



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA [ò*] Facultat de Química

Departamento de Química Analítica

Tesis Doctoral

**Desarrollo de métodos analíticos de alta
productividad basados en técnicas de
microextracción para el análisis de fluidos
biológicos**

Guillem Peris Pastor

Programa de Doctorado en Técnicas Experimentales en
Química (3158)

Directores:

Alberto Chisvert Sanía

Juan Luis Benedé Veiga

Octubre 2025

La realización de esta tesis doctoral ha sido financiada gracias a la ayuda predoctoral concedida por la Conselleria de Innovación, Universidades, Ciencia y Sociedad Digital de la Generalitat Valenciana y el Fondo Social Europeo (CIACIF/2021/027).

Agradecimientos

Las personas que me conocen bien saben que no soy de muchas palabras ni tampoco la persona más expresiva del mundo. Sin embargo, después de este largo camino llamado Tesis Doctoral, creo que debo agradecer a todas aquellas personas que han contribuido de una u otra forma a que yo esté escribiendo estas palabras.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores:

Alberto, tot i que en certes ocasions no hem coincidit en la forma de pensar, gràcies per escoltar-me sempre. També et vull agrair tots els coneixements que m'has transmès, la teua rigorositat científica i l'ambició que tens per voler anar sempre un poc més enllà, millorar els resultats i no ser conformista.

JuanLu, tú fuiste quien me ofreció la posibilidad de seguir en el grupo después de acabar mi TFG, lo que no me imaginaba al decirte que sí es que terminaría haciendo una Tesis Doctoral. Gracias por todo lo que me has enseñado, por tu comprensión y cercanía, y por estar siempre disponible para intentar solucionar los problemas que iban surgiendo.

Amparo, tot i que no has sigut la meua directora de Tesi ja que hem coincidit poc durant la meua etapa predoctoral, et vull agrair que em donares l'oportunitat de formar part de GICAPC, així com totes les ensenyances durant la carrera i el doctorat.

A todos los compañeros de GICAPC con los que he compartido este camino: Pepe, Lori, Víctor, Cristian, Andreu y Luismi. Gracias por todo lo que me habéis enseñado, así como por vuestra predisposición a ayudar en todo lo que fuera necesario. También por todos los momentos de risas, congresos, cenas, etc. Sin duda, la Tesis se ha hecho más amena gracias a todos vosotros. Además, me gustaría agradecer a todos los TFGs y TFM's que han pasado por el grupo, aportando su pequeño granito de arena.

También me gustaría agradecer al Departamento de Química Analítica y, en especial, al grupo MINTOTA por todos los momentos compartidos tanto en el día a día, así como en los congresos y celebraciones.

Més enllà de l'àmbit acadèmic, vull agrair a totes les meues amistats. Encara que molts de vosaltres no tinguéreu molt clar el que estava fent, sempre m'heu demostrat el vostre suport, fent que este camí fora més fàcil.

Crec que he de fer una menció especial a la meua família, no sols per ajudar-me en aquesta etapa, sinó per haver estat al meu costat durant tota la meua vida. Sempre m'heu animat a que seguira estudiant per poder formar-me i arribar lluny en tot el que em proposara. Sense vosaltres jo no seria la persona que soc a dia de hui. Moltes gràcies per tot el que feu per mi, vos estime molt.

Finalmente, a Carla, mi pareja. Tú eres la persona que más de cerca has vivido este camino. Gracias por estar siempre a mi lado, por alegrarte en los días buenos y no dejar que me derrumbara en los malos. Has sido un pilar fundamental de esta Tesis. Gracias por todo, te quiero.

Índice

Listado de abreviaturas	1
Resumen	7
Resum	13
Abstract	17
Objetivos	21
Sección 1. Introducción	25
Capítulo 1. Evaluación y beneficios de la automatización de las técnicas de microextracción empleando estaciones robóticas	27
Capítulo 2. Evaluación comparativa del impacto ambiental de las técnicas de microextracción con respecto a las técnicas de extracción convencionales .	53
Sección 2. Parte experimental, resultados y discusión	83
Capítulo 3. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en saliva mediante extracción en fase sólida dispersiva asistida por disolvente	85
Capítulo 4. Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en saliva empleando microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada	111
Capítulo 5. Determinación de bisfenoles en suero y orina mediante microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada	145
Capítulo 6. Determinación de biomarcadores de cáncer de vejiga empleando microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada en plataforma de 96 posiciones	175
Capítulo 7. Desarrollo de una estación de trabajo robótica controlada mediante software de código abierto para llevar a cabo microextracción en fase sólida dispersiva en muestras de bajo volumen	207
Conclusiones generales	239
Referencias	245
Anexo I. Diseños multivariantes	269
Anexo II. Publicaciones científicas derivadas de esta Tesis Doctoral.....	275

Listado de abreviaturas

Listado de abreviaturas

#	8OHdA	8-hidroxi-2'-deoxiadenosina
	8OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
μ	μSPE	Extracción en fase sólida miniaturizada
A	AALLME	Microextracción líquido-líquido asistida por aire
	ACN	Acetonitrilo
	AGREE	<i>Analytical GREEnness Metric Approach and Software</i>
	AGREEprep	<i>Analytical GREEnness Metric for Sample Preparation</i>
	ANOVA	Análisis de varianza
	APTES	(3-aminopropil)triethoxisilano
B	BAGI	<i>Blue Applicability Grade Index</i>
	BET	Brunauer-Emmett-Teller
	BPA	Bisfenol A
	BPA-d ₁₆	Bisfenol A-d ₁₆
	BPAF	Bisfenol AF
	BPAP	Bisfenol AP
	BPB	Bisfenol B
	BPE	Bisfenol E
	BPF	Bisfenol F
	BPS	Bisfenol S
	BPS-d ₈	Bisfenol S-d ₈
C	C5	Valeril-L-carnitina
	C16	Palmitoil-L-carnitina
	C16-d ₃	Palmitoil-L-carnitina-(N-metil-d ₃)
	C18	Estearoil-L-carnitina
	C ₁₈	Octadecilsilano
	C18:1	Oleoil-L-carnitina
	CAR	Carbowax
	CE	Electroforesis capilar
	CEIH	Comité de Ética de Investigación en Humanos
	COF	Red orgánica covalente
	ComplexGAPI	<i>Complex Green Analytical Procedure Index</i>
	ComplexMoGAPI	<i>Complex Modified Green Analytical Procedure Index</i>
	CPT-II	Carnitina palmitoiltransferasa II
D	DBS	Gota de sangre seca
	DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
	DMSO	Dimetilsulfóxido
	DMSPE	Microextracción en fase sólida dispersiva
	DPX	Extracción dispersiva en punta de pipeta
	DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva
	DVB	Divinilbenceno
E	ECD	Detección electroquímica

Listado de abreviaturas

	EE	Rendimiento de extracción
	EF	Factor de preconcentración
	ELISA	Ensayos por inmunoadsorción ligado a enzimas
	EME	Extracción en electromembrana
	ESI	Ionización por electroespray
	EtOH	Etanol
F	FIA	Análisis por inyección en flujo
	GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
	GAPI	<i>Green Analytical Procedure Index</i>
G	GC	Cromatografía de gases
	GQDs	Puntos cuánticos de grafeno
	GSP	<i>Green Sample Preparation</i>
	HDTMA	Hexadeciltrimetilamonio
	HF-LPME	Microextracción en fase líquida con fibra hueca
H	HF-SPME	Microextracción en fase sólida con fibra hueca
	HLB	Polímeros de balance hidrofílico-lipofílico
	HS-SPME	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza
	isoC4	Isobutiril-L-carnitina
I	isoC4-d ₉	Isobutiril-L-carnitina-d ₉
	IT-SPME	Microextracción en fase sólida en tubo
	LC	Cromatografía de líquidos
L	LLE	Extracción líquido-líquido
	LOD	Límite de detección
	LOQ	Límite de cuantificación
	MCX	Intercambiador catiónico de modo mixto
	M-DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva magnética
	MeOH	Metanol
	MEPS	Microextracción mediante sorbente empaquetado
M	MNP	Nanopartícula magnética
	MoGAPI	<i>Modified Green Analytical Procedure Index</i>
	M-PTME	Microextracción en punta de pipeta magnética
	MS	Espectrometría de masas
	M _s	Saturación magnética
	mSBSDME	Microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada
	MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
	MSPD	Dispersión de matriz en fase sólida
	M _w	Masa molecular
N	NQS	<i>Need, Quality and Sustainable index</i>
	NEMI	<i>National Environmental Methods Index</i>

Listado de abreviaturas

P	PALME	Extracción paralela en membrana líquida artificial
	PBS	Tampón fosfato salino
	PBT	Persistencia, bioacumulatividad y toxicidad
	PDA	Polidopamina
	PDMS	Polidimetilsiloxano
	PLE	Extracción líquida presurizada
R	P_{ow}	Coefficiente de partición octanol-agua
	R^2	Coefficiente de determinación
	RAPI	<i>Red Analytical Performance Index</i>
	RGB	<i>Red, Green and Blue</i>
	ROS	Especies reactivas de oxígeno
	RSD	Desviación estándar relativa
S	RSM	Metodología de superficie de respuesta
	SA-DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva asistida por disolvente
	SBDLME	Microextracción líquida dispersiva sobre barra agitadora
	SBSDME	Microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora
	SBSE	Extracción por sorción sobre barra agitadora
	SCX	Intercambiador catiónico fuerte
	SDME	Microextracción en gota
	SEM	Microscopía electrónica de barrido
	SIA	Análisis por inyección secuencial
	SPE	Extracción en fase sólida
	SPME	Microextracción en fase sólida
	SPMS	<i>Sample Preparation Metric of Sustainability</i>
T	SQUID	Dispositivo de interferencia cuántica de superconducción
	TAPA	1,3,5-tris(4-aminofenil)amina
	TCA	Ácido tricloroacético
	TEM	Microscopía electrónica de transmisión
	TGA	Análisis termogravimétrico
	THF	Tetrahidrofurano
V	TPA	Tereftalaldehído
	VA-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por vórtex
W	WAC	<i>White Analytical Chemistry</i>
	WCX	Intercambiador catiónico débil

Resumen

La presente Tesis Doctoral se ha estructurado en dos secciones y un total de 7 capítulos.

La **Sección 1** está constituida por los **Capítulos 1 y 2**. En el **Capítulo 1** se muestran las ventajas que presentan los sistemas automatizados en comparación con los manuales y se describen diferentes estaciones de trabajo robóticas empleadas para automatizar (en mayor o menor grado) las técnicas de microextracción más comunes. Además, se realiza una discusión en términos de productividad, comparando de forma general los métodos automatizados con los manuales. También se lleva a cabo una discusión sobre el análisis secuencial de las muestras, el acoplamiento en línea de la etapa de extracción con la de medida instrumental, la portabilidad y las consideraciones económicas de los sistemas robóticos.

Respecto al **Capítulo 2**, se presentan y se explican las principales herramientas métricas que se han desarrollado hasta el momento para la evaluación del impacto ambiental de los métodos analíticos, haciendo hincapié en aquellas que se centran en la etapa de tratamiento de muestra. Entre todas ellas, se ha seleccionado la herramienta *Analytical Greenness Metric for Sample Preparation* (AGREEprep) para llevar a cabo una comparación del impacto ambiental de la etapa de tratamiento de muestra entre métodos que emplean técnicas de extracción convencionales y técnicas de microextracción. Para ello, se han seleccionado diferentes métodos publicados, evidenciando que el impacto ambiental de los métodos que emplean técnicas de microextracción es menor.

En la **Sección 2** se describen los métodos analíticos desarrollados como parte de los resultados obtenidos, y su discusión. En el **Capítulo 3**, se presenta un método analítico para llevar a cabo la determinación de dos biomarcadores de estrés oxidativo (8-hidroxi-2'-deoxiadenosina (8OHdA) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG)) en saliva empleando extracción en fase sólida dispersiva asistida por disolvente (*Solvent-Assisted Dispersive Solid-Phase Extraction*, SA-DSPE) como etapa de limpieza de la muestra, seguida de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Como material sorbente se emplea un polímero comercial de balance hidrofílico-lipofílico (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*, HLB). Además, se lleva a cabo el análisis de saliva de voluntarios sanos y de personas que padecen diabetes tipo II, obteniéndose mayores concentraciones de los analitos para estas últimas.

En cuanto al **Capítulo 4**, se continúa con la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva desarrollándose un método con mejores prestaciones que las obtenidas en el capítulo anterior. Para llevar a cabo la extracción de los analitos se emplea microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*,

mSBSDME) haciendo uso de una plataforma de 15 posiciones impresa en 3D. Como sorbente se utilizó un material magnético que combina sinérgicamente las propiedades químicas de la polidopamina (PDA) y los puntos cuánticos de grafeno (*Graphene Quantum Dots*, GQDs). Además, se incluye un patrón surrogado que permite emplear calibración externa para la cuantificación de los analitos en las muestras, eliminando así la principal desventaja del método presentado en el **Capítulo 3**, que requiere el empleo de calibración por adición de patrón. El método se ha aplicado a muestras de voluntarios sanos y de personas que padecen diabetes tipo II, obteniéndose mayores concentraciones de los analitos para estas últimas.

Respecto al **Capítulo 5**, se presenta un método basado en mSBSDME para llevar a cabo la extracción de siete bisfenoles en muestras de suero y orina. Como sorbente se emplea un material magnético basado en una red orgánica covalente (*Covalent Organic Framework*, COF), estableciendo interacciones tipo π - π , hidrofóbicas y dipolo-dipolo con los analitos. Previa a la etapa de microextracción, se realiza una etapa de enzimólisis para desconjugar los bisfenoles y poder determinar su contenido total. La medida instrumental se realiza mediante LC-MS/MS. Finalmente, se lleva a cabo el análisis de muestras de suero y orina de mujeres, hallándose dos de los bisfenoles en la mayoría de las muestras analizadas.

En el **Capítulo 6** se desarrolla un método analítico para la determinación de dos acilcarnitinas de cadena corta (isobutiril-L-carnitina (isoC4) y valeril-L-carnitina (C5)) en suero, las cuales son biomarcadores de cáncer de vejiga. Como técnica de microextracción se emplea mSBSDME utilizando un material magnético conteniendo un intercambiador catiónico fuerte (*Strong Cation Exchange*, SCX) como sorbente. Este composite interacciona con la amina cuaternaria presente en la estructura de los analitos mediante interacciones iónicas. En esta ocasión, para llevar a cabo la mSBSDME se emplea una plataforma de 96 posiciones impresa en 3D, dotando al método de una elevada productividad. Como técnica instrumental se ha escogido LC-MS/MS. El método se ha aplicado a muestras reales, determinándose ambos analitos en todas ellas.

Finalmente, en el **Capítulo 7** se describe una estación de trabajo robótica controlada mediante software de código abierto que permite llevar a cabo la microextracción en fase sólida en muestras de bajo volumen de forma semiautomatizada. Esta plataforma está compuesta por dispositivos electrónicos de bajo coste convenientemente ensamblados en una carcasa impresa en 3D. Como prueba de concepto se lleva a cabo la determinación de tres acilcarnitinas de cadena larga en muestras de suero de recién nacidos. Como fase de extracción se emplea un material magnético conteniendo ácido oleico como sorbente. La determinación instrumental de los analitos se realiza mediante análisis por inyección en flujo acoplado a espectrometría de masas en tándem (*Flow Injection Analysis-Tandem Mass Spectrometry*, FIA-MS/MS). El

Resumen

método se ha aplicado a muestras de suero de recién nacidos, determinándose los tres analitos en todas ellas.

Resum

La present Tesi Doctoral s'ha estructurat en dos seccions i un total de 7 capítols.

La **Secció 1** està constituïda pels **Capítols 1 i 2**. En el **Capítol 1** es mostren els avantatges que presenten els sistemes automatitzats en comparació amb els manuals i es descriuen diferents estacions de treball robotitzades emprades per automatitzar (en major o menor grau) les tècniques de microextracció més comunes. A més, es realitza una discussió en termes de productivitat, comparant de forma general els mètodes automatitzats amb els manuals. També es du a terme una discussió sobre l'anàlisi seqüencial de les mostres, l'acoblament en línia de l'etapa d'extracció amb la mesura instrumental, la portabilitat i les consideracions econòmiques dels sistemes robòtics.

Respecte al **Capítol 2**, es presenten i s'expliquen les principals ferramentes mètriques que s'han desenvolupat fins al moment per a l'avaluació de l'impacte ambiental dels mètodes analítics, recalcant aquelles que es centren en l'etapa de tractament de la mostra. Entre totes elles, s'ha seleccionat la ferramenta *Analytical Greenness Metric for Sample Preparation* (AGREEprep) per a dur a terme una comparació de l'impacte ambiental de l'etapa de tractament de mostra entre mètodes que empen tècniques d'extracció convencionals i tècniques de microextracció. Amb aquesta finalitat, s'han seleccionat diferents mètodes publicats, establint-se que l'impacte ambiental dels mètodes que empen tècniques de microextracció és menor.

A la **Secció 2** es descriuen els mètodes analítics desenvolupats com a part dels resultats obtinguts, i la seua discussió. Al **Capítol 3**, es presenta un mètode analític per dur a terme la determinació de dos biomarcadors d'estrès oxidatiu (8-hidroxi-2'-deoxiadenosina (8OHdA) i 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG)) en saliva emprant extracció en fase sòlida dispersiva assistida per dissolvent (*Solvent-Assisted Dispersive Solid-Phase Extraction*, SA-DSPE) com a etapa de neteja de la mostra, seguida de cromatografia de líquids acoblada a espectrometria de masses en tàndem (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Com a material sorbent s'empra un polímer comercial de balanç hidrofílic-lipofílic (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*, HLB). A més, es du a terme l'anàlisi de saliva de voluntaris sans i de persones que pateixen diabetis tipus II, obtenint-se majors concentracions dels analits per a estes últimes.

Al **Capítol 4** es continua amb la determinació de 8OHdA i 8OHdG en saliva desenvolupant-se un mètode amb millors prestacions que les obtingudes en el capítol anterior. Per a dur a terme l'extracció dels analits s'empra microextracció dispersiva per sorció sobre barra agitadora miniaturitzada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, mSBSDE) fent ús d'una plataforma de 15 posicions impresa en 3D. Com a sorbent s'utilitza un material magnètic que combina sinèrgicament les propietats químiques de la polidopamina (PDA) i els punts quàntics de grafé (*Graphene Quantum Dots*, GQDs). A més, s'inclou un

patró surrogat, que permet emprar calibratge extern per a la quantificació dels analits a les mostres, eliminant així el principal desavantatge del mètode presentat al **Capítol 3**, el qual requereix emprar calibrat per adició de patró. El mètode s'ha aplicat a mostres de voluntaris sans i de persones que pateixen diabetis tipus II, obtenint-se majors concentracions dels analits per a estes últimes.

Respecte al **Capítol 5**, es presenta un mètode basat en mSBSDME per a dur a terme l'extracció de set bisfenols en mostres de sèrum i orina. Com a sorbent s'empra un material magnètic basat en una xarxa orgànica covalent (*Covalent Organic Framework*, COF), establint interaccions tipus π - π , hidrofòbiques i dipol-dipol amb els analits. Prèvia a l'etapa de microextracció, es realitza una etapa d'enzimòlisi per a desconjugar els bisfenols i poder determinar el seu contingut total. La mesura instrumental es realitza mitjançant LC-MS/MS. Finalment, es du a terme l'anàlisi de mostres de sèrum i orina de dones, trobant-se dos dels bisfenols en la majoria de les mostres analitzades.

Al **Capítol 6** es desenvolupa un mètode analític per determinar dos acilcarnitines de cadena curta (isobutiril-L-carnitina (isoC4) i valeril-L-carnitina (C5)) en sèrum, les quals són biomarcadors de càncer de bufeta. Com a tècnica de microextracció s'empra mSBSDME, utilitzant un material magnètic contenint un bescanviador catiònic fort (*Strong Cation Exchange*, SCX) com a sorbent. Este compost interacciona amb l'amina quaternària present en l'estructura dels analits mitjançant interaccions iòniques. En esta ocasió, per a dur a terme la mSBSDME s'empra una plataforma de 96 posicions impresa en 3D, dotant al mètode d'una elevada productivitat. Com a tècnica instrumental s'ha triat LC-MS/MS. El mètode s'ha aplicat a mostres reals, determinant-se els dos analits en totes elles.

Finalment, al **Capítol 7** es descriu una estació robòtica de treball controlada mitjançant software de codi obert, la qual permet dur a terme la microextracció en fase sòlida dispersiva en mostres de baix volum de manera semiautomatitzada. Esta estació està composta per dispositius electrònics de baix cost convenientment acoblats en una carcassa impresa en 3D. Com a prova de concepte es du a terme la determinació de tres acilcarnitines de cadena llarga en mostres de sèrum de nounats. Com a fase d'extracció s'empra un material magnètic contenint àcid oleic com a sorbent. La determinació instrumental dels analits es realitza mitjançant anàlisi per injecció en flux acoblat a espectrometria de masses en tàndem (*Flow Injection Analysis-Tandem Mass Spectrometry*, FIA-MS/MS). El mètode s'ha aplicat a mostres de nounats, determinant-se els tres analits en totes elles.

Abstract

Abstract

This Doctoral Thesis has been structured in two sections and a total of 7 chapters.

Section 1 consists of **Chapters 1** and **2**. In **Chapter 1** the advantages of the automated systems over manual systems are proved and different robotic workstations used to automate (to a greater or lesser degree) the most common microextraction techniques are described. In addition, a discussion is held in terms of productivity, comparing automated methods with manual ones in a general way. Furthermore, a discussion on the sequential analysis of the samples, the on-line coupling of the extraction stage with the instrumental measurement stage, portability and economic considerations of robotic systems is also held.

Chapter 2 presents and explains the main metric tools that have been developed to date for assessing the environmental impact of analytical methods, with an emphasis on those that focus on the sample treatment stage. Among these, the Analytical Greenness Metric for Sample Preparation (AGREEprep) tool has been selected to compare the environmental impact of the sample treatment stage between methods that use conventional extraction techniques and microextraction techniques. To this regard, different published methods have been selected, evidencing that the environmental impact of methods using microextraction techniques is lower.

Section 2 describes the developed analytical methods, the obtained results, and their discussion. In **Chapter 3**, a method to determine two oxidative stress biomarkers (8-hydroxy-2'-deoxyadenosine (8OHdA) and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8OHdG)) in saliva using solvent-assisted dispersive solid-phase extraction (SA-DSPE) as cleaning step, followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is presented. A commercial hydrophilic-lipophilic balance (HLB) polymer is used as sorbent material. In addition, saliva samples from healthy volunteers and people with type II diabetes are analyzed, obtaining higher concentrations of the analytes for the latter.

In **Chapter 4**, the determination of 8OHdA and 8OHdG in saliva is also carried out but with better features than the ones obtained in the previous chapter. To extract the analytes, miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction (mSBSDE) is used on a 15-position 3D-printed platform. A magnetic material that synergistically combines the chemical properties of polydopamine (PDA) and graphene quantum dots (GQDs) is used as sorbent. In addition, a surrogate standard is included, allowing external calibration to be used for the quantification of analytes in the samples, thus eliminating the main disadvantage of the method presented in **Chapter 3**, which requires the employment of a standard addition calibration. The method has been applied to samples from healthy volunteers and people with type II diabetes, obtaining higher concentrations of analytes for the latter.

Abstract

With regard to **Chapter 5**, a method based on mSBSDME is developed to extract seven bisphenols from serum and urine samples. A magnetic material based on a covalent organic framework (COF) is selected as sorbent, establishing π - π , hydrophobic, and dipole-dipole interactions with the analytes. Prior to the microextraction stage, an enzymolysis step is carried out to deconjugate the bisphenols and determine their total content. The instrumental measurement is performed using LC-MS/MS. Finally, serum and urine samples from women are analyzed, founding two of the bisphenols in most of the samples.

In **Chapter 6**, an analytical method for the determination of two short-chain acylcarnitines (isobutyryl-L-carnitine (isoC4) and valeryl-L-carnitine (C5)) in serum, which are biomarkers of bladder cancer, is presented. The mSBSDME is used as microextraction technique, employing a magnetic material containing a strong cation exchange (SCX) sorbent. This composite interacts with the quaternary amine present in the structure of the analytes through ionic interactions. On this occasion, a 3D-printed 96-position platform is used to perform the mSBSDME, obtaining a high throughput method. LC-MS/MS has been chosen as the instrumental technique. The method has been applied to real samples, determining both analytes in all of them.

Finally, **Chapter 7** describes the development of a robotic workstation controlled by open-source software that allows for semi-automated sorbent-based dispersive microextraction in low-volume samples. This platform consists of low-cost electronic devices conveniently assembled in a 3D-printed casing. As a proof of concept, three long-chain acylcarnitines are determined in serum samples from newborns. A magnetic material containing oleic acid is used as a sorbent for the extraction step. The instrumental determination of the analytes is performed by flow injection analysis-tandem mass spectrometry (FIA-MS/MS). The method has been applied to real samples from newborns, determining the three analytes in all of them.

Objetivos

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de biomarcadores en muestras biológicas mediante el empleo de técnicas de microextracción en la etapa de tratamiento de muestra.

Para lograr este objetivo general, se han fijado los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollar métodos analíticos de elevada productividad y/o (semi)automatizados que empleen un bajo volumen de muestra, siendo útiles en el análisis clínico rutinario
- Sintetizar y caracterizar materiales magnéticos capaces de extraer los analitos de las muestras
- Optimizar las variables implicadas en la medida instrumental y en el proceso de microextracción para obtener la mayor sensibilidad posible
- Validar los métodos desarrollados en términos de linealidad, sensibilidad, precisión y exactitud
- Aplicar los métodos desarrollados al análisis de muestras reales
- Evaluar el impacto ambiental y la viabilidad de los métodos desarrollados

Sección 1

Introducción

Capítulo 1

Evaluación y beneficios de la automatización de
las técnicas de microextracción empleando
estaciones de trabajo robóticas

1.1. Técnicas de microextracción en Química Analítica y automatización

El área de la Química Analítica está en constante desarrollo y evolución con la finalidad de cubrir las demandas que presenta la sociedad en cada momento. Desde hace unas décadas, la preocupación sobre el impacto ambiental ha aumentado en la sociedad y por consiguiente se ha visto reflejado en el campo de la Química Analítica, por lo que los métodos analíticos a desarrollar buscan cumplir con los requisitos ambientales actuales. Con este propósito, se han enunciado diferentes principios que sirven de guía para que los investigadores desarrollen métodos con el menor impacto ambiental posible. De este modo, en 2013 Namieśnik y colaboradores presentaron los 12 principios de la *Green Analytical Chemistry* (GAC) [1], basados en los 12 principios de la *Green Chemistry* [2] aplicados a los procesos analíticos. Más adelante, en 2021, Pawliszyn y colaboradores presentaron el concepto de *White Analytical Chemistry* (WAC) [3], que puede considerarse como una extensión de la GAC, pero con una mayor contribución en términos de desarrollo sostenible. Además, la WAC presenta una visión más holística considerando la funcionalidad (evaluada de acuerdo con los “principios azules”) del método desarrollado para alcanzar un compromiso entre el rendimiento analítico (evaluado de acuerdo con los “principios rojos”) y el impacto ambiental (evaluado de acuerdo con los “principios verdes”). Los pilares fundamentales de los “principios verdes” de la WAC promueven la eliminación o reducción del uso de sustancias químicas, la minimización del consumo de energía y generación de residuos, la automatización y el incremento de la productividad y la seguridad del operador. Todos estos conceptos son necesarios para el desarrollo de metodologías de bajo impacto ambiental, sin dejar de lado que se debe garantizar un buen rendimiento analítico. Teniendo en cuenta estos principios, siempre que sea posible se prefiere realizar análisis directos. Sin embargo, en muchas ocasiones la etapa de preparación de muestra no se puede evitar debido a la complejidad de la matriz o la necesidad de preconcentrar los analitos para alcanzar la sensibilidad requerida. En este sentido, un grupo internacional de investigadores presentaron recientemente los 10 principios de la *Green Sample Preparation* (GSP) [4], basados en los principios de la GAC pero enfocados a la etapa de preparación de muestra, asumiéndose, de entrada, la necesidad de la misma.

Con la finalidad de disminuir el impacto ambiental de la etapa de tratamiento de muestra surgieron las técnicas de microextracción como alternativas a las técnicas de extracción clásicas (la extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) y la extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*, SPE)). En este sentido, en 1990 se presentó la microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME) [5] como primera técnica de microextracción. Desde entonces, se han desarrollado una elevada variedad de técnicas de microextracción tanto en fase sólida como en fase líquida [6]. Asimismo, las

técnicas de microextracción han seguido la tendencia de miniaturizar el sistema analítico con la finalidad de explotar sus ventajas, como son el menor consumo de reactivos y disolventes; la menor producción de residuos; la mayor sensibilidad, rapidez y portabilidad; y el menor consumo de energía [7]. Además, estas técnicas de extracción ya miniaturizadas han evolucionado hacia un mayor grado de miniaturización prestando un mayor énfasis tanto en la reducción de la cantidad de fase extractante como de muestra. Esta evolución ha conducido a una nueva generación de técnicas más allá de la microextracción, las cuales han sido acuñadas como técnicas de “ultramicroextracción” [8], evidenciando los avances en este campo hacia una preparación de muestra más sostenible y con un menor impacto ambiental.

A pesar de esta gran cantidad de ventajas sobre las técnicas de extracción convencionales, algunas técnicas de microextracción todavía requieren de etapas manuales tediosas, lo cual conlleva un elevado consumo de tiempo, así como posibles errores humanos. Sin embargo, los laboratorios en los que se procesa un elevado número de muestras diariamente, como son los laboratorios clínicos, requieren de metodologías reproducibles y eficientes.

En este sentido, la automatización puede ser una solución eficaz ya que permite obtener procedimientos más rápidos y seguros, ofreciendo resultados más precisos y exactos. Además, como se discutirá posteriormente, los procedimientos automatizados también pueden suponer una ventaja económica [9]. Debe también considerarse que la automatización es uno de los principales criterios de la WAC y GSP.

De este modo, se pueden obtener procedimientos más rápidos en comparación con los manuales, ya que los sistemas automatizados, generalmente, son capaces de realizar las tareas operativas de forma más rápida que los humanos. Además, algunos sistemas automatizados son capaces de operar durante largos periodos de forma ininterrumpida (durante la noche o varios días), incrementando la productividad [10,11]. Esta habilidad es de especial relevancia en entornos en los que existe una elevada carga de trabajo y se requiere tratar muchas muestras en poco tiempo.

Respecto a la seguridad de los procedimientos, la cantidad de reactivos tóxicos empleados se ha reducido progresivamente, siguiendo las tendencias antes nombradas, y estos han sido sustituidos por alternativas con un menor grado de toxicidad o incluso nulo [12]. Sin embargo, su uso todavía se requiere en determinados casos, en los que solo pueden ser manipulados por personal cualificado. Incluso si se adoptan las medidas necesarias de seguridad, no se elimina totalmente el riesgo a su exposición y, por tanto, a desarrollar algún problema de salud. En este sentido, un mayor grado de automatización implica una menor intervención del operador, reduciendo el contacto con reactivos tóxicos y, por tanto, aumentando la seguridad del procedimiento. Además,

algunos procedimientos automatizados se pueden realizar en sistemas herméticos, de forma que el único contacto del operador con los reactivos es cuando estos se introducen en los correspondientes recipientes en caso de que esta etapa no esté automatizada, reduciendo drásticamente la exposición humana.

A pesar de que los procedimientos analíticos los llevan a cabo profesionales expertos, se pueden producir errores involuntarios [11]. Durante estos procedimientos existen diferentes tareas operativas como la adición de volúmenes exactos, el preciso control del tiempo de una etapa o de la posición de un elemento, que pueden ser una fuente de errores inintencionados, conduciendo a resultados imprecisos o inexactos. Además, en ciertas ocasiones el volumen de muestra puede ser limitado debido a su naturaleza, no disponiendo de suficiente cantidad para repetir el análisis en caso de que ocurra cualquier error. Por ello, se debe asegurar la correcta ejecución del procedimiento. En este sentido, los sistemas totalmente automatizados permiten obtener procedimientos más exactos y precisos en comparación con los manuales, garantizando mejores resultados. Esto se debe a que pueden controlar de forma exacta y precisa diferentes parámetros tales como el tiempo, la temperatura o la velocidad de agitación, o acciones como la toma o adición de volúmenes exactos, aportando consistencia a los análisis de diferentes tandas de muestras [11]. Además, algunos sistemas automatizados de microextracción permiten acoplar la etapa de tratamiento de muestra con la medida instrumental, pudiendo realizar el procedimiento analítico en su totalidad de forma automatizada.

Respecto al aspecto económico, dado que los sistemas automatizados permiten obtener procedimientos más rápidos, se pueden tratar más muestras por unidad de tiempo, conllevando beneficios económicos. Además, estos sistemas también permiten ahorrar en cuanto a gastos en personal [9].

El objetivo de este capítulo es describir las diferentes estaciones de trabajo robóticas que se han desarrollado para la automatización del procedimiento de tratamiento de muestra empleando las principales técnicas de microextracción. Sin embargo, las técnicas de microextracción no se han descrito en sí, dado que ya han sido ampliamente descritas en diversas tesis doctorales presentadas por el grupo de investigación en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral [13–15]. De entre todos los sistemas disponibles para llevar a cabo la automatización de la etapa de extracción, en este capítulo únicamente se han considerado las estaciones de trabajo robóticas. En este sentido, se ha considerado como estación de trabajo robótica aquellos sistemas en los que todos sus componentes están integrados en un solo módulo. De este modo, se han dejado a un lado las técnicas en flujo, las cuales comprenden un rango de técnicas desde el análisis por inyección en flujo (*Flow Injection Analysis*, FIA) o secuencial (*Sequential Injection Analysis*, SIA) hasta los sistemas microfluídicos

más recientes [16]. Además, se ha realizado una comparación en términos generales con procedimientos manuales en aspectos tales como la productividad, la intervención del operador, el acoplamiento con la medida instrumental, la economía y la portabilidad.

1.2. Sistemas robóticos para la automatización de técnicas de microextracción basadas en sorbentes

1.2.1. Microextracción en fase sólida

La SPME surgió en 1990 [5] revolucionando el campo del tratamiento de muestra. En su configuración original, una fibra unida a un émbolo de jeringa se introducía en un vial conteniendo la muestra y se agitaba durante un tiempo. A continuación, la fibra se retraía al interior de la jeringa y se transfería al puerto de inyección del sistema de cromatografía de gases (*Gas Chromatography*, GC) para la desorción térmica de los analitos. Alternativamente, en posteriores aplicaciones de la técnica, tras la extracción, la fibra se insertaba en un vial conteniendo un disolvente adecuado y se agitaba para llevar a cabo la desorción líquida de los analitos, y a continuación se inyectaba parte del extracto líquido en el instrumento analítico. Además, también se realizaron modificaciones en la extracción, pudiendo situar la fibra en el espacio de cabeza de la muestra en lugar de en contacto con ella.

La primera versión de esta técnica en la que se empleaba una estación de trabajo robótica fue desarrollada por Pawliszyn y colaboradores [17]. Para ello, se reemplazó la aguja del inyector de un automuestreador comercial de GC por la fibra de SPME y se situó un agitador magnético en posición vertical en el lugar del vial de lavado. Además, la bandeja de viales tenía la habilidad de moverse hacia delante y hacia atrás. Para llevar a cabo el procedimiento de extracción, todos los viales conteniendo las muestras, con un imán en su interior, se posicionaron manualmente en la bandeja. A partir de este punto, todas las etapas se realizaron automáticamente. La bandeja se movió con la finalidad de situar el primer vial debajo de la fibra de SPME y a 3 cm del agitador, que se mantenía siempre encendido. A continuación, la fibra se insertó en el vial a la profundidad deseada. Una vez terminada la etapa de extracción, la fibra se insertó en el inyector del GC para llevar a cabo la desorción térmica de los analitos. A pesar de que el procedimiento estaba totalmente automatizado, el sistema no permitía controlar la temperatura de los viales, de forma que no era posible llevar a cabo la versión en espacio de cabeza de la técnica o controlar la temperatura en inmersión directa en caso de que fuera necesario.

Respecto a dispositivos no comerciales, Santos-Neto y colaboradores desarrollaron ellos mismos un robot cartesiano de bajo coste controlado por el software de código abierto Arduino (**Figura 1.1a**) [18,19]. El sistema consiste

básicamente en un brazo vertical y una plataforma horizontal, permitiendo el movimiento en los ejes x, y y z mediante motores de paso a paso y tornillos de bolas. Respecto al brazo vertical, este está compuesto por un controlador de jeringa, pudiéndose mover en el eje y para llevar a cabo cualquier etapa que consistiera en una transferencia de líquidos. Además, este contiene una válvula solenoide conectada a un instrumento de cromatografía de líquidos (*Liquid Chromatography*, LC) permitiendo el análisis en línea después de la extracción. En el caso de la plataforma horizontal (que tiene la capacidad de moverse en el eje x), sobre ella se sitúan los viales conteniendo las muestras, así como otra instrumentación requerida como por ejemplo agitadores magnéticos. Esta plataforma también se ha empleado para la microextracción en gota (*Single-Drop Microextraction*, SDME) (**Sección 1.3.1**) y para la microextracción en fase líquida con fibra hueca (*Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*, HF-LPME) (**Sección 1.3.2**). Para llevar a cabo el procedimiento basado en SPME, el material sorbente se dispone recubriendo la superficie de la aguja de la jeringa. Los viales conteniendo las muestras y un imán en su interior, así como los disolventes de lavado y desorción, se sitúan encima de un agitador magnético que está sobre la plataforma horizontal. Una vez finalizado el procedimiento de extracción, el extracto líquido se inyecta automáticamente en el instrumento de medida.

En los sistemas descritos hasta el momento se requiere de imanes para agitar la muestra en el proceso de extracción. Sin embargo, su introducción en los viales, así como su lavado, se realiza manualmente. Este inconveniente no está presente en el método desarrollado por Kojima y colaboradores en 2002 empleando un automuestreador que permite la agitación de la bandeja de muestras en lugar de la agitación magnética mediante imanes [20]. De este modo, no se requiere introducir el imán ni su posterior lavado después de la extracción, mejorando la automatización del procedimiento. Además, se puede controlar la temperatura de la extracción mediante calentamiento de la muestra, permitiendo la versión en espacio de cabeza. Para mejorar el control de la temperatura, se implementó posteriormente una mejora que permite tanto calentar como enfriar la muestra (**Figura 1.1b**) [21].

Con la finalidad de automatizar el procedimiento analítico en su totalidad y no solo la etapa de microextracción junto con la de medida instrumental, se empleó un sistema Twin PAL de CTC que contiene dos brazos robóticos (**Figura 1.1c**) para llevar a cabo la SPME [22]. Por un lado, el brazo encargado de la preparación de la muestra consiste en una jeringa, la cual permite preparar diluciones patrón, llevar a cabo diluciones y añadir el agente derivatizante en el vial de la muestra. Por otro lado, el brazo de inyección contiene la fibra de SPME. Ambos brazos pueden transportar viales ya que disponen de una plataforma magnética para ello. El sistema está compuesto de un calentador para fibras, dos agitadores con calefacción para muestras, una bandeja para viales, así como otra para enfriar estos y una estación de lavado. Ambos brazos tienen acceso a todos estos compartimentos y están situados encima de ellos.

Además, el sistema es capaz de realizar el lavado de la jeringa automáticamente para prevenir la contaminación cruzada.

Con la intención de aumentar la productividad en la etapa de tratamiento de muestra, Pawliszyn y colaboradores desarrollaron un método de SPME automatizado que es capaz de llevar a cabo la extracción de 96 muestras simultáneamente (**Figura 1.1d**) [23]. En este sistema se emplea desorción líquida de los analitos, por lo que es compatible tanto con LC como con GC. La estación de trabajo robótica consiste principalmente de tres brazos robóticos controlados mediante software. La función de cada brazo es la siguiente: (i) controlar el dispositivo de 96 fibras y posicionarlo en el lugar adecuado para llevar a cabo las etapas de extracción y desorción; (ii) sistema de evaporación mediante flujo de nitrógeno; (iii) dispensar los volúmenes requeridos con una jeringa de 250 μL en la placa de 96 pocillos y realizar la inyección en el instrumento analítico. Este sistema emplea agitación orbital en las etapas de extracción y desorción. Además, es capaz de adicionar la cantidad requerida de disolución de patrón interno, controlar la agitación y llevar a cabo la evaporación y reconstitución de los extractos. De este modo todo el procedimiento analítico se realiza de forma automatizada.

1.2.2. Extracción en fase sólida dispersiva

La extracción en fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid-Phase Extraction*, DSPE) se presentó en 2003 por Anastassiades y colaboradores [24]. Esta técnica consiste en la dispersión del material sorbente en la muestra para extraer los compuestos de interés. A continuación, el sorbente se recolecta mediante centrifugación, descartando la fase dadora y añadiendo el disolvente de desorción, dispersando el sorbente en este último. Finalmente, el sorbente se recolecta de igual modo que en la etapa previa y el disolvente de desorción se inyecta en el instrumento analítico. En el caso de que se empleen sorbentes magnéticos, las propiedades paramagnéticas de estos materiales permiten su separación con respecto a la muestra o el disolvente de desorción mediante la aplicación de un campo magnético externo con un imán [25].

Capítulo 1

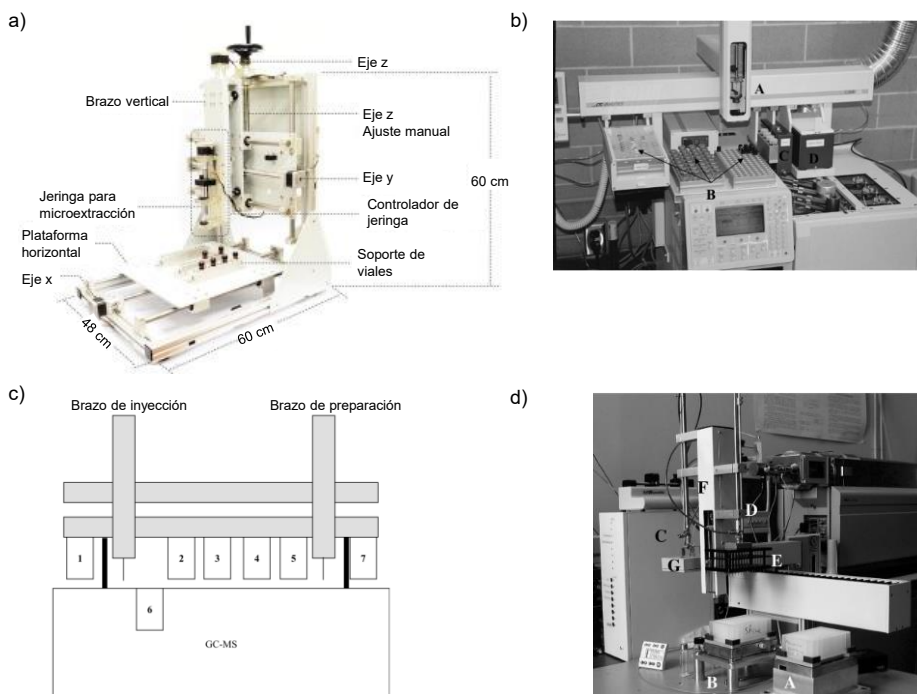


Figura 1.1. a) Robot cartesiano no comercial [18,19]; b) Automuestreador comercial compuesto de: (A) brazo de preparación/inyección; (B) bandeja de muestras; (C) calefactor de aguja; (D) calefactor/agitador [21]; c) Representación esquemática del sistema de dos brazos: (1) agitador/calefactor de la muestra; (2) calefactor de la fibra; (3) bandeja de enfriado para viales; (4) bandeja de viales; (5) estación de lavado; (6) puerto de inyección del GC; (7) agitador/calefactor de la muestra [22]; d) Sistema robótico de tres brazos: (A, B) agitadores orbitales; (C) controlador del sistema; (D) brazo que contiene el dispositivo con 96 fibras; (E) dispositivo de 96 fibras; (F) brazo con la jeringa; (G) brazo con el evaporador [23].

Como parte de esta Tesis Doctoral, se ha desarrollado una estación de trabajo robótica controlada mediante software de código abierto empleando hardware de bajo coste para llevar a cabo la extracción de los analitos de muestras de baja disponibilidad de manera semiautomatizada (**Figura 1.2a**) [26]. Este dispositivo se presenta de forma más detallada en el **Capítulo 7**. De forma resumida, la estación de trabajo robótica opera de forma automática, programando los comandos a realizar en lenguaje C++ empleando el software de código abierto Arduino y ejecutándolos mediante un microcontrolador. Sin embargo, las etapas que requieren adicionar o retirar líquidos se realizan manualmente. En primer lugar, el recipiente de extracción conteniendo el material magnético se sitúa sobre el electroimán. A continuación, se añade el

correspondiente disolvente y el motor CC, el cual tiene un imán acoplado por medio de un eje, se coloca en la parte superior del recipiente de extracción mediante un servomotor (posición de trabajo). A continuación, se enciende el motor, haciendo girar el imán, dispersando el material en la fase líquida. Después de un periodo de tiempo definido, se detiene el motor y se mueve a la posición de acceso mediante el servomotor. Para la deposición del material en la parte inferior del recipiente de extracción, se activa el electroimán, permitiendo descartar la fase líquida. Este procedimiento general se repite las veces que sea necesario con la finalidad de acondicionar el material (en caso de ser necesario) y llevar a cabo las etapas de extracción y desorción. Además, se garantiza la portabilidad del sistema, ya que los elementos de hardware se posicionan en un soporte impreso en 3D (20.2 x 19.4 x 10.2 cm) y se puede alimentar mediante una batería externa de 9 V.

Por otra parte, Zhang y colaboradores han desarrollado un sistema que emplea un brazo magnético capaz de manipular una barra magnética que se inserta en una funda, llevando a cabo la DSPE con un sorbente magnético de forma automatizada (**Figura 1.2b**) [27]. En este sentido, en el contenedor 1 se introduce una dispersión del material y a continuación, se sumerge la barra magnética con la funda, atrayéndose el material sobre la funda. Seguidamente, el brazo mecánico inserta todo el conjunto en el contenedor 2 que contiene la muestra, retrayéndose la barra magnética y dispersándose el material mediante oscilación de la funda en la disolución. Posteriormente, el brazo mecánico posiciona la barra magnética de nuevo en la funda para retraer el material. A continuación, el procedimiento se repite en el contenedor 3, conteniendo también una disolución de la muestra. Una vez se realiza la extracción, el material se lava en el contenedor 4 y después se dispersa como se ha descrito anteriormente en el disolvente de desorción presente en el contenedor 5. Finalmente, el material se retrae sobre la funda, permitiendo tomar el extracto líquido para su medida instrumental.

Con la finalidad de desarrollar un procedimiento analítico totalmente automatizado basado en DSPE, Lee y colaboradores emplearon un automuestreador comercial CombiPAL de CTC Analytics [28]. En este sentido, en un vial se inserta el material magnético junto con el disolvente de dispersión, transportándolo a un agitador para asegurar su homogeneidad. A continuación, se toma un determinado volumen de esta dispersión mediante la jeringa y se inyecta en el vial conteniendo la muestra, posicionándolo en el agitador para dispersar correctamente el material. Una vez finalizada la etapa de extracción, el vial se sitúa en una bandeja conteniendo un imán para depositar el material en la parte inferior del vial y permitir retirar la fase dadora. Posteriormente, se añade una disolución ácida para disolver el material magnético, agitando y controlando la temperatura. Finalmente, el extracto se inyecta en el instrumento analítico.

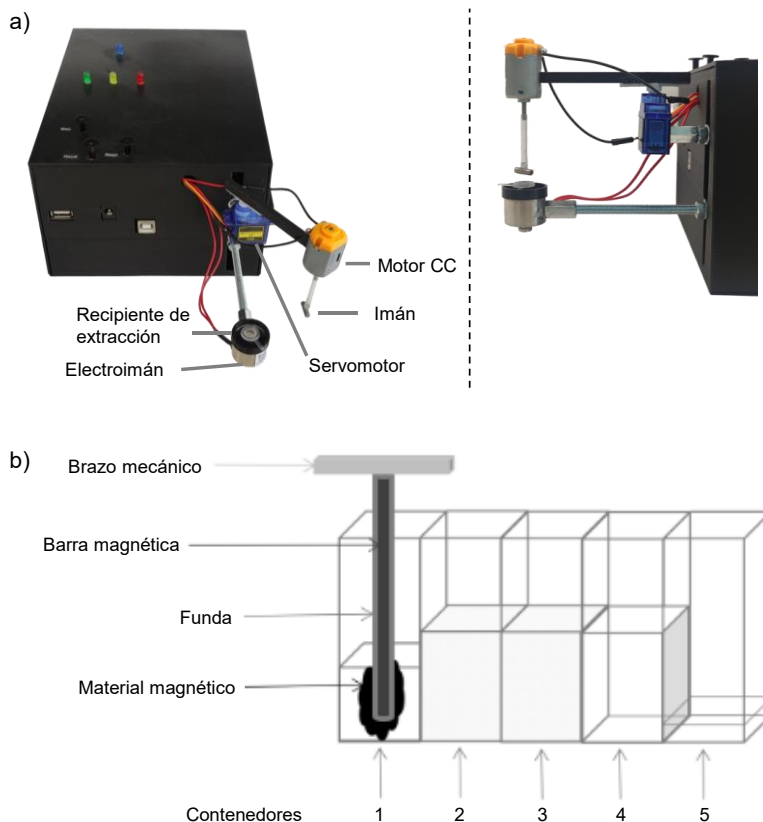


Figura 1.2. a) Esquema de la estación de trabajo robótica desarrollada en esta Tesis Doctoral (vista frontal en la parte izquierda y vista lateral en la parte derecha) [26]; b) Esquema del sistema que emplea una barra magnética [27].

1.2.3. Microextracción mediante sorbente empaquetado

En la microextracción mediante sorbente empaquetado (*Microextraction by Packed Sorbent*, MEPS), el sorbente para llevar a cabo la extracción de los analitos se sitúa en el interior de una jeringa [29]. En este sentido, la muestra se pasa a través del sorbente un determinado número de ciclos, reteniendo así los analitos. A continuación, se repite la misma operación, pero en este caso con el disolvente de lavado (en caso de ser necesario) y el disolvente de desorción, inyectándose el extracto en el instrumento analítico. Esta técnica se presentó de forma automatizada en su versión original empleando un automuestreador [29]. En concreto, la jeringa del automuestreador se reemplazó por la jeringa que contiene el sorbente empaquetado. Los viales conteniendo las muestras, así

como los disolventes de lavado y desorción, se sitúan en la bandeja del automuestreador. De este modo, una vez lanzada la secuencia el sistema es capaz de realizar la extracción y posteriormente inyectar el extracto líquido en el instrumento de medida. Además, la limpieza de la jeringa para evitar una posible contaminación cruzada también se realiza de forma automatizada.

Con la finalidad de poder tratar varias muestras en paralelo, aumentando así la productividad, Santos-Neto y colaboradores desarrollaron ellos mismos un automuestreador empleando un robot cartesiano controlado por un software de código abierto (**Figura 1.3**) [30]. Este sistema está equipado con seis jeringas y cada una de ellas tiene acceso a 8 recipientes distintos situados en una plataforma horizontal. Los recipientes se utilizan para introducir las muestras y los disolventes requeridos, y para la recolección de los extractos una vez finalizado el proceso de extracción. Además, cada jeringa puede moverse por la plataforma horizontal gracias a un microcontrolador que acciona su movimiento. Los soportes de las jeringas se pueden mover en el eje z, mientras que la plataforma horizontal se puede mover en el eje x.

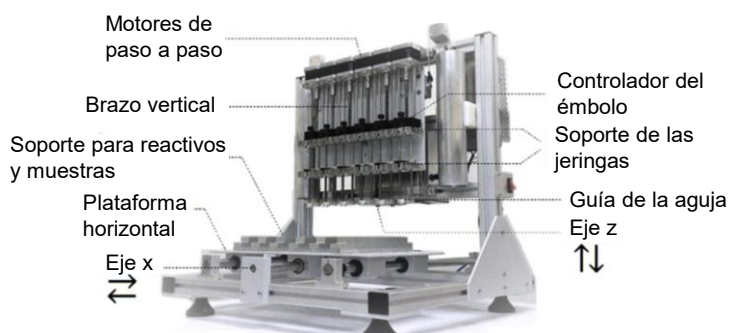


Figura 1.3. Automuestreador cartesiano desarrollado por Santos-Neto y colaboradores [30].

También se ha descrito otro sistema capaz de llevar a cabo el tratamiento de diversas muestras simultáneamente empleando MEPS. Este es el caso de un sistema que tiene capacidad para 96 puntas conteniendo el sorbente, realizando la extracción en todas ellas de forma simultánea [31]. El procedimiento de extracción consiste en las siguientes etapas. En primer lugar, las muestras se sitúan en una placa de 96 pocillos. A continuación, el sistema robótico dotado de 96 puntas conteniendo el sorbente aspira una cantidad determinada de muestra. Seguidamente, el sorbente se lava y se hace pasar el disolvente de desorción y los extractos se vierten sobre una placa de 96 pocillos para su análisis instrumental.

1.2.4. Extracción en fase sólida miniaturizada

La extracción en fase sólida miniaturizada (*Micro-Solid-Phase Extraction*, μ SPE) sigue los mismos principios que la SPE, pero emplea una menor cantidad de sorbente. En este sentido, el material extractante se encuentra confinado en un cartucho de dimensiones reducidas, haciendo pasar por este el disolvente de acondicionamiento, la muestra, el disolvente de lavado y el disolvente de desorción mediante la aplicación de vacío o presión positiva.

Para la automatización de esta técnica de microextracción se ha empleado un automuestreador PAL HTS de CTC Analytics equipado con una jeringa de 100 μ L, tres bandejas para viales y una válvula de inyección [32]. Este sistema solo permite el tratamiento de una muestra simultáneamente. Sin embargo, la inyección del extracto se realiza de forma automatizada. Además, se puede llevar a cabo la medida instrumental de una muestra mientras la siguiente se somete al procedimiento de extracción.

Con la finalidad de obtener una elevada productividad, se ha empleado también un sistema de placas de 96 pocillos [33]. La estación robótica utilizada es capaz de transferir líquidos mediante un brazo robótico de 8 canales y está compuesta por un agitador de pocillos, un módulo de vacío y un brazo de manipulación de placas. Para llevar a cabo el procedimiento de extracción, en primer lugar, se añade el volumen deseado de patrón interno a las muestras. A continuación, el sorbente se acondiciona haciendo pasar el correspondiente disolvente por el cartucho mediante la aplicación de vacío. Seguidamente, se realiza la carga de las muestras, así como la etapa de lavado. Finalmente, se añade el disolvente de desorción y los extractos se vierten sobre una placa de 96 pocillos, cubriéndolos manualmente con tapones y transfiriéndolos al sistema de LC. A pesar de que las plataformas de 96 posiciones están diseñadas para obtener métodos con una elevada productividad, Laurell y colaboradores consiguieron incrementarla todavía más empleando un sistema robótico con capacidad para hasta 384 muestras [34].

1.3. Sistemas robóticos para la automatización de técnicas de microextracción basadas en solventes

1.3.1. Microextracción en gota

En SDME, la muestra y un imán se colocan en el interior de un vial. Seguidamente, se introduce la aguja de una jeringa que contiene un disolvente orgánico en su interior (fase aceptora) de modo que se expone cuidadosamente una gota de dicho disolvente en contacto directo con la muestra y se agita durante un periodo de tiempo [35,36]. A continuación, el disolvente orgánico se retrae al interior de la jeringa y se inyecta en el instrumento analítico.

Posteriormente, se desarrolló su versión en espacio de cabeza para la extracción de compuestos volátiles, de forma que la gota no entra en contacto con la fase dadora sino con el espacio de cabeza.

Con la finalidad de automatizar la SDME empleando un automuestreador de bajo coste [37], se utilizó el mismo robot cartesiano que se ha descrito para la SPME [18,19] en la **Sección 1.2.1**. En este sentido, los viales conteniendo la muestra y un imán se sitúan en el agitador magnético. El módulo de la jeringa del sistema robótico toma el disolvente de extracción de un vial posicionado en la plataforma horizontal y, seguidamente, expone la gota a la muestra para llevar a cabo la extracción de los analitos. Una vez finalizada la extracción, la gota se inyecta en el LC mediante la válvula solenoide. Como característica adicional, mientras se realiza el análisis cromatográfico, el sistema robótico es capaz de llevar a cabo una etapa de limpieza del sistema de extracción para evitar la contaminación cruzada con las siguientes muestras.

También se ha descrito un procedimiento similar al anterior pero en este caso empleando un automuestreador comercial CombiPAL junto con un agitador magnético [38]. En este sentido, las muestras se introducen en un vial de vidrio sellado conteniendo un imán y se sitúan en la bandeja de muestras. A continuación, una vez el agitador alcanza la temperatura deseada se posiciona un vial de forma automática sobre él. Seguidamente, la jeringa del automuestreador se inserta en el vial, exponiendo la gota de fase aceptora en el espacio de cabeza durante un determinado tiempo. Una vez finalizada la extracción, la gota se retrae en la jeringa y se inyecta en el sistema de GC.

Los trabajos descritos hasta el momento para SDME requieren del empleo de un imán para agitar la fase dadora. Sin embargo, tal y como se ha descrito para SPME (**Sección 1.2.1**), su introducción en la muestra, así como su lavado se realizan de forma manual, requiriendo un mayor consumo de tiempo. En este sentido, se utilizó un automuestreador CombiPAL de CTC para automatizar la SDME, llevando a cabo muestreo pasivo y dinámico empleando un agitador vórtex [39]. Para el primer tipo de muestreo, el vial conteniendo la muestra se coloca en el vórtex dotado de control de temperatura. Pasado un determinado tiempo de agitación, esta se para y la jeringa expone la gota de fase aceptora en el espacio de cabeza del vial. Una vez finalizada la etapa de extracción, la gota se retrae en el interior de la jeringa y se inyecta en el GC. Respecto al muestreo dinámico, el procedimiento que se realiza es el mismo, pero en este caso se llevan a cabo diferentes ciclos de agitación y posterior exposición de la gota.

También se ha empleado un robot nanoESI para llevar a cabo de forma automatizada la SDME de tres fases mediante electroextracción, sin requerir de un imán [40]. En este sentido, se modificó una placa de 96 pocillos situando una placa de acero inoxidable en la parte inferior, la cual actúa como ánodo. Como

cátodo se emplea el mandril que tiene el sistema, el cual sujeta la punta de la pipeta y está conectado eléctricamente a ella. A pesar de que se emplea una placa de 96 pocillos, el sistema solo permite realizar la extracción de una muestra a la vez. Respecto al procedimiento empleado, en primer lugar, las muestras y el disolvente orgánico se sitúan manualmente en la placa de 96 pocillos. Seguidamente, el sistema robótico aspira el volumen deseado de gota, moviendo la punta de pipeta al pocillo en el que se encuentra la muestra y exponiéndola a ella. Una vez finalizada la extracción, la gota se transfiere automáticamente al instrumento analítico.

1.3.2. Microextracción en fase líquida con fibra hueca

En 1999, Pedersen-Bjergaard y Rasmussen presentaron la primera versión de HF-LPME [41]. Esta técnica consistía en una fibra hueca porosa en forma de U que se introducía en la muestra, conteniendo en su interior la fase aceptora. En ambos extremos de la fibra se insertaba una aguja de jeringa. Una de ellas se empleaba para introducir la fase aceptora, y la otra para recogerla una vez finalizada la extracción. Además, en el vial conteniendo la muestra se insertaba un imán para llevar a cabo su agitación durante la extracción. Posteriormente, Lee y colaboradores presentaron una versión en la que la fibra se encontraba sellada en uno de los extremos y en el otro extremo se insertaba la aguja de una jeringa [42]. Más adelante, se desarrolló una versión en la que la fibra hueca porosa contiene la fase aceptora y está sellada por ambos lados [43]. De este modo, la fibra se introduce en la muestra junto con el imán, permitiendo que esta se mueva libremente por la fase dadora, aumentando la transferencia de masa hacia la fase aceptora.

Para realizar la HF-LPME de forma semiautomatizada se ha empleado un sistema basado en una bomba de jeringa (**Figura 1.4a**) [44], llevando a cabo el siguiente procedimiento experimental. En primer lugar, se toma el volumen requerido de fase aceptora en el interior de la jeringa y se ensambla la fibra hueca en la aguja de la jeringa de forma manual. A continuación, la fibra se sumerge en la fase aceptora para rellenar los poros y el volumen de este que se había cargado en la jeringa se introduce en la fibra. Seguidamente, se expone la fibra a la muestra que está situada sobre un agitador magnético, dejando la jeringa en la bomba de jeringa, accionándola al mismo tiempo que el agitador magnético. Todos los pasos descritos hasta el momento se realizan de forma manual. Sin embargo, los siguientes pasos se realizan de forma automatizada empleando la bomba de la jeringa. En este sentido, el émbolo de la jeringa se retrae para cargar un determinado volumen de muestra en la fibra hueca, situando la fase aceptora en el interior de la jeringa. A continuación, se realiza el procedimiento opuesto, expulsando la muestra que estaba en el interior de la fibra y situando la fase aceptora en su lugar. Estas dos últimas etapas de

aspiración/expulsión se repiten un determinado número de veces. Finalmente, el agitador magnético y la bomba de la jeringa se apagan manualmente, inyectando el extracto en el instrumento analítico.

En la **Figura 1.4b** se muestra una estación de trabajo robótica no comercial basada en un sistema en jeringa [45], la cual presenta un mayor grado de automatización respecto al sistema descrito previamente para realizar HF-LPME. Todos los componentes de este sistema se encuentran en el interior de una carcasa cerrada. El sistema consiste en cuatro recipientes para líquidos, un controlador para jeringa, una válvula de inyección de 6 vías, un compartimento para la extracción, placas electrónicas y una pantalla táctil. Además, la estación de trabajo robótica permite el control de la temperatura. Los recipientes conteniendo los líquidos, así como el recipiente utilizado para los desechos están conectados al módulo de control de la jeringa. Este módulo consiste en la propia jeringa, un motor de paso a paso y una válvula de distribución. También está conectado a una válvula de 6 vías que tiene acceso a la fibra hueca, el instrumento analítico y una bomba. Para llevar a cabo la extracción de los analitos, la fibra hueca se dispone en forma de U en el interior del vial que contiene la muestra y un imán, situado sobre un agitador magnético. El sistema es capaz de realizar tanto la carga de la fase aceptora en la fibra hueca como la posterior inyección en el instrumento analítico de forma automatizada. Sin embargo, la fibra se sustituye manualmente al finalizar cada extracción para evitar la contaminación cruzada.

Con la finalidad de automatizar la HF-LPME empleando un automuestreador de bajo coste [46], se ha empleado el mismo robot cartesiano que para la SPME [18] (**Sección 1.2.1**) y la SDME [37] (**Sección 1.3.1**). En este sentido, el vial conteniendo la muestra, la fibra hueca y el imán se sitúa sobre un agitador magnético. Para llenar la fibra hueca con la fase aceptora (de forma automatizada), previamente la jeringa se acopla de forma manual a la fibra. Una vez finalizado el procedimiento de extracción, la fase aceptora se inyecta de forma automatizada en el LC.

En los sistemas previamente descritos para llevar a cabo la HF-LPME, la fibra hueca se reemplaza manualmente después de cada extracción. Sin embargo, este inconveniente no está presente en el sistema desarrollado por Ouyang y Pawliszyn que emplea un automuestreador y en el cual la fibra hueca se encuentra fijada en el septum del vial y adherida a una punta de pipeta [47]. En este sentido, todos los viales conteniendo la fibra hueca y la muestra se sitúan en la bandeja del automuestreador. A continuación, la fibra se llena con la fase aceptora y el vial se transfiere al agitador vórtex con control de temperatura. Una vez finalizada la extracción, el vial se devuelve a la bandeja del automuestreador y se recolecta la fase aceptora presente en el interior de la fibra hueca para su inyección en el instrumento de medida.

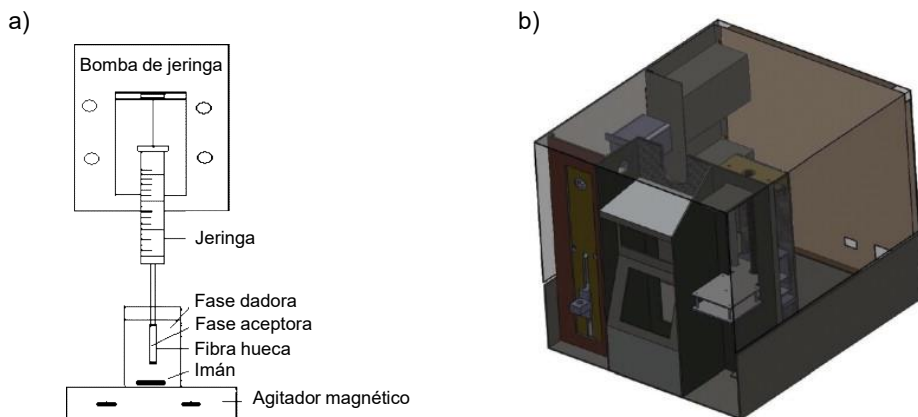


Figura 1.4. a) Sistema semiautomatizado basado en un automuestreador [44]; b) Estación robótica basada en jeringa [45].

1.3.3. Microextracción líquido-líquido dispersiva

La microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) fue propuesta por Assadi y colaboradores en 2006 [48]. En esta técnica, la fase aceptora se inserta en un tubo de vidrio de punta cónica. A continuación, la mezcla conteniendo el disolvente de extracción y el dispersante (disolvente orgánico miscible tanto en la muestra como en el disolvente extractante) se inyecta rápidamente. De este modo, se forma una microemulsión, aumentando el área de contacto entre la fase dadora y la aceptora, lo que permite llegar rápidamente al estado de equilibrio. Posteriormente, se realiza la centrifugación del tubo cónico de forma que el disolvente de extracción queda sedimentado en la parte inferior, el cual se toma para su inyección en el instrumento analítico.

Lee y Guo desarrollaron un método para llevar a cabo la DLLME empleando un automuestreador que permite la extracción de varias muestras sin intervención humana utilizando un agente demulsificante para separar la emulsión sin necesidad de centrifugar [49]. En este sentido, los viales conteniendo las muestras, el agente demulsificante y la mezcla conteniendo el agente dispersante y el disolvente de desorción se sitúan en la bandeja del automuestreador. A continuación, se llena la jeringa con el correspondiente volumen de mezcla de extracción y se dispersa en la muestra. Seguidamente, se inyecta el agente demulsificante para romper la emulsión y permitir que el disolvente de extracción se separe en la parte estrecha del cuello del vial. Finalmente, el extracto se recolecta y se inyecta en el instrumento analítico.

