



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES: DISEÑO Y
APLICACIONES**

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO



PRESENTA

ADRIÁN PITALÚA CALLEJA

CDMX, 2023

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: MENDEZ STIVALET JOSÉ MANUEL

VOCAL: Profesora: MONROY BARRETO MINERVA

SECRETARIO: Profesor: GARCÍA ORTEGA HÉCTOR

1er. SUPLENTE: Profesora: CABALLERO ARROYO YOLANDA

2º SUPLENTE: Profesora: SÁNCHEZ GARCÍA JESSICA JAZMÍN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

HÉCTOR GARCÍA ORTEGA

SUSTENTANTE:

ADRIÁN PITALÚA CALLEJA

*No entres dócilmente en esa noche quieta.
La vejez debería delirar y arder cuando se cierra el día;
Rabia, rabia, contra la agonía de la luz.*

*Aunque los sabios al morir entiendan que la tiniebla es justa,
porque sus palabras no ensartaron relámpagos
no entran dócilmente en esa noche quieta.*

*Los buenos, que tras la última inquietud lloran por ese brillo
con que sus actos frágiles pudieron danzar en una bahía verde
rabian, rabian contra la agonía de la luz.*

*Los locos que atraparon y cantaron al sol en su carrera
y aprenden, ya muy tarde, que llenaron de pena su camino
no entran dócilmente en esa noche quieta.*

*Los solemnes, cercanos a la muerte, que ven con mirada deslumbrante
cuánto los ojos ciegos pudieron alegrarse y arder como meteoros
rabian, rabian contra la agonía de la luz.*

*Y tú mi padre, allí, en tu triste apogeo
maldice, bendice, que yo ahora imploro con la vehemencia de tus lágrimas.
No entres dócilmente en esa noche quieta.
Rabia, rabia contra la agonía de la luz.*

Dylan Thomas

Agradecimientos

A la UNAM por darme la oportunidad de convertirme en un hombre con educación, desarrollarme en el extranjero, haberme desempeñado como profesor y ser partícipe del deporte de alto rendimiento. Por abrirme los ojos al mundo de la ciencia.

Al gran Dr. Héctor García Ortega por ser un guía y apoyo en todo momento, por abrirme las puertas de su experiencia en docencia y en la orientación de este trabajo. Es un ejemplo a seguir para mí.

Al Subprograma 121 “Formación de Profesores” de la Facultad de Química por mostrarme una de las vocaciones que más admiro y aspiro.

A la Dra. Jessica Sánchez y Dra. Minerva Monroy, por ser claves en mi desarrollo profesional y académico. Les debo tanto.

A la Dra. Soledad Rubio, Dra. Nohelia Caballero y al resto del equipo del laboratorio de Disolventes Supramoleculares de la Universidad de Córdoba por abrirme las puertas de su institución y enamorarme de este campo de la Química Aplicada.

A Mayra por ser mi compañera, mi sustento y mi motor en este camino, por ayudarme a explotar todo mi potencial y darme cuenta de lo que soy capaz.

Al gran Pablo por crecer conmigo, haber sido mi compañero y mi amigo durante este gran proceso.

A mis grandes amigos, indispensables para mí en este proceso: Estefy por brindarme una amistad tan bella y sincera, Damian por ser un gran hermano desde niños, y familia Tavera por darme un segundo hogar.

A la comunidad del CUC y la familia Calvillo, por hacerse presentes en momentos de dificultad. Sin ustedes esto no hubiera sido posible.

A Raúl por ser un gran, amigo y una gran compañía. A mi hermano David por ser un ejemplo de sencillez y darme el regalo de la experiencia, y a mi madre por enseñarme la resiliencia, por alentarme a continuar y permitirme llegar hasta este punto.

*Es difícil empezar desde ceros
es difícil encontrar el camino
y es difícil continuar cuando todo parece ir contracorriente
pero es aún más difícil hacer todo ello con dos hijos y aún así triunfar.*

*Por darme el mejor de los futuros que me pudiste haber dado
por regalarme tanto cariño y amor
por haber luchado con los lobos por mí.*

*Por ser el combustible que siempre necesito
por ser energía y entusiasmo para lograr mis objetivos.*

*Sin ti nunca hubiera llegado tan lejos.
Este triunfo es fruto tuyo.
Este trabajo está dedicado a nadie más que a ti.
Te amo.*

A mi madre



Índice

| | |
|---|----|
| NOMENCLATURA | 8 |
| 1. RESUMEN..... | 9 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 3. OBJETIVOS..... | 12 |
| 4. TENSOACTIVOS | 13 |
| 4.1 SOLUBILIZACIÓN MICELAR | 14 |
| 4.2 EXTRACCIÓN CON COACERVADOS..... | 15 |
| 5. DISOLVENTES SUPRAMOLECULARES: SUPRAS | 16 |
| 5.1 PROCEDIMIENTO GENERAL PARA LA FORMACIÓN DE SUPRAS | 19 |
| 5.2 MECANISMO DE FORMACIÓN DE UN SUPRA | 27 |
| 5.3 AVANCES DE LOS SUPRAS EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA SU ANÁLISIS..... | 31 |
| 5.3.1 MEJORA LA COMPATIBILIDAD CON LC | 32 |
| 5.3.2 MEJORA EN LA COMPATIBILIDAD GC..... | 36 |
| 5.3.3 INTERACCIONES SUPRA-SOLUTO QUE IMPULSAN LAS EXTRACCIONES..... | 40 |
| 5.3.4 AUMENTO PARA PREDECIR LOS FACTORES DE CONCENTRACIÓN EN LA LLE | 43 |
| 5.3.5 ADAPTACIÓN DE LOS SUPRAS EN EXTRACCIONES | 48 |
| 5.3.6 EXTRACCIONES MULTICOMPONENTES CON SUPRAS | 54 |
| 6. APLICACIONES DE LOS SUPRAS..... | 59 |



| | | |
|-------|---|----|
| 6.1 | DESARROLLOS DEPENDIENDO DEL TIPO DE AGREGADO DEL SUPRA | 60 |
| 6.1.1 | MICELAS ACUOSAS NO IÓNICAS | 60 |
| 6.1.2 | MICELAS ACUOSAS IÓNICAS..... | 61 |
| 6.1.3 | MICELAS MIXTAS ACUOSAS..... | 61 |
| 6.1.4 | MICELAS INVERSAS | 64 |
| 6.1.5 | VESÍCULAS | 65 |
| 6.2 | DESARROLLO DE SUPRAS Y SUS CARACTERÍSTICAS PARA ANALITOS ESPECÍFICOS..... | 66 |
| 6.2.1 | HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS (HAP)..... | 66 |
| 6.2.2 | PESTICIDAS | 72 |
| 6.2.3 | TENSOACTIVOS | 78 |
| 6.2.4 | COMPUESTOS BIOACTIVOS | 79 |
| 6.2.5 | COLORANTES | 81 |
| 6.2.6 | DISRUPTORES ENDÓCRINOS..... | 83 |
| 6.2.7 | FENOLES..... | 86 |
| 6.3 | ADAPTACIÓN DE SUPRAS A TRATAMIENTOS INNOVADORES DE MUESTRAS | 88 |
| 7.0 | DESAFÍOS DE LOS SUPRAS EN LA PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA CROMATOGRAFÍA . | 93 |
| 7.1 | ELUCIDACIÓN DE LAS NANOESTRUCTURAS DE LOS SUPRAS | 93 |
| 8. | CONCLUSIONES | 97 |
| 9. | BIBLIOGRAFÍA | 98 |



Nomenclatura

SUPRA: Disolvente supramolecular

Tensoactivo: Sustancia que reduce la tensión superficial

SPE: Extracción en fase sólida

LLE: Extracción líquido-líquido

LC: Cromatografía de líquidos

GC: Cromatografía de gases

MS: Espectrometría de masas

HS: Espacio de cabeza del SUPRA

Suspensión coloidal: Sistema conformado de dos fases

Anfífilo: Sustancia hidrófila y lipófila

Micela: Conglomerado de moléculas que constituye una de las fases de los coloides

Vesícula: Conglomerado de moléculas que constituye una de las fases del coloide que contiene una membrana de alguna fase dentro de ella

Zwitterión: Compuesto eléctricamente neutro pero con cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes

HAP: Hidrocarburos aromáticos policíclicos

CPE: Extracción por punto de turbidez

TCF: Coeficiente teórico de concentración

SUPRAS-RAM: Disolvente supramolecular de acceso restringido

THF: Tetrahidrofurano



1. Resumen

El importante deseo por aplicar Química Verde a todos los posibles métodos químicos de cuantificación ha impulsado la sustitución de disolventes orgánicos contaminantes por métodos de extracción más amigables con el ambiente. De este modo, se ha aprovechado la separación de fases líquido-líquido como método de extracción y concentración de analitos a través de las propiedades que pueden variar en los tensoactivos modificando su ambiente fisicoquímico, como el pH, la temperatura, los electrolitos, etcétera. La fase rica que se presentan en los tensoactivos siempre va a contener un líquido nanoestructurado, que actualmente fue bautizado por el nombre de “Disolvente Supramolecular” o “SUPRA”, el cual posee una estructura ensamblada a partir de anfifílos, generando micelas o vesículas.

Los disolventes supramoleculares, mejor conocidos como SUPRAS, se han convertido en una eficaz alternativa a los disolventes orgánicos previo a su análisis químico. Las propiedades que poseen estos disolventes son de gran valor, como la variabilidad en su polaridad, las diferentes propiedades que pueden poseer y los lugares de interacción en su estructura. Estas características abren la posibilidad de tratar una amplia gama de muestras que normalmente son difíciles de determinar utilizando disolventes orgánicos convencionales.

En esta actualización monográfica se presentan los principales logros alcanzados en las últimas dos décadas combinando los SUPRAS y la cromatografía, así como un pequeño panorama de los desafíos que se presentan en la actualidad, abordando de manera teórica y experimental los conocimientos adquiridos a través de múltiples investigaciones. Se presentan a continuación los avances más relevantes en sus diferentes formatos o estrategias que se han seguido para el análisis de una muestra dependiendo de su naturaleza química, y se hace hincapié en la maximización que representa utilizar disolventes supramoleculares en comparación con los disolventes orgánicos en diferentes campos: químico, biológico, ambiental o agroalimentario. Los avances publicados exponen los mecanismos de formación de SUPRAS y las interacciones que pueden presentar con diferentes analitos. De igual manera, se presentan las estrategias que se siguieron para mejorar las extracciones con los SUPRAS utilizando cromatografía de gases y de líquidos.



2. Introducción

Los organismos reguladores y los laboratorios de control de calidad exigen continuamente métodos más rápidos, sencillos y baratos para el análisis de los contaminantes traza en muestras alimenticias, biológicas y orgánicas. La preparación de las muestras es hoy en día el cuello de botella en el análisis de alimentos y es necesario minimizar el número de pasos para reducir tanto el tiempo como las fuentes de error.

En este sentido, la preparación de muestras para los análisis por cromatografía se ha vuelto cada vez más exigente en muchos ámbitos, como en el control de la calidad de los alimentos [1], la lucha contra el dopaje [2], análisis medioambientales [3], la evaluación del riesgo humano de las mezclas químicas [4], etcétera. Las razones de estos exigentes requisitos son el elevado número de sustancias químicas estructuralmente no relacionadas que hay que determinar en una sola serie cromatográfica, los bajos límites de umbral establecidos para muchas sustancias químicas, la especificidad requerida para evitar falsos resultados positivos y negativos, y la necesidad de analizar un elevado número de muestras y que los resultados se obtengan en poco tiempo. Los atributos necesarios para los procedimientos de preparación de muestras que se aplican en estas áreas incluyen la extracción eficiente y simultánea de un gran número de compuestos estructuralmente no relacionados, proporcionando al mismo tiempo extractos limpios para el análisis y un alto porcentaje de recuperación.

La extracción con disolventes es la técnica con más publicaciones en la literatura científica utilizada para la extracción de contaminantes de alimentos líquidos, a pesar de que a menudo requiere el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos tóxicos y la posterior evaporación y limpieza de los extractos. Por otro lado, en lo que respecta a las técnicas de extracción en fase sólida, aunque caros y con limitadas aplicaciones en alimentos líquidos, se han convertido en una buena estrategia para la extracción, por ejemplo la extracción de ocratoxina A en vinos y de herbicidas de fenilurea en zumos de frutas. Sin embargo, sigue habiendo una gran necesidad de procedimientos de preparación de muestras más generales y valiosos que cumplan los exigentes límites reglamentarios establecidos.

La evolución de las técnicas cromatográficas en las últimas dos décadas ha sido impresionante en términos de eficiencia, reducción de los tiempos de análisis y poder de resolución de los problemas de detección. Hoy en día, las técnicas LC-MS/MS, GC-MS y algunas otras más se han convertido en esenciales para hacer frente a la mayoría de los retos que se plantean de forma rutinaria a los que se enfrentan los laboratorios que realizan análisis químicos [5].

No es de extrañar que la mayoría de los procedimientos de preparación de muestras desarrollados actualmente estén destinados a proporcionar extractos adecuados para el análisis cromatográfico-MS. En la actualidad, se siguen principalmente tres estrategias para la preparación de la muestra antes de la cromatografía: la extracción en fase sólida (SPE), la extracción con disolventes (tanto la extracción líquido-líquido (LLE), como la extracción sólido-líquido (SLE)) y la dilución de la matriz (métodos de diluir e inyectar, D&S), cada una de ellas con



ventajas e inconvenientes [6]. Los métodos D&S permiten una preparación de la muestra escasa o nula, un alto rendimiento y un coste reducido. Sin embargo, al diluir la muestra hasta una limpieza aceptable, la sensibilidad sólo es adecuada para los analitos presentes en las muestras a altas concentraciones. Otros inconvenientes son los desplazamientos del tiempo de retención, que reducen la capacidad de identificación, y los cambios en la forma de los picos [7].

Por lo tanto, el uso de una preparación de muestras más extensa basada en LLE, SLE o SPE es un enfoque más fiable para el análisis cromatográfico. La SLE es obligatoria para el tratamiento de muestras sólidas y la LLE se utiliza ampliamente para el procesamiento de líquidos debido a su simplicidad. Sin embargo, la extracción con disolventes orgánicos convencionales no es adecuada para la extracción de una gran variedad de analitos que cubren un amplio rango de polaridad: usualmente se requiere un gran volumen de disolventes utilizando extracciones repetitivas para obtener rendimientos aceptables, y su uso plantea problemas medioambientales y de salud.

Por otro lado, la SPE en sus diferentes variantes, capaz de retener analitos con base en diferentes mecanismos de interacción, sólo es aplicable a muestras líquidas y también implica múltiples pasos (acondicionamiento, carga, lavado, elución y evaporación), lo que aumenta tanto el tiempo como los costes en comparación con la extracción con disolventes [8]. Además, los efectos de la matriz siguen siendo la principal preocupación en la separación de sus analitos en técnicas cromatográficas más utilizadas en la actualidad (por ejemplo, LC-MS/MS, en particular utilizando la ionización por electrospray, ESI), pues a mayor cantidad de otros componentes diferentes al analito la respuesta instrumental del analito de interés disminuye, lo que hace que la mayoría de las veces sea obligatorio utilizar una calibración adaptada a la matriz o una amplia limpieza de la muestra para eliminar las interferencias [9].

En este sentido, se ha dedicado mucho tiempo en investigaciones para el desarrollo de diferentes estrategias que incluyen la miniaturización para reducir el consumo de disolventes, por ejemplo: microextracción en fase líquida (LPME), microextracción de gota única (SDME), microextracción en fase líquida de fibra hueca, (HF-LPME), la mejora de la extracción con disolventes, la extracción con líquidos presurizados (PLE), la extracción asistida por microondas (MAE), etc. [10] y el uso de disolventes alternativos más ecológicos, para mejorar las propiedades de extracción (por ejemplo, fluidos supercríticos, líquidos iónicos, disolventes eutécticos profundos, etc.).

El diseño de métodos de extracción ecológicos y sostenibles es actualmente un tema de investigación muy presente, tanto que se han introducido seis principios de extracción ecológica para proteger tanto el medioambiente como a los consumidores [11]. En este contexto, los disolventes supramoleculares se han convertido en una alternativa adecuada a los disolventes orgánicos convencionales para el tratamiento de las muestras previo a sus determinaciones cromatográficas [12]. Este trabajo trata de los logros a través de los años en la aplicación de los SUPRAS a la extracción de compuestos orgánicos antes de su determinación cromatográfica, y los principales retos que hay que abordar en este ámbito para que las extracciones basadas en SUPRAS sean competitivas con los métodos rutinarios de laboratorio.



3. Objetivos

General

Realizar una investigación en la literatura científica sobre los disolventes supramoleculares y sus aplicaciones. Hacer una comparación de sus ventajas respecto a los disolventes convencionales utilizados en extracciones.

Particulares

- Hacer una actualización bibliográfica de los avances en las últimas dos décadas basadas en extracciones fisicoquímicas aplicando disolventes supramoleculares.
- Describir qué es un disolvente supramolecular y su mecanismo de formación.
- Demostrar que los disolventes supramoleculares son una alternativa verde a la extracción mediada por disolventes orgánicos convencionales a través de la recopilación de los resultados de investigaciones recientes.



4. Tensoactivos

Los tensoactivos se componen convencionalmente de un grupo de cabeza polar y un grupo de cola largo e hidrofóbico, y pueden clasificarse en cuatro grupos diferentes:

- Tensoactivos aniónicos
- Tensoactivos catiónicos
- Tensoactivos zwitteriónicos
- Tensoactivos no iónicos

Las moléculas de los tensoactivos se adsorben en la interfase: solución acuosa-aire o solución acuosa-solución orgánica, de forma que la parte hidrofílica se dirige siempre hacia la fase acuosa. Cuando la concentración aumenta, las moléculas anfifílicas dispersas en un disolvente se encuentran bajo la influencia de las propiedades anfifílicas de las cadenas hidrofóbicas, y se autoensamblan en grupos de tamaño coloidal. La asociación se produce tras superar la concentración característica para los compuestos tensoactivos, conocida como concentración micelar crítica (CMC). Los agregados formados por encima de la CMC se denominan micelas [13].

Las micelas son sistemas coloidales, transparentes (el tamaño de los agregados es menor que la longitud de la luz visible) en los que la fase continua es el agua o el disolvente, y las moléculas de tensoactivos agregados son la fase dispersa. Debido al tamaño de los agregados, las micelas se encuentran en una posición intermedia entre las suspensiones y las soluciones propiamente dichas, cuyo límite no está estrictamente definido. Las micelas pueden tener diferentes formas, desde esféricas hasta elipsoidales, dependiendo del tensoactivo específico y de las condiciones de la solución. En disolventes polares, las micelas adoptan una forma con cabezas hidrofílicas fuera de la estructura (Figura 1), de modo que las colas están protegidas de los efectos adversos del disolvente. En un disolvente no polar, se forman micelas inversas, en las que las colas hidrofóbicas están fuera de la estructura [13].

La estabilidad y la estructura de las micelas se consiguen gracias a la presencia de una carga en la superficie, en la que el agregado es eléctricamente neutro. El número de moléculas de tensoactivo presentes en las micelas se ha denominado grado o número de agregación. El valor numérico de este parámetro depende de ciertos factores, como [13]:

- Estructura de los grupos hidrofóbicos e hidrofílicos
- Tipo de tensoactivo
- Presencia y concentración de electrolitos
- Naturaleza del disolvente
- Temperatura
- pH de la solución



Las micelas se encuentran en un equilibrio dinámico con los monómeros (unidad del tensoactivo que cuenta con cabeza y cola, representado en la Figura 1 a), en el que cada monómero puede salir de la micela, y puede ser sustituido por otro. El tiempo del monómero dentro de una micela depende del tipo y la estructura de la molécula, mientras que el tiempo de salida del monómero es del orden de microsegundos, y su retorno depende de la velocidad de difusión. Es importante señalar que la forma de las micelas puede alterarse mediante la selección adecuada de los parámetros de la solución, como la temperatura, la concentración del tensoactivo y la presencia, tipo y la concentración de compuestos adicionales en la solución.

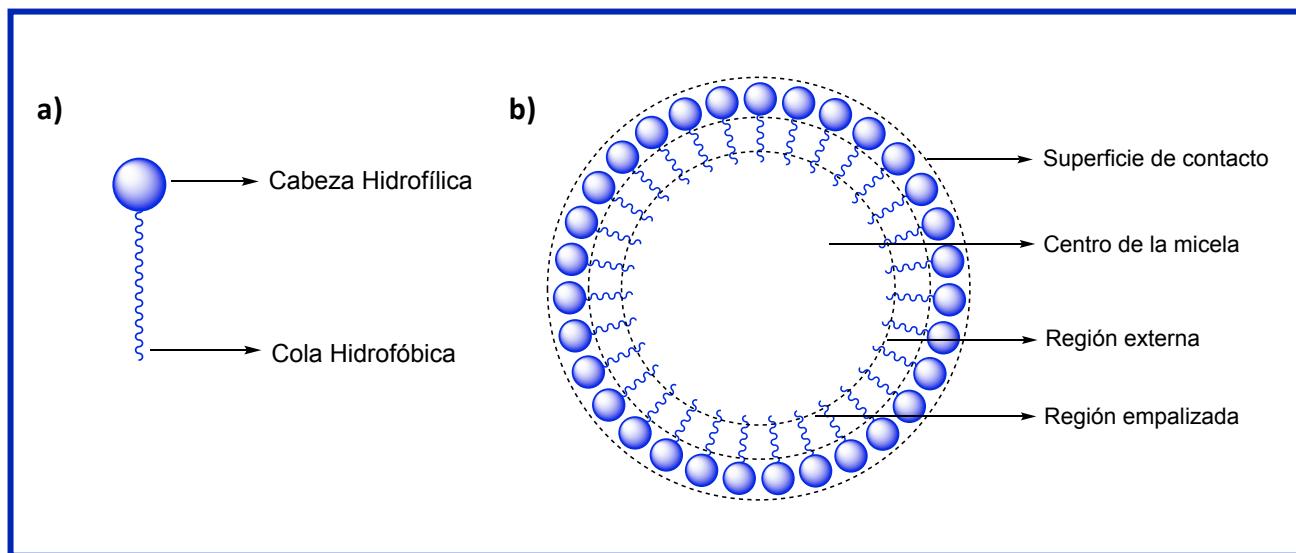


Figura 1. a) Componentes de una estructura anfifílica, b) Zonas de solubilización de un analito en una micela.

4.1 Solubilización micelar

Los compuestos tensoactivos se han utilizado en el proceso de extracción debido al aumento observado en la solubilidad de los compuestos ligeramente solubles en presencia de compuestos anfifílicos. La capacidad de absorción de las partículas de compuestos ligeramente solubles mediante agregados micelares recibe el nombre de "solubilización". Las regiones de las micelas aumentan el potencial para solubilizar solutos en una amplia variedad de polaridades. En las soluciones acuosas que contienen micelas, la solubilidad de muchos compuestos hidrofóbicos, o parcialmente solubles en agua (como los compuestos orgánicos iónicos y no iónicos) es considerablemente mayor que en la solución acuosa pura. Este proceso se produce mediante la formación de una microemulsión en soluciones acuosas de tensoactivos (un sistema macroscópicamente homogéneo que es microscópicamente heterogéneo). Los solutos hidrofóbicos se solubilizan en el núcleo micelar interior [13].

Asimismo, en las soluciones orgánicas, la presencia de micelas inversas provoca un aumento de la solubilidad de las sustancias hidrofílicas, como los aminoácidos o las proteínas. Los



compuestos solubilizados de carácter polar pueden estar localizados en el centro de la micela o pueden sufrir una absorción cerca de los grupos polares del tensoactivo o cerca de las cadenas hidrofóbicas de la micela. Los analitos polares se solubilizan en la región polar a través de interacciones electrostáticas. Los compuestos polares que se incorporan a la estructura de la micela se pueden difundir a través de las membranas semipermeables, y las soluciones creadas de este modo tienen un carácter isotrópico y son termodinámicamente estables. Los solutos anfifílicos se incorporan a las micelas mediante interacciones tanto hidrofóbicas como polares, formando agregados mixtos [14].

4.2 Extracción con coacervados

La estructura de los agregados micelares les da la capacidad de formar numerosos enlaces con las sustancias disueltas, por lo que las micelas se caracterizan por sus fuertes propiedades de solvatación en relación con diferentes compuestos. El proceso de extracción comienza cuando la solución de tensoactivo se introduce en la muestra en una cantidad que permite la formación de micelas (por encima del valor de la CMC). Tras la solubilización de los analitos en agregados micelares, se observa la creación de dos fases isotrópicas incompatibles e inmiscibles:

- Fase coactiva. Fase rica en tensoactivos con compuestos extraídos
- Fase pobre en tensoactivos. Fase llamada líquido de equilibrio o masa acuosa (una solución que está en equilibrio con la fase coactiva)

La separación de fases líquido-líquido es inducida por condiciones ambientales, como la temperatura, el pH y la adición de un electrolito o un disolvente miscible con el agua, en el que las macromoléculas se caracterizan por su baja solubilidad. Como resultado, los analitos se aíslan de la matriz de la muestra y se concentran en el pequeño volumen de la fase coactiva, que está lista para ser analizada [13].

El proceso de extracción a través de la extracción por punto de turbidez (CPT) consta de tres pasos:

1. Solubilización de analitos para agregados micelares. Compuestos presentes en la matriz original unidos a las micelas.
2. Enturbiamiento. Se produce un enturbiamiento o turbidez de la solución que se describe como punto de turbidez (CP), que resulta de la dispersión de la luz visible que pasa a través de la solución, y es la razón de la presencia de agregados micelares.
3. Separación de fases. Tras superar el límite de temperatura, conocido como temperatura del punto de turbidez (CPT), la solución se separa en dos fases.



El CPT es un valor característico de cada tensoactivo. Puede variar desde valores bajos hasta bastante altos dependiendo del tensoactivo utilizado (para los tensoactivos no iónicos la temperatura es más baja y para los tensoactivos zwitteriónicos más alta). El CPT depende de la concentración de la solución tensioactiva. Sin embargo, la presencia de aditivos como sales, álcalis, ácidos, polímeros, urea y otros tensoactivos, puede modificar los valores de CPT.

5. Disolventes supramoleculares: SUPRAS

Los disolventes supramoleculares (SUPRAS) son líquidos nanoestructurados producidos en suspensiones coloidales de anfífilos por fenómenos de autoensamblaje y coacervación. “SUPRAS” es un término reciente para referirse a los líquidos nanoestructurados generados a partir de anfífilos mediante un proceso de autoensamblaje secuencial que se produce a dos escalas: molecular y nano. Este proceso da al principio agregados tridimensionales que se coacervan, y en una segunda etapa produce líquidos inmiscibles en agua constituidos por grandes agregados supramoleculares dispersos en una fase continua.

