- Balakrishnan VK, Terry KA, Toito J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: a comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *J Chromatogr A*. 2006; 1131 (1): 1 – 10.
- Battle R, Colmsjö A, Nilsson U. Development of a personal isocyanate sampler base don DBA derivatization on solid – phase microextraction fibers. *J Anal Chem*. 2001; 371 (4): 514 – 518.
- Battu C, Marquet A, Fauconnet A L, Lacassie E, Lachâtre G. Screening procedure for 21 amphetamine – related compounds in urine using solid – phase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry. *J Chromatog Sci*. 1998; 36.
- Beltrán J, López J F, Hernández F. Solid – phase microextraction in pesticide residue analysis. *J Chromatog A*. 2000; 885 (1 – 2): 389 – 404.
- Birjandi A P, Bojko B, Ning Z, Figeys D, Pawliszyn J. High throughput solid – phase microextraction: a new alternative for analysis of celular lipodome? *J Chromatog B*. 2017; 1043: 12 – 19.
- Cháfer C. Acoplamiento microextracción en fase sólida – cromatográfica. Tesis doctoral, universidad de Valencia, facultad de química, departamento de química analítica; 2006.
- Chen Y, Zhang Y, Pan F, Liu J, Wang K, Zhang C, Cheng S, Lu L, Zhang W, Zhang Z, Zhi X. Zhang Q, Alfranca G, Fuente J M, Chen, D, Cui D. Breath analysis base don Surface

– enhanced raman scattering sensors distinguishes early and advanced gastric cáncer patients from healthy person. ACS Nano. 2016; 10: 8169 – 8179.

Chu T – Y. Application of solid – phase microextraction for determination of flavonoids from plants food. Hsiupong Institute of Technology (Taiwan). 2008 [en línea]. [Consultado en Mayo 2017]. Disponible en: <http://ir.hust.edu.tw/dspace/bitstream/310993100/1711/1/NSC96-2113-M164-001.pdf>

Cudjoe E, Bojko B, Togunde P, Pawliszyn J. In vivo solid – phase microextraction for tissue bioanalysis. Bional. 2012; 4 (21): 2605 – 2619.

Curren M, King J. Ethanol – modified subcritical water extraction combined with solid – phase microextraction for determining atrazine in beef kidney. J Agric Food Chem. 2001; 49 (5): 2175 – 2180.

Dietrich A, Volmer J, Hui P M. Rapid determination of corticosteroids in urine by combined solid phase microextraction / liquid chromatography / mass spectrometry. Rapid Comunic Mass Spectromet. 1997; 11 (17): 1926 – 1934.

Dietz C, Perez – Corona T, Madrid – Albarrán Y, Cámara C. SPME for on – line volatile órgano – selenium speciation. J Anal At Spectrum. 2008; 18 (3): 467 – 473.

Diwan A, Singh B, Roychowdhury T, Tan D, Tedone L, Nesterenko P N et al. Porous, high capacity coatings for solid – phase microextraction (SPME) by sputtering. Brigham Young University, Utah, Usa. 2014.

Eisert R, Levsen K. Determination of pesticides in aqueous samples by solid – phase microextraction in – line coupled to gas chromatography – mass spectrometry. J Am Soc Mass Spectrom. 1995; 6: 1119 – 1130.

Fang M, Xu G. Determination of trace RA by capillary electrophoresis – solid – phase microextraction with direct UV detection. J Chromatog Sci. 2003; 41.

Fernández Hernando P, Martín – Esteban A, Pérez – Conde C, Vidal M, Cámara C. Toma y Tratamiento de Muestras. 1ª ed. Madrid: Síntesis; 2004.