Otro sistema empleado para llevar a cabo la DLLME de forma totalmente automatizada fue el utilizado por Hankemeier y colaboradores [50]. La única etapa manual requerida es el llenado de los 384 pocillos con las muestras y el disolvente de extracción. Además, también cabe mencionar que a pesar de que se emplea una plataforma multiposición, solo se puede realizar la extracción de una muestra. Para llevar a cabo la extracción, la muestra se dispersa en un pocillo que contiene previamente el disolvente de extracción y se aplica una corriente de nitrógeno para asegurar una buena dispersión. Posteriormente, se deja que ambas fases se separen y se inyecta un volumen definido del extracto líquido en el instrumento de medida.

1.4. Discusión

1.4.1. Productividad

Como se ha explicado anteriormente, de forma general los sistemas automatizados son capaces de realizar las tareas operacionales de forma más rápida que los humanos, lo cual afecta a la productividad que se obtiene en la etapa de tratamiento de muestra. En este contexto la productividad se define como la cantidad de muestras que se pueden tratar por unidad de tiempo. En entornos de elevada demanda, la productividad es una característica crítica que influye directamente en los costes operacionales, plazos de entrega y eficiencia total del laboratorio. Por ello, se ha realizado una comparación en términos generales de la productividad de los sistemas automatizados con procedimientos manuales.

Dejando a un lado etapas previas de tratamiento de muestra tales como la filtración, centrifugación o decantación, entre otras, los métodos analíticos que emplean técnicas de extracción se pueden dividir en dos etapas principales, la extracción y la medida instrumental. Por ello, la productividad final del procedimiento analítico depende de la productividad concreta de cada etapa. En el caso de la extracción, la productividad se puede aumentar reduciendo el tiempo requerido en esta etapa y/o realizando extracciones en paralelo. Respecto a la medida instrumental, la única forma de aumentar la productividad de este parámetro es reduciendo el tiempo de análisis, utilizando técnicas de medida de respuesta instantánea o, en el caso de las técnicas cromatográficas, acortando todo lo posible el programa de elución.

En la **Figura 1.5** se muestra una comparación a grandes rasgos entre los métodos manuales y automatizados como guía general. Cabe recalcar que para realizar las comparaciones se ha empleado a modo de ejemplo la SPME con la finalidad de simplificar la discusión. Además, también se ha considerado que la duración de la medida instrumental era igual para los métodos automatizados y manuales, de forma que se pudiera llevar a cabo una comparación más justa.

Los tiempos considerados en cada etapa son solamente orientativos y tienen como finalidad plasmar a modo de ejemplo el tiempo empleado en cada una de las etapas, de forma que se pueda realizar una representación gráfica (**Figura 1.5**) para una mejor comprensión. Sin embargo, se deben utilizar datos reales y concretos de las etapas tanto de extracción como de medida instrumental cuando se quiera comparar métodos específicos.

Para realizar la comparación se ha considerado que tanto los sistemas manuales como los automatizados son capaces de realizar la extracción de una muestra mientras que la anterior está siendo medida en el correspondiente instrumento, es decir, extracción y medida simultáneas. Además, se han diferenciado los sistemas que solo pueden llevar a cabo la extracción de una sola muestra (monoextracción) y aquellos que son capaces de extraer varias muestras de forma simultánea (multiextracción). La productividad del método analítico completo (extracción y medida instrumental) se ha determinado teniendo en cuenta la etapa limitante, es decir, la etapa que consume una mayor cantidad de tiempo.

En la **Figura 1.5** se muestran las comparaciones realizadas, considerando para todas ellas que se lleva a cabo el análisis de tres muestras, pudiendo así evidenciar las diferencias.

Cuando se comparan sistemas monoextracción automatizados (p. ej. SPME en un automuestreador de una sola posición) (**Figura 1.5a y Figura 1.5e**) y manuales (p. ej. SPME manual) (**Figura 1.5c y Figura 1.5g**), se obtiene una mayor productividad en la etapa de extracción para los métodos automatizados, ya que son capaces de realizar las tareas operativas de forma más rápida, como, por ejemplo, en el caso de la SPME, posicionar la fibra (en el interior de la muestra o en el espacio de cabeza) para llevar a cabo la extracción y posteriormente la desorción (en una unidad de desorción térmica o en un vial conteniendo el disolvente de desorción), entre otras. En este sentido, los sistemas automatizados previamente programados son capaces de realizar movimientos de forma más rápida, así como con mayor precisión y exactitud. Por ejemplo, son capaces de insertar una determinada longitud de la fibra en la muestra de forma más rápida y exacta que un operador de forma manual, que debería medir cada vez la longitud de la fibra a insertar, así como anclar la jeringa a un soporte a una determinada altura respecto al recipiente que contiene la muestra. Además, de forma general, los sistemas de extracción automatizados que están acoplados al sistema de medida realizan el proceso de extracción muy cerca de este, de forma que una vez terminada esta etapa no se emplea casi tiempo en trasladar la fibra de SPME o el disolvente de desorción al instrumento de medida.

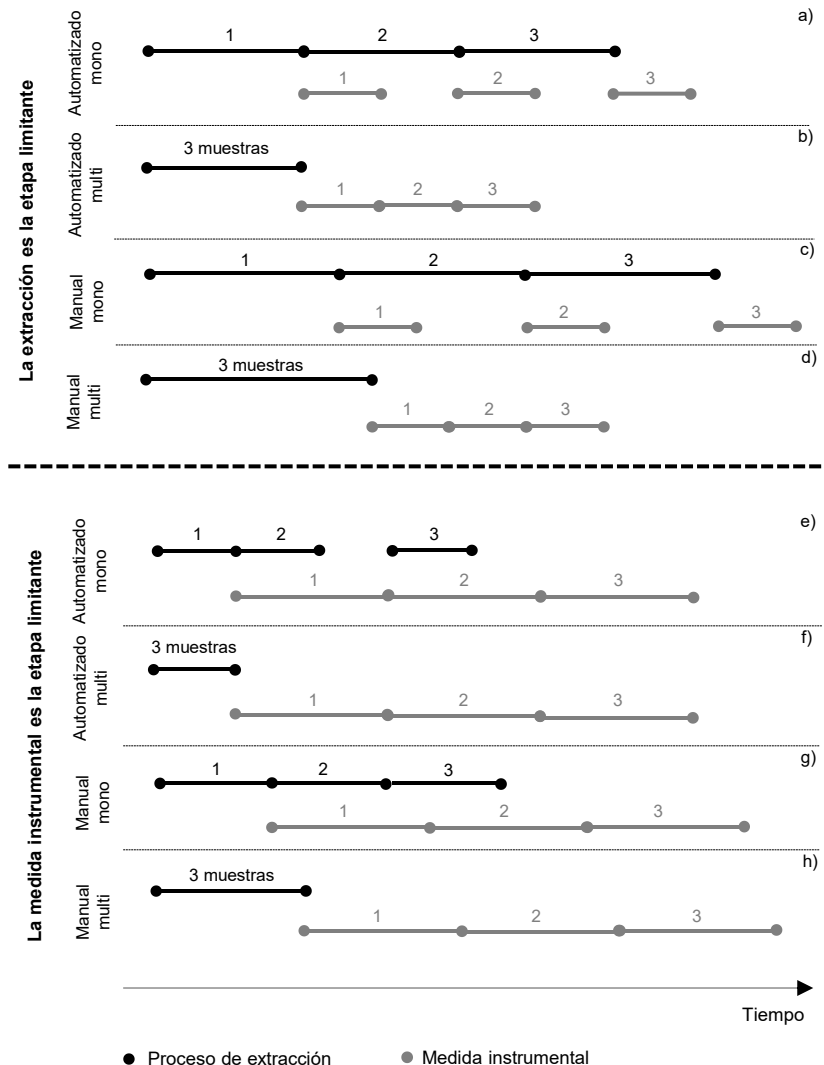


Figura 1.5. Comparación en términos de productividad entre los procedimientos manuales y los automáticos dependiendo de la etapa limitante y la configuración monoextracción o multiextracción para el tratamiento de tres muestras. Los números (1, 2, 3) representan el número de la muestra tratada.

Respecto a la productividad total del análisis (extracción y medida instrumental), esta está mayormente influenciada por la etapa limitante. En este sentido, cuando la etapa limitante es la extracción, dado que los sistemas automatizados (**Figura 1.5a**) son capaces de realizar los procesos implicados en esta etapa de

forma más rápida que los manuales (**Figura 1.5c**) y, teniendo en cuenta que la etapa de medida instrumental emplea el mismo tiempo para ambas, se obtiene una mayor productividad para los sistemas automatizados. Además, cuantas más muestras se tratan la diferencia de tiempo para analizar el mismo número de muestras entre los procedimientos automatizados y manuales aumenta (es decir, si se compara la diferencia de tiempo al finalizar la medida instrumental de la muestra 2 entre el sistema automatizado y manual es superior a si se compara con la muestra 1). Por ello, cuantas más muestras se traten mayor será el beneficio de la automatización. Por otro lado, cuando la etapa limitante es la medida instrumental, la productividad de la extracción no tiene tanto peso en la productividad total del método ya que se emplea más tiempo en la medida instrumental. De este modo, ambos sistemas son capaces de realizar de forma completa el proceso de extracción de una muestra mientras la previa está siendo analizada en el instrumento de medida. En este sentido, para estas configuraciones concretas se obtiene una productividad similar (**Figura 1.5e y g**), ya que la única diferencia es el tiempo empleado en la primera extracción, lo cual no es altamente significativo.

Por otra parte, cuando se comparan sistemas monoextracción automatizados (p. ej. SPME llevada a cabo en un automuestreador de una sola posición) (**Figura 1.5a y e**) y sistemas multiextracción manuales (p. ej. SPME realizada en paralelo) (**Figura 1.5d y h**), se obtiene una menor productividad en la etapa de extracción para los sistemas automatizados. Esto se debe a que los beneficios que aporta la extracción en paralelo manual, pese a que se necesita un mayor empleo de tiempo para el montaje del sistema y llevar a cabo las tareas operacionales requeridas (p. ej. insertar la fibra en la muestra), son superiores a los que aporta la mayor velocidad de los sistemas automatizados en realizar las tareas operacionales. Respecto a la productividad del análisis completo (extracción y medida instrumental), cuando la etapa de extracción es la etapa limitante, se obtiene una menor productividad para los sistemas automatizados (**Figura 1.5a**) respecto a los manuales (**Figura 1.5d**). Esto viene influenciado por la menor productividad de estos sistemas en la etapa de extracción. Además, cuantas más muestras se traten, mayor será la diferencia de productividad. Sin embargo, cuando la etapa limitante es la medida instrumental, se obtiene una mayor productividad del procedimiento analítico para los sistemas automatizados (**Figura 1.5e**), ya que el tiempo empleado en la extracción de la primera muestra es menor en comparación con la extracción manual de las tres muestras de forma simultánea (**Figura 1.5h**). Por ello, como la etapa limitante es la medida instrumental, los sistemas automatizados son capaces de realizar completamente la extracción de una muestra mientras la anterior está siendo analizada en el instrumento de medida. No obstante, la diferencia de tiempo total del análisis de todas las muestras será igual a la diferencia de tiempo entre la extracción de la primera muestra en el sistema

automatizado y la extracción de las diferentes muestras de forma simultánea manualmente.

Cuando se realiza la comparación de sistemas multiextracción automatizados (p. ej. SPME en una placa de 96 posiciones) (**Figura 1.5b y f**) y sistemas manuales monoextracción (p. ej. SPME de forma manual) (**Figura 1.5c y g**), se obtiene una mayor productividad en la etapa de extracción para los sistemas automatizados, ya que combinan los dos beneficios mencionados anteriormente, es decir, operaciones más rápidas y la capacidad de realizar diversas extracciones de forma simultánea. Respecto a la productividad del análisis completo (extracción y medida instrumental), cuando la etapa limitante es la extracción, la diferencia de productividad entre los sistemas manuales (**Figura 1.5c**) y automatizados (**Figura 1.5b**) es muy elevada, sobre todo cuando se tratan un gran número de muestras. Esto se debe a la gran diferencia de productividad en la etapa de extracción entre los sistemas manuales monoextracción y los automatizados multiextracción. Además, a mayor número de muestras tratadas, mayor es la ventaja que proporcionan los sistemas automatizados. Sin embargo, cuando la etapa limitante es el análisis instrumental, se obtiene una diferencia de productividad más pequeña (**Figura 1.5f y g**), ya que en este caso la única diferencia se encuentra en el tiempo empleado para la extracción de la primera muestra en el sistema manual y la extracción de las diversas muestras empleando el sistema automatizado.

En el caso en el que tanto los sistemas manuales (p. ej. SPME en paralelo) (**Figura 1.5d y h**) como los automatizados (p. ej. SPME en placa de 96 posiciones) (**Figura 1.5b y f**) son capaces de tratar varias muestras de forma simultánea, se obtiene una mayor productividad para los sistemas automatizados, ya que realizan las tareas operativas de forma más rápida. En este caso, la etapa limitante no es un factor determinante para establecer la modalidad que presenta una mayor productividad del análisis completo (extracción y medida instrumental), ya que la extracción de todas las muestras se realiza de forma simultánea. Por ello, independientemente de la etapa limitante, se obtiene una mayor productividad para los sistemas automatizados. Sin embargo, esta diferencia va a depender de la técnica de microextracción empleada, ya que el grado de manipulación requerido varía entre ellas. De este modo, la automatización va a presentar mayores beneficios cuando se utilicen técnicas de microextracción con una elevada manipulación.

1.4.2. Automatización del análisis secuencial de muestras y detección en línea

Como se ha descrito anteriormente, un elevado grado de automatización proporciona grandes ventajas. Sin embargo, incluso si la etapa de extracción está totalmente automatizada, se pueden requerir algunas etapas manuales previas (p. ej. posicionar la muestra antes del procedimiento de extracción) o posteriores (p. ej. inyectar el extracto final en el instrumento de medida). En este sentido, para considerar que un sistema está totalmente automatizado debe realizar el procedimiento analítico en su totalidad sin requerir la intervención humana. Para este propósito, el sistema de extracción debe estar en línea con el instrumento analítico. Sin embargo, a pesar de que algunos sistemas presentan esta característica, solo son capaces de realizar el análisis de una sola muestra sin requerir intervención humana. En este sentido, para realizar el tratamiento de la siguiente muestra se requiere de alguna etapa manual. Por ello, los sistemas que pueden procesar diversas muestras sin intervención humana presentan una gran ventaja, ya que son capaces de estar en funcionamiento las 24 horas del día de forma ininterrumpida. Esto implica que se puedan tratar un gran número de muestras diariamente, incluso si el sistema por sí solo no presenta una elevada productividad. A continuación, se evalúa el grado de automatización del procedimiento analítico completo (extracción y medida instrumental), así como la capacidad de realizar el análisis secuencial de muestras de los sistemas robóticos descritos.

En este sentido, la estación de trabajo robótica controlada por Arduino desarrollada durante esta Tesis Doctoral para llevar a cabo la DSPE [26] requiere de la intervención manual para añadir y retirar las disoluciones. Además, el extracto final se transfiere manualmente al instrumento de medida y no se permite la extracción secuencial de las muestras sin intervención humana. En el caso del sistema empleado para llevar a cabo la HF-LPME de forma semiautomatizada [44], algunas etapas previas tales como el acondicionamiento de la fibra, la carga de la fase aceptora en la jeringa y la introducción de la fibra en la muestra se realizan de forma manual, así como la inyección del extracto en el instrumento de medida. En cuanto al sistema basado en una barra magnética empleado para llevar a cabo la DSPE [27], se requiere inyectar manualmente el extracto en el instrumento analítico, así como sustituir la dispersión del material magnético, los disolventes de lavado y desorción y la muestra después de cada extracción.

Otros sistemas presentan mejoras en términos de automatización del procedimiento analítico mediante la detección instrumental en línea con el procedimiento de extracción. Sin embargo, estos sistemas todavía requieren de ciertas etapas manuales. En el caso del sistema en jeringa para llevar a cabo la HF-LPME [45], tanto la fibra hueca como la muestra se reemplazan después de cada extracción de forma manual. Respecto al automuestreador no comercial

para llevar a cabo HF-LPME [46], se requiere acoplar manualmente la fibra a la jeringa para cada extracción.

Otros sistemas relevantes son aquellos que permiten el tratamiento de varias muestras de forma simultánea sin requerir la intervención humana, pero no tienen la capacidad de realizar la detección instrumental en línea con la etapa de extracción. Este es el caso de la estación robótica de 8 posiciones [30] y la de 96 posiciones para llevar a cabo MEPS [31], así como las plataformas de 96 [33] y 384 [34] posiciones para llevar a cabo μ SPE.

En este contexto, los sistemas más eficientes son aquellos que son capaces de llevar a cabo el procedimiento analítico en su totalidad de forma automatizada, así como el análisis secuencial de las muestras. En este sentido, una vez las muestras están posicionadas en su correspondiente lugar, se lanza una secuencia y todas las etapas se realizan de forma totalmente automatizada. Estos sistemas son de especial relevancia en los laboratorios de rutina que necesitan tratar un elevado número de muestras. Los sistemas que presentan estas características son los automuestreadores empleados para llevar a cabo SPME [17,18,20,21], DSPE [28], MEPS [29], μ SPE [32], SDME [37–40], HF-LPME [47] y DLLME [49,50], así como el sistema de dos brazos [22] y el de 96 posiciones [23] para llevar a cabo SPME.

1.4.3. Portabilidad y consideraciones económicas

Una característica que ha ganado interés en los últimos años es la portabilidad de los métodos desarrollados. Esto se debe a que tanto el transporte como el almacenamiento de las muestras son etapas críticas y si no se llevan a cabo de forma correcta se puede producir una alteración en su composición, pudiéndose degradar los compuestos de interés. Además, estas dos etapas llevan asociado un mayor consumo de tiempo y de recursos económicos. Por ello, hay una demanda creciente de métodos donde el procedimiento de extracción se lleva a cabo en el lugar donde se toma la muestra y, si es posible, también la medida instrumental. En el caso de los sistemas robóticos descritos, generalmente presentan un gran tamaño, dificultando su portabilidad. Sin embargo, sería interesante desarrollar versiones miniaturizadas que presentaran esta característica, tal y como se ha realizado con los sistemas miniaturizados de medida instrumental. En este sentido, en la estación de trabajo robótica desarrollada en esta Tesis Doctoral para llevar a cabo la DSPE [26], los dispositivos electrónicos se sitúan en el interior de una carcasa impresa en 3D de 20.2 x 19.4 x 10.2 cm, permitiendo su total portabilidad. Además, este sistema se puede alimentar mediante una batería externa de 9 V, sin necesidad de estar conectado eléctricamente a la red.

Otro aspecto relevante a la hora de desarrollar métodos automatizados es el coste económico de la instrumentación. En este sentido, los automuestreadores comerciales son solo asequibles para los laboratorios con un elevado presupuesto, ya que su precio es muy elevado. Sin embargo, se han propuesto sistemas alternativos basados en software de código abierto y ensamblados con hardware de bajo coste, asegurando así que sean asequibles. Este es el caso de las estación de trabajo robótica desarrollada en esta Tesis Doctoral para llevar a cabo DSPE [26], así como el automuestreador desarrollado [19] para llevar a cabo SPME [18], SDME [37] y HF-LPME [46] y el robot cartesiano de 8 posiciones para realizar MEPS [30]. Además, estos sistemas se pueden modificar y mejorar fácilmente dependiendo de los requisitos de cada método.

Respecto a los beneficios económicos, se deben considerar diversos aspectos con la finalidad de comparar los métodos automatizados con los manuales. Por un lado, como se ha comentado en la **Sección 1.4.1**, la productividad del método. En este sentido, cuantas más muestras es capaz de tratar un sistema por unidad de tiempo, mayores beneficios económicos se obtienen. Por otro lado, hay que tener en cuenta también el grado de automatización de la etapa de extracción, el acoplamiento en línea con el instrumento de medida y el análisis secuencial de muestras. En caso de que un método presente estas tres características, se reduce extremadamente la intervención del operador, así como el número de operadores necesarios, disminuyendo los gastos económicos en personal. En el caso en el que el procedimiento de extracción esté automatizado o solo se requieran etapas manuales simples, este se puede llevar a cabo por personal menos cualificado. Como se ha descrito anteriormente, la intervención del operador es diferente para cada uno de los sistemas robóticos. Además, aquellos sistemas en los que no se requiere intervención humana (a excepción de situar las muestras o reactivos en el sistema) presentarán una mayor seguridad para el operador ya que su contacto con los reactivos se reduce.

1.5. Conclusiones

Como se ha demostrado, la automatización de la etapa de tratamiento de muestra ha sido uno de los focos principales en el campo de la Química Analítica en las últimas décadas. En este sentido, se han desarrollado diferentes estaciones robóticas para llevar a cabo las técnicas de microextracción más ampliamente empleadas, obteniendo ventajas sobre los procedimientos manuales. Como se ha discutido de forma general, los sistemas automatizados presentan una mayor productividad en comparación con los manuales. Además, es de gran importancia desarrollar sistemas que permitan la medida instrumental en línea con la etapa de microextracción. Otro aspecto a remarcar es el grado de automatización del procedimiento analítico. En este sentido, es

Capítulo 1

crucial desarrollar procedimientos analíticos que estén totalmente automatizados y, por tanto, no requieran intervención manual. De este modo, la única intervención humana sería situar las muestras y los reactivos en los correspondientes lugares al inicio del procedimiento analítico. Esto conllevaría una menor intervención del operador, obteniendo procedimientos más seguros y con un menor coste económico. A pesar de los beneficios de los sistemas robóticos, una de las mayores limitaciones es su portabilidad debido a su gran tamaño, por lo que todavía se requiere realizar más avances en esta área.

Capítulo 2

Evaluación comparativa del impacto ambiental de las técnicas de microextracción con respecto a las técnicas de extracción convencionales

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo: G. Peris-Pastor, C. Azorín, J. Grau, J.L. Benedé, A. Chisvert, Miniaturization as a smart strategy to achieve greener sample preparation approaches: A view through greenness assessment, TrAC, Trends Anal. Chem. 170 (2024) 117434.



2.1. Principales herramientas métricas para la evaluación del impacto ambiental

En las últimas dos décadas se han desarrollado diferentes herramientas métricas para evaluar el impacto ambiental de los métodos analíticos con la finalidad de proporcionar una idea general de la concordancia de estos con los principios de la *Green Analytical Chemistry* (GAC) [1], *White Analytical Chemistry* (WAC) [3] y *Green Sample Preparation* (GSP) [4]. De este modo, la comunidad científica dispone de una guía para llevar a cabo prácticas más sostenibles. Sin embargo, cada herramienta adopta sus propias reglas y consideraciones para evaluar el impacto ambiental del método analítico. Por ejemplo, algunas herramientas se centran en el proceso analítico completo mientras que otras prestan más atención a una etapa en concreto. Además, dependiendo de los criterios considerados por cada herramienta, se obtiene una amplia variación en la puntuación final del método. Por esta razón, la comparación del impacto ambiental entre diferentes métodos analíticos se debe realizar empleando la misma herramienta para todos, de lo contrario se obtendrían resultados erróneos o inconcluyentes.

Recientemente, se han publicado diferentes artículos de revisión sobre las herramientas de evaluación del impacto ambiental más utilizadas [51–54]. En estos artículos se ha realizado una descripción y discusión de cada herramienta aplicándose a diferentes métodos analíticos para demostrar sus ventajas y limitaciones. En términos generales, se concluyó que cada herramienta es apropiada para un tipo de aplicación concreto, no existiendo una herramienta universal.

El objetivo de este capítulo es evidenciar la importancia de la miniaturización en el desarrollo de metodologías que presenten un menor impacto ambiental en la etapa de tratamiento de muestra, no solo de forma empírica o conceptual como se ha descrito recientemente [8], sino de una forma tangible mediante el uso de herramientas de evaluación de impacto ambiental. Específicamente, se ha evaluado la influencia de la miniaturización en la reducción del impacto ambiental comparando las técnicas de extracción convencionales con las de microextracción en una serie de aplicaciones concretas.

En las siguientes subsecciones se resumen, en primer lugar, algunas de las herramientas más relevantes para la evaluación del impacto ambiental, discutiendo las ventajas y desventajas de cada una, con la finalidad de seleccionar la herramienta que mejor se adapta al objetivo propuesto para realizar las pertinentes evaluaciones de los métodos y posteriormente se aplica, como se ha comentado, a la evaluación de una serie de aplicaciones concretas.

2.1.1. National Environmental Methods Index

El *National Environmental Methods Index* (NEMI) [55], propuesto en 2007, fue la primera herramienta creada para la evaluación del impacto ambiental de los métodos analíticos. Esta se basa en cuatro criterios: (a) persistencia, bioacumulatividad y toxicidad (PBT), (b) peligrosidad, (c) corrosividad y (d) residuos generados. Estas categorías se representan como porciones de un círculo, empleando una puntuación semicuantitativa basada en dos colores, utilizando el color verde para la opción de menor impacto ambiental y el color blanco para la de mayor impacto. Dos años después, en 2009, Raynie y Driver [56] propusieron el NEMI modificado como una evolución del NEMI tradicional. En esta herramienta se emplean cinco categorías para llevar a cabo la evaluación del impacto ambiental: (a) energía, (b) peligro medioambiental, (c) salud, (d) seguridad y (e) residuos generados. Estas cinco secciones se representan en un pictograma pentagonal y, en este caso, se emplea un sistema de puntuación semicuantitativo basado en tres colores, utilizando el color verde para la opción de menor impacto ambiental, el amarillo para la opción intermedia y el rojo para la opción con mayor impacto. Además, se emplean valores predeterminados para asignar el color de cada categoría. En la **Figura 2.1** se muestra un ejemplo del NEMI y del NEMI modificado, así como el significado de cada categoría.

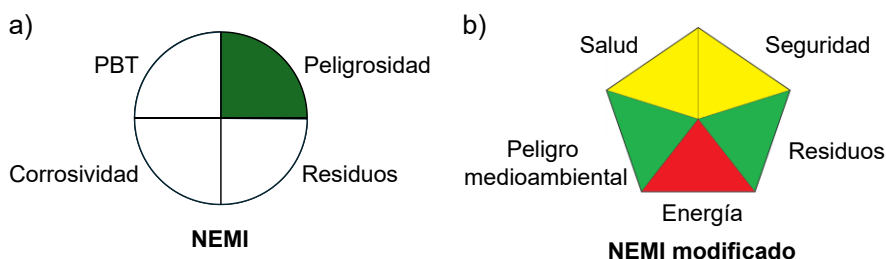


Figura 2.1. Representación a modo ejemplo de un pictograma de a) NEMI y b) NEMI modificado.

A continuación, se describen las ventajas e inconvenientes del NEMI modificado para la evaluación de técnicas de microextracción.

- **Ventajas:**
 - Simple y visual: debido a la presencia de solo 5 criterios y a su puntuación mediante asignación de colores se puede detectar fácilmente las áreas generales que necesitan ser mejoradas

Capítulo 2

- Inconvenientes
 - Herramienta semicuantitativa: al presentar una puntuación cualitativa empleando un código de colores dificulta la comparación entre diferentes métodos
 - Evaluación del método completo: no presta especial atención a la etapa de preparación de muestra, por lo que es difícil realizar una comparación entre técnicas de extracción
 - Criterios muy generales: se consideran muchos aspectos dentro de cada criterio, lo que dificulta encontrar los aspectos concretos del método a mejorar
 - Cantidad de reactivos peligrosos utilizados: no se considera la cantidad de reactivos
 - Valores límite elevados y rangos amplios: los valores límite, así como los rangos para evaluar los residuos y los materiales peligrosos son del orden de las decenas de gramos, por lo que los métodos que emplean microextracción difícilmente superan estos valores, obteniendo siempre pictogramas verdes y dificultando su comparación
 - No se consideran aspectos como la cantidad y el lugar de preparación de muestra, la cantidad de muestras procesadas por unidad de tiempo o la automatización

2.1.2. Analytical Eco-Scale

En 2012, Namieśnik y colaboradores propusieron la *Analytical Eco-Scale* [57], la cual se basa en una escala arbitraria en la que a un método analítico con un impacto ambiental ideal (nulo) se le asigna una puntuación de 100. De este modo, a estos 100 puntos iniciales se les resta una cantidad determinada de puntos de penalización en aquellos parámetros en los que el método difiere del impacto ambiental ideal. En esta herramienta se consideran las siguientes categorías: (a) cantidad de reactivos, (b) peligrosidad de los reactivos, (c) consumo de energía, (d) riesgos laborales y (e) residuos generados. Cada uno de estos parámetros se tiene en cuenta para el proceso analítico completo. Dependiendo de la puntuación final obtenida, el método se puede clasificar como “excelente” cuando la puntuación es superior a 75, “aceptable” cuando la puntuación está entre 75 y 50 e “inadecuado” cuando la puntuación es inferior a 50.

A continuación, se describen las ventajas e inconvenientes de la *Analytical Eco-Scale* para la evaluación de técnicas de microextracción.

- Ventajas:
 - Simple y cuantitativa: se pueden comparar los métodos empleando simplemente la puntuación final obtenida

- Inconvenientes
 - Evaluación del método completo: no presta especial atención a la etapa de preparación de muestra, por lo que es difícil realizar una comparación entre técnicas de extracción
 - Mayor contribución de la etapa de medida instrumental: dado que se considera la cantidad de reactivos y sustancias peligrosas empleadas en el método completo, la contribución de la etapa de medida instrumental (p. ej. en técnicas de cromatografía de líquidos) a la cantidad total de estos es superior en comparación con la etapa de extracción, lo cual se acentúa todavía más cuando se emplean técnicas de microextracción, debido a las bajas cantidades empleadas
 - Valores límite elevados y rangos amplios: los valores límite, así como los rangos establecidos para evaluar los residuos y los materiales peligrosos son del orden de las decenas de gramos, por lo que los métodos de microextracción difícilmente superan estos valores, no obteniendo así puntos de penalización
 - Consideración individual de reactivos, disolventes e instrumentación: se aplican puntos de penalización por el número de reactivos diferentes o disolventes empleados sin tener en cuenta la cantidad individual, así como el número de instrumentos sin considerar el consumo de energía
 - Difícil identificación de los aspectos del método a mejorar: debido a que solo se presenta un valor de puntuación final, dificulta la comparación de aspectos concretos entre diferentes métodos, así como los aspectos que tienen una mayor mejora potencial
 - No se consideran aspectos como la cantidad y el lugar de preparación de la muestra, la cantidad de muestras por unidad de tiempo o la automatización

2.1.3. Green Analytical Procedure Index y sus variantes

En 2018, Plotka-Wasyłka desarrolló el *Green Analytical Procedure Index* (GAPI) [58]. Esta herramienta se basa en cinco pentágonos fraccionados atendiendo a las siguientes categorías: (a) toma de muestra, (b) preparación de muestra, (c) reactivos y compuestos empleados, (d) instrumentación y (e) tipo de método (cuantitativo o cualitativo). Se emplea un sistema de puntuación semicuantitativo basado en tres colores. Dependiendo del impacto ambiental de cada parámetro se le asigna el color verde (menor impacto), amarillo (impacto intermedio) o rojo (impacto elevado), atendiendo a unos valores preestablecidos. Más tarde, Plotka-Wasyłka y Wojnowski implementaron mejoras al GAPI, creando así el ComplexGAPI [59]. En esta nueva herramienta se mantuvieron intactos los cinco pentágonos anteriores y los parámetros descritos en cada uno, así como el sistema de puntuación basado en tres colores. La novedad fue la adición de

un hexágono, el cual hace referencia a los procesos previos al análisis tales como la síntesis de los materiales extractantes. Dentro de este hexágono se encuentra un número acotado como *e-factor* el cual hace referencia a la proporción de la masa de residuos generada en el proceso de síntesis respecto a la masa total de material extractante obtenido. Además, se desarrolló un software libre para facilitar el uso de esta herramienta y poder generar pictogramas de ComplexGAPI [59]. Recientemente, en 2024, Mansour, Plotka-Wasyłka y Locatelli propusieron el *Modified GAPI* (MoGAPI) [60], introduciendo un sistema de puntuación final del método a la versión original del GAPI. De este modo, la comparación entre métodos se puede realizar de forma más sencilla mediante una simple comparación de las puntuaciones totales obtenidas. Finalmente, ese mismo año, Mansour, Omer y Plotka-Wasyłka presentaron una nueva versión de esta herramienta, renombrándola como ComplexMoGAPI [61]. En esta versión se añadió un sistema de puntuación final del método al ComplexGAPI, al igual que se había hecho con el MoGAPI con respecto al GAPI. Además, tanto para el MoGAPI como para el ComplexMoGAPI, se desarrolló un software libre que permite llevar a cabo la evaluación del método y obtener el correspondiente pictograma.

En la **Figura 2.2** se muestra un ejemplo del ComplexMoGAPI así como el significado de cada uno de los criterios.

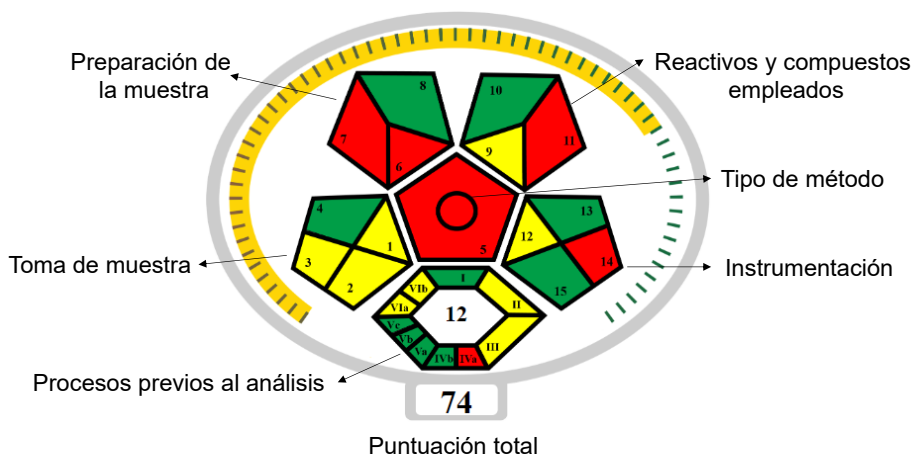


Figura 2.2. Representación a modo de ejemplo de un pictograma de ComplexMoGAPI.

A continuación, se describen las ventajas e inconvenientes del ComplexMoGAPI para la evaluación de técnicas de microextracción.

Capítulo 2

- Ventajas:
 - Herramienta completa: se evalúan un elevado número de aspectos
 - Visual y cuantitativa: el sistema de colores permite identificar fácilmente los criterios a mejorar y la puntuación total permite comparar rápidamente y de forma cuantitativa entre métodos
 - Software: se encuentra disponible un software para realizar la evaluación de los métodos
- Inconvenientes:
 - Evaluación del método completo: no presta especial atención a la etapa de preparación de muestra, por lo que es difícil realizar una comparación entre técnicas de extracción
 - Difícil evaluación de los métodos: a pesar de que la evaluación de un elevado número de aspectos haga que sea una herramienta muy completa, se requiere de una gran cantidad de información que no está normalmente presente en los artículos, y por tanto resulta complicado realizar su evaluación
 - Valores límite elevados y rangos amplios: los valores límite, así como los rangos establecidos para evaluar los residuos y los materiales peligrosos son del orden de las decenas de gramos, por lo que los métodos de microextracción difícilmente superan estos valores, obteniendo pictogramas de color verde

2.1.4. Analytical GREEnness

En 2020, Pena-Pereira, Wojnowski y Tobiszewski desarrollaron la *Analytical GREEnness Metric Approach and Software* (AGREE) [62]. Para evaluar el impacto ambiental de los métodos, se consideran 12 aspectos a evaluar directamente relacionados con los 12 principios de la GAC, y se asignan puntuaciones de entre 0 y 1 en cada uno de ellos dependiendo del grado de concordancia del método con dicho principio. Cada categoría presenta un peso diferente dependiendo de su importancia, lo cual se tiene en cuenta para el cálculo de la puntuación final de entre 0 y 1 como promedio ponderado. Además, se asigna una escala gradual de colores de verde a rojo, dependiendo de la puntuación obtenida en cada categoría, así como la puntuación final. El pictograma obtenido es un gráfico en forma de reloj, donde se muestra en el medio la puntuación numérica total, así como el correspondiente color obtenido. A su alrededor se encuentran los 12 aspectos adecuadamente etiquetados entre el 1 y el 12, dispuestos en arcos circundantes y representados con su correspondiente escala de color. El peso de cada uno de los aspectos se representa mediante el tamaño de su arco circundante. En la **Figura 2.3** se muestra un ejemplo de pictograma AGREE.

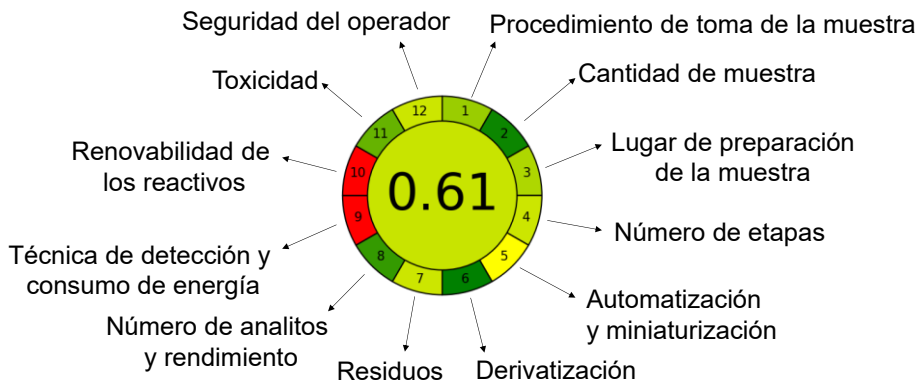


Figura 2.3. Representación a modo de ejemplo de un pictograma de AGREE.

A continuación, se describen las ventajas e inconvenientes de AGREE para la evaluación de técnicas de microextracción.

- **Ventajas:**
 - Cuantitativa: la puntuación final del método se presenta como un valor entre 0 y 1, lo que permite una fácil comparación entre los diferentes métodos evaluados
 - Visual: Se aplica un sistema de puntuación basado en colores para los diferentes aspectos evaluados, permitiendo diferenciar fácilmente los aspectos a mejorar, así como comparar determinados aspectos entre diferentes métodos
 - Empleo de valores exactos: para la evaluación de los aspectos 2, 7 y 8 se requieren los valores exactos, por lo que la evaluación del método es más justa y no existen valores límite mínimos ni rangos amplios
 - Software: se ha desarrollado un software libre fácil de usar para llevar a cabo la evaluación de los métodos
- **Inconvenientes:**
 - Evaluación del método completo: no presta especial atención a la etapa de preparación de muestra, por lo que es difícil realizar una comparación entre técnicas de extracción

2.1.5. Analytical Greenness Metric for Sample Preparation

En 2022, Wojnowski, Tobiszewski, Pena-Pereira y Psillakis desarrollaron la *Analytical Greenness Metric for Sample Preparation* (AGREEprep) [63]. Esta herramienta tiene similitudes con AGREE, pero se centra en la etapa de

preparación de muestra. Los criterios a tener en cuenta se basan en los 10 principios de la GSP, los cuales se representan en el pictograma etiquetados entre el 1 y el 10 de la siguiente forma: (1) lugar de preparación de la muestra, (2) uso de materiales peligrosos, (3) sostenibilidad, renovabilidad y reusabilidad de los materiales, (4) generación de residuos, (5) cantidad de muestra, (6) productividad, (7) integración y automatización de procesos, (8) consumo de energía, (9) instrumentación analítica y (10) seguridad del operador. Tanto el gráfico como las puntuaciones se representan de manera similar a AGREE, pero en este caso cada criterio tiene el mismo tamaño de arco circundante, representando su peso según si sobresale más o menos del círculo. En la **Figura 2.4** se muestra un ejemplo de pictograma de AGREEprep, así como el significado de cada criterio.

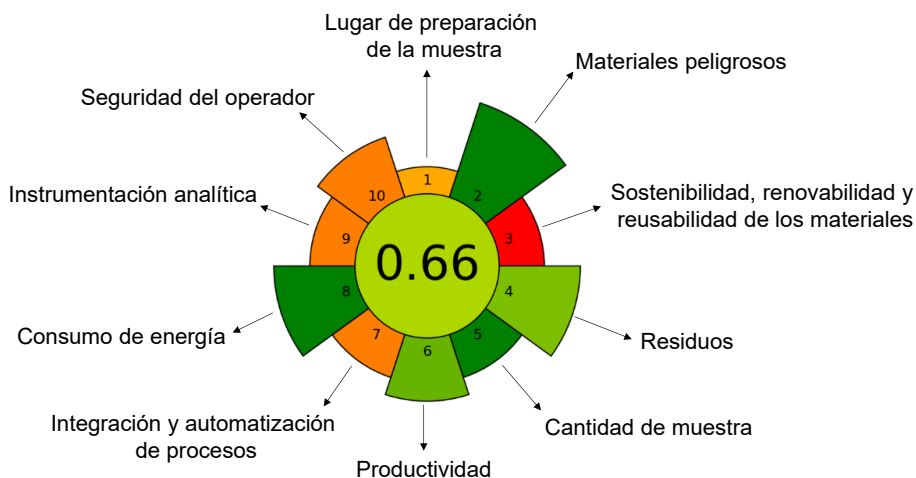


Figura 2.4. Representación a modo de ejemplo de un pictograma de AGREEprep.

A continuación, se describen las ventajas e inconvenientes de AGREEprep para la evaluación de técnicas de microextracción.

- **Ventajas:**
 - Cuantitativa: la puntuación final del método se presenta como un valor entre 0 y 1, lo que permite una fácil comparación entre los diferentes métodos evaluados
 - Visual: Se aplica un sistema de puntuación basado en colores para los diferentes criterios evaluados, permitiendo diferenciar fácilmente los criterios a mejorar, así como comparar determinados criterios entre diferentes métodos

- Empleo de valores exactos: para la evaluación de los criterios 2, 4, 5, 6 y 8 se requieren los valores exactos, por lo que la evaluación del método es más justa y no existen valores límite mínimos ni rangos amplios
- Software: se ha desarrollado un software libre fácil de usar para llevar a cabo la evaluación de los métodos
- Inconvenientes
 - No consideración de otras etapas diferentes a la de tratamiento de muestra: no se tienen en cuenta otras etapas relacionadas como la síntesis de los materiales extractantes

2.1.6. Otras herramientas que incluyen la evaluación del impacto ambiental

Además de las descritas anteriormente, en los últimos años se han desarrollado otras herramientas que incluyen la evaluación del impacto ambiental. Sin embargo, la gran mayoría de estas herramientas evalúan también otros parámetros distintos a este.

En 2019, Campins y colaboradores desarrollaron la herramienta métrica Hexagon-CALIFICAMET [64]. Esta herramienta se basa en un hexágono dividido en seis parámetros: (a) residuos, (b) huella de carbono, (c) toxicidad/seguridad, (d) figuras de mérito 1 (tratamiento de muestra y calibración y características del método), (e) figuras de mérito 2 (control de calidad y exactitud) y (f) coste económico. Los parámetros que difieren de la idealidad reciben puntos de penalización, obteniendo una puntuación final de entre 0 y 4 (siendo 0 la mejor puntuación y 4 la peor) para cada parámetro.

En 2019 también, Nowak y colaboradores desarrollaron la herramienta RGB [65], la cual emplea los tres colores primarios para representar los tres atributos principales del método evaluado: rojo para las características analíticas, verde para evaluar la concordancia con los principios de la GAC y azul para la productividad/efectividad práctica. Para cada parámetro se asignan tres intervalos de concordancia: (a) superior al 66.6% (satisfactorio), (b) entre 66.6 y 33.3% (tolerable) y (c) inferior al 33.3% (inaceptable), considerando que el 66.6% es el valor satisfactorio más bajo y el 33.3% el valor aceptable más bajo. De esta forma, se comparan estos intervalos con los valores del método desarrollado, obteniéndose una puntuación final. A partir de la combinación de los valores RGB obtenidos, se le asigna al método como puntuación final uno de los siguientes nueve colores, ordenados de mejor a peor: blanco, magenta, amarillo, cian, rojo, azul, verde, gris y negro. Además, se puede calcular un parámetro adicional llamado *Method Brilliance* para obtener un valor cuantitativo. Más adelante, en 2021 se desarrolló una nueva versión llamada RGB12 [3]. Esta

herramienta está basada en los 12 principios de la WAC, divididos en tres atributos representados por los tres colores primarios, al igual que en RGB original. El usuario establece unos valores de referencia para cada parámetro (cada uno de los 12 principios de la WAC) según los requerimientos de la aplicación analítica en concreto y evalúa la concordancia de cada método concediendo una puntuación entre 0 (peor) y 100 (mejor). La puntuación obtenida para cada parámetro se introduce en una hoja de cálculo, obteniendo automáticamente la puntuación para cada atributo, así como la puntuación total del método, ambas entre 0 y 100. Posteriormente, en 2024 se desarrolló otra versión de esta herramienta llamada RGBfast [66], presentando ventajas en términos de simplicidad de uso, transparencia, automatización del procedimiento de evaluación y libertad limitada de manipulación. Al igual que sus predecesoras, los atributos están representados por los colores primarios. Sin embargo, el número de parámetros se reduce a 6, simplificando el proceso de evaluación. Además, la forma de llevar a cabo la evaluación de los métodos analíticos es distinta a las herramientas anteriores, de forma que solo permite la comparación entre métodos, pero no evaluar un método de forma individual. En este sentido, en una hoja de cálculo se insertan los valores de cada método para cada parámetro, calculando automáticamente el promedio de cada uno. Posteriormente, se realiza una evaluación de los parámetros de cada método mediante comparación de su valor individual con la media. De esta forma, se obtienen puntuaciones de entre 0 y 100, tanto para los parámetros individuales, como para los atributos expresados como colores primarios y para el método en conjunto.

En 2023, se desarrolló el *Need, Quality and Sustainable index* (NQS) [67]. Esta herramienta evalúa el proceso analítico en términos de “necesidad” (*Need*), considerando la necesidad actual de desarrollar métodos para ese determinado propósito, de “calidad” (*Quality*) empleando la WAC y la sostenibilidad (*Sustainability*) como concordancia con los Objetivos de Desarrollo Sostenible. El porcentaje de “calidad” se calcula empleando el algoritmo RGB 12 propuesto por Nowak y colaboradores, la “necesidad” se calcula dependiendo de las características del método respecto a la necesidad preestablecida representada en la pirámide de Koel [68], y la “sostenibilidad” se calcula como un porcentaje de concordancia con los 17 Objetivos de Desarrollo Sostenible.

Todas estas otras herramientas se centran en la evaluación del proceso analítico completo. Sin embargo, en 2023, Pino y colaboradores desarrollaron una herramienta llamada *Sample Preparation Metric of Sustainability* (SPMS) [69], que se centra en la etapa de preparación de muestra de forma similar a la herramienta AGREEprep. Esta se basa en la evaluación de nueve parámetros divididos en cuatro categorías: (a) información de la muestra (cantidad de la muestra), (b) información del extractante (cantidad, naturaleza y reusabilidad), (c) información sobre el procedimiento de preparación de muestra (número de etapas, tiempo de extracción, necesidad de etapas adicionales después de la

extracción y número de muestras por unidad de tiempo), en caso de que se puedan tratar varias muestras simultáneamente, se añade un marco a esta sección y (d) consumo de energía y residuos. Dependiendo del valor de cada parámetro, se obtiene una puntuación tanto para los parámetros individualmente como una puntuación total del método. Además, se obtiene un diagrama en forma de reloj donde cada parámetro (excepto la reusabilidad, el cual aparece en forma de estrella siempre y cuando se dé esa condición) se representa por un pequeño cuadrado coloreado (verde para exitoso, amarillo para aceptable, naranja para tolerable y rojo para inadecuado). Los cuadrados se agrupan en las cuatro categorías principales, representando la puntuación total del método tanto numéricamente (de 0 a 10) como en un código de colores (de rojo a verde) en un cuadrado situado en el centro del pictograma. En la **Figura 2.5** se muestra un ejemplo de pictograma de SPMS.

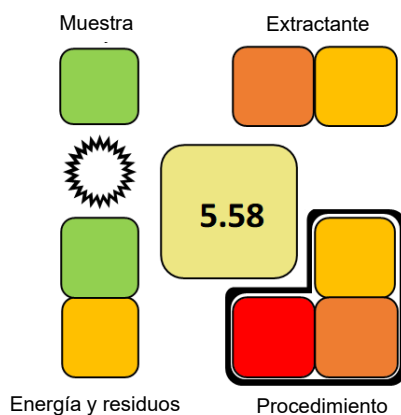


Figura 2.5. Representación a modo de ejemplo de un pictograma de SPMS.

2.1.7. Otras herramientas complementarias a las desarrolladas para la evaluación del impacto ambiental

Con la finalidad de poder determinar el grado de sostenibilidad de un método analítico se deben evaluar tres pilares fundamentales: eficiencia analítica, impacto ambiental y seguridad, y aspectos prácticos y económicos. Al igual que se ha hecho para el impacto ambiental y seguridad, también se han desarrollado herramientas métricas para evaluar tanto la eficiencia analítica como los aspectos prácticos y económicos.

En este sentido, para evaluar la practicidad de los métodos analíticos, en 2023 se desarrolló el *Blue Applicability Grade Index* (BAGI) [70]. Esta herramienta tiene en cuenta el tipo de análisis, el número de analitos, la técnica instrumental, el número de muestras tratadas simultáneamente, la escala de la etapa de preparación de muestra, la productividad, el tipo de materiales y reactivos, la

necesidad de realizar una etapa de preconcentración, el grado de automatización y la cantidad de la muestra. En la **Figura 2.6** se muestra a modo de ejemplo un pictograma de BAGI obtenido mediante el software desarrollado para llevar a cabo la evaluación. Como se puede observar, el pictograma presenta una forma de estrella dividida en 10 fragmentos, uno por cada criterio a evaluar, situando la puntuación final del método en el centro. Para cada criterio se obtiene una puntuación de entre 2.5 y 10, siendo 2.5 la peor (representada en color blanco) y 10 la mejor (representada en color azul oscuro), según su concordancia con la sostenibilidad. La puntuación final obtenida se calcula como el sumatorio de las puntuaciones individuales de los 10 criterios, siendo 100 la mejor puntuación posible y 25 la peor. Para que un método pueda ser considerado como práctico debe obtener al menos una puntuación de 60.

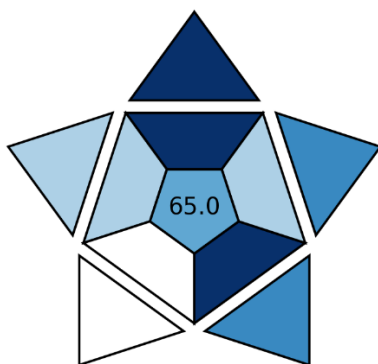


Figura 2.6. Representación a modo de ejemplo de un pictograma de BAGI.

Para evaluar la eficiencia analítica de los métodos, en 2025 se desarrolló el *Red Analytical Performance Index* (RAPI) [71], presentando varias similitudes con el BAGI. Los 10 criterios que evalúa esta herramienta métrica son: repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad, exactitud, coeficientes de recuperación relativa y efecto matriz, límites de cuantificación, intervalo de trabajo, estimación de la linealidad, robustez y selectividad. Al igual que en el BAGI, se obtiene un pictograma en forma de estrella donde la puntuación final del método se sitúa en el centro. Sin embargo, la puntuación individual de cada criterio varía entre 0 (peor, representado en blanco) y 10 (mejor, representado en rojo oscuro). La puntuación final se calcula como suma de las puntuaciones individuales de cada criterio, obteniendo un rango entre 0 (peor) y 100 (mejor).

Cabe mencionar que existen diferentes herramientas métricas descritas anteriormente (Hexagon-CALIFICAMET, RGB, RGBfast, RGB12 y NSQ) que evalúan la sostenibilidad en conjunto. En este sentido, dependiendo de qué se quiera evaluar se debe seleccionar la herramienta más adecuada para esa finalidad en concreto.

2.2. Evaluación de métodos analíticos mediante AGREEprep

Como se ha mencionado anteriormente, el objetivo de este capítulo es la evaluación y comparación del impacto ambiental de la etapa de tratamiento de muestra entre métodos que emplean técnicas de extracción convencionales y técnicas de microextracción. De este modo, teniendo en cuenta todas las ventajas e inconvenientes discutidas anteriormente de cada una de las herramientas métricas que evalúan el impacto ambiental de los métodos analíticos, se seleccionó la herramienta AGREEprep, ya que era la que más se ajustaba al objetivo principal. Esta herramienta se aplicó a diferentes técnicas de extracción que se emplean para realizar el tratamiento de muestra para la determinación de un grupo concreto de analitos. Se debe mencionar que, en algunos casos, especialmente cuando las muestras son sólidas, se requiere una etapa previa a la extracción. Sin embargo, esta etapa no se ha considerado en la herramienta AGREEprep para poder realizar una comparación justa del proceso de extracción. Además, pese a que AGREEprep permite cambiar los pesos de cada criterio, se mantuvieron los predeterminados para no sesgar los resultados. Asimismo, se establecieron diferentes reglas para asegurar una justa evaluación del impacto ambiental. Según describen los autores de AGREEprep, se deben considerar en la sección de residuos todos los materiales de un solo uso tales como puntas de pipeta, tubos de centrifuga o tubos cónicos, entre otros. Sin embargo, en los artículos publicados se suelen omitir detalles concretos tanto de la instrumentación de uso habitual (p. ej. agitador, centrifuga, etc.) como algunos procesos de laboratorio, por lo que es muy complicado realizar una valoración exacta. Por ello, se decidió considerar solamente el material de laboratorio donde se lleva a cabo la etapa de extracción (p. ej. cartuchos de SPE, microtubos de centrifuga, insertos de base plana, etc.). En la **Tabla 2.1** se muestra la masa en gramos considerada para cada material, con la finalidad de homogeneizar la evaluación de la generación de residuos.

Respecto a la productividad y el consumo de energía, no en todos los casos se especifica la marca o el modelo de la instrumentación utilizada. Debido a que el número de muestras que se pueden tratar simultáneamente y el consumo de energía dependen de los instrumentos concretos empleados en cada laboratorio, para homogeneizar esta información como en el caso del peso de los residuos, se consideraron instrumentos de referencia para todos los métodos. En la **Tabla 2.2** se muestra el consumo de energía y las posiciones simultáneas consideradas para cada tipo de instrumento.

En cuanto a la selección de los métodos a evaluar se consideraron cuatro de los campos de aplicación más importantes de la Química Analítica (fluidos biológicos, aguas medioambientales, productos de cuidado personal y alimentos) para incluir la mayor variedad posible de métodos analíticos.

Tabla 2.1. Masas consideradas para material desechable de uso general en el laboratorio.

Material	m (g)
Punta de pipeta 2-200 µL	0.3
Cartucho SPE 1 mL	1.6
Cartucho SPE 3 mL	2.5
Cartucho SPE 6 mL	4.0
Tubo de microcentrífuga 0.5 mL	0.5
Tubo de microcentrífuga 2 mL	0.9
Tubo 8 mL	4.0
Tubo de centrífuga 15 mL	6.6
Inserto de vidrio de base plana	0.8

Tabla 2.2. Número de posiciones y consumo de energía estimado considerados para la evaluación de la productividad y del consumo de energía.

Instrumentación ^a	Posiciones	Consumo de energía (W)
Agitador magnético	10	20
Vórtex	1	45
Colector SPE	12	160
Agitador vertical rotatorio	16	15
Centrífuga	6	440
Microcentrífuga	12	440
Agitador orbital termostatzado	24	42
Baño de ultrasonidos	12	330
Evaporador de nitrógeno	12	400
Baño de agua	20	960
Agitador orbital	12	250
Concentrador de vacío	48	350
Sistema de extracción acelerada por disolvente	1	500
Robot automatizado para SDME	1	40
Instrumento desorción térmica	1	650

^a SDME: microextracción en gota (*Single Drop Microextraction*); SPE: extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*).

Respecto a las matrices biológicas, se seleccionaron dos aplicaciones, la determinación de corticoides (**Tabla 2.3**) y de biomarcadores de estrés oxidativo (8-hidroxi-2'-deoxiguanosina y 8-hidroxi-2'-deoxiadenosina) (**Tabla 2.4**). Ambos grupos de analitos proporcionan información valiosa sobre diferentes procesos biológicos, de modo que su determinación es importante para el diagnóstico de diversas patologías. Por un lado, los corticoides están relacionados con el síndrome de Cushing, el estrés y la diabetes mellitus [72–74], entre otras enfermedades. Por otro lado, los biomarcadores de estrés oxidativo están relacionados con algunos tipos de cáncer, fallo cardíaco o diabetes [75], entre otras patologías.

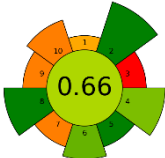
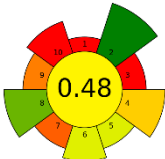
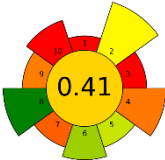
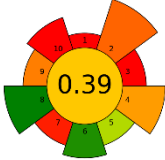
Respecto a las aguas medioambientales, se seleccionaron los filtros UV (**Tabla 2.5**) y los parabenos (**Tabla 2.6**) debido a que son contaminantes emergentes que se emplean en una gran variedad de productos de uso diario. Los filtros UV se añaden a productos cosméticos para proteger la piel de la radiación solar. Por ello, estos compuestos pueden propagarse al medio ambiente mediante fuentes directas o indirectas y alterar la fauna y la flora [76]. Dado que los filtros UV lipofílicos son los más empleados, solo se seleccionaron métodos en los que se lleva a cabo la determinación de varios de ellos. Los parabenos se utilizan como conservantes y bactericidas en un amplio rango de productos. Al igual que los filtros UV, pueden propagarse al medio ambiente, acumulándose en los sistemas acuáticos, por lo que es recomendable su monitorización ya que presentan efectos dañinos [77].

En relación con los productos de cuidado personal (**Tabla 2.7**), algunos compuestos están prohibidos o su concentración máxima está restringida para asegurar la seguridad de los consumidores. Por ello, su determinación en el producto final así como durante el proceso de fabricación es de vital importancia [78]. De entre todos, se seleccionaron los alérgenos como modelo.

En el campo de los alimentos (**Tabla 2.8**), la acrilamida se ha convertido en un compuesto ampliamente estudiado debido a sus características mutagénicas, neurotóxicas y carcinogénicas [79]. Debido a su elevada toxicidad es importante controlar su concentración en los alimentos para evitar problemas de salud.

Para cada grupo de analitos se compararon, generalmente, dos técnicas de extracción convencionales con tres técnicas de microextracción. La selección de los métodos se realizó en base a los analitos determinados, ya sea para cubrir el mayor número posible o debido al elevado interés en la determinación de los analitos. Para cada uno de los grupos se trató de incluir la mayor variedad de técnicas. En algunos casos las técnicas se repiten dentro del mismo grupo de analitos, pero los métodos presentan características distintas obteniendo puntuaciones diferentes en AGREEprep, siendo su comparación muy interesante.

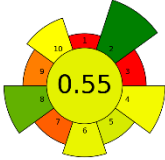
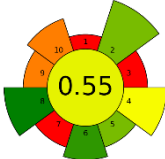
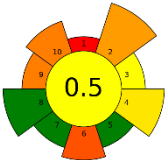
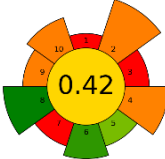
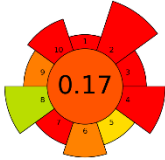
Tabla 2.3. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos seleccionados para la determinación de corticoides en fluidos biológicos.

Analito(s)	Matriz	Técnica de extracción ^{a,b}	Puntuación	Ref.
Corticoides	Orina y suero	M-PTME		[80]
	Saliva	mSBSDME		[81]
	Orina	LLE		[82]
	Saliva	DLLME		[83]
	Orina y plasma	SPE		[84]

^a En negrita se resaltan las técnicas de microextracción

^b DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*); LLE: extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*); M-PTME: microextracción en punta de pipeta magnética (*Magnetic Pipette Tip Microextraction*); mSBSDME: microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*); SPE: extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*).

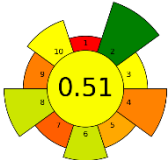
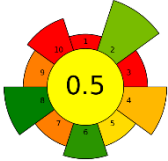
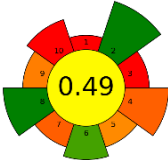
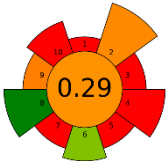
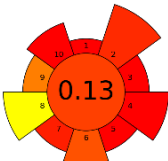
Tabla 2.4. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos seleccionados para la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en fluidos biológicos.

Analito(s)	Matriz	Técnica de extracción ^{a,b}	Puntuación	Ref.
Biomarcadores de estrés oxidativo	Saliva y orina	SPME		[85]
	Saliva	DSPE		[86]
	Orina	IT-SPME		[87]
	Orina	SPE		[88]
	Orina	SPE		[89]

^a En negrita se resaltan las técnicas de microextracción

^b DSPE: extracción en fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid- Phase Extraction*); IT-SPME: microextracción en fase sólida en tubo (*In-Tube Solid-Phase Microextraction*); SPE: extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*); SPME: microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*).

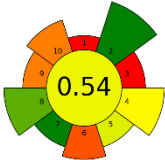
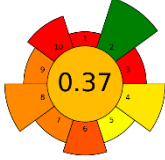
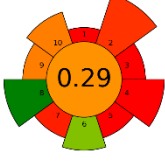
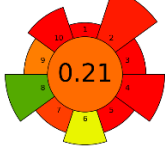
Tabla 2.5. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos seleccionados para la determinación de filtros UV lipofílicos en aguas medioambientales.

Analito(s)	Matriz	Técnica de extracción ^{a,b}	Puntuación	Ref.
Filtros UV lipofílicos	Aguas medioambientales	SPME		[90]
		DLLME		[91]
		SBDLME		[92]
		SPE		[93]
		SPE		[94]

^a En negrita se resaltan las técnicas de microextracción

^b DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*); SBDLME: microextracción líquida dispersiva sobre barra agitadora (*Stir Bar Dispersive Liquid Microextraction*); SPE: extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*); SPME: microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*).

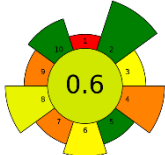
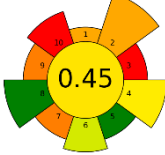
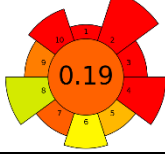
Tabla 2.6. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos seleccionados para la determinación de parabenos en aguas medioambientales.

Analito(s)	Matriz	Técnica de extracción ^{a,b}	Puntuación	Ref.
Parabenos	Aguas medioambientales	SDME		[95]
		HF-SPME		[96]
		SDME		[97]
		SPE		[98]
		SPE		[99]

^a En negrita se resaltan las técnicas de microextracción

^b HF-SPME: microextracción en fase sólida con fibra hueca (*Hollow-Fiber Solid-Phase Microextraction*); SDME: microextracción en gota (*Single Drop Microextraction*); SPE: extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*).

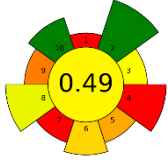
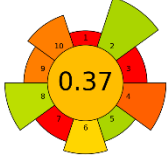
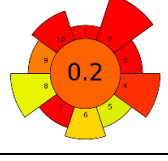
Tabla 2.7. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos seleccionados para la determinación de alérgenos en productos de cuidado personal.

Analito(s)	Matriz	Técnica de extracción ^{a,b}	Puntuación	Ref.
Alérgenos	Productos de cuidado personal	HS-SPME		[100]
		SBSDME		[101]
		LLE		[102]
		MSPD		[103]
		PLE		[104]

^a En negrita se resaltan las técnicas de microextracción

^b HS-SPME: microextracción en fase sólida en espacio de cabeza (*Headspace Solid-Phase Microextraction*); LLE: extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*); MSPD: dispersión de matriz en fase sólida (*Matrix Solid-Phase Dispersion*); PLE: extracción líquida presurizada (*Pressurized Liquid Extraction*); SBSDMI: microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (*Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*).

Tabla 2.8. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos seleccionados para la determinación de acrilamida en alimentos.

Analito(s)	Matriz	Técnica de extracción ^{a,b}	Puntuación	Ref.
Acrilamida	Alimentos	SDME		[105]
		DLLME		[106]
		SPME		[107]
		LLE		[108]
		SPE		[109]

^a En negrita se resaltan las técnicas de microextracción

^b DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*); LLE: extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*); SDME: microextracción en gota (*Single Drop Microextraction*); SPE: extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*); SPME: microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*).

2.3. Discusión

En las **Tablas 2.3-2.8** se puede observar que, como tendencia general, se obtienen metodologías con un menor impacto ambiental en la etapa de tratamiento de muestra cuando se emplean técnicas de microextracción en comparación con las técnicas de extracción convencionales. Las puntuaciones obtenidas para las técnicas de extracción clásicas se encuentran en un rango de entre 0.13 y 0.48, con un valor medio de 0.31, mientras que para las técnicas de microextracción se obtienen puntuaciones superiores, de entre 0.37 y 0.66 con un valor medio de 0.54. De este modo, se evidencian los beneficios de las técnicas de microextracción en términos de impacto ambiental. A continuación se ha realizado una discusión más detallada, considerando dos subsecciones principales: por un lado, los aspectos relacionados con la escala de la extracción, esto es, los disolventes empleados (criterio 2), la cantidad de residuos generados (criterio 4) y el volumen de muestra (criterio 5) y por otro lado, los relacionados con la operatividad y la productividad, como muestras tratadas por unidad de tiempo (criterio 6), automatización e integración de etapas (criterio 7) y consumo de energía (criterio 8).

2.3.1. Reactivos, residuos y cantidad de muestra

Como resultado de los elevados esfuerzos en el campo de la Química Analítica en reducir los volúmenes de disolventes, residuos y, más recientemente, muestras, es de gran interés realizar una comparación en términos de impacto ambiental entre las técnicas de extracción convencionales y las técnicas de microextracción.

La evolución de las técnicas tradicionales de extracción hacia las técnicas de microextracción implica indudablemente una reducción de la fase aceptora, es decir, del disolvente o del sorbente empleado para llevar a cabo la extracción de los analitos. En el caso de las técnicas convencionales basadas en disolventes se emplean volúmenes de mililitros. Por ejemplo, se emplearon 2 mL de éter metil tert-butílico para la determinación de corticoides en orina [82], mientras que se utilizaron 5 mL del mismo disolvente para la determinación de alérgenos en productos de cuidado personal [102]. Sin embargo, la SDME se empleó para la determinación de parabenos en aguas requiriendo solo de 3 μL de acetato de hexilo [97], así como para la determinación de acrilamida en alimentos empleando 1 μL de octanol [105], entre otros, presentando un impacto positivo en el criterio 2. Además, la DLLME se empleó para la determinación de corticoides en saliva requiriendo 0.09 g de un líquido iónico y 150 μL de metanol como dispersante [83], y para la determinación de filtros UV en aguas medioambientales utilizando 50 μL de cloroformo y 250 μL de acetona como disolvente dispersante [91], así como para la determinación de acrilamida en

alimentos empleando 100 μL de diclorometano y 400 μL de acetonitrilo como disolvente dispersante [106]. La disminución en el volumen de disolventes orgánicos está directamente relacionada con una reducción a la exposición de sustancias tóxicas, así como una menor generación de residuos, obteniendo mejores puntuaciones en los criterios 2 y 4, respectivamente, comparado con LLE.