Los disolventes supramoleculares se han utilizado durante muchos años en los procesos de extracción bajo diferentes nombres (por ejemplo, en la técnica del punto de turbidez para referirse a la temperatura a la que los tensoactivos no iónicos comienzan a sufrir separación de fases en soluciones acuosas, convirtiéndose así en enturbiantes, o coacervados para referirse al fenómeno por el que separación de fases líquido-líquido, es decir, la coacervación). El uso del término “disolventes supramoleculares” se expone **para poner mayor énfasis en su carácter de disolvente, para diferenciarlos de los disolventes moleculares e iónicos y considerar las interacciones no covalentes mediante las cuales las moléculas se mantienen unidas en el disolvente**, teniendo en cuenta los procesos de autoensamblaje por los que se forman [15].

El término disolvente supramolecular se introduce por primera vez en 2009 por Rubio *et al.* para designar a los líquidos inmiscibles en agua compuestos por conjuntos supramoleculares dispersos en una fase continua. Los disolventes moleculares a base de anfífilos (ASS) se producen a partir de soluciones anfifílicas mediante dos procesos de autoensamblaje bien definidos que ocurren a dos escalas: molecular y nano. En primer lugar, las moléculas anfifílicas forman espontáneamente agregados tridimensionales por encima de una concentración crítica de agregación, principalmente acuosos y micelas invertidas, y vesículas dependiendo de la estructura del anfífilo y de las propiedades del disolvente (Figura 2). Posteriormente, las nanoestructuras generadas se autoensamblan en agregados más grandes con un de tamaño en la magnitud nano y microescala por la acción de un estímulo ambiental, por ejemplo temperatura, electrolito, pH, disolvente, etc., y se separan de la solución de equilibrio por un mecanismo que sigue siendo sencillo. El fenómeno de separación de fases líquido-líquido, se produce en muchas soluciones coloidales que contienen proteínas, carbohidratos y polímeros, y se utiliza ampliamente para microencapsulación de ingredientes activos en productos farmacéuticos y alimentos [16].



Los disolventes supramoleculares son por definición incompatibles con el disolvente del que proceden, a pesar de que este disolvente es un componente principal de los ASS y constituye la fase continua en la que se dispersan los conjuntos supramoleculares. Asimismo, los disolventes supramoleculares son reversibles: las estructuras ordenadas se ensamblan mediante interacciones no covalentes y pueden disolverse en respuesta a factores ambientales externos, por lo que los ASS se comportan como materiales adaptativos.

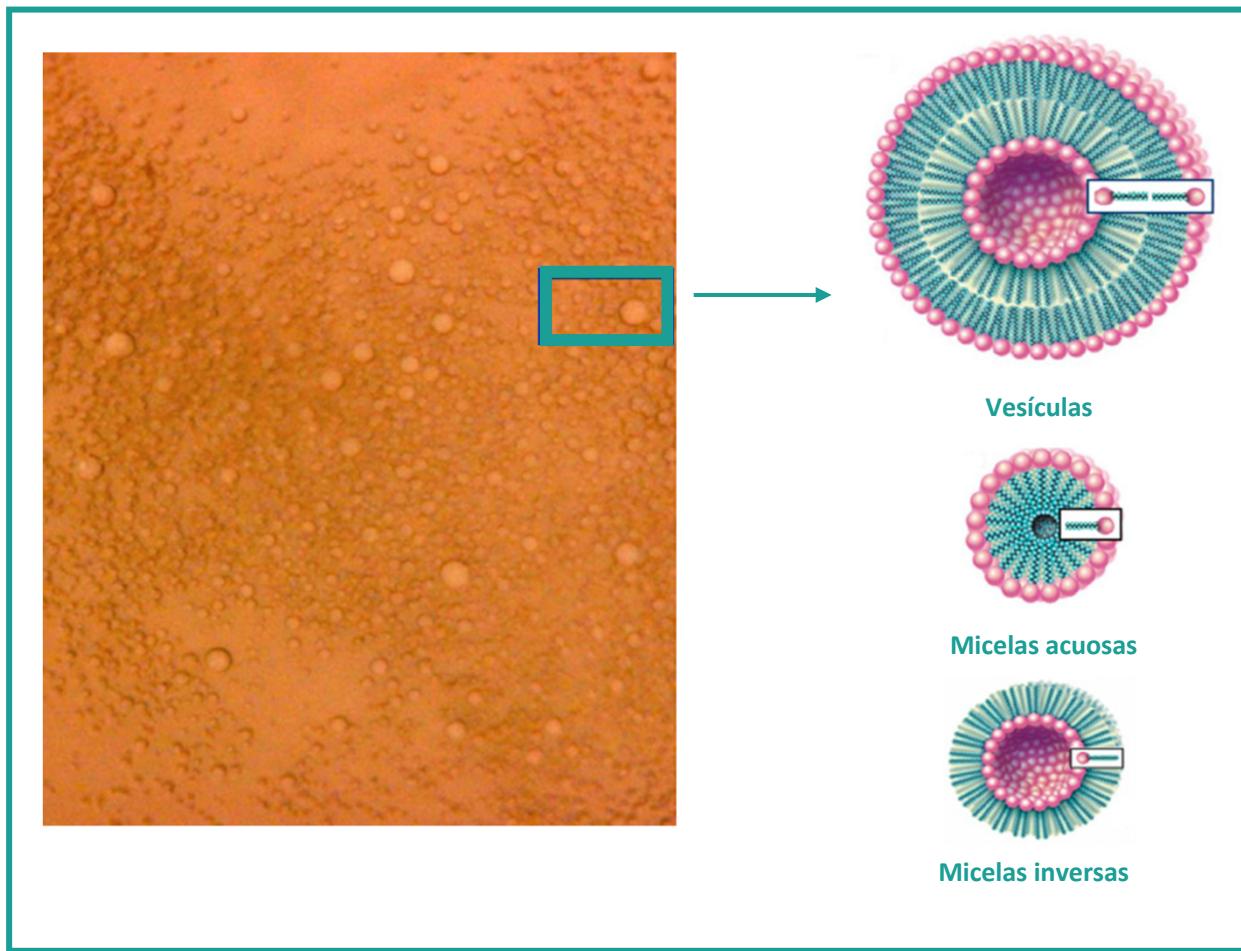


Figura 2. Micrografía de microscopía de luz (campo brillante) de un típico disolvente supramolecular basado en anfífilos, e imagen esquemática de los agregados que pueden constituirlo [16].



Las propiedades destacadas de los ASS para los procesos de extracción se derivan de la estructura y alta concentración de los agregados ordenados que los constituyen. Los ensamblajes supramoleculares tienen regiones de diferente polaridad que proporcionan una variedad de interacciones para los analitos. El tipo de interacción puede ajustarse variando el grupo hidrofóbico o el polar del anfífilo y, en teoría, podemos diseñar el ASS más apropiado para una aplicación específica porque los anfífilos están presentes en toda la naturaleza, así como su fácil síntesis. Una característica importante de los ASS es la alta concentración de anfífilos, y por tanto de sitios de unión, que contienen. Por lo tanto, se pueden conseguir altas eficiencias de extracción utilizando bajos volúmenes de ASS, lo que se traduce en altos factores de concentración.

El desarrollo de disolventes supramoleculares basados en micelas zwitteriónicas, catiónicas y aniónicas evitó los problemas de coelución causados por los tensoactivos no iónicos en LC y compatibilizaron los ASS con la MS, lo que permitió su aplicación a la extracción de contaminantes de lodos y suelos. Recientemente, los ASS formados por vesículas y micelas invertidas de ácidos alquilcarboxílicos han marcado un punto de inflexión con respecto al tipo de agregados que los constituyen, la variedad de interacciones que pueden establecer con los analitos y la alta concentración de anfífilos que contienen [16].

Los SUPRAS tienen una serie de propiedades fisicoquímicas únicas que los hacen muy atractivos para sustituir a los disolventes orgánicos en las extracciones analíticas. Las principales propiedades intrínsecas de estos disolventes son:

- Uso de procedimientos sintéticos basados en el autoensamblaje que están al alcance de todos.
- Ubicuidad de los anfífilos en la naturaleza y en la química sintética, que los hace fácilmente accesibles.
- Posibilidad de variar las propiedades de los disolventes variando el grupo hidrófobo o polar del anfífilo.
- Presencia de diferentes regiones de polaridad en los agregados supramoleculares que proporcionan excelentes propiedades de solvatación para una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos.
- No volatilidad y no flamabilidad de los agregados supramoleculares que permiten la implementación de procesos más seguros.



5.1 Procedimiento general para la formación de SUPRAS

La formación de SUPRAS a partir de una solución homogénea que contiene anfífilos se produce a través de tres procesos secuenciales de autoensamblaje, que ocurren respectivamente a nivel molecular y nanométrico (Figura 3 y Figura 4) [15]:

1. Autoensamblaje.

Los anfífilos dan lugar a agregados tridimensionales, principalmente micelas acuosas/inversas o vesículas, por encima de la concentración crítica de agregación. Se prepara una suspensión coloidal acuosa u orgánica del anfífilo por encima de la concentración crítica de agregación. Esta suspensión contiene agregados supramoleculares, normalmente micelas o vesículas acuosas o inversas. En este proceso los componentes aislados se organizan de forma autónoma y espontánea en estructuras ordenadas y/o funcionales. Se produce cuando los componentes interactúan entre sí mediante un equilibrio de interacciones atractivas y repulsivas. Estas interacciones son débiles y no covalentes (interacciones hidrofóbicas, y enlaces de hidrógeno), pero los enlaces covalentes relativamente débiles (enlaces de coordinación) se reconocen cada vez más como apropiados para el autoensamblaje.

2. Autoensamblaje de moléculas anfíflicas.

A continuación, estas nanoestructuras (micelas o vesículas) se autoensamblan en agregados más grandes que se separan de la solución coloidal como una nueva fase líquida (es decir, el disolvente supramolecular) mediante un fenómeno conocido como coacervación. La agregación de moléculas anfíflicas en una variedad de nanoestructuras es el primer proceso de autoensamblaje en la formación de disolventes supramoleculares. Los anfífilos se asocian espontáneamente para minimizar las interacciones solvofóbicas desfavorables. En la cac, se vuelve energéticamente favorable que los anfífilos interactúen entre sí. Así, las estructuras coloidales autoensambladas surgen de una delicada interacción entre las interacciones soluto-disolvente y soluto-soluto.

3. Autoensamblaje de agregados anfíflicos a escala nanométrica: separación de fases líquido-líquido.

Se modifican las condiciones ambientales de la suspensión coloidal mediante la acción de un agente inductor de la coacervación (por ejemplo, el pH, la temperatura, las sales inorgánicas y orgánicas o los disolventes pobres para el anfífilo) con el objetivo de aumentar el tamaño de los agregados supramoleculares. El crecimiento de los agregados a partir de los agregados anfíflicos de tamaño nanométrico previamente formados es el tercer proceso de autoensamblaje en la formación de disolventes supramoleculares. Este proceso no puede existir sin el anterior. El crecimiento de los agregados en este paso procederá hasta que se produzca una fase líquida separada y rica en anfífilos. El fenómeno de separación de la fase líquida, que suele producirse en las soluciones coloidales, se denomina coacervación.



Los SUPRAS son ricos en anfífilos e inmiscibles con el disolvente del que proceden, a pesar de que el disolvente es un componente principal de los SUPRAS y constituye la fase continua en la que se dispersan los conjuntos supramoleculares. La solución en equilibrio con el SUPRAS contiene monómeros de anfífilos a la concentración crítica de agregación.

Principios de autoensamblaje

El crecimiento de los agregados provoca la formación espontánea de gotas aceitosas (es decir, gotas de coacervado) que se asocian en conglomerados de gotas individuales. La densidad de estos conglomerados es diferente a la de la solución en la que se formaron, lo que hace que floculen o se sedimenten como una nueva fase líquida (SUPRAS), en la que las gotas de coacervado permanecen como entidades individuales. Los SUPRAS, la fase rica en coloides está en equilibrio con la solución inicial que contiene el anfífilo en la concentración crítica de agregación [17].

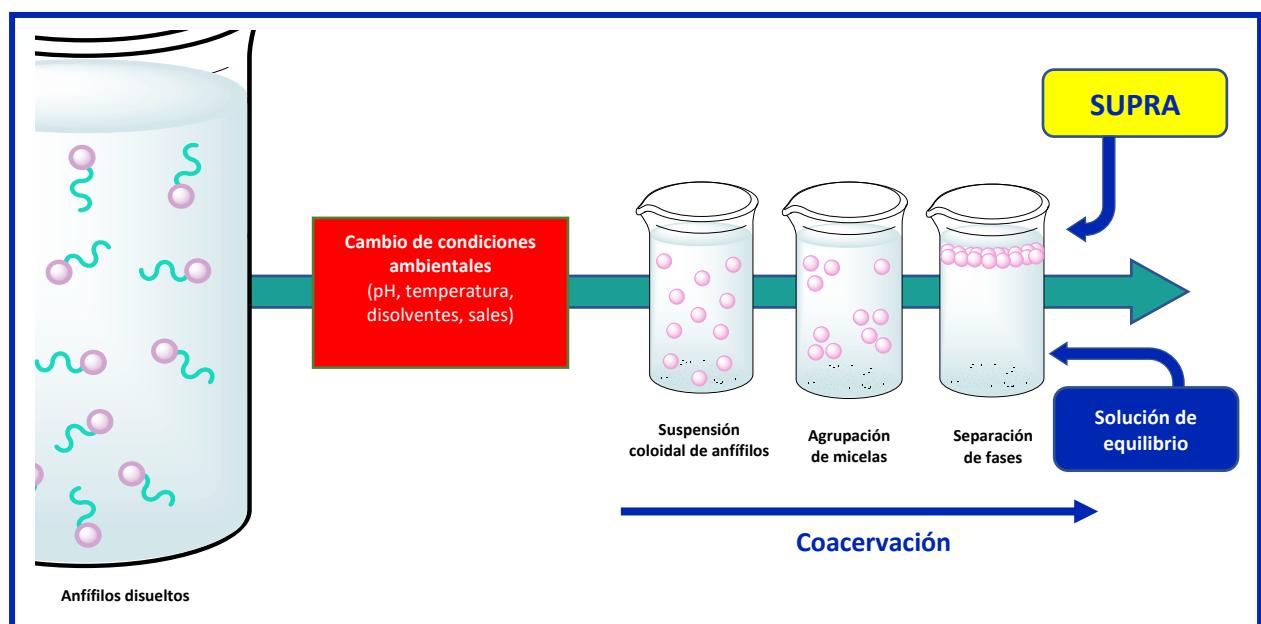


Figura 3. Esquema de un procedimiento general de producción de SUPRAS [17].

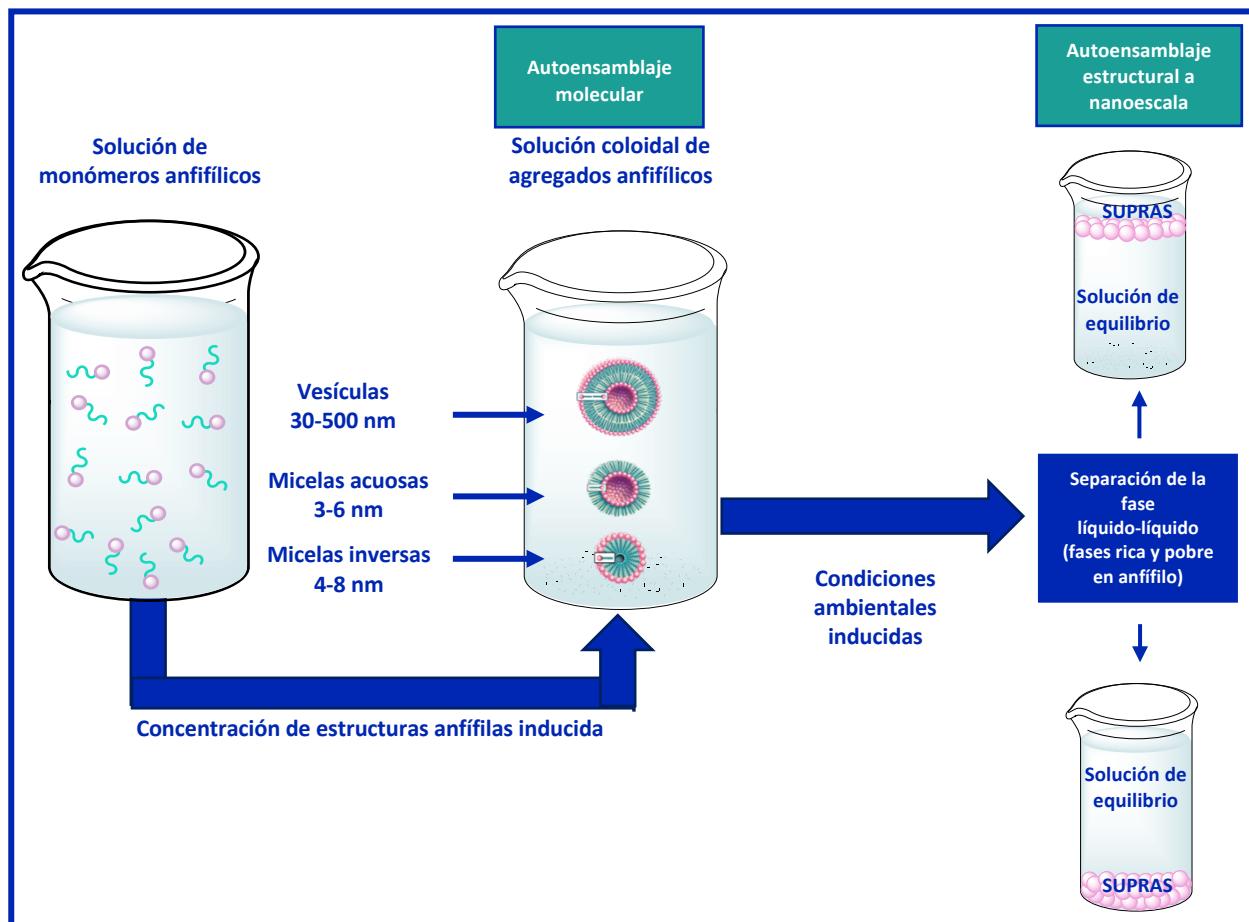


Figura 4. Proceso de autoensamblaje en la formación de un SUPRA [15].

En química analítica, el uso de fases ricas en coloides en los procesos de extracción fue propuesto por primera vez en 1978 por Watanabe *et al.* [18] para la extracción de iones inorgánicos y se acuñó el término técnica del punto de turbidez (CPT) para referirse a la temperatura a la que los tensoactivos no iónicos comienzan a sufrir la separación de fases en soluciones acuosas, enturbiándose.

La explicación habitual ofrecida para el fenómeno de solubilización sugiere que los compuestos solubilizados se incorporan a un entorno hidrocarbonado en el interior de las micelas. Esto lleva a considerar que estas especies se distribuyen entre una fase micelar y una fase acuosa masiva, desempeñando la fase micelar el mismo papel que el disolvente orgánico en la extracción líquido-líquido ordinaria. Por lo tanto, si las dos fases pueden separarse físicamente, debería ser posible concentrar los quelatos metálicos en un pequeño volumen de la fase micelar de forma similar a la extracción líquido-líquido.

Una solución micelar de un tensoactivo no iónico se separa en dos fases cuando se calienta por encima de una determinada temperatura, y se vuelve repentinamente turbia a una temperatura denominada punto de turbidez (CP). A una temperatura algo superior al punto de turbidez, y tras



un tiempo de equilibrio adecuado, la solución micelar se separa en dos fases distintas. La concentración del tensoactivo es mayor en una de estas fases que en la otra.

Watanabe *et al.* desarrollaron un método de extracción de zinc con 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN), basado en el hecho de que una solución micelar de un tensoactivo no iónico se separa en dos fases a partir de una determinada temperatura: punto de turbidez. Utilizaron como tensoactivo el polioxietileno nonil fenil éter, (PONPE-7.5; número medio de unidades de óxido de etileno 7.5). El punto de turbidez de una solución de PONPE-7.5 al 0.40 % es a 1 °C. y por tanto, la solución es turbia a temperatura ambiente. El quelato de zinc de PAN se extrajo con éxito de manera cuantitativa, de 50 g de la solución en un pequeño volumen (aproximadamente 1 mL) de la fase inferior (rica en tensoactivos) en el intervalo de pH = 8-11.5, midiendo la absorbancia a 535 nm [18] (Figura 5).

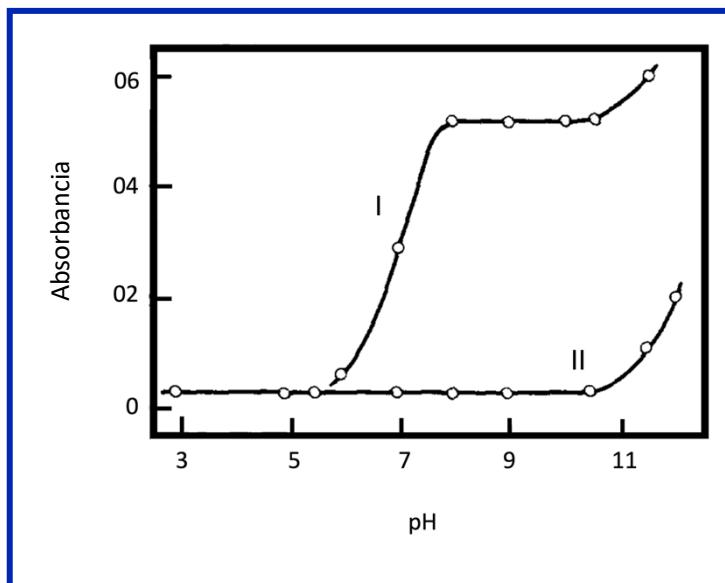


Figura 5. Influencia del pH en la absorbancia del quelato de zinc (I) y el blanco (II) a 535 nm [18].

Las fases ricas en coloides producidas mediante la coacervación han atraído durante mucho tiempo el interés de los científicos en diferentes áreas (por ejemplo en coloides, fisicoquímica, polímeros, etc.), pero su nanoestructura interna sigue siendo bastante difícil de determinar debido a la destrucción de los agregados cuando se someten a las condiciones experimentales necesarias para la determinación de la estructura (por ejemplo, mediante microscopía electrónica) [19].

La palabra “coacervado” proviene del latín *coacervare* que significa “ensamblarse juntos”. El término implica que una solución coloidal se separa en dos fases acuosas inmiscibles: una capa de coacervado rica en material coloidal, y el llamado líquido de equilibrio, que suele ser pobre en material coloidal. Por lo tanto, nos encontramos con una situación extraordinaria en la que



dos capas acuosas, una con hasta un 95 % de agua y la otra con un 99-100 % de agua, no se mezclan libremente.

En el año 2000, Menger *et al.* realizaron pruebas de disolución de gemini en agua (Figura 6), obteniendo como resultado que se separa rápidamente en forma de gotas aceitosas que a pesar del alto contenido de agua (83 % m/V), son inmiscibles con el agua. El examen por microscopía electrónica de barrido de alta resolución a temperatura criogénica de las gotitas mostró una estructura de "esponja" (Figura 7). Aunque ya se había propuesto para las fases de coacervados, nunca antes se había representado claramente una morfología de esponja. La ausencia de imágenes de coacervados por microscopía electrónica se atribuyó a los artefactos asociados a los métodos de microscopía electrónica de transmisión, a la fragilidad del coacervado frente a las perturbaciones físicas y a los posibles cambios de composición con mezclas complejas durante la preparación de la muestra. Al exponer el coacervado geminiano a un cizallamiento leve, la estructura de panal desapareció y fue sustituida por una fase laminar [19]

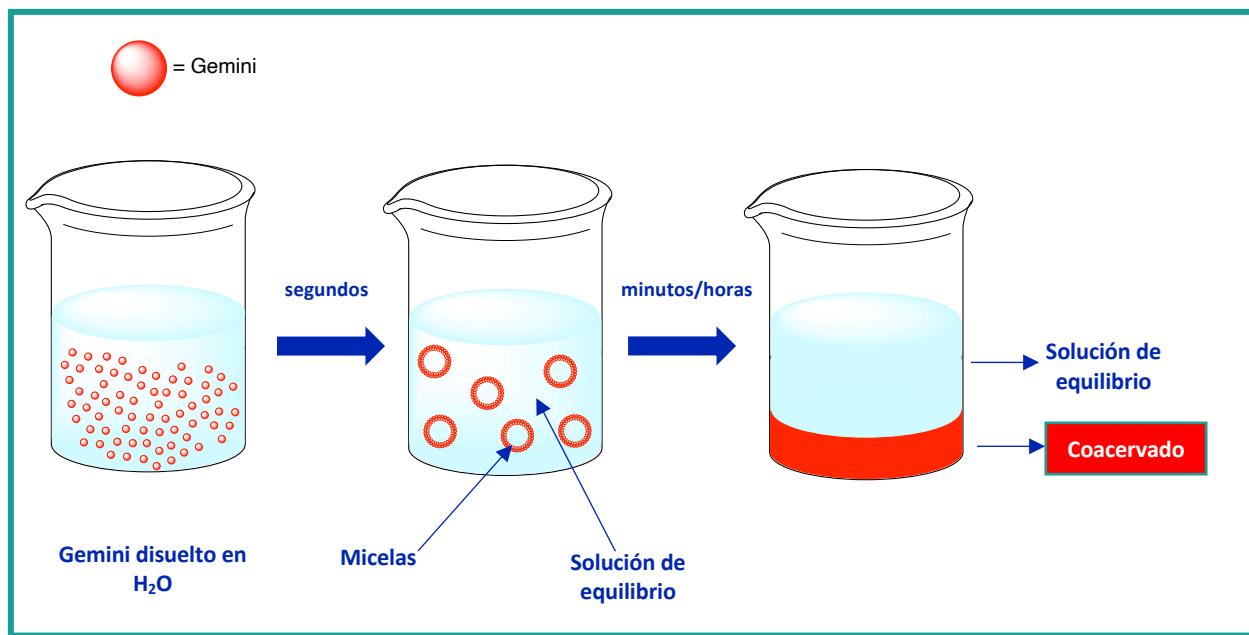


Figura 6. Representación esquemática de coacervación en un tensoactivo a base de gemini [19].

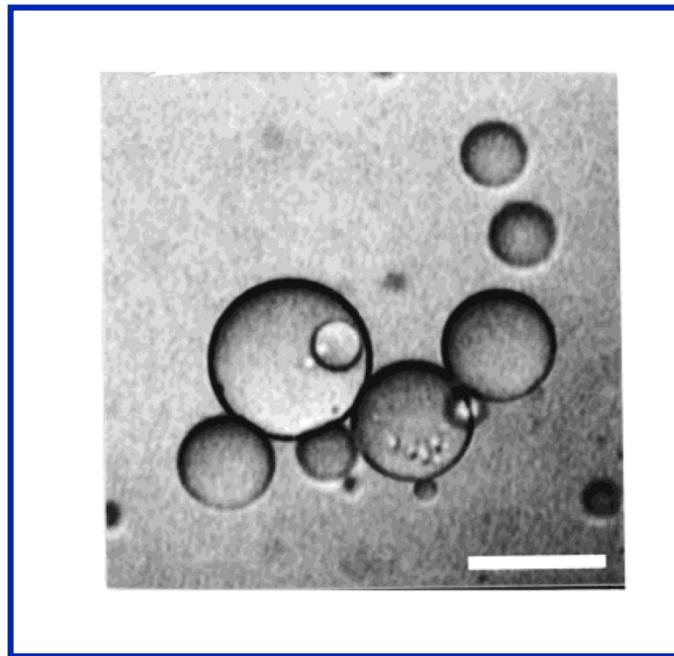


Figura 7. Micelas vistas a través de microscopía óptica [19].