- Gbatu T P, Ceylan O, Sutton K L, Rubinson J, Caruso J A, Mark H B. Electrochemical control of solid phase microextraction using unique conducting polymer coated fibers. *Anal Commun.* 1999; 36: 203 – 205.
- Gbatu T P, Sutton K L, Caruso J A. Development of new SPME fibers by sol – gel technology for SPME – HPLC determination of organometals. *Anal Chim Act.* 1999; 402 (1 – 2): 67 – 79.
- Gionfriddo E, Bouaci E, Pawliszyn J. New generation of solid – phase microextraction coatings for complementary separation approaches: a step toward comprehensive metabolomics and multiresidue analyses in complex matrices. *Anal Chem.* 2017; 89: 4046 – 4054.
- Gou Y, Tragas C, Lord H. On – line coupling of in – tube solid phase microextraction (SPME) to HPLC for analysis of carbamates in water samples: comparison of two commercially available autosamplers. *J Microcolumn Sep.* 2000; 12 (3): 125 – 134.
- Grote C, Pawliszyn J. Solid – phase microextraction for the analysis of human breath. *Anal Chem.* 1997; 69: 587 – 596.
- Haberhauer – Troyer C, Crnoja M, Rosenberg E, Grasserbauer M, Fresenius S. Surface characterization of commercial fibers for solid – phase microextraction and related problems in their application. *J Anal Chem.* 2000; 366 (4): 329 – 331.
- Harvey S D, Nelson D A, Wright B W, Grate J W. Selective stationary phase for solid – phase microextraction analysis of sarín (GB). *J Chromatog A.* 2002; 954 (1 – 2): 217 – 225.
- Hu X, Cai Q, Fan Y, Ye T, Cao Y, Guo C. Molecularly imprinted polymer coated solid – phase microextraction fibers for determination of Sudan I – IV hot chili powder and poultry feed samples. *J Chromatogr A.* 2012; 1219: 39 – 46.
- Huang Z, Shi X, Jiang W. Theoretical models for supercritical fluid extraction. *J Chromatograf A.* 2012; 1250: 2 – 26.

- Khaled A, Pawliszyn J. Time – weighted average sampling of volatile and semi – volatile airborne organic compounds by the solid – phase microextraction device. *J Chromatog A*. 2000; 892 (1 – 2): 455 – 467.
- Kataoka H. Automated simple preparation using in – tube solid – phase microextraction and his application – a review. *Anal Bioanal Chem*. 2002; 373: 31 – 45.
- Kolár K, Ciganek M, Malecha J. Air polymer distribution coefficients for polycyclic aromatic hydrocarbons by solid – phase microextraction sampling. *J Chromatogr A*. 2004; 1029: 263 – 266.
- Koziel J A, Noah J, Pawliszyn J. Field sampling and determination of formaldehyde in indoor air with solid – phase microextraction and on – fiber derivatization. *Environ. Sci. Technol*. 2001; 35 (7): 1481 – 1486.
- Kumuzawa T, Seno H, Watanabe – Suzuki, Hattori, Ishii A, Sato K, Suzuki O. Determination of phenothiazines in human body fluids by solid – phase microextraction and liquid chromatography / tandem mass spectrometry. *J Mass Spectromet*. 2000; 35: 1091 – 1099.
- Leong M, Fuh M, Huang S. Beyond dispersive liquid – liquid microextraction. *J Chromatograf A*. 2014; 1335: 2 – 4.
- Lestreman F, Desauziers V, Fanlo J – L. Headspace SPME followed by GC / PFPD for analysis of malodorous sulfur compounds in liquid industrial effluents. *Anal Bioanal Chem*. 2004; 378: 190 – 196.
- Li S, Lu Chengwei, Zhu F, Jiang R, Ouyang G. Preparation of C18 composite solid – phase microextraction fiber and its applications to the determination of organochlorine pesticides in water samples. *Anal Chim A*. 2015; 873: 57 – 62.
- Liu Y, Lord H, Maciazek – Jurczyk M, Jolly S, Hussain M A, Pawliszyn J. Development of an immunoaffinity solid phase microextraction method for the identification of penicillin binding protein 2<sup>a</sup>. *J Chromatog A*. 2014; 2364: 64 – 73.
- Lord H, Pawliszyn J. Evolution of solid – phase microextraction technology. *J Chromatogr Sci*. 2000; 885: 153 – 193.