Respecto a la extracción basada en sorbentes, el formato en el que se encuentra el sorbente empleado como fase de extracción afecta directamente a la cantidad de residuos generados. En este sentido, en SPE se emplean comúnmente cartuchos de extracción de entre 1 y 6 mL, generando entre 1.6 y 4 g de residuos en caso de no reutilizarlos. Esta técnica se ha utilizado para una gran cantidad de aplicaciones como la determinación de corticoides en orina y plasma [84], biomarcadores de estrés oxidativo en orina [88,89], filtros UV [93,94] y parabenos [98,99] en aguas medioambientales, y acrilamida en alimentos [109], obteniendo puntuaciones iguales o inferiores a 0.42, con un promedio de 0.26. Sin embargo, cuando se emplean técnicas de microextracción basadas en sorbentes, en términos generales, se utiliza una menor cantidad de fase de extracción, disminuyendo la cantidad de residuos. Por ejemplo, en microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, mSBSDE) para la determinación de corticoides en saliva se requirió solamente 0.5 mg de sorbente [81], y en DSPE para la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo 9 mg de sorbente [86], entre otras. Además, en algunas técnicas como SPME la fase de extracción se reutiliza varias veces. En este sentido, se consiguen mejoras notables en el criterio 4 y, en caso de emplear materiales reutilizables, en el criterio 3.

La miniaturización de las técnicas basadas en sorbentes también implica una reducción del tamaño del dispositivo de extracción, disminuyendo la cantidad de disolventes empleados en las etapas de acondicionamiento, lavado y/o elución. En los métodos en los que se emplea la SPE, se requieren comúnmente volúmenes del orden de mililitros mientras que en las técnicas de microextracción se emplean volúmenes de pocos microlitros. Sin embargo, cabe mencionar que existe una gran diversidad en los volúmenes empleados en SPE. Por ejemplo, para la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo, Cervinkova et al. [88] emplearon 1.8 mL de disolvente orgánico, mientras Shigenaga et al. [89] emplearon 20 veces más volumen, afectando significativamente a la puntuación final obtenida (0.42 frente a 0.17, respectivamente). El mismo comportamiento se observa para la determinación de filtros UV, ya que Díaz-Cruz et al. [94] utilizaron 4 veces más volumen de disolvente orgánico que Cuderman y Heath [93] (0.13 frente a 0.29, respectivamente). Por consiguiente, a pesar de que las técnicas de extracción convencionales requieren de volúmenes más elevados de disolventes orgánicos, se debe realizar un esfuerzo para reducirlos al máximo. A diferencia de las técnicas de extracción convencionales, algunas técnicas de

microextracción como la SPME o la SBSDE se pueden acoplar directamente a un equipo de desorción térmica como etapa previa a la cromatografía de gases, reduciendo más todavía el consumo de disolventes, o incluso desarrollando métodos que no requieran el empleo de disolventes. Como se ha mencionado anteriormente, la reducción del uso de disolventes está directamente relacionada en una disminución en los residuos generados, así como una menor exposición a sustancias tóxicas, obteniendo mejores puntuaciones en los criterios 2 y 4.

Se ha observado también una tendencia a disminuir o eliminar los disolventes con mayor impacto ambiental [110], lo que afecta directamente al criterio 10. Mientras que en algunos procedimientos de SPE se emplean más de 20 mL de disolventes tóxicos como metanol, en las técnicas de microextracción se tiende a evitar su uso o reducirlo a valores del orden de decenas de microlitros. Además, la sustitución de disolventes orgánicos convencionales (especialmente los clorados) por disolventes más ecológicos es uno de los focos de atención en el campo de la microextracción [111,112]. De esta forma, se obtienen mejores puntuaciones en los criterios 2 y 10 cuando se emplean técnicas de microextracción conjuntamente con disolventes de bajo impacto ambiental.

Adicionalmente, en los últimos años se ha realizado un esfuerzo en reducir el volumen de muestra, sobre todo en campos como el bioanálisis, donde este es limitado y en ocasiones solo se dispone de unos pocos microlitros. En este sentido, la microextracción en punta de pipeta magnética (*Magnetic Pipette Tip Microextraction*, M-PTME) se empleó para determinar corticoides requiriendo solo 10 μ L de orina o suero [80], la SBSDE se aplicó para la determinación de corticoides en 175 μ L de saliva [81] y la microextracción en fase sólida en tubo (*In-Tube Solid-Phase Microextraction*, IT-SPME) se utilizó para determinar biomarcadores de estrés oxidativo en 100 μ L de orina [87], entre otras. Por el contrario, cuando se emplean técnicas convencionales de extracción, estas requieren volúmenes de entre 0.5 y 5 mL para realizar el análisis de fluidos biológicos. En otras matrices esta tendencia es menos acusada debido a su menor limitación. Así, se ha observado una disminución del volumen de muestra empleado en los análisis de aguas medioambientales cuando se emplea microextracción (varios mL) con respecto a cuando se emplean técnicas convencionales (cientos de mL). En los productos de cuidado personal, pese a que existe una disminución cuando se emplean técnicas de microextracción, esta no es tan acusada. En resumen, el empleo de técnicas de microextracción conlleva generalmente una reducción de la cantidad de muestra, lo que también implica una reducción en los residuos y comúnmente un menor uso de sorbentes y disolventes, obteniendo mejores puntuaciones en los criterios 2, 4 y 5.

2.3.2. Productividad, integración de etapas y automatización

Los laboratorios analíticos de rutina requieren metodologías con una elevada productividad, con la finalidad de poder realizar el análisis de un gran número de muestras diariamente. Por ello, el empleo de metodologías en las que se pueda llevar a cabo el tratamiento de numerosas muestras en paralelo es de gran utilidad. En este sentido, las técnicas de microextracción presentan una ligera ventaja sobre las técnicas convencionales, ya que la miniaturización de los dispositivos de extracción implica un menor espacio físico, permitiendo tratar un mayor número de muestras en un mismo espacio. Sin embargo, la diferencia en este aspecto no es tan notoria debido a que las técnicas convencionales emplean dispositivos de vacío en el caso de la SPE o, agitadores o baños de ultrasonidos en el caso de la LLE, pudiéndose tratar varias muestras en paralelo. En algunos casos en concreto, como la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo, uno de los métodos basados en SPE [88] presenta la misma productividad que el basado en DSPE [86], siendo 20 veces superior que para IT-SPME [87]. Sin embargo, de forma general, la tendencia es similar a la que se observa para la determinación de acrilamida en alimentos, donde la productividad de la SDME es 10 veces superior a la de la LLE o la SPE. Por ello, se obtienen mejores puntuaciones para las técnicas de microextracción en el criterio 6 y, como una elevada productividad está directamente relacionada con un menor consumo de energía por muestra, también se obtienen mejores puntuaciones en el criterio 8. Adicionalmente, la reducción del espacio físico de los dispositivos de extracción permite su portabilidad al lugar de toma de muestra (criterio 1), aunque, dependiendo del sistema, se puede requerir el empleo de una fuente de alimentación externa.

Respecto al número de etapas, se puede observar una clara diferencia entre las técnicas convencionales y las de microextracción. Mientras que en técnicas como la SPE se requieren por lo general 5 etapas o más, las técnicas de microextracción suelen constar de entre 1 y 4 etapas, por lo que se obtienen mejores puntuaciones en el criterio 7. A modo de ejemplo, para la determinación de filtros UV en aguas medioambientales, se requieren 2 o 3 etapas empleando técnicas de microextracción (SPME, DLLME y SBDLME), mientras que se necesitan 5 o 6 cuando se utiliza SPE. De este modo, la reducción en el número de etapas está directamente relacionada con una reducción en el tiempo total de análisis, aumentando la productividad. Además, es importante evitar etapas que presenten un elevado consumo de tiempo como la evaporación y la reconstitución de los extractos, sobre todo cuando se emplean volúmenes superiores a 1 mL como en el caso de la SPE y la LLE, lo que conlleva a un elevado consumo de tiempo.

En cuanto a la automatización se refiere, debido a la complejidad de la etapa de preparación de muestra y el elevado coste generalmente asociado a las estaciones de trabajo robóticas, es difícil automatizar el procedimiento completo.

Por consiguiente, en la mayoría de los métodos se requiere la intervención del operador. Solo en la determinación de parabenos en aguas medioambientales empleando SDME [95] y la determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en orina utilizando IT-SPME [87] son métodos totalmente automatizados, obteniendo mejores puntuaciones en el criterio 7, pero una baja productividad debido a que no se pueden tratar varias muestras de forma simultánea. Para poder conseguir métodos totalmente automatizados y que sean capaces de realizar el tratamiento de un elevado número de muestras por unidad de tiempo se requiere de una mayor inversión en el desarrollo de equipamiento que pueda hacer frente a los equipos automáticos comerciales, los cuales un gran número de laboratorios no pueden permitirse económicamente, como se ha discutido ampliamente en el **Capítulo 1**.

2.3.3. Principales aspectos de mejora para el desarrollo de métodos con un menor impacto ambiental

De acuerdo con los pictogramas de AGREEprep que se muestran en las **Tablas 2.3-2.8**, tanto para las técnicas convencionales como para las de microextracción, existen principalmente tres criterios que generalmente reducen la puntuación final del método. Estos son: lugar de preparación de muestra (criterio 1), reusabilidad de los materiales (criterio 3) e instrumentación analítica empleada (criterio 9). La mejora en estos tres aspectos es la tarea más difícil para obtener un método analítico con el menor impacto ambiental posible.

En cuanto al lugar de preparación de muestra, no siempre es posible realizar el tratamiento de esta en el lugar de su toma. Esto se debe a la instrumentación requerida durante el procedimiento. Sin embargo, aprovechando el menor espacio requerido en las técnicas de microextracción sería conveniente el desarrollo de equipamiento miniaturizado y portátil que permitiera realizar el tratamiento de muestra *in situ*. Además, en caso de disponer de instrumentación analítica portátil, el análisis completo se puede llevar a cabo donde se encuentra la muestra.

Respecto al criterio 3, no se ha prestado toda la atención requerida a la reusabilidad de los materiales, priorizando el beneficio para el operador, buscando un fácil manejo. Por consiguiente, el empleo de materiales de plástico no biodegradable y de un solo uso, así como las fases de extracción, aumentan la cantidad total de residuos generados.

El empleo de técnicas cromatográficas acopladas a detectores de espectrometría de masas, entre otros detectores, es a veces inevitable debido a la sensibilidad y selectividad requeridas. Sin embargo, se recomienda optimizar los métodos de forma que su duración sea lo más corta posible, disminuyendo el consumo de energía y por tanto el impacto ambiental.

Asimismo, se pueden emplear algunas técnicas con menor impacto como la electroforesis capilar o técnicas electroquímicas, siempre y cuando sean una alternativa viable. Por otra parte, el empleo de instrumentación compleja compromete indudablemente la portabilidad del método completo.

2.4. Conclusión

La evolución de las técnicas convencionales hacia las técnicas de microextracción ha proporcionado numerosas ventajas en términos de impacto ambiental como consecuencia de la reducción del tamaño, tal y como se ha demostrado empleando la herramienta métrica AGREEprep. La miniaturización de los métodos analíticos permite emplear una menor cantidad de fase extractante durante el proceso de preparación de muestra, generando una menor cantidad de residuos. Además, se ha observado una disminución en el uso de reactivos peligrosos, así como elevados esfuerzos para reemplazarlos por alternativas de menor impacto ambiental, incrementando la seguridad del operador.

A lo largo de las décadas se ha seguido la tendencia de reducir el tamaño requerido de muestra, especialmente en el campo del bioanálisis, donde en ocasiones la cantidad de muestra es limitada. También cabe resaltar que la reducción del número de etapas necesarias en las técnicas de microextracción ha conllevado un aumento en la productividad, un menor consumo de energía por muestra y una mayor integración de las etapas, obteniéndose métodos más simples y rápidos. Respecto a la automatización, se han obtenido valores bajos de productividad debido a la complejidad de la etapa de tratamiento de muestra. Además, el elevado coste de los instrumentos conlleva que estos no sean asequibles para una gran cantidad de laboratorios, por lo que es crucial realizar más esfuerzos en este aspecto.

Pese a que la implementación de las técnicas de microextracción ha permitido realizar grandes avances, se debe seguir investigando en este campo para desarrollar técnicas y métodos que presenten una mayor concordancia con los principios de la GSP. De este modo, el objetivo final debería ser obtener la mayor puntuación posible en herramientas que miden el impacto ambiental (p. ej. AGREEprep) sin comprometer el rendimiento analítico. En particular, como se ha demostrado empleando la herramienta AGREEprep, se debe prestar más atención a los criterios que presentan una mayor controversia. Estos son la portabilidad de la etapa de preparación de muestra, la reutilización de los materiales y el análisis instrumental, teniendo en cuenta que este último no siempre depende directamente de la técnica de extracción sino de la aplicación. Además, se necesita más conciencia de la comunidad científica respecto al uso

Capítulo 2

de técnicas miniaturizadas, no solo en el campo de la investigación donde se implementan asiduamente, sino también en laboratorios de análisis rutinarios.

En este capítulo se ha demostrado que el uso de herramientas métricas es muy útil para evaluar el impacto ambiental de un método analítico, de forma que los investigadores pueden comprobar si sus métodos cumplen con los principios en los que se basa la herramienta utilizada. En esta comparación en concreto se ha empleado AGREEprep debido a su potencial para evaluar la etapa de preparación de muestra. Cabe resaltar que para llevar a cabo una comparación justa entre métodos publicados se necesita llegar a un consenso en algunos aspectos. Esto se debe a que mucha información, como por ejemplo el material de laboratorio o instrumentos empleados, no está disponible en los artículos publicados o difiere de unos laboratorios a otros. Por ello, en este capítulo se han incluido algunos valores de referencia para que se puedan emplear de forma general, con la finalidad de llevar a cabo una justa comparación entre métodos.

Sección 2

Parte experimental, resultados y discusión

Capítulo 3

Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en saliva mediante extracción en fase sólida dispersiva asistida por disolvente

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo:

G. Peris-Pastor, S. Alonso-Rodríguez, J.L. Benedé, A. Chisvert, High-throughput determination of oxidative stress biomarkers in saliva by solvent-assisted dispersive solid-phase extraction for clinical analysis, *Adv. Sample Prep.* 6 (2023) 100067



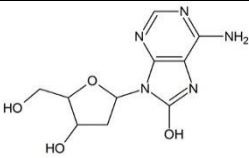
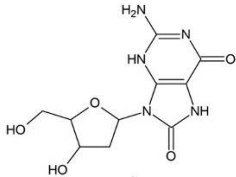
Resumen

En este capítulo se presenta un método analítico que se ha desarrollado para la determinación simultánea de dos biomarcadores de estrés oxidativo (8-hidroxi-2'-deoxiadenosina (8OHdA) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG)) en saliva. Estos biomarcadores se producen debido al daño oxidativo del ADN y han ganado protagonismo en el campo de la medicina como herramientas para el diagnóstico precoz y control de enfermedades. El método se basa en la extracción en fase sólida dispersiva asistida por disolvente (*Solvent-Assisted Dispersive Solid-Phase Extraction*, SA-DSPE) como etapa de limpieza de muestra, seguida de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Como fase extractante se ha empleado un polímero comercial de balance hidrofílico-lipofílico (*Hydrophilic-Lipophilic Balance*, HLB) que permite la extracción de compuestos polares como los analitos de matrices polares como la saliva. Para obtener la mayor sensibilidad posible, se han optimizado las variables implicadas en el proceso de extracción mediante un diseño de Box-Behnken, mientras que las variables implicadas en la etapa de desorción se han optimizado mediante un diseño de Doehlert, a excepción del disolvente de desorción que se ha optimizado empleando un diseño de Simplex-Centroid. El método se ha validado obteniendo una linealidad de hasta al menos 20 ng mL^{-1} , límites de detección y cuantificación en el rango bajo de los ng mL^{-1} y valores de precisión inferiores al 15 %. Se ha empleado un calibrado de adición de patrón para corregir el efecto matriz observado. Finalmente, se ha aplicado el método desarrollado a muestras de saliva de nueve voluntarios, tres de los cuales padecen diabetes tipo II, obteniendo notables diferencias de concentraciones entre estos y los voluntarios sanos. Además, la metodología propuesta soluciona algunos inconvenientes presentes en el único trabajo previo donde se determinan estos biomarcadores en saliva, disminuyendo el consumo de tiempo, así como el uso de disolventes orgánicos. Para poder tratar un mayor número de muestras de forma simultánea y así reducir el tiempo de análisis se ha empleado un agitador orbital termostatzado multiposición que permite tratar 4 muestras simultáneamente.

3.1. Introducción

El estrés oxidativo se produce como resultado de un desequilibrio en el balance oxidante-antioxidante del organismo cuando las defensas celulares antioxidantes no desactivan completamente las especies reactivas de oxígeno (ROS) [113]. Este daño oxidativo representa un mecanismo patológico común para el riesgo de desarrollo de aterosclerosis [114,115], determinados tipos de cáncer [116,117], insuficiencia cardíaca [114,118] o diabetes [114,119], entre otras patologías. El estrés oxidativo induce la oxidación de diversas biomoléculas, incluyendo el ADN o ARN, formando nucleótidos oxidados que son posteriormente excretados mediante diferentes fluidos biológicos. Por ello, la determinación en fluidos biológicos de estos productos de estrés oxidativo, los cuales se consideran potenciales biomarcadores de enfermedades, ha ganado importancia en el campo de la medicina como herramienta para el diagnóstico precoz y control de dichas enfermedades. La 8-hidroxi-2'-deoxiadenosina (8OHdA) y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG), formadas por el daño oxidativo del ADN, han sido asociados con la diabetes y diferentes tipos de cáncer [75,120,121]. Además, se ha demostrado que sus niveles incrementan significativamente en pacientes con alguna enfermedad en comparación con las personas sanas [122]. La estructura molecular y algunas propiedades relevantes de estos compuestos se pueden observar en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Estructura molecular y propiedades relevantes de los compuestos objeto de estudio.

Analito	Estructura molecular	logP _{ow} ^a	M _w (g mol ⁻¹) ^b
8OHdA		0.3	267.2
8OHdG		-1.1	283.2

^a P_{ow}: Coeficiente de partición octanol-agua

^b M_w: Masa molecular

En el campo del bioanálisis es muy interesante disponer de métodos analíticos para la determinación de biomarcadores en muestras que requieran una toma

no invasiva e indolora, tal como la orina o la saliva. Esta última se ha convertido en una herramienta con un gran potencial y muy prometedora en los últimos años, ya que los niveles de biomarcadores están altamente correlacionados con los niveles en sangre, presentando ventajas adicionales en términos de facilidad de obtención, manejo y conservación [123,124].

Las concentraciones de los biomarcadores en estos fluidos biológicos suelen estar en el rango de los bajos ng mL^{-1} , por lo que se requieren métodos analíticos sensibles para llevar a cabo su determinación. En este sentido, se han empleado diferentes técnicas analíticas para la determinación de 8OHdA y 8OHdG en muestras biológicas, como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (*Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS) con derivatización previa [125] y la cromatografía de líquidos con detección electroquímica (*Liquid Chromatography-Electrochemical Detection*, LC-ECD) [89,126,127] o detección mediante LC-MS/MS [75,87,128]. También se han empleado técnicas no cromatográficas como los ensayos por inmunoadsorción ligados a enzimas (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assays*, ELISA) [129]. Sin embargo, estos últimos presentan ciertas desventajas como largos tiempos de análisis debido al elevado tiempo de incubación necesario, los kits comerciales son relativamente caros, y pueden darse reacciones cruzadas entre el anticuerpo y otras moléculas que tienen estructuras similares a los compuestos de interés.

Adicionalmente, la etapa de preparación de muestra es normalmente esencial para eliminar compuestos interferentes presentes en la matriz. En este contexto, la determinación de 8OHdA, y principalmente de 8OHdG, en fluidos biológicos, se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*, SPE) [88,127,130–132]. Sin embargo, el empleo de técnicas de microextracción en bioanálisis ha aumentado recientemente [133] debido a sus ventajas sobre las técnicas convencionales, tales como el menor consumo de disolventes y cantidad de muestra, menor generación de residuos y procedimientos más rápidos. De este modo, se han publicado diferentes trabajos en los cuales se emplean técnicas de microextracción para la determinación de 8OHdG y/o 8OHdA en orina [85,134–137]. Hasta la realización del presente estudio, solo existía un precedente en el cual se empleaba una técnica de microextracción (microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME)) para llevar a cabo la extracción de estos dos biomarcadores en saliva, requiriendo un elevado tiempo en esta etapa (60 min) [85].

Por otro lado, respecto a las fases de extracción, se han empleado diferentes materiales como C_{18} [138], C_{18}/OH [127] o derivados del óxido de grafeno [134]. Sin embargo, los más ampliamente utilizados han sido los polímeros de tipo HLB [88,131,132,139–141]. Estos polímeros proporcionan una combinación óptima de monómeros polares y apolares, consiguiendo una buena retención de los

analitos. Además, se suelen emplear monómeros aromáticos como por ejemplo divinilbenceno (DVB), lo que permite aumentar la eficacia de extracción de compuestos con anillos aromáticos, como la 8OHdA y la 8OHdG, debido a las interacciones tipo π - π entre el material y estos compuestos.

El objetivo de este capítulo es desarrollar una metodología que emplee SA-DSPE [142] como etapa de limpieza de muestra previa al análisis mediante LC-MS/MS para la determinación de 8OHdA y 8OHdG en muestras de saliva. En esta metodología se pretende dispersar el sorbente previamente en un pequeño volumen de disolvente y no añadirlo directamente a la muestra como se hace en la DSPE convencional. Con este propósito, con la ayuda de una jeringa, la dispersión se inyectará en la fase dadora para causar una dispersión del sorbente más eficiente [143]. Se pretende emplear como sorbente un polímero comercial de tipo HLB (StrataTM-X-RP) debido a su capacidad para interaccionar con los analitos. Las variables que afectan a las etapas de extracción y desorción se optimizarán mediante una metodología de superficie de respuesta (*Response Surface Methodology*, RSM) para poder obtener la mayor sensibilidad posible.

3.2. Experimental

3.2.1. Reactivos

Se emplearon 8-hidroxi-2'-deoxiadenosina ≥ 99 % de Cayman Chemical Company (Michigan, EE. UU.) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina ≥ 98 % de Biosynth Carbosynth (Berkshire, Reino Unido) como patrones.

Como fase extractante se empleó StrataTM-X-RP obtenido de cartuchos de SPE (500 mg/6 mL) de Phenomenex (Torrance, EE. UU.).

Como disolventes se emplearon N,N-dimetilformamida de Scharlab (Barcelona, España), acetonitrilo (ACN) grado LC-MS de VWR (Fontenay-sous-Bois, Francia) y agua ultrapura (resistividad ≥ 18.2 M Ω cm) obtenida a través de un sistema de purificación de agua Adrona (Riga, Letonia). Para la preparación de la fase móvil se utilizó metanol (MeOH) grado LC-MS de Honeywell (Seelze, Alemania), agua grado LC-MS de Panreac (Barcelona, España) y fluoruro de amonio (NH₄F) de Acros Organics (Geel, Bélgica).

Para la preparación de saliva sintética se adquirieron cloruro de sodio (NaCl) de Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio (CaCl₂·H₂O), tiocianato de potasio (KSCN) y dihidrógeno fosfato de sodio (NaH₂PO₄·H₂O) de Panreac, sulfuro de sodio (Na₂S) de Scharlab y urea de VWR Chemicals.

Capítulo 3

Se empleó nitrógeno como gas de nebulización en la fuente MS/MS obtenido mediante un generador NiGen LC-MS 40-1 de Claind S.r.l. (Lenno, Italia), y nitrógeno extrapuro (> 99.999 %) en la celda de colisión del MS/MS de Praxair (Madrid, España).

3.2.2. Instrumentación

Se emplearon una centrífuga EBA 21 de Hettich (Tuttlingen, Alemania) y un agitador orbital termostatzado multiposición modelo TS-100 de Thermo-Shaker Biosan (Riga, Letonia).

Para la medida del potencial zeta, con la finalidad de determinar el punto de carga cero del sorbente, se empleó un equipo Malvern Zetasizer ZS (Malvern, Reino Unido).

Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos Agilent Technologies 1100 Series equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un horno con una columna Zorbax SB-C₁₈ (50 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.8 µm de tamaño de partícula), acoplado a un detector Agilent 6410B Triple Quad MS/MS.

3.2.3. Toma de muestra y pretratamiento

Se analizaron muestras de saliva de nueve voluntarios, tres de ellos con diabetes de tipo II. Cada voluntario dio su consentimiento por escrito para la participación en este estudio, siguiendo las directrices éticas de la Declaración de Helsinki y siendo aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad de Valencia.

Para la toma de cada una de las muestras se empleó el salivado pasivo, centrifugando a 6000 rpm durante 5 min para separar la saliva de posibles restos de comida o flema, y guardando el sobrenadante a -20 °C. Previamente al análisis, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y centrifugaron a 18000 rpm durante 5 min para eliminar las mucinas y reducir así la viscosidad.

3.2.4. Preparación de saliva sintética

Para la validación del método, se preparó saliva sintética de acuerdo a un protocolo adaptado [144]. De este modo, se preparó una disolución de agua ultrapura conteniendo NaCl (400 mg L⁻¹), KCl (400 mg L⁻¹), CaCl₂·H₂O (795 mg L⁻¹), NaH₂PO₄·H₂O (690 mg L⁻¹), KSCN (300 mg L⁻¹), Na₂S (5 mg L⁻¹) y urea (1000 mg L⁻¹).

3.2.5. Preparación del calibrado por adición de patrón

Se prepararon disoluciones patrón independientes de 8OHdA y 8OHdG en N,N-dimetilformamida a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A continuación, una alícuota de cada disolución se diluyó en agua ultrapura para obtener una disolución multicomponente con una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada analito. Estas disoluciones se conservaron a -20°C . En cada sesión de trabajo se diluyó una alícuota de la disolución multicomponente en agua ultrapura para obtener una disolución patrón de 100 ng mL^{-1} de cada analito.

El calibrado de adición de patrón se preparó añadiendo diferentes volúmenes (10 a $50 \mu\text{L}$) de la disolución patrón multicomponente de 100 ng mL^{-1} a diferentes microtubos de centrifuga con 0.5 mL de saliva obtenida como se ha indicado en la **Sección 3.2.3** y añadiendo agua ultrapura hasta completar 1 mL , obteniendo un rango de concentraciones de entre 1 y 5 ng mL^{-1} . En la **Figura 3.1** se muestra un esquema del pretratamiento de la muestra y la preparación del calibrado por adición de patrón.

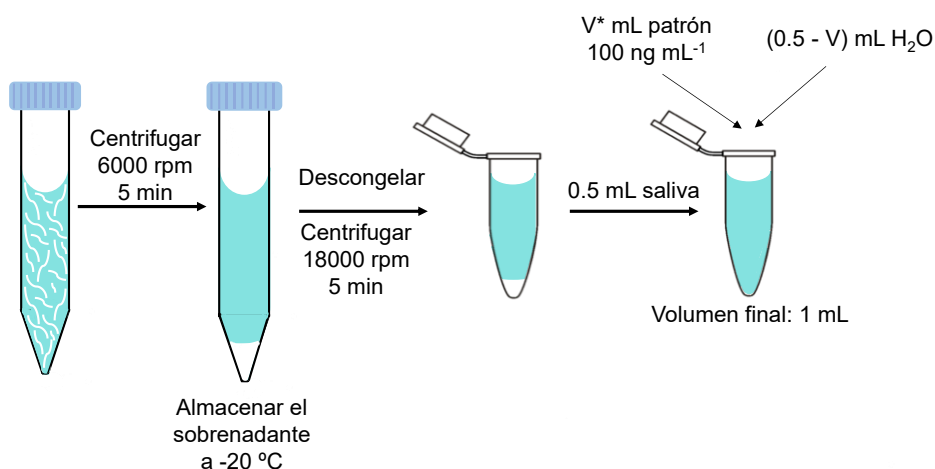


Figura 3.1. Tratamiento de la saliva previo a la SA-DSPE (* $V=10\text{-}50 \mu\text{L}$).

3.2.6. Procedimiento de la SA-DSPE

En primer lugar, se pesaron 9 mg del sorbente en microtubos de centrifuga y se añadieron $50 \mu\text{L}$ de MeOH, dispersando el material, e introduciendo la dispersión con la ayuda de una pipeta semiautomática en las disoluciones del calibrado de adición de patrón preparadas previamente. A continuación, los microtubos de centrifuga se llevaron al agitador orbital multiposición, agitando a 250 rpm durante 1 min a 25°C . Seguidamente, los microtubos se centrifugaron

a 18000 rpm durante 3 min, y el sobrenadante se descartó. El sorbente conteniendo los analitos se lavó con 50 μL de agua ultrapura para eliminar posibles restos de saliva, posteriormente se centrifugó y se descartó de nuevo el sobrenadante. Para llevar a cabo la desorción de los analitos, se añadieron 60 μL de ACN y se procedió a la dispersión del material en el agitador orbital termostatzado agitando a 1400 rpm durante 7 min a 25 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se procedió a la centrifugación de los microtubos, transfiriendo el sobrenadante a insertos de 250 μL situados en el interior de viales para su inyección en el sistema LC-MS/MS (**Figura 3.2**).

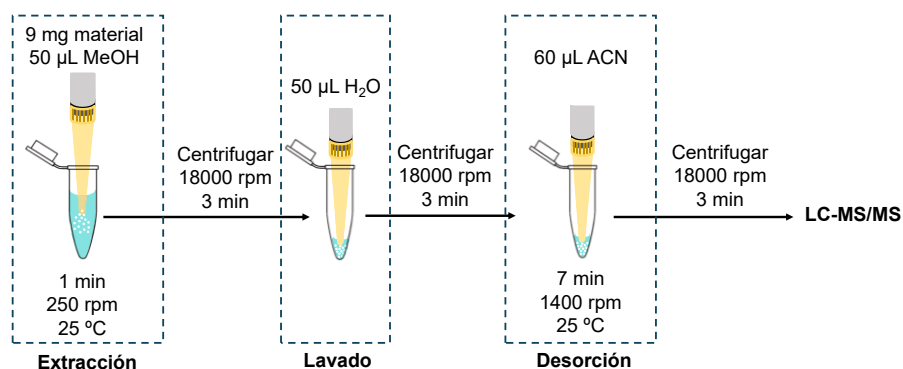


Figura 3.2. Esquema del procedimiento de extracción propuesto para la extracción de los analitos en muestras de saliva.

3.2.7. Condiciones LC-MS/MS

- Columna: Zorbax SB-C₁₈ (50 mm longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.8 μm de tamaño de partícula)
- Temperatura de la columna: 35 $^{\circ}\text{C}$
- Volumen de inyección: 10 μL
- Fase móvil: 0.5 mM NH_4F :MeOH (10:90, v/v) (isocrático)
- Caudal: 0.2 mL min^{-1}
- Duración del cromatograma: 3.5 min
- Modo ionización MS/MS: ESI+
- Voltaje: 5000 V (ESI+)

Capítulo 3

- Temperatura del gas de nebulización: 340 °C
- Flujo del gas de nebulización: 4 L min⁻¹
- Presión del nebulizador: 20 psi

En la **Tabla 3.2** se muestran las transiciones empleadas para la detección instrumental de los analitos.

Tabla 3.2. Relaciones masa/carga (m/z) de los iones precursores y producto, energías de colisión y fragmentador para 8OHdA y 8OHdG.

Analito	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z) ^a	Energía de colisión (V)	Fragmentador (V)
8OHdA	268	152	10	96
		89	16	
8OHdG	284	168	14	96
		117	14	

^a En negrita se resaltan las m/z empleadas para la cuantificación

En la **Figura 3.3** se muestran los cromatogramas obtenidos para ambos analitos al aplicar el método a una disolución patrón de 5 ng mL⁻¹ preparada en saliva sintética.

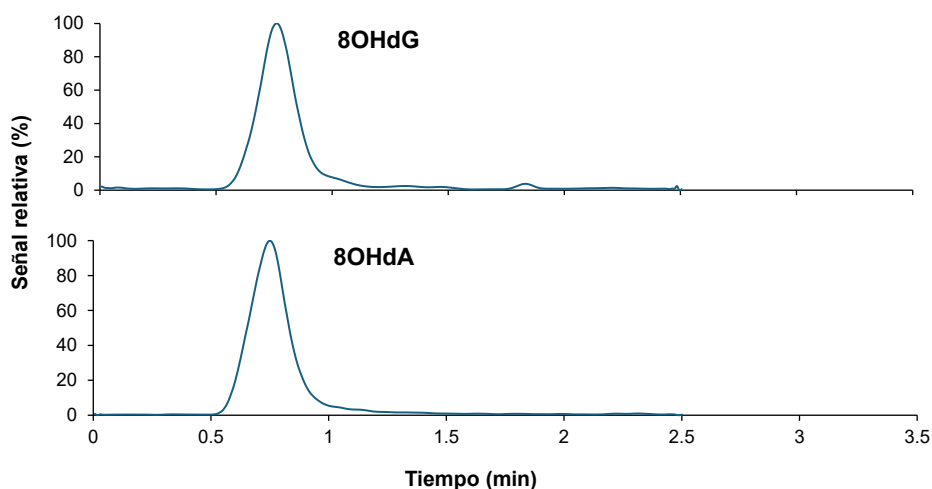


Figura 3.3. Cromatograma obtenido para una disolución patrón conteniendo 5 ng mL⁻¹ de los analitos en saliva sintética tras la aplicación del método basado en SA-DSPE y su posterior análisis mediante LC-MS/MS.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Selección del sorbente y acondicionamiento del mismo

Se decidió emplear StrataTM-X-RP como sorbente debido a que presenta una óptima combinación de grupos funcionales polares y apolares en su estructura, confiriéndole así propiedades hidrofílicas y lipofílicas, permitiendo su interacción con los analitos [88,130,139]. Específicamente, este sorbente está compuesto de un copolímero de estireno-DVB y pirrolidona.

En un primer intento, se consideró el empleo de un composite magnético incrustando las nanopartículas magnéticas en la red polimérica como se describe en trabajos previos [81,143,145]. Sin embargo, no se encontraron diferencias en términos de eficacia de extracción empleando las mismas condiciones para el composite magnético y el polímero no magnético. Debido a estos resultados y con la intención de desarrollar un método asequible para cualquier laboratorio de rutina sin la necesidad de sintetizar previamente un composite, se decidió emplear el polímero no magnético a pesar de no poseer las ventajas de los materiales magnéticos en cuanto a su fácil recuperación posterior a su dispersión. Sin embargo, la posibilidad de tratar varias muestras simultáneamente empleando el agitador orbital multiposición contrarresta este inconveniente.

Además, en experimentos preliminares se confirmó que era necesario el acondicionamiento del material con un disolvente orgánico, como por ejemplo MeOH, previo al proceso de extracción. De lo contrario, el material en la etapa de centrifugación no se depositaba en la parte inferior del microtubo y permanecía en la parte superior, dificultando así la retirada del sobrenadante sin pérdida de material. Esto se debe a la baja densidad del sorbente, que al ser acondicionado con un disolvente orgánico se introduce en los poros, aumentando su densidad. De esta forma, primero se dispersaba el material en unos pocos microlitros de MeOH en el microtubo de centrifuga y posteriormente la dispersión se inyectaba en la correspondiente fase dadora para proceder a la extracción de los analitos.

3.3.2. Potencial zeta del material y estudio del pH

El potencial zeta es una medida de la carga eléctrica efectiva en la superficie del material y de la estabilidad de la dispersión, lo cual depende de las propiedades químicas de la superficie del material. Se realizó la medida del potencial zeta en función del pH del medio para determinar el punto de carga cero del material. Como se puede observar en la **Figura 3.4**, la superficie de las partículas se mantiene cercana a la neutralidad a pH entre 2 y 6 ya que los

valores de potencial zeta presentan valores superiores a -10 mV, mientras que se encuentra negativamente cargado a pH 8.

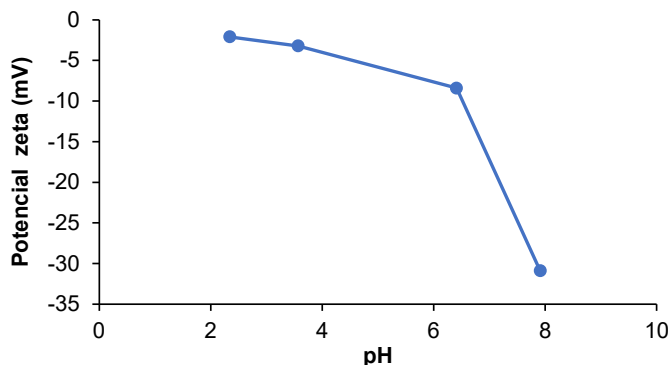


Figura 3.4. Potencial zeta del sorbente Strata™-X-RP.

A continuación, se llevó a cabo un estudio del efecto del pH de la fase dadora de entre 4 y 8. En el caso de pH 8 se observaba turbidez en la disolución patrón, por lo que los analitos podían haber precipitado, descartando este valor. Los resultados mostrados en la **Figura 3.5** muestran la disminución de la extracción de los analitos cuando se acidificaba el medio. Este hecho se puede deber a la protonación de los nitrógenos purínicos de ambos analitos, lo que genera que los analitos queden cargados positivamente incrementando su afinidad por la fase acuosa. Además, pese a que los analitos estaban positivamente cargados, el material no era capaz de establecer interacciones electroestáticas que favorecieran la extracción de los analitos debido a su estado neutro a estos valores de pH. Por ello, se seleccionó el pH fisiológico de la saliva que se encuentra entre 6 y 7 como valor óptimo.

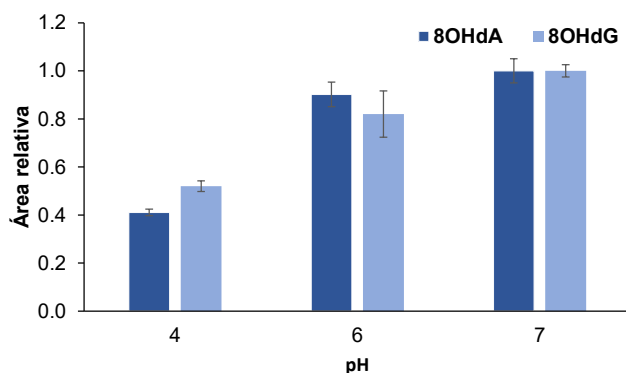


Figura 3.5. Estudio de la influencia del pH en la extracción de los analitos.

3.3.3. Estudio de la fuerza iónica

La fuerza iónica puede tener efectos significantes en la afinidad de los compuestos por la fase acuosa, afectando a la eficacia de la extracción. Por ello, se prepararon diferentes disoluciones patrón en agua ultrapura conteniendo 10 ng mL^{-1} de los analitos cada una, añadiendo diferentes concentraciones de NaCl (20, 50 y 100 mM). Como se muestra en la **Figura 3.6**, se obtuvo una mayor extracción a valores bajos de fuerza iónica. Este hecho se puede deber al aumento de la viscosidad de la disolución al aumentar la concentración de NaCl, disminuyendo la eficiencia de la dispersión del material en la fase dadora y, por tanto, la extracción de los analitos.

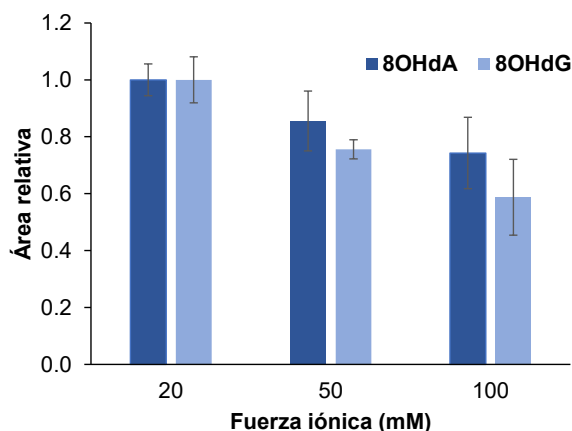


Figura 3.6. Estudio del efecto de la fuerza iónica en la extracción de los analitos.

A partir de estos resultados y teniendo en cuenta que la saliva presenta una fuerza iónica intrínseca alrededor de 50 mM, se realizó un estudio de la dilución de la muestra. Se probaron tres diluciones diferentes de saliva:agua (1:3, 1:1 y 3:1, v/v) y saliva sin diluir. Para ello, se empleó una disolución patrón de saliva sintética de 10 ng mL^{-1} diluida convenientemente, obteniendo concentraciones de 2.5, 5 y 7.5 ng mL^{-1} para las diluciones 1:3, 1:1 y 3:1 (v/v), respectivamente. Teniendo en cuenta los resultados que se muestran en la **Figura 3.7**, la dilución 1:1 (v/v) resultó ser la óptima. Mientras que la dilución 3:1 (v/v) era insuficiente para reducir la fuerza iónica, mediante una dilución 1:3 (v/v) se conseguía una mayor disminución de la fuerza iónica, pero también una mayor dilución de la muestra y, por tanto, de los analitos, obteniéndose señales inferiores a las proporcionadas por la dilución 1:1 (v/v), la cual fue seleccionada como la mejor opción.

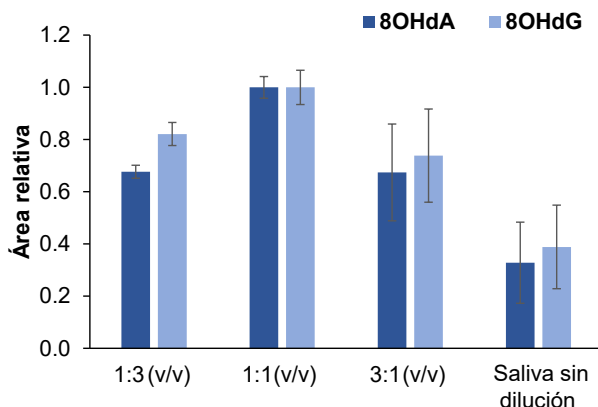


Figura 3.7. Estudio del efecto de la dilución de la muestra en la extracción de los analitos.

3.3.4. Optimización de las variables de extracción

Para el estudio de la influencia de la masa de sorbente, el tiempo de extracción, la temperatura y la velocidad de agitación, se empleó una estrategia de optimización multivariante basada en una RSM. De esta forma, se pueden observar relaciones entre variables de forma general. Se empleó un diseño de Box-Behnken de cuatro factores y tres niveles, estudiando los siguientes rangos de valores: 1-20 mg de masa de sorbente, 1-20 min de tiempo de extracción, 25-60 °C de temperatura y 250-1400 rpm de velocidad de agitación. Todos los experimentos se realizaron empleando 500 μL de una disolución patrón conteniendo 5 ng mL^{-1} de los analitos preparada en saliva sintética y diluida con agua ultrapura en una proporción 1:1 (v/v). Como condiciones de desorción se seleccionaron 80 μL de MeOH y una velocidad de agitación de 1400 rpm durante 5 min a 25 °C. Se seleccionó el área de los picos como respuesta analítica. La descripción del diseño de Box-Behnken se muestra en el **Anexo I**. Se realizaron un total de 54 experimentos, incluyendo tres réplicas del punto central (**Tabla 3.3**), y un duplicado de todo el diseño experimental. Para llevar a cabo el análisis estadístico se empleó el software Statgraphics Centurion XVI (Virginia, EE. UU.).

Tabla 3.3. Diseño Box-Behnken para la optimización multivariante de las variables involucradas en el proceso de extracción.

Etapa	Masa de sorbente (mg)		Tiempo de extracción (min)		Temperatura (°C)		Velocidad de agitación (rpm)	
	D ^a	C ^b	D	C	D	C	D	C
1	1	-1	1	-1	42.5	0	800	0
2	20	1	1	-1	42.5	0	800	0
3	1	-1	20	1	42.5	0	800	0
4	20	1	20	1	42.5	0	800	0
5	10.5	0	10.5	0	25	-1	200	-1
6	10.5	0	10.5	0	25	-1	1400	1
7	10.5	0	10.5	0	60	1	200	-1
8	10.5	0	10.5	0	60	1	1400	1
9	1	-1	10.5	0	25	-1	800	0
10	20	1	10.5	0	25	-1	800	0
11	1	-1	10.5	0	60	1	800	0
12	20	1	10.5	0	60	1	800	0
13	10.5	0	1	-1	42.5	0	200	-1
14	10.5	0	20	1	42.5	0	200	-1
15	10.5	0	1	-1	42.5	0	1400	1
16	10.5	0	20	1	42.5	0	1400	1
17	1	-1	10.5	0	42.5	0	200	-1
18	20	1	10.5	0	42.5	0	200	-1
19	1	-1	10.5	0	42.5	0	1400	1
20	20	1	10.5	0	42.5	0	1400	1
21	10.5	0	1	-1	25	-1	200	-1
22	10.5	0	20	1	25	-1	200	-1
23	10.5	0	1	-1	60	1	1400	1
24	10.5	0	20	1	60	1	1400	1
25	10.5	0	10.5	0	42.5	0	800	0
26	10.5	0	10.5	0	42.5	0	800	0
27	10.5	0	10.5	0	42.5	0	800	0

^a Valores descodificados

^b Valores codificados

La adecuación del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), para el cual se obtuvieron valores superiores a 0.85 para ambos analitos. Este valor indica que el modelo diseñado es eficiente para la predicción de las respuestas. Las superficies de respuesta en función de la deseabilidad se representaron por pares de variables. Como se puede observar en la **Figura 3.8**, valores intermedios de masa de sorbente conseguían una óptima eficacia

de extracción. Esto se debe a que a menor cantidad de material la superficie de adsorción disminuye y por tanto también la eficacia de adsorción. Sin embargo, una cantidad elevada de sorbente no permitía su correcta dispersión en el disolvente de desorción debido a su bajo volumen, disminuyendo la eficacia en la transferencia de los analitos desde el sorbente al disolvente de desorción. Por ello, se seleccionó 9 mg como valor óptimo.

Respecto al tiempo de extracción, el análisis de varianza (ANOVA) mostró que era la única variable que no afectaba de forma significativa ($p > 0.05$) en el proceso de extracción. Esto se puede explicar atendiendo a que se alcanza rápidamente el equilibrio adsorción-desorción entre los analitos y el sorbente debido a su dispersión, requiriendo tiempos de extracción cortos. Con la finalidad de reducir el consumo de tiempo, se seleccionó 1 min como tiempo de extracción.

La temperatura fue la variable con mayor influencia en la eficacia de extracción, mostrando un efecto negativo, por lo que se seleccionaron 25 °C por ser el valor mínimo del agitador orbital termostatzado. Según la bibliografía, esto se puede deber a la degradación de los analitos al aumentar la temperatura o a una mejor solubilidad en la fase dadora [146]. Para determinar la causa real, se prepararon diversas disoluciones patrón en agua y se aplicaron temperaturas crecientes hasta 60 °C durante 10 min sin extracción. Los resultados mostraron que la concentración de los analitos se mantenía constante. Por ello, se concluyó que el efecto negativo de la temperatura se debió a la mayor solubilidad de los analitos en la fase dadora.

Al igual que la temperatura, también se obtuvo un efecto negativo para la velocidad de agitación. Esto se puede explicar teniendo en cuenta que el equilibrio de adsorción se alcanza rápidamente incluso a velocidades bajas de agitación. Un aumento en la velocidad de agitación solo favorecía la dispersión del material con los analitos retenidos por todo el interior del microtubo de centrifuga y el tapón. De esta forma, en la etapa de desorción, al utilizar un bajo volumen de disolvente, el contacto entre este y el sorbente no era el adecuado ya que el sorbente se encontraba también disperso en la parte superior del microtubo donde no llegaba el disolvente. Por ello, había una menor transferencia de los analitos del sorbente al disolvente de desorción, disminuyendo la eficacia de extracción, por lo que se seleccionó 250 rpm como velocidad de agitación para posteriores experimentos.

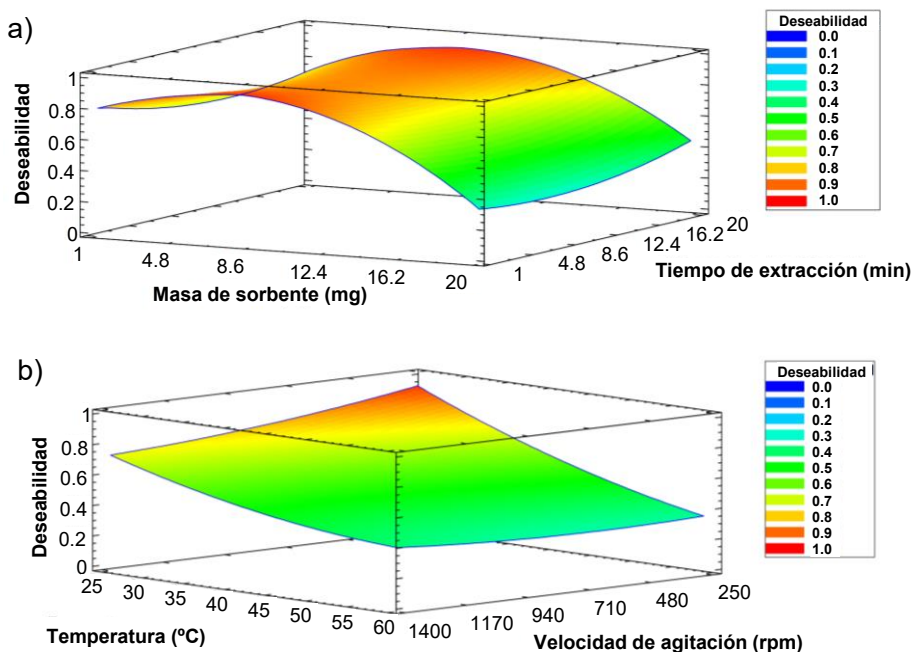


Figura 3.8. Superficies de respuesta obtenidas en la optimización multivariante de las condiciones de extracción para a) masa de sorbente y tiempo de extracción; b) temperatura y velocidad de agitación.

Dado que el sorbente se introduce disperso en MeOH, produciéndose así su dispersión en la muestra, se comprobó que la agitación en la etapa de extracción producía una mejora en la eficacia. Así, se realizaron diversos experimentos para comprobar que una posterior agitación aumentaba la extracción de los analitos. Con esta finalidad, las señales de los analitos fueron comparadas después de la extracción bajo las siguientes condiciones: (1) 1 min de extracción a una velocidad de agitación de 250 rpm; (2) 1 min de extracción sin agitación dejando la dispersión sin alterar durante este tiempo; (3) sin tiempo de extracción, centrifugando inmediatamente después de la dispersión del material. Como se puede observar en la **Figura 3.9**, se obtuvo una menor señal para ambos analitos cuando no existía agitación, demostrando que sí favorece la cinética de extracción y por tanto su necesidad.

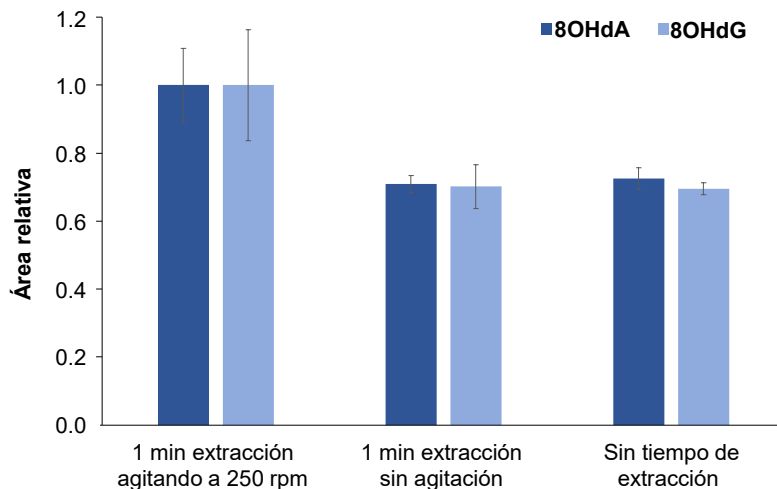


Figura 3.9. Comparación de las condiciones de extracción en términos de tiempo y agitación.

En resumen, se seleccionaron como valores óptimos para la etapa de extracción 9 mg de sorbente, una velocidad de agitación de 250 rpm, una temperatura de 25 °C y 1 min como tiempo de extracción.

3.3.5. Optimización de las variables de desorción

Se estudiaron las variables involucradas en la etapa de desorción. Estas fueron el tiempo de desorción, la velocidad de agitación y el disolvente de desorción. Todos los experimentos se llevaron a cabo empleando 500 µL de una disolución patrón conteniendo 5 ng mL⁻¹ de los analitos preparada en saliva sintética y diluida con agua ultrapura en una proporción 1:1 (v/v). Se seleccionaron 60 µL como volumen de desorción ya que este era el mínimo volumen que podía ser empleado eficientemente debido a que volúmenes más bajos no proporcionaban una buena dispersión del sorbente.

3.3.5.1. Tiempo de desorción y velocidad de agitación

Para llevar a cabo la optimización del tiempo de desorción y la velocidad de agitación se empleó un diseño Doehlert (**Anexo I**), basado en una RSM de dos factores y tres niveles. Se estudiaron los siguientes rangos de valores para cada variable: 1-20 min de tiempo de desorción y 250-1400 rpm de velocidad de agitación. Se requirieron un total de 9 experimentos y se empleó el software Statgraphics para el análisis estadístico.

Se evaluó la adecuación del modelo mediante el R^2 , obteniendo valores superiores a 0.86 para ambos analitos. Este valor indica que el modelo es eficiente para la predicción de las respuestas.

Como se puede observar en la **Figura 3.10**, se obtuvo una mejora en la transferencia de los analitos desde el sorbente al disolvente de desorción cuando se empleaban velocidades de agitación elevadas, por lo que 1400 rpm se seleccionó como valor óptimo. Esta tendencia se puede explicar teniendo en cuenta que a una elevada velocidad se producía una mejor dispersión del sorbente, lo que conlleva una mejor transferencia de los analitos al disolvente de desorción. Respecto al tiempo de desorción, se obtuvo un importante efecto positivo en la respuesta de los analitos al emplear bajas velocidades de agitación. Sin embargo, cuando el material se dispersaba a elevadas velocidades, la importancia del tiempo de desorción disminuía. A un valor de 1400 rpm, se obtuvo un amplio rango de tiempo (7-15 min) en el cual se conseguía una buena eficacia de extracción, obteniendo valores similares dentro de dicho rango. Para minimizar el tiempo de análisis, se seleccionó un tiempo de desorción de 7 min.

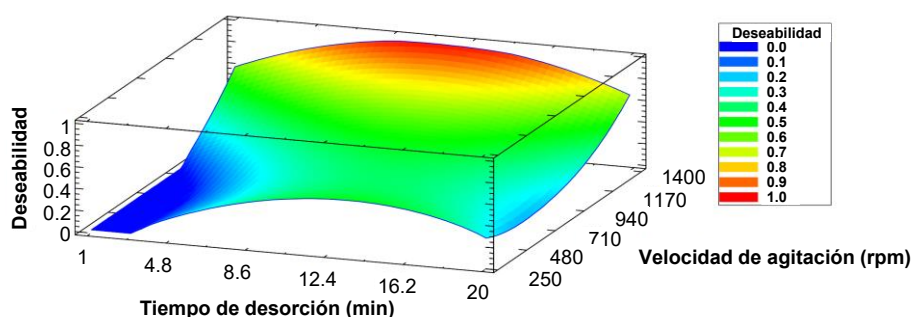


Figura 3.10. Superficie de respuesta obtenida en la optimización multivariante de las condiciones de desorción representando el tiempo de desorción y la velocidad de agitación.

3.3.5.2. Disolvente de desorción

Para la optimización del disolvente de desorción se empleó un diseño Simplex-Centroid [147] (**Anexo I**). Este modelo representa el triángulo de todas las mezclas posibles de tres componentes para encontrar el valor óptimo. Los vértices del triángulo representan los tres disolventes puros y los puntos intermedios una mezcla de los componentes. Se eligieron MeOH, ACN y agua ultrapura para ser estudiados como disolventes de desorción. Para el análisis

estadístico se empleó el software Statgraphics Centurion XVI, tomando las áreas de los picos como respuestas analíticas.

La proporción de los componentes se expresó como una fracción de la mezcla, tomando valores entre 0 y 1. Se llevaron a cabo 7 experimentos para el desarrollo de este modelo seleccionando como condiciones de extracción las obtenidas en la optimización. Como condiciones de desorción, se emplearon 60 μL del correspondiente disolvente de desorción o mezcla, a 1400 rpm durante 7 min a una temperatura de 25 $^{\circ}\text{C}$.

La adecuación del modelo se evaluó mediante el R^2 , obteniéndose un valor superior a 0.94 para ambos analitos. Este valor indica que el modelo diseñado es eficiente para la predicción de las respuestas. Como se muestra en la **Figura 3.11**, los mejores resultados se obtuvieron empleando ACN, por lo que se seleccionó como disolvente de desorción. Además, la baja eficacia de desorción del agua confirmó que no había ninguna pérdida significativa de los analitos durante el proceso de lavado del material. Esta etapa permite eliminar el exceso de sal presente en la superficie del sorbente, el cual puede ocasionar supresión iónica en el detector de MS/MS, conllevando un efecto matriz.

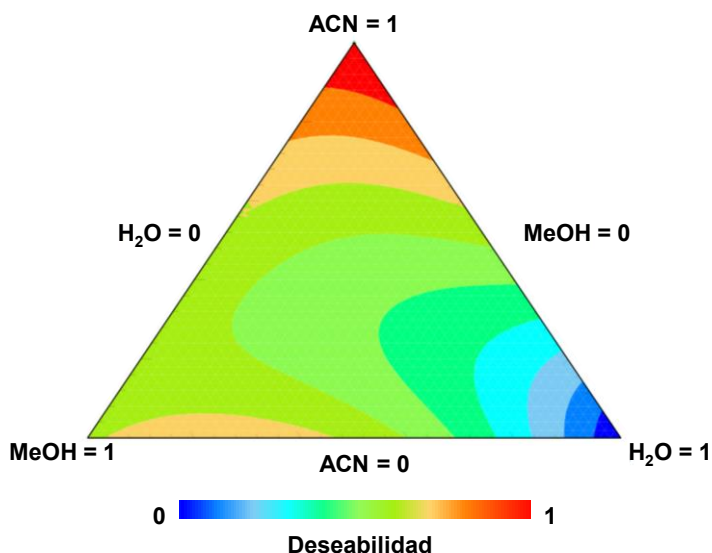


Figura 3.11. Representación gráfica del diseño Simplex-Centroid empleado para la optimización del disolvente de desorción.

3.3.6. Estudio del efecto matriz

Para la evaluación del efecto matriz se determinaron los coeficientes de recuperación relativa de dos muestras de saliva de diferentes voluntarios. Para ello, las muestras se fortificaron a dos niveles de concentración (1 y 5 ng mL⁻¹) y se aplicó el método optimizado. Se obtuvieron bajos valores (7-42%), indicando la presencia de efecto matriz. De esta forma, se empleó el calibrado de adición de patrón para corregir dicho efecto matriz [148].

3.3.7. Características analíticas del método

Se evaluaron diferentes parámetros analíticos con la finalidad de validar el método propuesto siguiendo la guía armonizada ICH [149]. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.4**. Cabe resaltar que, debido al empleo del calibrado por adición de patrón para corregir el efecto matriz, el cual puede variar según la muestra, los parámetros dependientes de la señal, como la linealidad o los límites de detección (*Limit of Detection*, LOD) o de cuantificación (*Limit of Quantification*, LOQ) son dependientes de cada muestra. Con la finalidad de obtener valores aproximados y determinar el orden de magnitud para poder realizar una comparación con otros métodos, se empleó saliva sintética para obtener los valores de estos parámetros.

El método presentó una linealidad de hasta al menos 20 ng mL⁻¹, obteniéndose coeficientes de determinación superiores a 0.990.

Los LOD y LOQ se calcularon como 3 y 10 veces, respectivamente, la relación señal-ruido de una disolución patrón a la que se le aplicó el método propuesto. Se obtuvieron valores de LOD y LOQ de 0.25 y 0.83 ng mL⁻¹ para la 8OHdA y de 0.22 y 0.72 ng mL⁻¹ para la 8OHdG, respectivamente.

El rendimiento de extracción (*Extraction Efficiency*, EE) para ambos analitos se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 = \frac{C_f \cdot V_f}{C_i \cdot V_i} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 3.1})$$

Donde m_f es la masa final del analito en el extracto, m_i es la masa inicial del analito en la fase dadora, C_f es la concentración final del analito en el extracto, V_f es el volumen del extracto, C_i es la concentración inicial de los analitos en la fase dadora y V_i es el volumen de la fase dadora. Se obtuvieron valores de 7.2 % para la 8OHdA y de 11 % para la 8OHdG. Pese a que estos valores no son muy elevados, permiten alcanzar los límites necesarios para la determinación de los analitos. Además, se requiere de una etapa de limpieza de la muestra debido a la elevada concentración salina de la saliva, la cual no puede introducirse directamente en el MS/MS.

La precisión del método propuesto se estudió en una misma sesión de trabajo (intra-día) y en diferentes sesiones consecutivas (inter-día). Con esta finalidad se aplicó el método a cinco réplicas independientes de disoluciones patrón multicomponente a dos niveles de concentración (1 y 5 ng mL⁻¹). Como se puede observar en la **Tabla 3.4**, todos los valores de desviación estándar relativa (*Relative Standard Deviation*, RSD) se encontraban por debajo de 15%, concluyendo que el método propuesto presenta una buena precisión.

Tabla 3.4. Características analíticas del método propuesto.

Analito	R ²	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Precisión (% RSD)			
				Intra-día		Inter-día	
				1 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	1 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹
8OHdA	0.992	0.25	0.83	14.8	6.3	5.7	10.0
8OHdG	0.991	0.22	0.72	8.3	10.0	14.0	14.7

3.3.8. Análisis de muestras

Para demostrar la aplicabilidad del método en la determinación de los biomarcadores 8OHdA y 8OHdG en saliva, se analizaron muestras de saliva de nueve voluntarios. En la **Tabla 3.5** se muestran las concentraciones obtenidas para cada voluntario. Los voluntarios del 1 al 6 eran personas sanas, mientras que los voluntarios del 7 al 9 padecían diabetes tipo II. Como se puede observar, los voluntarios sanos presentaron concentraciones más bajas de ambos biomarcadores (<2.4 ng mL⁻¹), mientras que los voluntarios con diabetes tipo II presentaban concentraciones más elevadas (2.8-6.9 ng mL⁻¹). Los resultados obtenidos muestran que el método es totalmente aplicable para la determinación de estos biomarcadores en saliva, por lo que puede ser una herramienta útil para el seguimiento clínico de rutina de pacientes con diferentes patologías tal como la diabetes tipo II.

Tabla 3.5. Resultados obtenidos aplicando el método basado en SA-DSPE y LC-MS/MS a muestras de saliva de diferentes voluntarios.

Voluntario	Concentración (ng mL ⁻¹)	
	8OHdA	8OHdG
1	1.0 ± 0.1	2.4 ± 0.1
2	<LOD	1.1 ± 0.2
3	1.3 ± 0.3	<LOD
4	2.4 ± 0.4	1.3 ± 0.2
5	1.9 ± 0.2	<LOQ
6	<LOQ	<LOQ
7 ^a	6.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1
8 ^a	5.0 ± 0.5	4.4 ± 0.6
9 ^a	3.9 ± 0.5	4.0 ± 0.4

^a diagnosticados con diabetes tipo II

3.3.9. Comparación con métodos previos y evaluación del impacto ambiental

Se llevó a cabo una comparación del método propuesto con otras metodologías presentes en la bibliografía científica donde se realiza la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva (**Tabla 3.6**) [85,150]. Respecto a los LOD, el método desarrollado presenta considerables mejoras. Además, la etapa de tratamiento de muestra requiere de 17 min (1 min de extracción + 7 min de desorción + 9 min de centrifugación), mientras que en el único método previo basado en microextracción se requieren 60 min (30 min de extracción + 30 min de desorción). También cabe remarcar que el empleo del agitador orbital termostatzado es otra considerable ventaja ya que permite procesar varias muestras simultáneamente.

Sin embargo, la mayor desventaja del método propuesto es el elevado volumen de muestra que requiere (0.5 mL por cada punto del calibrado) debido al empleo del calibrado por adición de patrón para la cuantificación de los analitos. También cabe remarcar que la etapa de tratamiento de muestra es más laboriosa en comparación con el método analítico basado en electroforesis capilar (*Capillary Electrophoresis*, CE) [150], el cual no requiere de ningún proceso de extracción, pero el LOD obtenido es considerablemente superior.

Además, como se ha comentado, evitar la etapa de tratamiento de muestra en el análisis de saliva no es conveniente cuando se emplea LC-MS/MS debido a su elevado contenido en sales.

El impacto ambiental de la etapa de preparación de muestra se evaluó empleando la herramienta métrica AGREEprep [63]. Como se observa en la **Figura 3.12**, se obtuvo una puntuación de 0.34. Pese a que el método desarrollado presenta ventajas respecto a los métodos previos (comentadas anteriormente), no consigue obtener una elevada puntuación en lo que al impacto ambiental se refiere. Esto se debe principalmente a la necesidad de emplear un calibrado de adición de patrón, lo que conlleva una mayor generación de residuos (criterio 4) y volumen de muestra (criterio 5), y una menor productividad (criterio 6). Además, a pesar de usarse un agitador con 24 posiciones, solo se puede realizar la extracción simultánea de 4 muestras ya que cada muestra requiere el empleo de 6 tubos de microcentrífuga, correspondientes al calibrado de adición de patrón. La comparación en términos de impacto ambiental de la etapa de tratamiento de muestra de este método con métodos previos se encuentra en la **Sección 4.3.8** conjuntamente con el método desarrollado en el **Capítulo 4**, ya que ambos tratan sobre la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva empleando técnicas de microextracción.

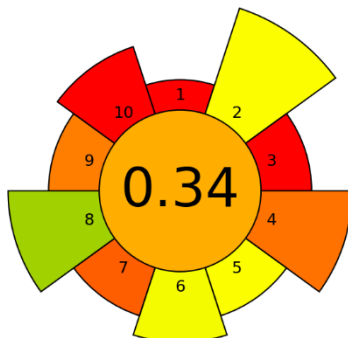


Figura 3.12. Evaluación mediante AGREEprep del método desarrollado.

Tabla 3.6. Comparación del método SA-DSPE desarrollado con métodos previos para la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva.

Analitos	Técnica de extracción	Volumen de muestra (mL)	Tiempo de extracción (min)	Técnica instrumental	Características analíticas	Ref.
8OHdG	-	-	-	CE-ECD	Linealidad: 56-56648 ng mL ⁻¹ LOD: 11.6 ng mL ⁻¹ RSD: 0.9 %	[150]
8OHdG 8OHdA	SPME	1.8	30	LC-MS/MS	Linealidad: 5-250 ng mL ⁻¹ LOD: 5 ng mL ⁻¹ RSD: 3-18 %	[85]
8OHdG 8OHdA	SA-DSPE	3	1	LC-MS/MS	Linealidad: 0.5-5 ng mL ⁻¹ LOD: 0.22-0.25 ng mL ⁻¹ RSD: 5.7-14.8 %	Este trabajo

3.4. Conclusiones

En este trabajo se ha desarrollado un método analítico para la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva, dos biomarcadores de daño oxidativo de ADN. Se ha empleado un polímero tipo HLB como fase sorbente ya que puede interaccionar con los analitos mediante interacciones hidrofílicas, lipofílicas y de tipo π - π . El método propuesto se basa en la SA-DSPE seguida del análisis instrumental mediante LC-MS/MS y emplea una cantidad moderada de muestra, disolventes orgánicos y sorbente. Además, el tiempo total de análisis se reduce considerablemente en comparación con el único trabajo previo con la misma finalidad.