La desagregación o reversibilidad de los anfífilos surge del carácter no covalente de las interacciones que componen los agregados supramoleculares. Los diferentes nombres acuñados para las fases ricas en coloides en la literatura científica (coacervado, fase L₃, fase anómala, fase esponja, fase Azul I, etc.) no han ayudado a la sistematización de los conocimientos en este ámbito.

Fue entonces cuando en 2009, Rubio *et al.* denominó a las fases ricas en coloides como disolventes supramoleculares con el objetivo de poner mayor énfasis en su carácter de disolvente, diferenciándolos de los disolventes moleculares y iónicos, y teniendo en cuenta los procesos de autoensamblaje mediante los que se forman.

Rubio *et al.* evaluaron los disolventes supramoleculares basados en anfífilos (ASS). El ASS seleccionado estaba formado por micelas invertidas de ácido decanoico dispersas en THF-agua y los contaminantes utilizados como modelo fueron el bisfenol A (BPA), la ocratoxina A (OTA) y el benzo(a)pireno (BaPy). Se investigó la influencia de los componentes de la matriz en la producción de disolventes extractores, las recuperaciones de la extracción y los factores de concentración reales utilizando alimentos comerciales como el vino y los productos a base de vino, la cerveza, los refrescos y las infusiones de té y café, y/o soluciones sintéticas acuosas que contenían componentes específicos de la matriz alimentaria. Los métodos desarrollados se aplicaron a la determinación de una variedad de alimentos comerciales (muestras de vinagre, mosto y cerveza) y exitosamente determinaron concentraciones que oscilaban entre 92 y 177 ng·L⁻¹, el BPA se cuantificó en muestras de té y café con concentraciones entre 1.5 y 16.6 ng·L⁻¹, en dos refrescos enlatados y se cuantificó en uno de ellos (bebida de té) con un nivel de 2.3 g·L⁻¹.



Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que los disolventes supramoleculares son una estrategia prometedora para simplificar el tratamiento de muestras en el análisis de alimentos líquidos. Los disolventes supramoleculares se producen *in situ* mediante procesos de autoensamblaje que están al alcance de todos. Asimismo, los procedimientos de extracción son sencillos y no requieren equipos especiales de laboratorio. La alta concentración de ácido decanoico en la fase extractora ($0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ aproximadamente) y, principalmente la capacidad de solubilización de analitos de las nanoestructuras formadas permite la partición favorable de analitos utilizando un volumen bastante bajo de disolvente supramolecular ($100\text{-}150 \mu\text{L}$ para 15 mL de muestra en la anterior aplicación). En consecuencia, los factores de concentración reales se encuentran en el intervalo de 65 a 141, y se obtienen fácilmente utilizando una extracción de un solo paso y sin necesidad de evaporar el disolvente. Una ventaja valiosa de esta estrategia es que los principales componentes de la matriz en los alimentos líquidos (por ejemplo, las proteínas) no se disuelven en la fase extractiva: floculan y permanecen como un precipitado en el fondo del disolvente supramolecular. Así, los extractos crudos pueden inyectarse directamente en el sistema cromatográfico [16] (Figura 8 y Figura 9).

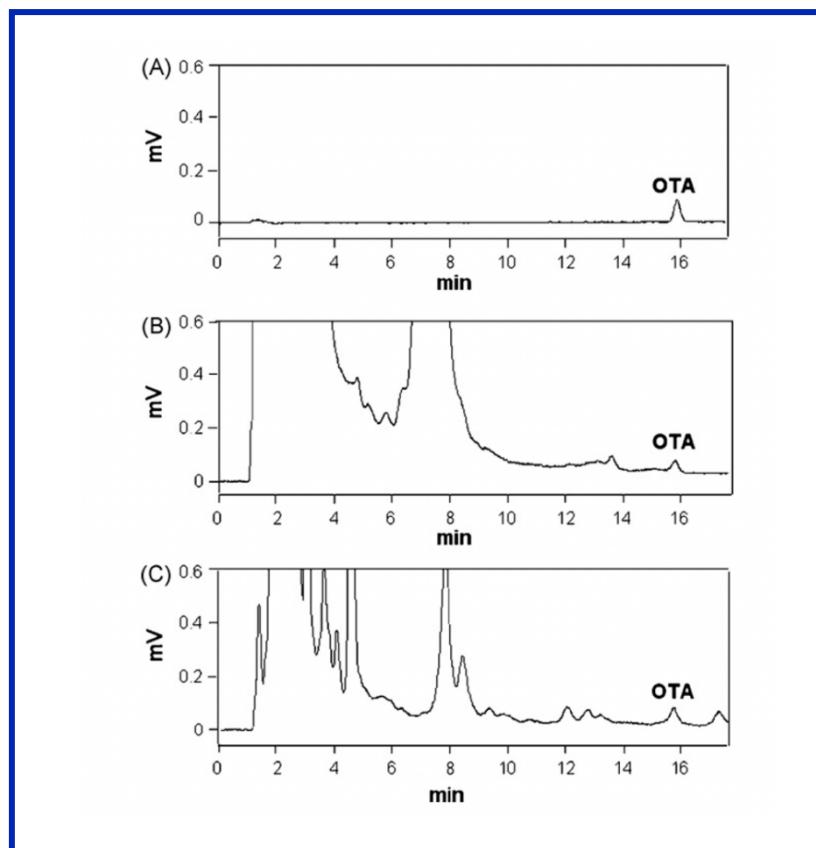


Figura 8. Cromatogramas de LC/fluorescencia obtenidos de (A) OTA ($20 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en metanol y dos muestras contaminadas: (B) mosto de vino blanco ($177 \text{ n}\cdot\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y (C) vinagre ($92 \text{ n}\cdot\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [16].

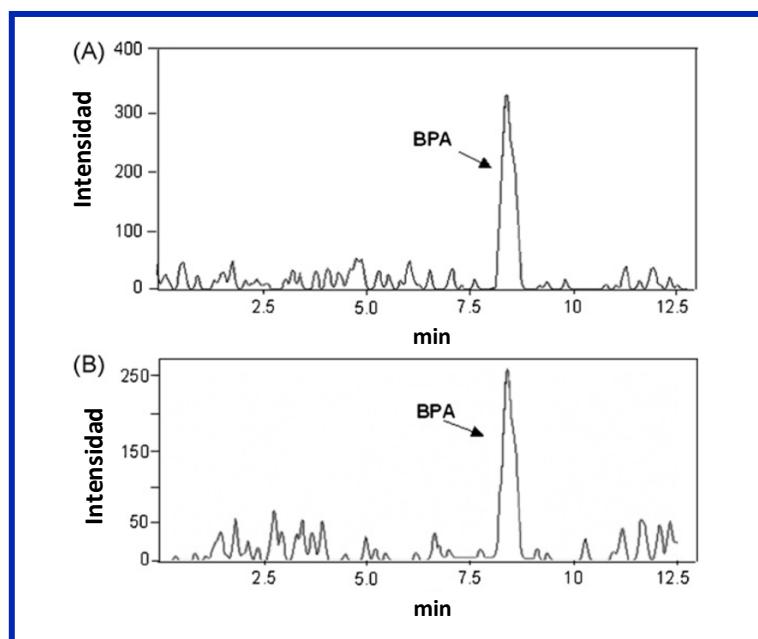


Figura 9. Cromatograma de iones extraídos LC/MS2 obtenido de (A) BPA ($300 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) en acetonitrilo y (B) un refresco de té contaminado con BPA ($2.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) [16].



5.2 Mecanismo de formación de un SUPRA

El aumento del tamaño de los agregados que componen la suspensión coloidal es de suma importancia para obtener el coacervado. En general, la agregación de los anfífilos es un proceso de agregación y estabilización que se produce a través de un equilibrio de interacciones atractivas y repulsivas entre anfífilo-disolvente y anfífilo-anfífilo. En el caso de los anfífilos típicos, la solvofobicidad favorece la agregación, mientras que las repulsiones entre los grupos en la cabeza de las estructuras son la causa principal de la estabilización. Por lo tanto, para obtener coacervados, hay que reducir las repulsiones entre los grupos de cabeza y las micelas presentes en la suspensión coloidal.

Existen dos mecanismos básicos para el crecimiento de agregados, dependiendo del carácter iónico o neutro del grupo de cabeza del anfífilo. En los sistemas iónicos, una forma eficaz de reducir la repulsión entre los grupos en la cabeza de la estructura es la neutralización de la carga, que puede conseguirse añadiendo sales inorgánicas u orgánicas o contraiones anfifílicos. En el caso de los anfífilos ionizables, la cocervación también puede promoverse en medios ácidos, a concentraciones de ácido superiores a las requeridas para su neutralización.

En 1999, Casero *et al.* lograron la separación de fases líquido-líquido inducida por un ácido de los tensoactivos aniónicos en soluciones acuosas, y estudiaron su aplicabilidad a la metodología de Extracción por Punto de Turbidez (CPE). Los diagramas de fase obtenidos ($[HCl]$ vs [tensoactivo]) consistían en tres regiones: una región líquida homogénea dos fases isotrópicas coexistentes y una región sólida, donde la amplitud de cada región depende de la estructura del tensoactivo. También se examinó el comportamiento de cada fase en relación con la temperatura y las sales añadidas. Los tensoactivos aniónicos investigados fueron el dodecilsulfato de sodio (SDS), ácido dodecilbencensulfónico (SDBSA) ácido dodecansulfónico (SDSA) y ácido dioctilsulfosuccinato de sodio (Aerosol OT). El uso de tensoactivos aniónicos proporcionó eficacias de extracción muy altas (80-100%) para el pireno en muestras acuosas y varios Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en un material de referencia certificado. El factor de preconcentración se encontró en función de las concentraciones de tensoactivos y de las concentraciones de ácido [17].

En lo que respecta a los anfífilos no iónicos, la forma más eficaz de promover la coacervación es reducir el número de moléculas de disolvente disponibles para la solvatación de los grupos de cabeza, lo que puede lograrse aumentando la temperatura [20] o añadiendo un disolvente pobre para el agregado coloidal que sea miscible con el disolvente de solvatación [21]:

1. Aumento de la temperatura: la temperatura a la que se produce la separación de fases es una función de la concentración de los tensoactivos. En 1993 Hinze definió un gráfico de temperatura frente a la concentración de tensoactivos una curva que separa la región monofásica (L) de la región bifásica (2L). Estas curvas de coexistencia presentan un mínimo, denominado punto crítico. La temperatura y la concentración del tensoactivo a las que se produce el mínimo se denominan temperatura y concentración críticas.



La Figura 10 muestra un diagrama de fase de solución de PONPE-7.5, que ha sido uno de los sistemas micelares de tensoactivos no iónicos más utilizados en los procedimientos de CPE [20].

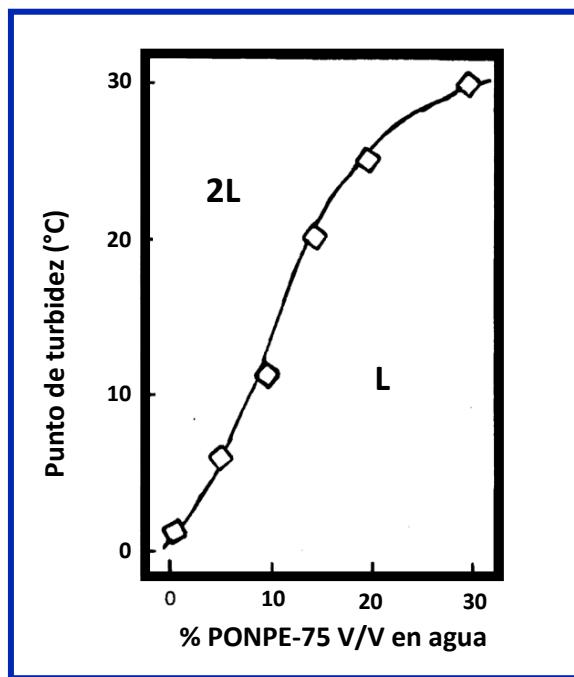


Figura 10. Variación de la temperatura en el punto de turbidez de las soluciones del tensoactivo no iónico PONPE-7.5 en función de la concentración de tensoactivo. “L” denota la región de la fase anfifílica única de la solución y “2L” indica la presencia de dos fases isotrópicas coexistentes [20].

2. Adición de un disolvente pobre: En el 2007, Javier-Ruiz *et al.* describieron por primera vez coacervados formados por micelas inversas de ácidos alcanoicos (C_8-C_{16}) y alquenoicos (C_{18}) [21], y se examinó su potencial para la extracción de compuestos orgánicos previo a LC. El proceso de coacervación se produjo en mezclas binarias miscibles de agua y una variedad de disolventes prócticos y apróticos, los cuales son la fase del coacervado que son inmiscibles con la solución acuosa de equilibrio pobre en coloides de la que se separa. Se comprobó que el comportamiento de fase de los ácidos alquilcarboxílicos era una función tanto del parámetro de solubilidad de Hildebrand (δ), como de la capacidad de generar interacciones de puente de hidrógeno del disolvente propio. Los mejores disolventes para las extracciones analíticas fueron los que presentaban los valores δ más bajos. Se investigó el comportamiento de fase de los sistemas ternarios de ácido alquilcarboxílico/agua/THF en función de la concentración de los componentes, el pH, la fuerza iónica y la temperatura. La eficacia y el tiempo necesarios para la separación de fases dependieron del procedimiento experimental utilizado (es decir, la permanencia, la centrifugación, la agitación y la sonicación). La formación de micelas inversas de ácidos alquilcarboxílicos en THF se comprobó mediante sondas fluorescentes hidrofílicas y mediciones de luz dispersa [21].



Con el aumento de la temperatura o la eliminación de algunas moléculas de disolvente se provoca la reducción del área de contacto por grupo de cabeza y la contracción con las micelas vecinas. En el 2007, Glatter *et al.* informaron una serie de experimentos sobre la estructura de sistemas binarios de tensoactivos no iónicos [22]. El análisis ofrece una imagen clara de la dependencia de la temperatura de las soluciones acuosas de tensoactivos no iónicos del tipo *n*-alquil poliglicol éter al acercarse a la curva del punto de turbidez. Se estudiaron seis tensoactivos diferentes, cambiando la longitud de la cadena alquílica, así como el número de grupos de óxido de etileno. El resultado es que todos los sistemas examinados muestran una transición de esfera a varilla, cuyo grado de crecimiento y temperatura de transición dependen de la concentración y la hidrofobicidad del tensoactivo. A esta transición se superpone la aparición de interacciones electrostáticas de atracción a medida que se aproxima la curva del punto de turbidez, cuyo rango depende del tamaño total del tensoactivo, lo que finalmente desencadena la formación de SUPRAS [22]. En el segundo caso, con la adición de un disolvente pobre, la competencia por el disolvente de solvatación sólo favorecerá la interacción anfífilo-anfífilo.

En el caso de las micelas no iónicas con grupos de cabeza zwitteriónicos, se producen SUPRAS a medida que la temperatura disminuye por debajo de un valor crítico [23]. En 1991 Saitoh esquematizó el comportamiento del octilglucósido con dos tensoactivos zwitteriónicos (Figura 11), mostrando la dependencia del punto de turbidez en función de la composición para un sistema mixto de tensoactivos zwitteriónicos y no iónicos. A medida que aumentó la proporción de concentración del tensoactivo no iónico disminuyó la temperatura del punto de turbidez de las soluciones de tensoactivos zwitteriónicos. Así, la temperatura necesaria para la separación de fases puede controlarse de forma predecible mediante cambios adecuados en la concentración o la proporción de los tensoactivos zwitteriónicos y no iónicos. Este comportamiento inesperado puede explicarse entendiendo que aunque se supone que las interacciones electrostáticas participan en las interacciones intra e interagregadas, son de corto alcance y sus efectos son cualitativamente diferentes de los tensoactivos iónicos.

Las condiciones experimentales para la formación de SUPRAS pueden delimitarse fácilmente estudiando los diagramas de fase del anfífilo en función del agente inductor de la coacervación [15]. En 2016, Salatti-Dorado *et al.* estudiaron los límites de estos diagramas de fase y su dependencia con la estructura de los componentes anfifílicos y de la matriz en la muestra [16 y 24]. A modo de ejemplo, la Figura 11a muestra el diagrama de fases obtenido para la coacervación de una suspensión coloidal de micelas inversas de hexanol en THF utilizando agua como disolvente pobre para el anfífilo y agente inductor de la coacervación. La coacervación del hexanol también se produce en la orina (Figura 11b) debido al alto contenido de agua de esta matriz biológica (aproximadamente el 95%), por lo que los SUPRAS pueden sintetizarse en la muestra. En este caso, la región para la formación de SUPRAS se hace más amplia en la presencia de los componentes de la matriz de la orina [24].

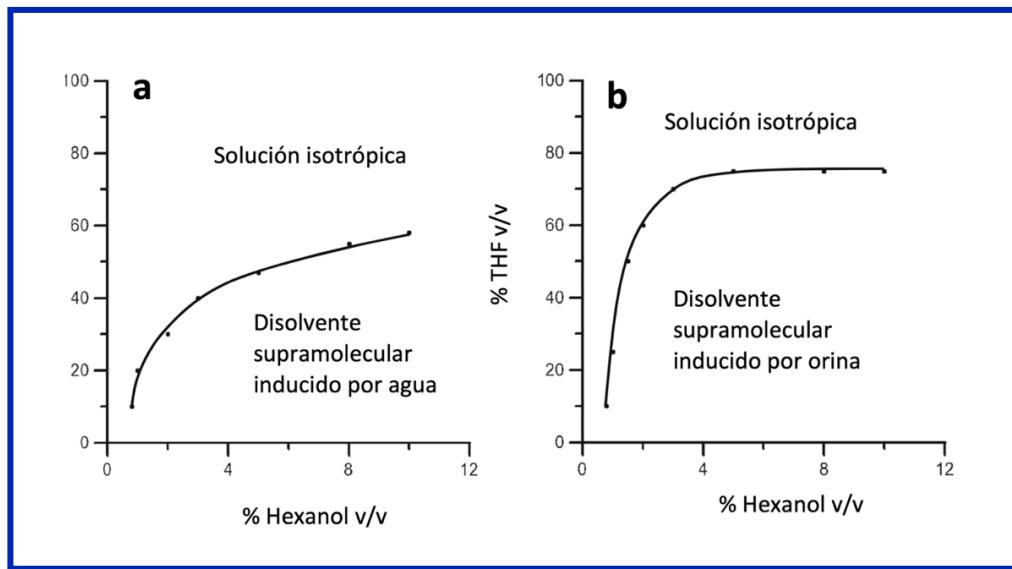


Figura 11. Diagramas de fase para SUPRAS sintetizados en mezclas ternarias de a) hexanol-THF-agua y b) hexanol-THF-orina [24].

Propiedades relevantes de los SUPRAS en el tratamiento de muestras

Los SUPRAS tienen características únicas que se derivan del carácter nanoestructurado y reversible de los agregados que los componen. Estas características aportan propiedades extraordinarias para la extracción de analitos en los SUPRAS [12]. En cuanto a la extracción, los SUPRAS ofrecen [15 y 20]:

- Microentornos de polaridad diferentes en los que se pueden solubilizar simultáneamente solutos que abarcan amplios rangos de polaridad. Así, a diferencia de los disolventes convencionales, los SUPRAS tienen la capacidad de extraer sustancias mediante mecanismos mixtos (por ejemplo, puente de hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, enlaces iónicos, etc. en la región polar y en la no polar).
- Múltiples sitios de unión debido a la enorme concentración de anfífilos en el SUPRA. Los solutos pueden extraerse con una baja relación SUPRA/muestra, aumentando la sensibilidad y evitando la evaporación de los extractos, lo que genera un ahorro de tiempo y costos.
- Gran superficie de contacto, ya que las gotas de coacervado se reúnen como entidades individuales en el SUPRA, por lo que se puede obtener una rápida transferencia de masa de soluto en los procesos de extracción.



En cuanto a las características operativas, cabe destacar las siguientes:

- Los extractos del SUPRA son compatibles con LC-MS y GG-MS.
- Los procedimientos y operaciones de extracción son similares a los que se siguen en la extracción convencional con disolventes (LLE y SLE), por lo que no se requiere ninguna inversión adicional en equipos para desarrollar este enfoque.
- Los SUPRAS se producen directamente en las muestras con sólo añadir el anfífilo y establecer las condiciones de coacervación, por lo que su síntesis es sencilla.
- El proceso es sostenible debido a los procedimientos sintéticos sin energía a través de los que se obtienen los SUPRAS y a la amplia disponibilidad de anfífilos verdes a bajo costo.

5.3 Avances de los SUPRAS en la preparación de muestras para su análisis

Aunque aún queda mucho por hacer, en los últimos años se han producido avances gigantescos en la aplicación de los SUPRAS a la extracción de compuestos orgánicos previa a la cromatografía. Aquí no centramos en siete áreas de investigación, ya que los avances en estas áreas han permitido establecer los fundamentos de las extracciones basadas en SUPRAS, han hecho posible considerar los SUPRAS como una alternativa a los disolventes orgánicos en el análisis cromatográfico y han logrado el desarrollo de tratamientos innovadores de muestras y únicos no realizables por la extracción convencional con disolventes. Esta discusión no pretende ser exhaustiva, sino dar parámetros clave que ayuden a entender la evolución de los SUPRAS en la cromatografía.



5.3.1 Mejora la compatibilidad con LC

Desde el principio, los extractos de SUPRAS que contienen los analitos se han inyectado directamente en el sistema LC. Sólo en el caso de los SUPRAS muy viscosos los extractos se han diluido previamente con un disolvente orgánico (por ejemplo, metanol o acetonitrilo). La gran mayoría de las aplicaciones implican el uso de LC de fase reversa [25]. En este caso, a medida que el SUPRA entra en el sistema cromatográfico, las nanoestructuras se desensamblan en la fase móvil hidroorgánica y producen monómeros tensoactivos que normalmente no influyen en el comportamiento cromatográfico de los solutos (Figura 3). Sin embargo, en el caso de las fases móviles que contienen una alta proporción de agua, los agregados supramoleculares pueden desensamblarse lentamente a través del sistema cromatográfico dando micelas, vesículas, etc. en un primer paso (Figura 3) que ofrece una fase en formación a los solutos donde pueden distribuirse. La introducción de un mecanismo adicional de retención puede beneficiar la separación del analito. Sin embargo, puede ser perjudicial para la resolución y el extracto debe diluirse con un disolvente orgánico antes de la inyección en el cromatógrafo.

En cuanto a los sistemas de detección, los SUPRAS se han aplicado en LC acoplados a la detección por UV-visible, fluorescencia y espectrometría de masas. La evolución en este campo ha dependido en gran medida de la estructura y las propiedades fisicoquímicas del tensoactivo que compone el SUPRA.

Las primeras aplicaciones de los SUPRAS en LC se basaron en la coacervación inducida por la temperatura de los tensoactivos no iónicos pertenecientes a las series Tritón X (éteres de polioxietileno(*n*)*tert*-octilfenilo) y PONPE (éteres de polioxietileno(*n*)nonilfenilo), utilizando detectores de UV-visible en 2009 por Santaland *et al.* [26] y de fluorescencia en 1996 por Ferrer *et al.* [27]. Estos tensoactivos proporcionan un gran número de picos cromatográficos y altas señales de absorbancia y fluorescencia, por lo que no son una buena opción para la separación y detección de compuestos polares o medio polares. Por lo tanto, las aplicaciones se limitan a la determinación de unos pocos analitos compatibles con las características de absorción o fluorescencia del tensoactivo.

El uso de tensoactivos zwitteriónicos no aromáticos como el sulfato de alquilamonio [23], o de tensoactivos iónicos, como los alquilsulfatos y los sulfonatos [17] (que se caracterizan por sus bajos tiempos de retención) no absorben por encima de 210 nm y están disponibles comercialmente como compuestos puros, evitando el problema de la compatibilidad con las características de absorción y ampliando el ámbito de aplicación de los SUPRAS.

Yu *et al.* demostraron en 2005 la aplicación del método CPE basado en ácido con micelas de dodecilsulfato de sodio (SDS) en combinación con la determinación fluorimétrica de acenafteno, antraceno, benz[a]antraceno, benz[a]pireno, criseno, dibenz[a,h]antraceno, fenantreno y pireno. Se demostró entonces que el SDS en presencia de HCl 4-7 M formaba una fase clara y homogénea adecuada para la medición directa de la fluorescencia, encontrando que la dependencia de los límites de detección de la intensidad de fluorescencia permite determinar



los HAP con alta fluorescencia en presencia de aquellos que tienen intensidades de fluorescencia débiles (tensoactivos zwitteriónicos) con una desviación estándar relativa inferior al 3 % [28].

En la actualidad, se han desarrollado un gran número de aplicaciones interesantes en combinación con la detección LC-UV: por ejemplo la determinación de los residuos del insecticida Etofenprox en muestras ambientales propuesto en 2005 por Jia *et al.* [29], donde se evaluó la CPE de tensoactivos aniónicos para el aislamiento de Etofenprox antes de la HPLC utilizando SDS en HCl 12 mol·L⁻¹; la determinación de meloxicam en suero humano por CPE en 2008 por Zhang *et al.* se extrajo con Tritón X-114 en presencia de HCl 1 mol·L⁻¹ y NaCl [29 y 30] y LC-fluorescencia; y la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos prioritarios en aguas superficiales y residuales, determinados en 2008 por Ballesteros-Gómez *et al.* a través de CPE con THF y ácido decanoico [31]; así como García-Prieto *et al.* proponen en 2008 el uso de coacervados formados por micelas inversas para la microextracción de bisfenol A (BPA) urinario con la adición de ácido decanoico y tetrahidrofurano [32]. La Figura 12 muestra un esquema del proceso de CPE para matrices complejas.