- Lores M, Llompart M, González – García R, González – Barreiro C, Cela R. On – fibre photodegradation studies of polychlorinated biphenyls using SPME – GC – MS – MS: a new approach. *Chemosphere*. 2002; 47 (6): 607 – 615.
- Lützhof H C H, Vaes W H J, Freidig A P, Hlling – Sorensen B, Hermens J L M. Influence of pH and other modifying factors on the distribution behavior of 4 – quinolones to solid phases and humic acids studied by “Negligible – Depletion” SPME \_ HPLC. *Environ Sci Technol*. 2000; 34 (23); 4989 – 4994.
- Marchand A, Aranda – Rodríguez R, Tardif R, Nong A, Haddad S. Human inhalation exposures to toluene, ethylbenzene and m – xylene and physiologically based pharmacokinetic modeling of exposures biomarkers in exhaled air, blood and urine. *Toxicol Sci*. 2015; 144 (2): 414 – 424.
- Martos P A, Pawliszyn J. Time – Weighted Average Sampling with solid – phase microextraction device: implications for enhanced personal exposure monitoring to airborne pollutants. *Anal Chem*. 1999; 71 (8): 1513 – 1520.
- Mohammadiazar S, Hasanli F, Maham M, Samarin S P. Solid – phase microextraction of methadone in urine samples by electrochemically co – deposited sol – gel / Cu nanocomposite fiber. *Biomed Chromatog*. 2016; 10 (1002): 26 – 39.
- Mosaddegh M, Richardson T, Stoddart R W, McClure J. Application of solid – phase microextraction technology to drug screening and identification. *Anal Clin Biochem*. 2001; 38: 541 – 547.
- Mullet W M, Pawliszyn J. Direct determination of benzodiazepines in biological fluids by restricted – Access solid phase microextraction. *J Anal Chem*. 2002; 74 (5): 1081 – 1087.
- Musshoff F, Lachenmeier D, Kroener L, Madea B. Automated headspace solid – phase microextraction dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples. *Forensic Sci Int*. 2003; 133 (1 – 2): 32 – 38.
- Mutavdzic D, Babic S, Horvat AJM, Kastelan-Macan M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends Anal Chem*. 2007; 26 (11): 1062-75.

- Negrao M R, Alpendurada M F. Solvent – free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid – phase microextraction – high – performance liquid chromatography with photodiode – array detection. J Chromatogr A. 1998; 823: 211 – 218.
- Nie J, Zhang M, Fan Y, Wen Y, Xiang B, Feng Y Q. Biocompatible *in – tube* solid – phase microextraction coupled to HPLC for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma and urine. J Chromatog B. 2005; 828: 62 – 69.
- Pawliszyn J. Applications of Solid Phase Microextraction. 1ª ed. United Kingdom: RSC; 1999.
- Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction. Universidad de Waterloo, Ontario. 2009. [Consultado en Enero 2017]. Disponible en:  
<http://www.sciborg.uwaterloo.ca/chemistry/pawliszyn>
- Pawliszyn J. Solid Phase Microextraction. Theory and Practice. 1ª ed. New York: Wiley; 1997.
- Pawliszyn J. Theory of Solid Phase Microextraction. J Chromatogr Sci. 2000; 38: 270-278.
- Peña – Álvarez A, Castillo – Alanís A. Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por SPME – CG –EM. TIP. 2015; 18 (1): 29 – 42.
- Piri – Moghadam H, Lendor S, Pawliszyn J. Development of a biocompatible *in tube* – solid – phase microextraction device: a sensitive approach for direct analysis of single drops of complex matrixes. Anal Chem. 2016 88: 12188 – 12195.
- Poli D, Manini P, Andreoli R, Franchini I, Mutti A. Determination of dichloromethane, trichloroethylene and perchloroethylene in urine simple by headspace solid phase microextraction gas chromatograph – mass spectrometry. J Chromatogr B. 2005; 820 (1): 95 – 102.
- Popiel S, Sankowska M. Determination of chemical warfare agents and related compounds in environmental samples by solid – phase microextraction with gas chromatography. J Chromatogr A. 2011; 1218: 8457 – 8479.