El método ha sido validado en términos de linealidad, sensibilidad, y precisión, obteniéndose buenos resultados. Asimismo, su simplicidad y asequibilidad lo hacen adecuado para el seguimiento clínico de rutina de pacientes con diferentes patologías como la diabetes tipo II.

Capítulo 4

Determinación de biomarcadores de estrés oxidativo en saliva empleando microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo:

G. Peris-Pastor, N. Chansud, O. Bunkoed, J.L. Benedé, A. Chisvert, A step forward in the determination of oxidative stress biomarkers in saliva by miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 295 (2025) 128351



Resumen

El bioanálisis ha sido siempre una herramienta de gran importancia en medicina, debido a su utilidad en el diagnóstico, pronóstico y respuesta al tratamiento de enfermedades. Más específicamente, el análisis la saliva presenta un elevado potencial debido a la correlación de los niveles de biomarcadores en este fluido biológico y la sangre, mientras que su recolección es más fácil y menos invasiva. En este capítulo se ha desarrollado un método analítico sostenible que presenta una elevada productividad para la determinación de dos biomarcadores de daño oxidativo del ADN (8-hidroxi-2'-deoxiadenosina (8OHdA) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG)) en saliva. Para su extracción se ha empleado la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, mSBSDE) utilizando como sorbente un material magnético que combina sinérgicamente las propiedades químicas de la polidopamina (PDA) y los puntos cuánticos de grafeno (*Graphene Quantum Dots*, GQDs) ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{@PDA/GQDs}$). Los parámetros analíticos obtenidos para ambos analitos, en términos de factor de preconcentración (3.8 y 3.2), límites de detección (0.10 y 0.18 ng mL⁻¹) y precisión (RSD <15 %) resultan muy adecuados para la determinación de estos biomarcadores a nivel de trazas en saliva. Respecto a los coeficientes de recuperación relativa, se han obtenido valores entre 83 y 119 %, demostrando que el efecto matriz es despreciable y, por tanto, se puede hacer uso de la calibración externa, empleando bisfenol S como patrón surrogado. Para demostrar la utilidad del método desarrollado, se han analizado muestras de saliva de cinco voluntarios sanos y tres con diabetes tipo II. Los resultados muestran que los niveles en saliva de estos biomarcadores son más elevados en las personas con diabetes tipo II respecto a los voluntarios sanos. Además, este trabajo mejora algunos de los inconvenientes relacionados con la sostenibilidad de trabajos previos dedicados al mismo propósito.

4.1. Introducción

Como se ha descrito en el **Capítulo 3**, la 8-hidroxi-2'-deoxiadenosina (8OHdA) y la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG) son dos biomarcadores de estrés oxidativo relacionados con el daño del ADN. Por ello, su determinación en fluidos biológicos puede aportar información valiosa acerca de diversas patologías. Además, como también se ha mencionado anteriormente, los niveles de biomarcadores en saliva y sangre están altamente correlacionados. Teniendo en cuenta la fácil obtención, manejo y conservación de la saliva, esta presenta un elevado potencial en el campo del bioanálisis. Sin embargo, esta matriz no se puede inyectar directamente en los equipos de cromatografía, y más si están acoplados a espectrometría de masas, por lo que se requieren etapas de extracción que permitan preconcentrar los analitos y eliminar posibles interferentes.

No obstante, hasta la fecha, solo dos artículos reportan la determinación de ambos biomarcadores en muestras de saliva empleando microextracción. Uno de ellos es un método basado en microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME), el cual requiere de largos tiempos en la etapa de extracción (30 min) y desorción (30 min) [85]. Recientemente, y fruto de la investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral, con la finalidad de contrarrestar este inconveniente, se desarrolló un método basado en la extracción en fase sólida dispersiva asistida por disolvente (*Solvent-Assisted Dispersive Solid-Phase Extraction*, SA-DSPE) [86] el cual se ha presentado en el **Capítulo 3**, aprovechando la mayor cinética de extracción que presentan las técnicas dispersivas en comparación con las estáticas. De esta forma, se consiguió una mejora significativa en cuanto a los tiempos de extracción requeridos (de 30 min a 1 min). Sin embargo, se requieren mejoras adicionales, ya que el método basado en SA-DSPE presenta etapas de centrifugación para recoger el sorbente después de su dispersión en la muestra o en el disolvente de desorción. De este modo, con la finalidad de evitar estas etapas, los sorbentes magnéticos son una buena alternativa debido a su fácil recolección con tan solo aplicar un campo magnético.

Respecto a los sorbentes empleados para la determinación de ambos analitos en saliva, como ya se ha comentado, solo se han utilizado polímeros de balance hidrofílico-lipofílico (*Hydrophilic-Lipophilic Balanced*, HLB) debido a su óptima combinación de monómeros polares y apolares [85,86]. Sin embargo, se obtuvieron bajos rendimientos de extracción (menores de 2.1 % para SPME y menores de 11 % para SA-DSPE), y ninguno de ellos era magnético, por lo que es necesario buscar alternativas.

Cabe indicar que la polidopamina (PDA) ha ganado un gran interés como fase de extracción debido a la presencia de abundantes grupos hidroxilo, amino y anillos aromáticos en su estructura, lo que le confiere propiedades anfífilas

[151]. De este modo, la PDA puede interaccionar con los compuestos de interés mediante puentes de hidrógeno e interacciones π - π [152], lo cual es especialmente interesante para la extracción de la 8OHdA y 8OHdG. Además, se puede obtener fácilmente a partir de la dopamina sin la necesidad de añadir un agente entrelazante o iniciador químico, ya que presenta la habilidad de autopolimerizarse en medio acuoso. Por otro lado, los puntos cuánticos de grafeno (*Graphene Quantum Dots*, GQDs) también ofrecen propiedades interesantes como fase de extracción debido a su capacidad para establecer puentes de hidrógeno e interacciones tipo π - π , además de su pequeño tamaño de partícula, elevada área superficial, estabilidad química y fácil dispersión en medio acuoso [153]. Los GQDs son nanoestructuras cero-dimensionales que presentan un tamaño de plano menor de 100 nm y un espesor inferior a 10 capas [154]. Debido a su elevada solubilidad y modificabilidad en medio acuoso, los GQDs se deben inmovilizar en la superficie de algún material de soporte para poder recuperarlos de una dispersión acuosa.

El objetivo de este trabajo es sintetizar un nuevo material basado en PDA y GQDs con el propósito de contrarrestar los bajos rendimientos de extracción que presentan los métodos previos. Para incrementar la cinética de la extracción se empleará mSBSDME [81] como técnica de tratamiento de muestra, la cual requiere que los sorbentes sean magnéticos. Por ello, el material sintetizado que se pretende emplear se basará en nanopartículas magnéticas (*Magnetic Nanoparticles*, MNPs) recubiertas con PDA y GQDs ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$). Como técnica instrumental se empleará la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) para obtener una buena sensibilidad y selectividad.

4.2. Experimental

4.2.1. Reactivos

Se empleó 8-hidroxi-2'-deoxiadenosina ≥ 99 % de Cayman Chemical Company (Michigan, EE. UU.) y 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina ≥ 98 % de Biosynth Carbosynth (Berkshire, Reino Unido) como patrones. Como patrón surrogado se empleó bisfenol S deuterado (BPS-d_3) ≥ 99 % de CDN isotopes (Quebec, Canadá).

Para la síntesis del sorbente magnético se empleó $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de Acros Organics (Geel, Bélgica), hidróxido de sodio (NaOH) de Scharlab (Barcelona, España), ácido cítrico de Guinama (Valencia, España), dopamina clorhidrato de Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania), tris(hidroximetil)-aminometano-clorhidrato (Tris-HCl) de Merck (Darmstadt, Alemania) y agua ultrapura (resistividad ≥ 18.2 M Ω cm) obtenida a través de un sistema de purificación de agua Adrona (Riga, Letonia).

Para la preparación de saliva sintética se empleó cloruro de sodio (NaCl) de Fisher Scientific (Loughborough, Reino Unido), cloruro de potasio (KCl), cloruro de calcio ($\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), tiocianato de potasio (KSCN) y dihidrógeno fosfato de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de PanReac AppliChem (Damstad, Alemania), sulfuro de sodio (Na_2S) de Scharlab y urea de VWR Chemicals.

Se adquirió etanol (EtOH) grado HPLC de PanReac AppliChem, metanol (MeOH) grado LC-MS de Honeywell (Seelze, Alemania) y tetrahidrofurano (THF) y N-N-dimetilformamida de Scharlab.

Para la preparación de la fase móvil se adquirió acetonitrilo (ACN) grado LC-MS, agua grado LC-MS de PanReac AppliChem, y fluoruro de amonio (NH_4F) 98 % de Acros Organics.

Como gas de nebulización en la fuente MS/MS y para la evaporación de los extractos posterior al proceso de extracción se empleó nitrógeno obtenido a través de un generador NiGen LCMS 40-1 de Claind S.r.l. (Lenno, Italia), mientras que se empleó nitrógeno extrapuro (> 99.999 %) de Praxair (Madrid, España) como gas de colisión en la celda de colisión del MS/MS.

4.2.2. Instrumentación

Para llevar a cabo la mSBSDE se empleó un dispositivo multiextracción desarrollado por el grupo de investigación en el que se ha realizado la presente Tesis Doctoral [81] que consistía en un agitador magnético MX-3K (18 W, 0-3000 rpm) de Anzeser (Frankfurt am Main, Alemania) al que se le acopla un soporte diseñado en 3D con capacidad para 15 insertos de vidrio de base plana (**Figura 4.1**). Estos insertos de Labbox (Barcelona, España) se emplearon como recipientes en la etapa de microextracción y presentaban una capacidad de 400 μL (31 mm de altura y 4 mm de diámetro interno), mientras que los imanes cilíndricos de NdFeB (3 mm de longitud y 2 mm de diámetro) utilizados para dispersar el sorbente se adquirieron de Supermagnete (Gottmadingen, Alemania).



Figura 4.1. Dispositivo multiextracción de 15 posiciones empleado para llevar a cabo mSBSDE.

Capítulo 4

Se empleó un medidor de pH Basic 20 de Crison (Alella, España) para la síntesis del sorbente. Para llevar a cabo la evaporación de los extractos se empleó un evaporador Stuart SBHCONC/1 de Cole-Parmer (Staffordshire, Reino Unido).

Para observar la morfología del material sintetizado se utilizó un equipo de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscopy*, SEM) HITACHI S4800 a 10 kV equipado con un detector de electrones retrodispersados RX Bruker y un equipo de microscopía electrónica de transmisión (*Transmission Electron Microscopy*, TEM) JEOL JEM-1010 a 100 kV equipado con una cámara digital AMT (8.0 Mpx).

Se empleó un dispositivo de interferencia cuántica de superconducción (*Superconducting Quantum Interference Device*, SQUID) Quantum Design MPMS-XL-5 para la medida de las propiedades magnéticas del material sintetizado.

Para la medida de la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno y el área superficial específica se utilizó un analizador ASAP 2010 de Micrometrics.

Se empleó una termobalanza Perkin-Elmer TGA-7 para el análisis termogravimétrico, calentando de 25 a 1000 °C bajo atmósfera de nitrógeno.

Se utilizó un sistema de LC-MS/MS Sciex Qtrap 6500 plus equipado con un desgasificador, una bomba programable, un inyector automático y un horno con una columna Waters C₁₈ BEH (50 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.7 µm de tamaño de partícula).

4.2.3. Toma de muestra y pretratamiento

Se analizaron muestras de saliva de ocho voluntarios, tres de ellos con diabetes de tipo II. Cada voluntario dio su consentimiento por escrito para la participación en este estudio, siguiendo las directrices éticas de la Declaración de Helsinki y siendo aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad de Valencia.

Para recoger las muestras se empleó el salivado pasivo y posteriormente se almacenaron a -20 °C para fragmentar las mucinas. Previamente al análisis, las muestras se descongelaron y centrifugaron a 6000 rpm durante 5 min para separar la saliva de comida, flema y mucinas precipitadas. Finalmente, se emplearon 350 µL del sobrenadante para la mSBSDME (**Figura 4.2**).

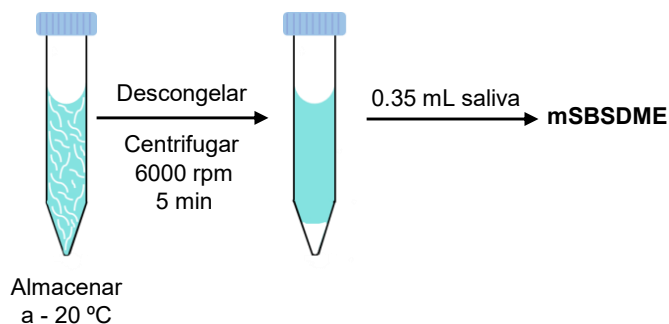


Figura 4.2. Tratamiento de la saliva previo a la mSBSDE.

4.2.4. Preparación de saliva sintética

Para la validación del método se preparó saliva sintética de acuerdo a un protocolo adaptado [144]. Con esta finalidad se preparó una disolución de agua ultrapura conteniendo NaCl (400 mg L⁻¹), KCl (400 mg L⁻¹), CaCl₂·H₂O (795 mg L⁻¹), NaH₂PO₄·H₂O (690 mg L⁻¹), KSCN (300 mg L⁻¹), Na₂S (5 mg L⁻¹) y urea (1000 mg L⁻¹).

4.2.5. Preparación de las disoluciones patrón

Se prepararon disoluciones patrón independientes de 8OHdA y 8OHdG en N,N-dimetilformamida a una concentración de 1000 µg mL⁻¹. A continuación, una alícuota de cada disolución se diluyó en agua ultrapura para obtener una disolución multicomponente con una concentración de 1 µg mL⁻¹ de cada analito. Estas disoluciones se conservaron a -20 °C. En cada sesión de trabajo, una alícuota de la disolución multicomponente se diluyó en saliva sintética para obtener una disolución patrón de 100 ng mL⁻¹ de cada analito. Las disoluciones patrón de trabajo empleadas en la obtención de la recta de calibrado se prepararon en saliva sintética con concentraciones de entre 0.5 y 10 ng mL⁻¹.

Respecto al patrón surrogado, se preparó una disolución patrón de BPS-d₈ en ACN a una concentración de 1000 µg mL⁻¹. En cada sesión de trabajo se preparó una disolución patrón de 350 ng mL⁻¹ en agua ultrapura.

4.2.6. Síntesis de CoFe₂O₄@PDA/GQDs

En primer lugar se realizó la síntesis de MNPs de CoFe₂O₄ mediante un proceso de coprecipitación en medio básico empleando un procedimiento adaptado

[155]. Para ello, se mezclaron 100 mL de una disolución acuosa 0.4 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 100 mL de una disolución acuosa 0.2 M de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Seguidamente, se añadieron 100 mL de NaOH 3 M gota a gota calentando a 80 °C durante 1 h mientras la disolución se agitó magnéticamente. A continuación, la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente y las MNPs obtenidas se lavaron con agua ultrapura y EtOH, dejándose secar a 80 °C durante toda la noche.

La síntesis de los GQDs se realizó vía pirolisis de acuerdo a un protocolo adaptado [156]. En primer lugar, se calentaron 2 g de ácido cítrico durante 30 min a 200 °C. A continuación, el líquido amarillo obtenido se añadió gota a gota a 100 mL de una disolución 0.25 M de NaOH y se agitó durante 30 min. La disolución de GQDs obtenida se almacenó a 4 °C.

Finalmente, para la síntesis de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$ se empleó un procedimiento adaptado [157]. Se dispersaron 0.2 g de CoFe_2O_4 en 20 mL de agua ultrapura. Seguidamente, se añadieron 5 mL de la disolución de GQDs, 0.6 g de dopamina hidroclicada y 10 mL de una disolución tampón 0.25 M Tris-HCl (pH 8.5). La mezcla se agitó magnéticamente durante 24 h y el sólido obtenido se lavó con agua ultrapura y EtOH, y se dejó secar a 80 °C durante 6 h. Finalmente, el material se molturó para obtener un polvo fino.

4.2.7. Procedimiento de microextracción

Para cada una de las disoluciones patrón y muestra a extraer, se pesaron 7 mg de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$ en un inserto de vidrio de base plana y se añadió un imán de neodimio. A continuación, se realizó el acondicionamiento del material. Para ello, se añadieron 350 μL de EtOH, dispersando el material durante 30 s y posteriormente descartándolos. Este paso se repitió empleando agua ultrapura. Para llevar a cabo la extracción de los analitos se añadieron 350 μL de muestra o disolución patrón y 5 μL de la disolución de patrón surrogado (350 ng mL^{-1}), agitando durante 1 min. A continuación, tras detener la agitación, el material magnético se depositó en la superficie del imán y se descartó la fase dadora. Para lavar el material se añadieron 350 μL de agua ultrapura y seguidamente se descartaron. Para llevar a cabo la desorción de los analitos se añadieron 100 μL de una mezcla MeOH:THF (1:1, v/v), dispersando el sorbente durante 1 min. El extracto se transfirió a un inserto cónico situado en el interior de un vial de inyección. Se empleó una corriente de nitrógeno para la evaporación de los extractos hasta sequedad (3 min aprox.) y su consiguiente reconstitución con 30 μL de agua calidad LC-MS para su posterior análisis mediante LC-MS/MS. En la **Figura 4.3** se muestra un esquema del método propuesto.

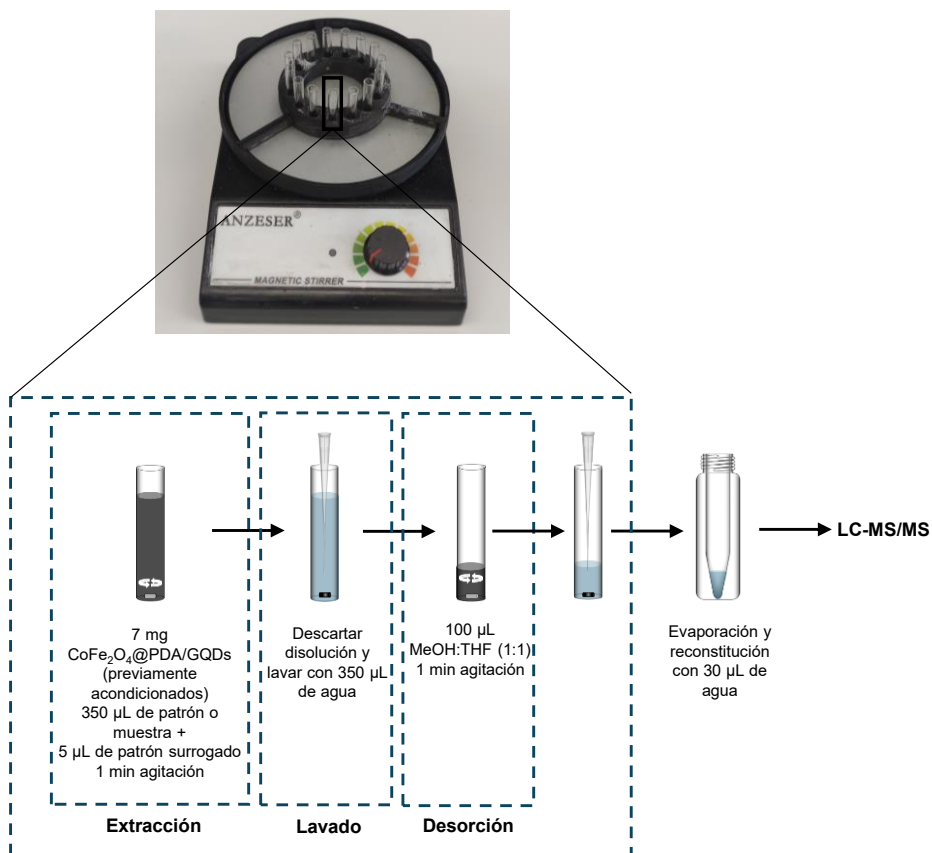


Figura 4.3. Esquema del método propuesto.

4.2.8. Condiciones LC-MS/MS

- Columna: Waters C_{18} BEH (50 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.7 μm de tamaño de partícula)
- Temperatura de la columna: 35 $^{\circ}\text{C}$
- Volumen de inyección: 5 μL
- Fase móvil: A: 0.5 mM NH_4F y B: ACN

Capítulo 4

- Gradiente:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0.0	100	0
0.5	85	15
1.0	1	99
2.0	1	99
3.0	100	0
5.0	100	0

- Caudal: 0.4 mL min⁻¹

- Duración del cromatograma: 5 min

- Modo ionización MS/MS: ESI+ y ESI-

- Voltaje: 5500 V (ESI+) y -4500 V (ESI-)

- Temperatura del gas de nebulización: 600 °C

- Presión del nebulizador: 55 psi

En la **Tabla 4.1** se muestran las transiciones empleadas para la detección instrumental de los compuestos de interés.

Tabla 4.1. Relaciones masa/carga (m/z) de los iones precursores y producto, energías de colisión y fragmentador para la 8OHdA y 8OHdG.

Analito	Ion precursor (m/z)	Ion producto ^a (m/z)	Energía de colisión (V)
8OHdA	268	152	15
		89	15
8OHdG	284	168	15
		140	43
BPS-d ₈	257	112	40
		96	38

^a En negrita se resaltan las m/z empleadas para la cuantificación

En la **Figura 4.4** se muestran los cromatogramas obtenidos al aplicar el método a una disolución patrón conteniendo 5 ng mL⁻¹ de los analitos.

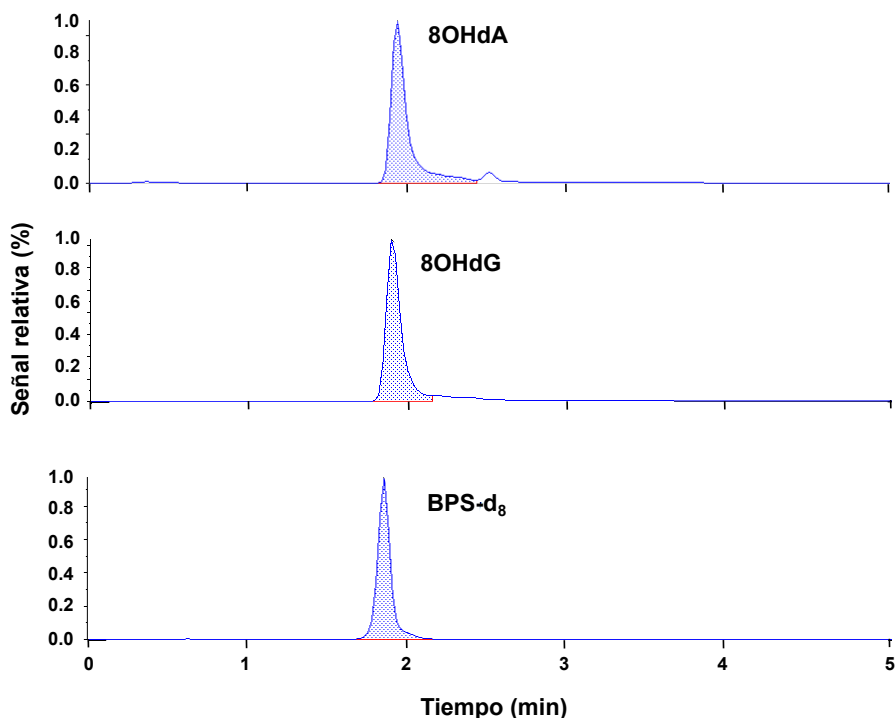


Figura 4.4. Cromatograma obtenido al aplicar el método propuesto basado en mSBSDME y su posterior análisis mediante LC-MS/MS a una disolución patrón conteniendo 5 ng mL⁻¹ de los analitos.

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Selección y rendimiento del sorbente empleado

Los compuestos aquí estudiados son moléculas polares que contienen grupos hidrofílicos (grupos hidroxilo y amino) en sus estructuras (**Tabla 3.1**), por lo que presentan una elevada afinidad por la saliva, la cual está formada mayoritariamente por agua (> 99 %), dificultando así su extracción. Por un lado, la PDA puede interaccionar con los analitos mediante puentes de hidrógeno con los grupos polares, así como mediante interacciones de tipo π - π con los anillos aromáticos. Por otro lado, los GQDs proporcionan beneficios como su reducido tamaño y fácil dispersión en agua, entre otros. Además, de forma similar a la PDA, los GQDs pueden establecer enlaces por puentes de hidrógeno e interacciones de tipo π - π con los analitos. Por esta razón, se seleccionó un

material compuesto por MNPs de ferrita de cobalto recubiertas por PDA y GQDs ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$) para llevar a cabo la extracción de los analitos. El núcleo de CoFe_2O_4 le confiere al material propiedades magnéticas, permitiendo así una fácil recuperación posterior a su dispersión. En la **Figura 4.5** se presenta un esquema gráfico de las posibles interacciones que se pueden dar entre el sorbente y los analitos. Además, los GQDs de ácido cítrico tienen un menor tamaño y presentan más grupos carboxilo en su estructura que otros puntos cuánticos basados en carbono [158].

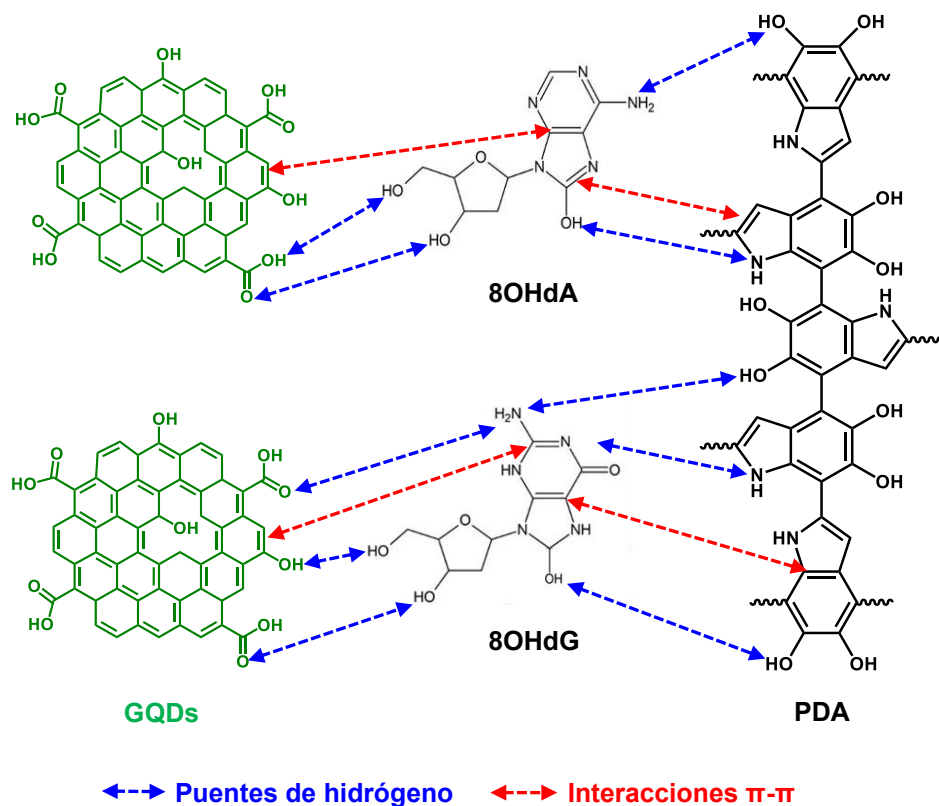


Figura 4.5. Mecanismo hipotetizado de las interacciones que pueden darse entre los analitos y el sorbente.

En primer lugar, se comparó la eficacia de extracción de diferentes materiales magnéticos. Para este propósito se realizó la extracción de una disolución patrón de 10 ng mL^{-1} de los analitos preparada en saliva sintética empleando MNPs de CoFe_2O_4 , $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4/\text{GQDs}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$. Adicionalmente, también se incluyó en la comparación un polímero magnético

de tipo HLB (CoFe₂O₄-Strata™-X) empleado en trabajos previos para la determinación de estos biomarcadores en saliva [86]. Se seleccionó el área de pico como respuesta analítica después de aplicar el procedimiento de extracción (sin optimizar). Los resultados se muestran en la **Figura 4.6**.

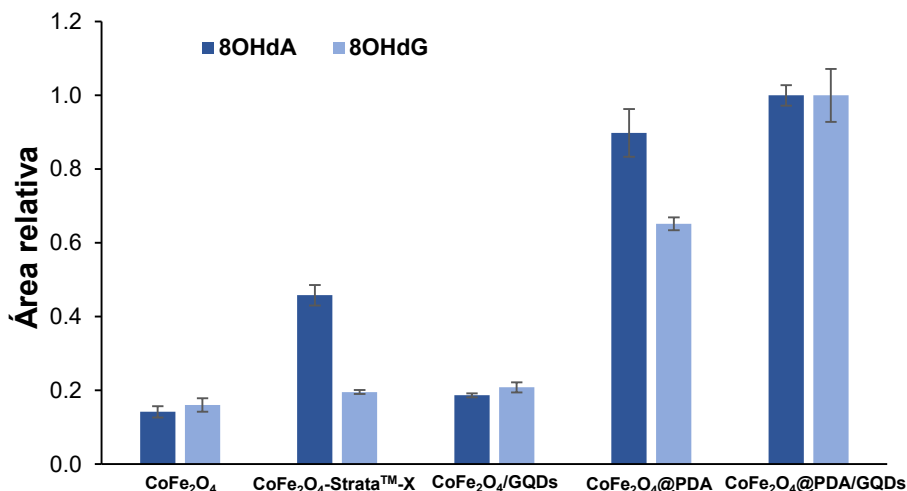


Figura 4.6. Comparación de la eficacia de extracción de los diferentes materiales ensayados.

Como se muestra en la **Figura 4.6**, la menor eficacia de extracción para ambos analitos se obtuvo con las MNPs de CoFe₂O₄, demostrando que la extracción no se produjo por interacción de los analitos con la superficie de las MNPs sino con el recubrimiento de las mismas (Strata™-X, GQDs o PDA), por lo que su función se limita a aportar magnetismo al material.

Los materiales más adecuados resultaron ser los que contenían PDA en su estructura, obteniéndose una mayor eficacia de extracción (entre 2 y 5 veces) en comparación con CoFe₂O₄-Strata™-X, lo que proporciona una mayor sensibilidad. Esto se puede deber a la mayor presencia de grupos hidrofílicos en el material basado en GQDs y PDA, impulsando así la extracción de los analitos teniendo en cuenta su carácter hidrofílico. Tampoco se obtuvo una elevada eficacia de extracción empleando CoFe₂O₄/GQDs. Esto se puede atribuir a que este material no se recuperaba totalmente después de su dispersión en agua en la etapa de acondicionamiento, conllevando pérdidas de material significativas, afectando negativamente a la eficacia de extracción de los analitos. La mejor eficacia de extracción se consiguió con CoFe₂O₄@PDA/GQDs. De esta forma, el empleo simultáneo de PDA y GQDs mejora el rendimiento en comparación a cuando se emplean por separado,

mostrando un efecto sinérgico. Además, se puede concluir que la extracción de los analitos se realiza mayoritariamente debido a su interacción con la PDA, probablemente por su mayor número de grupos funcionales presentes en su estructura. El empleo de los GQDs mejora la extracción debido a que confieren una mejor dispersión del material, incrementando el área de contacto en la etapa de extracción. Además, interaccionan con los analitos mediante puentes de hidrógeno y vía π - π .

Se calculó la eficacia de adsorción del material. Con este propósito, se midió la señal analítica de una disolución acuosa conteniendo 10 ng mL^{-1} de los analitos antes y después de realizar el procedimiento de extracción. Con este experimento se pudo determinar la cantidad de analito retenida en el sorbente, obteniendo un valor de 0.3 ng de cada analito por cada mg de material.

Se estudió la repetibilidad entre lotes para garantizar que la eficacia de extracción fuera comparable entre ellos y confirmar que la síntesis era repetible. Para ello, se sintetizaron tres lotes diferentes de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$ y se emplearon para la extracción de una disolución patrón de 10 ng mL^{-1} de los analitos preparada en saliva sintética. Como se muestra en la **Figura 4.7**, se obtuvieron resultados similares entre los distintos lotes, demostrando una buena repetibilidad de la síntesis.

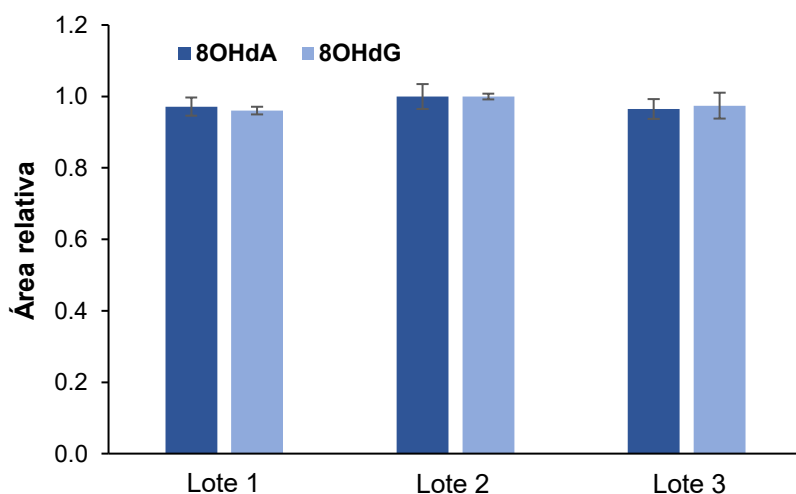


Figura 4.7. Estudio de la repetibilidad de la síntesis del material.

4.3.2. Caracterización del $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$

Se emplearon diferentes técnicas para la caracterización del material sintetizado. De esta forma, se estudió la morfología, la saturación magnética (M_s), la capacidad de adsorción y la estabilidad térmica.

La morfología del $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$ se estudió y comparó con la de las MNPs de CoFe_2O_4 empleando SEM (**Figura 4.8 a y b**) y TEM (**Figura 4.8 c y d**). Como se puede observar en las imágenes tomadas mediante SEM, ambos materiales presentan una forma esférica, obteniendo unos tamaños considerablemente superiores para el $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$ como consecuencia del recubrimiento. Las imágenes tomadas mediante TEM mostraron que el recubrimiento (PDA y GQDs) se disponía envolviendo el núcleo formado por las MNPs. Esta estructura presenta la fuerza suficiente para llevar a cabo el procedimiento de extracción sin experimentar problemas asociados al desprendimiento de la PDA y los GQDs respecto de las MNPs.

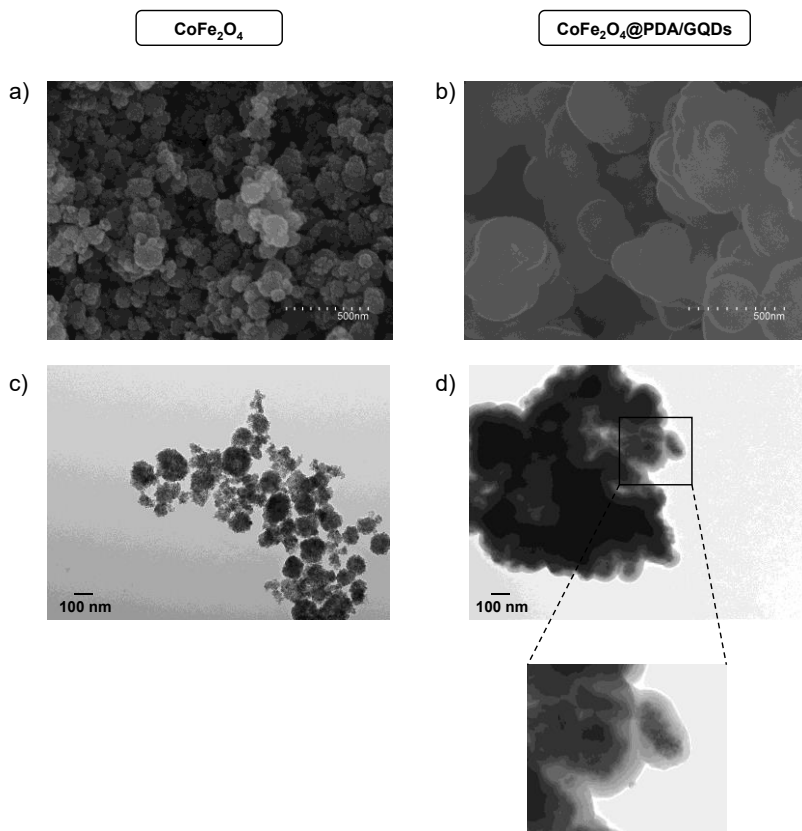


Figura 4.8. Imágenes SEM y TEM, respectivamente, de CoFe_2O_4 (a y c) y $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA}/\text{GQDs}$ (b y d).

Respecto a las propiedades magnéticas (**Figura 4.9a**), se obtuvo un valor de M_s de 27.8 emu g⁻¹ para el CoFe₂O₄@PDA/GQDs y de 74.2 emu g⁻¹ para las MNPs de CoFe₂O₄. La disminución en el valor de M_s se debe a la menor proporción de MNPs CoFe₂O₄ en el material sorbente. Sin embargo, este valor es suficiente para conseguir recuperar el material magnético después de su dispersión durante el procedimiento de la mSBSDE.

El análisis termogravimétrico (*Thermogravimetric Analysis*, TGA) se llevó a cabo bajo atmósfera de nitrógeno. Como se puede observar en la **Figura 4.9b**, desde temperatura ambiente hasta 150 °C se produce una primera pérdida progresiva de masa. Esto se puede atribuir a la evaporación del disolvente o el agua empleados en la etapa de lavado de la síntesis del material que se han quedado en el interior de sus poros. Desde 150 °C hasta 580 °C se observó una pérdida constante de masa, que se atribuyó a la degradación progresiva de la materia orgánica. Sin embargo, la pérdida de masa más significativa se observó entre 580 y 600 °C, correspondiente a la degradación final y total de la materia orgánica.

Se obtuvieron las isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno para el material sintetizado (**Figura 4.9c**). Se observó una isoterma tipo II, indicando que el sorbente presenta macroporos y una adsorción monocapa-multicapa sin restricciones hasta altos p/p^0 [159]. Se obtuvieron tamaños medios de poro de 52 nm y un área superficial de Brunauer-Emmett-Teller (BET) de 7.5 m² g⁻¹.

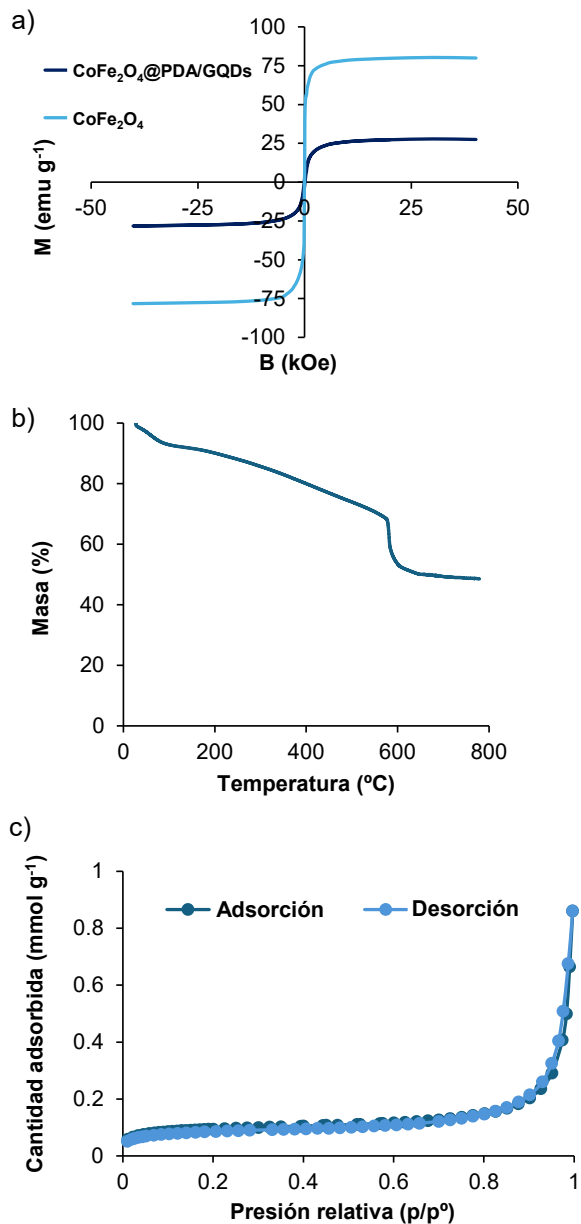


Figura 4.9. a) Curva de magnetización de CoFe₂O₄ y CoFe₂O₄@PDA/GQDs; representación de b) TGA y c) isoterma de adsorción-desorción de CoFe₂O₄@PDA/GQDs.

4.3.3. Estudio de la dilución de la saliva

La dilución de la muestra implica una disminución de los factores de preconcentración máximos teóricos, pero en algunos casos presenta beneficios debido a que se consigue reducir el efecto matriz. Por ello, se realizó un estudio de la dilución de la saliva con la finalidad de obtener información acerca de cómo afecta a la extracción de los analitos y conseguir la máxima sensibilidad posible. En este sentido, se probaron diferentes relaciones de saliva sintética y agua ultrapura (1:3, 1:1 y 3:1 (v/v)), y saliva sintética sin diluir. Para ello, se empleó una disolución patrón de saliva sintética de 5 ng mL⁻¹ diluida convenientemente, obteniendo concentraciones de 1.25, 2.5 y 3.75 ng mL⁻¹ para las diluciones 1:3, 1:1 y 3:1 (v/v), respectivamente. Como se puede observar en la **Figura 4.10**, los mejores resultados se obtuvieron empleando saliva sintética sin diluir como fase dadora. Por ello, se decidió no realizar ningún tipo de dilución en adelante.

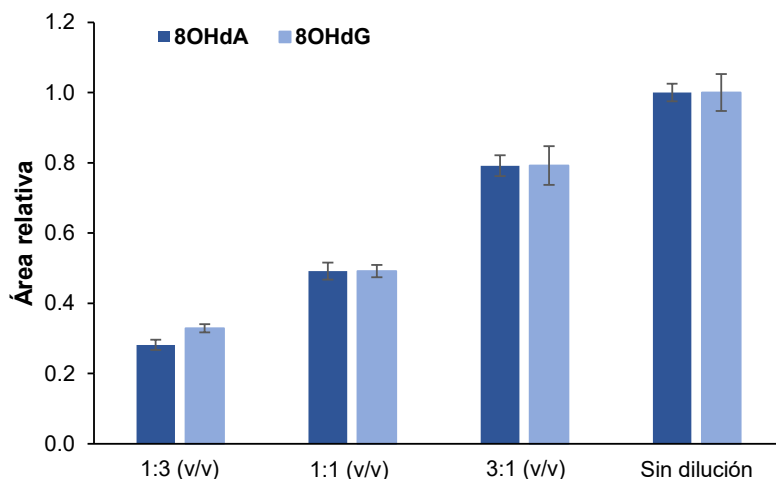


Figura 4.10. Estudio de la dilución de la saliva.

4.3.4. Optimización de las variables de extracción y desorción

4.3.4.1. Cribado de las variables

Se estudiaron diferentes variables de extracción y desorción que podían afectar al rendimiento de la mSBSDME con la finalidad de obtener la mayor sensibilidad posible. Las variables estudiadas y sus rangos fueron las siguientes: fuerza iónica (0-10 % m/v NaCl, correspondiente al contenido de NaCl añadido a la saliva sintética), masa de sorbente (0.5-10.0 mg), tiempo de extracción (1-10 min), tiempo de desorción (1-10 min) y volumen de desorción (20-100 µL). El pH no se optimizó ya que solo se emplearon 350 µL de saliva, lo que impedía la

medida del pH en la muestra para su ajuste. Una alternativa habría sido añadir una disolución tampón, pero conllevaría una dilución de la muestra, obteniendo menores factores de preconcentración. Se seleccionó una fuerza iónica máxima del 10 % ya que valores superiores dificultan la correcta dispersión y recolección del sorbente magnético debido a la elevada viscosidad de la fase dadora. Respecto a la masa de sorbente, se estableció un valor mínimo de 0.5 mg debido a la dificultad de pesar masas inferiores, y 10 mg como límite superior ya que es la cantidad máxima que admite el imán empleado en mSBSDME. Como tiempos de extracción y desorción se seleccionaron valores típicos empleados en mSBSDME (1-10 min). En cuanto al volumen de desorción, se seleccionó un valor mínimo de 20 μL para asegurar una buena dispersión del material magnético en el disolvente orgánico, y 100 μL como valor máximo para evitar un elevado consumo de tiempo en la etapa de evaporación. Esta etapa era necesaria por un lado para evitar desdoblamiento en el pico cromatográfico y por otro lado para aumentar la preconcentración de los analitos.

Debido al elevado número de variables, se realizó un estudio de cribado para identificar las que presentaban un efecto significativo, excluyendo las demás del proceso de optimización, acortando este procedimiento. Con esta finalidad se realizó un diseño de Plackett-Burman, permitiendo identificar simultáneamente el impacto de las variables seleccionadas en la respuesta analítica (área de pico) [160]. En este diseño solo se requiere un pequeño número de experimentos ya que se omite la interacción entre variables. El análisis estadístico se llevó a cabo empleando el software Minitab 19 (Minitab LLC, EE. UU.). Como se puede observar en la **Tabla 4.2**, se necesitaron un total de 12 experimentos, los cuales se realizaron empleando 350 μL de saliva sintética conteniendo 10 ng mL^{-1} de los analitos. La desorción se llevó a cabo con MeOH y el extracto se evaporó y reconstituyó con 30 μL de agua.

Tabla 4.2. Diseño Plackett-Burman para el cribado de las variables implicadas en la extracción y desorción.

Etapa	Fuerza iónica (% NaCl)		Masa de sorbente (mg)		Tiempo de extracción (min)		Tiempo de desorción (min)		Volumen de desorción (μL)	
	D ^a	C ^b	D	C	D	C	D	C	D	C
1	10	1	0.5	-1	10	1	1	-1	20	-1
2	10	1	10	1	1	-1	10	1	20	-1
3	0	-1	10	1	10	1	1	-1	100	1
4	10	1	0.5	-1	10	1	10	1	20	-1
5	10	1	10	1	1	-1	10	1	100	1
6	10	1	10	1	10	1	1	-1	100	1
7	0	-1	10	1	10	1	10	1	20	-1
8	0	-1	0.5	-1	10	1	10	1	100	1
9	0	-1	0.5	-1	1	-1	10	1	100	1
10	10	1	0.5	-1	1	-1	1	-1	100	1
11	0	-1	10	1	1	-1	1	-1	20	-1
12	0	-1	0.5	-1	1	-1	1	-1	20	-1

^a Valores descodificados

^b Valores codificados

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar los resultados y se emplearon los gráficos de Pareto para representar los efectos principales. La influencia se mide mediante el tamaño de cada barra en el gráfico y la línea vertical representa el intervalo de confianza del 95%. Por ello, cuando un efecto principal tiene una influencia significativa (positiva o negativa) la barra excede la línea vertical. Como se puede observar en la **Figura 4.11**, la masa de sorbente resultó ser una variable significativa para ambos analitos y el volumen de desorción para la 8OHdA. El tiempo de desorción no se consideró para la optimización ya que esta variable no resultó ser significativa para la 8OHdA, y para la 8OHdG estaba en el límite del 95% del intervalo de confianza, pero sin exceder la línea vertical. De este modo, se realizó una optimización multivariante empleando solo estas dos variables significativas. Respecto a las no significativas, se seleccionaron los valores mínimos (fuerza iónica sin ajustar y 1 minuto como tiempo de extracción y desorción).

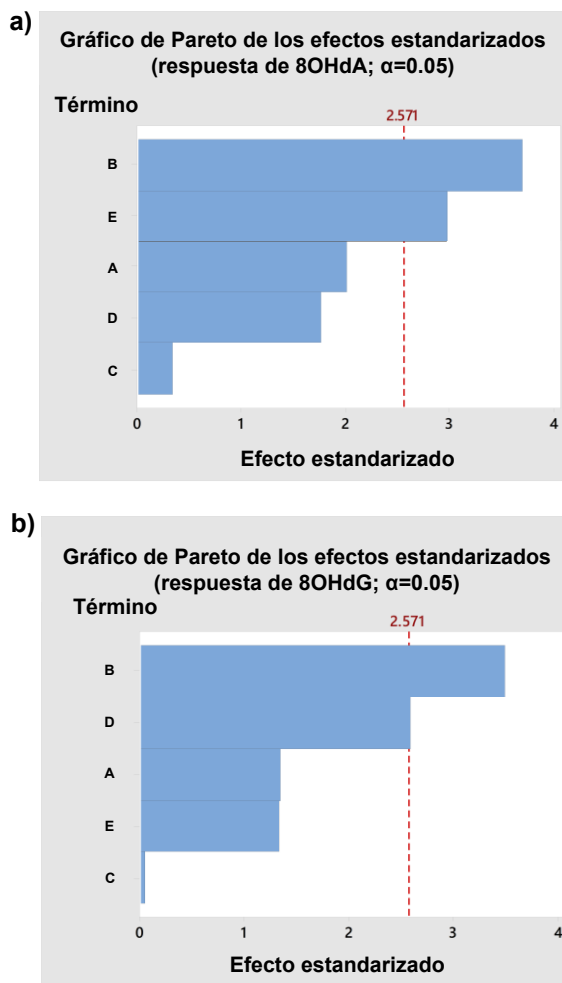


Figura 4.11. Gráficos de Pareto obtenidos en el diseño de Plackett-Burman para a) 8OHdA y b) 8OHdG. A: fuerza iónica (% NaCl (m/v)); B: masa de sorbente (mg); C: tiempo de extracción (min); D: tiempo de desorción (min); E: volumen de desorción (μL).

4.3.4.2. Optimización de las variables significativas

Se empleó una optimización multivariante basada en una metodología de superficie de respuesta (*Response Surface Methodology*, RSM) [161] a pesar de que solo dos variables resultaron ser significativas para la mSBSDME. Se requirió un número similar de experimentos para la optimización multivariante (9 experimentos) en comparación con una optimización univariante. Sin embargo, la masa de sorbente y el volumen de desorción son variables fuertemente

correlacionadas, por lo que se decidió seleccionar una optimización multivariante para poder tener en cuenta esta correlación. Se empleó una RSM basada en un diseño factorial de dos factores y tres niveles. Los rangos estudiados para cada variable fueron los seleccionados para el cribado preliminar (**Sección 4.3.4.1**). Todos los experimentos se llevaron a cabo empleando 350 μL de saliva sintética conteniendo 10 ng mL^{-1} de los analitos, dispersando el material durante 1 min tanto en la fase dadora para llevar a cabo la extracción como en MeOH para la desorción. A continuación, los extractos se evaporaron y reconstituyeron con 30 μL de agua. Como respuesta analítica se seleccionó el área de pico. Los valores de cada variable para cada experimento se presentan en la **Tabla 4.3**. Para el análisis estadístico se empleó el software Statgraphics Centurion XVI (Virginia, EEUU).

Tabla 4.3. Diseño factorial de dos factores y tres niveles empleado para la optimización multivariante de las variables significativas implicadas en el procedimiento de extracción.

Etapa	Masa de sorbente (mg)		Volumen de desorción (μL)	
	C ^a	D ^b	C	D
1	5.25	0	60	0
2	0.5	-1	20	-1
3	10	1	60	0
4	5.25	0	100	1
5	10	1	20	-1
6	0.5	-1	100	1
7	5.25	0	20	-1
8	0.5	-1	60	0
9	10	1	100	1

^aValores descodificados

^bValores codificados

La adecuación del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), obteniéndose valores superiores a 0.96 para ambos analitos. Este valor indica que el modelo diseñado es eficiente para la predicción de las respuestas. En la **Figura 4.12** se muestra la superficie de respuesta en función de la deseabilidad. Como se puede observar, masas elevadas de sorbente mostraron un efecto positivo en la extracción de los analitos. Este efecto se puede deber al aumento del área superficial capaz de adsorber los analitos, obteniendo una

mayor eficacia de adsorción en comparación con bajas masas de sorbente. Se seleccionaron 7 mg como masa óptima de sorbente ya que valores superiores no proporcionaban un aumento de la eficacia de extracción. Respecto al volumen de desorción, valores elevados proporcionaron la mayor eficacia de extracción. Esta tendencia puede estar relacionada con la elevada masa requerida para la extracción de los analitos, ya que se debe asegurar que en la etapa de desorción se dispone de suficiente disolvente para garantizar una correcta dispersión del material. En caso contrario, el material no se dispersaba completamente, de forma que no permitía una transferencia eficiente de los analitos hacia el disolvente de desorción. Por ello, se seleccionaron 100 μL como valor óptimo de volumen de desorción

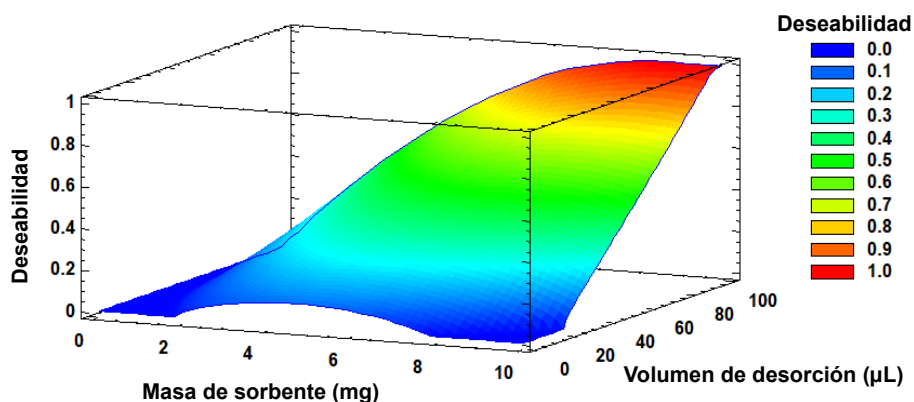


Figura 4.12. Superficie de respuesta de la función de deseabilidad representando la relación entre la masa de sorbente y el volumen de desorción.

4.3.4.3. Optimización del disolvente de desorción

Para la optimización del disolvente de desorción se empleó un diseño Simplex-Centroid [147] (**Anexo I**). Este modelo representa el triángulo de todas las mezclas posibles de tres componentes para encontrar el valor óptimo. Los disolventes puros se representan en los vértices del triángulo y las mezclas en los puntos intermedios. Se estudiaron como disolventes de desorción MeOH, EtOH y THF, empleando el software Statgraphics para el análisis estadístico. Las fracciones de las mezclas de los componentes se expresaron como valores entre 0 y 1. Se requirieron 7 experimentos y los valores de cada disolvente en cada uno de ellos se encuentran en la **Tabla 4.4**. Como respuesta analítica se empleó el área de pico y como condiciones de extracción las seleccionadas en

el cribado y la optimización previa. Todos los experimentos se llevaron a cabo con 350 μL de saliva sintética conteniendo 10 ng mL^{-1} de cada analito.

Tabla 4.4. Diseño Simplex-Centroid para la optimización del disolvente de desorción.

Etapa	MeOH	EtOH	THF
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3

La adecuación del modelo se evaluó mediante el R^2 , obteniéndose un valor superior a 0.95 para ambos analitos. Este valor indica que el modelo diseñado es eficiente para la predicción de las respuestas. Como se muestra en la **Figura 4.13**, la mezcla MeOH:THF (1:1, v/v) proporcionó la respuesta analítica más elevada, por lo que se seleccionó como valor óptimo. Estos disolventes presentan índices de polaridad de 5.1 y 4.0, respectivamente, siendo efectiva esta mezcla para desorber los analitos de la superficie del sorbente.

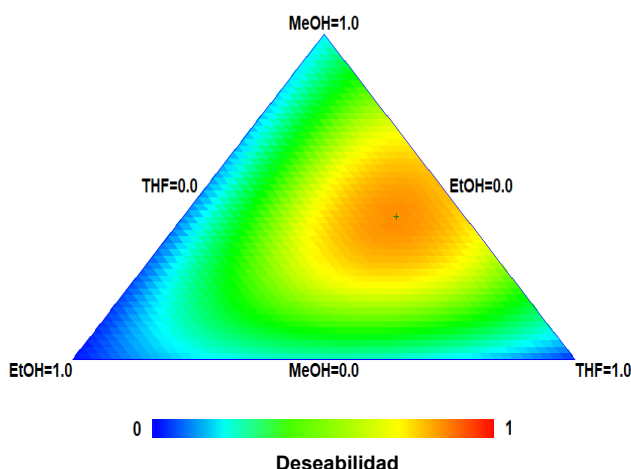


Figura 4.13. Representación gráfica del diseño Simplex-Centroid empleado para la optimización del disolvente de desorción.

4.3.5. Características analíticas del método

Se estudiaron diferentes parámetros tales como la linealidad, límites de detección (*Limit of Detection*, LOD) y cuantificación (*Limit of Quantification*, LOQ), precisión y exactitud empleando las condiciones optimizadas previamente para validar el método analítico (**Tabla 4.5**) de acuerdo con la guía armonizada ICH [149]. Además, se calcularon los factores de preconcentración (*Enrichment Factor*, EF) y los rendimientos de extracción (*Extraction Efficiency*, EE) con la finalidad de obtener información adicional acerca de las características del método.

Para determinar la linealidad, se aplicó el método a disoluciones patrón preparadas en saliva sintética conteniendo diferentes concentraciones de analitos y empleando BPS-d₈ como patrón surrogado. Como señal analítica se empleó la relación del área de los analitos con respecto al patrón surrogado. Se determinó que la linealidad se extendía hasta, al menos, 20 ng mL⁻¹, obteniendo coeficientes de determinación (R²) superiores a 0.996. Sin embargo, debido a que las concentraciones esperadas en las muestras eran inferiores se estableció un rango de trabajo de entre 0.5 y 10 ng mL⁻¹.

Para el cálculo de los EFs se aplicó el método a una disolución patrón conteniendo 10 ng mL⁻¹ de los analitos en saliva sintética. Además, se preparó una disolución patrón de la misma concentración en el disolvente de inyección (agua calidad LC-MS) y se inyectó directamente en el instrumento analítico. De acuerdo con la definición de EF, esto es la relación entre la concentración del analito en el extracto final (C_f) y la concentración del mismo analito en la disolución de partida antes de la extracción (C_i), y teniendo en cuenta la relación directamente proporcional entre el área (A) y la concentración, se puede calcular el EF de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EF = \frac{C_f}{C_i} \propto \frac{A_f}{A_i} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

Así, se obtuvieron valores de 3.8 para la 8OHdA y 3.2 para la 8OHdG.

El EE se calculó teniendo en cuenta el EF experimental (EF_{exp}) obtenido mediante la **Ecuación 4.1** y el EF máximo (EF_{max}) empleando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{EF_{exp}}{EF_{max}} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Teniendo en cuenta que el volumen de muestra es de 350 µL y el volumen del extracto final tras la reconstitución es de 30 µL, el EF máximo teórico es de 11.7. Se obtuvieron valores de EE de 33 % para la 8OHdA y 27 % para la 8OHdG.

Los LOD y LOQ se calcularon como 3 y 10 veces, respectivamente, la relación señal-ruido de una disolución patrón de 0.5 ng mL⁻¹ preparada en saliva sintética

a la que se le aplicó el método propuesto. Se obtuvieron valores de LOD y LOQ de entre 0.03 y 0.05 ng mL⁻¹ y entre 0.10 y 0.18 ng mL⁻¹, respectivamente para la 8OHdA y 8OHdG.

La precisión del método propuesto se estudió en una misma sesión de trabajo (intra-día) y en diferentes sesiones consecutivas (inter-día). Con esta finalidad, se aplicó el método a cinco réplicas independientes de disoluciones patrón multicomponentes preparadas en saliva sintética a tres niveles de concentración (0.5, 5 y 10 ng mL⁻¹) empleando BPS-d₈ como patrón surrogado. Como se puede observar en la **Tabla 4.5**, los valores obtenidos se encontraban entre 3 y 13 % para la 8OHdA y entre 4 y 13 % para la 8OHdG.

Todas estas características analíticas muestran el elevado potencial del método desarrollado para su aplicación en la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva.

Tabla 4.5. Características analíticas del método propuesto para la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva.

Analito	R ²	EF	EE (%)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Precisión (RSD, %)					
						Intra-día			Inter-día		
						0.5 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	0.5 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹
8OHdA	0.996	3.8	33	0.03	0.10	4	3	7	13	11	7
8OHdG	0.997	3.2	27	0.05	0.18	7	9	6	4	13	13

4.3.6. Estudio del efecto matriz

Para evaluar la exactitud del método y descartar la presencia de efecto matriz, se fortificaron tres muestras de saliva a dos niveles de concentración (0.5 y 5 ng mL⁻¹) y se procedió a su extracción mediante mSBSdME. A continuación, se calcularon los coeficientes de recuperación relativa, obteniendo valores entre 90 y 119% para la 8OHdA y entre 83 y 116 % para la 8OHdG (**Tabla 4.6**), indicando que el efecto matriz era despreciable. Por ello, se empleó calibración externa para la determinación de los biomarcadores de estrés oxidativo de interés en muestras de saliva seleccionando BPS-d₈ como patrón surrogado, el cual permitía corregir posibles desviaciones tanto en la etapa de medida como durante todo el proceso de extracción.

Tabla 4.6. Coeficientes de recuperación relativa obtenidos para las muestras de saliva aplicando el método propuesto.

Voluntario	Añadido (ng mL ⁻¹)	Encontrado (ng mL ⁻¹)		Coeficiente de recuperación relativa (%)	
		8OHdA	8OHdG	8OHdA	8OHdG
A	0	1.7 ± 0.2	-	-	-
	0.5	2.3 ± 0.2	0.43 ± 0.03	110 ± 10	86 ± 6
	5	6.4 ± 0.2	4.1 ± 0.3	100 ± 10	83 ± 5
B	0	0.6 ± 0.1	-	-	-
	0.5	1.1 ± 0.1	0.43 ± 0.02	100 ± 1	86 ± 3
	5	5.8 ± 0.5	5.5 ± 0.1	105 ± 7	111 ± 1
C	0	1.3 ± 0.1	-	-	-
	0.5	1.9 ± 0.1	0.43 ± 0.05	119 ± 2	90 ± 10
	5	5.8 ± 0.3	4.8 ± 0.2	90 ± 7	97 ± 3

4.3.7. Análisis de muestras reales

Se analizaron diferentes muestras de ocho personas voluntarias para demostrar la utilidad del método en la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva. Como se muestra en la **Tabla 4.7**, las concentraciones encontradas de ambos biomarcadores en las personas voluntarias sanas (1-5) estaban entre el LOD y 1.7 ng mL⁻¹, obteniendo concentraciones superiores (hasta 6 ng mL⁻¹) para las personas que presentaban diabetes tipo II (6-8). De este modo, estos resultados están en concordancia con los obtenidos en el **Capítulo 3**.

Los resultados obtenidos mostraron que el método desarrollado es adecuado para determinar estos biomarcadores de estrés oxidativo en saliva. Pese a que no es el objetivo de este capítulo, la diferencia entre las concentraciones encontradas anticipa que el método puede emplearse para discriminar entre personas sanas y con diabetes tipo II. Para confirmar esta relación se debería realizar un estudio con un número elevado de muestras.

Tabla 4.7. Resultados obtenidos aplicando el método desarrollado basado en mSBSDME a muestras de saliva de diferentes personas voluntarias.

Persona voluntaria	Concentración (ng mL ⁻¹)	
	8OHdA	8OHdG
1	1.7 ± 0.2	<LOQ
2	0.6 ± 0.1	<LOQ
3	1.3 ± 0.1	<LOQ
4	<LOD	<LOQ
5	<LOD	1.1 ± 0.1
6 ^a	6.0 ± 0.2	3.1 ± 0.3
7 ^a	4.4 ± 0.7	3.2 ± 0.4
8 ^a	<LOD	3.0 ± 0.3

^a diagnosticados con diabetes tipo II

4.3.8. Comparación con métodos previos y evaluación de la sostenibilidad

Como se ha mencionado anteriormente, solo en dos trabajos previos se llevó a cabo la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva, el primero empleando SPME [85] y el segundo SA-DSPE [86] (**Capítulo 3**), ambos utilizando LC-MS/MS como técnica instrumental. En la **Tabla 4.8** se muestra una comparación entre el método propuesto y los métodos previos en términos de características analíticas.

Respecto al volumen de muestra, el método propuesto emplea 350 µL, presentando una mejora significativa, reduciendo el volumen entre 5 y 9 veces en comparación con los métodos previos. A pesar de que la saliva es una muestra no invasiva y se puede obtener mediante salivado pasivo, es complicado obtener elevados volúmenes de muestra [162]. En concreto, el método basado en SPME requiere de 1.8 mL mientras que el basado en SA-DSPE requiere de 3 mL como consecuencia del empleo de un calibrado de adición de patrón para solventar el efecto matriz. Este aspecto se ha mejorado en el método de mSBSDME propuesto mediante la adición de un patrón surrogado capaz de corregir el efecto matriz, reduciendo el volumen de muestra requerido.

Además, en laboratorios clínicos de rutina se requieren métodos rápidos capaces de tratar la mayor cantidad posible de muestras por unidad de tiempo. En los trabajos previos, la etapa de tratamiento de muestra se llevaba a cabo en 17 min para el método de SA-DSPE (1 min de extracción + 7 min de desorción + 9 min de centrifugación) y 60 min para el basado en SPME (30 min de extracción + 30 min de desorción). Estos valores son considerablemente superiores a los 2 min empleados en el método de mSBSDME (1 min de extracción + 1 min de desorción). A pesar de que este método requiere una etapa adicional de evaporación y reconstitución (3 min), permite tratar un mayor número de muestras por unidad de tiempo debido al bajo tiempo requerido en las etapas de extracción y desorción, favorecido por el empleo de una técnica dispersiva de microextracción y un material magnético. Además, el método basado en mSBSDME es capaz de procesar hasta 15 muestras en paralelo.

Respecto a las características analíticas, se han conseguido mejoras en términos de LODs y EEs empleando mSBSDME, debido a la buena dispersión del sorbente en la fase dadora y su interacción con los analitos, alcanzando una mayor sensibilidad.

Tabla 4.8. Comparación del método desarrollado basado en mSBSDME con otros métodos previos empleando microextracción para el análisis de 8OHdA y 8OHdG en saliva.