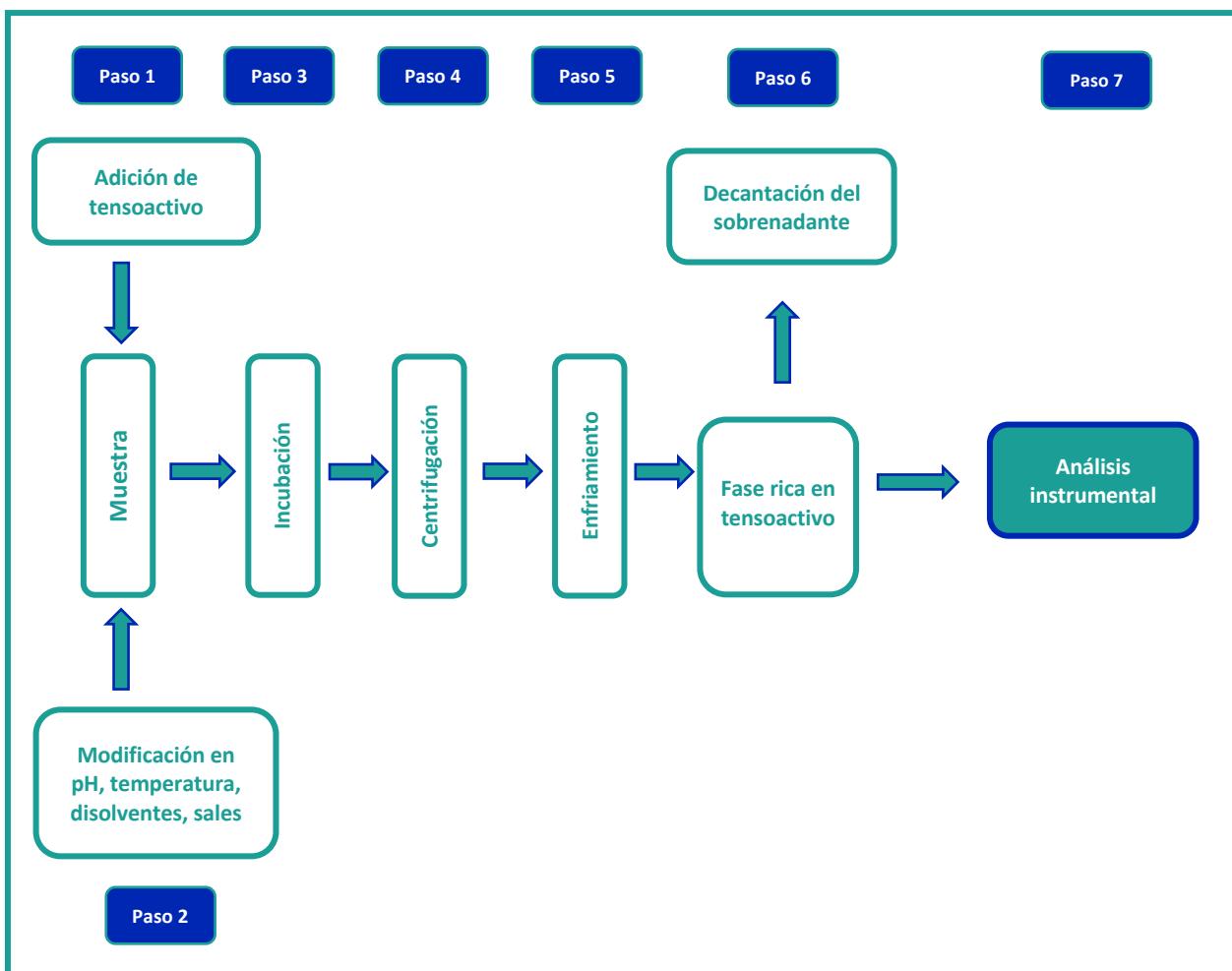


Figura 12. Diagrama esquemático del sistema de la CPE para analitos de matrices complejas.



Sin embargo, el desarrollo más importante en este ámbito ha sido el uso de SUPRAS en combinación con LC acoplada a espectrometría de masas. Por regla general, los tensoactivos se dirigen automáticamente a los residuos después de la separación cromatográfica (es decir, sólo se detectan los componentes de la muestra) para evitar la contaminación de la fuente de iones y/o la pérdida de la eficiencia de ionización y la sensibilidad del detector. De esta manera, los tensoactivos que componen el SUPRA se tratan de forma similar a los componentes de la matriz.

En 2018, Zong *et al.* propusieron un disolvente supramolecular de alta densidad a base de ácido carboxílico hexafluoroisopropanol (HFIP) y se combinó con la microextracción líquida dispersiva (DLLME) para la extracción y preconcentración de hormonas sexuales esteroideas en orina humana antes de su análisis por HPLC-MS/MS. El ácido octanoico se utilizó como agente de extracción y el HFIP como importante donante de puentes de hidrógeno y alta hidrofobicidad, se utilizó como agente dispersante de la DLLME, así como agente inductor de la coacervación y agente regulador de la densidad del ácido octanoico. Las recuperaciones oscilaron entre el 82.7-120.2 %, y las desviaciones estándar relativas fueron inferiores al 15 %. Los efectos de la matriz mostraron que no había interferencias de la matriz de la orina con la detección de MS, lo que se debió principalmente a la propiedad de acceso restringido del SUPRA de HFIP-ácido octanoico con agregados de micelas inversas. El novedoso método de DLLME basado en SUPRAS propuesto por Zong *et al.* se logró aplicar para la determinación de hormonas diana en orina real [33].

En 2019, Dueñas-Mas *et al.* desarrollaron un estudio para la microextracción de BPA con SUPRAS. El BPA está presente en una gran variedad de materiales y es un conocido disruptor endocrino en ambientes interiores y exteriores. Mediante este método, los sustitutos emergentes del BPA (BPS-MAE, D-8 y TGSA) se detectaron a concentraciones medias en el rango de 6-22 ng·g⁻¹. Estos resultados constituyen una primera visión de la migración de los sustitutos emergentes del BPA al medio ambiente a través del polvo de interiores, que es una vía común de exposición humana a los contaminantes [34].

Ese mismo año, Koolivand *et al.* informaron la utilización del hexafluoroisopropanol (HFIP) para inducir la coacervación de los componentes lipídicos de las membranas celulares naturales que daría lugar a la solubilización, extracción y enriquecimiento de las proteínas en la fase de coacervado, y a la extracción de las proteínas hidrofílicas en una fase acuosa separada. La mayoría de las proteínas integrales de membrana (las proteínas implicadas en procesos metabólicos y las proteínas responsables de la unión de iones o fármacos) se identificaron en la fase coacervada. El proceso de coacervación de lípidos naturales resulta ser fácil y rápido, sin detergentes, y aumentó el número de proteínas identificadas en un 8 % (frente al experimento de separación sin fase). La identificación de todas las PEI y de las PEI de los orgánulos mejoró en un 13% y un 29%, respectivamente. Además, se identificaron un 25 % más de proteínas de baja abundancia [35].

Caballo *et al.* realizaron en 2015 una investigación que aborda por primera vez el análisis enantioselectivo de los antiinflamatorios no esteroideos ibuprofeno, naproxeno y ketoprofeno



en peces de agua dulce. El método se basó en la microextracción de los medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINE) del músculo de los peces con un líquido supramolecular formado por agregados hexagonales invertidos de ácido decanoico, su separación enantiomérica por LC en una fase estacionaria de (*R*)-1-naftilglicina y ácido 3,5-dinitrobenzoico y su cuantificación por LC/MS. Los LOQ para los enantiómeros de los AINE estaban en el rango de 1.7-3.3 ng·g⁻¹. Las recuperaciones absolutas oscilaron entre el 97-104 %, lo que indica la gran eficacia de extracción del disolvente supramolecular. Las desviaciones estándar relativas de los enantiómeros en el músculo de pescado fueron siempre inferiores al 6 % [36] A continuación, la Figura 13 muestra la relación entre la fase móvil y la coacervación en un sistema cromatográfico de líquidos.

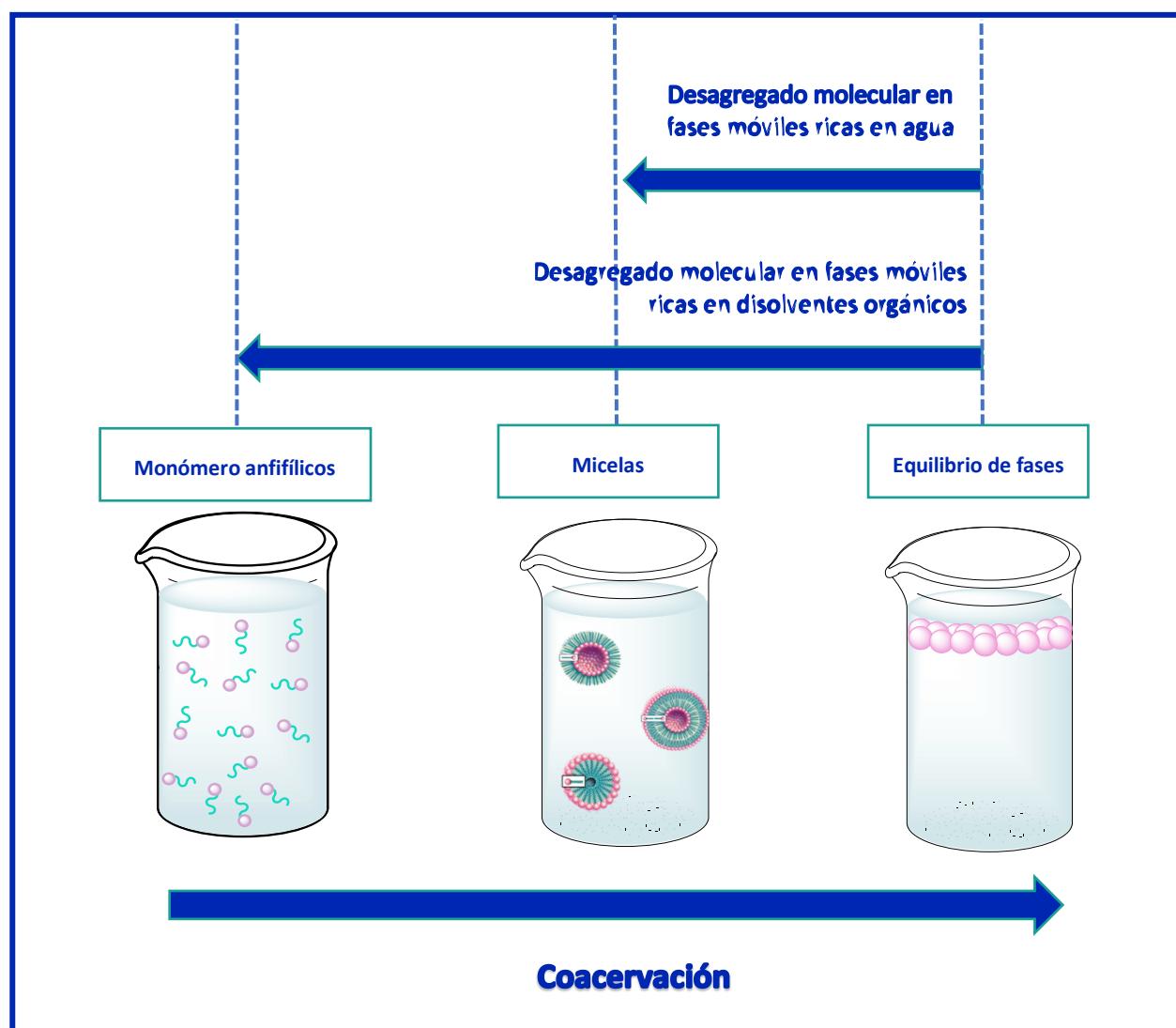


Figura 13. Esquema de los fenómenos que intervienen en el sistema cromatográfico en función de la composición de la fase móvil [37].



5.3.2 Mejora en la compatibilidad GC

La combinación de SUPRAS con GC no ha sido sencilla debido a la baja volatilidad de los tensoactivos y a la naturaleza viscosa del SUPRAS que puede bloquear la columna capilar. Las principales estrategias propuestas para hacerlas compatibles se han centrado en la eliminación del tensoactivo antes del análisis cromatográfico. Para ello, la retroextracción de analitos asistida por microondas o ultrasonidos mediante disolventes inmiscibles en agua ha sido el enfoque más utilizado [38].

Sikalos informó en 2005 un estudio sobre la CPE de los tensoactivos no iónicos y aniónicos aplicado como paso de preconcentración antes de la cromatografía de gases. La fase rica en tensoactivos obtenida se trató con disolventes inmiscibles en agua, y los analitos objetivo se volvieron a extraer mediante la aplicación de microondas a corto plazo o mediante ultrasonidos. Se utilizó una mezcla de seis hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAP) como compuestos de prueba como se muestra en la Figura 14. Las recuperaciones de las muestras de agua y suelo enriquecidas oscilaron entre el 92-105%, mientras que el análisis de los materiales de referencia certificados dio resultados que coincidían con los valores certificados. En las condiciones experimentales óptimas, no se produjeron interferencias ni se bloqueó la columna. Este enfoque presenta una solución conveniente al problema actual de combinar la cromatografía de gases con la extracción micelar del punto de turbidez [38].

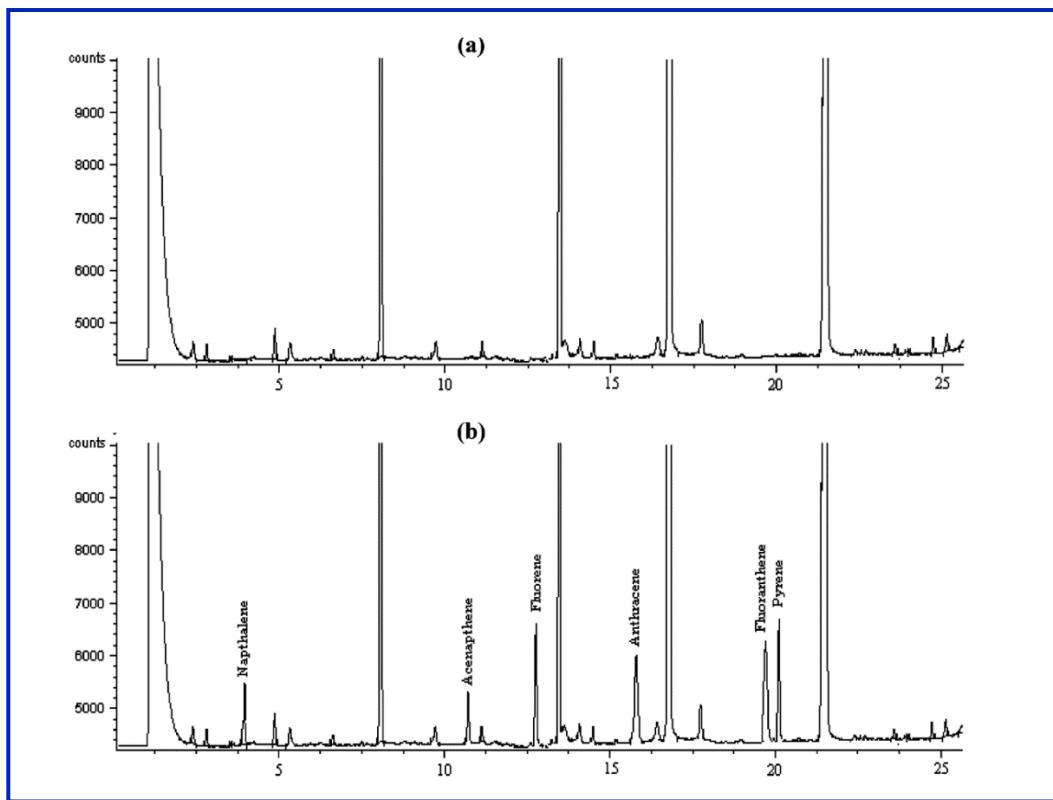


Figura 14. Cromatograma de (a) blanco y (b) solución adicionada con $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de naftaleno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno y pireno después de la CPE mediada por un tensoactivo no iónico ($1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de Tritón X-114) y la retroextracción acelerada por microondas en isoctano ($200 \mu\text{L}$) [38].

Kori mostró en 2019 que la CPE-BE (extracción por retroceso) es una herramienta analítica que tiene un gran potencial para mejorar los límites de detección y otras características analíticas. Los tensoactivos utilizados en la CPE-BE hacen que el procedimiento de extracción basado en micelas sea sencillo, práctico, seguro y económico [39].

La CPE de tensoactivos no iónicos y aniónicos se ha aplicado como un paso de preconcentración antes del análisis instrumental. Debido a la baja volatilidad y a la alta viscosidad de la fase rica en tensoactivos, ésta no puede inyectarse directamente para los análisis instrumentales como en HPLC, la LC-MS o GC. Por lo tanto, después de la CPE y antes del análisis, se requiere una etapa suplementaria para evitar los bloqueos del inyector y el deterioro de la columna. Es necesario un paso de limpieza antes de la inyección para el GC.

En el procedimiento de BE, la fase rica en tensoactivos extraída se trata con agua o con un disolvente inmiscible como hexano, acetonitrilo, acetato de etilo, isoctano o cloroformo. Los analitos objetivo se retroextraen de la fase rica en tensoactivos a la fase de disolvente orgánico [39]. Esto muestra que la CPE-BE es una herramienta analítica que tiene un gran potencial para



mejorar los límites de detección y otras características analíticas. Es una alternativa válida a los procedimientos de separación y preconcentración por sus altas recuperaciones y factores de concentración.

Algunas aplicaciones representativas de la combinación SUPRAS-GC son la determinación de HAP en el agua y en el suelo, comentada anteriormente por Sikalos realizada en 2005 [38]; los éteres de ftalato en el agua exemplificado en 2017 por Feizi *et al.* [40]; o los alcaloides del tabaco en las hojas curadas al fuego estudiados en 2006 por Shen y Shao [41]. Takagai y Hinze presentaron en 2009 una estrategia interesante que no requiere la eliminación de tensoactivos. Se basa en la derivatización de Tritón X-114 con *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, que proporciona un mejor rendimiento cromatográfico, una ventana de tiempo de elución razonable para los analitos, tiempos de retención reproducibles y resultados cuantitativos. El enfoque, útil para la derivatización simultanea de analitos no volátiles, se aplicó con éxito a la determinación de mezclas de HAP y herbicidas [42].

Los últimos avances se centran en enfoques que evitan pasos adicionales tras la extracción con SUPRAS. Uno de estos enfoques implica el uso de una unidad de desorción comercial como interfaz para transferir los analitos extraídos del sistema SUPRAS al sistema GC, descrito en 2016 por Cacho *et al* (Figura 15). Para ello el SUPRA, compuesto por Tritón X-114, se coloca en un microvial de vidrio que se introduce en el tubo de desorción térmica y todo el conjunto se somete a desorción térmica. Los analitos son trasladados por un gas portador a un inyector vaporizador de temperatura programada (PTV), donde se concentran antes de entrar en la columna cromatográfica. A continuación, el PTV se calienta y los compuestos retenidos entran en el sistema GC. El método fue exitoso en la determinación de cuatro haloanisoles en bebidas alcohólicas [43].

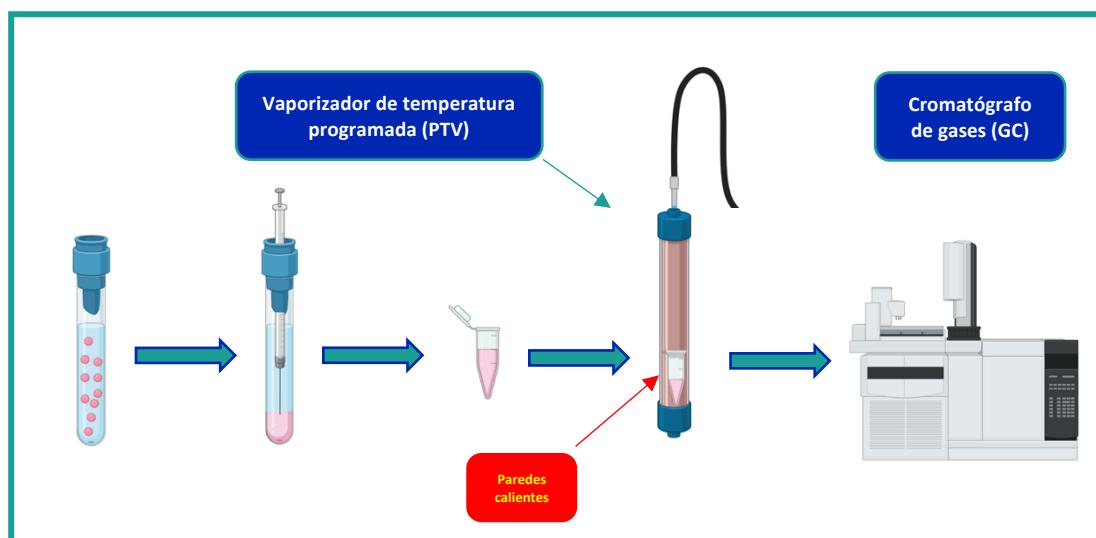


Figura 15. Esquema de extracción por GC utilizando un PTV para la muestra extraída por el SUPRA [43].



Otro enfoque que evita pasos adicionales es el uso de SUPRAS con alta estabilidad térmica que son compatibles con el espacio de cabeza (HS) y GC-MS estudiado en 2018 por Salati-Dorado *et al.* Estos SUPRAS consisten en un polí(ácido undecilénico) (un tensoactivo oligomérico), tetraglima (un solvente aprótico polar con excelente estabilidad química y térmica) y agua: un SUPRA completamente caracterizado en términos de composición y propiedades físicas como la estabilidad térmica. Posteriormente, el HTS (alta estabilidad térmica)-SUPRAS desarrollado se aplicó con éxito, como prueba de principio a la extracción y determinación de disolventes residuales en fármacos, incluyendo varios disolventes cuyo análisis por HS-GC ha demostrado ser altamente complejo. El enfoque se aplicó a la extracción y determinación de 37 disolventes residuales en fármacos en sus respectivos niveles máximos de residuos, incluyendo varios disolventes cuyo análisis por HS-GC es muy complejo [44].

Un desarrollo en 2019 por Zhou *et al.* es el uso de SUPRAS combinado con la degradación térmica mediante pirólisis GC-MS. El SUPRA compuesto por Tritón X-45 se aplicó a la extracción de nanoplásticos de aguas ambientales. Después de la extracción, los extractos del SUPRA que contenían los nanoplásticos se calentaron a 190 °C durante 3 horas para degradar térmicamente el tensoactivo, y después se llevó a cabo la cuantificación en masa de los nanoplásticos mediante pirólisis-GC-MS. Esta técnica demuestra por primera vez un método ventajoso de preconcentración de nanoplásticos en trazas de aguas ambientales. Dado que los nanoplásticos pueden mantener su morfología original durante el proceso de CPE, las distribuciones de tamaño de las trazas de nanoplásticos pueden obtenerse mediante la caracterización de los nanoplásticos concentrados en la fase rica en tensoactivos. En comparación con las técnicas existentes para el análisis de microplásticos, este método propuesto presenta ventajas únicas, como una alta sensibilidad, una buena tolerancia a la interferencia de la matriz de la muestra real y un funcionamiento sencillo. Así, el método podría ser una alternativa atractiva en el análisis de trazas de nanoplásticos (Figura 16) [45].

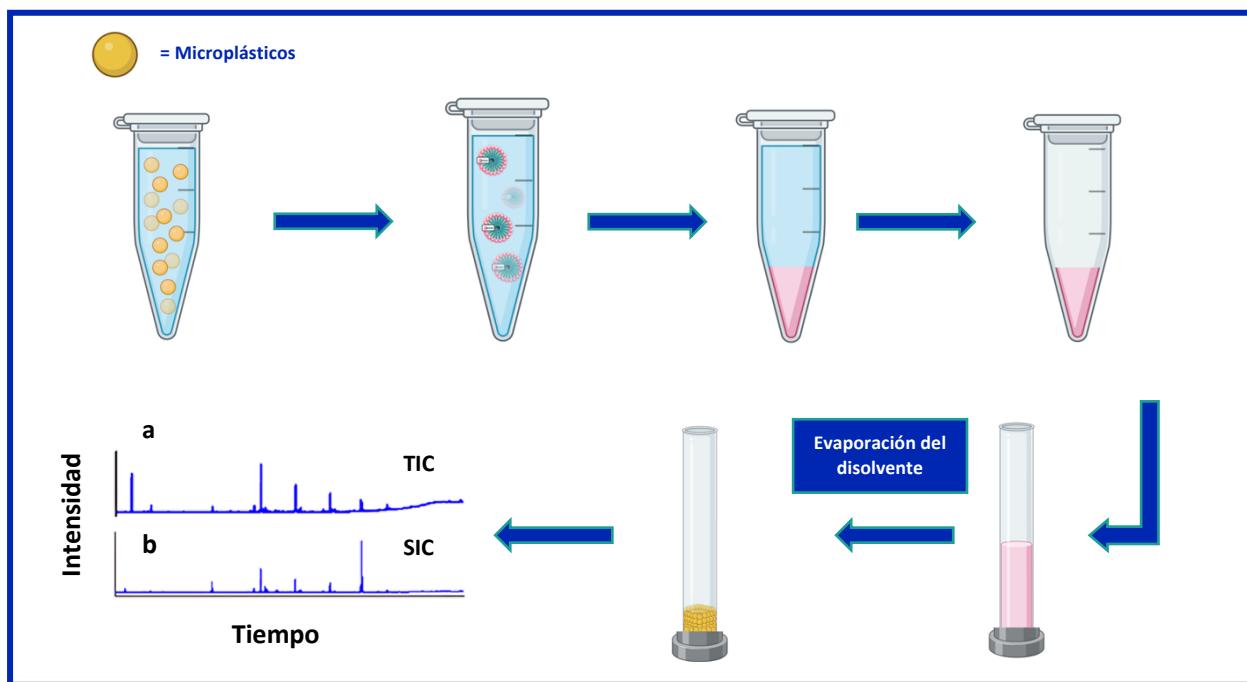


Figura 16. Resumen esquemático de la extracción de nanoplásticos en aguas ambientales mediante degradación térmica obteniendo cromatogramas de pirólisis en a) cromatografía de gases de iones totales (TIC) y b) cromatografía de inyecciones secuenciales (SIC) [45].

5.3.3 Interacciones SUPRA-soluto que impulsan las extracciones

Tener un buen conocimiento de las interacciones soluto-disolvente es un requisito esencial para desarrollar esquemas de extracción eficientes y, en este sentido en los años más recientes se han realizado amplios progresos en relación con las interacciones que impulsan las extracciones basadas en SUPRAS.

Los SUPRAS están formados principalmente por anfífilos y agua, y pueden incluir otros ingredientes como agentes inductores de la coacervación (por ejemplo, sales orgánicas o inorgánicas), disolventes orgánicos, etc. La determinación de la composición de los SUPRAS ayuda a comprender los posibles mecanismos que rigen las extracciones de solutos y a explotar el potencial de los SUPRAS.

Las moléculas anfifílicas están formadas por una parte hidrofílica y otra hidrofóbica y se autoensamblan en el SUPRA como agregados ordenados que ofrecen microambientes de diferente polaridad. Esto significa que tienen la capacidad intrínseca de extraer solutos en un amplio rango de polaridad, y en consecuencia tienen el potencial de ser excelentes herramientas para desarrollar plataformas de tratamiento de muestras completas antes de la cromatografía-espectrometría de masas (tanto de baja como de alta resolución).