- Pörschamann J, Plugge J, Toth R. In situ derivatisation using pressurized liquid extraction to determine phenols, sterols and carboxylic acids in environmental samples and microbial biomasses. *J Chromatogr A*. 2001; 909: 95 – 109.
- Ress C A, Shen A, Hill J E. Characterization of the *Clostridium difficile* volatile metabolome using comprehensive two – dimensional gas chromatography time – of – flight mass spectrometry. *J Chromatog B*. 2016; 1039: 8 – 16.
- Shirey R E, Mindrup R F. SPME – adsorption versus absorption: which fiber is best for your application?. Pennsylvania, USA. Sigma – Aldrich Co (Supelco); 1999.
- Silvestre C, Santos J, Lima J, Zagatto E. Liquid – liquid extraction in flow analysis: a critical review. *Anal Chim A*. 2009; 652: 54 – 65.
- Soini H A, Bruce K E, Wiesler F D, Sandra P, Novotny M V. Stir bar sorptive extraction: a new quantitative and comprehensive sampling technique for determination of chemical signal profiles from biological media. *J Chem Ec*. 2005; 31 (2): 337 – 392.
- Theodoridis G, Koster E H M, Jong G J. Solid – phase microextraction for the analysis of biological samples. *J Chromatog B*. 2000; 745: 49 – 82.
- Tsai S W, Chang T A. Time – weighted average sampling of airborne n – valeraldehyde by a solid – phase microextraction device. *J Chromatog A*. 2002; 954 (1 – 2): 191 – 198.
- Tsai S – W, Tsai S – T, Wang V – S, Lai J – S. Laboratory and field validations of a solid – phase microextraction device for the determination of ethylene oxide. *J Chromatogr A*. 2004; 1026: 25 – 30.
- Valcárcel M. *Principios de Química Analítica*. 1ªed. Barcelona: Springer – Verlag; 1999.
- Vitali B, Ndagijimana M, Maccaferri S, Biagi E, Guerzoni M E, Brigidi P. An *in vitro* evaluation of the effect of probiotics and prebiotics on the metabolic profile of human microbiota. *Anaerobe*. 2012; 18 (4): 386 – 391.
- Walles M, Mullet W M, Levens K, Borlak J, Wünsch G, Pawliszyn J. Verapamil drug metabolism studies by automated in – tube solid phase microextraction. *J Pharm Biom Anal*. 2002; 30: 307 – 319.

- Xiao C, Han S, Wang Z, Xing J, Wu C. Application of the polysilicone fullerene coating for solid – phase microextraction in the determination of semi – volatile compounds. *J Chromatog A*. 2001; 927 (1 – 2): 121 – 130.
- Xiao – Pen L, Takeshi K, Sato K. Detection of tricyclic antidepressants in whole blood by headspace solid - phase microextraction and capillary gas chromatography. *J Chromatog Sci*. 1997; 35.
- Yonamine M, Tawil N, Moreau R, Alves O. Solid – phase microextraction / gas chromatography / mass spectrometry and headspace – gas chromatography of tetrahydrocannabinol amphetamine, methamphetamine, cocaine and ethanol in saliva samples. *J. Chromatogr B*. 2003; 789 (1): 73 – 78.
- Yuan H, Mullett W M, Pawliszyn J. Biological sample analysis with immunoaffinity solid – phase microextraction. *Anal*. 2001; 126: 1456 – 1461.
- Zambonin C, Monaci L, Aresta M. Determination of cyclopiazonic acid in cheese samples using solid – phase microextraction and high performance liquid chromatography. *Food Chem*. 2001; 75: 249 – 254.
- Zhang Z, Pawliszyn J. Headspace solid – phase microextraction. *Anal. Chem*. 1993; 65: 1843 – 1852.