Técnica de extracción	Volumen de muestra (mL)	Tiempo de extracción (min)	Técnica instrumental	Características analíticas	Ref.
SPME	1.8	30	LC-MS/MS	LOD: 5 ng mL ⁻¹ RSD: 3-18 % EE: 0.4-2.1 %	[85]
SA-DSPE	3	1	LC-MS/MS	LOD: 0.22-0.25 ng mL ⁻¹ RSD: 5.7-14.8 % EE: 7.2-11 %	[86]
mSBSDME	0.35	1	LC-MS/MS	LOD: 0.03-0.05 ng mL ⁻¹ RSD: 3-13 % EE: 27-33 %	Este trabajo

El impacto ambiental de la etapa de preparación de muestra se evaluó y comparó empleando la herramienta métrica AGREEprep [63]. Los resultados obtenidos mostraron que esta etapa era similar para el método desarrollado y el basado en SPME, presentando un menor impacto ambiental respecto al basado en SA-DSPE (**Figura 4.14**). Además, el método desarrollado presenta considerables mejoras en términos de tamaño de muestra (criterio 5), número

de muestras tratadas por unidad de tiempo (criterio 6) y consumo de energía por muestra (criterio 8). Sin embargo, el empleo de MeOH y THF supone una desventaja a pesar de que se emplean volúmenes muy bajos (criterio 10). Los valores considerados para cada criterio se muestran en la **Tabla 4.9**.

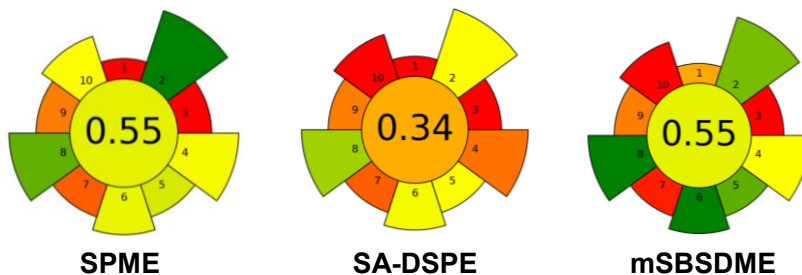


Figura 4.14. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos comparados.

Para evaluar la viabilidad del método analítico se aplicó la herramienta *Blue Applicability Grade Index* (BAGI) [70]. Valores superiores a 60 indican que el método desarrollado puede ser considerado como viable. En el caso del método basado en mSBSDME se obtuvo un valor de 62.5, mejorando los valores presentados por los métodos previos, los cuales se encontraban por debajo de 60 (**Figura 4.15**). Las diferencias más remarcables son las mejoras en términos de muestras tratadas simultáneamente, muestras por hora y cantidad de muestra. Cabe mencionar que el número de muestras tratadas por unidad de tiempo se puede mejorar empleando la plataforma basada en 96 posiciones para llevar a cabo la mSBSDME presentada recientemente por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral [163], tal y como se realiza en el **Capítulo 6**. Los valores considerados para cada criterio se muestran en la **Tabla 4.10**.



Figura 4.15. Evaluación mediante BAGI de los métodos comparados

Tabla 4.9. Valores considerados en la aplicación de la herramienta AGREEprep de los métodos comparados.

Criterio	Método		
	SPME [85]	SA-DSPE [86]	mSBSDME
1. Lugar de preparación de muestra	<i>Ex situ</i>	<i>Ex situ</i>	<i>On site</i>
2. Materiales peligrosos (g o mL)	0	0.3	0.05
3. Sostenibilidad, renovabilidad y reusabilidad de los materiales	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez
4. Residuos	1.96	12.36	2.24
5. Cantidad de muestra (g o mL)	1.8	3	0.35
6. Productividad	10	9.2	90
7. Integración y automatización	3 etapas, sistema manual	3 etapas, sistema manual	5 etapas, sistema manual
8. Consumo de energía (W)	20.83	34.4	0.2
9. Análisis instrumental	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos
10. Seguridad del operador	2 pictogramas	4 o más pictogramas	4 o más pictogramas

Tabla 4.10. Valores considerados en la aplicación de la herramienta BAGI de los métodos comparados.

Criterio	Método		
	SPME [85]	SA-DSPE [86]	mSBSDME
Tipo de análisis	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio
Análisis multielemental o individual	Análisis multielemental de 2 a 5 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de 2 a 5 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de 2 a 5 compuestos de la misma familia química
Técnica analítica	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios
Preparación de muestra simultánea	2-12	2-12	13-95
Preparación de muestra	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción
Muestras por hora	5-10	5-10	>10
Reactivos y materiales	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes	Necesitan sintetizarse en el laboratorio con instrumentación común de forma simple
Preconcentración	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas
Grado de automatización	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes
Cantidad de muestra	>1000 µL (o mg) muestras biológicas	>1000 µL (o mg) muestras biológicas	100-500 µL (o mg) muestras biológicas

4.4. Conclusiones

En el presente capítulo se ha desarrollado un método para la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva, el cual supone un avance respecto a los métodos previos con la misma finalidad. El sorbente empleado ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{PDA/GQDs}$) mejora la extracción de los analitos mediante interacciones hidrofílicas, hidrofóbicas y tipo π - π . Además, el uso de la mSBSDME permite tratar un elevado número de muestras por unidad de tiempo, ya que al tratarse de una técnica dispersiva requiere de cortos tiempos de extracción y desorción (1 min) y se pueden tratar hasta 15 muestras de forma simultánea (lo que puede incrementarse empleando la plataforma de 96 posiciones). El método propuesto se ha validado en términos de linealidad, sensibilidad y precisión, obteniendo buenos valores para todos los parámetros. Se han obtenido coeficientes de recuperación relativa entre 83 y 119 %, demostrando que el efecto matriz es despreciable y se puede emplear calibración externa con BPS- d_8 como patrón surrogado. Adicionalmente, se ha demostrado la aplicabilidad del método mediante el análisis de muestras de saliva de personas voluntarias sanas y diagnosticadas con diabetes tipo II, obteniendo valores superiores de los biomarcadores para estas últimas. Si bien sería de gran interés confirmarlo con el análisis de un elevado número de muestras. El método desarrollado se ha comparado con los trabajos previos con la misma finalidad, obteniendo mejoras en términos de cantidad de muestra, número de muestras tratadas por unidad de tiempo, límites de detección, rendimiento de extracción y viabilidad.

Capítulo 5

Determinación de bisfenoles en suero y orina mediante microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo:

G. Peris-Pastor, E.E. Lara-Molina, J.L. Benedé, A. Chisvert, Boosting miniaturization in clinical analysis: determination of bisphenols in human serum and urine by miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 417 (2025) 155-165



Resumen

En este capítulo se presenta el desarrollo de un método analítico y sostenible para la determinación de bisfenoles en suero y orina mediante microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, mSBSDME). Los bisfenoles son compuestos que presentan un marcado poder de disrupción endocrina, por lo que su determinación en fluidos biológicos es de gran importancia para obtener información sobre la exposición de la población a estos compuestos. Para llevar a cabo la extracción de los analitos de las matrices biológicas mediante mSBSDME se ha empleado como sorbente un material magnético basado en una red orgánica covalente (*Covalent Organic Framework*, COF), mostrando un buen rendimiento de extracción debido a las interacciones tipo π - π , hidrofóbicas y dipolo-dipolo con los analitos. Debido a que estos compuestos se conjugan en el cuerpo humano con el ácido glucurónico y el sulfato, se ha realizado una enzimólisis empleando una mezcla comercial de β -glucuronidasa y arilsulfatasa previa al procedimiento de microextracción, con la finalidad de determinar el contenido total de bisfenoles. Como técnica de detección se ha empleado la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS), obteniendo una buena sensibilidad y selectividad. El método se ha validado para ambas matrices, obteniendo una buena linealidad hasta al menos 100 ng mL^{-1} , límites de detección en el rango bajo de ng mL^{-1} , valores de precisión inferiores al 15 % y coeficientes de recuperación relativa entre 80 y 127 %. Para demostrar la aplicabilidad del método propuesto se han analizado muestras de cinco mujeres voluntarias con la finalidad de ofrecer una herramienta práctica para la monitorización de la exposición de estos disruptores endocrinos en la población femenina con el propósito final de que el método pueda ser útil en el estudio de problemas de fertilidad en mujeres. Este nuevo procedimiento aumenta la implementación de las aplicaciones de preparación de muestra miniaturizadas en muestras biológicas para el análisis clínico.

5.1. Introducción

El bisfenol A (BPA) y sus análogos han sido ampliamente empleados en la producción de resinas y poliacrilatos, presentes en productos de uso diario como botellas de plástico, recipientes alimenticios, lentes oculares o electrodomésticos, entre otros [164]. Cabe señalar que el cuerpo humano está altamente expuesto a estos compuestos, como se ha evidenciado por su presencia en diferentes fluidos biológicos como orina, sangre o saliva, entre otros [165,166]. Además, se ha demostrado que los bisfenoles presentan un marcado carácter de disrupción endocrina pudiendo provocar problemas de salud debido a su toxicidad y a sus efectos sobre el sistema reproductivo, como genotoxicidad o infertilidad [167–169]. Por esta razón, es importante su biomonitorización en la población humana, así como el estudio de los niveles de estos compuestos en fluidos biológicos que pueden causar enfermedades con la finalidad de tomar medidas a tiempo.

El volumen disponible de algunos fluidos biológicos es en ocasiones limitado, bien debido a su propia naturaleza (sangre, saliva, fluido cerebroespinal, etc.), bien debido a las particularidades de los pacientes (recién nacidos, gente de avanzada edad, pacientes inmunodeprimidos o con algún tipo de enfermedad) o bien que la muestra se requiera para otros fines como la medida de otros parámetros. Además, las matrices biológicas presentan una elevada complejidad debido al elevado número de posibles interferentes, la presencia de macromoléculas como polisacáridos, proteínas, o lípidos, y también debido a los bajos niveles a los que se encuentran algunos de los analitos. Por ello, se requiere realizar una etapa de tratamiento de muestra como etapa de limpieza para eliminar posibles interferentes y como etapa de preconcentración para alcanzar la sensibilidad necesaria [170,171]. Asimismo, cabe destacar que los laboratorios de análisis clínico requieren tratar un gran número de muestras diariamente y proporcionar los resultados tan pronto como sea posible.

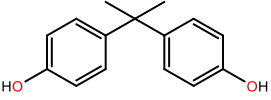
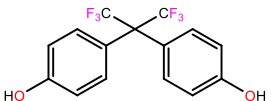
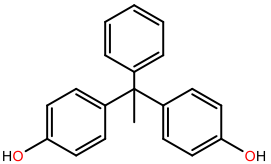
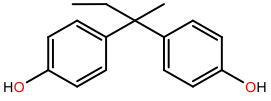
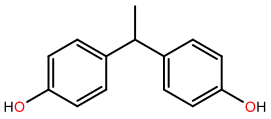
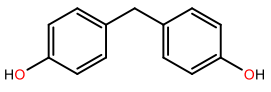
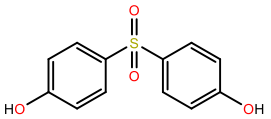
Una opción interesante para superar los retos mencionados es el empleo de técnicas de microextracción en la etapa de preparación de muestra. En estos enfoques, el impacto ambiental se minimiza debido a la reducción de los recursos necesarios, los desechos producidos y el consumo de energía, cumpliendo con los principios de la *Green Sample Preparation* (GSP) [4]. Adicionalmente, los dispositivos de microextracción suelen requerir un menor espacio físico, pudiendo tratar más muestras de forma simultánea, lo cual es un aspecto muy importante en el análisis clínico de rutina. Todo esto se ha descrito con más profundidad en el **Capítulo 2**. Además, la viabilidad de los métodos analíticos en términos de productividad y eficacia tanto práctica como económica se ha puesto en el foco de interés recientemente [70].

La determinación de bisfenoles se ha realizado en diferentes fluidos biológicos como sangre, orina, leche materna o fluido folicular [172]. En el análisis de

muestras de suero y orina se han empleado mayoritariamente técnicas de extracción convencionales como la extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*, SPE) o la extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE) [173–181], sin embargo estas son contrarias a los principios de la GSP. De entre todas las técnicas de extracción miniaturizadas disponibles, aquellas que se basan en la dispersión de la fase extractante mejoran la cinética de extracción, obteniendo procedimientos más rápidos que en las técnicas no dispersivas [182], cumpliendo en gran medida con todos los requisitos mencionados anteriormente. En este contexto, la microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) ha sido la técnica mayoritariamente empleada en orina, ya que se encuentran disponibles grandes volúmenes de muestra [183–187]. Por el contrario, el empleo de técnicas de microextracción basadas en sorbentes se ha aplicado solo al análisis de orina, pero no han sido ampliamente explotadas [188,189].

El objetivo de este capítulo es el desarrollo de un método analítico práctico para la determinación del contenido total de bisfenoles en suero y orina, con el propósito de que pueda ser aplicado en laboratorios de bioanálisis. En concreto, se pretende determinar BPA, bisfenol AF (BPAF), bisfenol AP (BPAP), bisfenol B (BPB), bisfenol E (BPE), bisfenol F (BPF) y bisfenol S (BPS), cuyas estructuras se muestran en la **Tabla 5.1**. La extracción de los analitos se va a llevar a cabo empleando la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, mSBSDME) [81], que ha demostrado ser una herramienta prometedora para el análisis de muestras de bajo volumen. Esta técnica requiere un máximo de 350 µL de fase dadora (muestra) y presenta un fácil manejo debido al empleo de materiales magnéticos como sorbentes, evitando etapas como la centrifugación. En esta aplicación en concreto, se empleará un material magnético que presenta una red orgánica covalente (*Covalent Organic Framework*, COF) como sorbente. Debido a la dispersión del material en la fase dadora se pretenden obtener elevadas cinéticas de extracción, requiriendo bajos tiempos de extracción. Además, el soporte impreso en 3D permite el tratamiento de hasta 15 muestras de forma simultánea, permitiendo el análisis de un gran número de muestras por unidad de tiempo. Dado que parte de los analitos se pueden encontrar en el cuerpo humano conjugados con ácido glucurónico o sulfato, se requiere de una etapa de enzimólisis previa a la extracción para llevar a cabo su desconjugación y determinar el contenido total de bisfenoles y no solo la fracción libre. Para este propósito, se empleará una mezcla enzimática comercial conteniendo β-glucuronidasa y arilsulfatasa [190]. Además, para obtener un método lo más sensible y selectivo posible, la identificación y cuantificación de los analitos se llevará a cabo mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS).

Tabla 5.1. Estructura molecular y algunas propiedades relevantes de los analitos.

Analitos	Estructura molecular	$\log P_{ow}^a$	M_w (g mol ⁻¹) ^b
BPA		3.6	228.3
BPAF		4.0	336.3
BPAP		4.3	290.3
BPB		4.1	242.3
BPE		3.2	214.3
BPF		2.8	200.3
BPS		2.1	250.3

^a P_{ow} : Coeficiente de partición octanol-agua

^b M_w : Masa molecular

5.2. Experimental

5.2.1. Reactivos

Se emplearon BPA ≥ 99 %, BPAF ≥ 99 %, BPAP ≥ 99 %, BPB ≥ 98 %, BPE ≥ 98 %, BPF ≥ 98 %, BPS ≥ 98 % y bisfenol A deuterado (BPA-d₁₆) ≥ 98 % utilizado como patrón surrogado (para la cuantificación de BPA, BPAF, BPAP, BPB y BPE) de Sigma-Aldrich (St. Louis. EE. UU.). Se empleó bisfenol S deuterado

(BPS- d_8) ≥ 99 % como patrón surrogado (para la cuantificación de BPS y BPF) de CDN isotopes (Quebec, Canadá).

Para la síntesis del COF magnético se empleó $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de Acros Organics (Geel, Bélgica), acetato de sodio anhidro y ácido acético de Scharlab (Barcelona, España), etilenglicol y dimetilsulfóxido (DMSO) de Thermo Scientific Chemicals (Waltham, EE. UU.), (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) y tereftalaldehído (TPA) de Sigma-Aldrich, 1,3,5-tris(4-aminofenil)amina (TAPA) de BLD Pharmatech GMBH (Kaiserslautern, Alemania), etanol (EtOH) y acetonitrilo (ACN) grado LC de PanReac AppliChem (Damstad, Alemania) y agua ultrapura (resistividad $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtenida a través de un sistema de purificación de agua Adrona (Riga, Letonia).

Para la preparación de suero sintético y orina sintética se adquirió cloruro de potasio (KCl) y dihidrógeno fosfato de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de PanReac AppliChem, cloruro de sodio (NaCl) de Fisher Chemical (Loughborough, Reino Unido), hidrogeno fosfato de disodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), dihidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4), sulfato de magnesio (MgSO_4) e hidrogeno carbonato de sodio (NaHCO_3) de Scharlab, urea de VWR Chemicals (Fontenay-sous-Bois, Francia), creatinina de Thermo Scientific, citrato de sodio de Guinama (La Pobla de Vallbona, España) y cloruro de amonio (NH_4Cl) y cloruro de calcio (CaCl_2) de Probus (Badalona, España).

Para realizar la enzimólisis de las muestras de suero y orina se empleó β -glucuronidasa/arilsulfatasa de Roche (Mannheim, Alemania), ácido fórmico y ácido acético de Scharlab y acetato de amonio de Sigma-Aldrich.

Se empleó EtOH grado LC de PanReac AppliChem como disolvente de desorción.

Se adquirió agua grado LC-MS de PanReac AppliChem, metanol (MeOH) grado LC-MS de Honeywell (Seelze, Alemania) y fluoruro de amonio (NH_4F) 98 % de Acros Organics para la preparación de la fase móvil.

Como gas de nebulización en la fuente MS/MS y para la evaporación de los extractos posterior al proceso de extracción se empleó nitrógeno obtenido a través de un generador NiGen LCMS 40-1 de Claind S.r.l. (Lenno, Italia), mientras que se empleó nitrógeno extrapuro (> 99.999 %) de Praxair (Madrid, España) como gas de colisión en la celda de colisión del MS/MS.

5.2.2. Instrumentación

Para llevar a cabo la mSBSDME se empleó un dispositivo multiextracción desarrollado por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral [81] que consistía en un agitador magnético MX-3K (18

W, 0-3000 rpm) de Anzeser (Frankfurt am Main, Alemania) al que se le acopla un soporte diseñado en 3D con capacidad para 15 insertos de vidrio de base plana (**Figura 5.1**). Estos insertos de Labbox (Barcelona, España) se emplearon como recipientes en la etapa de microextracción y presentaban una capacidad de 400 μL (31 mm de altura y 4 mm de diámetro interno), mientras que los imanes cilíndricos de NdFeB (3 mm de longitud y 2 mm de diámetro) utilizados para dispersar el sorbente se adquirieron de Supermagnete (Gottmadingen, Alemania).



Figura 5.1. Dispositivo multiextracción de 15 posiciones empleado para llevar a cabo la mSBSDME.

Para la preparación de suero sintético y orina sintética se utilizó un medidor de pH Basic 20 de Crison (Alella, España). En la etapa de síntesis del sorbente se empleó un baño de ultrasonidos de JP Selecta (Barcelona, España). En la etapa de enzimólisis se requirió el empleo de un agitador vórtex ZX3 de VELP Scientifica (Usmate Velate, Italia) y de un agitador orbital termostatzado Thermo Shaker TS-100 de Biosan (Riga, Letonia). En la última etapa de la enzimólisis se empleó una centrífuga Microspin 12 de Biosan para separar el precipitado del sobrenadante. Para llevar a cabo la evaporación de los extractos se empleó un evaporador Stuart SBHCONC/1 de Cole-Parmer (Staffordshire, Reino Unido).

Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos Agilent Technologies 1100 Series equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, inyector automático y un horno con una columna Kinetex C₁₈ (150 mm de longitud, 3 mm de diámetro interno y 2.6 μm de tamaño de partícula), acoplada a un detector Agilent 6410B Triple Quad MS/MS.

5.2.3. Toma de muestra y pretratamiento

Las muestras de suero y orina fueron proporcionadas por el IVIRMA (Instituto Valenciano de Infertilidad – Reproductive Medicine Associates) Barcelona.

Estas se recolectaron en tubos de polipropileno de 2 mL y se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis. Todas las mujeres voluntarias (de entre 18 y 46 años de edad) dieron su consentimiento por escrito a participar en este estudio, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad de Valencia y el Hospital Clínic de Barcelona.

Para realizar la enzimólisis de las muestras de suero y orina, en primer lugar, se dejaron descongelar a temperatura ambiente. A continuación, se transfirieron 100 μL de cada muestra a un microtubo de centrifuga y se añadieron 25 μL de una disolución de 20 ng mL^{-1} de los patrones surrogados y 250 μL de tampón de acetato de amonio (1 M, pH 4.7) conteniendo 240 unidades de β -glucuronidasa y 1920 unidades de arilsulfatasa. La adición de los patrones surrogados en esta etapa de preparación de muestra permite mejorar la imprecisión y corregir posibles desviaciones en el tratamiento de muestra, así como en la medida instrumental. Se aplicó agitación mediante vórtex a la mezcla y se incubó a 37 °C durante 12 h. A continuación, se añadieron 125 μL de ácido fórmico 0.5 M para llevar a cabo la precipitación de las proteínas y se centrifugó durante 5 min a 12500 rpm. Finalmente, el precipitado se descartó y el sobrenadante se empleó en las siguientes etapas (**Figura 5.2**).

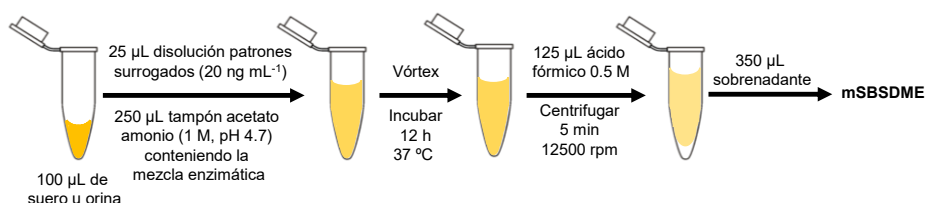


Figura 5.2. Tratamiento de las muestras previo a la mSBSDE.

5.2.4. Preparación de suero sintético y saliva sintética

Se empleó tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline* PBS) pH 7.4 como suero sintético, preparándose de acuerdo con un protocolo modificado [191]. Para ello, se preparó una disolución en agua ultrapura conteniendo NaCl (8.00 g L^{-1}), KCl (0.20 g L^{-1}), KH_2PO_4 (0.24 g L^{-1}) y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1.44 g L^{-1}), ajustando el pH a 7.4.

La orina sintética también se preparó de acuerdo con un protocolo modificado [192]. Para ello, se preparó una disolución acuosa conteniendo urea (12.01 g L^{-1}), creatinina (0.45 g L^{-1}), citrato de sodio (1.29 g L^{-1}), NaCl (3.16 g L^{-1}), KCl (2.24 g L^{-1}), NH_4Cl (0.80 g L^{-1}), $\text{CaCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.91 g L^{-1}), MgSO_4 (0.24 g L^{-1}), NaHCO_3 (0.17 g L^{-1}), Na_2SO_4 (1.28 g L^{-1}), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.57 g L^{-1}), y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (0.36 g L^{-1}), ajustando el pH a 6.2.

5.2.5. Preparación de las disoluciones patrón

Las disoluciones patrón de cada bisfenol y de los dos patrones surrogados se prepararon en ACN a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. A partir de las disoluciones individuales de los analitos, se preparó una disolución multicomponente de 100 ng mL^{-1} en suero sintético u orina sintética (**Sección 5.2.4**). El empleo de estas disoluciones tiene por finalidad imitar el contenido salino del suero y la orina reales, evitando así el posible efecto matriz causado por la diferencia de fuerza iónica de las disoluciones patrón y las muestras. Para evitar la degradación de los analitos, las disoluciones se almacenaron a 4°C y se protegieron de la exposición a la luz. A partir de la disolución patrón de 100 ng mL^{-1} , se prepararon en suero sintético u orina sintética disoluciones patrón de trabajo para obtener el calibrado ($0.5\text{-}10 \text{ ng mL}^{-1}$). Por otro lado, se preparó en ACN una disolución intermedia conteniendo ambos patrones surrogados a $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, y una disolución final conteniendo 20 ng mL^{-1} .

Para preparar los patrones del mismo modo que las muestras (**Sección 5.2.3**), se mezclaron $100 \mu\text{L}$ de cada disolución patrón con $25 \mu\text{L}$ de la disolución multicomponente de patrones surrogados de 20 ng mL^{-1} , $250 \mu\text{L}$ de tampón de acetato de amonio (1 M , $\text{pH } 4.7$) y $125 \mu\text{L}$ de ácido fórmico 0.5 M .

5.2.6. Síntesis del material empleado como sorbente

La síntesis del COF magnético consistió en tres etapas [193]. La primera fue la síntesis de nanopartículas magnéticas (*Magnetic Nanoparticles*, MNPs) de CoFe_2O_4 mediante un método solvotermal modificado [194]. En primer lugar, se pesaron 4.05 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (15 mmol), 1.78 mg de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (7.5 mmol) y 10.8 g de acetato de sodio anhidro, los cuales se disolvieron en 120 mL de etilenglicol, obteniendo una disolución de color naranja. Para asegurar la homogeneidad y la total disolución de los sólidos, se agitó vigorosamente durante 30 min . A continuación, la mezcla se trasvasó a dos reactores solvotermales de teflón que fueron sellados y calentados a 200°C durante 8 h . Finalmente, las MNPs obtenidas se decantaron y se lavaron con EtOH, dejándose secar a 80°C durante toda la noche.

La segunda etapa consistió en la amino-funcionalización de las MNPs previamente sintetizadas [195]. Para ello, se añadieron 0.5 g de CoFe_2O_4 a una disolución de 25 mL de EtOH y 2 mL de agua. La mezcla se mantuvo en baño de ultrasonidos durante 30 min , y posteriormente se añadió 1 mL de APTES. Para llevar a cabo la reacción, la suspensión se agitó magnéticamente durante 24 h a temperatura ambiente. Finalmente, el polvo negro obtenido se decantó, se lavó con agua y EtOH y se dejó secar durante toda la noche a 80°C .

La última etapa consistió en el recubrimiento del COF. Esta etapa se basa en el enlace covalente de los grupos amino con los grupos aldehído del TPA, obteniendo la red orgánica en la superficie de las MNPs. Con esta finalidad, se dispersaron 0.3 g de las MNPs amino-funcionalizadas, 0.06 g de TPA (0.45 mmol) y 0.087 g de TAPA (0.3 mmol) en 60 mL de DMSO durante 30 min en baño de ultrasonidos. A continuación, se añadieron 2 mL de ácido acético gota a gota mientras la mezcla se mantenía agitada magnéticamente. La agitación se mantuvo durante 30 min, permitiendo la formación del material ($\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{COF}$). Seguidamente, el polvo marrón obtenido se decantó, se lavó con ACN y se secó a 80 °C durante 4 h. Finalmente, el material obtenido se molturó para obtener un polvo fino.

5.2.7. Procedimiento de *mSBSDME*

Para cada una de las disoluciones a extraer de patrón o de sobrenadante obtenido tras la enzimólisis, se pesaron 0.5 mg de $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{COF}$ en un inserto de vidrio de base plana y se añadió un imán de neodimio. A continuación, se añadieron 350 μL de disolución a extraer, agitando durante 1 min. Tras detener la agitación, el material magnético se depositó en la superficie del imán y se descartó la fase dadora. Para lavar el material se añadieron 350 μL de una mezcla 99:1 (v/v) de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ y seguidamente se descartaron. Para llevar a cabo la desorción de los analitos se añadieron 20 μL de EtOH, dispersando el sorbente durante 1 min. Posteriormente, el extracto se transfirió a un inserto cónico situado en el interior de un vial de inyección. Se empleó una corriente de nitrógeno para la evaporación de los extractos hasta sequedad (2 min aprox.) y su consiguiente reconstitución con 20 μL de una mezcla 70:30 (v/v) de $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ para su posterior análisis mediante LC-MS/MS. En la **Figura 5.3** se muestra un esquema del método propuesto.

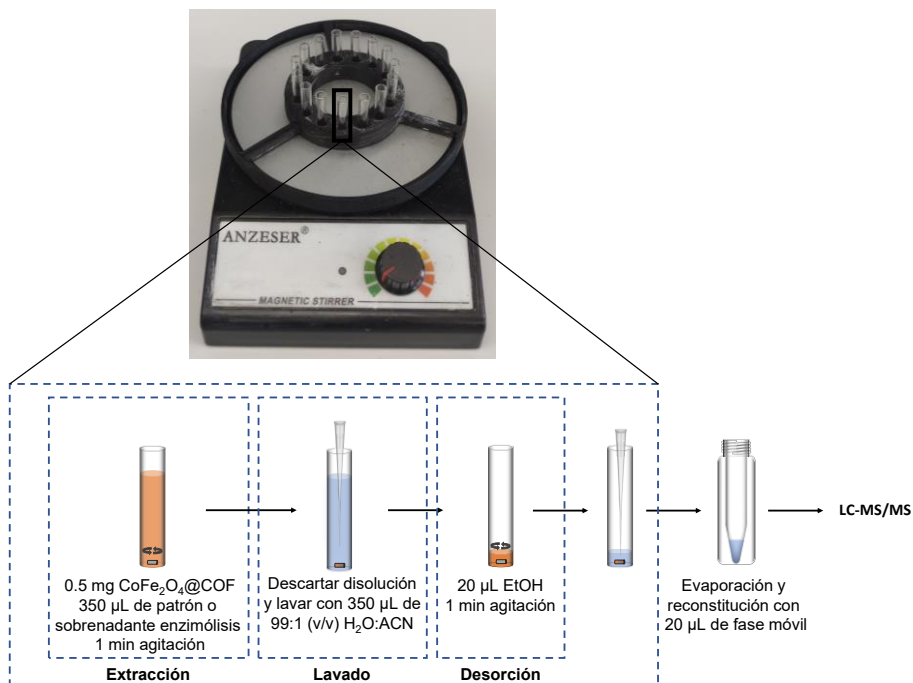


Figura 5.3. Esquema del método propuesto.

5.2.8. Condiciones LC-MS/MS

- Columna: Kinetex C_{18} (150 mm longitud, 3 mm de diámetro interno y 2.6 μm de tamaño de partícula)
- Temperatura de la columna: 40 $^{\circ}\text{C}$
- Volumen de inyección: 10 μL
- Fase móvil: A: 0.5 mM NH_4F y B: MeOH

Capítulo 5

- Gradiente:

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0.0	30	70
0.5	0	100
2.5	0	100
2.6	30	70
14.0	30	70

- Caudal: 0.25 mL min⁻¹
- Duración del cromatograma: 14 min
- Modo de ionización MS/MS: ESI-
- Voltaje: -5000 V (ESI-)
- Temperatura del gas de nebulización: 230 °C
- Flujo del gas de nebulización: 12 L min⁻¹
- Presión del nebulizador: 40 psi

En la **Tabla 5.2** se muestran las transiciones empleadas para la determinación instrumental de los compuestos de interés.

Tabla 5.2. Relaciones masa/carga (m/z) de los iones precursores y producto, energías de colisión y fragmentador para los analitos y los patrones surrogados.

Analito	Ion precursor (m/z)	Ion producto ^a (m/z)	Energía de colisión (V)	Fragmentador (V)
BPA	227	212	16	152
		133	24	
BPA-d ₁₆	241	223	18	170
		142	30	
BPAF	335	265	22	165
		197	40	
BPAP	289	274	18	180
		-	-	
BPB	241	212	16	170
		147	22	
BPE	213	198	14	150
		197	32	
BPF	199	93	24	140
		105	20	
BPS	249	108	28	170
		92	36	
BPS-d ₈	257	112	30	60
		96	38	

^a En negrita se resaltan las m/z empleadas para la cuantificación

En la **Figura 5.4** se muestran los cromatogramas obtenidos al aplicar el método desarrollado a una disolución patrón conteniendo 5 ng mL⁻¹ de los analitos.

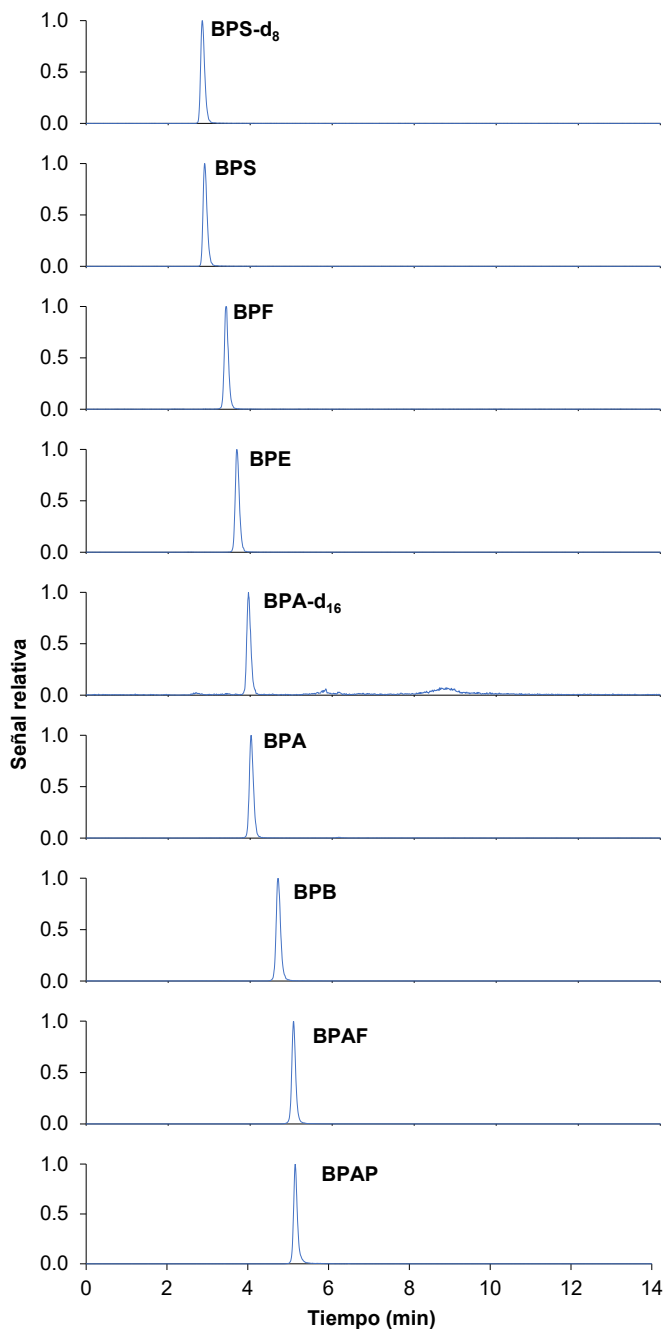


Figura 5.4. Cromatograma obtenido al aplicar el método basado en mSBSDME y su posterior análisis mediante LC-MS/MS a una disolución patrón conteniendo 5 ng mL⁻¹ de los analitos.

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Selección de la metodología de preparación de muestra y condiciones

Como técnica de extracción se eligió la mSBSDME debido a su demostrada capacidad para el análisis de muestras biológicas de bajo volumen, donde los analitos se encuentran a un nivel bajo de concentración [81,163]. De hecho, esta metodología ha sido empleada para la determinación de bisfenoles en fluido folicular obteniendo excelentes parámetros analíticos [193]. En este trabajo se ha expandido el empleo de esta técnica al análisis de suero y orina, con la finalidad de contribuir a un mapa contextual de la exposición de las mujeres a estos disruptores endocrinos, de forma que permita estudiar su relación con los problemas de fertilidad.

La etapa de pretratamiento de muestra debe ser la adecuada dependiendo de la naturaleza de la misma. Los bisfenoles son compuestos tóxicos que se conjugan en el hígado mediante diferentes rutas metabólicas para facilitar su secreción a través de diferentes fluidos biológicos [196]. Las reacciones de conjugación más comunes son con ácido glucurónico y sulfato. Estos han sido considerados como mecanismos de detoxificación debido a que los bisfenoles conjugados no se unen a los receptores estrógenos [197,198]. Por ello, estos compuestos se encuentran presentes en los fluidos biológicos como una mezcla de bisfenoles libres y conjugados [190]. Como se ha mencionado previamente, se requiere una etapa de enzimólisis de la muestra para poder transformar los bisfenoles conjugados en bisfenoles libres, de forma que se pueda determinar su contenido total. Con esta finalidad, se empleó una mezcla enzimática comercialmente disponible de β -glucuronidasa y arilsulfatasa de *Helix pomatia*.

Respecto a las condiciones de la etapa de extracción, la selección del sorbente se basó en las propiedades fisicoquímicas de los analitos, así como los requerimientos de la técnica de microextracción. En este caso se consideró la aromaticidad e hidrofobicidad de los bisfenoles (coeficientes de partición octanol-agua entre 2.1 y 4.3) y el magnetismo requerido para poder llevar a cabo la mSBSDME. El $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{COF}$ empleado en este trabajo cumple perfectamente todos los requisitos [193]. Por un lado, el COF formado por dos compuestos aromáticos como son el TAPA y TPA proporciona unos buenos rendimientos de extracción debido a interacciones tipo π - π , hidrofóbicas y dipolo-dipolo entre los analitos y el material. Por otro lado, las MNPs empleadas como base del composite proporcionan la suficiente capacidad magnética.

Las variables que afectan a la extracción y la desorción (masa de sorbente, tiempo de extracción, tiempo de desorción y fuerza iónica) se optimizaron en un trabajo previo realizado por el grupo de investigación en el que se ha desarrollado la presente Tesis Doctoral [193], obteniéndose los siguientes

valores: 0.5 mg de masa de sorbente, 1 min de tiempo de extracción, 1 minuto de tiempo de desorción y sin ajuste de la fuerza iónica. Sin embargo, como disolvente de desorción se empleaba tetrahidrofurano (THF). Con la finalidad de conseguir un método más sostenible en este capítulo, se realizó una comparación entre THF y EtOH como disolventes de desorción. Para ello se llevó a cabo el procedimiento de extracción empleando las condiciones seleccionadas de una disolución patrón conteniendo 5 ng mL^{-1} de los analitos y se emplearon $20 \text{ }\mu\text{L}$ del correspondiente disolvente para la desorción. Como se muestra en la **Figura 5.5**, se obtuvo una mejor eficacia de extracción con EtOH para la mayoría de los analitos, por lo que se empleó este disolvente como disolvente de desorción debido a sus mejores prestaciones y a su mayor sostenibilidad.

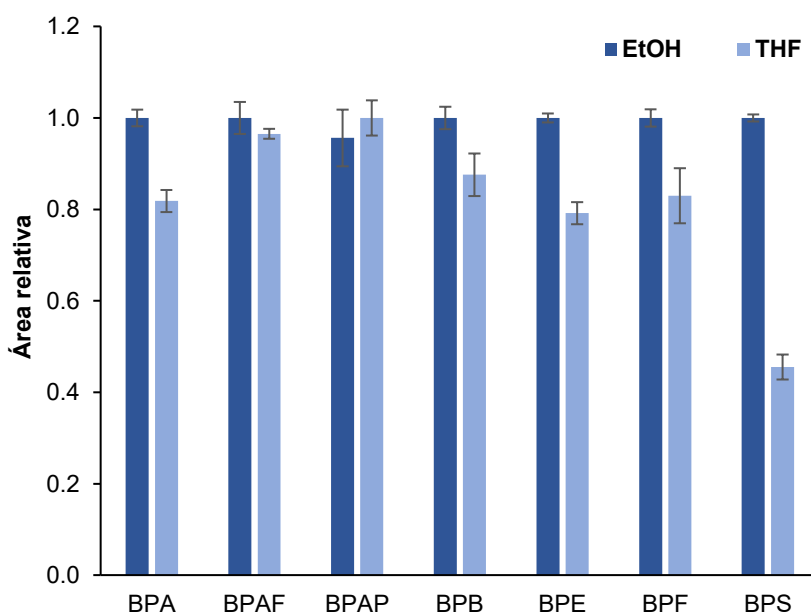


Figura 5.5. Comparación de la eficacia de desorción entre EtOH y THF.

Una vez se seleccionaron todos los parámetros relacionados con el proceso de extracción, se realizaron dos estudios adicionales para demostrar la eficacia de extracción del sorbente y la reproducibilidad de su síntesis. Debido a que la síntesis del sorbente consistía en tres etapas, se demostró que la extracción de los analitos se debe a su interacción con el COF y no con los grupos amino o las MNPs. Para ello, se aplicó el método a una disolución patrón conteniendo 5 ng mL^{-1} de los analitos empleando CoFe_2O_4 , CoFe_2O_4 amino-funcionalizadas y

CoFe₂O₄@COF como materiales sorbentes. Como se muestra en la **Figura 5.6**, la extracción de los analitos se lleva a cabo claramente por el COF.

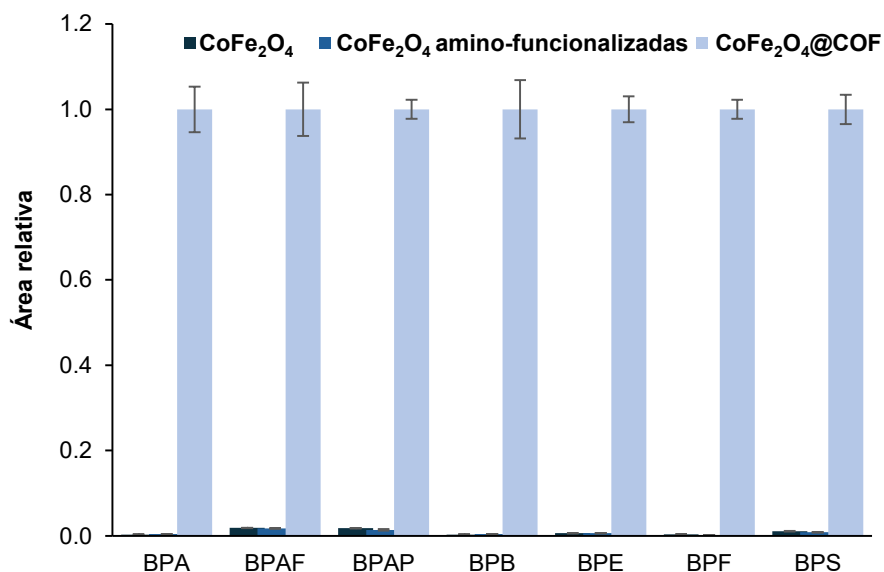


Figura 5.6. Comparación de la eficacia de extracción de los materiales obtenidos en cada una de las etapas de la síntesis del composite.

Finalmente, se evaluó la repetibilidad de la síntesis para asegurar la misma eficacia de extracción entre diferentes lotes. Para ello, se sintetizaron tres lotes independientes de material y cada uno de ellos se empleó para llevar a cabo la extracción de una disolución patrón conteniendo 5 ng mL⁻¹ de los analitos. Como se muestra en la **Figura 5.7**, se obtuvieron resultados similares (RSD < 7 %) entre los diferentes lotes sintetizados, demostrando una buena repetibilidad en el procedimiento.

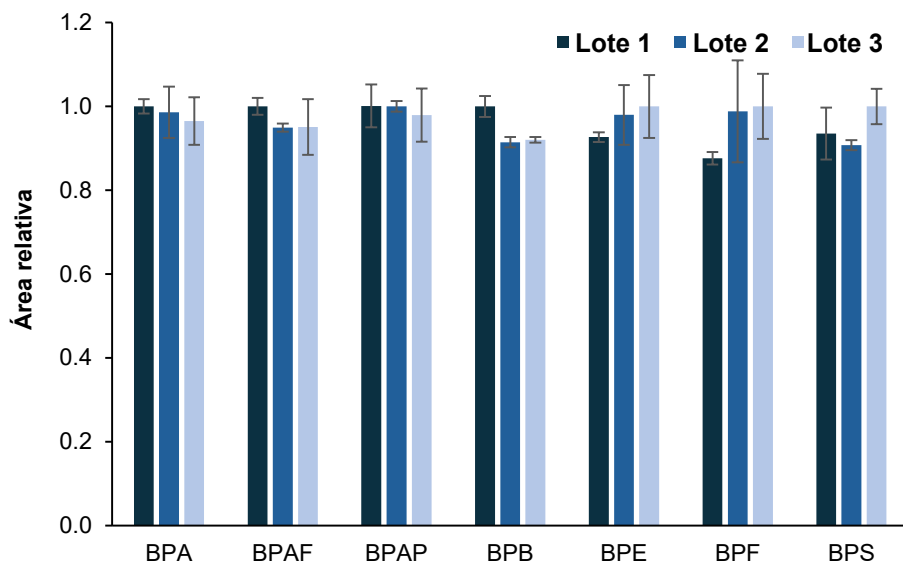


Figura 5.7. Comparación de la eficacia de extracción de diferentes lotes de la síntesis del sorbente.

5.3.2. Características analíticas del método

Se evaluaron las características analíticas del método siguiendo la guía armonizada ICH [149] en términos de linealidad, límites de detección (*Limit of Detection*, LOD) y cuantificación (*Limit of Quantification*, LOQ) y precisión. Además, se calculó el factor de preconcentración (*Enrichment Factor*, EF) y el rendimiento de extracción (*Extraction Efficiency*, EE). Los resultados se muestran en la **Tabla 5.3** para suero y en la **Tabla 5.4** para orina.

Para determinar la linealidad, se aplicó el método a disoluciones patrón preparadas en suero sintético u orina sintética conteniendo diferentes concentraciones de bisfenoles y empleando BPA-d₁₆ y BPS-d₈ como patrones surrogados. Como señal analítica se empleó la relación del área de los bisfenoles con respecto a su correspondiente patrón surrogado. Se determinó que la linealidad se extendía hasta, al menos, 100 ng mL⁻¹, obteniendo coeficientes de determinación (R^2) superiores a 0.990. Sin embargo, debido a que las concentraciones esperadas en las muestras eran considerablemente inferiores, se estableció un rango de trabajo de entre 0.5 y 10 ng mL⁻¹.

Para el cálculo de los EFs se aplicó el método a una disolución patrón conteniendo 10 ng mL⁻¹ de los analitos en suero u orina sintéticas, mientras otra disolución patrón de la misma concentración se preparó en una mezcla de

MeOH:H₂O en una proporción 70:30 (v/v) y se inyectó directamente en el instrumento analítico. De acuerdo con la definición de EF, este se puede calcular como el cociente entre la concentración del analito en el extracto final (C_f) y la concentración del mismo analito en la disolución antes de la extracción (C_i). Ahora bien, teniendo en cuenta la relación directamente proporcional entre el área y la concentración, se calculó comparando el área de los picos (A) de ambas disoluciones de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$EF = \frac{C_f}{C_i} \propto \frac{A_f}{A_i} \quad (\text{Ec. 5.1})$$

Los valores obtenidos oscilaron entre 0.5 y 2 para el suero y entre 0.6 y 2.6 para la orina.

El EE se calculó teniendo en cuenta el EF experimental (EF_{exp}) obtenido mediante la **Ecuación 5.1** y el factor de preconcentración máximo (EF_{max}) empleando la siguiente ecuación:

$$EE (\%) = \frac{EF_{\text{exp}}}{EF_{\text{max}}} \quad (\text{Ec. 5.2})$$

Teniendo en cuenta que el volumen de muestra es de 100 μL y el volumen del extracto final es de 20 μL , el EF máximo teórico es de 5. Se obtuvieron valores de EE de entre 9 y 41 % para el suero y entre 11 y 52 % para la orina.

Los LOD y LOQ se calcularon como 3 y 10 veces, respectivamente, la relación señal-ruido de una disolución patrón preparada en suero sintético y orina sintética a la que se le aplicó el método propuesto. Se obtuvieron valores de LOD y LOQ de entre 0.01 y 0.15 ng mL^{-1} y entre 0.04 y 0.50 ng mL^{-1} , respectivamente para suero, y entre 0.01 y 0.20 ng mL^{-1} y entre 0.04 y 0.65 ng mL^{-1} , respectivamente, para orina.

La precisión del método propuesto se estudió en una misma sesión de trabajo (intra-día) y en diferentes sesiones consecutivas (inter-día). Con esta finalidad, se aplicó el método a cinco réplicas independientes de disoluciones patrón multicomponente a tres niveles de concentración (0.5, 5 y 10 ng mL^{-1}). Como se puede observar en la **Tabla 5.3** y **Tabla 5.4**, todos los valores de RSD se encontraban por debajo de 15 %, concluyendo que el método propuesto presenta una buena precisión.

Tabla 5.3. Características analíticas del método propuesto para suero.

Analito	R ²	EF	EE (%)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Precisión (RSD, %)					
						Intra-día			Inter-día		
						0.5 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	0.5 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹
BPA	0.996	1.8	37	0.15	0.50	7	7	1	13	10	6
BPAF	0.998	1.4	27	0.01	0.04	1	7	1	11	7	3
BPAP	0.996	1.6	33	0.02	0.06	1	2	4	8	4	7
BPB	0.995	1.8	37	0.11	0.35	2	7	4	1	7	13
BPE	0.997	2.0	41	0.06	0.20	8	3	3	3	3	5
BPF	0.996	1.9	38	0.14	0.47	3	3	11	13	8	3
BPS	0.9991	0.5	9	0.09	0.29	5	3	13	13	13	10

Tabla 5.4. Características analíticas del método propuesto para orina.

Analito	R ²	EF	EE (%)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Precisión (RSD, %)					
						Intra-día			Inter-día		
						0.5 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	0.5 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹
BPA	0.995	2.2	47	0.12	0.40	5	2	2	9	1	5
BPAF	0.995	1.6	32	0.01	0.04	5	1	1	6	4	1
BPAP	0.998	1.8	36	0.02	0.06	3	3	3	9	14	2
BPB	0.997	2.3	47	0.09	0.30	7	4	4	9	9	12
BPE	0.997	2.5	49	0.05	0.17	6	6	4	14	5	7
BPF	0.994	2.6	52	0.20	0.65	1	3	5	5	8	8
BPS	0.998	0.6	11	0.05	0.15	5	1	5	8	4	4

5.3.3. Estudio del efecto matriz

Para evaluar la exactitud del método y descartar la presencia de efecto matriz, se fortificaron diferentes muestras de suero y orina a tres niveles de concentración (0.5, 5 y 10 ng mL⁻¹) y se procedió a su extracción mediante mSBSDME. A continuación, se calcularon los coeficientes de recuperación

relativa, obteniendo valores entre 80 y 127 % para el suero y entre 82 y 124 % para la orina (**Tabla 5.5**), mostrando que el efecto matriz para ambas muestras era despreciable. Por ello, se empleó calibración externa para la determinación de los bisfenoles de interés en muestras tanto de suero como de orina, utilizando dos patrones surrogados para mejorar la precisión y corregir posibles desviaciones en el proceso de extracción. Dado que el efecto matriz era despreciable sin necesidad de realizar ninguna dilución de la muestra, no se realizó ningún estudio referente su dilución, puesto que esto conllevaría a una disminución en los EF máximos teóricos.

Tabla 5.5. Coeficientes de recuperación relativa obtenidos para las muestras de suero y orina aplicando el método propuesto.

Matriz	Añadido (ng mL ⁻¹)	Coeficientes de recuperación relativa (%)						
		BPA	BPAF	BPAP	BPB	BPE	BPF	BPS
Suero	0.5	89 ± 7	127 ± 1	120 ± 1	80 ± 2	85 ± 8	116 ± 3	102 ± 5
	5	94 ± 5	97 ± 8	84 ± 7	87 ± 6	103 ± 3	107 ± 6	99 ± 5
	10	103 ± 1	89 ± 1	90 ± 4	80 ± 4	121 ± 3	120 ± 10	110 ± 10
Orina	0.5	86 ± 5	97 ± 5	106 ± 3	85 ± 7	95 ± 6	124 ± 1	82 ± 5
	5	110 ± 2	116 ± 1	109 ± 3	107 ± 4	101 ± 3	103 ± 3	101 ± 1
	10	102 ± 2	119 ± 1	120 ± 3	106 ± 4	107 ± 4	121 ± 5	97 ± 5

5.3.4. Análisis de muestras

Se analizaron diferentes muestras de mujeres voluntarias empleando el método propuesto para demostrar su utilidad en la determinación de bisfenoles en suero y orina. Como se puede observar en la **Tabla 5.6**, los bisfenoles más comúnmente encontrados en ambas matrices fueron BPA y BPS, siendo detectados o cuantificados en casi todas las voluntarias. Estos resultados muestran la alta exposición de la población, y especialmente mujeres, a estos disruptores endocrinos.

Tabla 5.6. Concentración de bisfenoles en muestras de suero y orina.

Matriz	Voluntaria	Concentración (ng mL ⁻¹)						
		BPA	BPAF	BPAP	BPB	BPE	BPF	BPS
Suero	1	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOQ
	2	<LOQ	0.25	<LOD	<LOQ	<LOD	<LOD	0.56
	3	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
	4	1.75	<LOD	0.40	<LOD	0.57	<LOD	<LOD
	5	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.31
Orina	1	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1.86
	2	5.03	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0.89
	3	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOQ
	4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	5	<LOQ	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD

5.3.5. Comparación con métodos previos y evaluación de la sostenibilidad

La determinación de bisfenoles ha sido ampliamente realizada mediante técnicas de extracción convencionales. Sin embargo, el empleo de técnicas miniaturizadas dispersivas es escaso, a pesar de las ventajas que ofrecen en términos de aplicabilidad y sostenibilidad. Por ello, se realizó una comparación entre el método propuesto y otros métodos que emplean técnicas de microextracción dispersivas para la determinación de bisfenoles en orina y/o suero. Los resultados se muestran en la **Tabla 5.7**.

Como se puede observar, el volumen de muestra empleado en el método desarrollado (0.1 mL) es considerablemente inferior al de los métodos previos (1-20 mL). Esto presenta una clara ventaja debido a que, en el caso de la orina, se pueden obtener volúmenes de muestra más o menos grandes, pero no en el caso de suero. Por ello, el método basado en mSBSME es el más adecuado para el análisis de muestras de bajo volumen. En determinados casos la reducción del volumen de muestra afecta negativamente a los LODs, debido a que los EF máximos son inferiores a cuando se utiliza un mayor volumen de muestra. Sin embargo, el método desarrollado alcanza límites del mismo orden que los métodos previos que emplean un mayor volumen de muestra. Además, en bioanálisis el número de muestras procesadas por unidad de tiempo es un parámetro muy importante. En este sentido, el método desarrollado permite el

tratamiento de hasta 15 muestras simultáneamente, empleando además tiempos de extracción y desorción muy bajos (1 min). En los métodos previos, se requieren elevados tiempos de extracción y desorción, o solo se puede tratar una muestra simultáneamente. Respecto a la masa de sorbente, en el presente trabajo se emplean 0.5 mg, mientras que en trabajos previos se emplean 20 o 50 mg. En los trabajos basados en técnicas de microextracción en fase líquida, se requiere volúmenes de entre 0.3 y 0.75 mL. En relación con el disolvente de desorción, el método desarrollado solo requiere de 20 μ L, mientras que en otros trabajos basados en técnicas de microextracción en fase sólida son necesarios volúmenes de entre 0.4 y 1 mL para llevar a cabo la desorción de los analitos.

El impacto ambiental de la etapa de preparación de muestra se evaluó y comparó empleando la herramienta métrica AGREEprep [63] (**Figura 5.8**). De este modo, se demostró que el método desarrollado basado en mSBSDME presenta un menor impacto ambiental en comparación con los métodos previamente desarrollados. Las principales ventajas obtenidas a destacar son los pocos residuos generados (criterio 4) y la baja cantidad de muestra requerida (criterio 5). Los valores considerados para cada criterio se muestran en la **Tabla 5.8**.

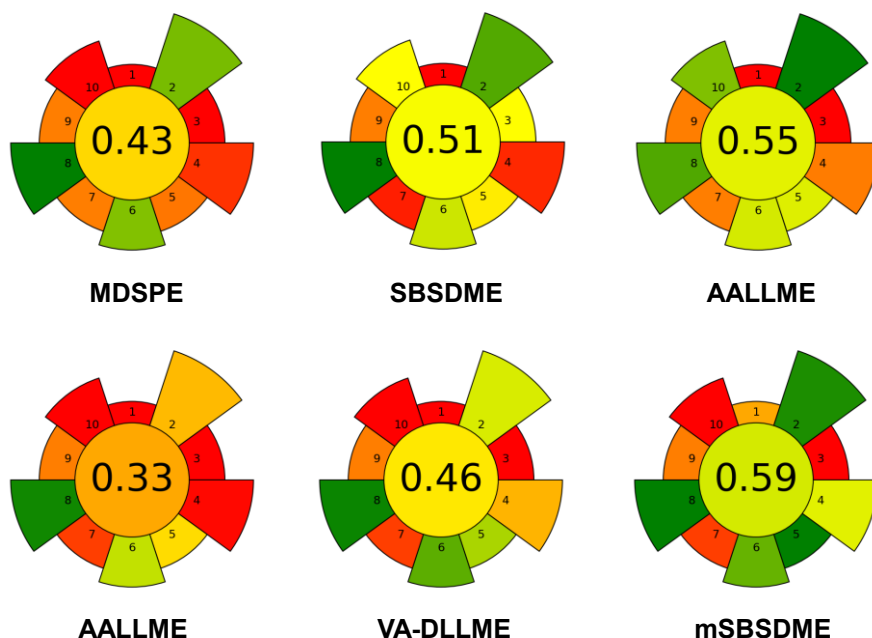


Figura 5.8. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos comparados.

Tabla 5.7. Comparación del método desarrollado basado en mSBSDE con otros métodos basados en microextracción dispersiva para la determinación de bisfenoles en suero u orina.

Matriz	Número de bisfenoles	Técnica de extracción	Técnica analítica	Volumen de muestra (mL)	Condiciones de extracción ^a	LOD (ng mL ⁻¹)	Ref.
Orina y agua	4	M-DSPE	LC-UV	20	Extracción: 50 mg HDTMA-ZSM-/Fe ₂ O ₃ ; 2 min Desorción: 400 µL EtOH; 2 min	0.6-1.5	[188]
Orina	7	SBSDE	LC-MS/MS	4	Extracción: 20 mg PCN-250(Fe ₂ Mn); 15 min Desorción: 1 mL ACN; 20 min	0.02-0.3	[189]
Orina	7	AALLME	LC-MS/MS	2	Extracción: 0.3 mL 1-octanol Centrifugación: 15 min	0.01-0.03	[184]
Orina	7	AALLME	LC-MS/MS	5	Extracción: 0.75 mL dicloroetano Centrifugación: 20 min	0.01-0.08	[185]
Orina	7	VA-DLLME	LC-MS/MS	1	Extracción: 0.15 mL diclorometano+ 0.25 mL 2-propanol; 20 s Centrifugación: 8 min	0.05-0.09	[187]
Orina y suero	7	mSBSDE	LC-MS/MS	0.1	Extracción: 0.5 mg CoFe ₂ O ₄ @COF; 1 min Desorción: 20 µL EtOH; 1 min	0.01-0.2	Este trabajo

^a HDTMA: hexadeciltrimetilamonio (*Hexadecyltrimethylammonium*)

Tabla 5.8. Valores considerados en la aplicación de la herramienta AGREEp de los métodos comparados.

Criterio	Método					
	M-DSPE [188]	SBSDME [189]	AALLME [184]	AALLME [185]	VA-DLLME [187]	mSBS DME
1. Lugar de preparación de muestra	Ex situ	Ex situ	Ex situ	Ex situ	Ex situ	On site
2. Materiales peligrosos (g o mL)	0.05	0.03	0	0.8	0.185	0.015
3. Sostenibilidad, renovabilidad y reusabilidad de los materiales	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez	Los materiales no son sostenibles o renovables pero se usan diversas veces	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez
4. Residuos	26.7	30.07	11.01	44.74	5.5	1.54
5. Cantidad de muestra (g o mL)	20	4	2	5	1	0.1
6. Productividad	24	13	12	14	33	30
7. Integración y automatización	2 etapas, sistema manual	5 etapas, sistema manual	2 etapas, sistema manual	4 etapas, sistema manual	4 etapas, sistema manual	4 etapas, sistema manual
8. Consumo de energía (W)	0.91	6.72	18.33	11.1	10.62	2.26
9. Análisis instrumental	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos
10. Seguridad del operador	4 o más pictogramas	2 pictogramas	1 pictograma	4 o más pictogramas	4 o más pictogramas	4 pictogramas

Asimismo, se empleó la herramienta BAGI (*Blue Applicability Grade Index*) [70], la cual evalúa la practicidad de un método analítico. En este sentido, el método desarrollado presenta valores ligeramente superiores en comparación con los métodos previos, obteniendo mejores puntuaciones en lo que se refiere al número de muestras tratadas simultáneamente y a la cantidad de muestra requerida (**Figura 5.9**). Los valores considerados para cada criterio se muestran en la **Tabla 5.9**.

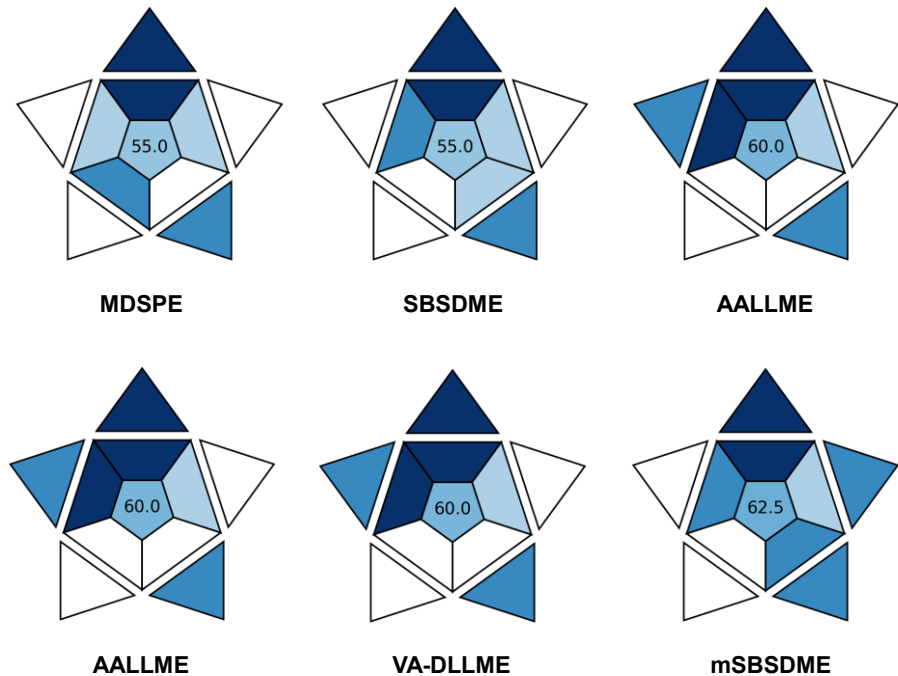


Figura 5.9. Evaluación mediante BAGI de los métodos comparados.

Tabla 5.9. Valores considerados en la aplicación de la herramienta BAGI de los métodos comparados.

Criterio	Método					
	M-DSPE [188]	SBSDME [189]	AALLME [184]	AALLME [185]	VA-DLLME [187]	mSBSDME
Tipo de análisis	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio
Análisis multielemental o individual	Análisis multielemental de 2 a 5 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de 6 a 15 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de más de 15 compuestos	Análisis multielemental de más de 15 compuestos	Análisis multielemental de más de 15 compuestos	Análisis multielemental de 6 a 15 compuestos de la misma familia química
Técnica analítica	Instrumentación simple disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios
Preparación de muestra simultánea	1	2-12	1	1	1	13-95
Preparación de muestra	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción
Muestras por hora	>10	>10	>10	>10	>10	>10
Reactivos y materiales	Necesitan sintetizarse en el laboratorio con instrumentación avanzada	Necesitan sintetizarse en el laboratorio con instrumentación avanzada	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes en los laboratorios	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes en los laboratorios	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes en los laboratorios	Necesitan sintetizarse en el laboratorio con instrumentación avanzada
Preconcentración	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas
Grado de automatización	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes
Cantidad de muestra	>1000 µL (o mg) muestras biológicas	>1000 µL (o mg) muestras biológicas	>1000 µL (o mg) muestras biológicas	>1000 µL (o mg) muestras biológicas	501-1000 µL (o mg) muestras biológicas	100-500 µL (o mg) muestras biológicas

5.4. Conclusiones

En este trabajo se ha desarrollado un método analítico basado en una técnica de microextracción dispersiva en fase sólida para la determinación de los bisfenoles más comunes en suero y orina. Se ha realizado una enzimólisis empleando una mezcla enzimática comercial de β -glucuronidasa y arilsulfatasa para la desconjugación de los bisfenoles y la determinación de su contenido total. Posterior a la enzimólisis, se ha empleado mSBSDME como técnica de microextracción dada su demostrada utilidad en el análisis de muestras de bajo volumen y su capacidad para tratar hasta 15 muestras de forma simultánea. Como sorbente en la etapa de microextracción se han empleado nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un COF compuesto de TPA y TAPA. Este material presenta el magnetismo suficiente que requiere la mSBSDME y se consigue una buena interacción con los analitos mediante interacciones tipo π - π , hidrofóbicas y dipolo-dipolo. Se ha empleado LC-MS/MS como técnica instrumental, obteniendo una buena sensibilidad y selectividad. El método se ha validado en términos de linealidad, factores de preconcentración, sensibilidad, precisión y exactitud y se ha aplicado al análisis de muestras de suero y orina de mujeres para mostrar su aplicabilidad.

Capítulo 6

Determinación de biomarcadores de cáncer de vejiga empleando microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada en plataforma de 96 posiciones

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo:

G. Peris-Pastor, C. Clemente-Pechuán, J.L. Benedé, A. Chisvert, A 96-position sample preparation procedure based on miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction for the determination of bladder cancer biomarkers in human serum. *Microchem. J.* 217 (2025) 115058



Resumen

En el campo del bioanálisis se requiere de metodologías con una elevada productividad, ya que se precisa realizar el análisis de un gran número de muestras diariamente y así obtener los resultados en el menor tiempo posible y poder actuar cuanto antes ante una posible patología. En este sentido, una excelente estrategia es el empleo de plataformas que permitan el tratamiento de diversas muestras en paralelo. De este modo, en este trabajo se ha utilizado una plataforma de 96 posiciones que permite llevar a cabo la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, mSBSDME) para la determinación de dos acilcarnitinas de cadena corta (isobutiril-L-carnitina (isoC4) y valeril-L-carnitina (C5)) en muestras de suero, cuyos niveles pueden aportar información sobre el cáncer de vejiga. Como material extractante se ha empleado un composite magnético formado por nanopartículas magnéticas incrustadas en un polímero de intercambio catiónico fuerte (*Strong Cation Exchange*, SCX) ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$). Se ha empleado calibración externa con isobutiril-L-carnitina deuterada (isoC4- d_9) como patrón surrogado. Utilizando condiciones de extracción previamente optimizadas se han obtenido buenos parámetros analíticos para ambos analitos en términos de límites de detección (0.1 y 0.3 ng mL^{-1}), rendimientos de extracción (32 y 37 %) y precisión (5-14 %). Se han calculado los coeficientes de recuperación relativa a dos niveles de concentración obteniendo valores entre 95 y 120 %, demostrando que el efecto matriz es despreciable. Para demostrar la utilidad del método desarrollado se han analizado muestras de cinco voluntarios, cuantificándose ambos analitos en todas ellas. Además, el método se ha comparado con otros publicados previamente con la misma finalidad, obteniendo mejoras significativas en términos de número de muestras tratadas por unidad de tiempo. El bajo volumen de muestra y de reactivos requerido, junto con el reducido tiempo que se requiere en el tratamiento de muestra, hacen de este método una clara alternativa para los laboratorios clínicos que requieren de metodologías con una elevada productividad.