Considerando que las interacciones ofrecidas por los SUPRAS pueden ajustarse simplemente cambiando los anfífilos, es fácil concluir que los SUPRAS pueden diseñarse de acuerdo con requisitos específicos.

El microambiente hidrofóbico de los SUPRAS constituye un excelente extractor para los compuestos hidrofóbicos, ofrece principalmente interacciones de dispersión y dipolo para su solubilización. La eficacia de la extracción aumenta a medida que lo hace la hidrofobicidad del soluto, como lo indicaron Quina y Hinze en 1999 [46]. Sin embargo, aunque muchas aplicaciones de los SUPRAS han implicado la extracción de solutos no polares, el campo más utilizado ha estado relacionado con la extracción de compuestos polares en LLE. Los SUPRAS superan a los disolventes orgánicos polares no sólo en la variedad de interacciones disponibles, sino también en su inmiscibilidad en el agua, lo que ha ampliado enormemente el ámbito de aplicación de la LLE.

Entre los grupos polares de anfífilos, los más utilizados en las extracciones basadas en SUPRAS han sido los óxidos de polietileno, ácidos carboxílicos, sulfatos, sulfonatos, carboxilos y iones de amonio y piridinio. Las interacciones que impulsan la extracción de los solutos polares han sido principalmente iónicas, puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo. Debido a la alta energía de los enlaces iónicos, la extracción de compuestos iónicos con anfífilos de carga opuesta es la opción más eficiente [47 y 48].

Man *et al.* desarrollaron en 2002 un nuevo método de CPE y preconcentración utilizando un tensioactivo catiónico: cloruro de tricaprililmetilamonio (Aliquat-336), para la determinación de las toxinas de cianobacterias en aguas naturales. El sistema de punto de turbidez reveló una relación de volumen de fase muy alta en comparación con otros sistemas establecidos de tensoactivos con recuperaciones medias de 113.9 % y 87.1 % [47].

Garenne *et al.* mostraron en 2016 que los sistemas de ácidos grasos cargados negativamente se enturbian al enfriar las dispersiones calientes en función de la concentración o al añadir un exceso de clorhidrato de guanidina (GuHCl). El enturbiamiento de estas soluciones da lugar a la formación de gotas de ácidos grasos enriquecidos en las que se nota un polimorfismo que depende de la temperatura: al enfriar, las micelas alargadas en forma de gusano se transforman a bicapas rígidas apiladas en el interior de las gotas. Los resultados muestran un caso adicional de tensoactivos cargados negativamente que presentan el fenómeno de enturbiamiento y sugieren que estos sistemas podrían utilizarse para extraer solutos en función de su carga y lipofilia [48].

En 2019 Ballesteros-Gómez *et al.* diseñaron SUPRAS mediante la coacervación de anfífilos iónicos en presencia de contraiones orgánicos. Extrajeron colorantes aniónicos (Azul tripán, Rojo directo 81, Azul cibacrón 3G-A, Rojo ácido 97) y catiónicos (Acetato de violeta de cresilo, Verde de malaquita) de las aguas residuales textiles utilizando SUPRAS sintetizados a partir de vesículas acuosas de mezclas de ácidos carboxílicos y carboxilatos, bajo la acción de iones de tetrahexilamonio (THA). La Figura 17 muestra un esquema de este SUPRA que consiste en gotas



de coacervado formadas por grandes vesículas unilaminares puenteados por iones de tetraalquilamonio. Todos los colorantes catiónicos y aniónicos seleccionados se extrajeron eficazmente mediante interacciones iónicas con los grupos carboxilato y amonio respectivamente, en proporciones SUPRA/aguas residuales de 0.01 [49].

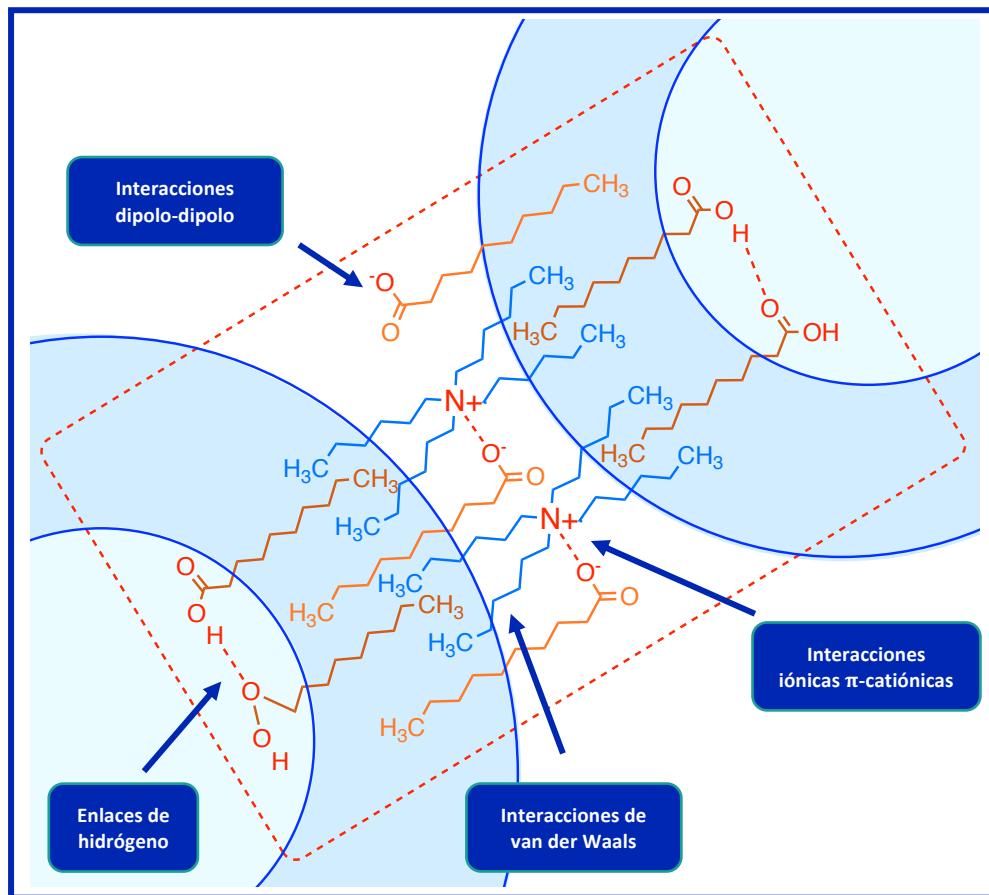


Figura 17. Imagen esquemática del SUPRA vesicular basado en THA, que muestra las interacciones de unión para la solubilización de contaminantes situados en diferentes regiones del disolvente nanoestructurado [49].

Los puentes de hidrógeno son un mecanismo eficaz para la extracción de compuestos polares. La energía de los puentes de hidrógeno disminuye a medida que la longitud de la cadena de hidrocarburos incrementa, por lo que los anfífilos de cadena corta son mejores donantes de protones que los más largos. A. Ballesteros-Gómez y S. Rubio describieron en 2012 las recuperaciones de fenol a partir de agua por extracción con SUPRAS a base de alanol. Resultó que fueron mayores para un SUPRA a base de heptanol ($70 \pm 4\%$) que las obtenidas con decanol ($35 \pm 2\%$) o tetradecanol ($22 \pm 3\%$) [50].

Por otra parte, la energía de enlace de los puentes de hidrógeno también depende de la temperatura: la energía del enlace disminuye a medida que la temperatura aumenta. Materna y



Szymanowski determinaron en el 2022 que el aumento de la temperatura aumenta la concentración del anfífilo en el SUPRA y, en consecuencia, el número de sitios de unión, y como se ha especificado anteriormente, disminuye la energía de unión de los puentes de hidrógeno [51]. Por lo tanto, la temperatura de extracción es siempre un compromiso entre ambos factores: longitud de la cadena del hidrocarburo y la temperatura a la que se somete la CPE, y debe optimizarse cuidadosamente.

En 2018, Lara *et al.* informaron que el enlace con un halógeno (XB) es un nuevo mecanismo para las extracciones basadas en SUPRAS [32]. El XB es una interacción altamente energética y con una interacción direccional, que resulta de la capacidad general de los halógenos unidos de forma covalente para interactuar de forma atractiva con una región rica en electrones de un átomo o molécula vecina [52]. Se puede representar como R-X \cdots D, donde X es el halógeno electrófilo (I, Br, Cl), D es un donante de densidad electrónica (N, O, P, S, Se, etc.) y R es un átomo de carbono, nitrógeno o halógeno. El enlace con el halógeno ha sido aplicado para la extracción de hexabromociclododecano (HBCD) en suelos y sedimentos utilizando SUPRAS que contienen donantes de XB en su estructura, encontrando una eficiencia de extracción obtenida del 93-102 % en condiciones experimentales de temperatura ambiente y presión atmosférica, la baja relación de volumen SUPRA/cantidad de muestra, y los reducidos tiempos de extracción (15 min) [32].

5.3.4 Aumento para predecir los factores de concentración en la LLE

El desarrollo de la LLE basada en SUPRAS implica la formación del disolvente en la muestra mediante la adición del anfífilo y los ingredientes necesarios para la coacervación. El volumen de SUPRA generado *in situ* determina los factores de concentración teóricos (TCF) que pueden alcanzarse en una aplicación específica. En 2020 Soledad Rubio expuso los resultados recabados de estudiar los valores representativos de TCF para SUPRAS sintetizados a partir de micelas acuosas compuestas por tensoactivos no iónicos, catiónicos, zwitteriónicos y mixtos [37]. En la Tabla 4 se muestran dichos resultados, incluyendo también los valores de TCF obtenidos para los SUPRAS sintetizados a partir de micelas inversas, vesículas y líquidos iónicos.

Por regla general, los factores de concentración dependen principalmente de la estructura y la concentración del anfífilo y de la concentración del agente coacervante, aunque otros aditivos pueden afectar a la composición del SUPRA, y en consecuencia, al volumen de disolvente producido [15].

En lo que respecta al anfífilo, el volumen de SUPRA producido depende en su mayor parte de forma lineal de su concentración en la muestra. Esta linealidad indica que la composición del SUPRA se mantiene constante, ya que otros parámetros no cambian [53]. Por lo tanto, los TCF máximos siempre se alcanzarán con la menor concentración de tensoactivo. La concentración mínima de anfífilo recomendada para una aplicación específica dependerá tanto de la recuperación del analito que determina el factor de concentración real, como el volumen de SUPRA necesario para el análisis posterior.



Ballesteros-Gómez *et al.* desarrollaron en 2007 un método analítico sencillo, rápido y sensible para la determinación simultánea de bisfenol A (BPA), bisfenol F (BPF) y sus correspondientes diglicidiléteres (BADGE y BFDGE) en aguas residuales y fluviales, y propusieron una ecuación general para la predicción del volumen del coacervado en función de sus componentes, ajustando la ecuación mediante regresión no lineal. Esta ecuación está representada de manera gráfica por la Figura 18, y permite conocer a priori los factores de concentración máximos que pueden alcanzarse en unas condiciones experimentales determinadas, la composición que debe tener la mezcla tensoactivo-anfífilo y la cantidad mínima de muestra que debe inyectarse al SUPRA para poder ser extraído [53].

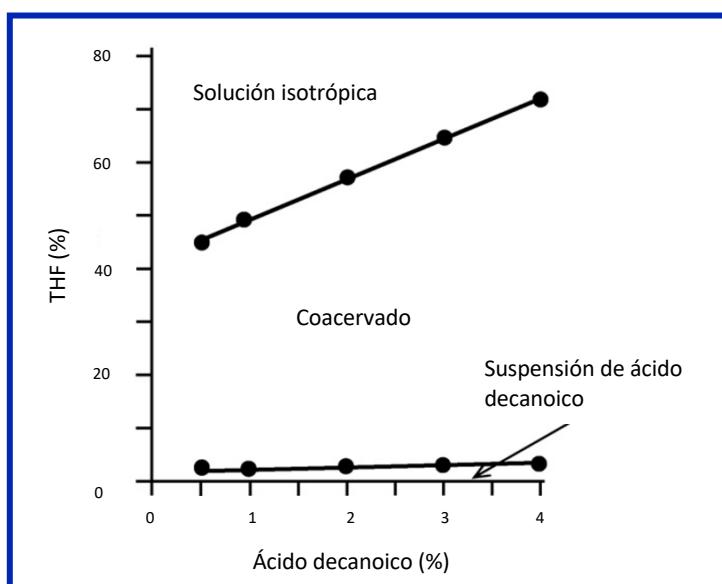


Figura 18. Diagrama de fases del ácido decanoico en mezclas binarias de THF(Tetrahidrofurano):agua. Volumen final de la solución (THF + agua) = 40mL. Experimentos realizados a temperatura ambiente [53].



El tipo de dependencia que muestra la Tabla 1 es típico de las extracciones basadas en tensoactivos e indica que la composición de la fase rica en tensoactivos se mantiene constante mientras las demás variables no cambian. La pendiente de la relación lineal da los microlitros de coacervado obtenidos por cada mg de tensoactivo, por lo que los factores de concentración máximos se encontrarán en las condiciones en las que se obtengan los valores de pendiente más bajos. La Tabla 2 muestra la relación que existe entre la cantidad de tensoactivo y el volumen utilizado para sintetizar el SUPRA. A mayor porcentaje de tensoactivo existe una mayor cantidad de volumen de fase rica en SUPRAS.

Tabla 1. Relación lineal entre la cantidad de ácido decanoico y el volumen del coacervado a diferentes porcentajes de THF [53].

| % THF | b ± S ^a ($\mu\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$) | a ± S ^a (μL) | R ^{2b} |
|-------|---|--------------------------------------|-----------------|
| 5 | 1.31 ± 0.03 | 3.46 ± 2.76 | 0.997 |
| 10 | 1.67 ± 0.04 | 0.67 ± 3.99 | 0.997 |
| 20 | 2.64 ± 0.03 | -3.19 ± 3.36 | 0.998 |
| 30 | 4.00 ± 0.04 | 20.10 ± 10.65 | 0.998 |

n=10

^a Desviación estándar

^b Coeficiente de correlación

Tabla 2. Relaciones de volumen de fase inferidas a partir de la ecuación general para bisfenoles [53].

| Ácido decanoico (%) | Relación de volúmenes de fase | Factores reales de concentración | Volumen mínimo de muestra | LOD ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|---------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| 0.1 | 542 | 358-244 | 54 | 12-8 |
| 0.25 | 217 | 189-145 | 22 | 21-16 |
| 0.5 | 108 | 102-87 | 11 | 35-30 |
| 1 | 54 | 50-49 | 5 | 62-60 |
| 2 | 27 | 27-25 | 3 | 119-111 |

* THF=10 %

La estructura del anífilo tiene una gran influencia en el volumen de SUPRA producido. En general los TCF aumentan a medida que disminuye la longitud de la cadena hidrocarbonada o el tamaño del grupo polar. Así, los TCF obtenidos para los SUPRAS inducidos por temperatura hechos a partir de los etoxilatos de alcohol C₁₀E₆ y C₁₆E₆ fueron 24 y 5, respectivamente, mientras que los hechos a partir de C₁₂E₅, C₁₂E₆ y C₁₂E₈ fueron 31, 20 y 12, respectivamente [Tabla 4][37].



Tabla 4. Factores de concentración teóricos proporcionados por disolventes supramoleculares representativos sintetizados a partir de diferentes tipos de agregados anfifílicos y agentes inductores de la coacervación [37].

| Agregados anfifílicos en la suspensión coloidal | Anfífilo | Concentración del anfífilo (% m/V) | Agentes inductores de la coacervación | Factor teórico de concentración (TCF) |
|---|---|------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Micelas acuosas no iónicas | Etoxilatos de alcoholes | | | |
| | C ₁₂ E ₅ | 2.9 | 0.8 mol·L ⁻¹ NaCl, 80 °C | 31 |
| | C ₁₂ E ₆ | 3.2 | | 20 |
| | C ₁₂ E ₈ | 3.9 | | 12 |
| | C ₁₀ E ₆ | 3.0 | | 24 |
| | C ₁₆ E ₆ | 3.6 | 35 °C | 5 |
| | | 0.05 | | 60 |
| | | 0.2 | | 20 |
| | | 0.5 | 65 °C | 500 |
| | | 1.0 | | 250 |
| Micelas aniónicas acuosas | Etoxilatos de alquilfenol Tritón X-114 | | 1.0 | 0.6 mol·L ⁻¹ Na ₂ SO ₄ |
| | | | 2.5 | 15 % NaCl, 70 °C |
| | | 0.25 | 4 mol·L ⁻¹ HCl | 30 |
| | | 1.0 | | 11 |
| | | 0.25 | 5 mol·L ⁻¹ HCl | 14 |
| Micelas catiónicas acuosas | Dodecil sulfato de sodio | | 1.0 | 8 |
| | Cetrimida | | 0.5 | 6.8 mol·L ⁻¹ NaCl, 0.05 % (V/V) 1-octanol |
| | | 0.5 | | 5 |
| Micelas acuosas zwitteriónicas | 3-[Decil-dimetilamonio] propilsulfato | | 0.2 | 6.8 mol·L ⁻¹ NaCl, 0.08 % (V/V) |
| | | 2.0 | 1-octanol, 35 °C | 35 |
| | | | | 50 |
| Mezclas de micelas acuosas | POLE y Brij 30 | | 0.26 % y 0.74 % | 78 °C |
| | | 0.13 % y 0.37 % | 11 | |
| | Tritón X-114 y cetiltrimetilamonio bromuro | | 0.2 % y 0.012 % | 16 |
| Micelas invertidas | Ácido decanoico en THF | | 0.2 | 85 °C |
| | | 1.0 | 95 % (V/V) H ₂ O | 167 |
| | | 0.2 | | 769 |
| | | 1.0 | 85 % (V/V) H ₂ O | 72 |
| Vesículas acuosas | Ácido decanoico | 0.5 | Tetrabutilamonio | 200 |
| | | 2.0 | | 40 |
| Líquidos iónicos | Hexafluorofosfato de butil-3-metilimidazol | 100 µL en 5 mL de muestra | 4 °C | 769 |
| | | | | 102 |
| | | | | 50 |



Los agentes inductores de la coacervación también tienen una fuerte influencia en el volumen de SUPRAS producidos, pero a diferencia de los anfílicos, la dependencia de los TCF de ellos es menos predecible. Así, en el caso de los SUPRAS inducidos por temperatura, los agregados supramoleculares se vuelven progresivamente más compactos a medida que aumenta la diferencia entre la temperatura de funcionamiento y el punto de turbidez, lo que da lugar a fases ricas en tensoactivos con volúmenes más pequeños, y en consecuencia mayores TCF. La Tabla 3 muestra algunas ecuaciones derivadas para el cálculo del volumen de SUPRA producido a partir de alcanos y ácidos alquilcarboxílicos en función de la cantidad de anfílico y del porcentaje de disolvente orgánico (THF) [37]. Estas ecuaciones permiten predecir las condiciones experimentales en las que se alcanzarán los máximos factores de concentración teóricos, por ejemplo, en las concentraciones más bajas de anfílico y THF.

Tabla 3. Ecuaciones generales para la predicción del volumen de los SUPRAS inducidos por agua a partir de suspensiones coloidales de alcanoles y ácidos carboxílicos en THF [37].

| Anfílico | n | Ecuación general |
|---|------|---|
| Alcanoles $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ | 6-13 | $V_{\text{SUPRA}} = X (0.17 + e^{0.0389\text{THF}})$ |
| Ácidos carboxílicos $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$ | | |
| Ácido hexanoico | 4 | $V_{\text{SUPRA}} = 0.60X + 0.0076 \times \text{THF} + e^{0.104\text{THF}}$ |
| Ácido octanoico | 6 | $V_{\text{SUPRA}} = 1.17 \times e^{0.039\text{THF}}$ |
| Ácido decanoico | 8 | $V_{\text{SUPRA}} = 1.05 \times e^{0.047\text{THF}}$ |
| Ácido dodecanoico | 10 | $V_{\text{SUPRAS}} = 0.92 \times e^{0.056\text{THF}}$ |

V_{SUPRAS} : volumen de disolvente supramolecular (μL)

X: cantidad de tensoactivo (mg)

THF: concentración de THF (%), V/V)



5.3.5 Adaptación de los SUPRAS en extracciones

Los SUPRAS se aplican habitualmente a la extracción de compuestos orgánicos tanto de muestras líquidas (LLE) como sólidas (SLE). En el caso de la LLE, el SUPRA se forma *in situ* en la muestra mediante la adición del anfífilo y el establecimiento de las condiciones experimentales necesarias para la coacervación. El SUPRA se genera de forma espontánea e instantánea y, dado que las gotas de coacervado permanecen como entidades individuales, la transferencia de masa de los analitos de la muestra al SUPRA suele ser extremadamente rápida. Así, la mayoría de los procedimientos implican la agitación de la muestra durante unos minutos y su posterior centrifugación para acelerar la separación del SUPRA de la solución a original. A continuación, el SUPRA completo o una alícuota se extrae con una microjeringa y se somete a análisis. En el caso de los SUPRAS inducidos por temperatura, el valor de la temperatura requerida para la coacervación (punto de turbidez) debe mantenerse durante todo el proceso, ya que cualquier descenso de la temperatura podría dar lugar a una disminución de la eficacia de la extracción observada si la fase rica en tensoactivos se redissuelve en la fase acuosa principal [46]. Sin embargo, se suelen preferir los tensoactivos no iónicos con puntos de turbidez bajos para facilitar el proceso de extracción y evitar la degradación de los analitos termolábiles.

Hay que conocer el volumen del SUPRA que se produce en la muestra, y en este sentido las investigaciones de los últimos años se han centrado en derivar ecuaciones que se ajusten al comportamiento del SUPRA y permitan su estimación directa [Tabla 3]. Cuando estas ecuaciones no están disponibles para el SUPRA sintetizado, los volúmenes de los SUPRAS pueden calcularse de diferentes maneras: para los SUPRAS menos densos que la muestra, el volumen suele calcularse midiendo la altura (h) a la que se llena el disolvente en el tubo de centrífuga con un Vernier digital y aplicando la ecuación del volumen cilíndrico $\pi r^2 h$, donde r es el radio del tubo. El uso de tubos de centrífuga con cuellos estrechos (por ejemplo la Figura 19a) facilita la medición y la extracción de los SUPRAS cuando se producen volúmenes bajos de disolvente (microlitros).

En 2016, García-Fonseca *et al.* proponen un disolvente supramolecular de acceso restringido (SUPRAS-RAM) formado por micelas inversas de ácido tetradecanoico como estrategia de amplio alcance y bajo coste para el tratamiento de muestras agroalimentarias antes de los ensayos inmunoenzimáticos. El enfoque se evaluó para la determinación de ocratoxina A (OTA) en vinos y especias, y de aflatoxina B1 (AFB1) en cereales. La Figura 19b muestra un esquema del procedimiento propuesto para la extracción de micotoxinas del vino tinto. La extracción y la medición de SUPRAS más densos que la muestra se facilitan enfriando el tubo después de la centrifugación para aumentar la viscosidad del SUPRA y luego se decanta. El volumen de disolvente puede medirse con una microjeringa o calcularse pesándolo. En cuanto a la aplicación del SUPRA respecto a la extracción de compuestos orgánicos de muestras sólidas (SLE), hay que tener en cuenta que la coacervación tiene lugar en una suspensión coloidal del anfífilo (Figura 1), y por lo tanto el SUPRA debe generarse siempre en una solución (agua o una mezcla de disolvente orgánico y agua) antes de aplicarlo al SLE.

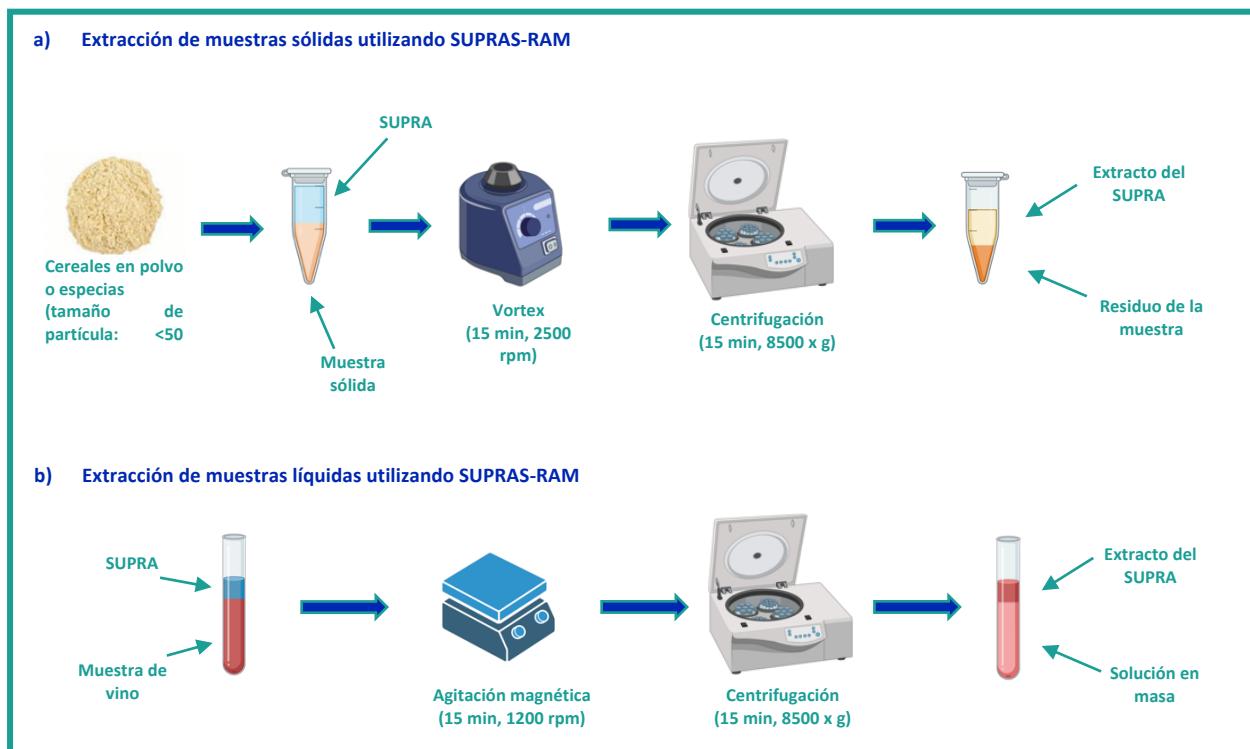


Figura 19. Flujo de trabajo para la cuantificación de micotoxinas en alimentos sólidos (a) y líquidos (b) utilizando SUPRAS-RAM [54].

Se han seguido dos estrategias para la aplicación de SUPRAS en el SLE. En la primera, el SUPRA se añade directamente a la muestra sólida, la mezcla se agita en vórtex y luego se centrifuga para la separación de fases. La Figura 19a muestra un procedimiento típico para esta estrategia. En la segunda estrategia, se añadieron a las muestras sólidas volúmenes tanto del SUPRA como de la solución de equilibrio generada en el proceso de coacervación. Por lo tanto, tras la extracción y centrifugación se obtendrían tres fases: el residuo sólido, la solución de equilibrio y el extracto del SUPRA. La solución de equilibrio desempeña una doble función: humedecer la muestra y atrapar las interferencias polares, lo que mejora la selectividad [54].

Un ejemplo de la segunda estrategia fue en 2010 cuando Costi *et al.* evaluaron mediante la extracción de flumequina (FLU) y ácido oxolínico (OXO) dos medicamentos veterinarios ampliamente utilizados, a partir de músculo de pescado y marisco, utilizando un disolvente supramolecular formado por micelas inversas de ácido decanoico (DeA), obteniendo recuperaciones del 99-102 %, utilizando un SUPRA formado por agregados hexagonales invertidos de ácido decanoico [55].

Un segundo ejemplo es la extracción de fungicidas de benzimidazol en frutas y verduras utilizando un SUPRA vesicular de ácido decanoico determinada en 2009 por Moral *et al.* En esta investigación se propuso un disolvente supramolecular formado por vesículas, compuestas por cantidades equimoleculares de ácido decanoico (DeA) y decanoato de tetrabutilamonio, dispersas en una fase acuosa continua, para la extracción de fungicidas benzimidazólicos (BF) de



frutas y verduras. El carbendazim (CB), el tiabendazol (TB) y el fuberidazol (FB) se extrajeron en un solo paso y no fue necesario limpiar ni concentrar los extractos. La alta eficiencia de extracción obtenida para el FB fue el resultado de los diferentes tipos de interacciones proporcionadas por el disolvente supramolecular (por ejemplo, enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno) y el alto número de sitios de solubilización que contiene. Sin embargo, esta opción no es recomendable para la extracción de analitos muy polares ya que se distribuyen entre el SUPRA y la solución de equilibrio, disminuyendo así la eficacia de la extracción (Figura 20 y 21) [56].

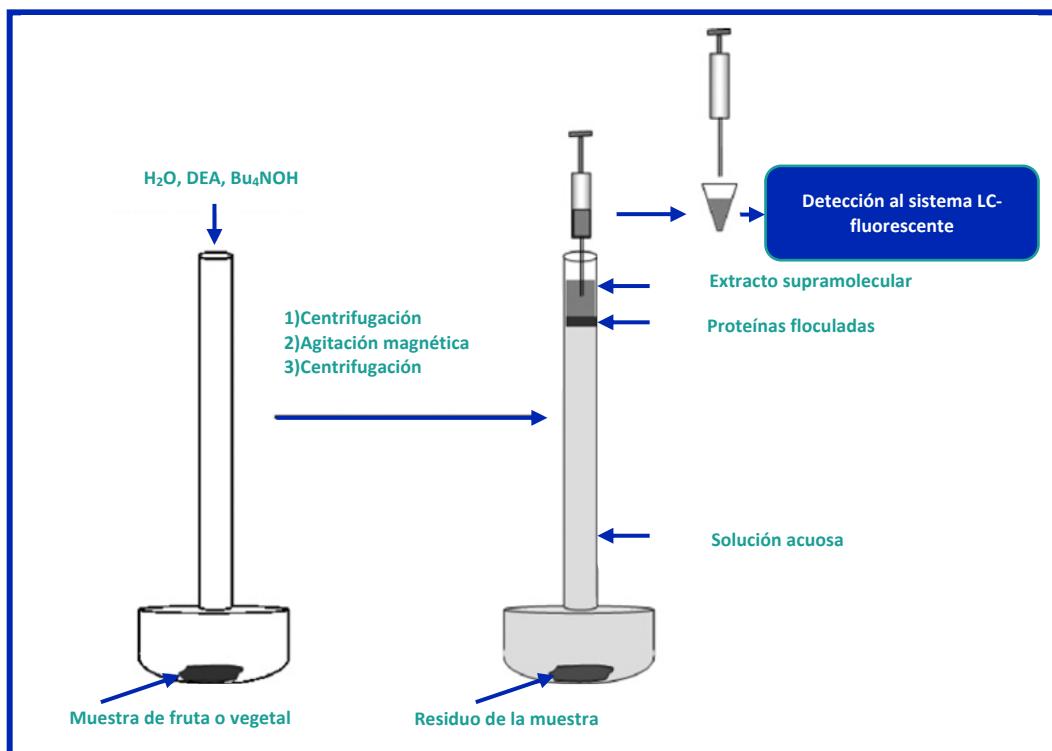


Figura 20. Imagen esquemática que muestra el proceso de microextracción basado en disolventes supramoleculares [56].



Además de los formatos convencionales ya mencionados, las extracciones basadas en SUPRAS se han adaptado a los formatos actuales de LLE miniaturizados. Así, su uso se ha extendido a:

- Microextracción de gota única (SDME) como López-Jiménez *et al.* investigaron en 2008 los parámetros que afectan a la eficacia de la SDCME utilizando coacervados vesiculares como disolvente y 2-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol como analitos modelo [57].

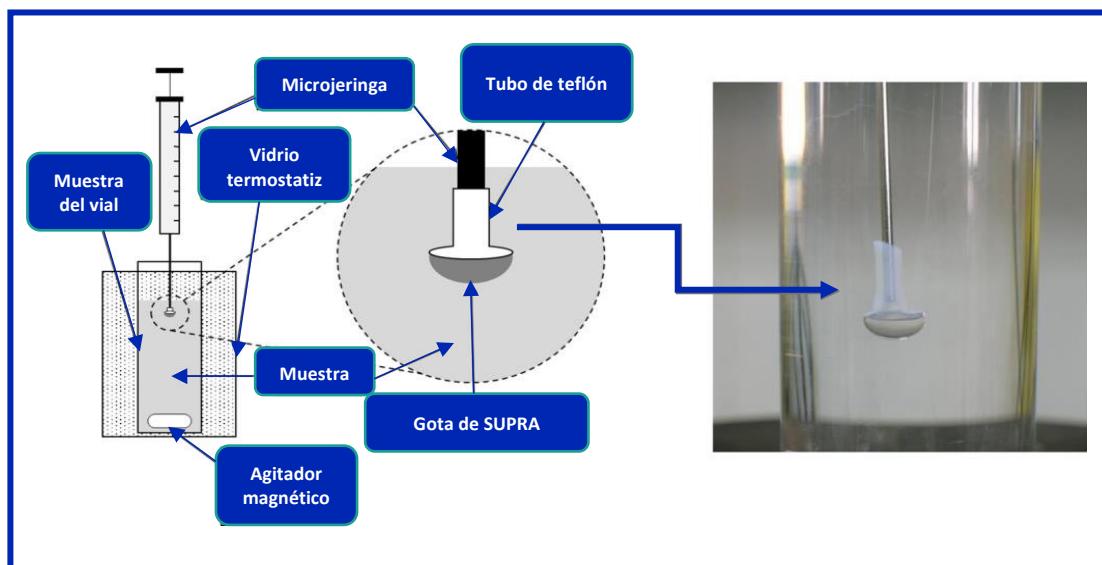


Figura 21. Esquema y fotografía del sistema utilizado para la microextracción de gota única basada en SUPRAS [37].

- Microextracción en fase líquida de fibra hueca (HF-LPME) así como Moradi *et al.* desarrollaron en 2012 un método novedoso y altamente flexible basado en disolventes supramoleculares construidos a partir de vesículas de ácido decanoico, que se han utilizado por primera vez como disolvente en HF-LPME. Este disolvente se produce a partir de la coacervación de vesículas acuosas de ácido decanoico por la acción del tetrabutilamonio (Bu_4N^+) [58].
- Microextracción basada en la solidificación de una gota flotante (ME-SFD). A modo de ejemplo Moradi y Yamidi desarrollaron en 2012 el análisis de parabenos utilizando la microextracción de gotas coactivas vesiculares flotantes solidificadas (SFVCDME). Se utilizó un disolvente supramolecular formado por vesículas de ácido decanoico en los regímenes de nano y microescala como disolvente en la microextracción de gota flotante solidificada. El disolvente se produjo a partir de la coacervación de vesículas acuosas de ácido decanoico en presencia de tetrabutilamonio (Bu_4N^+). El metilparabeno (MP), el etilparabeno (EP) y el propilparabeno (PP) se trajeron sobre la base de las interacciones hidrofóbicas y catiónicas y la formación de puentes de hidrógeno [59].



En estas aplicaciones, el SUPRA se añade directamente a la muestra líquida, por lo que las fuerzas de unión no covalentes para los anfífilos en los agregados supramoleculares tienen que ser lo suficientemente fuertes para mantener su integridad durante el proceso de extracción y no se desequilibren con la solución de muestra. Este requisito es difícil de cumplir, particularmente en relaciones SUPRA/volumen de muestras que pueden alcanzar valores de hasta 1.5×10^{-3} [57, 58 y 59]. Para este propósito, se han utilizado SUPRAS sintetizados a partir de vesículas de carboxilatos de ácido carboxílico inducidos por iones de tetrabutilamonio como Ruiz *et al.* lo expusieron en 2006 para la extracción de compuestos orgánicos a base de soluciones vesiculares de ácidos alquilcarboxílicos [60].

Los SUPRAS formados por estos agregados vesiculares son cinéticamente estables (es decir, el tiempo de residencia de los tensoactivos en las vesículas suele ser de horas o días, que es bastante más largo que el tiempo de las micelas de aproximadamente 10^{-8} s), y además las fuerzas impulsoras no covalentes que componen los agregados son las más energéticas (enlaces iónicos y de hidrógeno). Estas características convierten los conjuntos dinámicos presentes en los agregados supramoleculares en morfologías permanentes atrapadas cinéticamente.

Recientemente se ha prestado mucha atención a la combinación de SUPRAS con nanopartículas magnéticas (MNP) con el objetivo de evitar la centrifugación para la separación de la fase SUPRA de la muestra líquida [61, 62, 63, 64, 65 y 66].

A modo de ejemplo, Giokas *et al.* hacen público en 2012 por primera vez una novedosa técnica de extracción en dos pasos que combina la CPE con la extracción en fase microsólica dispersiva (D-micro-SPE). El método implica la extracción inicial de los analitos objetivo mediante CPE en las micelas de un medio tensoactivo no iónico. Posteriormente se utilizan nanopartículas magnéticas (MNP) de núcleo recubierto de polisiloxano altamente hidrofóbico para recuperar la fase micelar (Figura 22). De esta manera, la fase micelar que contiene los analitos es el objetivo del paso D-micro-SPE en lugar de los analitos directamente. Los MNP se recogen entonces mediante la aplicación de un campo magnético de adsorción, superando la necesidad de pasos específicos asociados a la CPE como la centrifugación para separar la fase rica en tensoactivos, la refrigeración de la fase micelar condensada para reducir su viscosidad o los aparatos adecuados que permiten el muestreo directo de la fase rica en tensoactivos. Una característica destacable del método es la introducción de MNP altamente oleofílicos, que permiten una transferencia de masa rápida y cuantitativa de la fase tensoactiva, a diferencia de otras nanopartículas hidrofóbicas convencionales [61].

Además, Gao *et al.* desarrollaron en 2015 la CPE de micelas mixtas (MM-CPE) combinada con la extracción en fase sólida de dispersión magnética (MD-micro-SPE) como un nuevo enfoque para la extracción de doxazosina (DOX) y alfuzosina (ALF) antes del análisis por fluorescencia. El tensoactivo aniónico de micela mixta dodecil sulfato de sodio y el polioxietileno(7,5)nonilfeniléter no iónico se utilizó como disolvente de extracción en el MMCPE, y las nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 de enlace de diatomita se utilizaron como adsorbente en el MD-micro-SPE [62].

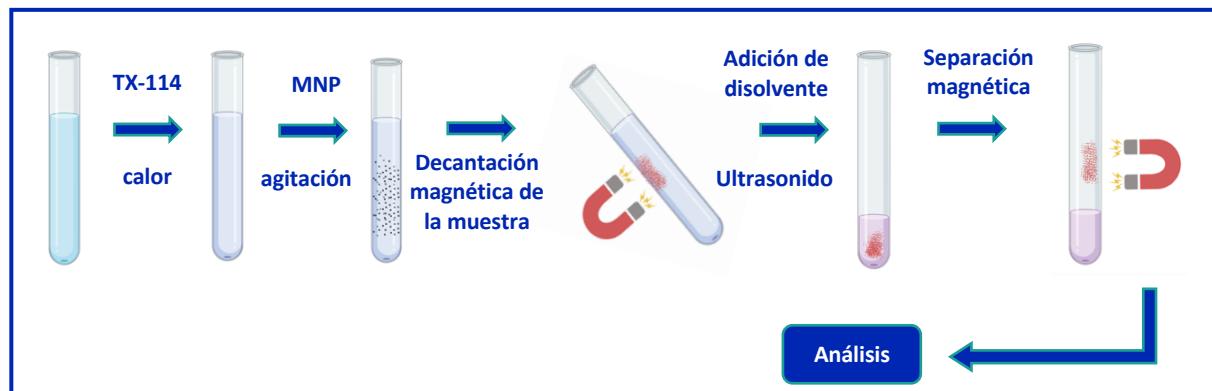


Figura 22. Esquema simplificado del proceso de extracción con nanopartículas magnéticas [62].

Los SUPRAS también se han combinado con fuentes de energía auxiliares, como los ultrasonidos. En 2013, Moradi *et al.* expusieron un nuevo método para la extracción y determinación de los ftalatos en el agua y los cosméticos utilizando la microextracción con disolventes supramoleculares mejorada por ultrasonidos (USESSM) y la HPLC-UV. Los coacervados consistentes en agregados nanoestructurados a base de ácido decanoico (micelas inversas) se han utilizado por primera vez como disolventes para la microextracción por emulsificación asistida por ultrasonidos (USAEME). La sonicación aceleró la transferencia de masa de los analitos objetivo al disolvente nanoestructurado desde la muestra acuosa, reduciendo así el tiempo de extracción. El tiempo de extracción se redujo de 10 a 2 minutos [67].



5.3.6 Extracciones multicomponentes con SUPRAS

Además de la aplicación de SUPRAS a la extracción y preconcentración de compuestos orgánicos, el uso de SUPRAS en la extracción de iones metálicos es un área consolidada y en expansión.

Bezerra *et al.* explicaron en 2005 cómo la extracción con SUPRAS se ha aplicado ampliamente para la determinación de metales traza en varias matrices diferentes. Sus principales ventajas son la sencillez de los procedimientos experimentales, el bajo coste, los elevados factores de preconcentración y la seguridad medioambiental [68].

Los oligoelementos son objeto de atención cada vez mayor por parte de los científicos que trabajan en diversos campos analíticos. La presencia o ausencia de un oligoelemento en un sistema modifica seriamente su comportamiento intrínseco. La extracción a través de SUPRAS es una tecnología de reciente aparición para preconcentrar y separar muchos de los oligoelementos de diferentes sistemas químicos y biológicos. Samaddar y Sen resumieron en 2013 los resultados de la preconcentración de metales traza utilizando SUPRAS a partir de diferentes muestras prácticas con una visión del probable mecanismo y la especiación implicados desde 2006 [69].

Los avances en estos campos se actualizan periódicamente en las revisiones anuales orientadas a la aplicación dedicadas a la espectrometría atómica por Bacon *et al.* enfocado a los métodos de preconcentración usando SPE para analizar muestras de agua [70]. Por otro lado, también cabe destacar los amplios trabajos teóricos y experimentales dedicados al uso de SUPRAS para la separación y purificación de proteínas combinada con la separación cromatográfica [71 y 72]. La mayoría de estas aplicaciones tratan de la separación de proteínas hidrofóbicas e hidrofílicas, que se distribuyen entre los SUPRAS y la fase acuosa.

En cuanto a la aplicación de los SUPRAS a la extracción y el enriquecimiento de compuestos orgánicos, se ha tardado mucho tiempo en empezar a explotar una de sus características clave: la capacidad de extraer simultáneamente sustancias químicas que cubren un amplio rango de polaridad o sustancias químicas con puntos de ebullición que varían en un amplio rango de temperaturas.

Hasta ahora, las principales aplicaciones de los SUPRAS han estado relacionadas con la extracción de HAP, compuestos policlorados, plaguicidas, tensoactivos, compuestos bioactivos (productos farmacéuticos, vitaminas y medicamentos, tintes, disruptores endocrinos, micotoxinas, fenoles, aminas aromáticas, etc.). Las muestras de interés se han tomado principalmente de diferentes compartimentos ambientales (agua natural, agua subterránea, agua de mar, aguas residuales, suelo, sedimentos, lodos, etc.), productos agroalimentarios (verduras, carne, pescado, cereales, frutas, bebidas, etc.) y muestras biológicas (orina, plasma, saliva, etc.). En general, la mayoría de las aplicaciones se centran en la extracción de unos pocos analitos (normalmente de uno a cinco). Por lo tanto, en esta sección se destinarán los esfuerzos por utilizar los SUPRAS como extractores multicomponentes eficaces.



A modo de ejemplo, Pino *et al.* desarrollaron en 2002 la extracción y preconcentración de 14 HAP con el tensoactivo no iónico polioxietileno-10-lauril éter, clasificados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, a partir de muestras de agua de mar utilizando preconcentración por SUPRAS, previa separación por HPLC, y la cuantificación mediante detección fluorimétrica (Tabla 5) [73].

Tabla 5. Lista de los 14 HAP separados mediante la extracción multicomponente y sus respectivas longitudes de onda del detector [73].

| Tiempo (min) | Excitación (nm) | Emisión (nm) | Compuesto |
|--------------|-----------------|--------------|----------------------------------|
| 0.0 | 222 | 329 | (1) Nph |
| 10.7 | 260 | 332 | (2) Fi |
| 13.9 | 248 | 370 | (3) Phe (4) A |
| 17.7 | 275 | 419 | (5) Ft (6) Py |
| 22.1 | 273 | 384 | (7) B(a)A (8) Chy |
| 28.5 | 254 | 451 | (9) B(b)Ft |
| 32.2 | 288 | 406 | (10) B(k)Ft (11) B(a)Py |
| 35.9 | 289 | 422 | (12) diB(a,h)A (13) B(ghi)Per |
| 40.0 | 297 | 496 | (14) 1(1,2,3-cd)Py |

La capacidad de los SUPRAS para extraer analitos en un amplio rango de polaridad se ha demostrado en la extracción de 14 fenoles de agua de mar y aguas residuales [74] y 12 bisfenoles, éteres diglicidílicos de bisfenol y derivados de productos alimenticios enlatados [75]. Las recuperaciones estaban en los rangos 95-114 % y 80-110 %, respectivamente. En ambos casos, técnicas sencillas como la LC-UV y LC-FL [75] se utilizaron para la determinación de los analitos [Tabla 6].



Tabla 6. Aplicaciones de los disolventes supramoleculares a la extracción simultánea de multicomponentes (≥ 10 compuestos) [37].

| Compuestos | Muestra | Tensoactivos basados en SUPRAS | Componente conductor en la fase de separación | Sistema de detección-separación | Proporción de volumen de fase (PVR) ^a , recuperación (R) |
|--|----------------------------------|---|---|---------------------------------|---|
| Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) | | | | | |
| 14 HAP de la lista de prioridades de la EPA (acenafteno y excluido el acenaftileno) | Agua de mar | Acuoso polioxietileno-10-éter de laurilo | Temperatura (90 °C) | LC-FL | PVR = 17.6 % R = 38-104 |
| 15 HAP de la lista de prioridades de la EPA (excluido el acenaftileno) | Agua embotellada y de río | Tritón X-114 acuoso | Temperatura(40 °C) | LC-FL | % R = 30-109 |
| 15 HAP de la lista de prioridades de la EPA (excluido el acenaftileno) | Suero humano | Tritón X-100 acuoso | Temperatura (60 °C) | LC-UV | % R ~ 100 |
| 13 HAP de la lista de prioridades de la EPA (excluido el acenaftileno, acenafteno y el indeno[1,2,3-cd]pireno) | Agua de mar | Polioxietileno acuoso éter de laurilo y Brij 30 | Temperatura (78 °C) | LC-FL | PVR = 11.1 % R = 72-99 |
| 16 HAP de la lista de prioridades de la EPA | Agua natural | Dodecano sulfonato acuoso | 4 mol·L ⁻¹ HCl | LC-FL | PVR = 140 % R = 62-106 |
| 10 HAP de la lista de prioridades de la EPA: acenafteno, antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno, fenantreno, pireno, fluoreno, fluoranteno | Agua del grifo | Sulfato de dodecilo acuoso | 6 mol·L ⁻¹ HCl | LC-FL | % R = 67-95 |
| 14 HAP de la lista de prioridades de la EPA (se excluyen el naftaleno y el acenaftileno) | Musgos | Ácido decanoico en THF | 0.01 mol·L ⁻¹ HCl | LC-FL | % R = 70-110 |
| Fenoles | | | | | |
| Fenol, 2,4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, <i>p</i> -cresol, 2-nitrofenol, 2-clorofenol, 2,4-dimetilfenol, 4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol, 4-cloro- <i>m</i> -cresol, 2,4,6-trimetilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4-cloro-3,5-dimetilfenol, 2,4,6-triclorofenol, pentaclorofenol | Agua del mar, aguas residuales | Genapol X acuoso | Temperatura (85 °C) | LC-UV | PVR = 5-10 % R = 95-114 |
| Tensoactivos | | | | | |
| 10 tensoactivos homólogos de dialquildimiel, alquilbencildimielo y alquiltrímetilamonio | Aguas residuales del lodo | Dodecano sulfonato acuoso | 3 mol·L ⁻¹ HCl | LC-ESI-MS (trampa de iones) | % R = 91-100 |
| Disruptores endócrinos | | | | | |
| 12 bisfenoles, bisfenol éteres de diglicidilo y derivados | Productos alimenticios enlatados | Tetradecanol en THF | Agua | LC-FL | % R = 80-110 |
| Disolventes residuales | | | | | |
| 37 disolventes residuales | Formulaciones farmacéuticas | Polímero (ácido undecilénico) en tetraglima | Agua | HS-GC-MS | % R = 70-120 |

^a Relación entre el volumen de la muestra y el volumen del SUPRA



Así, las principales aplicaciones han estado relacionadas con la extracción de HAP, que se espera que sean solubilizados en la región de hidrocarburos de los agregados supramoleculares por interacciones de dispersión, y para los cuales se obtienen comúnmente buenos rendimientos de extracción independientemente del SUPRA utilizado.

Como se ha mencionado anteriormente, la extracción de compuestos anfíflicos mediante la formación de agregados mixtos es una estrategia valiosa para obtener altos rendimientos de extracción de matrices complejas. Un ejemplo es la extracción de tensoactivos catiónicos de lodos de depuradora utilizando SUPRAS en 2003 hecho por Merino *et al.* que consisten en anfífilos de carga opuesta (por ejemplo, sulfonato de dodecano). Las recuperaciones fueron del 91-100 % utilizando LC-MS (trampa de iones) [76]. La Tabla 7 muestra las curvas de calibración obtenidas para cada compuesto objetivo en el rango de cantidades inyectadas examinado. Los coeficientes de correlación indican un buen ajuste. Los límites de detección instrumentales se calcularon utilizando una relación señal/ruido de 3 compuestos (la relación entre la intensidad del pico para cada compuesto en la solución estándar bajo las condiciones del cromatograma de iones extraídos y la intensidad del ruido) [76].

Tabla 7. Compuestos tensoactivos de lodos mediante SUPRAS anfíflicos y sus respectivas características del método [76].

| Tensoactivos catiónicos | m/z | m+SD ($\cdot 10^5$) | b+SD ($\cdot 10^5$) | r ^a | LOD ^b |
|-------------------------|-----|-----------------------|-----------------------|----------------|------------------|
| DDDAS | 382 | 51.8 ± 0.2 | 2 ± 3 | 0.998 | 006 |
| DDTAS | 438 | 37.1 ± 0.1 | 5 ± 6 | 0.998 | 006 |
| DHDAS | 494 | 19.4 ± 0.9 | 2 ± 8 | 0.995 | 007 |
| DTAS | 228 | 42.2 ± 0.3 | 0.3 ± 6 | 0.997 | 006 |
| TIAS | 256 | 72.8 ± 0.3 | 1 ± 7 | 0.997 | 005 |
| HTAS | 284 | 46.8 ± 0.4 | 2 ± 9 | 0.995 | 006 |
| BDDAS | 304 | 89.4 ± 0.3 | 1 ± 8 | 0.995 | 004 |
| BTDAS | 332 | 91.2 ± 0.4 | 3 ± 9 | 0.997 | 004 |
| DPS | 248 | 64.9 ± 0.4 | 2 ± 5 | 0.995 | 005 |
| HPS | 304 | 81.7 ± 0.3 | 3 ± 8 | 0.996 | 005 |

m: pendiente

b: ordenada al origen

SD: Desviación estándar

^a Coeficiente de correlación (n=9)

^b Límite de detección calculado como tres veces el ruido (ng inyectado); rango dinámico desde 0.2 ng de cada tensoactivo catiónico inyectado.



La aplicación de SUPRAS a la extracción de multicomponentes con puntos de ebullición que varían en un amplio rango de temperaturas es un buen ejemplo de la capacidad de SUPRAS para abrir nuevas vías para el tratamiento de muestras antes de la HS-GC-MS.

Sin embargo, a pesar de los prometedores avances logrados en la aplicación de SUPRAS a la extracción de multicomponentes, queda mucho por hacer en este ámbito, especialmente en lo que respecta a la extracción de un gran número de combinaciones no relacionadas estructuralmente y su combinación con LC-MS y GC-MS.



6. Aplicaciones de los SUPRAS

La amplia gama de propiedades de los disolventes supramoleculares hizo que éstos se convirtieran en un área importante de la ciencia y la tecnología. La ventaja innegable de las técnicas de extracción basadas en coacervados es el bajo consumo de disolventes orgánicos utilizados. También cabe destacar la ventaja económica con la reducción de la mano de obra y de los procedimientos que consumen tiempo, debido a la eliminación de ciertas operaciones para la preparación de la muestra para el análisis, que son necesarias en las técnicas de extracción convencionales. Las ventajas que pueden presentar estos disolventes entre algunas otras son:

- Un paso adicional de enriquecimiento (por ejemplo la SPE).
- Evaporación de la cantidad excesiva de disolvente (por ejemplo, bajo una corriente de nitrógeno).
- Limpieza del extracto.
- Carácter no tóxico de los disolventes utilizados para la síntesis del SUPRA.
- Cantidad significativamente menor de productos químicos utilizados como los disolventes orgánicos, en comparación con las técnicas de extracción convencionales, como la SPE y LLE.
- La extracción simultánea de varias muestras.
- El corto tiempo para alcanzar el equilibrio de extracción.
- Posibilidad de realizar la extracción en condiciones suaves, reduciendo el consumo de energía.
- Eliminación del problema de la formación de emulsiones.
- Posibilidad de extracción de analitos a partir de muestras sólidas y líquidas caracterizadas por ser una matriz compleja (por ejemplo, plasma, cerveza, lodos, plantas, etc.).
- Alta eficiencia de extracción (altos valores de recuperación, altos factores de concentración, bajos valores de LOD y LOQ).
- Sencilla combinación con los instrumentos analíticos utilizados en el análisis de muestras de extractos (por ejemplo, absorción atómica, análisis cromatográficos y electroquímicos).