6.1. Introducción

La isobutiril-L-carnitina (isoC4) y la valeril-L-carnitina (C5) son acilcarnitinas de cadena corta provenientes de la conjugación de la carnitina con un ácido graso. Estas moléculas presentan un papel crucial en la producción de energía y el metabolismo de los ácidos grasos. Concentraciones elevadas de estas acilcarnitinas en el cuerpo humano indican un metabolismo aberrante de los ácidos grasos, que se asocia con células cancerosas. Se ha demostrado que tanto la isoC4 como la C5 presentan una especificidad del 100 % como biomarcadores de cáncer de vejiga [199].

Para determinar los biomarcadores de manera efectiva, los laboratorios de análisis clínico requieren de métodos analíticos capaces de realizar el tratamiento de un elevado número de muestras por unidad de tiempo para poder así obtener los resultados de forma rápida. En este sentido, se recomienda evitar la etapa de tratamiento de muestra así como etapas que presenten un elevado consumo de tiempo, tal y como se especifica en los 12 principios de la *Green Analytical Chemistry* (GAC) [200]. Sin embargo, las matrices biológicas son relativamente complejas debido a la presencia de un elevado número de constituyentes tales como sales, proteínas o lípidos, entre otros, por lo que no pueden inyectarse directamente en el instrumento analítico, requiriendo de una etapa previa de limpieza.

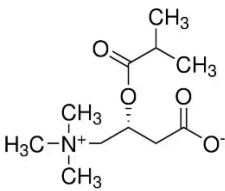
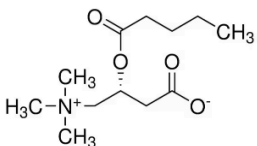
Tradicionalmente, el test de la gota de sangre seca (*Dried Blood Spot*, DBS) se ha empleado como etapa de pretratamiento de muestra para la determinación de la isoC4 y C5 en fluidos biológicos [201–203]. Este test se basa en la deposición de una gota de sangre sobre un círculo en un papel especial, dejándose secar durante un periodo de tiempo (aproximadamente varias horas). A continuación, se recorta dicho círculo de papel conteniendo la gota de sangre y los analitos se eluyen sumergiéndolo en el correspondiente disolvente (requiriéndose varias horas). Además, usualmente se precisan etapas adicionales de derivatización y evaporación/reconstitución, obteniendo procedimientos lentos. Esto conlleva que solo se puedan tratar unas pocas muestras por unidad de tiempo.

El desarrollo de métodos analíticos que presenten una elevada productividad es de gran importancia y el empleo de técnicas de microextracción puede ser una excelente opción [12]. En este sentido, se ha utilizado la microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME) para la determinación de ambos biomarcadores en orina [204] y tejidos [205,206]. Sin embargo, a pesar de que se obtienen procedimientos más rápidos que los que emplean DBS, los métodos basados en SPME siguen requiriendo elevados tiempos de extracción (entre 30 y 60 min) y desorción (60 min). Para solventar este inconveniente, una opción interesante es el empleo de técnicas de microextracción dispersivas, las cuales reducen drásticamente los tiempos de extracción y desorción en comparación

con las técnicas estáticas debido a que presentan cinéticas más rápidas [207]. Sin embargo, aunque la etapa de extracción propiamente dicha es rápida en las técnicas dispersivas, estas usualmente requieren de etapas como la centrifugación, la cual consume un elevado tiempo. Como ya se ha comentado anteriormente, esto se puede evitar empleando materiales magnéticos, recolectándose el sorbente al finalizar la extracción debido a la aplicación de un campo magnético [208]. Además, también se puede conseguir una elevada productividad realizando extracciones paralelas, como es el caso de las plataformas basadas en placas de 96 pocillos [209–211]. En este sentido, la combinación sinérgica de una técnica de microextracción dispersiva con un material magnético llevándola a cabo en una plataforma de 96 posiciones puede ser una excelente opción para desarrollar métodos con una elevada productividad.

La extracción de isoC4 y C5 en matrices acuosas, como el suero, es compleja debido a su naturaleza moderadamente polar. Sin embargo, estos compuestos presentan una amina cuaternaria en su estructura (**Tabla 6.1**), la cual se encuentra siempre cargada positivamente. En este sentido, los intercambiadores catiónicos, bien débiles (*Weak Cation Exchange*, WCX), de modo mixto (*Mix-mode Cation Exchange*, MCX) o fuertes (*Strong Cation Exchange*, SCX) pueden constituir una excelente opción para llevar a cabo la extracción de la isoC4 y C5 de muestras de suero mediante interacciones iónicas.

Tabla 6.1. Estructura molecular y algunas propiedades relevantes de los analitos.

Analitos	Estructura molecular	pK _a	logP _{ow} ^a	M _w (g mol ⁻¹) ^b
isoC4		4.3	1.4	231.3
C5		4.3	1.8	245.3

^a P_{ow}: Coeficiente de partición octanol-agua

^b M_w: Masa molecular

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método analítico que permita tratar un elevado número de muestras por unidad de tiempo para la determinación de isoC4 y C5 en suero, que sea adecuado para los laboratorios de análisis clínico. Para ello, se pretende emplear la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, mSBSDE) [81], la cual es compatible con bajos volúmenes de muestra. Esta técnica permite el tratamiento de hasta 96 muestras de forma simultánea empleando un soporte impreso en 3D [163] desarrollado por el grupo de investigación en el que se ha realizado esta Tesis Doctoral. Además, debido a la combinación de una técnica dispersiva y un material magnético, se espera obtener tiempos de extracción y desorción cortos, evitando etapas que consuman un elevado tiempo como la centrifugación. Como sorbente, se van a estudiar diferentes intercambiadores, previendo una buena interacción con los analitos mediante interacciones iónicas con la amina cuaternaria presente en la estructura de las acilcarnitinas. Además, como técnica instrumental se empleará la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (*Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS) para asegurar una buena sensibilidad y selectividad.

6.2. Experimental

6.2.1. Reactivos

Como patrones se emplearon la isobutiril-L-carnitina (isoC4) (estándar analítico, 99.3 %) de MedChemExpress (Nueva Jersey, EE. UU.) y la valeril-L-carnitina (C5) (estándar analítico, 99.9 %) de Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Como patrón surrogado se adquirió la isobutiril-L-carnitina-(N,N,N-trimetil-d₉) (isoC4-d₉) (estándar analítico, 99.9 %) de Sigma-Aldrich.

Para la síntesis del sorbente magnético se empleó FeCl₃·6H₂O y CoCl₂·6H₂O de Acros Organics (Geel, Bélgica), hidróxido de sodio (NaOH) de Scharlab (Barcelona, España) y polímero SCX obtenido de cartuchos de SPE Discovery® DSC-SCX proporcionados por Supelco (Steinheim, Alemania).

Para realizar la comparación entre los diferentes sorbentes de intercambio catiónico se adquirieron cartuchos de SPE Discovery® DSC-WCX de Supelco y Oasis MCX de Waters (Milford, EE. UU.).

Como disolventes se emplearon etanol (EtOH) grado HPLC de PanReac (Darmstadt, Alemania), metanol (MeOH) grado LC-MS de Honeywell (Seelze, Alemania), agua y acetonitrilo (ACN) grado LC-MS de PanReac y agua ultrapura (resistividad ≥18.2 MΩ cm) obtenida a través de un sistema de purificación de agua Adrona (Riga, Letonia).

Capítulo 6

Se adquirieron ácido fórmico e hidróxido amónico al 28 % (m/m) de Scharlab (Barcelona, España). Se empleó nitrógeno como gas de nebulización en la fuente MS/MS obtenido a través de un generador NiGen LC-MS 40-1 de Claind S.r.l. (Lenno, Italia), mientras que se empleó nitrógeno extrapuro (> 99.999 %) de Praxair (Madrid, España) como gas de colisión en la celda de colisión del MS/MS.

Para la preparación del tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*, PBS) se adquirieron cloruro de potasio (KCl) y dihidrógeno fosfato de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) de Panreac, cloruro de sodio (NaCl) de Fisher Chemical (Loughborough, Reino Unido) e hidrogeno fosfato de disodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) de Scharlab (Barcelona, España).

6.2.2. Instrumentación

Para llevar a cabo la mSBSDME se empleó un agitador magnético de 96 posiciones MIXdrive96 MTP y un controlador MIXcontrol MTP, ambos de 2MAG (Munich, Alemania), un soporte impreso en 3D diseñado a medida con el software AutoCAD (San Francisco, EE. UU.) e impreso por Imprimarkers (La Pobra de Vallbona, España) (**Figura 6.1**). Además, se adquirieron insertos de base plana con una capacidad de 400 μL (31 mm de altura y 4 mm de diámetro interno) de Labbox (Barcelona, España) e imanes cilíndricos de NdFeB (3 mm de longitud y 2 mm de diámetro) de Supermagnete (Gottmadingen, Alemania).

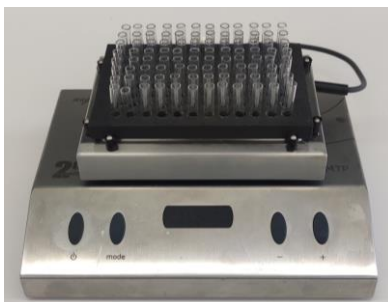


Figura 6.1. Dispositivo multiextracción de 96 posiciones empleado para llevar a cabo la mSBSDME.

Para la preparación de PBS se utilizó un medidor de pH Basic 20 de Crison (Alella, España).

Para la centrifugación de sangre y obtención de suero se empleó una centrífuga EBA 21 de Hettich (Tuttlingen, Alemania).

Para observar la morfología del material sintetizado se utilizó un equipo de microscopía electrónica de barrido (*Scanning Electron Microscope*, SEM) HITACHI S4800 a 10 kV equipado con un detector de electrones retrodispersados RX Bruker.

Se empleó un dispositivo de interferencia cuántica de superconducción (*Superconducting Quantum Interference Device*, SQUID) Quantum Design MPMS-XL-5 para la medida de las propiedades magnéticas del material sintetizado.

Para la medida de la isoterma de adsorción-desorción en nitrógeno y el área superficial específica se utilizó un analizador ASAP 2010 de Micrometrics.

Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos Agilent Technologies 1100 Series equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, un inyector automático y un horno con una columna Zorbax SB-C₁₈ (50 mm de longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.8 μ m de tamaño de partícula), acoplado a un detector Agilent 6410B Triple Quad MS/MS.

6.2.3. Toma de muestra y pretratamiento

Se obtuvieron muestras de suero de cinco voluntarios a través de la extracción de sangre en tubos no heparinizados por parte de personal sanitario especializado, los cuales se dejaron en reposo durante 10 min. A continuación, se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min y los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C hasta el momento del análisis (**Figura 6.2**). Cada voluntario dio su consentimiento por escrito para la participación en este estudio, siguiendo las directrices éticas de la Declaración de Helsinki y siendo aprobado por el Comité de Ética de Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad de Valencia.

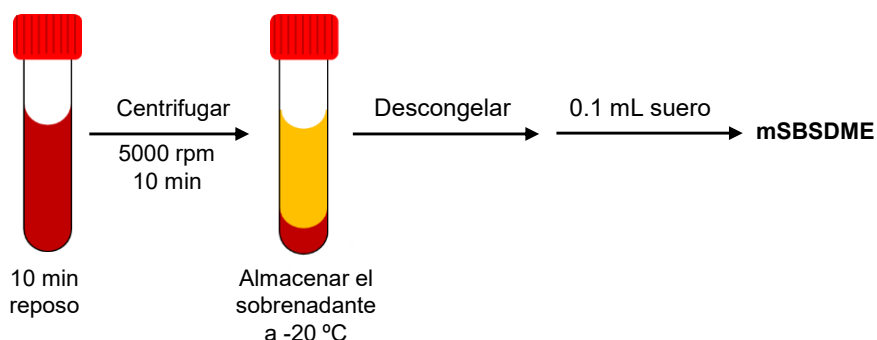


Figura 6.2. Tratamiento de la muestra previo a la mSBSDME.

6.2.4. Preparación de tampón fosfato salino

Se empleó PBS a pH 7.4 como suero sintético, preparándose de acuerdo a un protocolo modificado [191]. Para ello, se preparó una disolución en agua ultrapura conteniendo NaCl (8.00 g L^{-1}), KCl (0.20 g L^{-1}), KH_2PO_4 (0.24 g L^{-1}) y $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (1.44 g L^{-1}), ajustando el pH a 7.4.

6.2.5. Preparación de disoluciones patrón

Se prepararon disoluciones patrón individuales de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (isoC4) y $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (C5) en agua ultrapura. A continuación, se preparó una disolución patrón multicomponente de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ en agua ultrapura a partir de las disoluciones individuales. Todas las disoluciones mencionadas anteriormente se mantuvieron a -20°C . En cada sesión de trabajo se preparó una disolución patrón multicomponente de 1000 ng mL^{-1} en PBS. Finalmente, a partir de esta disolución, para imitar el contenido en sales presente en el suero y evitar un posible efecto matriz, la curva de calibrado se preparó en PBS conteniendo entre 1 y 100 ng mL^{-1} de cada analito.

Se preparó una disolución patrón individual de isoC4-d₉ en agua ultrapura conteniendo $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Seguidamente, se preparó una disolución patrón intermedia conteniendo 1000 ng mL^{-1} en agua ultrapura. En cada sesión de trabajo se preparó una disolución de 25 ng mL^{-1} en agua ultrapura conteniendo 0.1 % de ácido fórmico.

6.2.6. Síntesis de CoFe_2O_4 -SCX

En primer lugar se realizó la síntesis de MNPs de CoFe_2O_4 mediante un proceso de coprecipitación en medio básico empleando un procedimiento adaptado [155]. Para ello, se mezclaron 100 mL de una disolución acuosa 0.4 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 100 mL de una disolución acuosa 0.2 M de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Seguidamente, se añadieron 100 mL de NaOH 3 M gota a gota calentando a 80°C durante 1 h mientras la disolución se agitó magnéticamente. A continuación, la disolución se dejó enfriar a temperatura ambiente y las MNPs obtenidas se lavaron con agua ultrapura y EtOH, dejándose secar a 80°C durante toda la noche.

En segundo lugar, para la obtención del sorbente magnético (CoFe_2O_4 -SCX), se pesaron 0.15 g de CoFe_2O_4 MNPs y 0.15 g de SCX. A continuación, se añadieron 50 mL de EtOH y la suspensión se mantuvo en agitación 24 h. Finalmente, el material obtenido se decantó, se lavó con EtOH y se secó en estufa a 80°C , molturándose para obtener un polvo fino.

La síntesis de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MCX}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-WCX}$, utilizados en el estudio comparativo, se realizó del mismo modo que la descrita para el $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$.

6.2.7. Procedimiento de microextracción

Se pesaron 0.5 mg de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ en cada uno de los 96 insertos de vidrio de base plana que se situaron en el dispositivo de extracción de 96 posiciones, a los que se añadió un imán de neodimio. A continuación, se realizó el acondicionamiento del material, añadiéndose 200 μL de EtOH, agitando durante 30 s y posteriormente descartándolos. Para llevar a cabo la extracción de los analitos se añadieron 100 μL de muestra o disolución patrón y 100 μL de la disolución de patrón surrogado (25 ng mL^{-1}), agitando durante 1 min. A continuación, el material magnético se depositó en la superficie del imán y se descartó la fase dadora. Para llevar a cabo la desorción de los analitos se añadieron 40 μL de una mezcla $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (tampón amonio 0.1 M, pH 9) (15:85, v/v), dispersando el sorbente durante 1 min. Finalmente, el extracto se transfirió a un inserto cónico situado en el interior de un vial de cromatografía para su análisis mediante LC-MS/MS. En la **Figura 6.3** se muestra un esquema del método propuesto.

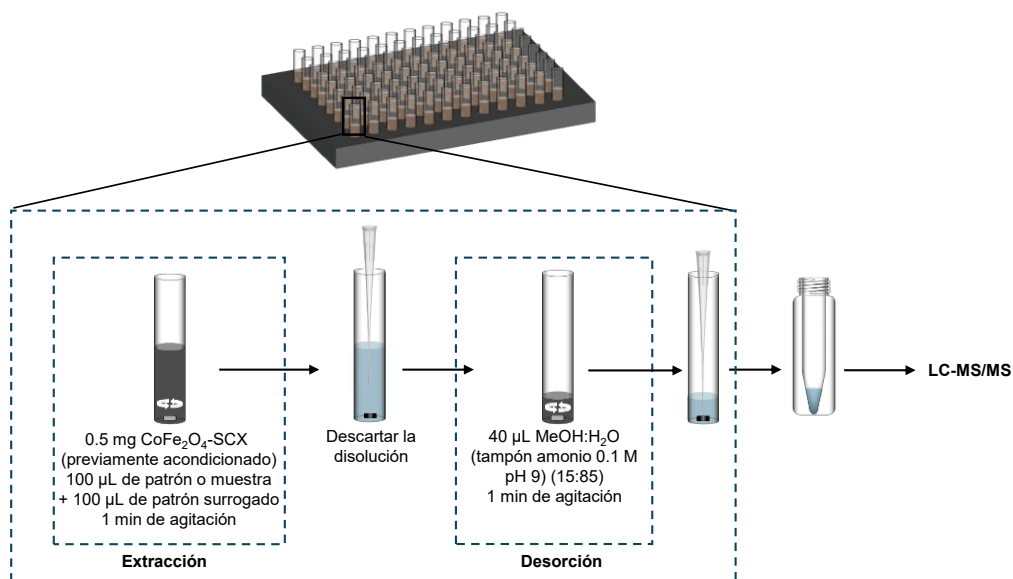


Figura 6.3. Esquema del método propuesto.

6.2.8. Condiciones LC-MS/MS

- Columna: Zorbax SB-C₁₈ (50 mm longitud, 2.1 mm de diámetro interno y 1.8 µm de tamaño de partícula)
- Volumen de inyección: 10 µL
- Temperatura de la columna: 25 °C
- Fase móvil: MeOH:agua (ambos con 0.1 % de ácido fórmico) (15:85, v/v) (isocrático)
- Caudal: 0.2 mL min⁻¹
- Duración del cromatograma: 6 min
- Modo ionización MS/MS: ESI+
- Voltaje: 4500 V (ESI+)
- Temperatura del gas de nebulización: 340 °C
- Flujo del gas de nebulización: 12 L min⁻¹
- Presión del nebulizador: 40 psi

En la **Tabla 6.2** se muestran las transiciones empleadas para la medida instrumental de los compuestos de interés.

Tabla 6.2. Relaciones masa/carga (m/z) de los iones precursores y producto, energías de colisión y fragmentador para la isoC4, C5 e isoC4-d₉.

Analito	Ion precursor (m/z)	Ion producto (m/z) ^a	Energía de colisión (V)	Fragmentador (V)
isoC4	232	85	22	114
		173	10	
C5	246	85	22	114
		187	10	
isoC4-d ₉	241	85	22	114

^a En negrita se resaltan las m/z empleadas para la cuantificación

En la **Figura 6.4** se muestran los cromatogramas obtenidos para ambos analitos, así como el patrón surrogado al aplicar el método a una disolución patrón de 50 ng mL⁻¹ preparada en PBS.

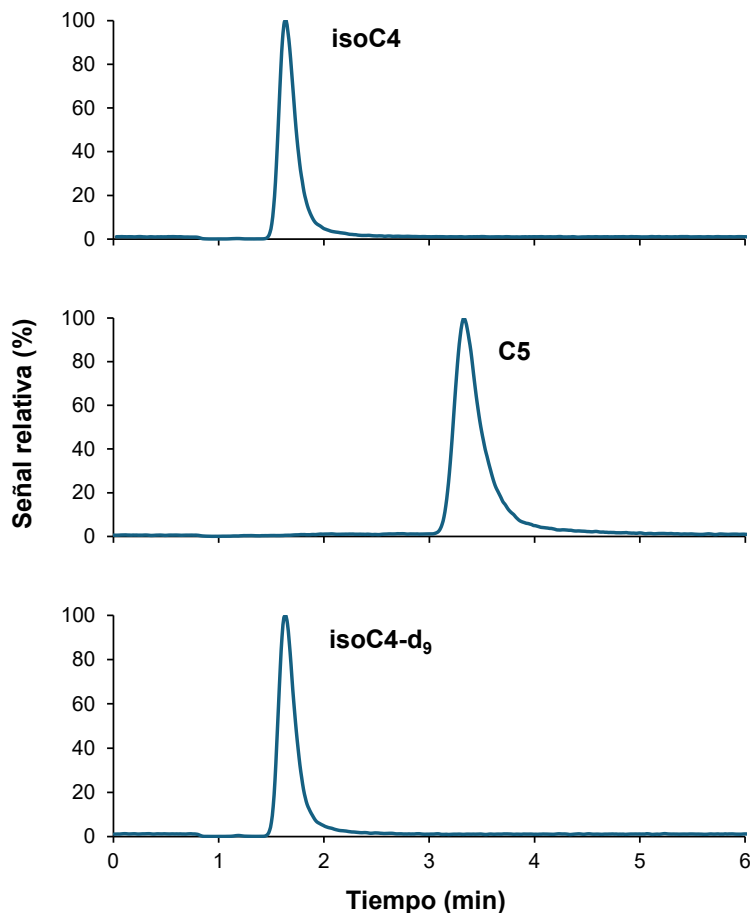


Figura 6.4. Cromatograma obtenido para una disolución patrón conteniendo 50 ng mL⁻¹ de los analitos en PBS tras aplicar el método basado en mSBSDME y su posterior análisis mediante LC-MS/MS.

6.3. Resultados y discusión

6.3.1. Selección y rendimiento del sorbente empleado

Los analitos son compuestos moderadamente polares que contienen una amina cuaternaria en su estructura que está permanentemente cargada de forma positiva. Además, también presentan un ácido carboxílico, de modo que a pH relativamente ácido los analitos presentan carga positiva mientras que a pH neutro y básico adoptan una forma zwitteriónica. En este sentido, se planteó la hipótesis de que un intercambiador catiónico podría extraer los analitos

mediante interacciones electrostáticas. Por ello, se probaron como posibles sorbentes el $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$, $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MCX}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-WCX}$ para llevar a cabo la extracción de una disolución patrón conteniendo 50 ng mL^{-1} empleando mSBSDME (sin optimizar). La presencia de grupos ionizables en los analitos (amina cuaternaria y ácido carboxílico ($\text{pK}_a \approx 4.3$)) y en los materiales (ácido sulfónico ($\text{pK}_a < 1$) en SCX y MCX y ácido carboxílico ($\text{pK}_a \approx 5$) en WCX) hace que la eficacia de extracción de los materiales dependa del pH. Por este motivo, se ensayaron condiciones de pH ácido o básico en las etapas de extracción y desorción para cada uno de los materiales teniendo en cuenta las interacciones que se podían establecer con los analitos. En el caso de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MCX}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$, en la etapa de extracción se seleccionó un pH ácido (2.5) ya que el material presenta carga negativa debido al grupo sulfonato, mientras que los analitos están cargados positivamente debido a la amina cuaternaria. Respecto a la etapa de desorción, se prefirió un pH básico (9) ya que el material permanece con carga negativa mientras que los analitos están presentes en forma zwitteriónica debido a la desprotonación del ácido carboxílico. Para el $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-WCX}$, en la etapa de extracción se seleccionó pH básico (9) ya que los analitos se encuentran en la forma zwitteriónica y el material se encuentra cargado negativamente debido a que el ácido carboxílico está desprotonado. Respecto a la desorción, se empleó un pH ácido (2.5) donde los analitos se encuentran cargados positivamente y el material se encuentra neutro. Los resultados experimentales combinando las etapas de extracción y desorción se muestran en la **Figura 6.5**, empleando el área de pico como respuesta analítica.

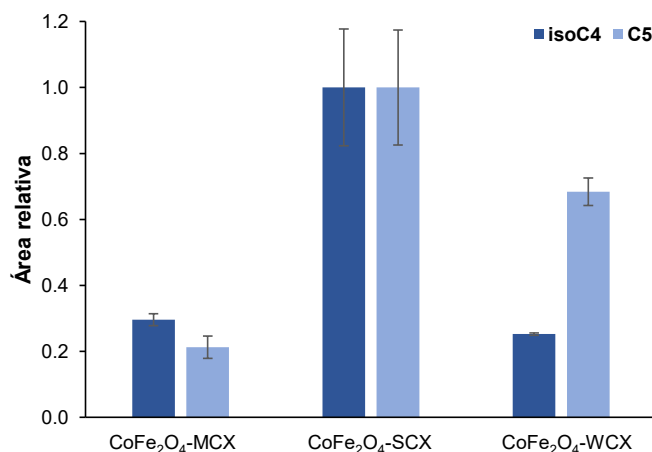


Figura 6.5. Comparación del rendimiento total de diferentes intercambiadores catiónicos en la etapa de extracción.

La mayor eficacia de extracción global se obtuvo con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$. Esto se puede deber a que se establecen interacciones más fuertes en la etapa de

extracción en comparación con $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MCX}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-WCX}$. A pesar de que el mecanismo de interacción de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ es el mismo que el de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MCX}$, el intercambiador fuerte presenta una mayor densidad de carga negativa. Respecto al $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-WCX}$, su interacción con los analitos es más débil en comparación con el $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ ya que el grupo carboxilo de los analitos se encuentra desprotonado, adquiriendo una forma zwitteriónica con una menor afinidad por el sorbente.

Respecto a la etapa de desorción, el mecanismo para el $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MCX}$ es idéntico, obteniendo una eficacia de desorción similar. En el caso de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-WCX}$, la eficacia de desorción se predispone superior a la de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$, debido a las interacciones más débiles con los analitos a pH ácido cuando el material se encuentra neutro, permitiendo una mejor desorción. Sin embargo, esta eficacia de desorción más elevada no compensa la menor eficacia de extracción. Finalmente, se escogió $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ ya que presentó los mejores resultados basándose únicamente en el mecanismo iónico, el cual es muy predecible y fácilmente ajustable mediante la modificación del pH.

Para asegurar que la extracción de los analitos se lleva a cabo principalmente por el material sorbente sintetizado y no por las MNPs, se realizó la extracción de una disolución patrón conteniendo 25 ng mL^{-1} de los analitos en PBS empleando CoFe_2O_4 y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$. Como se puede observar en la **Figura 6.6**, se demostró que la extracción de los analitos se lleva a cabo mayoritariamente debido a la interacción entre estos y el SCX. En este sentido, las MNPs de CoFe_2O_4 principalmente confieren el magnetismo necesario al material para llevar a cabo la mSBSDME.

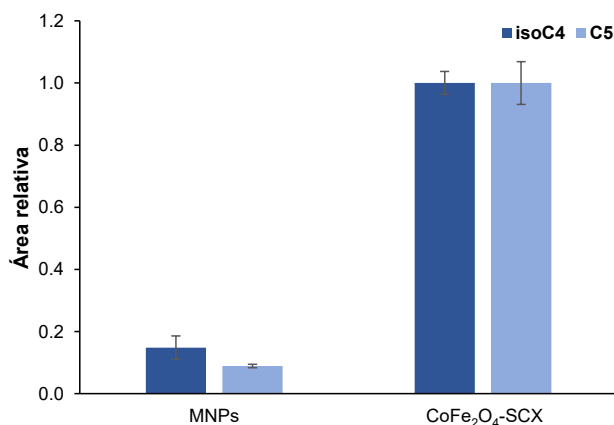


Figura 6.6. Comparación de la eficacia de extracción entre MNPs de CoFe_2O_4 y el material sorbente $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ sintetizado.

Además, para asegurar que la síntesis de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ es reproducible, se sintetizaron tres lotes distintos. A continuación, cada lote se empleó para realizar la extracción de un patrón de 25 ng mL^{-1} preparado en PBS. Como se puede observar en la **Figura 6.7**, la señal instrumental (área de pico) obtenida para todos los lotes es similar entre ellos, demostrando que la síntesis del material sorbente es reproducible.

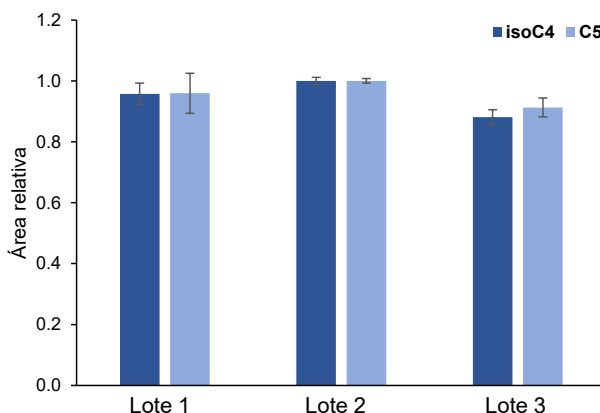


Figura 6.7. Comparación de la eficacia de extracción entre diferentes lotes de síntesis del material magnético.

6.3.2. Caracterización de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$

Se emplearon diferentes técnicas para la caracterización del material sintetizado. De esta forma, se estudió la morfología, la saturación magnética (M_s) y la capacidad de adsorción.

La morfología del $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ se estudió y comparó con la de las MNPs de CoFe_2O_4 empleando SEM. Como se puede observar en la **Figura 6.8a**, la superficie del polímero SCX es totalmente lisa. En la **Figura 6.8b** se observa que las partículas esféricas de CoFe_2O_4 se encuentran incrustadas en la superficie del polímero SCX.

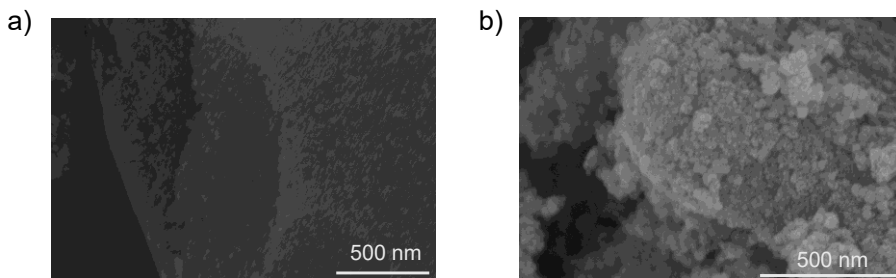


Figura 6.8. Imágenes tomadas mediante SEM de a) polímero SCX y b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$.

Respecto a las propiedades magnéticas (**Figura 6.9a**), se obtuvo un valor de M_s de 32 emu g^{-1} para el $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ y de 66 emu g^{-1} para las MNPs de CoFe_2O_4 . La disminución en el valor de M_s se debe a la menor proporción de MNPs en el material sorbente. Sin embargo, este valor es suficiente para conseguir recuperar el material magnético después de su dispersión durante el procedimiento de mSBSDME.

Se obtuvieron las isothermas de adsorción-desorción en nitrógeno para el material sintetizado (**Figura 6.9b**). Se observó una isoterma tipo IVa, indicando que el material presenta mesoporos y que el comportamiento de la adsorción está determinado por las interacciones entre el adsorbente y el adsorbido, así como por las interacciones entre las moléculas en estado condensado. Se obtuvo una histéresis de tipo H2, indicando un bloqueo de los poros [159]. Se observó un tamaño de poro medio de 7.8 nm y una área superficial de Brunauer-Emmett-Teller (BET) de $233 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

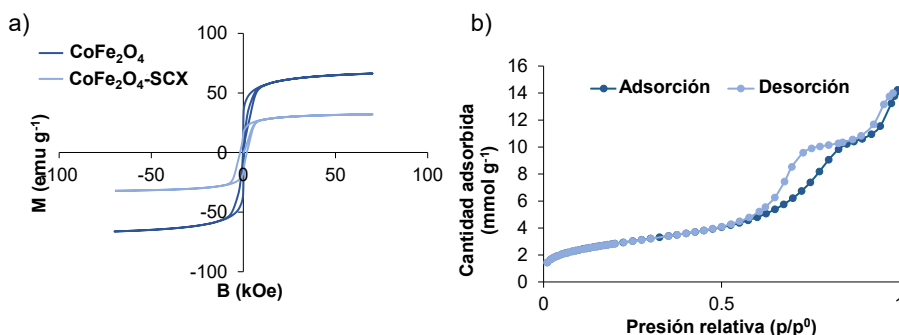


Figura 6.9. a) Curva de magnetización de CoFe_2O_4 y $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$ y b) isoterma de adsorción-desorción de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$.

6.3.3. Estudio de la dilución de la muestra

Con la finalidad de estudiar el efecto matriz en el procedimiento de extracción y así obtener la mayor sensibilidad posible sin comprometer la exactitud, se realizó un estudio de la dilución de la muestra. De este modo, se prevé que diluciones elevadas reduzcan la posibilidad de experimentar efecto matriz, sin embargo, se consiguen menores factores de preconcentración (EF) y por tanto la sensibilidad. Por el contrario, no diluir la muestra resulta beneficioso en términos de EFs máximos que se pueden obtener, pero la posibilidad de experimentar efecto matriz es superior. Por ello, se estudiaron diferentes proporciones de PBS y agua ultrapura (conteniendo 0.1 % de ácido fórmico) (1:3, 1:1 y 3:1 (v/v)) y PBS sin diluir como fases dadoras en el proceso de extracción. Todas las disoluciones se prepararon a partir de una disolución patrón de 50 ng mL⁻¹ en PBS diluyéndola en la proporción correspondiente, obteniendo concentraciones de 12.5, 25 y 37.5 ng mL⁻¹ para las diluciones 1:3, 1:1 y 3:1 (v/v), respectivamente.

Como se muestra en la **Figura 6.10**, los mejores resultados se obtuvieron empleando la dilución 1:1 (v/v). En este sentido, menores diluciones (3:1 (v/v) y PBS sin diluir) presentaban un elevado contenido en sales, afectando negativamente a la extracción de los analitos. Respecto a la dilución 1:3 (v/v), los beneficios aportados por la disminución de la fuerza iónica no compensaban la elevada dilución de los analitos. Por tanto, se seleccionó la dilución 1:1 (v/v) como óptima.

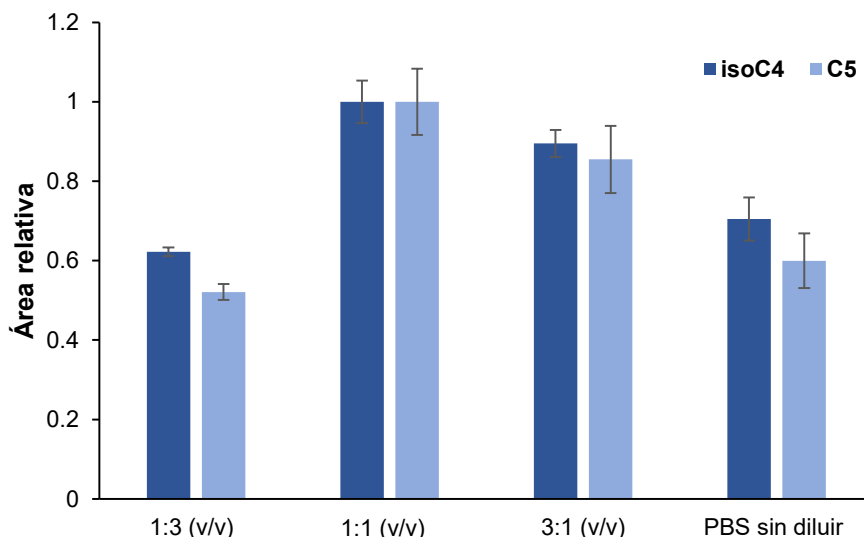


Figura 6.10. Estudio de la dilución de la muestra.

6.3.4. Optimización de las variables de extracción y desorción

6.3.4.1. Cribado de las variables

Con la finalidad de obtener la mayor sensibilidad posible se estudiaron diferentes variables de extracción y desorción que podían afectar al rendimiento de mSBSDME. Las variables estudiadas y sus rangos fueron las siguientes: masa de sorbente (0.5-2.0 mg), tiempo de extracción y desorción (1-5 min), concentración de ácido fórmico en la fase dadora (0.1-1.0 %) y volumen de desorción (20-40 μL). Como masa mínima de sorbente se seleccionaron 0.5 mg, ya que masas inferiores comprometen la exactitud en la pesada, y como masa máxima 2 mg, ya que valores superiores generalmente implican volúmenes de desorción elevados, disminuyendo los EFs máximos teóricos y, en algunos casos, requiriendo de etapas adicionales como evaporación y reconstitución. Respecto a los tiempos de extracción y desorción, se eligieron valores típicos empleados en mSBSDME (1-5 min). En cuanto a la concentración de ácido fórmico en la fase dadora, se seleccionó 0.1 % como valor mínimo para asegurar un pH inferior a 5 y 1 % como máximo ya que concentraciones más elevadas no proporcionan valores de pH significativamente inferiores. El valor mínimo para el disolvente de desorción se estableció en 20 μL para asegurar la correcta dispersión del sorbente, mientras que se seleccionaron 40 μL como valor máximo para evitar una excesiva disminución de los EF máximos teóricos.

Se llevó a cabo un diseño Plackett-Burman, evaluando el impacto de las variables seleccionadas en la respuesta analítica (área de pico), requiriendo un pequeño número de experimentos (**Tabla 6.3**) debido a que la interacción entre variables se omite [160]. Para el análisis estadístico se empleó el software Minitab 19 (Minitab LLC, EE. UU.). Todos los experimentos se llevaron a cabo empleando 100 μL de una disolución patrón de 50 ng mL⁻¹ de los analitos preparada en PBS, diluyéndola con 100 μL de agua ultrapura conteniendo la correspondiente concentración de ácido fórmico. La desorción se realizó empleando una mezcla de MeOH:H₂O (tampón amonio 0.1 M, pH 9) (15:85, v/v) ya que esta proporción era la misma que la empleada para la fase móvil, evitando así un desdoblamiento de los picos cromatográficos y, por tanto, evaporar y reconstituir.

Tabla 6.3. Diseño Plackett-Burman para el cribado de las variables implicadas en la extracción y desorción.

Etapa	Masa de sorbente (mg)		Tiempo de extracción (min)		Concentración de ácido fórmico (%)		Tiempo de desorción (min)		Volumen de desorción (μL)	
	D ^a	C ^b	D	C	D	C	D	C	D	C
1	2.0	1	1	-1	1.0	1	1	-1	20	-1
2	0.5	-1	5	1	1.0	1	5	1	20	-1
3	0.5	-1	1	-1	1.0	1	5	1	40	1
4	2.0	1	5	1	1.0	1	1	-1	20	-1
5	2.0	1	5	1	0.1	-1	5	1	40	1
6	0.5	-1	1	-1	0.1	-1	1	-1	40	1
7	0.5	-1	5	1	0.1	-1	1	-1	20	-1
8	2.0	1	1	-1	1.0	1	5	1	40	1
9	2.0	1	5	1	0.1	-1	5	1	40	1
10	0.5	-1	1	-1	0.1	-1	5	1	40	1
11	0.5	-1	5	1	1.0	1	1	-1	20	-1
12	2.0	1	1	-1	0.1	-1	1	-1	20	-1

^a Valores descodificados

^b Valores codificados

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar los resultados y se emplearon los gráficos de Pareto para representar los efectos principales. La influencia de cada variable se mide mediante el tamaño de cada barra en el gráfico y la línea vertical representa el intervalo de confianza del 95%. Por ello, cuando un efecto principal tiene una influencia significativa (positiva o negativa) la barra excede la línea vertical. Como se puede observar en la **Figura 6.11**, la masa de sorbente y la concentración de ácido fórmico eran variables significativas para ambos analitos. Respecto al volumen de desorción, este no era significativo para la isoC4, pero sí lo era para la C5. Por ello, estas tres variables se seleccionaron para llevar a cabo una optimización multivariante. En cuanto a las variables no significativas, se seleccionaron los valores mínimos (1 min) tanto para el tiempo de extracción como el de desorción, con la finalidad de reducir el consumo de tiempo y obtener un método que pueda tratar el mayor número de muestras posibles por unidad de tiempo.

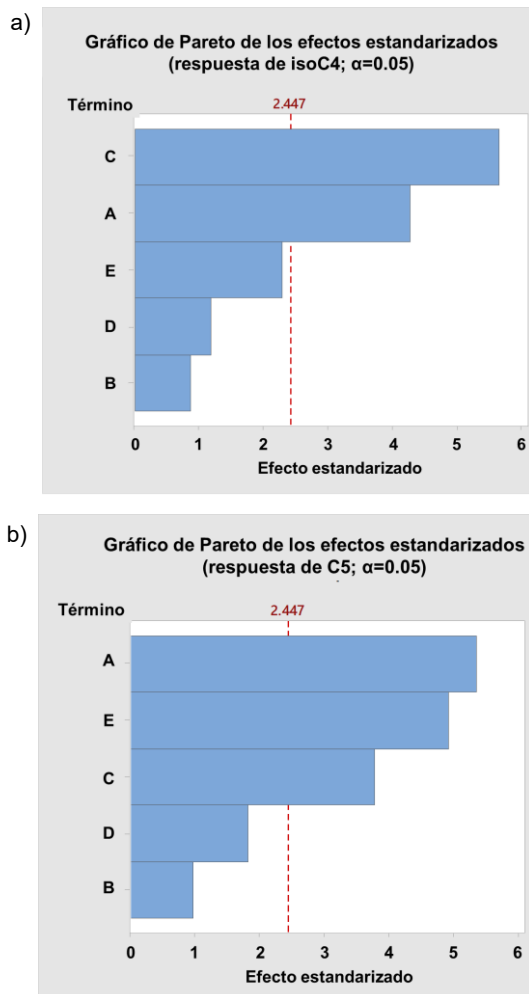


Figura 6.11. Gráficos de Pareto obtenidos en el diseño de Plackett-Burman para a) isoC4 y b) C5. A: masa de sorbente (mg); B: tiempo de extracción (min); C: concentración de ácido fórmico (%); D: tiempo de desorción (min); E: volumen de desorción (μL).

6.3.4.2. Optimización de las variables significativas

Se empleó una optimización multivariante basada en una metodología de superficie de respuesta (*Response Surface Methodology*, RSM) [161] para optimizar las variables significativas para la mSBSDME. Se utilizó un diseño de Box-Behnken (**Anexo I**) de tres factores y tres niveles. Los rangos estudiados para cada variable fueron los mismos que los seleccionados en el cribado

(Sección 6.3.4.1). Todos los experimentos se llevaron a cabo empleando 100 μL de un patrón de 50 ng mL^{-1} preparado en PBS diluido con 100 μL de agua ultrapura conteniendo la concentración correspondiente de ácido fórmico, agitando durante 1 min. Para llevar a cabo la desorción de los analitos se empleó una mezcla de $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ (tampón amonio, pH 9) (15:85, v/v). Se seleccionó el área de pico como respuesta analítica, empleando el software Statgraphics Centurion XVI (Virginia, EE. UU.) para llevar a cabo el análisis estadístico. Se requirieron en total 15 experimentos, incluyéndose un triplicado del punto central. Los valores para cada variable en cada experimento se muestran en la **Tabla 6.4**.

Tabla 6.4. Diseño Box-Behnken para la optimización multivariante de las variables significativas del procedimiento de extracción.

Etapas	Masa de sorbente (mg)		Concentración de ácido fórmico (%)		Volumen de desorción (μL)	
	D ^a	C ^b	D	C	D	C
1	0.5	-1	0.1	-1	30	0
2	2	1	0.1	-1	30	0
3	0.5	-1	1	1	30	0
4	2	1	1	1	30	0
5	0.5	-1	0.55	0	20	-1
6	2	1	0.55	0	20	-1
7	0.5	-1	0.55	0	40	1
8	2	1	0.55	0	40	1
9	1.25	0	0.1	-1	20	-1
10	1.25	0	1	1	20	-1
11	1.25	0	0.1	-1	40	1
12	1.25	0	1	1	40	1
13	1.25	0	0.55	0	30	0
14	1.25	0	0.55	0	30	0
15	1.25	0	0.55	0	30	0

^a Valores descodificados

^b Valores codificados

La adecuación del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), obteniéndose valores superiores a 0.94 para ambos analitos. Este valor indica que el modelo diseñado es eficiente para la predicción de las respuestas. En la **Figura 6.12** se muestran las superficies de respuesta en función de la deseabilidad. Como se puede observar, masas de sorbente de entre 0.5 y 1.4 mg presentaron elevados valores de deseabilidad. Por ello, con la finalidad de reducir el consumo de sorbente se seleccionó 0.5 mg como valor óptimo. Respecto al volumen de desorción, un valor de 40 μL proporcionó el mejor resultado, por lo que se eligió este valor. Esto se puede deber a la mejor dispersión del material en la fase aceptora. En el caso de la concentración de ácido fórmico en la fase dadora, el valor más bajo del rango (0.1 %) fue el que proporcionó unos mejores resultados, por lo que este valor se seleccionó como óptimo.

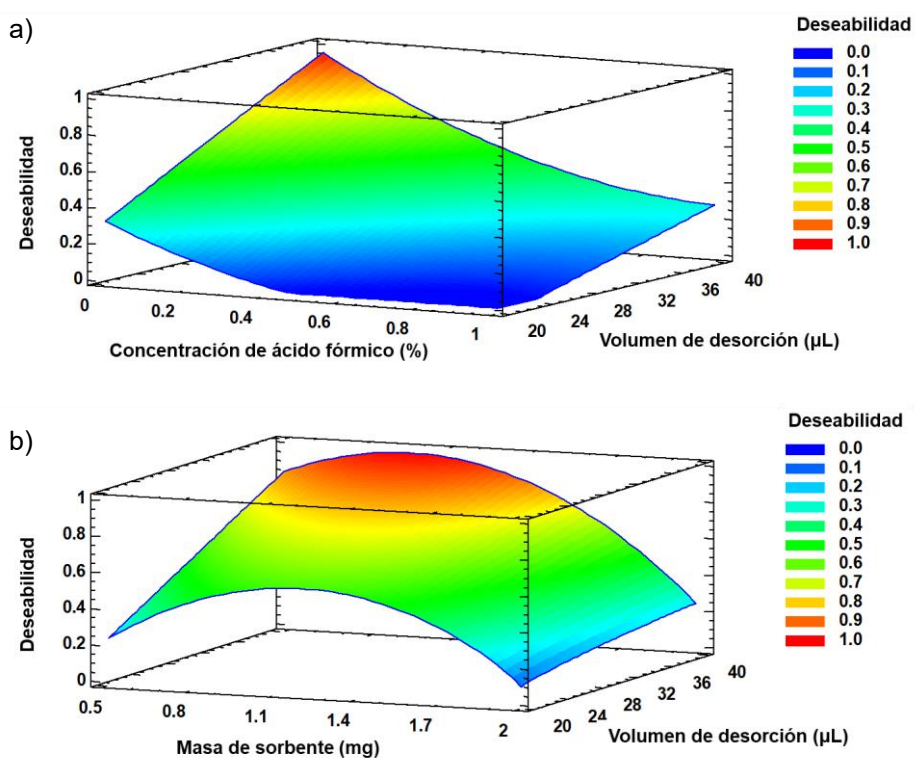


Figura 6.12. Superficie de respuesta de la función de deseabilidad representando la relación entre a) concentración de ácido fórmico y volumen de desorción y b) masa de sorbente y volumen de desorción.

6.3.4.3. Optimización del disolvente de desorción

Para la optimización del disolvente de desorción se empleó un diseño Simplex-Centroid [147] (**Anexo I**). Este modelo representa el triángulo de todas las mezclas posibles de tres componentes para encontrar el valor óptimo. Los disolventes puros se representan en los vértices del triángulo y las mezclas en los puntos intermedios. Se estudiaron como disolventes de desorción el MeOH, ACN y agua (tampón amonio 0.1 M, pH 9), empleando el software Statgraphics para el análisis estadístico. Las fracciones de las mezclas de los componentes se expresaron como valores entre 0 y 1. Se requirieron 7 experimentos, y los valores de cada disolvente en cada uno de ellos se encuentran en la **Tabla 6.5**. Como respuesta analítica se empleó el área de pico, y como condiciones de extracción las seleccionadas en el cribado (**Sección 6.3.4.1**) y la optimización previa (**Sección 6.3.4.2**). Todos los experimentos se llevaron a cabo en 100 μL de una disolución patrón de 50 ng mL^{-1} preparada en PBS y diluida con 100 μL de agua conteniendo ácido fórmico al 0.1 %.

Tabla 6.5. Diseño Simplex-Centroid para la optimización del disolvente de desorción.

Etapas	MeOH	ACN	Agua (tampón amonio 0.1 M, pH 9)
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	0	1/2	1/2
7	1/3	1/3	1/3

La adecuación del modelo se evaluó mediante el R^2 , obteniéndose un valor superior a 0.95 para ambos analitos. Este valor indica que el modelo diseñado es eficiente para la predicción de las respuestas. Como se muestra en la **Figura 6.13**, porcentajes elevados de agua junto con porcentajes bajos de MeOH proporcionaron los mejores resultados. Por ello, se seleccionó la mezcla MeOH:H₂O (tampón amonio 0.1 M, pH 9) (15:85, v/v) como valor óptimo ya que era la misma proporción que la fase móvil, evitando cualquier tipo de desdoblamiento o largas colas de los picos cromatográficos y, por tanto, también etapas de evaporación y reconstitución.

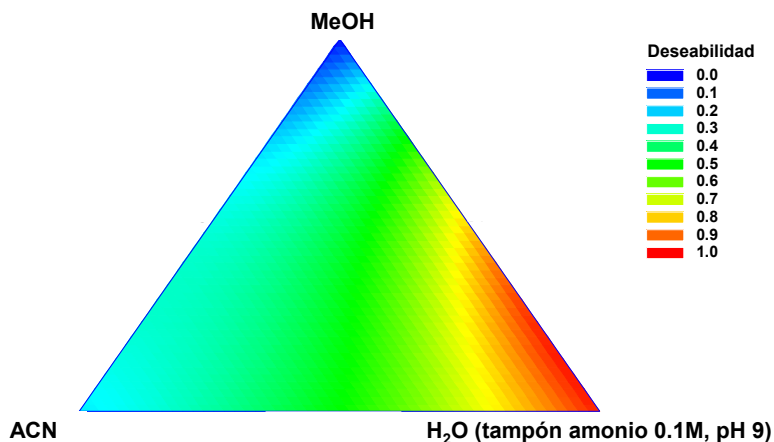


Figura 6.13. Representación gráfica del diseño Simplex-Centroid empleado para la optimización del disolvente de desorción.

6.3.5. Características analíticas del método

Se estudiaron diferentes parámetros tales como la linealidad, límites de detección (*Limit of Detection*, LOD) y cuantificación (*Limit of Quantification*, LOQ), precisión y exactitud empleando las condiciones optimizadas previamente para validar el método analítico (**Tabla 6.6**) de acuerdo con la guía armonizada ICH [149]. Además, se calcularon los rendimientos de extracción (*Extraction Efficiency*, EE) con la finalidad de obtener información adicional acerca de las características del método.

Para determinar la linealidad, se aplicó el método a disoluciones patrón preparadas en PBS conteniendo diferentes concentraciones de analitos y empleando isoC4-d₉ como patrón surrogado. Como señal analítica se utilizó la relación del área de los analitos y del patrón surrogado. Se determinó que la linealidad se extendía hasta, al menos, 100 ng mL⁻¹, obteniéndose coeficientes de determinación superiores a 0.998.

El EE del método se calculó de acuerdo con la **Ecuación 6.1**:

$$EE (\%) = \frac{m_f}{m_i} \cdot 100 = \frac{C_f \cdot V_f}{C_i \cdot V_i} \cdot 100 \propto \frac{A_f \cdot V_f}{A_i \cdot V_i} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 6.1})$$

Donde m_f es la masa final del analito en el extracto, m_i es la masa inicial del analito en la fase dadora (es decir, en la muestra), C_f es la concentración final del analito en el extracto, V_f es el volumen del extracto (40 µL), C_i es la concentración inicial de los analitos en la fase dadora y V_i es el volumen de la fase dadora (100 µL). A_f es el área de pico obtenida para el extracto y A_i es el área de pico de la fase dadora, considerando la relación directa entre la

concentración de los analitos con el área de pico instrumental. Se obtuvieron valores de 37 % para la isoC4 y 32 % para la C5.

Los LOD y LOQ se calcularon como 3 y 10 veces, respectivamente, la relación señal ruido de una disolución patrón de 1 ng mL⁻¹ preparada en PBS a la cual se le aplicó el método propuesto. Se obtuvieron valores de LOD y LOQ de entre 0.1 y 0.3 ng mL⁻¹ y entre 0.4 y 1.0 ng mL⁻¹, respectivamente para la isoC4 y C5.

La precisión del método propuesto se estudió en una misma sesión de trabajo (intra-día) y en diferentes sesiones consecutivas (inter-día). Con esta finalidad, se aplicó el método a cinco réplicas independientes de disoluciones patrón multicomponentes preparadas en PBS a tres niveles de concentración (1, 25 y 50 ng mL⁻¹) empleando isoC4-d₉ como patrón surrogado. Como se puede observar en la **Tabla 6.6**, los valores obtenidos se encontraban entre 5 y 12 % para la isoC4 y entre 8 y 14 % para la C5.

Tabla 6.6. Características analíticas del método propuesto para la determinación de isoC4 y C5 en suero.

Analito	EE (%)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Precisión (RSD, %)					
				Intra-día			Inter-día		
				1 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹	50 ng mL ⁻¹	1 ng mL ⁻¹	25 ng mL ⁻¹	50 ng mL ⁻¹
isoC4	37	0.1	0.4	10	5	12	7	9	8
C5	32	0.3	1.0	8	9	12	14	9	10

6.3.6. Estudio del efecto matriz

Para evaluar la exactitud del método y descartar la presencia de efecto matriz, se fortificó una mezcla de sueros de diferentes voluntarios a dos niveles de concentración (5 y 25 ng mL⁻¹) y se aplicó el método basado en mSBSDME. A continuación, se calcularon los coeficientes de recuperación relativa, obteniendo valores entre 95 y 120 % para la isoC4 y entre 110 y 120 % para la C5 (**Tabla 6.7**), demostrando que el efecto matriz era despreciable. Por ello, se empleó calibración externa para la determinación de estas acilcarnitinas de cadena corta en muestras de suero empleando isoC4-d₉ como patrón surrogado, el cual permitía corregir posibles desviaciones tanto en la etapa de medida como durante todo el proceso de extracción.

Tabla 6.7. Coeficientes de recuperación relativa obtenidos para una mezcla de sueros de diferentes voluntarios aplicando el método propuesto.

Añadido (ng mL ⁻¹)	Encontrado (ng mL ⁻¹)		Coeficientes de recuperación relativa (%)	
	isoC4	C5	isoC4	C5
0	54 ± 2	49 ± 1	-	-
5	59 ± 2	55 ± 2	95 ± 5	120 ± 10
25	84 ± 3	76 ± 2	120 ± 8	110 ± 7

6.3.7. Análisis de muestras

Para demostrar la aplicabilidad del método se analizaron muestras de cinco voluntarios. Como se muestra en **Tabla 6.8**, los valores obtenidos se encontraban entre 24 y 54 ng mL⁻¹ para isoC4 y entre 39 y 64 ng mL⁻¹ para C5. De este modo, se demostró la adecuación del método para la determinación de las acilcarnitinas de cadena corta isoC4 y C5 en suero. Por ello, sería de elevado interés realizar el análisis de un mayor número de muestras tanto de voluntarios sanos como de personas que padecen cáncer de vejiga con la finalidad de obtener valores límite para el diagnóstico de esta enfermedad.

Tabla 6.8. Resultados obtenidos aplicando el método basado en mSBSDME a muestras de suero de diferentes personas voluntarias.

Persona voluntaria	Concentración (ng mL ⁻¹)	
	isoC4	C5
1	48 ± 2	50 ± 2
2	36 ± 2	55 ± 2
3	54 ± 3	39 ± 1
4	53 ± 1	64 ± 2
5	24 ± 2	46 ± 1

6.3.8. Comparación con métodos previos y evaluación de la sostenibilidad

En la **Tabla 6.9** se muestra una comparación del método desarrollado con métodos previos en los que se lleva a cabo la determinación de isoC4 y C5 en muestras biológicas empleando técnicas de microextracción. Respecto a la cantidad de la muestra, el método desarrollado presenta una clara ventaja ya que emplea 40 veces menos muestra que el otro precedente donde se analiza una muestra líquida (orina). A pesar de que se pueden obtener elevados volúmenes de orina fácilmente, esta metodología no sería aplicable a muestras de baja disponibilidad. En el caso de los métodos previos en los que la muestra es un tejido, la fibra de SPME se insertó en su interior, por lo que no se especificó la cantidad utilizada. Respecto a las condiciones de la preparación de muestra, el método desarrollado presenta una ventaja sustancial en términos de tiempos de extracción y desorción, ya que solo emplea 1 min en cada etapa, mientras que los métodos previos requieren entre 30 y 60 min para la extracción y entre 2 y 60 min para la desorción. En este sentido, el método basado en mSBSDME no presenta etapas con un elevado consumo de tiempo y además emplea una plataforma de 96 posiciones, por lo que se obtiene una productividad mucho mayor que para los métodos previos. Parámetros analíticos como los LODs, la precisión o los EFs no se especificaron en los métodos anteriores, por lo que no se pudo realizar una comparación.

El impacto ambiental de la etapa de preparación de muestra se evaluó empleando la herramienta métrica AGREEprep [63]. Como se observa en la **Figura 6.14**, la puntuación obtenida mostró que el método desarrollado presenta una etapa de preparación de muestra con un menor impacto ambiental. La mayor ventaja está relacionada con la cantidad de muestras que se pueden tratar por unidad de tiempo (criterio 6) debido a los cortos tiempos de extracción y desorción combinados con el empleo de una plataforma de 96 posiciones, lo cual afecta directamente al consumo de energía por muestra (criterio 8). Los valores considerados para cada criterio se muestran en la **Tabla 6.10**.

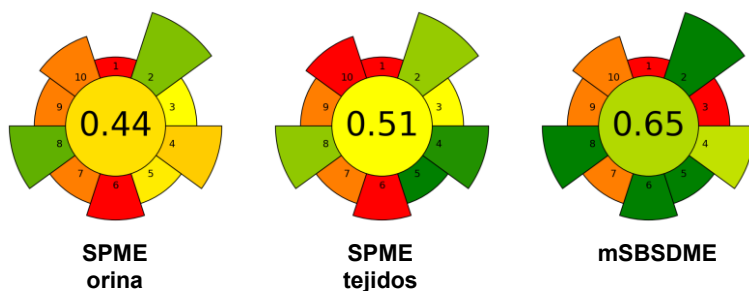


Figura 6.14. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos comparados.

Tabla 6.9. Comparación del método desarrollado basado en mSBSDME con otros métodos previos empleando microextracción para el análisis de isoC4 y C5 en muestras biológicas.

Matriz	Técnica de extracción	Técnica instrumental	Cantidad de muestra	Condiciones de la etapa de extracción ^b	Ref.
Orina	SPME	MS	4 mL	Extracción: CAR-PDMS; 60 min Desorción: 70 µL MeOH:H ₂ O (80:20 v/v); 2 min	[204]
Tejido	SPME	LC-MS/MS	n.r. ^a	Extracción: C ₁₈ ; 30 min Desorción: 150 µL MeOH:IPA (1:1 v/v); 60 min	[205]
Tejido	SPME	LC-MS/MS	n.r.	Extracción: C ₁₈ ; 30 min Desorción: 150 µL MeOH:IPA (1:1 v/v); 60 min	[206]
Suero	mSBSDME	LC-MS/MS	0.1 mL	Extracción: 0.5 mg CoFe ₂ O ₄ -SCX; 1 min Desorción: 40 µL MeOH:H ₂ O (tampón amonio 0.1 M, pH 9); 1 min	Este trabajo

^a no reportado

^b CAR: carbowax; IPA: isopropanol; PDMS: polidimetilsiloxano

Tabla 6.10. Valores considerados en la aplicación de la herramienta AGREEprep de los métodos comparados.

Criterio	Método		
	SPME orina [204]	SPME tejido [205,206]	mSBSDME
1. Lugar de preparación de muestra	<i>Ex situ</i>	<i>Ex situ</i>	<i>Ex situ</i>
2. Materiales peligrosos (g o mL)	0.06	0.08	0.01
3. Sostenibilidad, renovabilidad y reusabilidad de los materiales	Los materiales no son sostenibles ni renovables pero se usan diversas veces	Los materiales no son sostenibles ni renovables pero se usan diversas veces	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez
4. Residuos	4.07	0.15	1.04
5. Cantidad de muestra (g o mL)	4	0	0.1
6. Productividad	0.96	0.66	192
7. Integración y automatización	2 etapas o menos, sistema manual	2 etapas o menos, sistema manual	2 etapas o menos, sistema manual
8. Consumo de energía (W)	20.66	30	0.01
9. Análisis instrumental	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos
10. Seguridad del operador	3 pictogramas	4 o más pictogramas	3 pictogramas

Para evaluar la viabilidad del método analítico se aplicó la herramienta *Blue Applicability Grade Index* (BAGI) [70]. Se obtuvo una puntuación de 65 para el método desarrollado, siendo superior a las puntuaciones obtenidas para los métodos previos (50 y 57.5) (**Figura 6.15**). Por tanto, se puede afirmar que el método basado en mSBSDME presenta una mayor practicidad, mejorando especialmente en criterios relacionados con el número de muestras tratadas por unidad de tiempo y las muestras que se pueden tratar simultáneamente. Los valores considerados para cada criterio se encuentran en la **Tabla 6.11**.

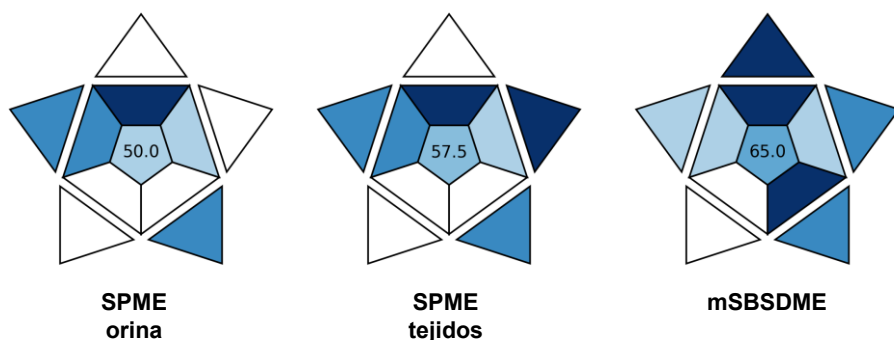


Figura 6.15. Evaluación mediante BAGI de los métodos comparados.

6.4. Conclusiones

En este capítulo se ha desarrollado un método con una elevada productividad para la determinación de las acilcarnitinas isoC4 y C5 en suero gracias al empleo de una plataforma de 96 posiciones. Además, se ha empleado una técnica de microextracción dispersiva como la mSBSDME, requiriendo cortos tiempos de extracción y desorción (ambos 1 min) utilizando un material magnético ($\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-SCX}$) como sorbente, el cual presenta una buena eficacia de extracción debido a las interacciones iónicas establecidas con los analitos. A pesar de que es imprescindible realizar la síntesis del sorbente magnético dado que no se encuentra disponible comercialmente, se puede llevar a cabo un elevado número de extracciones con una sola síntesis debido a la baja masa (0.5 mg) que se requiere para cada análisis. En cualquier caso, se ha demostrado que la síntesis es repetible. El método basado en mSBSDME se ha validado en términos de linealidad, rendimiento de extracción, límites de detección y precisión. Los valores obtenidos de coeficientes de recuperación relativa oscilan entre 95 y 120 %, demostrando que el efecto matriz es despreciable, empleando calibración externa. Se ha utilizado como patrón surrogado isoC4- d_9 con la finalidad de corregir cualquier tipo de imprecisión durante el procedimiento analítico. Se ha realizado el análisis de suero de cinco voluntarios mediante el método desarrollado para demostrar su aplicabilidad, cuantificando ambos analitos en todas las muestras. Basándose en estos resultados, sería de gran interés llevar a cabo el análisis de una cohorte mayor de muestras tanto de voluntarios sanos como de pacientes de cáncer de vejiga para establecer los valores límite de estos biomarcadores en suero. El impacto ambiental y la practicidad del método desarrollado se han comparado con métodos previos, obteniendo mejores valores para el método basado en mSBSDME, especialmente en los criterios relacionados con el número de muestras que pueden ser tratadas por unidad de tiempo.

Tabla 6.11. Valores considerados en la aplicación de la herramienta AGREEprep de los métodos comparados.

Criterio	Método		
	SPME en orina [204]	SPME en tejido [205,206]	mSBSDE
Tipo de análisis	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio
Análisis multielemental o individual	Análisis multielemental de 6 a 15 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de 6 a 15 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de 2 a 5 compuestos de la misma familia química
Técnica analítica	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios
Preparación de muestra simultánea	1	1	>95
Preparación de muestra	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción
Muestras por hora	≤1	≤1	>95
Reactivos y materiales	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes	Necesitan sintetizarse en el laboratorio con instrumentación común de forma simple
Preconcentración	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas
Grado de automatización	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes
Cantidad de muestra	>1000 µL (o mg) muestras biológicas	<100 µL (o mg) muestras biológicas	100-500 µL (o mg) muestras biológicas

Capítulo 7

Desarrollo de una estación de trabajo robótica controlada mediante software de código abierto para llevar a cabo microextracción en fase sólida dispersiva en muestras de bajo volumen

El contenido de este capítulo ha sido publicado en el artículo:

G. Peris-Pastor, J. Grau, L. Arruza, J.L. Benedé, A. Chisvert, Lab-made open-source controlled robotic workstation for sorbent-based dispersive microextraction of low-volume samples, *Anal. Chim. Acta* 1356 (2025) 344033



Resumen

A pesar de que las técnicas de microextracción han ganado prominencia sobre las técnicas de extracción convencionales, estas usualmente involucran procedimientos más o menos repetitivos que a veces pueden resultar tediosos. La automatización parcial o total de estos procedimientos podría de alguna manera ayudar a mitigar este inconveniente. A pesar de que se encuentran disponibles diferentes sistemas para automatizar la etapa de preparación de muestra, estos tienen un coste elevado y no son asequibles para un elevado número de laboratorios. Con el objetivo de contribuir a la automatización en el campo de la preparación de muestra, y, más específicamente, en las técnicas de microextracción, en este capítulo se ha desarrollado una estación de trabajo robótica controlada mediante software de código abierto que permite llevar a cabo microextracción dispersiva basada en sorbentes en muestras de bajo volumen de forma semiautomatizada. La estación de trabajo robótica está compuesta por dispositivos electrónicos de bajo coste convenientemente ensamblados en una carcasa impresa en 3D y controlada por el software de código abierto Arduino, siendo la primera estación robótica no comercial dedicada a la microextracción dispersiva basada en sorbentes. Para demostrar el potencial de esta estación robótica, se ha empleado para la extracción y posterior determinación de tres acilcarnitinas de cadena larga, biomarcadores de metabolopatías, en muestras de suero de recién nacidos. La determinación instrumental de los analitos se ha realizado mediante análisis por inyección en flujo acoplado a espectrometría de masas en tándem (*Flow Injection Analysis-Tandem Mass Spectrometry*, FIA-MS/MS). Finalmente, el método se ha validado en términos de sensibilidad, precisión y exactitud y se ha aplicado con éxito al análisis de muestras de cinco recién nacidos.