Como resultado, los SUPRAS llevan a cabo un procedimiento de extracción sencillo que ahorra costos, energía y tiempo, y es respetuoso con el medio ambiente, así como la compatibilidad con analitos con amplios rangos de polaridad y carga. Los SUPRAS se utilizan cada vez más en la determinación de compuestos tóxicos y elementos pesados a nivel de trazas, incluidos los compuestos orgánicos en diferentes tipos de muestras, a menudo con matrices complejas. La obtención de buenos parámetros de análisis (altas recuperaciones y bajos valores de LOD y LOQ) es posible gracias a la alta concentración del tensoactivo en algunos coacervados. Además, como no siempre es necesario evaporar los disolventes tras la extracción, no hay pérdida de analitos, como Melnyk *et al.* lo expusieron en 2014 [14].

6.1 Desarrollos dependiendo del tipo de agregado del SUPRA

6.1.1 Micelas acuosas no iónicas

Las micelas no iónicas basadas en SUPRAS han probado tener una sustentabilidad en sus extracciones en un amplio rango de muestras y analitos. Sus aplicaciones están principalmente enfocadas en la extracción de HAP, pesticidas y compuestos bioactivos ambientales, alimentos y muestras biológicas, así como en la extracción de colorantes, disruptores endocrinos, fenoles y otros compuestos orgánicos.

La mayoría de las aplicaciones utilizan concentraciones de tensoactivos cercano al 1 %, aunque la extracción cuantitativa de compuestos bioactivos en muestras biológicas requiere porcentajes de tensoactivos mucho mayores (3-10 %). Dado que los factores de concentración están directamente relacionados con las relaciones de volumen muestra/SUPRA (PVR) y el volumen del SUPRA depende principalmente del porcentaje de tensoactivo en la muestra, no se esperan factores de concentración elevados utilizando SUPRAS acuosos basados en micelas no iónicas. Por lo general, se alcanzan límites de detección a nivel de $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, que no son lo suficientemente bajos para muchas aplicaciones.

Ballesteros-Gómez *et al.* han reportado en 2010 que se han desarrollado algunas aplicaciones destacadas utilizando concentraciones bajas de Tritón X-114 (0.1-0.25 %). Se han obtenido valores de PVR de 50 para pesticidas, 73-152 para disruptores endocrinos y 500 para residuos de filtros UV trabajando a temperaturas en el rango de 45-60 °C bajo la adición de sales.

La detección LC-UV sigue siendo el sistema más frecuentemente utilizado para analizar los extractos de SUPRAS. La falta de disponibilidad comercial de los tensoactivos no iónicos en forma de homólogos u oligómeros puros es un grave inconveniente para el análisis cromatográfico. La mayoría de las recuperaciones se sitúan en el rango del 80-100 %, lo que demuestra la alta eficacia de extracción en este tipo de disolventes [15].



6.1.2 Micelas acuosas iónicas

Los SUPRAS producidos por la coacervación de micelas iónicas en un medio ácido han sido por mucho los más usados entre las micelas iónicas. Han sido exitosamente aplicados en la extracción de una variedad de analitos, incluyendo HAP, en pesticidas y tensoactivos en muestras ambientales. También han sido desarrolladas interesantes aplicaciones de micelas catiónicas para la extracción de compuestos bioactivos y clorofenoles.

Una desventaja para la aplicación rutinaria de los SUPRAS basados en micelas acuosas proviene de las fuertes condiciones experimentales en las que se produce el crecimiento de los agregados (por ejemplo, $3\text{-}4 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HCl o 4 g de NaCl). Sin embargo, estas condiciones indeseables han sido reconocidas como esenciales para el tratamiento exitoso de muestras sólidas ambientales muy complejas como suelos, lodos y sedimentos. Así, se ha demostrado que el medio ácido favorece la desorción de los tensoactivos catiónicos de los lodos, probablemente debido a un mecanismo de intercambio de iones.

Se puede alcanzar un PVR lo suficientemente alto para analitos en muestras acuosas a baja concentración de tensoactivos. Los límites de detección a nivel de $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ se obtienen mediante LC-UV y LC-FL, respectivamente. A diferencia de los tensoactivos no iónicos basados en micelas, los aniónicos están disponibles comercialmente como homólogos simples y presentan tiempos de retención bajos, lo que los hace ideales para la detección por ME, ya que pueden dirigirse con precisión a los residuos con tiempos de retención cortos después de la separación cromatográfica [15].

6.1.3 Micelas mixtas acuosas

Se espera que las micelas mixtas autoensambladas a partir de diferentes polímeros en bloque que interactúan a través de interacciones hidrofóbicas débiles, y las interacciones a través del reconocimiento molecular, las interacciones iónicas, así como la reticulación química en el núcleo se comporten de manera diferente. En la Figura 23 se muestra un esquema de la composición de una mezcla de micelas.

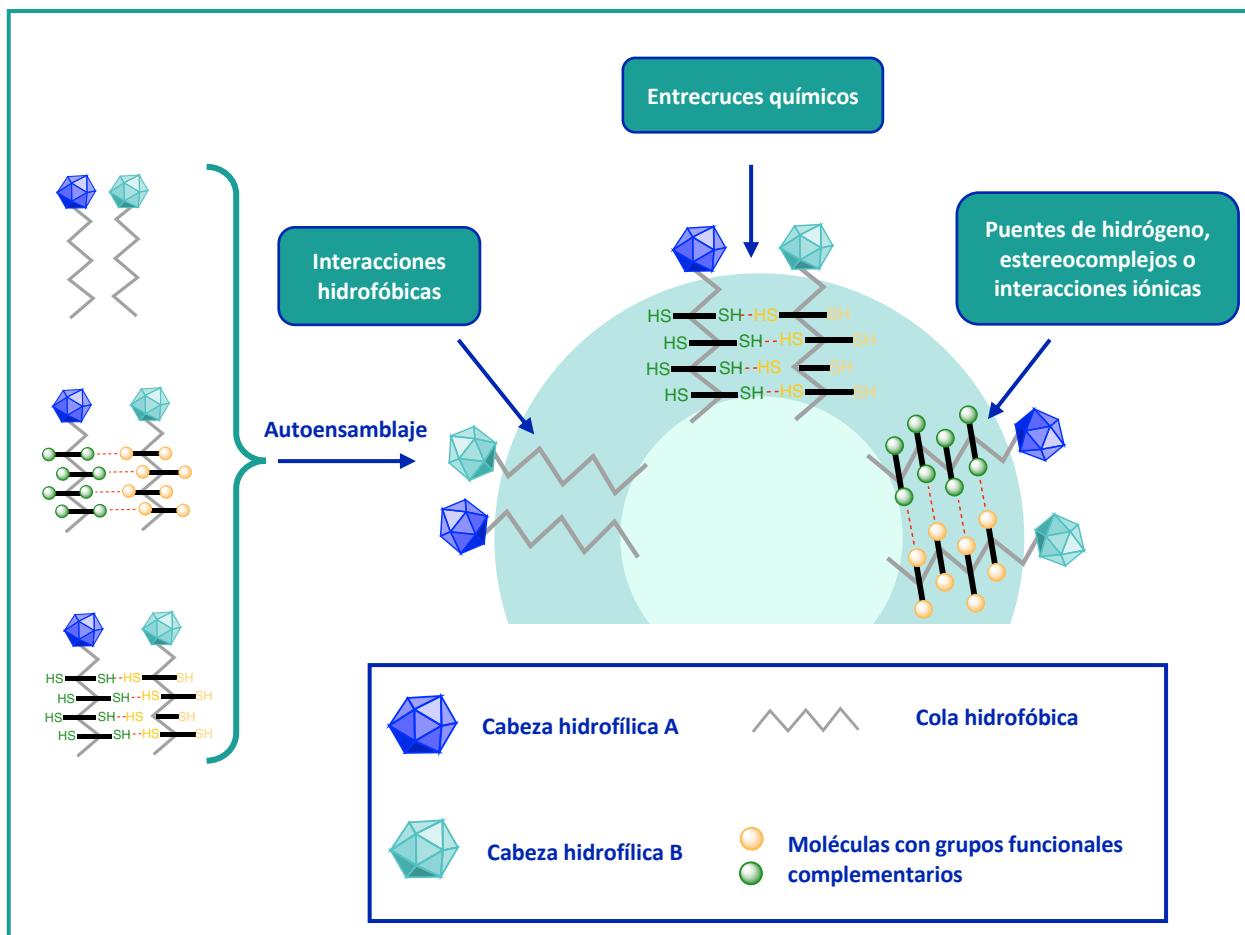


Figura 23. Presentación esquemática de la formación de micelas mixtas a través de diversas interacciones del núcleo [77].

La coacervación de micelas acuosas mixtas ha sido una estrategia para favorecer la extracción de compuestos cargados de muchos analitos de interés. El componente que impulsa la separación de fases ha sido principalmente la temperatura, tanto en presencia como en ausencia de alguna sal. De nuevo, Tritón X-114 ha sido el tensoactivo no iónico utilizado preferentemente en estas mezclas para la extracción de compuestos aniónicos y catiónicos, respectivamente. Se han extraído diversos analitos, como:

- Pesticidas. Un ejemplo muy particular es el primer desarrollo reportado por Zarei para la extracción de hidrazina en el 2007. El método propuesto es un procedimiento espectrofotométrico sencillo, muy sensible y de bajo costo para la determinación de la hidrazina que puede aplicarse a muestras de agua y biológicas. Se utilizó el tensoactivo no iónico Tritón X-114 y NaCl para la preconcentración de la hidrazina en las muestras, y así se ha evitado la extracción con disolventes tóxicos [78].



- Compuestos bioactivos. Kukusamude *et al.* desarrollaron en 2010 una extracción micelar mixta para el análisis de antibióticos penicilina (ampicilina, penicilina G, oxacilina y cloxacilina) en muestras de leche utilizando Tritón X-114 y bromuro de trimetilamonio como extractante micelar mixto [79].
- Colorantes. Pourreza *et al.* desarrollaron en 2009 un método de extracción por SUPRAS para la determinación de trazas de Naranja II por espectrofotometría. El método se basa en la extracción del Naranja II de una solución acuosa utilizando micelas mixtas de Tritón X-100 y bromuro de cetiltrimetil amonio en medio ácido. La fase rica en tensoactivos extraída se diluye con agua y su absorbancia se mide a 484 nm mediante un espectrofotómetro [80].
- Ácidos húmicos y fúlvicos. Wuilloud *et al.* desarrollaron en 2003 un método de preconcentración y determinación de estos ácidos a niveles traza en muestras de agua natural. Se empleó con éxito la CPE para la preconcentración del ácido húmico (HA) y del ácido fúlvico (FA) antes de la determinación utilizando un sistema de inyección de flujo acoplado a un detector espectrofotométrico UV-vis. La extracción cuantitativa de HA y FA dentro de un amplio rango de pH (pH = 1-12) se obtuvo mediante la neutralización de la carga aniónica de las sustancias húmicas con un tensoactivo catiónico: el bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Esto generó una especie hidrofóbica que fue posteriormente solubilizada en las micelas de un tensoactivo no iónico Tritón X-114 [81].
- Explosivos de muestras ambientales y biológicas. Babaee y Beiraghi desarrollaron el método de extracción, separación y determinación de cuatro explosivos: octahidro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazina (HMX), hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX), 2,4,6-trinitrotolueno (TNT) y tetranitrato de pentaeritritol (PETN) en muestras de agua de río y pozo. Estos compuestos se trajeron utilizando Tritón X-114 y bromuro de cetiltrimetilamonio. Para estas extracciones se han obtenido recuperaciones cuantitativas y un PVR de hasta 167 a bajas concentraciones de tensoactivos [82].

Al igual que con los SUPRAS acuosos basados en micelas simples no iónicas, la detección por UV ha sido el modo de detección preferido en el análisis cromatográfico de los extractos, por lo que se han obtenido límites de detección al nivel de $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [15].



6.1.4 Micelas inversas

Los SUPRAS anteriormente mencionados ya han demostrado su aplicabilidad a la extracción de una amplia variedad de analitos, tales como HAP, compuestos bioactivos, colorantes, disruptores endocrinos y micotoxinas en muestras ambientales (aguas naturales y superficiales) y agroalimentarias (alimentos grados y no grados, verduras, frutas y bebidas) [Tabla 6].

La principal ventaja de los SUPRAS basados en micelas inversas es la alta concentración de anfífilos en el disolvente, lo que permite obtener altos factores de concentración cuando se aplican a muestras líquidas. Las fuerzas que impulsan la extracción son los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas, siendo los primeros un mecanismo de solubilización extremadamente eficaz para los compuestos polares. La gran capacidad de solubilización de estos SUPRAS hace que los tiempos de extracción sean cortos. La mayoría de las recuperaciones notificadas para los analitos investigados hasta ahora eran superiores al 85 %.

Se han realizado estudios exhaustivos sobre la influencia de los principales componentes de las matrices alimentarias en la formación de SUPRAS basados en micelas inversas [22]. Las proteínas, por ejemplo, floculan en el medio necesario y provocan un precipitado blanquecino que queda en el fondo del SUPRA como una capa muy fina después de la extracción y centrifugación, lo que impide que interfieran. Se espera que los lípidos se extraigan en el SUPRA mediante la formación de agregados mixtos. Sin embargo, se ha obtenido una variación de volumen no apreciable en las aplicaciones comunicadas hasta ahora incluso cuando se trajeron alimentos muy grados [37].

La explicación probable a este comportamiento es que la cantidad de lípidos a incorporar no era suficiente para que se notara en comparación con la alta concentración de anfífilos en el disolvente. Otros componentes, como los azúcares o el etanol de las bebidas alcohólicas, provocan modificaciones en el límite superior del diagrama de fases de los SUPRAS basados en micelas inversas (Figura 24B). Sin embargo, estas modificaciones son irrelevantes para su uso en extracciones, ya que las aplicaciones analíticas suelen realizarse cerca del límite inferior de la fase para utilizar la mínima cantidad de THF. Estos SUPRAS son compatibles con la detección UV, FL y MS debido a su alta capacidad de solubilización utilizando bajos volúmenes de disolvente volúmenes de disolvente, los LOD típicos comunicados hasta ahora están en el nivel bajo de $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ y μL^{-1} [15].

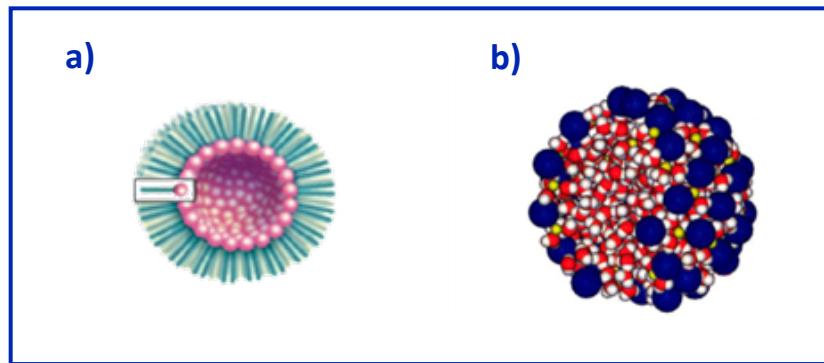


Figura 24. Ilustración de (a) una micela inversa y (b) un modelo más realista de micela inversa [99].

Las esferas azules de la Figura 24 representan los grupos de cabeza del tensoactivo, mientras que las esferas amarillas más pequeñas denotan los contraíones. Obsérvese que los grupos de cabeza del tensoactivo no protegen completamente el interior acuoso de la micela inversa (b) [83].

6.1.5 Vesículas

Los SUPRAS formados por vesículas de ácidos carboxílicos se han aplicado con éxito a:

- Extracción de pesticidas en frutas y verduras. Moral *et al.* desarrollaron en 2009 la extracción de pesticidas benzimidazólicos (BF) de frutas y verduras. Propusieron un SUPRA formado por vesículas, compuestas por cantidades equimoleculares de ácido decanoico (DeA) y decanoato de tetrabutilamonio (Bu_4NDe) dispersas en una fase acuosa continua. El carbendazim (CB), el tiabendazol (TB) y el fuberidazol (FB) se trajeron en un solo paso y no fue necesario limpiar ni centrar los extractos. La alta eficiencia de extracción obtenida para los FB fue el resultado de los diferentes tipos de interacciones proporcionadas por el disolvente supramolecular (por ejemplo, enlaces hidrofóbicos y de hidrógeno) y el alto número de sitios de solubilización que contiene [56].
- Disruptores endocrinos. Ruiz *et al.* propusieron en 2007 coacervados formados por vesículas de ácido decanoico, inducidos por tetrabutilamonio para la extracción de bisfenoles A y F (BPA y BPF) y sus correspondientes diglicidiléteres (BADGE y BFDGE) de aguas residuales y fluviales. Las fuerzas motrices de la extracción fueron la hidrofobia, los puentes de hidrógeno y los cationes. El método se aplicó a su determinación en muestras de aguas residuales y fluviales crudas y tratadas [84].
- Fenoles en muestras de agua ambiental. En 2008, López-Jiménez *et al.* investigaron los parámetros que afectan a la eficacia de la microextracción coactiva de gota única (SDCME) utilizando coacervados vesiculares como disolvente y 2-clorofenol (CP), 2,4-diclorofenol (DCP), 2,4,6-triclorofenol (TCP) y pentaclorofenol (PCP) como analitos modelo (Figura 25) [57].

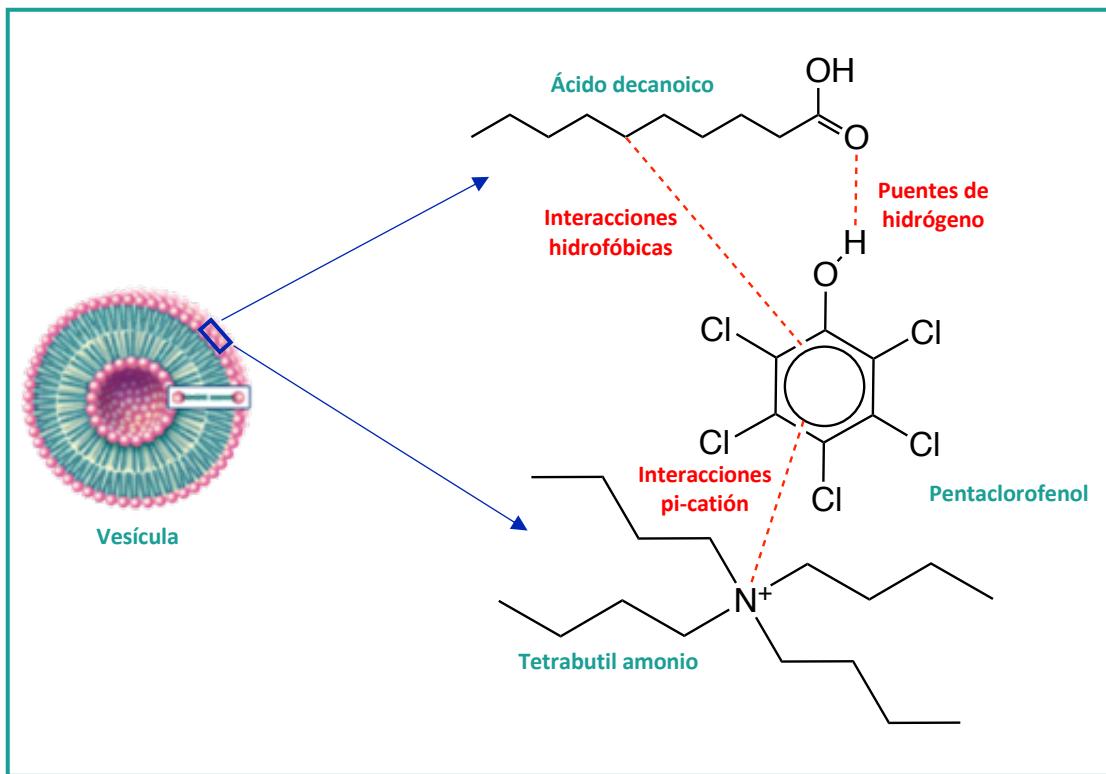


Figura 25. Esquema de las fuerzas intermoleculares responsables de la extracción de clorofenooles por coacervados basados en vesículas de ácido decanoico [57].

Las ventajas de estos SUPRAS son la gran concentración de anfífilos reportada para un SUPRA hasta el momento, el número de interacciones que ofrecen para la solubilización del analito (iónicas, puentes de hidrógeno e hidrofóbicas), su estabilidad cinética que permite utilizar los SUPRAS para la extracción de muestras que no contienen el componente que conduce la separación de fases, y las grandes fuerzas de cohesión entre las moléculas que permiten su uso en microextracciones de gota única [15].

6.2 Desarrollo de SUPRAS y sus características para analitos específicos

6.2.1 Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)

La aplicación de los SUPRAS a la extracción de HAP se ha centrado principalmente en muestras ambientales y sólo recientemente se han propuesto SUPRAS basados en micelas inversas para la determinación de HAP en alimentos (por ejemplo, benzo[a]pireno en infusiones de té y café) propuesto en 2009 por Ballesteros-Gómez *et al* [16].

Los principales problemas relacionados con el análisis de los HAP en el medio ambiente siguen siendo sus bajas concentraciones en el agua ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$) y las pérdidas asociadas a la sorción en los contenedores durante el almacenamiento. Las primeras aplicaciones de los SUPRAS a la extracción de HAP implicaban el uso de tensoactivos no iónicos como Tritón X-114, antes de la



determinación de LC-FL, como García *et al.* lo explicaron en 1994 [85]. Las principales limitaciones de estas metodologías eran las señales UV y FL interferentes que mostraban los tensoactivos coeluyentes. La inclusión de un paso de limpieza con una columna de gel de sílice fue una estrategia propuesta para superar estos obstáculos. Un enfoque más conveniente fue el uso de tensoactivo iónicos. Así, los SUPRAS compuestos por tensoactivos aniónicos [86] eluyeron antes en el cromatograma, permitiendo así la determinación de los HAP más polares en suelos, sedimentos, lodos y aguas. La principal desventaja de estos métodos era la elevada cantidad de ácido necesario para la coacervación (4 M aproximadamente)

Ballesteros-Gómez *et al.* mejoraron mucho la sensibilidad para la determinación de HAP cancerígenos en muestras de agua ambiental con el uso de SUPRAS basados en micelas inversas. Así, notificaron factores de concentración cercanos a 280 que son mucho más elevados que los proporcionados con Tritón X-114 (Tabla 8) [31]. Con Tritón X-114 se han reportado factores de concentración más bajos (10-15) [85]. Con este método se obtuvieron límites de detección lo suficientemente bajos para el cumplimiento de la legislación, $0.1\text{-}1 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$.



Tabla 8. Porcentajes promedio de recuperación junto con sus desviaciones estándar y factores de concentración real (ACF) obtenidos para los hidrocarburos aromáticos policíclicos cancerígenos (CPAH) en función de la cantidad de ácido decanoico [31].

| CPAH | Ácido decanoico (mg) | | | | | | | | | | | | | |
|-------|----------------------------------|-----|----------------------------------|-----|----------------------------------|-----|----------------------------------|-----|----------------------------------|-----|----------------------------------|-----|----------------------------------|-----|
| | 20 | | 40 | | 60 | | 70 | | 80 | | 200 | | 400 | |
| | R ^a ± SD ^c | ACF |
| BaA | 56 ± 2 | 607 | 65 ± 3 | 353 | 88 ± 1 | 318 | 91 ± 3 | 282 | 92 ± 2 | 249 | 94 ± 3 | 102 | 98 ± 1 | 53 |
| Chry | 56 ± 3 | 607 | 65 ± 1 | 353 | 87 ± 4 | 314 | 91 ± 1 | 282 | 93 ± 2 | 252 | 95 ± 2 | 103 | 97 ± 1 | 53 |
| BbF | 54 ± 1 | 585 | 66 ± 5 | 358 | 87 ± 2 | 314 | 92 ± 3 | 285 | 92 ± 2 | 249 | 96 ± 4 | 104 | 99 ± 4 | 54 |
| BkF | 54 ± 3 | 585 | 64 ± 4 | 348 | 89 ± 4 | 322 | 93 ± 2 | 288 | 92 ± 3 | 249 | 96 ± 2 | 104 | 98 ± 5 | 53 |
| BaPy | 54 ± 4 | 585 | 64 ± 2 | 348 | 88 ± 1 | 318 | 93 ± 3 | 288 | 91 ± 3 | 247 | 95 ± 6 | 103 | 98 ± 2 | 53 |
| DahAn | 53 ± 2 | 574 | 63 ± 1 | 342 | 89 ± 2 | 322 | 91 ± 4 | 282 | 92 ± 2 | 249 | 95 ± 3 | 103 | 97 ± 2 | 53 |
| IP | 51 ± 1 | 553 | 62 ± 1 | 342 | 87 ± 1 | 314 | 92 ± 2 | 285 | 93 ± 4 | 252 | 97 ± 2 | 105 | 99 ± 5 | 54 |

* CPAH: Hidrocarburos aromáticos policíclicos cancerígenos.



Por otro lado, en la literatura se han propuesto varias metodologías en línea para el análisis de HAP. Con la automatización, se evitan los procedimientos de equilibrio y centrifugación, lo que simplifica todo el proceso de extracción y acorta el tiempo de análisis.

En 2008, Li *et al.* reportaron una metodología donde el tensoactivo no iónico Tergitol 15-S-7 se utilizó con éxito como extractor mediado por tensoactivos en extracciones de suelos asistidas por ultrasonidos y microondas antes de la preconcentración por CPE y el análisis por el método de acoplamiento en línea FIA-CPE-LC-FL/UV. Las soluciones acuosas filtradas de tensoactivos que contenían HAP se cargaron en el sistema y luego se mezclaron con sulfato de amonio, que se añadió para inducir el CP del Tergitol a temperatura ambiente. El fenómeno de CP se produjo en la unión de los tubos y el tensoactivo resultante que contenía HAP fue retenido en una columna de gel de sílice [87].

Song *et al.* también informaron en 2006 un método en línea para el análisis del benzo[a]pireno con la CP inducida por sal de Tritón X-114 en muestras acuosas antes de la detección por quimioluminiscencia en LC, basado en un dispositivo similar pero utilizando una columna de algodón en su lugar [88].

Por último, cabe mencionar la idoneidad de los métodos coactivos para la conservación de los HAP durante el almacenamiento. La adición de SDSA (1 %) a las muestras de agua durante el almacenamiento antes de la coacervación se utilizó para evitar la adsorción de los HAP en los contenedores mediante micelas a base de tensoactivos. Sicilia *et al.* utilizaron en 1999 el tensoactivo aniónico ácido dodecano sulfónico sódico (SDSA) para la extracción y preconcentración de los 16 HAP clasificados como contaminantes prioritarios por La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) a partir de muestras de agua (de red, subterránea y de río). El uso de SDSA ofrecía dos ventajas significativas respecto a los tensoactivos no iónicos: bajas señales de fluorescencia y absorbancia en las longitudes de onda de detección de los HAP (por la ausencia de una fracción aromática en la molécula del tensoactivo), y un bajo tiempo de retención cromatográfico (debido al carácter polar de SDSA) [86].