7.1. Introducción

Como se ha mencionado en los **Capítulos 1 y 2**, se han desarrollado numerosas técnicas de microextracción, tanto en fase sólida como líquida, con la finalidad de sustituir a las técnicas clásicas de extracción (la extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction*, SPE) y la extracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Extraction*, LLE)). Sin embargo, a pesar de sus prestaciones, en ocasiones requieren de procedimientos manuales repetitivos (y usualmente tediosos) y/o emplean largos tiempos de extracción, limitando su utilidad en algunas aplicaciones más exigentes [212]. Con la finalidad de minimizar estos inconvenientes y obtener métodos que permitan tratar un gran número de muestras por unidad de tiempo, se pueden seguir dos estrategias: la automatización del procedimiento y/o realizar extracciones en paralelo.

Por un lado, se debe admitir que las extracciones en paralelo son una consecuencia de la reducción del espacio físico debido a la miniaturización [8]. Cabe mencionar los avances realizados en el desarrollo de plataformas de multiextracción basadas en el concepto de placas de 96 pocillos para llevar a cabo técnicas de extracción estáticas como SPE [213], microextracción en fase sólida (*Solid-Phase Microextraction*, SPME) [214], microextracción en fase líquida con fibra hueca (*Hollow-Fiber Liquid-Phase Microextraction*, HF-LPME) [215], microextracción en gota (*Single-Drop Microextraction*, SDME) [209] y extracción paralela en membrana líquida artificial (*Parallel Artificial Liquid Membrane Extraction*, PALME) [216]. A pesar de que las técnicas dispersivas son más difíciles de automatizar que las estáticas debido a su propio procedimiento experimental, el uso de materiales magnéticos ha permitido desarrollar plataformas basadas en placas de 96 pocillos para llevar a cabo microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) [217] y microextracción en fase sólida dispersiva (*Dispersive Micro Solid-Phase Extraction*, DMSPE) (más específicamente microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora miniaturizada (*Miniaturized Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, mSBSDE)) [163].

Por otro lado, como se ha comentado en el **Capítulo 1**, se han desarrollado un gran número de estaciones robóticas para llevar a cabo la automatización de las técnicas de microextracción. Esto se debe a que exhiben un potencial muy elevado, ya que proporcionan resultados exactos y precisos, mientras reducen los riesgos de salud asociados a productos químicos peligrosos o agentes biológicos [11,218].

Como también se ha discutido en el **Capítulo 1**, los sistemas robóticos comerciales presentan un gran coste, limitando así su uso en laboratorios con un elevado presupuesto [11,212]. Por ello, existe una tendencia emergente que se basa en el empleo de recursos de acceso libre, tales como los microcontroladores basados en Arduino. Estos permiten controlar dispositivos

de bajo coste, pudiendo así los investigadores sin conocimientos especializados en electrónica o programación crear sus propias estaciones robóticas para llevar a cabo operaciones específicas sin necesidad de disponer de un presupuesto elevado [11,37]. Recientemente, el grupo de investigación de Santos-Neto presentó dos robots cartesianos desarrollados en el laboratorio y controlados mediante Arduino. Uno permite llevar a cabo diferentes técnicas de microextracción tales como SDME [37,219], HF-LPME [46] y SPME [18], mientras que el otro es capaz de llevar a cabo la microextracción mediante sorbente empaquetado (*Microextraction by Packed Sorbent*, MEPS) [30] (ambos sistemas se encuentran descritos en el **Capítulo 1**). Asimismo, Carasek y colaboradores presentaron un dispositivo para realizar la extracción dispersiva en punta de pipeta (*Dispersive Pipette Extraction*, DPX) [220] mediante un procedimiento similar.

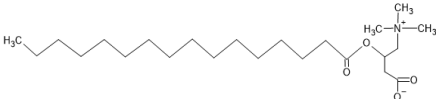
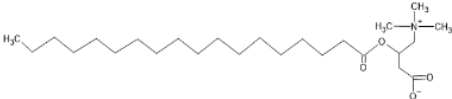
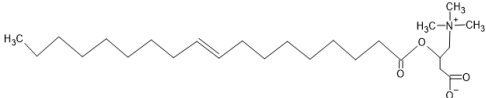
A pesar de las claras ventajas de la DMSPE empleando materiales magnéticos, no se han presentado estaciones de trabajo robóticas no comerciales para llevarla a cabo. Probablemente esto se debe a que el procedimiento experimental requiere operaciones que implican separar el sorbente de la disolución, siendo etapas difíciles de automatizar.

Todos los trabajos mencionados anteriormente requieren de volúmenes relativamente elevados de muestra (del orden de los mL), lo que puede suponer una limitación para el análisis de muestras de muy bajo volumen (inferior a 100 μ L), como es el caso de algunos fluidos biológicos. Dejando de un lado la orina y la sangre, no se suele disponer de un elevado volumen de muestra de la gran mayoría de los fluidos biológicos restantes debido a su naturaleza (saliva, semen, fluido folicular o cerebrospinal, entre otros) o debido a las características de la persona sometida al estudio (recién nacidos, pacientes inmunodeprimidos). Además, las matrices biológicas contienen un elevado número de compuestos potencialmente interferentes, dificultando el análisis de trazas. También cabe mencionar que el análisis clínico suele ser rutinario, requiriendo obtener resultados rápidos de un elevado número de muestras.

Con todo lo expuesto, el objetivo de este trabajo es desarrollar una estación robótica controlada por software de código abierto que sea compatible con muestras de muy bajo volumen, realizando la extracción de los analitos mediante una técnica de microextracción dispersiva basada en sorbentes magnéticos evitando procedimientos largos y tediosos de preparación de muestra. Para demostrar la aplicabilidad de la estación a desarrollar, se ha seleccionado la determinación de tres acilcarnitinas de cadena larga (palmitoil-L-carnitina (C16), estearoil-L-carnitina (C18) y oleoil-L-carnitina (C18:1) (**Tabla 7.1**)) en muestras de suero de recién nacido, a modo de prueba de concepto. Este bioanálisis es de vital importancia ya que proporciona información acerca de desórdenes en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga y deben

ser detectados en los primeros días de vida de los recién nacidos para evitar complicaciones mayores [221].

Tabla 7.1. Estructura molecular y algunas propiedades relevantes de los analitos.

Analito	Estructura molecular	$\log P_{ow}^a$	M_w (g mol ⁻¹) ^b
C16		7.7	399.6
C18		8.8	427.6
C18:1		7.9	425.6

^a P_{ow} : Coeficiente de partición octanol-agua

^b M_w : Masa molecular

7.2. Experimental

7.2.1. Reactivos

Los patrones de palmitoil-L-carnitina (C16) ($\geq 97\%$), estearoil-L-carnitina (C18) ($\geq 97\%$), oleoil-L-carnitina (C18:1) (estándar analítico) y palmitoil-L-carnitina-(N-metil-d₃) (C16-d₃) (estándar analítico) se adquirieron de Sigma Aldrich.

Para la preparación de las disoluciones patrón se empleó etanol de Panreac (Barcelona, España). Para la síntesis de CoFe₂O₄@ácido oleico, se adquirió FeCl₃·6H₂O y CoCl₂·6H₂O de Acros Organics (Geel, Bélgica) y ácido oleico de Sigma Aldrich (Steinheim, Alemania). Se obtuvo agua ultrapura (resistividad ≥ 18.2 MΩ cm) a través de un sistema de purificación de agua Adrona (Riga, Letonia). Se empleó acetonitrilo grado LC-MS de Panreac como disolvente de acondicionamiento y desorción, y metanol grado LC-MS/MS de Honeywell (Seelze, Alemania) como portador en FIA-MS/MS.

Para la preparación de suero sintético se adquirió cloruro de potasio (KCl) y dihidrógeno fosfato de sodio (NaH₂PO₄·H₂O) de Panreac, cloruro de sodio (NaCl) de Fisher Chemical (Loughborough, Reino Unido) e hidrogeno fosfato de disodio (Na₂HPO₄·12H₂O) de Scharlab (Barcelona, España).

Capítulo 7

Como gas de nebulización en la fuente MS/MS se empleó nitrógeno obtenido a través de un generador NiGen LCMS 40-1 de Claind S.r.l. (Lenno, Italia), mientras que se empleó nitrógeno extrapuro (> 99.999 %) de Praxair (Madrid, España) como gas de colisión en la celda de colisión del MS/MS.

7.2.2. Instrumentación

Para la preparación de suero sintético se utilizó un medidor de pH Basic 20 de Crison (Alella, España).

Se empleó un sistema de cromatografía de líquidos Agilent Technologies 1100 Series equipado con un desgasificador, una bomba cuaternaria, inyector automático y una precolumna de C₁₈ de 2.1 mm de diámetro interno de Phenomenex (Torrence, EE. UU.) acoplada a un detector Agilent 6410B Triple Quad MS/MS.

7.2.3. Toma de muestra y pretratamiento

En el estudio de validación se empleó una muestra de suero de un voluntario adulto. Para su obtención, profesionales sanitarios realizaron una extracción de sangre en un tubo no heparinizado y se dejó en reposo durante 10 minutos. A continuación, se centrifugó a 5000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se guardó en el congelador a -20 °C hasta su análisis.

Las muestras de recién nacidos fueron provistas por el hospital clínico San Carlos (Madrid, España). Para su obtención se realizó una punción en el talón de cada uno de los recién nacidos y la sangre se recogió en microtubos de centrifuga, los cuales fueron ultracentrifugados, y los sobrenadantes almacenados a -80°C hasta su análisis. Se obtuvo el consentimiento por escrito de los progenitores antes de recolectar las muestras. El estudio se aprobó por el Comité de Ética de Investigación en Humanos (CEIH) de la Universidad de Valencia y el Hospital Clínico San Carlos.

7.2.4. Preparación de suero sintético

Se empleó tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline* PBS) pH 7.4 como suero sintético, preparándose de acuerdo con un protocolo modificado [191]. Para ello, se preparó una disolución en agua ultrapura conteniendo NaCl (8.00 g L⁻¹), KCl (0.20 g L⁻¹), KH₂PO₄ (0.24 g L⁻¹) y Na₂HPO₄·12H₂O (1.44 g L⁻¹), ajustando el pH a 7.4.

7.2.5. Preparación de disoluciones patrón

Se prepararon disoluciones patrón individuales en etanol de C16, C18 y C18:1 a una concentración de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, y C16-d₃ (patrón surrogado) a una concentración de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. A continuación, se preparó una disolución multicomponente intermedia de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos, así como otra de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de patrón surrogado, en PBS. Las disoluciones de trabajo de entre 10 y $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ se prepararon en PBS a partir de la disolución patrón intermedia.

7.2.6. Descripción de la estación de trabajo robótica

La estación de trabajo robótica se construyó empleando dispositivos de bajo coste posicionados convenientemente y se encuentra protegida con una patente (ES3030757A1). Para su fabricación se adquirió un microcontrolador Uno R3, un módulo de alimentación (9V), una placa electrónica, un motor, un servomotor y unos leds de diferentes colores del *Super Starter Kit* de Elegoo (Shenzhen, China); un electroimán KK-P20/15 (2.5 kg fuerza) de KaKa Electric (Yueqing, China); un imán de neodimio de 10 mm de longitud x 2 mm de diámetro de Supermagnete (Gottmadingen, Alemania); y tapas de microtubos de centrífuga (0.5 mL) de polipropileno (3 mm altura x 4 mm de diámetro) de Daslab empleados como recipiente de extracción. El soporte (20.2 x 19.4 x 10.2 cm) y otros objetos impresos en 3D se diseñaron con el software AutoCAD 2023 (San Rafael, EE. UU.) y se imprimieron por Imprimakers (Valencia, España) empleando ácido poliláctico. La **Figura 7.1** muestra la vista frontal a) y lateral b) de la estación de trabajo robótica.

El servomotor, mediante el brazo impreso en 3D, permite el movimiento translacional del motor 22° respecto a la posición de acceso (donde el operador puede acceder al recipiente de extracción (**Figura 7.2a**)), desplazándolo a la posición de trabajo (**Figura 7.2b**), en la cual se encuentra en funcionamiento.

La **Figura 7.3** muestra la vista superior de los elementos de hardware posicionados dentro de la carcasa impresa en 3D y las conexiones eléctricas. El módulo de alimentación permite que la estación de trabajo robótica sea alimentada por una batería externa (9V) sin necesidad de enchufarse directamente a la red eléctrica, garantizando su total portabilidad.

Se empleó el software Arduino IDE 1.8.19 (Ivrea, Italia) para escribir el código en lenguaje C++, el cual se envió al microcontrolador para su ejecución.

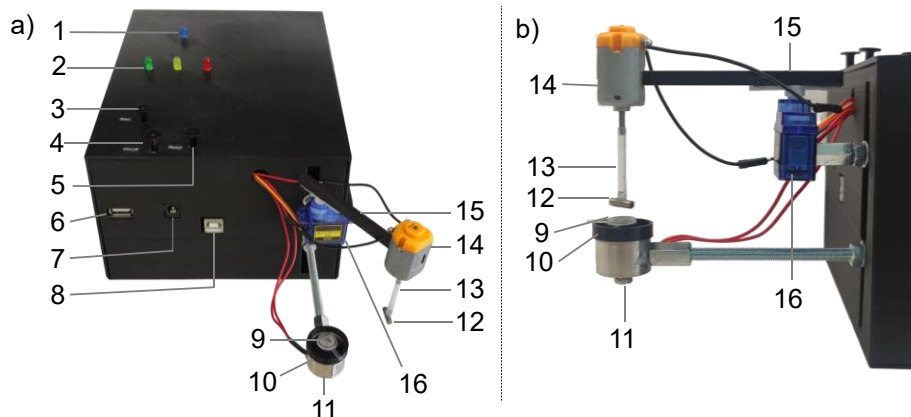


Figura 7.1. a) Vista frontal y b) vista lateral de la estación de trabajo robótica desarrollada (1: LED *On/Off*; 2: LEDs temporizadores; 3: Botón “*Start*”; 4: Botón “*On/Off*”; 5: Botón “*Reset*”; 6: Puerto USB A; 7: Puerto de alimentación; 8: Puerto USB B; 9: tapa de microtubo de centrífuga como recipiente de extracción; 10: Soporte impreso en 3D; 11: Electroimán; 12: Imán de neodimio (10 mm longitud x 4 mm diámetro); 13: Eje de plástico (25 mm largo x 2 mm diámetro interno); 14: Motor; 15: Brazo impreso en 3D (70 mm largo x 5 mm ancho x 5 mm alto); 16: Servomotor).

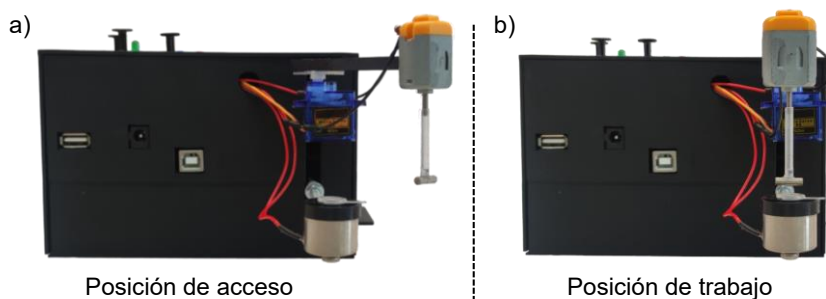


Figura 7.2. Vista frontal de la estación de trabajo robótica en la posición de a) acceso y en la de b) trabajo.

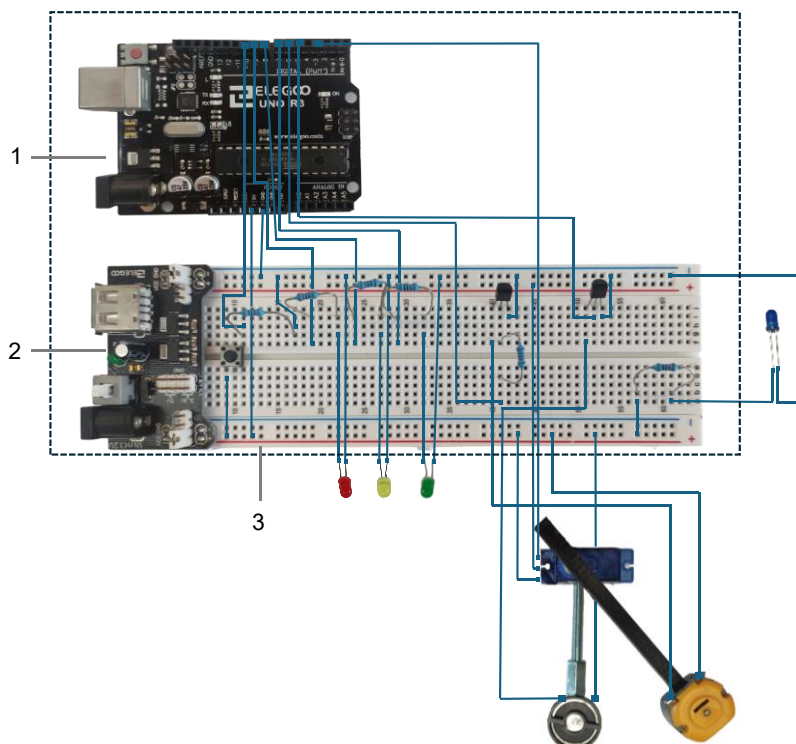


Figura 7.3. Vista superior de la disposición de los elementos de hardware y conexiones eléctricas (1: Microcontrolador Uno R3; 2: Módulo de alimentación; 3: Placa electrónica). La línea discontinua delimita los elementos situados en el interior de la carcasa.

7.2.7. Procedimiento operacional de la estación robótica

El procedimiento operacional puede verse en vídeo clicando o escaneando el siguiente código QR:



En primer lugar, se presiona el botón “On/Off”, encendiéndose el LED azul. El recipiente de extracción conteniendo el material sorbente previamente pesado se posiciona en el soporte impreso en 3D mientras que la estación de trabajo

robótica se mantiene en la posición de acceso. A continuación, se añade un volumen determinado de disolvente de acondicionamiento al recipiente de extracción. Seguidamente, se presiona el botón “*Start*”, de forma que el servomotor posiciona el motor en la posición de trabajo y este último se activa haciendo girar el imán a una velocidad previamente programada provocando la dispersión del sorbente magnético. Después de un tiempo definido (previamente programado), el motor se detiene y simultáneamente se activa el electroimán, quedando el sorbente magnético sedimentado y moviéndose el servomotor a la posición de acceso. En ese instante, se enciende el LED verde, indicando que el operador puede acceder a retirar el disolvente de acondicionamiento y añadir la muestra o la disolución patrón. El LED amarillo advierte al operador de que el tiempo (previamente programado) se está acabando. A continuación, el LED rojo se enciende y el servomotor vuelve a la posición de trabajo, deteniéndose el electroimán para liberar el sorbente. Simultáneamente, el motor se activa para dispersar el material durante un periodo determinado de tiempo (previamente programado). El mismo procedimiento se repite (cambiando las condiciones de tiempo y velocidad de agitación, en caso de ser necesario), retirando la muestra o disolución patrón y añadiendo el disolvente de lavado (si es necesario) o el disolvente de desorción. Finalmente, el extracto se transfiere a un vial de inyección. Cabe resaltar que el procedimiento completo de extracción/desorción se realiza en el mismo recipiente de extracción.

7.2.8. Síntesis del sorbente magnético

La síntesis de las nanopartículas magnéticas (*Magnetic Nanoparticles*, MNPs) de CoFe_2O_4 @ácido oleico se realizó mediante coprecipitación química, de acuerdo con un protocolo modificado [155]. Para ello, se mezclaron 100 mL de una disolución acuosa 0.4 M de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 100 mL de una disolución acuosa 0.2 M de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Seguidamente, se añadieron 100 mL de NaOH 3 M gota a gota calentando a 80 °C mientras la disolución se agitaba magnéticamente. Para la funcionalización de las MNPs se añadieron 2 mL de ácido oleico a la mezcla sin variar las condiciones, manteniendo la agitación durante 1 h. El precipitado negro obtenido se enfrió a temperatura ambiente, se decantó y el sólido se lavó varias veces con agua ultrapura y etanol para eliminar el exceso de ácido oleico. Finalmente, el precipitado se dejó secar en la estufa a 80 °C durante toda la noche y se molió para obtener un polvo fino.

7.2.9. Procedimiento de microextracción

Se emplearon 0.74 mg de MNPs de CoFe_2O_4 @ácido oleico como sorbente. Para el acondicionamiento del material se emplearon 50 μL de acetonitrilo agitando a 200 u.a. (7000 rpm) durante 1 min. En la etapa de extracción se

añadieron 40 μL de muestra de suero (o disolución patrón) y 10 μL de disolución de patrón surrogado agitando a 140 u.a. (5400 rpm) durante 5 min. Para realizar el lavado del material y del recipiente de extracción se añadieron 50 μL de agua ultrapura y seguidamente se descartaron. Para la desorción de los analitos se emplearon 20 μL de acetonitrilo agitando a 200 u.a. durante 3.5 min. A continuación, el extracto se aspiró con una punta de pipeta de 200 μL conteniendo un imán cúbico de NdFeB (1 mm x 1 mm) [80] en su interior para asegurar que cualquier partícula magnética que contuviera el disolvente de desorción se quedara retenida en la superficie del imán. Finalmente, el extracto se transfirió a un inserto de 250 μL situado en el interior de un vial de inyección para su análisis mediante FIA-MS/MS. La **Figura 7.4** muestra un esquema del procedimiento de microextracción propuesto para la determinación de acilcarnitinas de cadena larga en muestras de suero de recién nacidos.

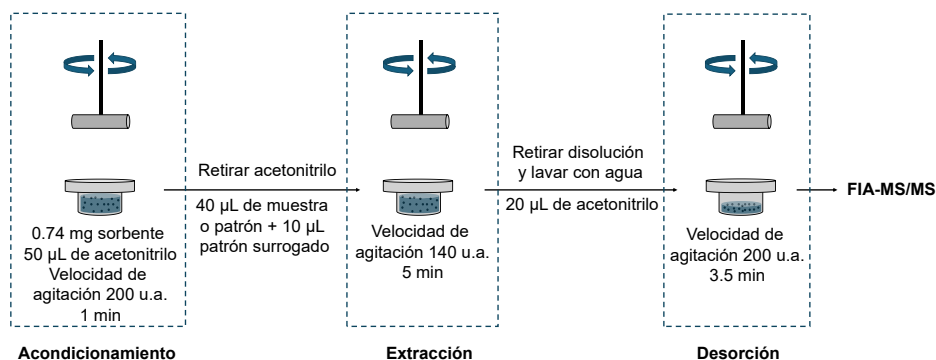


Figura 7.4. Esquema del procedimiento de extracción propuesto.

7.2.10. Análisis por inyección en flujo acoplado a espectrometría de masas en tándem (FIA-MS/MS)

- Volumen de inyección: 5 μL
- Disolvente portador: metanol
- Caudal: 0.2 mL min^{-1}
- Duración del cronograma: 2 min
- Modo ionización MS/MS: ESI+
- Voltaje: 5500 V (ESI+)
- Temperatura del gas de nebulización: 340 $^{\circ}\text{C}$
- Flujo del gas de nebulización: 12 L min^{-1}

- Presión del nebulizador: 20 psi

En la **Tabla 7.2** se muestran las transiciones empleadas para la detección instrumental de los compuestos de interés.

Tabla 7.2. Relaciones masa/carga (m/z) de los iones precursores y producto, energías de colisión y fragmentador para los analitos y el patrón surrogado.

Compuesto	Ion precursor (m/z)	Ion producto ^a (m/z)	Energía de colisión (V)	Fragmentador (V)
C16	400.3	85	30	150
		57	58	
C18	428.3	85	30	150
		57	58	
C18:1	426.3	85	30	150
		57	58	
C16-d ₃	403.3	85	30	150
		-	-	

^a En negrita se resaltan las m/z empleadas para la cuantificación

En la **Figura 7.5** se muestran los cronogramas obtenidos al aplicar el método a una disolución patrón conteniendo 100 ng mL⁻¹ de los analitos.

7.3. Resultados y discusión

7.3.1. Concepto y diseño de la estación robótica desarrollada

El punto de partida para el desarrollo de la estación robótica fue la microextracción dispersiva por sorción sobre barra agitadora (*Stir Bar Sorptive Dispersive Microextraction*, SBSDE) [222], desarrollada por el grupo de investigación en el que se ha llevado a cabo esta Tesis Doctoral, y más específicamente su versión miniaturizada (mSBSDE) [81,163] diseñada para volúmenes de muestra relativamente pequeños. Sin embargo, la mSBSDE no es compatible con volúmenes muy bajos de muestra (<100 µL) ya que la fuerza motriz (es decir, el imán) es demasiado grande para ser empleado en muestras de pocos microlitros, por lo que se propuso situarlo en el exterior de la disolución. Además, esto le confiere una ventaja adicional al prevenir la

contaminación cruzada entre muestras sucesivas, a menos que se lleve a cabo una limpieza escurpulsosa.

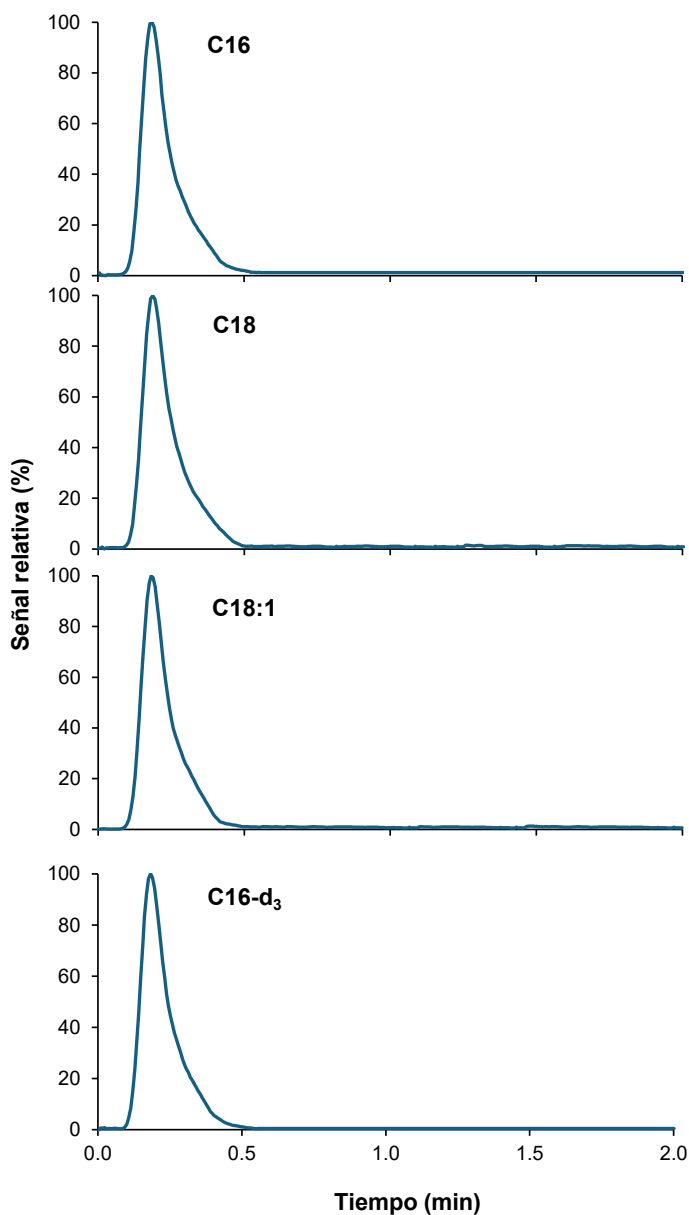


Figura 7.5. Cronograma obtenido al aplicar el método de microextracción empleando la estación de trabajo robótica y su posterior análisis mediante FIA-MS/MS a una disolución patrón conteniendo 100 ng mL⁻¹ de los analitos.

En este sentido, se construyó un primer prototipo, no automatizado, empleando dispositivos no controlados mediante software. Para ello, se utilizaron dos imanes de neodimio cúbicos (3 x 3 x 3 mm), que se pegaron a una pieza de acero en forma de Y invertida que se acopló a una pequeña amoladora. Este sistema se situó sobre el recipiente de extracción conteniendo 40 μ L de agua y 1 mg de material (**Figura 7.6a**). Una vez finalizada la extracción, se colocó manualmente un imán (10 mm largo x 5 mm diámetro) debajo del recipiente de extracción para sedimentar el sorbente magnético. Se probaron diferentes alturas de los imanes respecto del recipiente de extracción. Sin embargo, no se consiguió una adecuada dispersión del material ya que este permanecía cerca de las paredes del recipiente de extracción y no en el centro, por lo que esta configuración se descartó. En una versión posterior, se pegó un imán en forma cilíndrica (10 mm longitud x 2 mm diámetro) a un tubo lineal de plástico (25 mm longitud x 3 mm diámetro externo) que se ensambló a la amoladora (**Figura 7.6b**), consiguiendo una dispersión efectiva del material (la cual puede verse en vídeo clicando o escaneando el siguiente código QR), por lo que se eligió esta configuración como la adecuada.

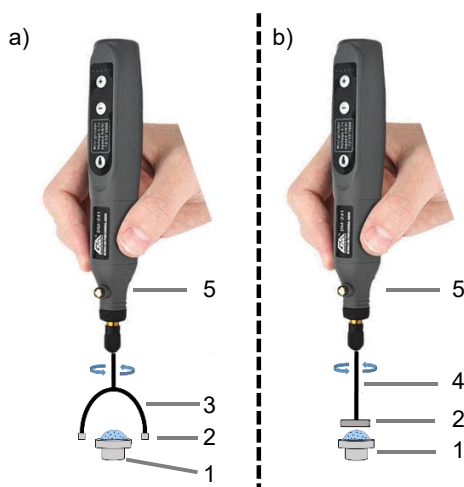


Figura 7.6. Dos diseños diferentes propuestos del primer prototipo empleando dispositivos no controlados mediante software para llevar a cabo la dispersión del material (1: recipiente de extracción; 2: imanes; 3: pieza metálica en forma de Y; 4: tubo lineal de plástico; 5: amoladora).

El siguiente paso fue determinar la altura del imán respecto al recipiente de extracción. Se probaron diferentes alturas (de 2 a 6 mm), observándose una mejor dispersión empleando 4 mm.

Esta configuración inicial se automatizó parcialmente en una siguiente versión mejorada empleando software de código abierto como Arduino [223] y hardware de fácil manejo (un microcontrolador y diferentes dispositivos electrónicos conectados mediante la placa electrónica). Todos los comandos programados se escribieron en lenguaje C++ y se ejecutaron mediante el microcontrolador UNO R3. El código escrito se fue modificando a medida que el nivel de automatización aumentó. En primer lugar, la pequeña amoladora se sustituyó por un motor y el imán externo (10 mm largo x 5 mm diámetro) empleado para sedimentación del material se sustituyó por un electroimán (**Figura 7.7**). La secuencia se inició pulsando el botón “Start”, activando así el motor. Una vez finalizado el tiempo de extracción, el motor se detuvo y el electroimán se activó, sedimentándose el material magnético sin requerir la intervención del operador.

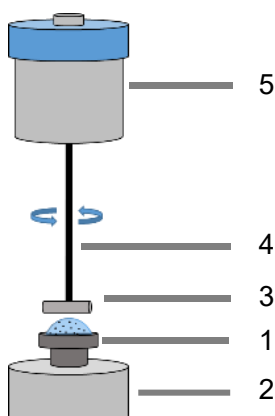


Figura 7.7. Diseño seleccionado para el segundo prototipo empleando dispositivos controlados mediante Arduino (1: recipiente de extracción; 2: electroimán; 3: imán; 4: tubo lineal de plástico; 5: motor).

Desde el punto de vista operacional, no era práctico para el operador añadir o eliminar líquidos (muestras, disoluciones patrón o disolventes) del recipiente de extracción debido a su proximidad al imán. Además, la posición exacta del imán sobre el recipiente de extracción era un parámetro crítico para asegurar una buena reproducibilidad en la dispersión del material. Esto podría complicarse en caso de que el imán tuviera que posicionarse manualmente cada vez. Para solucionar este inconveniente, se incorporó un servomotor con un brazo impreso en 3D que permitía mover el motor de forma que el operador tuviera libre acceso al recipiente de extracción y que este estuviera siempre a la misma distancia respecto al imán. Se establecieron dos posiciones, la posición de trabajo

(cuando el motor se encuentra posicionado encima del recipiente de extracción) y la posición de acceso (cuando el servomotor desplaza el motor en un ángulo de 22°). Además, se añadieron 3 LEDs para informar acerca de la accesibilidad al recipiente de extracción. El funcionamiento de los LEDs era similar al de un semáforo: la luz verde indicaba que se podía acceder al recipiente de extracción, la luz amarilla indicaba que no quedaba mucho tiempo de manipulación y la luz roja indicaba que el tiempo de manipulación había finalizado y no estaba permitido el acceso al recipiente de extracción.

Finalmente, para conseguir una total portabilidad de la estación de trabajo robótica y que fuera fácilmente manejable, se diseñó una carcasa impresa en 3D mediante AutoCAD. La carcasa consistía en dos partes, la base y la tapa. La base sostenía la placa electrónica y el microcontrolador, conteniendo los orificios necesarios para las entradas electrónicas. Además, tenía un orificio para anclar tanto el servomotor como el electroimán. Los botones de “Reset”, “On/Off” y “Start” se posicionaron en la tapa. Las dimensiones totales de la carcasa eran 20.2 cm largo x 19.4 cm ancho x 10.2 cm alto.

7.3.2. Selección de CoFe_2O_4 @ácido oleico como sorbente magnético

Las acilcarnitinas de cadena larga son compuestos que presentan una elevada hidrofobicidad (P_{ow} desde 7.7 hasta 8.8) debido a sus cadenas hidrocarbonadas. En trabajos previos se demostró que el CoFe_2O_4 @ácido oleico (compuesto de cadenas de ácido oleico enlazadas químicamente al núcleo de CoFe_2O_4 , como se ha descrito previamente [224]) puede establecer interacciones hidrofóbicas con los analitos, alcanzando elevados rendimientos de extracción debido a la cadena hidrocarbonada del ácido oleico [224]. Por ello, se seleccionó este material como fase extractante. A pesar de que no se trata de un material selectivo para los analitos y es posible que se extraigan otros compuestos apolares, la selectividad del método está garantizada mediante el empleo de espectrometría de masas en tándem como instrumentación analítica. Además, se comparó su eficacia de extracción con la de las MNPs de CoFe_2O_4 . Para ello, se realizó la extracción de 50 μL de una disolución patrón de 150 ng mL^{-1} preparada en suero sintético empleando 1 mg de material. Como se muestra en la **Figura 7.8**, las MNPs de CoFe_2O_4 apenas extrae los analitos, mientras que el CoFe_2O_4 @ácido oleico mostró una elevada eficacia de extracción, demostrando que la extracción se lleva a cabo mayoritariamente mediante la cadena hidrocarbonada del ácido oleico. De este modo, el CoFe_2O_4 solo confiere el carácter magnético del material necesario para su manejo. La caracterización de este material se realizó en trabajos previos [224].

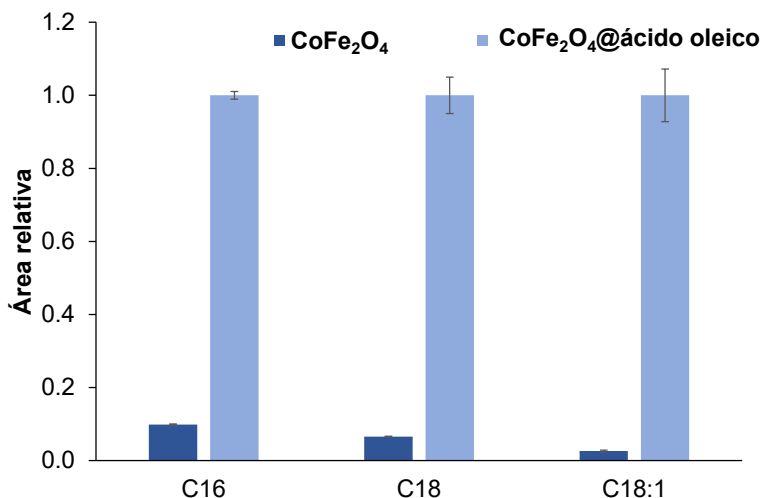


Figura 7.8. Comparación de la eficacia de extracción de CoFe₂O₄@ácido oleico y CoFe₂O₄.

7.3.3. Optimización de las variables de extracción

Se empleó una metodología de superficie de respuesta (*Response Surface Methodology*, RSM) basada en tres factores y tres niveles mediante un diseño de Box-Behnken para determinar los valores óptimos, así como establecer potenciales correlaciones entre variables involucradas en el proceso de extracción. Las variables estudiadas y sus rangos fueron las siguientes: masa de sorbente (0.25-1.75 mg), tiempo de extracción (0.5-5.0 min) y velocidad de agitación (140-200 u.a.). Cabe mencionar que los valores de velocidad de agitación corresponden a los valores arbitrarios establecidos por el software Arduino, los cuales son equivalentes a 5400 y 7000 rpm, respectivamente. El pH y la fuerza iónica de la fase dadora no se estudiaron dado que el volumen de muestra empleado (40 μL) no permitía su medida. Se emplearon 50 μL de disolución patrón conteniendo 200 ng mL^{-1} de cada analito en PBS para llevar a cabo los experimentos correspondientes. Como condiciones de desorción se emplearon 20 μL de acetonitrilo como disolvente y una velocidad de agitación de 200 u.a. durante 1 min. Como respuesta analítica se seleccionó el área de pico de los analitos. La descripción de las estadísticas del diseño de Box-Behnken se muestran en el **Anexo I**. Se realizaron un total de 30 experimentos, incluyendo tres réplicas del punto central y un duplicado del diseño (**Tabla 7.3**). El software Statgraphics Centurion XVI (Virginia, EE. UU.) se empleó para el análisis estadístico.

Tabla 7.3. Diseño Box-Behnken para la optimización multivariante de las variables críticas del proceso de extracción.

Etapa	Masa de sorbente (mg)		Tiempo de extracción (min)		Velocidad de agitación (u.a.)	
	D ^a	C ^b	D	C	D	C
1	1	0	0.5	-1	140	-1
2	1	0	5	1	140	-1
3	1	0	0.5	-1	200	1
4	1	0	5	1	200	1
5	0.25	-1	0.5	-1	170	0
6	0.25	-1	5	1	170	0
7	1.75	1	0.5	-1	170	0
8	1.75	1	5	1	170	0
9	0.25	-1	2.75	0	140	-1
10	0.25	-1	2.75	0	200	1
11	1.75	1	2.75	0	140	-1
12	1.75	1	2.75	0	200	1
13	1	0	2.75	0	170	0
14	1	0	2.75	0	170	0
15	1	0	2.75	0	170	0

^a Valores descodificados

^b Valores codificados

La adecuación del modelo se evaluó mediante el coeficiente de determinación (R^2), obteniéndose valores superiores a 0.8 para todos los analitos. Este valor indica que el modelo diseñado es eficiente para la predicción de las respuestas. En la **Figura 7.9** se muestran las superficies de respuesta en función de la deseabilidad. Como se puede observar en la **Figura 7.9a**, velocidades de agitación elevadas presentan un efecto negativo en la deseabilidad debido a que el material se dispersa solamente cerca de la pared del recipiente de

extracción, por lo que no hay material presente en el centro de la disolución, disminuyendo así la eficacia de la extracción. Por el contrario, a baja velocidad el material se dispersa eficientemente por toda la fase dadora, lo que puede estar relacionado con un mayor contacto entre el sorbente y los analitos. No se probaron menores velocidades de agitación ya que no tienen la suficiente fuerza para hacer rotar el imán y, por tanto, para dispersar el material magnético. Respecto al tiempo de extracción, los mejores resultados se obtienen empleando 5 min. Esto puede indicar que el equilibrio no se ha alcanzado, por lo que el máximo tiempo probado proporciona los mejores resultados. A pesar de que tiempos de extracción más elevados pueden mejorar la eficacia de la extracción, 5 min son suficientes para conseguir la sensibilidad requerida, por lo que se priorizó la rapidez del método sobre la eficacia de la extracción. Como se puede observar en la **Figura 7.9b**, la masa de sorbente es la variable con menor influencia en el proceso de extracción, obteniendo una deseabilidad similar para todo el rango estudiado. Estos resultados muestran que con la menor masa estudiada se consigue extraer la máxima cantidad de analitos. Sin embargo, se seleccionaron 0.74 mg como masa de sorbente ya que es el valor que proporcionó el software Statgraphics. Pese a que se pueden seleccionar valores inferiores, la repetibilidad en su pesada es peor, lo cual puede comprometer la repetibilidad del proceso de extracción.

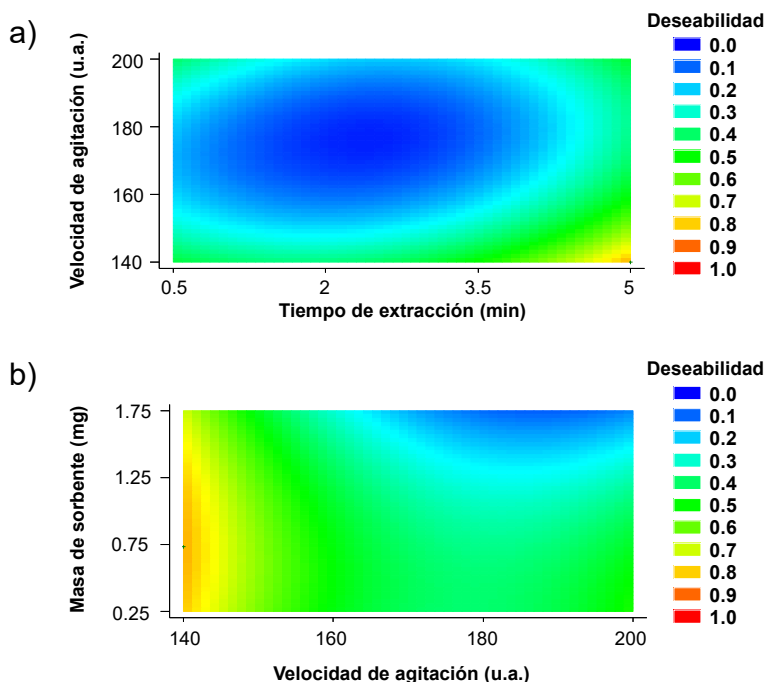


Figura 7.9. Superficies de respuesta obtenidas en la optimización multivariante de las condiciones de extracción para a) velocidad de agitación y tiempo; b) masa de sorbente y velocidad de agitación.

7.3.4. Optimización de las variables de desorción

Después de llevar a cabo la optimización del proceso de extracción se estudiaron las variables implicadas en el proceso de desorción. En primer lugar, se probaron diferentes disolventes de desorción (etanol, acetonitrilo y acetona). La acetona se descartó debido a su elevada volatilidad, que junto con el bajo volumen empleado hacen que se evapore completamente en menos de un minuto. De este modo, se llevó a cabo una optimización univariante del disolvente de desorción, probando etanol, acetonitrilo y una mezcla 1:1 de ambos. Como se puede observar en la **Figura 7.10**, los mejores resultados se obtienen empleando acetonitrilo puro como disolvente de desorción.

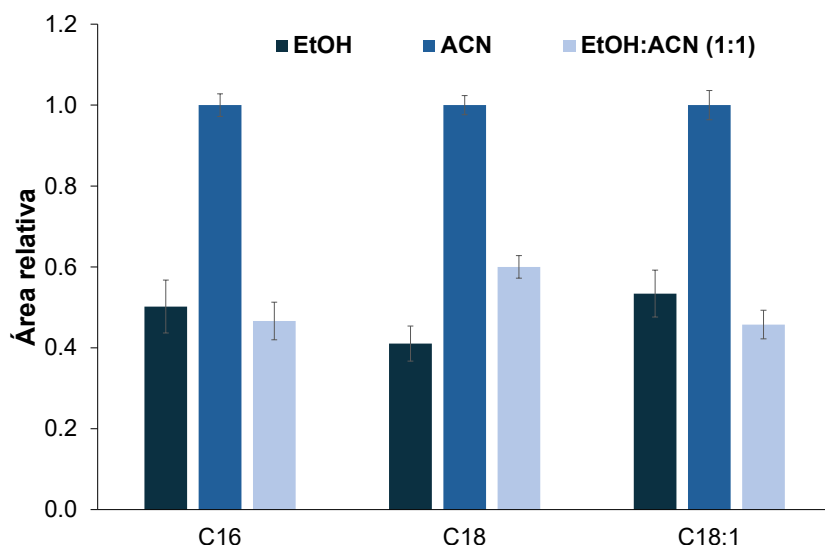


Figura 7.10. Optimización univariante del disolvente de desorción.

Para el estudio de las variables de desorción restantes se utilizó una RSM basada en tres factores y tres niveles empleando un diseño de Box-Behnken. Las variables estudiadas y sus rangos fueron: tiempo de desorción (0.5-5 min), velocidad de agitación (140-200 u.a.) y volumen del disolvente de desorción (20-40 μL). Para llevar a cabo los experimentos se emplearon 50 μL de una disolución patrón conteniendo 200 ng mL^{-1} de cada analito en PBS. Como condiciones de extracción se emplearon las seleccionadas tras la optimización de esta etapa. Se realizó un total de 30 experimentos, incluyendo tres réplicas del punto central y un duplicado del diseño (**Tabla 7.4**), empleando el software Statgraphics.

Tabla 7.4. Diseño Box-Behnken para la optimización multivariante de las variables críticas del proceso de desorción.

Etapa	Tiempo de desorción (min)		Volumen de disolvente de desorción (μL)		Velocidad de agitación (u.a.)	
	D ^a	C ^b	D	C	D	C
1	0.5	-1	30	0	140	-1
2	5	1	30	0	140	-1
3	0.5	-1	30	0	200	1
4	5	1	30	0	200	1
5	0.5	-1	20	-1	170	0
6	5	1	20	-1	170	0
7	0.5	-1	40	1	170	0
8	5	1	40	1	170	0
9	2.75	0	20	-1	140	-1
10	2.75	0	20	-1	200	1
11	2.75	0	40	1	140	-1
12	2.75	0	40	1	200	1
13	2.75	0	30	0	170	0
14	2.75	0	30	0	170	0
15	2.75	0	30	0	170	0

^a Valores descodificados

^b Valores codificados

La adecuación del modelo se evaluó mediante el R^2 , obteniéndose valores superiores a 0.97 para todos los analitos. Este valor indica que el modelo diseñado es eficiente para la predicción de las respuestas. En la **Figura 7.11** se muestran las superficies de respuesta en función de la deseabilidad. Como se puede observar en la **Figura 7.11a**, velocidades de agitación elevadas proporcionan un efecto positivo en la deseabilidad. Esto se debe a la mayor dispersión del material a velocidades elevadas, mejorando la transferencia de

los analitos del sorbente al disolvente de desorción. Por ello, se seleccionó un valor de 200 u.a. (7000 rpm) como velocidad de agitación. Respecto al volumen de disolvente de desorción, el menor volumen proporciona los mejores resultados debido al aumento en el factor de preconcentración máximo teórico, mejorando así la preconcentración, seleccionando 20 μL . Como se muestra en la **Figura 7.11b**, tiempos de desorción elevados proporcionan una mejora en la deseabilidad. De este modo, se seleccionaron 3.5 min ya que era tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio debido a que tiempos más elevados no proporcionan ninguna mejora en la deseabilidad.

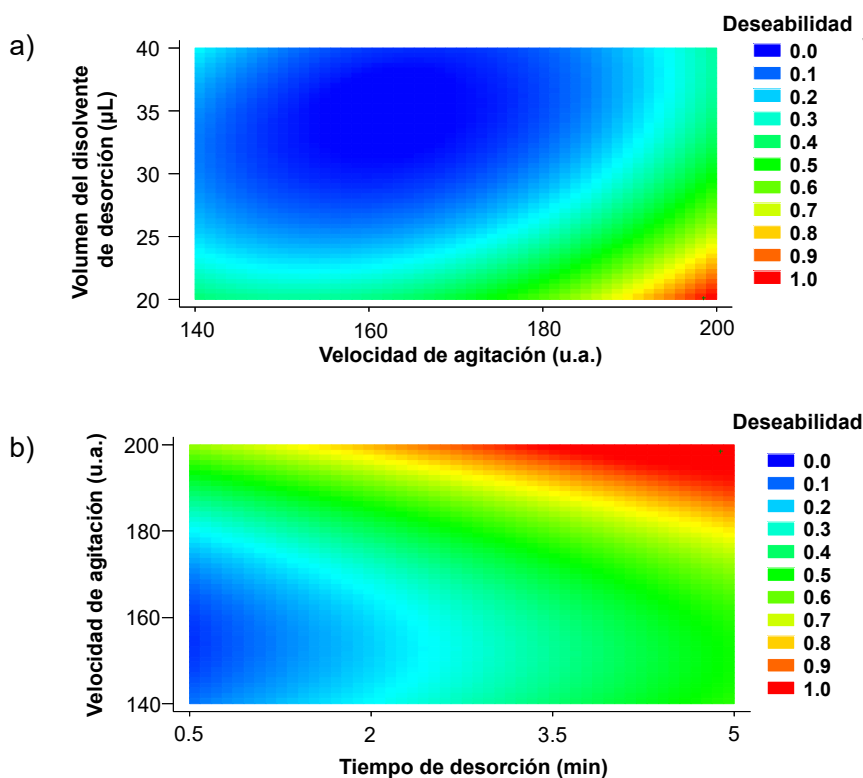


Figura 7.11. Superficies de respuesta obtenidas en la optimización multivariante de las condiciones de desorción para a) volumen del disolvente de desorción y velocidad de agitación; b) velocidad de agitación y tiempo de desorción.

7.3.5. Características analíticas del método

Se estudiaron diferentes parámetros tales como la linealidad, los límites de detección (*Limit of Detection*, LOD) y cuantificación (*Limit of Quantification*, LOQ), precisión y exactitud empleando las condiciones optimizadas previamente para validar el método analítico (**Tabla 7.5**) de acuerdo con la guía armonizada ICH [149].

Para evaluar la linealidad se prepararon disoluciones patrón a diferentes concentraciones de los analitos (conteniendo todas 150 ng mL^{-1} de patrón surrogado) y se les aplicó el método propuesto. Las rectas de calibrado se obtuvieron representando la relación del área del pico del analito (A_i) respecto a la del patrón surrogado (A_s) (A_i/A_s) frente a la concentración del analito. Se determinó que la linealidad se extiende hasta, al menos, $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, obteniendo coeficientes de determinación superiores a 0.990.

Los LOD y LOQ se calcularon como 3 y 10 veces, respectivamente, la relación señal-ruido de una disolución patrón (10 ng mL^{-1}) a la que se le aplicó el método propuesto. Se obtuvieron valores de LOD y LOQ de entre 0.26 y 0.30 ng mL^{-1} y entre 0.87 y 1.00 ng mL^{-1} , respectivamente.

La precisión del método propuesto se estudió en una misma sesión de trabajo (intra-día) y en diferentes sesiones consecutivas (inter-día). Con esta finalidad, se aplicó el método a cinco réplicas independientes de disoluciones patrón multicomponente a dos niveles de concentración (10 y 150 ng mL^{-1}). Como se puede observar en la **Tabla 7.5**, todos los valores de RSD se encontraban por debajo del 15 %, concluyendo que el método propuesto presenta una buena precisión.

Se calculó el rendimiento de la extracción (*Extraction Efficiency*, EE) como la proporción entre la masa final del analito en el extracto y la masa inicial del analito en la fase dadora. Los valores obtenidos fueron 20.3 %, 6.3 % y 16.0 % para las acilcarnitinas C16, C18 y C18:1, respectivamente. A pesar de que estos valores no son muy elevados, son suficientes para alcanzar la sensibilidad necesaria para la determinación de los analitos. Además, la etapa de limpieza es inevitable debido a que el suero no puede ser introducido directamente en el espectrómetro de masas.

Tabla 7.5. Características analíticas del método propuesto.

Analito	R ²	EE (%)	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)	Precisión (RSD, %)			
					Intra-día		Inter-día	
					10 ng mL ⁻¹	150 ng mL ⁻¹	10 ng mL ⁻¹	150 ng mL ⁻¹
C16	0.996	20.3	0.26	0.87	4.4	4.7	4.8	3.9
C18	0.991	6.3	0.30	1.00	6.3	5.7	7.1	2.6
C18:1	0.992	16.0	0.29	0.97	4.4	4.2	9.9	8.8

7.3.6. Estudio del efecto matriz

Para evaluar el efecto matriz se empleó una muestra de suero de un voluntario adulto que se fortificó a dos niveles de concentración (10 y 150 ng mL⁻¹) y se le aplicó el método propuesto junto con la misma muestra de suero sin fortificar. Como se puede observar en la **Tabla 7.6**, se obtuvieron valores de coeficientes de recuperación relativa cercanos al 100 % (94-117 %) para todos los analitos a ambos niveles de concentración, demostrando la ausencia de efecto matriz. Esto se puede deber al empleo del patrón surrogado deuterado, el cual presenta el mismo comportamiento que los analitos durante el procedimiento analítico. Por esta razón se empleó calibración externa con patrón surrogado.

Tabla 7.6. Valores de los coeficientes de recuperación relativa obtenidos en suero humano para las acilcarnitinas de cadena larga objeto de estudio.

Analito	Añadido (ng mL ⁻¹)	Encontrado (ng mL ⁻¹)	Coefficientes de recuperación relativa (%)
C16	0	27 ± 1	-
	10	36 ± 1	94 ± 7
	150	170 ± 10	96 ± 3
C18	0	55 ± 1	-
	10	67 ± 2	113 ± 7
	150	222 ± 6	111 ± 3
C18:1	0	46 ± 1	-
	10	56 ± 1	100 ± 3
	150	220 ± 10	117 ± 9

7.3.7. Análisis de muestras

La determinación de acilcarnitinas de cadena larga en suero informa sobre desordenes acerca de la deficiencia de la carnitina palmitoiltransferasa II (CPT-II), la cual está implicada en el metabolismo de los ácidos grasos de cadena larga. Este desorden es especialmente crítico en recién nacidos, ya que la deficiencia de la CPT-II puede causar fallos multiorgánicos e incluso la muerte si no se detecta a tiempo y no se recibe el tratamiento necesario [221].

Se analizaron muestras de suero de cinco recién nacidos para determinar los niveles de concentración de las tres acilcarnitinas de cadena larga objeto de estudio empleando la estación de trabajo robótica y aplicando el método propuesto. Como se puede observar en la **Tabla 7.7**, todos los compuestos de interés fueron cuantificados en todas las muestras. Teniendo en cuenta los valores límite de referencia de estas acilcarnitinas de cadena larga en muestras de suero de recién nacidos ($0.300 \mu\text{M}$ o 119.9 ng mL^{-1} para la C16, $0.300 \mu\text{M}$ o 128.3 ng mL^{-1} para la C18 y $0.400 \mu\text{M}$ o 170.2 ng mL^{-1} para la C18:1) [225], se puede observar que la gran mayoría los valores obtenidos están dentro de los niveles normales de acilcarnitinas, siendo muy inferiores respecto a los presentes en recién nacidos con deficiencia de CPT-II. Sin embargo, el valor para la C16 en las muestras de la 2 a la 5 estaba por encima del valor límite. No obstante, las otras dos acilcarnitinas de cadena larga presentaban valores inferiores al límite, indicando que los recién nacidos estaban sanos, tal y como lo confirmó el hospital colaborador.

Tabla 7.7. Concentración para las acilcarnitinas C16, C18 y C18:1 en suero de cinco recién nacidos.

Recién nacido	Concentración					
	C16		C18		C18:1	
	μM	ng mL^{-1}	μM	ng mL^{-1}	μM	ng mL^{-1}
1	0.2870 ± 0.0005	114.7 ± 0.2	0.154 ± 0.002	66 ± 1	0.1995 ± 0.0002	84.9 ± 0.1
2	0.353 ± 0.002	141.2 ± 0.8	0.201 ± 0.005	86 ± 2	0.303 ± 0.005	129 ± 2
3	0.427 ± 0.002	170.7 ± 0.7	0.228 ± 0.001	97.5 ± 0.6	0.3487 ± 0.0007	148.4 ± 0.3
4	0.46 ± 0.01	184 ± 5	0.194 ± 0.007	83 ± 3	0.357 ± 0.007	152 ± 3
5	0.3223 ± 0.0007	128.8 ± 0.3	0.189 ± 0.009	81 ± 4	0.249 ± 0.009	106 ± 4

Tradicionalmente, las acilcarnitinas de cadena larga se han determinado empleando la conocida prueba del talón, la cual se realiza rutinariamente en recién nacidos de entre 24 h y 7 días de edad en un gran número de países para el diagnóstico del desorden de la CPT-II y otras enfermedades [226]. Específicamente, el procedimiento consiste en realizar una punción en el talón

del bebé y recolectar una gota sobre un papel de filtro especial [227]. A continuación, se deja secar obteniendo una gota de sangre seca (*Dried Blood Spot*, DBS) que se recolecta y sumerge en una disolución tampón para extraer los analitos, midiendo el extracto resultante en el instrumento analítico apropiado [228]. A pesar de que presenta ciertas ventajas como un fácil transporte y buena estabilidad de los analitos, también presenta algunas desventajas como el control del volumen de sangre depositado y la obtención de una distribución homogénea. Esto puede producir variaciones en la concentración de los analitos dependiendo del área específica de la gota de sangre sujeta a la desorción. También se debe considerar el tiempo que se requiere para secar la gota de sangre y extraer los analitos (varias horas o incluso toda la noche), así como el posible efecto matriz [226].

7.3.8. Comparación con métodos previos y evaluación de la sostenibilidad

En la **Tabla 7.8** se muestra una comparación del método desarrollado con métodos previos basados en técnicas de microextracción para la determinación de las acilcarnitinas C16, C18 y C18:1 en muestras biológicas. En el caso del método basado en SPME se empleó un elevado volumen de orina (4 mL), a diferencia de los métodos basados en MEPS y EME, donde se empleó 0.1 mL de muestra. Sin embargo, cuando el volumen disponible de muestra es muy limitado, como es el caso de suero de recién nacidos, se requieren métodos que empleen menores volúmenes de muestra. Este es el caso del método desarrollado, el cual solo emplea 0.04 mL de suero para el análisis. Respecto a las condiciones de extracción, se requieren elevados tiempos tanto para SPME (1 h) como para EME (40 min). Esto puede ser un inconveniente para laboratorios clínicos de análisis rutinarios, ya que solo se pueden tratar unas pocas muestras por unidad de tiempo. Por el contrario, tanto el método desarrollado como el basado en MEPS emplean menores tiempos de extracción, incrementando el número de muestras que se pueden tratar por unidad de tiempo. Respecto al número de etapas, tanto MEPS como EME requieren etapas previas como la dilución de la muestra y/o vórtex previas a la extracción, aumentando el tiempo del análisis. En el método desarrollado solo se requiere de una etapa previa (centrifugación de la sangre), siendo necesaria para la obtención de la muestra (suero), la cual se introduce directamente (sin ningún tratamiento adicional) en el recipiente de extracción. En cuanto a los LODs, se obtuvieron valores del mismo orden para el método desarrollado que para los métodos previos a pesar de emplear un menor volumen de muestra, indicando que su reducción no compromete la sensibilidad del método.

Tabla 7.8. Comparación del método desarrollado con métodos previos donde se emplean técnicas de microextracción para la determinación de las acilcamitinas C16, C18 y C18:1.

Matriz	Técnica de microextracción	Técnica analítica	Volumen de muestra (mL)	Condiciones preparación de la muestra ^a	LOD (ng mL ⁻¹)	Ref.
Orina	SPME	MS	4	Extracción: CAR-PDMS; 1 h Desorción: 70 µL MeOH:H ₂ O (80:20 v/v); 2 min Dilución: 100 µL orina + 100 µL H ₂ O Vórtex: 30 s	25	[204]
Orina	MEPS	LC-MS/MS	0.1	Extracción: 4 mg etil- y octil-silica y SCX; 5 ciclos Desorción: 100 µL ACN + 100 µL ACN (20 mM piridina)	0.1	[229]
Sangre y orina	EME	LC-MS/MS	0.1	Dilución: 100 µL muestra + 700 µL TCA 0.1% v/v Extracción: 200 µL ácido acético 1 % (v/v); 40 min	0.43-1.30	[230]
Suero	DMSPE	FIA-MS/MS	0.04	Extracción: 0.74 mg CoFe ₂ O ₄ @ácido oleico; 5 min Desorción: 20 µL ACN; 3.5 min	0.26-0.30	Este trabajo

^a CAR:ccarbowax; PDMS: polidimetilsiloxano; TCA: ácido tricloroacético (*Tricloroacetic Acid*)

El impacto ambiental de la etapa de preparación de muestra se evaluó y comparó empleando la herramienta métrica AGREEprep [63]. Como se muestra en la **Figura 7.12**, el impacto ambiental del método desarrollado es significativamente inferior al de los métodos previos. Esto se debe a las diferentes ventajas que presenta, como la baja generación de residuos (criterio 4) y volumen de muestra requerido (criterio 5) y la mayor seguridad del operador al no emplear reactivos tóxicos (criterios 2 y 10). Los valores considerados para cada criterio se muestran en la **Tabla 7.9**.

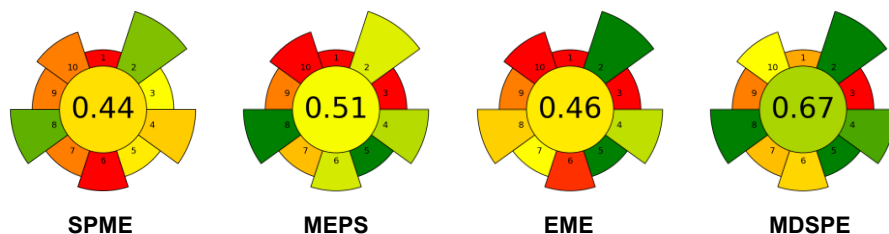


Figura 7.12. Evaluación mediante AGREEprep de los métodos comparados.

Asimismo, se empleó la herramienta BAGI (*Blue Applicability Grade Index*) [70] para evaluar la practicidad del método desarrollado así como de los métodos previos. Como se muestra en la **Figura 7.13**, la practicidad del método llevado a cabo en la estación de trabajo robótica es superior al método basado en SPME y EME, presentando ventajas en cuanto al número de muestras tratadas por hora y a la cantidad de muestra requerida. Sin embargo, la puntuación es inferior al método basado en MEPS, debido al menor número de muestras tratadas por hora, a la necesidad de realizar la síntesis del material extractante y a la menor cantidad de analitos determinados. Los valores considerados para cada criterio se encuentran en la **Tabla 7.10**.

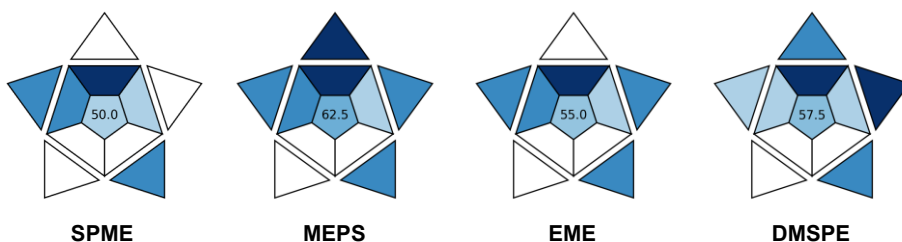


Figura 7.13. Evaluación mediante BAGI de los métodos comparados.

Tabla 7.9. Valores considerados en la aplicación de la herramienta AGREEprep de los métodos comparados.

Criterio	Método			
	SPME [204]	MEPS [229]	EME [230]	DMSPE
1. Lugar de preparación de muestra	<i>Ex situ</i>	<i>Ex situ</i>	<i>Ex situ</i>	<i>On site</i>
2. Materiales peligrosos (g o mL)	0.06	0.2	0	0
3. Sostenibilidad, renovabilidad y reusabilidad de los materiales	Los materiales no son sostenibles ni renovables pero se usan diversas veces	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez	< 25% de los materiales son sostenibles o renovables y solo se pueden utilizar una vez
4. Residuos	4.07	0.91	1	0.25
5. Cantidad de muestra (g o mL)	4	0.1	0.1	0.04
6. Productividad	0.96	12	1.5	6
7. Integración y automatización	2 etapas o menos, sistema manual	3 etapas, sistema semiautomatizado	2 etapas o menos, semiautomatizado	3 etapas, semiautomatizado
8. Consumo de energía (W)	20.66	1.66	100	3.33
9. Análisis instrumental	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos	Cromatografía de líquidos
10. Seguridad del operador	3 pictogramas	4 o más pictogramas	4 o más pictogramas	2 pictogramas

Tabla 7.10. Valores considerados en la aplicación de la herramienta BAGI de los métodos comparados.

Criterio	Método			
	SPME [204]	MEPS [229]	EME [230]	DMSPE
Tipo de análisis	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio	Cuantitativo y confirmatorio
Análisis multielemental o individual	Análisis multielemental de 6 a 15 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de 6 a 15 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de 6 a 15 compuestos de la misma familia química	Análisis multielemental de 2 a 5 compuestos de la misma familia química
Técnica analítica	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios	Instrumentación que no está comúnmente disponible en la mayoría de los laboratorios
Preparación de muestra simultánea	1	1	1	1
Preparación de muestra	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción	Preparación de muestra empleando microextracción
Muestras por hora	≤1	>10	≤1	5-10
Reactivos y materiales	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes	Reactivos comercialmente disponibles pero poco comunes	Sintetizados en el laboratorio de forma sencilla y con material común
Preconcentración	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas	Se requiere preconcentración. Criterios legislativos cumplidos tras etapas complicadas
Grado de automatización	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes	Semiautomatizado con dispositivos comunes
Cantidad de muestra	>1000 µL (o mg) muestras biológicas	100-500 µL (o mg) muestras biológicas	100-500 µL (o mg) muestras biológicas	<100 µL (o mg) muestras biológicas

7.4. Conclusiones

En este trabajo se ha diseñado y fabricado una estación de trabajo robótica controlada mediante software de código abierto que permite llevar a cabo la microextracción dispersiva basada en sorbentes en muestras de muy bajo volumen. El procedimiento consiste en la dispersión del material magnético en la muestra empleando un imán de neodimio acoplado a un motor que se encuentra suspendido en la parte superior de la muestra. El problema de una posible contaminación cruzada se elimina posicionando el imán en el exterior del recipiente de extracción, de forma que no entra en contacto ni con la muestra ni con el material magnético. Para mejorar la operatividad se ha incluido un electroimán que permite recuperar el material magnético después de su dispersión, así como un servomotor que facilita el acceso al recipiente de extracción con la finalidad de adicionar y retirar líquidos de forma más cómoda para el operador. Además, se ha diseñado una carcasa impresa en 3D, asegurando así un fácil transporte del dispositivo, colocando en su interior los elementos de hardware y conexiones eléctricas pertinentes.

La estación de trabajo robótica desarrollada presenta ventajas como la automatización de procesos (p. ej., parar la agitación o retomarla (programado previamente) sin depender del operador), así como la deposición instantánea del material magnético al acabar la agitación debido a la fuerte atracción que ejerce el electroimán. Además, el empleo de tecnología de código abierto y de bajo coste hace que sea asequible para laboratorios con un presupuesto bajo, sin estar limitados como es el caso de los sistemas robóticos comerciales.

Con perspectiva de futuro, se está trabajando para mejorar algunas limitaciones identificadas. De esta forma se pretende reducir el grado de intervención del operador mediante la automatización de etapas relacionadas con la adición o retirada de líquidos (fase dadora, disolvente de lavado o disolvente de desorción), reduciendo al máximo la manipulación requerida por el analista. Además, con la finalidad de aumentar el número de muestras que pueden ser tratadas por unidad de tiempo, se está desarrollando una nueva configuración que permita tratar muestras en paralelo.

Como prueba de concepto, la estación de trabajo robótica se ha empleado para la determinación de tres acilcarnitinas de cadena larga, las cuales son biomarcadores del desorden de la CPT-II en suero de recién nacidos. El método desarrollado ha sido validado en términos de linealidad, LODs, precisión y exactitud. Se han analizado muestras de suero de cinco recién nacidos obteniendo niveles normales de los compuestos estudiados. Además, el método desarrollado se ha comparado con métodos previos que emplean la microextracción para la determinación de estas tres acilcarnitinas, requiriendo un menor volumen de muestra y un menor número de etapas sin comprometer la sensibilidad.

Conclusiones generales

Conclusiones generales

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de métodos analíticos basados en técnicas de microextracción para la determinación de biomarcadores en fluidos biológicos. Además, se ha prestado especial atención a aspectos como la productividad, la automatización y el volumen de muestra requerido, con la finalidad de obtener métodos eficientes basados en técnicas de microextracción dispersivas que sean compatibles con muestras de bajo volumen y a su vez que presenten el menor impacto ambiental posible.

En el **Capítulo 3** se ha desarrollado un método analítico para la determinación de dos biomarcadores de estrés oxidativo (8OHdA y 8OHdG) en saliva empleando SA-DSPE. Para la extracción de los analitos se ha empleado un sorbente comercial de tipo HLB. En el estudio del efecto matriz se ha concluido que este es significativo, por lo que se ha empleado un calibrado de adición de patrón para corregir dicho efecto.

En el **Capítulo 4** se ha desarrollado un método para la determinación de 8OHdA y 8OHdG en saliva que presenta diversas mejoras con respecto al trabajo realizado en el capítulo anterior. En este sentido, se ha empleado la mSBSDME como técnica de microextracción y un material magnético compuesto de PDA y GQDs como sorbente, evitando así etapas de centrifugación. Además, el uso de BPS-d₈ como patrón surrogado ha permitido emplear calibración externa.

Respecto al **Capítulo 5**, se han determinado bisfenoles tanto en suero como en orina mediante mSBSDME. Con la finalidad de determinar el contenido total de estos analitos y no solo la fracción libre, se ha llevado a cabo una enzimólisis previa a la etapa de microextracción. Como sorbente se han empleado nanopartículas magnéticas funcionalizadas con un COF.

En el **Capítulo 6** se ha llevado a cabo la determinación en suero de dos acilcarnitinas de cadena corta (isoC4 y C5), las cuales son biomarcadores de cáncer de vejiga. Como material sorbente magnético se ha empleado un polímero de intercambio catiónico fuerte al cual se le han incrustado nanopartículas magnéticas.

Finalmente, en el **Capítulo 7** se ha diseñado y fabricado una estación de trabajo robótica de bajo coste controlada por software de código abierto para el análisis de muestras de baja disponibilidad mediante DMSPE. Con la finalidad de asegurar la portabilidad del dispositivo se ha diseñado una carcasa en 3D para situar los elementos de hardware. Esta plataforma robótica se encuentra patentada. Como prueba de concepto se ha llevado a cabo la determinación de tres acilcarnitinas de cadena larga (C16, C18 y C18:1) en suero.

Como se ha comentado anteriormente, uno de los objetivos específicos de la presente Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de métodos que presentaran una elevada productividad. Por ello, se han desarrollado varias metodologías que permiten tratar diversas muestras en paralelo. En este sentido, en el **Capítulo 3**

Conclusiones generales

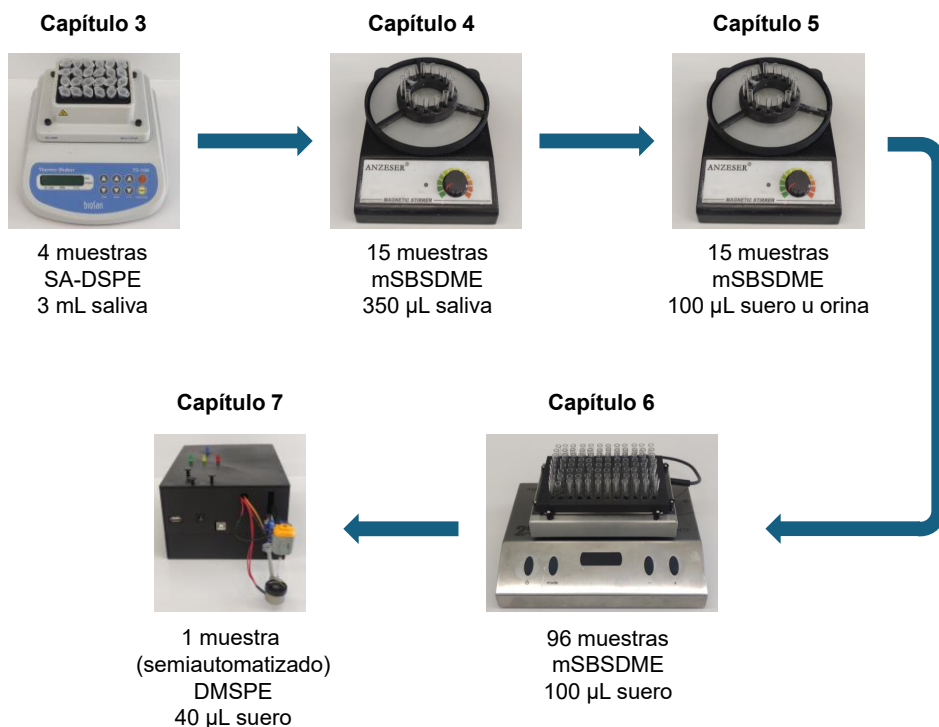
se ha empleado un agitador orbital termostatzado con 24 posiciones. Sin embargo, el empleo de un calibrado de adición de patrón disminuye la productividad, solo pudiendo tratar 4 muestras de forma simultánea. En los dos capítulos posteriores (**Capítulos 4 y 5**), se ha empleado una plataforma que permite la extracción de hasta 15 muestras de forma simultánea. Finalmente, en el **Capítulo 6** la productividad se ha aumentado considerablemente mediante el empleo de una plataforma de 96 posiciones. Por tanto, como se puede observar, el número de muestras tratadas en paralelo ha aumentado notoriamente desde 4 (**Capítulo 3**) hasta 96 (**Capítulo 6**), dejando de lado el **Capítulo 7** cuyo objetivo no era obtener un método de tratamiento de muestras en paralelo, sino desarrollar una estación de trabajo robótica para incrementar la automatización de los procesos de microextracción dispersiva.

En este sentido, acorde con otro de los objetivos específicos de esta Tesis Doctoral, se ha desarrollado un primer prototipo de estación robótica (**Capítulo 7**). Pese a que actualmente se requiere la intervención manual y, por tanto, el método desarrollado se puede considerar semiautomatizado, es un primer paso hacia el desarrollo de una estación de trabajo robótica totalmente automatizada. Además, en el grupo de investigación, y en el marco de un proyecto del Plan Nacional recientemente concedido (PID2024-162539NB-I00), se está trabajando para aumentar el número de muestras que se pueden tratar en paralelo, así como el grado de automatización, aunando ambos conceptos, es decir, incremento del nivel de automatización y tratamiento de muestras en paralelo.

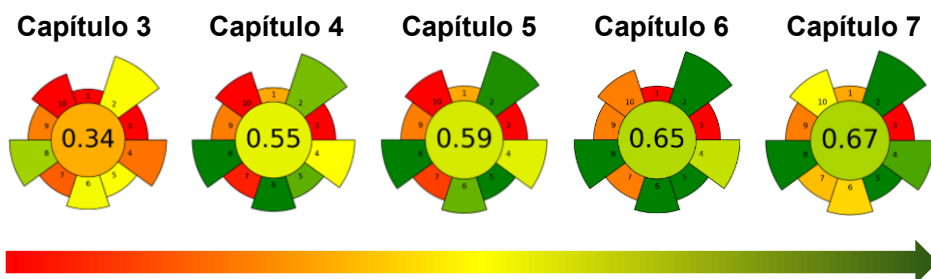
También cabe destacar que todos los métodos desarrollados requieren de un bajo volumen de muestra. En este sentido, en el **Capítulo 3** se han empleado 3 mL de saliva, en el **Capítulo 4** 350 µL de saliva, en los **Capítulos 5 y 6** 100 µL de orina y/o suero, y en el **Capítulo 7** 40 µL de suero. Esta disminución del volumen de muestra es de gran relevancia en el campo del bioanálisis ya que permite llevar a cabo el tratamiento de muestras de baja disponibilidad.

Estos aspectos se recogen de forma resumida en el siguiente esquema:

Conclusiones generales



Además, las mejoras evidenciadas en los métodos desarrollados a lo largo de la presente Tesis Doctoral en términos de productividad, automatización y volumen de muestra requerido se han reflejado en las puntuaciones obtenidas al aplicar la herramienta AGREEprep. En este sentido, los valores han ido creciendo desde 0.34 (**Capítulo 3**) hasta 0.67 (**Capítulo 7**).



En base a todo ello, se considera que los objetivos inicialmente planteados han sido alcanzados y los resultados obtenidos contribuyen de forma significativa a la generación de conocimiento en el campo de la preparación de muestra, y más concretamente en el campo de las técnicas de microextracción.

Referencias

Referencias

- [1] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84.
- [2] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green chemistry: Theory and practice*, Oxford University Press, Oxford, 1998.
- [3] P.M. Nowak, R. Wietecha-Postuszny, J. Pawliszyn, *White Analytical Chemistry: An approach to reconcile the principles of Green Analytical Chemistry and functionality*, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 138 (2021) 116223.
- [4] Á.I. López-Lorente, F. Pena-Pereira, S. Pedersen-Bjergaard, V.G. Zuin, S.A. Ozkan, E. Psillakis, The ten principles of green sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 148 (2022) 116530.
- [5] C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.
- [6] S. Cárdenas, R. Lucena, *Analytical Sample Preparation With Nano- and Other High-Performance Materials*, Elsevier, Amsterdam, 2021.
- [7] F. Pena-Pereira, From conventional to miniaturized analytical systems, in: *Miniaturization in Sample Preparation*, De Gruyter Open Ltd, Berlin, 2014, pp. 1-28.
- [8] C. Azorín, J.L. Benedé, A. Chisvert, Ultramicroextraction as a miniaturization of the already miniaturized. A step toward nanoextraction and beyond, *J. Sep. Sci.* 46 (2023) 2300223.
- [9] M.D. Luque de Castro, J.L. Luque García, Automation of sample preparation, in: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, 2003, pp. 649-680.
- [10] D.M. Sartore, D.A. Vargas Medina, M.D. Bocelli, M. Jordan-Sinisterra, Á.J. Santos-neto, F.M. Lanças, Modern automated microextraction procedures for bioanalytica, environmental, and food analyses, *J. Sep. Sci.* 46 (2023) 1–29.
- [11] D.A. Vargas Medina, E.V.S. Maciel, F.M. Lanças, Modern automated sample preparation for the determination of organic compounds: A review on robotic and on-flow systems, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 166 (2023) 117171.
- [12] G. Peris-Pastor, C. Azorín, J. Grau, J.L. Benedé, A. Chisvert, Miniaturization as a smart strategy to achieve greener sample preparation approaches: A view through greenness assessment, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 170 (2024) 117434.
- [13] [J. Grau Escribano, Desarrollo y evaluación de metodologías de](#)

Referencias

- [microextracción para el análisis de volúmenes pequeños de muestra, 2022.](#)
- [14] [C. Azorín Luis, Miniaturization of sample preparation techniques as an essential strategy for the analysis of low-volume and complex samples, 2024.](#)
- [15] [V. Vález Gomis, \(Nano\)materials as an efficient tool in extraction techniques for the analysis of complex matrices, 2024.](#)
- [16] M. Alexovi, B. Horstkotte, P. Solich, Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction . Part 1 : Approaches based on extractant drop- , plug- , film- and micro flow-formation, Anal. Chim. Acta 906 (2016) 22–40.
- [17] C.L. Arthur, L.M. Killam, K.D. Buchholz, J. Pawliszyn, J.R. Berg, Automation and optimization of solid-phase microextraction, Anal. Chem. 64 (1992) 1960–1966.
- [18] L. Felipe, D. Arley, V. Medina, F.M. Lanças, Automated needle-sleeve based online hyphenation of solid-phase microextraction and liquid chromatography, Talanta 221 (2021) 121608.
- [19] D.A.V. Medina, L.F. Rodriguez Cabal, F.M. Lanças, Á.J. Santos-Neto, Sample treatment platform for automated integration of microextraction techniques and liquid chromatography analysis, HardwareX. 5 (2019) e00056.
- [20] A. Namera, M. Yashiki, M. Nishida, T. Kojima, Automated Headspace Solid-Phase Microextraction and In-Matrix Derivatization for the Determination of Amphetamine-Related Drugs in Human Urine by Gas Chromatography–Mass Spectrometry, J. Chromatogr. Sci. 40 (2002) 19–25.
- [21] J. O'Reilly, Q. Wang, L. Setkova, J.P. Hutchinson, Y. Chen, H.L. Lord, C.M. Linton, J. Pawliszyn, Automation of solid-phase microextraction, J. Sep. Sci. 28 (2005) 2010–2022.
- [22] D.R. Parkinson, I. Bruheim, I. Christ, J. Pawliszyn, Full automation of derivatization - Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry with a dual-arm system for the determination of organometallic compounds in aqueous samples, J. Chromatogr. A 1025 (2004) 77–84.
- [23] D. Vuckovic, E. Cudjoe, D. Hein, J. Pawliszyn, Automation of solid-phase microextraction in high-throughput format and applications to drug analysis, Anal. Chem. 80 (2008) 6870–6880.
- [24] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Štajnbaher, F.J. Schenck, Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide

Referencias

- residues in produce, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412–431.
- [25] J.L. Benedé, R. Lucena, A. Chisvert, S. Cárdenas, Miniaturized solid-phase extraction, in: *Analytical Sample Preparation With Nano- and Other High-Performance Materials*, Elsevier, Amsterdam, 2021, pp. 13–31.
- [26] G. Peris-pastor, J. Grau, L. Arruza, J.L. Bened, A. Chisvert, Lab-made open-source controlled robotic workstation for sorbent-based dispersive microextraction of low-volume samples, *Anal. Chim. Acta* 1356 (2025) 344033.
- [27] Y. Li, R. Lian, Z. Sheng, J. Mao, C. Mao, C. Liang, P. Zhang, C. Ni, R. Wang, Y. Zhang, Automatic MDSPE Combined with DART-HRMS for the Rapid Quantitation of 21 Synthetic Cathinones in Urine, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 35 (2024) 40–49.
- [28] S. Tang, G.H. Chia, Y. Chang, H.K. Lee, Automated dispersive solid-phase extraction using dissolvable Fe₃O₄-layered double hydroxide core-shell microspheres as sorbent, *Anal. Chem.* 86 (2014) 11070–11076.
- [29] M. Abdel-Rehim, New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 801 (2004) 317–321.
- [30] D.M. Sartore, D.A. Vargas Medina, J.L. Costa, F.M. Lanças, Á.J. Santos-Neto, Automated microextraction by packed sorbent of cannabinoids from human urine using a lab-made device packed with molecularly imprinted polymer, *Talanta* 219 (2020) 121185.
- [31] Z. Altun, L.G. Blomberg, M. Abdel-Rehim, Increasing sample preparation throughput using monolithic methacrylate polymer as packing material for 96-tip robotic device, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 29 (2006) 1477–1489.
- [32] S. Lehmann, T. Kieliba, J. Beike, M. Thevis, K. Mercer-Chalmers-Bender, Determination of 74 new psychoactive substances in serum using automated in-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1064 (2017) 124–138.
- [33] G. Antonelli, A. Padoan, C. Artusi, M. Marinova, M. Zaninotto, M. Plebani, Automated saliva processing for LC-MS/MS: Improving laboratory efficiency in cortisol and cortisone testing, *Clin. Biochem.* 49 (2016) 518–520.
- [34] K.K. Jagadeesan, C. Rossetti, A. Abdel Qader, L. Reubsaet, B.

Referencias

- Sellergren, T. Laurell, S. Ekström, Filter Plate–Based Screening of MIP SPE Materials for Capture of the Biomarker Pro-Gastrin-Releasing Peptide, *SLAS Discov.* 22 (2017) 1253–1261.
- [35] M.A. Jeannot, F.F. Cantwell, Solvent microextraction into a single drop, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236–2240.
- [36] S. Liu, P.K. Dasgupta, Liquid droplet. A renewable gas sampling interface, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2042–2049.
- [37] D.A.V. Medina, L.F. Rodríguez Cabal, G.M. Titato, F.M. Lanças, Á.J. Santos-Neto, Automated online coupling of robot-assisted single drop microextraction and liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1595 (2019) 66–72.
- [38] L. Vallecillos, E. Pocurull, F. Borrull, Fully automated ionic liquid-based headspace single drop microextraction coupled to GC-MS/MS to determine musk fragrances in environmental water samples, *Talanta* 99 (2012) 824–832.
- [39] G. Ouyang, W. Zhao, J. Pawliszyn, Kinetic calibration for automated headspace liquid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 77 (2005) 8122–8128.
- [40] R. Raterink, P.W. Lindenburg, R.J. Vreeken, T. Hankemeier, Three-phase electroextraction: A new (online) sample purification and enrichment method for bioanalysis, *Anal. Chem.* 85 (2013) 7762–7768.
- [41] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650–2656.
- [42] L. Zhu, L. Zhu, H.K. Lee, Liquid-liquid-liquid microextraction of nitrophenols with a hollow fiber membrane prior to capillary liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 407–414.
- [43] X. Jiang, H.K. Lee, Solvent bar microextraction, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5591–5596.
- [44] L. Zhao, H.K. Lee, Liquid-phase microextraction combined with hollow fiber as a sample preparation technique prior to gas chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.* 74 (2002) 2486–2492.
- [45] A. Esrafil, Y. Yamini, M. Ghambarian, B. Ebrahimpour, Automated preconcentration and analysis of organic compounds by on-line hollow fiber liquid-phase microextraction-high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1262 (2012) 27–33.
- [46] L. Felipe, R. Cabal, D. Arley, V. Medina, J.L. Costa, F.M. Lanças, Determination of ring-substituted amphetamines through automated online hollow fiber liquid-phase microextraction-liquid chromatography,

Referencias

- Anal. Bioanal. Chem. 411 (2019) 7889–7897.
- [47] G. Ouyang, J. Pawliszyn, Kinetic calibration for automated hollow fiber-protected liquid-phase microextraction, *Anal. Chem.* 78 (2006) 5783–5788.
- [48] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1–9.
- [49] L. Guo, H.K. Lee, Automated dispersive liquid – liquid microextraction – gas chromatography – mass spectrometry, *Anal. Chem.* 86 (2014) 3743–3749.
- [50] R. Raterink, Y. Witkam, R.J. Vreeken, R. Ramautar, T. Hankemeier, Gas pressure assisted microliquid – liquid extraction coupled online to direct infusion mass spectrometry: A new automated screening platform for bioanalysis, *Anal. Chem.* 86 (2014) 10323–10330.
- [51] L.P. Kowtharapu, N.K. Katari, S.K. Muchakayala, V.M. Mariseti, Green metric tools for analytical methods assessment critical review, case studies and crucify, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 166 (2023) 117196.
- [52] M.S. Imam, M.M. Abdelrahman, How environmentally friendly is the analytical process? A paradigm overview of ten greenness assessment metric approaches for analytical methods, *Trends Environ. Anal. Chem.* 38 (2023) e00202.
- [53] J. Martínez, J.F. Cortés, R. Miranda, Green Chemistry Metrics, A Review, *Processes*. 10 (2022) 1274.
- [54] M. Sajid, J. Płotka-Wasyłka, Green analytical chemistry metrics: A review, *Talanta* 238 (2022) 123046.
- [55] L.H. Keith, L.U. Gron, J.L. Young, Green analytical methodologies, *Chem. Rev.* 107 (2007) 2695–2708.
- [56] D. Raynie, J.. Driver, Green assessment of chemical methods, 13th Annu. Green Chem. Eng. (2009).
- [57] A. Gałuszka, Z.M. Migaszewski, P. Konieczka, J. Namieśnik, Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 37 (2012) 61–72.
- [58] J. Płotka-Wasyłka, A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index, *Talanta* 181 (2018) 204–209.
- [59] J. Płotka-Wasyłka, W. Wojnowski, Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software, *Green Chem.* 23 (2021) 8657–8665.

Referencias

- [60] F.R. Mansour, J. Płotka-wasyłka, M. Locatelli, Modified GAPI (MoGAPI) Tool and Software for the Assessment of Method Greenness: Case Studies and Applications, *Analytica* (2024) 451–457.
- [61] F.R. Mansour, K.M. Omer, J. Płotka-Wasyłka, A total scoring system and software for complex modified GAPI (ComplexMoGAPI) application in the assessment of method greenness, *Green Anal. Chem.* 10 (2024) 100126.
- [62] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10076–10082.
- [63] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 149 (2022) 116553.
- [64] A. Ballester-Caudet, P. Campíns-Falcó, B. Pérez, R. Sancho, M. Lorente, G. Sastre, C. González, A new tool for evaluating and/or selecting analytical methods: Summarizing the information in a hexagon, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 118 (2019) 538–547.
- [65] P.M. Nowak, P. Kościelniak, What color is your method? adaptation of the RGB additive color model to analytical method evaluation, *Anal. Chem.* 91 (2019) 10343–10352.
- [66] P.M. Nowak, F. Arduini, RGBfast – A user-friendly version of the Red-Green-Blue model for assessing greenness and whiteness of analytical methods, *Green Anal. Chem.* 10 (2024) 100120.
- [67] K. Kiwo, S. Suteerapataranon, I.D. McKelvie, P. Meng Woi, S.D. Kolev, C. Saenjurn, G.D. Christian, K. Grudpan, A new need, quality, and sustainability (NQS) index for evaluating chemical analysis procedures using natural reagents, *Microchem. J.* 193 (2023) 109026.
- [68] M. Koel, Do we need Green Analytical Chemistry?, *Green Chem.* 18 (2016) 923–931.
- [69] R. González-Martín, A. Gutiérrez-Serpa, V. Pino, M. Sajid, A tool to assess analytical sample preparation procedures: Sample preparation metric of sustainability, *J. Chromatogr. A* 1707 (2023) 464291.
- [70] N. Manousi, W. Wojnowski, J. Płotka-Wasyłka, V. Samanidou, Blue applicability grade index (BAGI) and software: a new tool for the evaluation of method practicality, *Green Chem.* 25 (2023) 7598–7604.
- [71] P.M. Nowak, W. Wojnowski, N. Manousi, V. Samanidou, J. Płotka-Wasyłka, Red analytical performance index (RAPI) and software: the missing tool for assessing methods in terms of analytical performance, *Green Chem.* 27 (2025) 5546–5553.
- [72] L.K. Nieman, B.M.K. Biller, J.W. Findling, J. Newell-Price, M.O. Savage,

Referencias

- P.M. Stewart, V.M. Montori, The Diagnosis of Cushing 's Syndrome : An Endocrine Society Clinical Practice Guideline, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93 (2008) 1526–1540.
- [73] Y. Chida, A. Steptoe, Cortisol awakening response and psychosocial factors : A systematic review and meta-analysis, *Biol. Psychol.* 80 (2009) 265–278.
- [74] B. Kluwe, R. Ortiz, J.B. Odei, S. Zhao, D. Kline, G. Brock, J.B. Echouffo-tcheugui, J. Lee, S. Lazarus, T. Seeman, B. Needham, M.R. Carnethon, S.H. Golden, J.J. Joseph, The association of cortisol curve features with incident diabetes among whites and African Americans : The CARDIA study, *Psychoneuroendocrinology* 123 (2021) 105041.
- [75] J. Frijhoff, P.G. Winyard, N. Zarkovic, S.S. Davies, R. Stocker, D. Cheng, A.R. Knight, E.L. Taylor, J. Oettrich, T. Ruskovska, A.C. Gasparovic, A. Cuadrado, D. Weber, H.E. Poulsen, T. Grune, H.H.H.W. Schmidt, P. Ghezzi, Clinical relevance of biomarkers of oxidative stress, *Antioxidants Redox Signal.* 23 (2015) 1144–1170.
- [76] D.L. Giokas, A. Salvador, A. Chisvert, UV filters: From sunscreens to human body and the environment, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 360–374.
- [77] C. Haman, X. Dauchy, C. Rosin, Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments : A review, *Water Res.* 68 (2014) 1–11.
- [78] A. Salvador, A. Chisvert, Analysis of cosmetic products, Second edi, Elsevier, Amsterdam, 2018.
- [79] F. Yan, L. Wang, L. Zhao, C. Wang, Q. Lu, R. Liu, Acrylamide in food: Occurrence, metabolism, molecular toxicity mechanism and detoxification by phytochemicals, *Food Chem. Toxicol.* 175 (2023) 113696.
- [80] J. Grau, M. Moreno-Guzmán, L. Arruza, M.Á. López, A. Escarpa, A. Chisvert, Analysis of microsamples by miniaturized magnetic-based pipette tip microextraction: determination of free cortisol in serum and urine from very low birth weight preterm newborns, *Analyst* 148 (2023) 1050–1057.
- [81] C. Azorín, J.L. Benedé, A. Chisvert, New challenges in sample preparation: Miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction as a high-throughput and feasible approach for low-availability sample preparation, *Anal. Chim. Acta* 1238 (2023) 340627.
- [82] F. Arioli, M.C. Gamberini, R. Pavlovic, F. Di Cesare, S. Draghi, G. Bussei, F. Mungiguerra, A. Casati, M. Fidani, Quantification of cortisol and its metabolites in human urine by LC-MSn: applications in clinical diagnosis

Referencias

- and anti-doping control, *Anal. Bioanal. Chem.* 414 (2022) 6841–6853.
- [83] F. Abujaber, A.I. Corps Ricardo, Á. Ríos, F.J. Guzmán Bernardo, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, Ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with LC-UV-Vis for the fast and simultaneous determination of cortisone and cortisol in human saliva samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 165 (2019) 141–146.
- [84] S. AbuRuz, J. Millership, L. Heaney, J. McElnay, Simple liquid chromatography method for the rapid simultaneous determination of prednisolone and cortisol in plasma and urine using hydrophilic lipophilic balanced solid phase extraction cartridges, *J. Chromatogr. B.* 798 (2003) 193–201.
- [85] K. Kahremanoglu, E.R. Temel, T.E. Korkut, A.A. Nalbant, B.B. Azer, C. Durucan, M. Volkan, E. Boyaci, Development of a solid-phase microextraction LC–MS/MS method for determination of oxidative stress biomarkers in biofluids, *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 1925–1933.
- [86] G. Peris-Pastor, S. Alonso-Rodríguez, J.L. Benedé, A. Chisvert, High-throughput determination of oxidative stress biomarkers in saliva by solvent-assisted dispersive solid-phase extraction for clinical analysis, *Adv. Sample Prep.* 6 (2023) 100067.
- [87] A. Saito, M. Hamano, H. Kataoka, Simultaneous analysis of multiple urinary biomarkers for the evaluation of oxidative stress by automated online in-tube solid-phase microextraction coupled with negative/positive ion-switching mode liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 2743–2749.
- [88] B. Cervinkova, L.K. Krcmova, V. Sestakova, D. Solichova, P. Solich, A fully validated bioanalytical method using an UHPLC–MS/MS system for quantification of DNA and RNA oxidative stress biomarkers, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 3611–3621.
- [89] M.K. Shigenaga, C.J. Gimeno, B.N. Ames, Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 9697–9701.
- [90] N. Negreira, I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubí, R. Cela, Sensitive determination of salicylate and benzophenone type UV filters in water samples using solid-phase microextraction, derivatization and gas chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 638 (2009) 36–44.
- [91] J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, D. Sánchez-Quiles, A. Tovar-Sánchez, Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid–liquid microextraction followed by gas chromatography–mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 812 (2014) 50–58.

Referencias

- [92] A. Duque, J. Grau, J.L. Benedé, R.M. Alonso, M.A. Campanero, A. Chisvert, Low toxicity deep eutectic solvent-based ferrofluid for the determination of UV filters in environmental waters by stir bar dispersive liquid microextraction, *Talanta* 243 (2022) 123378.
- [93] P. Cuderman, E. Heath, Determination of UV filters and antimicrobial agents in environmental water samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1343–1350.
- [94] M.S. Díaz-Cruz, P. Gago-Ferrero, M. Llorca, D. Barceló, Analysis of UV filters in tap water and other clean waters in Spain, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 2325–2333.
- [95] M.D. Bocelli, D.A. Vargas Medina, J.P.G. Rodriguez, F.M. Lanças, Á.J. Santos-Neto, Determination of parabens in wastewater samples via robot-assisted dynamic single-drop microextraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Electrophoresis* 43 (2022) 1567–1576.
- [96] M.N. Yazdi, Y. Yamini, H. Asiabi, Fabrication of polypyrrole-silver nanocomposite for hollow fiber solid phase microextraction followed by HPLC/UV analysis for determination of parabens in water and beverages samples, *J. Food Compos. Anal.* 74 (2018) 18–26.
- [97] M. Saraji, S. Mirmahdieh, Single-drop microextraction followed by in-syringe derivatization and GC-MS detection for the determination of parabens in water and cosmetic products, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 988–995.
- [98] A.V. Marta-Sanchez, S.S. Caldas, A. Schneider, S.M.V.S. Cardoso, E.G. Primel, Trace analysis of parabens preservatives in drinking water treatment sludge, treated, and mineral water samples, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25 (2018) 14460–14470.
- [99] A. Zgoła-Grześkowiak, M. Jeszka-Skowron, B. Czarczyńska-Goślińska, T. Grześkowiak, Determination of Parabens in Polish River and Lake Water as a Function of Season, *Anal. Lett.* 49 (2016) 1734–1747.
- [100] L. Vazquez, M. Celeiro, A. Castiñeira-Landeira, T. Dagnac, M. Llompart, Development of a solid phase microextraction gas chromatography tandem mass spectrometry methodology for the analysis of sixty personal care products in hydroalcoholic gels - hand sanitizers - in the context of COVID-19 pandemic, *Anal. Chim. Acta* 1203 (2022) 339650.
- [101] V. Vález-Gomis, S. Carchano-Olcina, J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, Entrapment of magnetic nanoparticles into poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) copolymer for the determination of prohibited and restricted fragrance ingredients in cosmetic products, *Microchem. J.* 183 (2022) 108044.

Referencias

- [102] C.H. Lu, M.C. Fang, Y.Z. Chen, S.C. Huang, D.Y. Wang, Quantitative analysis of fragrance allergens in various matrixes of cosmetics by liquid-liquid extraction and GCeMS, *J. Food Drug Anal.* 29 (2021) 700–708.
- [103] M. Celeiro, E. Guerra, J.P. Lamas, M. Lores, C. Garcia-Jares, M. Llompart, Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products, *J. Chromatogr. A* 1344 (2014) 1–14.
- [104] M. Celeiro, J.P. Lamas, C. Garcia-Jares, M. Llompart, Pressurized liquid extraction-gas chromatography-mass spectrometry analysis of fragrance allergens, musks, phthalates and preservatives in baby wipes, *J. Chromatogr. A* 1384 (2015) 9–21.
- [105] M. Saraji, S. Javadian, Single-drop microextraction combined with gas chromatography-electron capture detection for the determination of acrylamide in food samples, *Food Chem.* 274 (2019) 55–60.
- [106] M.B. Galuch, T.F.S. Magon, R. Silveira, A.E. Nicácio, J.S. Pizzo, E.G. Bonafe, L. Maldaner, O.O. Santos, J.V. Visentainer, Determination of acrylamide in brewed coffee by dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS), *Food Chem.* 282 (2019) 120–126.
- [107] M.R. Lee, L.Y. Chang, J. Dou, Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* 582 (2007) 19–23.
- [108] M. Ghalebi, S. Hamidi, M. Nemati, High-performance liquid chromatography determination of acrylamide after its extraction from potato chips, *Pharm. Sci.* 25 (2019) 338–344.
- [109] Z. Geng, R. Jiang, M. Chen, Determination of acrylamide in starch-based foods by ion-exclusion liquid chromatography, *J. Food Compos. Anal.* 21 (2008) 178–182.
- [110] J.L. Benedé, A. Chisvert, J. Grau, V. Váñez-gomis, C. Azorín, L. Schettino, G. Peris-Pastor, A. Salvador, Moving toward green and sustainable sample preparation, *LC GC North Am.* 39 (2021) 18–20.
- [111] I. Pacheco-Fernández, V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, Guanidinium ionic liquid-based surfactants as low cytotoxic extractants: Analytical performance in an in-situ dispersive liquid – liquid microextraction method for determining personal care products, *J. Chromatogr. A* 1559 (2018) 102–111.
- [112] I. Pacheco-Fernández, V. Pino, Green solvents in analytical chemistry,

Referencias

- Curr. Opin. Green Sustain. Chem. 18 (2019) 42–50.
- [113] I. Liguori, G. Russo, F. Curcio, G. Bulli, L. Aran, D. Della-Morte, G. Gargiulo, G. Testa, F. Cacciatore, D. Bonaduce, P. Abete, Oxidative stress, aging, and diseases, *Clin. Interv. Aging*. 13 (2018) 757–772.
- [114] G. Kojda, D. Harrison, Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure, *Cardiovasc. Res.* 43 (1999) 562–571.
- [115] K. Uno, S.J. Nicholls, Biomarkers of inflammation and oxidative stress in atherosclerosis, *Biomark. Med.* 4 (2010) 361–373.
- [116] M. Erhola, S. Toyokuni, K. Okada, T. Tanaka, H. Hiai, H. Ochi, K. Uchida, T. Osawa, M.M. Nieminen, H. Alho, P. Kellokumpu-Lehtinen, Biomarker evidence of DNA oxidation in lung cancer patients: Association of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with radiotherapy, chemotherapy, and response to treatment, *FEBS Lett.* 409 (1997) 287–291.
- [117] A. Matsui, T. Ikeda, K. Enomoto, K. Hosoda, H. Nakashima, K. Omae, M. Watanabe, T. Hibi, M. Kitajima, Increased formation of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'- deoxyguanosine, in human breast cancer tissue and its relationship to GSTP1 and COMT genotypes, *Cancer Lett.* 151 (2000) 87–95.
- [118] E. Ho, K. Karimi Galougahi, C.C. Liu, R. Bhindi, G.A. Figtree, Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice, *Redox Biol.* 1 (2013) 483–491.
- [119] Y. Hinokio, S. Suzuki, M. Hirai, C. Suzuki, M. Suzuki, T. Toyota, Urinary excretion of 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a predictor of the development of diabetic nephropathy, *Diabetologia*. 45 (2002) 877–882.
- [120] H. Kasai, Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis, *Mutat. Res.* 387 (1997) 147–163.
- [121] A. Valavanidis, T. Vlachogianni, C. Fiotakis, 8-Hydroxy-2' -deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis, *J. Environ. Sci. Heal. - Part C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 27 (2009) 120–139.
- [122] Y. Sawamoto, N. Sugano, H. Tanaka, K. Ito, Detection of periodontopathic bacteria and an oxidative stress marker in saliva from periodontitis patients, *Oral Microbiol. Immunol.* 20 (2005) 216–220.
- [123] S. Martí-Álamo, A. Mancheño-Franch, C. Marzal-Gamarra, L. Carlos-Fabuel, Saliva as a diagnostic fluid. Literature review, *J. Clin. Exp. Dent.* 4 (2012) 237–243.

Referencias

- [124] I.T. Gug, M. Tertis, O. Hosu, C. Cristea, Salivary biomarkers detection: Analytical and immunological methods overview, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 113 (2019) 301–316.
- [125] H.S. Lin, A.M. Jenner, C.N. Ong, S.H. Huang, M. Whiteman, B. Halliwell, A high-throughput and sensitive methodology for the quantification of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine: Measurement with gas chromatography-mass spectrometry after single solid-phase extraction, *Biochem. J.* 380 (2004) 541–548.
- [126] S. Koide, Y. Kinoshita, N. Ito, J. Kimura, K. Yokoyama, I. Karube, Determination of human serum 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) by HPLC-ECD combined with solid phase extraction (SPE), *J. Chromatogr. B.* 878 (2010) 2163–2167.
- [127] D. Germadnik, A. Pilger, H.W. Rüdiger, Assay for the determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *J. Chromatogr. B.* 689 (1997) 399–403.
- [128] C.J. Wang, N.H. Yang, C.C. Chang, S.H. Liou, H.L. Lee, Rapid and simple one-step membrane extraction for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human plasma by a combination of on-line solid phase extraction and LC-MS/MS, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 3538–3543.
- [129] K. Shimoi, H. Kasai, N. Yokota, S. Toyokuni, N. Kinae, Comparison between high-performance liquid chromatography and enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11 (2002) 767–770.
- [130] C. Matayatsuk, P. Wilairat, Quantitative determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative stress in thalassemic patients using HPLC with an electrochemical detector, *J. Anal. Chem.* 63 (2008) 52–56.
- [131] K. Petrů, J. Šíroková, L. Bydžovská, L. Krčmová, M. Polášek, Assay of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by capillary electrophoresis with spectrophotometric detection using a high-sensitivity detection cell and solid-phase extraction, *Electrophoresis.* 35 (2014) 2546–2549.
- [132] P. Zhang, K. Lian, X. Wu, M. Yao, X. Lu, W. Kang, L. Jiang, Evaluation of the oxidative deoxyribonucleic acid damage biomarker 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the urine of leukemic children by micellar electrokinetic capillary chromatography, *J. Chromatogr. A* 1336 (2014) 112–119.
- [133] H. Gan, H. Xu, A novel aptamer-based online magnetic solid phase extraction method for simultaneous determination of urinary 8-hydroxy-

Referencias

- 2'-deoxyguanosine and monohydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons, *Talanta* 201 (2019) 271–279.
- [134] D. Chen, H. Xu, Simultaneous HPLC-MS determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, 3-hydroxyphenanthrene and 1-hydroxypyrene after online in-tube solid phase microextraction using a graphene oxide/poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/polypyrrole composite, *Microchim. Acta* 186 (2019) 300.
- [135] H. Kataoka, K. Mizuno, E. Oda, A. Saito, Determination of the oxidative stress biomarker urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B* 1019 (2016) 140–146.
- [136] B. Mendes, P. Silva, F. Aveiro, J. Pereira, J.S. Câmara, A micro-extraction technique using a new digitally controlled syringe combined with UHPLC for assessment of urinary biomarkers of oxidatively damaged DNA, *PLoS One* 8 (2013) 1–9.
- [137] X. Meng, Q. Liu, Y. Ding, Paper-based solid-phase microextraction for analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine sample by CE-LIF, *Electrophoresis* 38 (2017) 494–500.
- [138] C. Isobe, T. Abe, Y. Terayama, Levels of reduced and oxidized coenzymeQ-10 and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the cerebrospinal fluid of patients with living Parkinson's disease demonstrate that mitochondrial oxidative damage and/or oxidative DNA damage contributes to the neurodegenera, *Neurosci. Lett.* 469 (2010) 159–163.
- [139] Q. Chen, Y. Hu, Z. Fang, M. Ye, J. Li, S. Zhang, Y. Yuan, C. Guo, Elevated levels of oxidative nucleic acid modification markers in urine from gastric cancer patients: quantitative analysis by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Front. Chem.* 8 (2020) 1–7.
- [140] C. Hosozumi, A. Toriba, T. Chuesaard, T. Kameda, N. Tang, K. Hayakawa, Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B.* 893–894 (2012) 173–176.
- [141] C. Guo, X. Li, R. Wang, J. Yu, M. Ye, L. Mao, S. Zhang, S. Zheng, Association between oxidative DNA damage and risk of colorectal cancer: sensitive determination of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by UPLC-MS/MS analysis, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–9.
- [142] M.R. Jamali, A. Firouzjah, R. Rahnema, Solvent-assisted dispersive solid phase extraction, *Talanta* 116 (2013) 454–459.
- [143] J. Grau, J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, Modified magnetic-based

Referencias

- solvent-assisted dispersive solid-phase extraction: application to the determination of cortisol and cortisone in human saliva, *J. Chromatogr. A* 1652 (2021) 462361.
- [144] T. Fusayama, T. Katayori, S. Nomoto, Corrosion of gold and amalgam placed in contact with each other, *J. Dent. Res.* 42 (1963) 1183–1197.
- [145] C. Azorín, J.L. Benedé, A. Chisvert, A. Salvador, Trace determination of tetrahydrocannabinol (THC) in cosmetic products by stir bar sorptive dispersive microextraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 253 (2023) 123934.
- [146] E.R. Douglas, The effect of temperature on analytical extractions, *LCGC North Am.* 39 (2021) 15–18.
- [147] J.A. Cornell, Experiments with mixtures: designs, models, and the analysis of mixture data, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2002.
- [148] J.N. Miller, J.C. Miller, Statics and Chemometrics for Analytical Chemistry, Pearson Education Limited, London, 2005.
- [149] International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use, ICH harmonised guideline validation of analytical procedures Q2(R), (2022).
- [150] Y. Guan, G. Zhou, J. Ye, Fast quantification of salivary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as DNA damage biomarker using CE with electrochemical detection, *Chromatographia* 77 (2014) 603–607.
- [151] W. Chai, H. Wang, Y. Zhang, G. Ding, Preparation of polydopamine-coated magnetic nanoparticles for dispersive solid-phase extraction of water-soluble synthetic colorants in beverage samples with HPLC analysis, *Talanta* 149 (2016) 13–20.
- [152] Q. Di, H. Hong, L. Jiang, K. Ho, L. Zhi, P. Hu, Z. Jie, L. Hua, Y. Wang, Y. Yu, Polydopamine - modification of a magnetic composite constructed from citric acid – cross - linked cyclodextrin and graphene oxide for dye removal from waters, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 30 (2023) 78521–78536.
- [153] T. Chatzimitakos, A. Vasilas, C. Stalikas, Layered double hydroxide / graphene quantum dots as a new sorbent for the dispersive solid-phase microextraction of selected benzophenones, phenols, and parabens, *Molecules* 27 (2022) 8388.
- [154] K.S. Samra, Manpreet, A. Singh, Facile synthesis of graphene quantum dots and their optical characterization, *Fullerenes Nanotub. Carbon Nanostructures* 29 (2021) 638–642.
- [155] K. Maaz, A. Mumtaz, S.K. Hasanain, A. Ceylan, Synthesis and magnetic properties of cobalt ferrite (CoFe₂O₄) nanoparticles prepared by wet chemical route, *J. Magn. Mater.* 308 (2007) 289–295.

Referencias

- [156] K. Suanchan, N. Chansud, S. Sa-nguanprang, O. Bunkoed, A nanocomposite optosensing probe based on hierarchical porous carbon and graphene quantum dots incorporated in selective polymer for the detection of trace ofloxacin, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 628 (2021) 127376.
- [157] X. Li, H. Lu, Y. Zhang, F. He, L. Jing, X. He, Fabrication of magnetic alginate beads with uniform dispersion of CoFe₂O₄ by the polydopamine surface functionalization for organic pollutants removal, *Appl. Surf. Sci.* 389 (2016) 567–577.
- [158] E. Torabi, A. Abdar, N. Lotfian, M. Bazargan, C. Simms, M. Moussawi, Advanced materials in sorbent-based analytical sample preparation, *Coord. Chem. Rev.* 506 (2024) 215680.
- [159] M. Thommes, K. Kaneko, A. V. Neimark, J.P. Olivier, F. Rodriguez-Reinoso, J. Rouquerol, K.S.W. Sing, Physisorption of gases, with special reference to the evaluation of surface area and pore size distribution (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 87 (2015) 1051–1069.
- [160] D.C. Montgomery, Two-level fractional factorial designs, in: *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 2012, pp. 320–393.
- [161] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escaleira, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, *Talanta* 76 (2008) 965–977.
- [162] A.L. López-Juan, L.M. Moreno-Calleja, J.L. Benedé, A. Chisvert, Dispersive microextraction techniques as efficient strategies for the analysis of saliva: A comprehensive review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 255 (2025) 116644.
- [163] C. Azorín, J.L. Benedé, A. Chisvert, A 96-position platform for magnetic sorbent-based dispersive microextraction: Application to the determination of tetrahydrocannabinol and cannabidiol in saliva of cannabis smokers, *Anal. Chim. Acta* 1329 (2024) 343239.
- [164] R.L. Prueitt, M.L. Hixon, T. Fan, N.S. Olgun, P. Piatos, J. Zhou, J.E. Goodman, Systematic review of the potential carcinogenicity of bisphenol A in humans, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 142 (2023) 105414.
- [165] W. Dekant, W. Völkel, Human exposure to bisphenol A by biomonitoring: Methods, results and assessment of environmental exposures, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 228 (2008) 114–134.
- [166] M.D. Martin, Exposure to bisphenol A (BPA) from dental sealants is detectable in saliva and urine, and varies significantly between sealant formulations, *J. Evid. Based. Dent. Pract.* 7 (2007) 79–80.
- [167] A. Ziv-Gal, J.A. Flaws, Evidence for bisphenol A-induced female infertility:

Referencias

- a review (2007–2016), *Fertil. Steril.* 106 (2016) 827–856.
- [168] I.A. Kawa, Akbar masood, Q. Fatima, S.A. Mir, H. Jeelani, S. Manzoor, F. Rashid, Endocrine disrupting chemical Bisphenol A and its potential effects on female health, *Diabetes Metab. Syndr. Clin. Res. Rev.* 15 (2021) 803–811.
- [169] D. Chen, K. Kannan, H. Tan, Z. Zheng, Y.L. Feng, Y. Wu, M. Widelka, Bisphenol analogues other than BPA: Environmental occurrence, human exposure, and toxicity - A review, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 5438–5453.
- [170] M. Abdel-Rehim, S. Pedersen-Bjergaard, A. Abdel-Rehim, R. Lucena, M.M. Moein, S. Cárdenas, M. Miró, Microextraction approaches for bioanalytical applications: An overview, *J. Chromatogr. A* 1616 (2020) 460790.
- [171] Z. Niu, W. Zhang, C. Yu, J. Zhang, Y. Wen, Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 102 (2018) 123–146.
- [172] N. Caballero-Casero, L. Lunar, S. Rubio, Analytical methods for the determination of mixtures of bisphenols and derivatives in human and environmental exposure sources and biological fluids. A review, *Anal. Chim. Acta* 908 (2016) 22–53.
- [173] C. Guo, X. Zhao, J. Jin, L. Wang, D. Tan, J. Chen, Y. Ni, The dose effect of dansyl chloride on the derivative products of bisphenols and its application for the determination of bisphenols in human serum by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Sep. Sci.* 44 (2021) 3052–3060.
- [174] A. Li, F. Wang, L. Tao, C. Ma, L. Bi, M. Song, G. Jiang, Rapid and simultaneous determination of multiple endocrine-disrupting chemicals and their metabolites in human serum and urine samples, *Talanta* 248 (2022) 123639.
- [175] Y. Wang, G. Li, Q. Zhu, C. Liao, A multi-residue method for determination of 36 endocrine disrupting chemicals in human serum with a simple extraction procedure in combination of UPLC-MS/MS analysis, *Talanta* 205 (2019) 120144.
- [176] S. Song, M. Shao, W. Wang, Y. He, X. Dai, H. Wang, L. Liu, F. Guo, Development and evaluation of microwave-assisted and ultrasound-assisted methods based on a quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for the determination of bisphenol analogues in serum and sediments, *J. Sep. Sci.* 40 (2017) 4477–4660.
- [177] H. Zhao, J. Li, X. Ma, W. Huo, S. Xu, Z. Cai, Simultaneous determination

Referencias

- of bisphenols, benzophenones and parabens in human urine by using UHPLC-TQMS, *Chinese Chem. Lett.* 29 (2018) 102–106.
- [178] T. Tuzimski, S. Szubartowski, Application of solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection to analyze bisphenol A bis (2,3-dihydroxypropyl) ether (BADGE 2H2O), bisphenol F (BPF), and bisphenol E (BPE) in human urine samples, *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 18 (2021) 10307.
- [179] I. Moscoso-Ruiz, Y. Gálvez-Ontiveros, M. Giles-Mancilla, M. del Carmen Gómez-Regalado, A. Rivas, A. Zafra-Gómez, Improved method for the determination of endocrine-disrupting chemicals in urine of school-age children using microliquid–liquid extraction and UHPLC-MS/MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 414 (2022) 6681–6694.
- [180] J. Yang, Y. Li, J. Wang, X. Sun, R. Cao, H. Sun, C. Huang, J. Chen, Molecularly imprinted polymer microspheres prepared by Pickering emulsion polymerization for selective solid-phase extraction of eight bisphenols from human urine samples, *Anal. Chim. Acta* 872 (2015) 35–45.
- [181] J. Ao, Q. Zhang, W. Tang, T. Yuan, J. Zhang, A simple, rapid and sensitive method for the simultaneous determination of eighteen environmental phenols in human urine, *Chemosphere.* 278 (2021) 130494.
- [182] A. Chisvert, S. Cárdenas, R. Lucena, Dispersive micro-solid phase extraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 226–233.
- [183] F. Vela-Soria, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros, A. Navalón, UHPLC-MS/MS method for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives, bisphenol S, parabens, and benzophenones in human urine samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 3773–3785.
- [184] B.A. Rocha, S.R. de Oliveira, R.M. da Silva, G.R.M. Barcelos, A.R.M. de Oliveira, F. Barbosa, An eco-friendly sample preparation procedure based on low-density solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction for the simultaneous determination of 21 potential endocrine disruptors in urine samples by liquid chromatography-tandem mass spectro, *Microchem. J.* 147 (2019) 207–214.
- [185] B.A. Rocha, A.R.M. de Oliveira, F. Barbosa, A fast and simple air-assisted liquid-liquid microextraction procedure for the simultaneous determination of bisphenols, parabens, benzophenones, triclosan, and triclocarban in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 183 (2018) 94–101.
- [186] F. Vela-Soria, O. Ballesteros, A. Zafra-Gómez, L. Ballesteros, A. Navalón, A multiclass method for the analysis of endocrine disrupting

Referencias

- chemicals in human urine samples. Sample treatment by dispersive liquid-liquid microextraction, *Talanta* 129 (2014) 209–218.
- [187] M.Z. Bocato, C.A. Cesila, B.F. Lataro, A.R.M. de Oliveira, A.D. Campiglia, F. Barbosa, A fast-multiclass method for the determination of 21 endocrine disruptors in human urine by using vortex-assisted dispersive liquid-liquid microextraction (VADLLME) and LC-MS/MS, *Environ. Res.* 189 (2020) 109883.
- [188] P. Baile, J. Medina, L. Vidal, A. Canals, Determination of four bisphenols in water and urine samples by magnetic dispersive solid-phase extraction using a modified zeolite/iron oxide composite prior to liquid chromatography diode array detection, *J. Sep. Sci.* 43 (2020) 1808–1816.
- [189] V. Vázquez-Gomis, M.J. Trujillo-Rodríguez, J.L. Benedé, J. Pasán, V. Pino, A. Chisvert, The metal–organic framework PCN-250 for the extraction of endocrine disrupting compounds in human urine by stir bar sorptive dispersive microextraction, *Microchem. J.* 185 (2023) 108277.
- [190] C. Liao, K. Kannan, Determination of free and conjugated forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 5003–5009.
- [191] PBS (Phosphate Buffered Saline) (1X, pH 7.4) preparation and recipe, Available online: <https://www.aatbio.com/resources>, (2022).
- [192] S. Chutipongtanate, V. Thongboonkerd, Systematic comparisons of artificial urine formulas for in vitro cellular study, *Anal. Biochem.* 402 (2010) 110–112.
- [193] V. Vázquez-Gomis, J.L. Benedé, E. Lara-Molina, M. López-Noguerolles, A. Chisvert, A miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction method for the determination of bisphenols in follicular fluid using a magnetic covalent organic framework, *Anal. Chim. Acta* 1289 (2024) 342215.
- [194] H. Deng, X. Li, Q. Peng, X. Wang, J. Chen, Y. Li, Monodisperse magnetic single-crystal ferrite microspheres, *Angew. Int. Ed. Chemie.* 44 (2005) 2782–2785.
- [195] A. Castro-Grijalba, E.M. Reyes-Gallardo, R.G. Wuilloud, R. Lucena, S. Cárdenas, Synthesis of magnetic polymeric ionic liquid nanocomposites by the Radziszewski reaction, *RSC Adv.* 7 (2017) 42979–42985.
- [196] S.J. Genuis, S. Beesoon, D. Birkholz, R.A. Lobo, Human excretion of bisphenol A: Blood, urine, and sweat (BUS) study, *J. Environ. Public Health.* 2012 (2012) 185731.
- [197] W. Völkel, T. Colnot, G.A. Csanády, J.G. Filser, W. Dekant, Metabolism and kinetics of bisphenol a in humans at low doses following oral administration, *Chem. Res. Toxicol.* 15 (2002) 1281–1287.

Referencias

- [198] G. Ginsberg, D.C. Rice, Does rapid metabolism ensure negligible risk from bisphenol A?, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 1639–1643.
- [199] D.W. Foster, The role of the carnitine system in human metabolism, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1033 (2004) 1–16.
- [200] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 50 (2013) 78–84.
- [201] G.C. Talián, K. Komlósi, T. Decsi, B. Koletzko, B. Melegh, Determination of Carnitine Ester Patterns During the Second Half of Pregnancy , at Delivery , and in Neonatal Cord Blood by Tandem Mass Spectrometry : Complex and Dynamic Involvement of Carnitine in the Intermediary Metabolism, *Pediatr. Res.* 62 (2007) 88–92.
- [202] N. Janzen, U. Steuerwald, S. Sander, M. Terhardt, M. Peter, J. Sander, UPLC – MS / MS analysis of C5-acylcarnitines in dried blood spots, *Clin. Chim. Acta* 421 (2013) 41–45.
- [203] S. Forni, X. Fu, S.E. Palmer, L. Sweetman, Rapid determination of C4-acylcarnitine and C5-acylcarnitine isomers in plasma and dried blood spots by UPLC – MS / MS as a second tier test following flow-injection MS / MS acylcarnitine profile analysis, *Mol. Genet. Metab.* 101 (2010) 25–32.
- [204] M. Möder, H. Löster, R. Herzsuh, P. Popp, Determination of urinary acylcarnitines by ESI-MS coupled with solid-phase microextraction (SPME), *J. Mass Spectrom.* 32 (1997) 1195–1204.
- [205] J. Bogusiewicz, J. Furtak, M. Birski, K. Soszy, A. Majda, A. Ryfa, Acylcarnitine Profiling in Meningiomas with Different NF2 Mutation Status Acylcarnitine Profiling in Meningiomas with Different NF2 Mutation Status, *Int. J. Mol. Sci.* 26 (2024) 1570.
- [206] J. Bogusiewicz, K. Burlikowska, K. Jaroch, P.Z. Gorynska, K. Gorynski, M. Birski, J. Furtak, D. Paczkowski, M. Harat, B. Bojko, Profiling of carnitine shuttle system intermediates in gliomas using solid-phase microextraction (SPME), *Molecules* 26 (2021) 1–12.
- [207] A. Chisvert, S. Cárdenas, R. Lucena, Dispersive micro-solid phase extraction, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 112 (2019) 226–233.
- [208] R. Keçili, F. Ghorbani-Bidkorbeh, İ. Dolak, G. Canpolat, M. Karabörk, C.M. Hussain, Functionalized magnetic nanoparticles as powerful sorbents and stationary phases for the extraction and chromatographic applications, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 143 (2021) 116380.
- [209] G. Mafra, A.A. Vieira, J. Merib, J.L. Anderson, E. Carasek, Single drop microextraction in a 96-well plate format: A step toward automated and high-throughput analysis, *Anal. Chim. Acta* 1063 (2019) 159–166.

Referencias

- [210] M. Alexovič, Y. Dotsikas, P. Bober, J. Sabo, Achievements in robotic automation of solvent extraction and related approaches for bioanalysis of pharmaceuticals, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1092 (2018) 402–421.
- [211] L.E.E. Eibak, K.E. Rasmussen, E.L. Øiestad, S. Pedersen-Bjergaard, A. Gjelstad, Parallel electromembrane extraction in the 96-well format, *Anal. Chim. Acta* 828 (2014) 46–52.
- [212] E. Carasek, R. Scur, G. Bernardi, High-throughput analytical methods employing microextraction techniques: Towards fast analyses lasting a few seconds, *Adv. Sample Prep.* 8 (2023) 100095.
- [213] R.F. Venn, J. Merson, S. Cole, P. Macrae, 96-Well solid-phase extraction: A brief history of its development, *J. Chromatogr. B.* 817 (2005) 77–80.
- [214] J.P. Hutchinson, L. Setkova, J. Pawliszyn, Automation of solid-phase microextraction on a 96-well plate format, *J. Chromatogr. A* 1149 (2007) 127–137.
- [215] D. Lopes, A.N. Dias, J. Merib, E. Carasek, Hollow-fiber renewal liquid membrane extraction coupled with 96-well plate system as innovative high-throughput configuration for the determination of endocrine disrupting compounds by high-performance liquid chromatography-fluorescence and diode array de, *Anal. Chim. Acta* 1040 (2018) 33–40.
- [216] A. Gjelstad, K.E. Rasmussen, M.P. Parmer, S. Pedersen-Bjergaard, Parallel artificial liquid membrane extraction: Micro-scale liquid-liquid-liquid extraction in the 96-well format, *Bioanalysis.* 5 (2013) 1377–1385.
- [217] C. Will, R. Dagnoni, G. Mafra, J. Merib, J.L. Anderson, E. Carasek, High-throughput approach for the in situ generation of magnetic ionic liquids in parallel-dispersive droplet extraction of organic micropollutants in aqueous environmental samples, *Talanta* 223 (2021) 121759.
- [218] J. Merib, High-throughput platforms for microextraction techniques, *Anal. Bioanal. Chem.* 415 (2023) 3671–3681.
- [219] L. Felipe, R. Cabal, D. Arley, V. Medina, A.M. Lima, Á.J. Santos-Neto, Robotic-assisted dynamic large drop microextraction, *J. Chromatogr. A* 1608 (2019) 460416.
- [220] A. Bortolotto, C. Will, R.D. Huelsmann, E. Carasek, Lab-made automated parallel-dispersive pipette extraction device for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in distilled beverages (sugarcane spirits) using HPLC-DAD, *J. Chromatogr. A* 1733 (2024) 465257.
- [221] R. Yahyaoui, M.G. Espinosa, C. Gómez, A. Dayaldasani, I. Rueda, A. Roldán, M. Ugarte, G. Lastra, V. Pérez, Neonatal carnitine palmitoyltransferase II deficiency associated with Dandy-Walker syndrome and sudden death, *Mol. Genet. Metab.* 104 (2011) 414–416.

Referencias

- [222] J.L. Benedé, A. Chisvert, D.L. Giokas, A. Salvador, Development of stir bar sorptive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media, *J. Chromatogr. A* 1362 (2014) 25–33.
- [223] Arduino, <https://www.arduino.cc/>, accedido en febrero de 2023.
- [224] I.P. Román, A. Chisvert Alberto, A. Canals, Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 2467–2475.
- [225] K. Yamada, R. Bo, H. Kobayashi, Y. Hasegawa, M. Ago, S. Fukuda, S. Yamaguchi, T. Taketani, A newborn case with carnitine palmitoyltransferase II deficiency initially judged as unaffected by acylcarnitine analysis soon after birth, *Mol. Genet. Metab. Reports*. 11 (2017) 59–61.
- [226] J.G. Loeber, D. Platis, R.H. Zetterström, P.J.C.I. Schielen, Neonatal screening in Europe revisited: An ISNS-perspective on the current state and developments since 2010, *Int. J. Neonatal Screen*. 37 (2021) 441–456.
- [227] F. Shahhoseini, A. Azizi, C.S. Bottaro, Single-use porous polymer thin-film device: A reliable sampler for analysis of drugs in small volumes of biofluids, *Anal. Chim. Acta* 1203 (2022) 339651.
- [228] R. Zakaria, K.J. Allen, J.J. Koplin, P. Roche, R.F. Greaves, Advantages and challenges of dried blood spot analysis by mass spectrometry across the total testing process, *Ejifcc*. 27 (2016) 288–317.
- [229] S. Magiera, J. Baranowski, Determination of carnitine and acylcarnitines in human urine by means of microextraction in packed sorbent and hydrophilic interaction chromatography-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 109 (2015) 171–176.
- [230] L. Chen, Y. Yan, C. Hong, X. Wei, J. Xiong, C. Huang, X. Shen, Successive electromembrane extraction: A new insight in simultaneous extraction of polar and non-polar metabolic molecules from biological samples, *Anal. Chim. Acta* 1344 (2025) 343727.

Anexo I

Diseños multivariantes

Diseño de Box-Behnken

Los diseños de Box-Behnken son una clase de diseños giratorios o casi giratorios de segundo orden basados en diseños factoriales incompletos de tres niveles. El número de experimentos requeridos para el desarrollo del diseño (N) se define mediante la siguiente ecuación:

$$N = 2k(k - 1) + C_p \quad (\text{Ec. A-I.1})$$

donde k es el número de factores y C_p el número de puntos centrales. Se aplicó la siguiente ecuación cuadrática polinómica para evaluar la regresión lineal de cada respuesta:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (\text{Ec. A-I.2})$$

donde Y es la respuesta analítica; β_0 es un término constante; β_i , β_j y β_{ij} son los coeficientes de regresión del diseño; X_i y X_j son las diferentes variables; y ε es el error residual.

Se aplicó la deseabilidad global del experimento (D) para evaluar las diferentes respuestas y alcanzar las condiciones óptimas de extracción consiguiendo maximizar las respuestas analíticas de los analitos:

$$D = (d_1(Y_1) \cdot d_2(Y_2) \cdots d_n(Y_n))^{\frac{1}{n}} \quad (\text{Ec. A-I.3})$$

donde n es el número de respuestas en el proceso de optimización y $d_i(Y_i)$ es la deseabilidad individual de cada respuesta en el experimento. La deseabilidad individual se calcula como:

$$d_i = \frac{Y_i - Y_{\min}}{Y_{\max} - Y_{\min}} \quad (\text{Ec. A-I.4})$$

La deseabilidad toma valores de entre 0 y 1 para cada respuesta.

Diseño Simplex-Centroid

El ajuste para la región simplex establecida para el estudio se delimitó en tres pseudocomponentes (variables independientes (X_1, X_2, X_3)), comprendiendo valores de 0 a 1. El número de experimentos requeridos para el desarrollo de los diseños (N) se define como:

$$N = 2^q - 1 \quad (\text{Ec. A-I.5})$$

donde q es el número de componentes en la mezcla.

Los puntos del diseño en este modelo estadístico son representados en diagramas triangulares mediante ecuaciones polinómicas definidas por el orden q de la mezcla. El diseño normalmente encaja con tres modelos: lineal (Ec. A-I.6), cuadrático (Ec. A-I.7) o cúbico especial (Ec. A-I.8):

$$Y = \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \epsilon \quad (\text{Ec. A-I.6})$$

$$Y = \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \sum \sum_{i < j}^q \beta_{ij} X_i X_j + \epsilon \quad (\text{Ec. A-I.7})$$

$$Y = \sum_{i=1}^q \beta_i X_i + \sum \sum_{i < j}^q \beta_{ij} X_i X_j + \sum \sum \sum_{i < j < k}^q \beta_{ijk} X_i X_j X_k + \epsilon \quad (\text{Ec. A-I.8})$$

Las interacciones se evalúan mediante β_i , β_{ij} y β_{ijk} ; siendo X_i , X_j y X_k los factores estudiados y Y la respuesta experimental a los factores.

La deseabilidad global del experimento (D) (Ec. A-I.3) se aplicó para evaluar las diferentes respuestas y para conseguir las condiciones óptimas de extracción, con la finalidad de maximizar las respuestas analíticas de los compuestos estudiados. La deseabilidad individual de cada respuesta ($d_i(Y_i)$) se calculó de acuerdo con la Ec. A-I.4. Los valores de deseabilidad se encuentran entre 0 y 1.

Diseño Doehlert

Los diseños Doehlert se obtienen a partir de simplexes (figuras geométricas regulares con $k + 1$ vértices) regulares de k dimensiones, cuando eluden un punto central indicando una región óptima. Yuxtaponiendo los simplex, es posible cubrir todo el espacio k -dimensional, hasta que los vértices formen una red de puntos igualmente espaciados.

El número de experimentos que se requieren para los diseños desarrollados (N) se define de la siguiente forma:

$$N = k^2 + k + C_p \quad (\text{Ec. A-I.9})$$

donde k es el número de factores y C_p son las réplicas del punto central. Se aplicó la Ec. A-I.2 para evaluar la regresión lineal de cada respuesta.

Anexo II

Publicaciones científicas derivadas de esta
Tesis Doctoral

Artículos de investigación

1. G. Peris-Pastor, S. Alonso-Rodríguez, J.L. Benedé, A. Chisvert, High-throughput determination of oxidative stress biomarkers in saliva by solvent-assisted dispersive solid-phase extraction for clinical analysis, *Adv. Sample Prep.* 6 (2023) 100067.



2. G. Peris-Pastor, N. Chansud, O. Bunkoed, J.L. Benedé, A. Chisvert, A step forward in the determination of oxidative stress biomarkers in saliva by miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 295 (2025) 128351.



3. G. Peris-Pastor, E.E. Lara-Molina, J.L. Benedé, A. Chisvert, Boosting miniaturization in clinical analysis: determination of bisphenols in human serum and urine by miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction, *Anal. Bioanal. Chem.* 417 (2025) 155-165.



4. G. Peris-Pastor, C. Clemente-Pechuán, J.L. Benedé, A. Chisvert, A 96-position sample preparation procedure based on miniaturized stir bar sorptive dispersive microextraction for the determination of bladder cancer biomarkers in human serum, *Microchem. J.* 217 (2025) 115058.



5. G. Peris-Pastor, J. Grau, L. Arruza, J.L. Benedé, A. Chisvert, Lab-made open-source controlled robotic workstation for sorbent-based dispersive microextraction of low-volume samples, *Anal. Chim. Acta* 1356 (2025) 344033.



Artículos de revisión

6. G. Peris-Pastor, C. Azorín, J. Grau, J.L. Benedé, A. Chisvert, Miniaturization as a smart strategy to achieve greener sample preparation approaches: A view through greenness assessment, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 170 (2024) 117434.