Los disolventes supramoleculares han demostrado también una gran capacidad estabilizadora para la extracción y conservación *in situ* de los HAP, facilitando su transporte y almacenamiento. Luque *et al.* investigaron en 2007 por primera vez la idoneidad de los coacervados para la conservación de contaminantes orgánicos tras su extracción de muestras de agua. Para ello se seleccionaron coacervados basados en micelas de ácido dodecansulfónico inducido por ácido (SDSA), teniendo capacidad para preservar tensoactivos homólogos al benzalconio (C_{12} , C_{14} y C_{16}) y diferentes tipos de HAP (benzo[a]pireno (BaP), benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[ghi]perileno (BghiP), benzo[a]antraceno (BaA) e indeno[1,2,3-c,d]pireno) (Tabla 9). Estos compuestos fueron extraídos eficazmente por el coacervado mediante la formación de agregados mixtos e interacciones hidrofóbicas. Se investigó su estabilidad en el coacervado en diferentes condiciones de temperatura y concentración de ácido clorhídrico, que se utilizó para inducir la coacervación. No se observaron pérdidas durante al menos 3 meses en las diferentes condiciones experimentales probadas. El aumento de la temperatura hasta 35 °C durante un mes no afectó a la estabilidad de los compuestos objetivo. No se observó ninguna influencia de la matriz del agua (destilada, de río o residual) en la estabilización de estos hidrocarburos [89].



Tabla 9. Recuperación promedio de tensoactivos a base de benzalconios y HAP derivados de muestras ambientales de agua posterior a su almacenamiento con coacervados de SDSA inducido por ácido a 4 °C por un mes [89].

| Tiempo (semana) | Aguas residuales (influente) | | | | Aguas residuales (efluente) | | | | Agua de río (Guadalquivir) | | | |
|--------------------|--|--------------------|--------------------|------------------|------------------------------|--------------------|------------------|--------------------|----------------------------|------------------|------------------|---------|
| | BDDA | BDTA | BDHA | BDDA | BDTA | BDHA | BDDA | BDTA | BDHA | BDTA | BDHA | |
| | Tensoactivos de benzalconio | | | | | | | | | | | |
| 0 | 0.198 ± 0.008 | 0.182 ± 0.005 | 0.200 ± 0.004 | 0.208 ± 0.009 | 0.188 ± 0.005 | 0.200 ± 0.004 | 0.203 ± 0.007 | 0.186 ± 0.005 | 0.184 ± 0.004 | | | |
| 4 | 0.181 ± 0.002 | 0.1702 ± 0.0004 | 0.1791 ± 0.0009 | 0.186 ± 0.006 | 0.175 ± 0.002 | 0.176 ± 0.002 | 0.191 ± 0.005 | 0.17 ± 0.02 | 0.17 ± 0.02 | | | |
| Tiempo (semana) | Aguas residuales (influente) | | | | Aguas residuales (influente) | | | | Agua de río (Guadalquivir) | | | |
| | BbF | BkF | BaP | B(ghi)P | BbF | BkF | BaP | B(ghi)P | BbF | BkF | BaP | B(ghi)P |
| | Hidrocarburos aromáticos polinucleares | | | | | | | | | | | |
| 0 | 0.17 ± 0.02 | 0.18 ± 0.01 | 0.18 ± 0.01 | 0.17 ± 0.02 | 0.18 ± 0.02 | 0.19 ± 0.01 | 0.19 ± 0.02 | 0.17 ± 0.02 | 0.18 ± 0.01 | 0.18 ± 0.01 | 0.18 ± 0.02 | |
| 1 | 0.18 ± 0.01 | 0.169 ± 0.008 | 0.150 ± 0.007 | 0.150 ± 0.010 | 0.190 ± 0.003 | 0.177 ± 0.006 | 0.169 ± 0.003 | 0.186 ± 0.003 | 0.164 ± 0.002 | 0.16 ± 0.01 | 0.16 ± 0.02 | |
| 2 | 0.163 ± 0.004 | 0.165 ± 0.004 | 0.152 ± 0.004 | 0.18 ± 0.01 | 0.170 ± 0.005 | 0.172 ± 0.005 | 0.168 ± 0.006 | 0.18 ± 0.02 | 0.181 ± 0.007 | 0.182 ± 0.003 | 0.178 ± 0.002 | |
| 3 | 0.17 ± 0.02 | 0.177 ± 0.003 | 0.1729 ± 0.0003 | 0.175 ± 0.005 | 0.19 ± 0.02 | 0.185 ± 0.006 | 0.169 ± 0.002 | 0.179 ± 0.005 | 0.1981 ± 0.0007 | 0.188 ± 0.006 | 0.175 ± 0.002 | |
| 4 | 0.189 ± 0.006 | 0.183 ± 0.006 | 0.181 ± 0.003 | 0.17 ± 0.02 | 0.180 ± 0.006 | 0.1851 ± 0.0003 | 0.181 ± 0.003 | 0.1951 ± 0.0008 | 0.1716 ± 0.0005 | 0.18 ± 0.01 | 0.19 ± 0.02 | |

* n=2



6.2.2 Pesticidas

El análisis de pesticidas a nivel de ultratrazas, necesario para el cumplimiento de las legislaciones en cada país, exige métodos altamente sensibles que puedan proporcionar también suficiente selectividad en matrices alimentarias complejas. Un ejemplo de estas legislaciones se ven presentadas en la Directiva Europea sobre la calidad del agua destinada al consumo humano, donde se han establecido niveles individuales máximos de $100 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ para las aguas potables, siendo este valor más restrictivo para algunos plaguicidas clorados persistentes [90].

En la literatura se han propuesto varios enfoques basados en la extracción SUPRAS para la determinación de plaguicidas en muestras ambientales, agroalimentarias y biológicas. El Tritón X-114 y el Tritón X-100 se utilizaron para extraer:

- Residuos de insecticidas. Santalad *et al.* desarrollaron en 2009 un método para la extracción de residuos de insecticidas en frutas a través del CPE utilizando Tritón X-114 para la extracción y preconcentración de residuos de insecticidas carbamatos (metomilo, propoxur, carbofurano, carbaril, isoprocarb y promecarb) en muestras de fruta (Tabla 10). Las condiciones óptimas de la CPE fueron 1.5 % (m/V) de Tritón X-114, 7.0 % (m/V) de NaCl y 20 minutos de equilibrio a 45 °C. A continuación, la fase rica en tensoactivos se analizó mediante HPLC en fase reversa con detección UV a 270 nm, bajo separación en gradiente utilizando metanol y ácido acético al 0.1 % (V/V) [26].



Tabla 10. Recuperación de los insecticidas carbamatos estudiados en muestras de frutos obtenidos por CPE (n=3) [26].

| Carbamato (rendimiento, media ± SD) | | | | | | |
|-------------------------------------|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | MTM | PPX | CBF | CBR | IPC | PMC |
| (mg·kg ⁻¹) | Manzana | | | | | |
| 10 | - | 89.2 ± 3.43 | 91.3 ± 1.65 | 98.9 ± 1.3 | 86.7 ± 0.36 | 88.6 ± 2.89 |
| 20 | - | 98.5 ± 1.32 | 101 ± 6.12 | 94.2 ± 1.08 | 90.3 ± 2.13 | 80.0 ± 6.09 |
| 30 | - | 99.4 ± 8.51 | 107 ± 1.75 | 93.8 ± 6.82 | 98.5 ± 9.15 | 89.8 ± 5.28 |
| % R | - | 95.7 ± 6.75 | 99.8 ± 7.59 | 95.6 ± 4.30 | 91.8 ± 7.05 | 86.1 ± 6.29 |
| (mg·kg ⁻¹) | Pera | | | | | |
| 10 | - | - | - | 87.1 ± 2.90 | - | 82.3 ± 8.04 |
| 20 | - | - | - | 85.7 ± 1.66 | - | 84.8 ± 2.84 |
| 30 | - | - | - | 97.8 ± 9.04 | - | 85.7 ± 4.97 |
| % R | - | - | - | 90.2 ± 9.04 | - | 84.3 ± 5.16 |
| (mg·kg ⁻¹) | Guayaba | | | | | |
| 10 | - | 83.3 ± 5.13 | 84.7 ± 3.51 | 92.4 ± 8.43 | 83.5 ± 3.07 | 80.0 ± 6.00 |
| 20 | - | 87.3 ± 2.75 | 86.3 ± 2.08 | 91.4 ± 1.62 | 88.0 ± 0.84 | 81.2 ± 2.75 |
| 30 | - | 90.6 ± 3.29 | 87.2 ± 1.93 | 99.8 ± 6.96 | 88.2 ± 9.01 | 96.1 ± 7.81 |
| % R | - | 87.1 ± 4.58 | 86.1 ± 2.51 | 94.6 ± 6.81 | 85.6 ± 5.31 | 85.8 ± 9.32 |

SD: Desviación estándar

% R: Porcentaje de recuperación promedio

- Plaguicidas organofosforados en orina humana. Jia *et al.* desarrollaron en 2008 un procedimiento para la determinación de plaguicidas organofosforados (OPP) (forato, diazinón, paratión-metilo, fentión y quinalfos) en orina humana utilizando la extracción del punto de turbidez de Tritón X-114 junto con la retroextracción asistida por microondas antes del análisis por cromatografía de gases con detección por fotometría de llama (GC-FPD) (Tabla 11). El método demostró tener potencial para el monitoreo biológico [91].



Tabla 11. Comparación del rendimiento a través con el método CPE con el de otros métodos informados para extraer los OPP estudiados de la orina [91].

| Extracciones | Análisis | OPP | Rango lineal (ng·mL ⁻¹) | Rendimiento (%) | LOD (ng·mL ⁻¹) |
|------------------------|----------|--|--|-----------------|-------------------------------|
| SPME | GC-FPD | Diazinón/paratión-metilo/fentión | 1-100 | 82-140 | 0.1-0.4 |
| SPME | GC-MS | Quinalfos | 10-500, 500-50,000 | 24.5-27.7 | 2 |
| Retroextracción CPE | GC-FPD | Diazinón/ paratión-metilo/ fentión/quinalfos | 0.10-20 | 85-107 | 0.04/0.08/ 0.07/0.07 |

SPME: Microextracción en fase sólida

GC/FPD: Cromatografía de gases acoplado a detector fotométrico de flama

- Hidrazina en aguas y muestras biológicas. Zarei investigó en 2007 un proceso de CPE utilizando una micela mixta de dodecil sulfato de sodio y Tritón X-114 para extraer hidrazina de soluciones acuosas (Tabla 12). El método se basa en la reacción de condensación de la hidrazina con el *p*-(dimetilamino)benzaldehído, la formación de azina y la extracción mediada por micelas mixtas de azina en presencia de NaCl como inductor de la separación de fases. El producto de azina se concentró en la fase rica en tensoactivos tras la separación. El método se aplicó con éxito a la determinación de la hidrazina en muestras de agua y biológicas [78].

**Tabla 12.** Determinación de hidrazina en agua y muestras biológicas por el método propuesto [78].

| Muestras | Hidrazina ($\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) | | |
|--------------|--|------------------|------------------|
| | Enriquecido | Encontrado | Recuperación (%) |
| Agua potable | 2.0 | 1.98 ± 0.12 | 99 |
| | 5.0 | 5.08 ± 0.23 | 101.6 |
| | 20 | 19.7 ± 0.30 | 98.5 |
| | 50 | 49.6 ± 0.41 | 99.2 |
| Agua de río | 10 | 10.3 ± 0.11 | 103 |
| | 30 | 31.1 ± 0.33 | 103.7 |
| | 70 | 68.7 ± 0.41 | 98.1 |
| Suero humano | 10 | 10.5 ± 0.21 | 105 |
| | 40 | 38.4 ± 0.51 | 96 |
| | 100 | 104.2 ± 1.28 | 104.2 |
| Orina humana | 10 | $9.82 \pm .29$ | 98.2 |
| | 20 | $21. 1 \pm 0.35$ | 105.5 |
| | 40 | 41.4 ± 0.56 | 103.5 |
| | 60 | 57.7 ± 0.62 | 96.2 |

- Prometrina en agua y suelos. Zhou *et al.* desarrollaron en 2009 un método CPE-HPLC (UV) para la determinación de la prometrina (Tabla 13). En este método, se utilizó primero Tritón X-114 para extraer y preconcentrar la prometrina de las muestras de agua y suelo, investigando los parámetros y las variables que afectaban a la extracción y se descubrió que las condiciones óptimas eran el 0.5 % de Tritón X-114 (m/V), el 3 % de NaCl (m/V) y calor a 50 °C durante 30 min. Utilizando estas condiciones, las tasas de recuperación de prometrina oscilaron entre el 92.84 % y el 99.23 % en el agua y entre el 85.48 % y el 93.67 % en el suelo, respectivamente [92].

**Tabla 13.** Recuperación, repetibilidad, reproducibilidad y D.S.R. de Prometrina en agua y suelo [92].

| Matriz ambiental | Agregado (mg·kg ⁻¹) | Dia 1 (n = 6) | | | Dia 2 (n = 6) | | | CV _R (%) |
|------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------|----------------|-----------------------------------|------------|----------------|---------------------|
| | | Encontrado (mg·kg ⁻¹) | R.S.D. (%) | Recuperado (%) | Encontrado (mg·kg ⁻¹) | R.S.D. (%) | Recuperado (%) | |
| Agua | 0.4 | 0.397 | 0.93 | 99.23 | 0.394 | 0.80 | 98.58 | 0.90 |
| | 2 | 1.941 | 1.90 | 97.06 | 1.940 | 2.35 | 97.00 | 2.04 |
| | 10 | 9.679 | 2.02 | 96.79 | 9.284 | 2.38 | 92.84 | 3.02 |
| Tierra | 0.4 | 0.375 | 2.07 | 93.67 | 0.370 | 1.53 | 92.55 | 1.85 |
| | 2 | 1.748 | 1.96 | 87.40 | 1.710 | 1.48 | 85.48 | 2.03 |
| | 10 | 9.124 | 2.34 | 91.24 | 8.919 | 2.05 | 89.19 | 2.41 |

R.S.D: media de concentración en cada dia.

CV_R: media de concentración medida 12 veces.

- Carbamatos en maíz. Zhou *et al.* propusieron en 2009 un método altamente sensible para la determinación de arprocarb (AC), carbofurano (CF), isoprocarb (IC) y fenobucarb (FC) (Tabla 14). El método se basa en la hidrólisis alcalina de los cuatro plaguicidas carbamatos, y los productos de hidrólisis resultantes se hacen reaccionar con 4-aminoantipireno (AP) para dar cuatro productos de color rojo. Los compuestos coloreados se enriquecen y separan por el método de CPE utilizando Tritón X-100, y la fase coacervada que contiene los compuestos se determina con HPLC en la región visible [93].

**Tabla 14.** Resultados del análisis en muestras de maíz [93].

| Pesticida | Agregado ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | Encontrado en CPE ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (media \pm SD, n=5) | LLE ^a encontrado ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) (media \pm SD, n=5) | Encontrado en CPE (%) (media \pm RSD, n=5) |
|-------------|--|--|--|--|
| Arprocarbo | 2 | 1.64 \pm 0.07 | nd | 82.3 \pm 3.5 |
| | 20 | 17.77 \pm 0.45 | nd | 88.8 \pm 2.3 |
| | 200 | 182.67 \pm 4.04 | 179.64 \pm 3.54 | 91.4 \pm 2.0 |
| Carbofurano | 2 | 1.69 \pm 0.08 | nd | 84.2 \pm 3.8 |
| | 20 | 18.00 \pm 0.53 | nd | 90.0 \pm 2.6 |
| | 200 | 188.33 \pm 2.08 | 178.83 \pm 4.76 | 94.2 \pm 1.1 |
| Isoprocarbo | 2 | 1.69 \pm 0.09 | nd | 84.7 \pm 4.0 |
| | 20 | 18.27 \pm 0.60 | nd | 91.3 \pm 3.0 |
| | 200 | 181.67 \pm 3.79 | 178.87 \pm 3.76 | 90.8 \pm 1.9 |
| fenobucarbo | 5 | 4.64 \pm 0.14 | nd | 86.6 \pm 2.7 |
| | 20 | 17.87 \pm 0.35 | nd | 89.3 \pm 1.8 |
| | 200 | 179.34 \pm 4.16 | 180.25 \pm 4.41 | 89.7 \pm 2.0 |

SD: Desviación estándar

nd: No detectado

* Se obtuvieron recuperaciones superiores al 80 % en todos los métodos anteriormente mostrados.



6.2.3 Tensoactivos

Frente a las extracciones líquido-líquido convencionales, los disolventes supramoleculares compuestos por agregados tensoactivos son bastante adecuados para la extracción de estos contaminantes anfíflicos mediante la formación de agregados mixtos analito-extractor por interacciones hidrofóbicas y electrostáticas. Las interacciones hidrofóbicas conducen a la formación de agregados de anfífilos mezclados al azar y se considera como el componente ideal de la mezcla. Las interacciones electrostáticas se hacen progresivamente más fuertes en las mezclas del mismo tipo de anfífilo a las de carga opuesta.

Merino *et al.* trajeron en 2003 los tensoactivos de alquilamonio y los concentraron a partir de muestras de lodos mediante la técnica de extracción del punto de turbidez inducida por ácido (ACPE). Posteriormente se utilizó LC en fase reversa y la ionización por electropulverización en modo de iones positivos para la separación, cuantificación e identificación de homólogos individuales de los tensoactivos catiónicos. La recuperación total del método osciló entre el 91 y casi el 100 %. El análisis de los tensoactivos catiónicos en los lodos activados y deshidratados recogidos en dos plantas de tratamiento de aguas residuales diferentes reveló la presencia de dialquildimetilo, alquilbencildimetilo y alquiltrimetilo. No se detectaron tensoactivos de alquiltricloruro. Se confirmó la persistencia de los tensoactivos de alquil amonio en los lodos de depuradora tras los tratamientos aplicados en las plantas de aguas residuales [76].

Cantero *et al.* utilizaron en 2004 el disolvente supramolecular SDSA, que también se aplicó con éxito a la extracción de etoxilatos de alquilfenol y de etoxilatos de alcohol de lodos de depuradora antes de la determinación por LC-MS. Se analizaron los polietoxilatos de alquilfenol (APE, nonilo y octilo) y los etoxilatos de alcohol (AE, C₁₂-C₁₆) en lodos de depuradora mediante extracción con dodecansulfonato de sodio (SDoS), que se somete a coacervación en condiciones ácidas, seguida de cuantificación con LC/MS con ionización química a presión atmosférica. La extracción por coacervación se optimizó utilizando un lodo deshidratado envejecido y enriquecido. Las recuperaciones del método oscilaron entre el 78 y casi el 100 %, independientemente de la matriz de lodos analizada. Se encontraron polioxilatos en todas las muestras en los rangos de concentración para el octilfenol, el nonilfenol y los homólogos individuales de AE, respectivamente [94].

Por último, Ruiz *et al.* también se desarrollaron con éxito en 2004 un enfoque para la monitorización de los bencenosulfonatos lineales (C₁₀-C₁₃) en los lodos de depuradora antes de la LC-FL para la separación y detección de los homólogos de alquilbencenosulfonatos (LAS) (Tabla 15) [95].



Tabla 15. Porcentaje medio de recuperación obtenido para la extracción de homólogos de LAS (C_{10} - C_{13}) de lodos de depuradora (0.1 g) en función de la concentración de SDoS [95].

| SDoS (%) | C_{10} | C_{11} | C_{12} | C_{13} | Recuperación (%) ^a |
|-----------|----------|----------|----------|----------|-------------------------------|
| 15 | 52 | 48 | 46 | 46 | 48 |
| 2 | 75 | 72 | 71 | 70 | 72 |
| 25 | 77 | 74 | 70 | 71 | 73 |
| 3 | 99 | 99 | 98 | 98 | 98 |
| 4 | 90 | 90 | 88 | 85 | 87 |

^a Recuperaciones promedio de LAS homólogos. Condiciones experimentales: 40 °C, 4 M HCl y 1 hora.

6.2.4 Compuestos bioactivos

En la literatura se han propuesto varios métodos analíticos relativos a la aplicación de disolventes supramoleculares para la extracción de compuestos bioactivos, como productos farmacéuticos, vitaminas y medicamentos en matrices ambientales o biológicas. El análisis de muestras biológicas (por ejemplo sangre, suero, plasma, orina) implica la precipitación de las proteínas coextraídas de la fase rica antes de la inyección por filtración tras la adición de un disolvente orgánico. Debido a la complejidad de estas matrices, el análisis de las mismas se realiza con base a una matriz.

A veces se requieren bajas temperaturas del punto de turbidez para evitar la degradación de los compuestos bioactivos térmicamente lábiles. Con este objetivo, Casero *et al.* propusieron en 1999 el uso de la coacervación inducida por ácido de SDSA para extraer vitamina E de soluciones acuosas. Los tensoactivos aniónicos investigados fueron el dodecilsulfato de sodio (SDS), el ácido dodecilbencensulfónico (SDB-SA), el ácido dodecilsulfónico (SDSA) y el dioctilsulfosuccinato de sodio (Aerosol OT). La extracción se llevó a cabo a 10 °C y se comparó con la extracción por coacervación utilizando PONPE, mostrando este último señales de interferencia en los cromatogramas y probables pérdidas de analitos debido a la descomposición reportada de la vitamina a su temperatura de punto de turbidez. La capacidad de los tensoactivos aniónicos para extraer compuestos térmicamente lábiles se confirmó mediante la extracción de vitamina E con recuperaciones de alrededor del 80-85 % [17].

Abdollahi y Bagheri propusieron en 2004 la extracción con Tritón X-114 para la determinación simultánea de dos quininas casi relacionadas: la 1,4-naftoquinona y la 2-metil-1,4-naftoquinona



(vitamina K3) por espectrofotometría después de su reacción con anilina. Se ensayaron métodos quimiométricos y se acoplaron con la extracción coactiva para lograr una cuantificación selectiva. Entre los métodos de calibración multivariante probados se realizó el algoritmo de mínimos cuadrados parciales, el cual proporcionó los resultados más precisos y fue seleccionado como óptimo. El método se aplicó con éxito a los análisis de aguas enriquecidas y de una muestra sintética con una formulación similar a la de los comprimidos comerciales de vitamina K3 [96].

El Tritón X-114 también se ha utilizado para la extracción coactiva de arbidol en plasma de rata [97], carbamazepina y fenobarbital en plasma humano y saliva [98], valanfaxina en plasma humano [99] y meloxicam en suero humano [30]. Cabe mencionar que el método relativo a los fármacos antiepilepticos (carbamazepina y fenobarbital) permitió la separación de las fracciones libre y unida a proteínas de los fármacos, ya que los fármacos unidos a proteínas se transfirieron a la fase de coacervado, mientras que la fracción libre permaneció en la solución acuosa de equilibrio.

Se han propuesto otros tensoactivos no iónicos para evitar las señales de interferencia UV de la serie Tritón X. Con este objetivo Han seleccionó en 2008 el Genapol X-080 para el análisis de flurbiprofeno, un antiinflamatorio no esteroideo, por LC-UV en plasma de rata, el cual no genera dichas interferencias en la detección [100].

Lee y Su estudiaron en 1999 los comportamientos de partición de la vancomicina en un sistema bifásico con tensoactivo no iónico inducido por la temperatura. Se empleó *N*-deciltetraóxido de etileno ($C_{10}E_4$) como tensoactivo. En la mayoría de las condiciones experimentales, la vancomicina prefirió la fase superior rica en micelas. Sin embargo, a pH = 4, la vancomicina prefirió permanecer en la fase inferior, pobre en micelas. En el sistema de extracción se empleó un cotonosoactivo de afinidad, el colesterol modificado con D-alanina para aumentar el coeficiente de partición de la vancomicina. El coeficiente de partición aumentó significativamente de 0.87 a 15.98 cuando se empleó un cotonosoactivo de afinidad. Otros inconvenientes de este método fueron los largos tiempos necesarios para preparar el ligando de afinidad (20 h) y para la extracción (6 h) [101].

Se han propuesto pocos enfoques basados en disolventes supramoleculares para la extracción de compuestos bioactivos de plantas. Dos métodos para determinar fármacos comúnmente utilizados en la medicina tradicional china son el osthole y la imperatorina de *Cnidium monnieri* [102] y la aesculina y la aesculetina de *Cortex fraxini* [103]. Ambos métodos utilizaron Genapol X-080 para la extracción mediada por micelas bajo ultrasonidos, seguida de preconcentración coactiva y análisis LC-UV. Las recuperaciones para el osthole y la imperatonina fueron superiores al 94 %, mientras que las de la aesculina y la aesculetina fueron del 41 % y el 60 %, respectivamente. Estos métodos se propusieron como herramientas valiosas para la extracción y purificación a gran escala de ingredientes activos en materiales herbales.

Los SUPRAS también han demostrado un gran potencial para la extracción de compuestos bioactivos de los alimentos y se han aplicado recientemente a:



- Extracción de medicamentos veterinarios. Costi *et al.* proponen por primera vez en 2010 los disolventes supramoleculares como extractores en microextracciones de muestras sólidas. El enfoque se evaluó mediante la extracción de flumequina (FLU) y ácido oxolínico (OXO), dos medicamentos veterinarios ampliamente utilizados, a partir de músculo de pescado y marisco, utilizando un disolvente supramolecular formado por micelas inversas de ácido decanoico (DeA) [55].
- Antioxidantes en la cerveza. Chen *et al.* desarrollaron en 2010 un método basado en CPE-HPLC y la detección ultravioleta para la determinación del xantohumol en la cerveza. Se eligió Tritón X-114 como medio de extracción. El método propuesto se aplicó con éxito para la determinación de xantohumol en varias muestras de cerveza, se obtuvieron recuperaciones que van del 90.7 % al 101.9 %. El método desarrollado demostró ser eficiente, ecológico, rápido y barato para la extracción y determinación del xantohumol en la cerveza [104].
- Residuos de penicilina en la leche bovina. Kukusamude *et al.* desarrollaron en 2010 una extracción micelar mixta (MM-CPE) para el análisis de antibióticos de penicilina (ampicilina, penicilina G, oxacilina y cloxacilina) en muestras de leche utilizando Tritón X-114 y bromuro de trimetilamonio como extractor micelar mixto. Se obtuvo una alta precisión, con recuperaciones superiores al 80 %. El método de micela mixta-CPE-HPLC propuesto demostró tener un alto potencial para el análisis de residuos de penicilina en la leche con un LOD comparable a los límites máximos de residuos establecidos [79].

6.2.5 Colorantes

Se han propuesto varios enfoques para la determinación de colorantes en alimentos y agua utilizando disolventes supramoleculares. La determinación espectrofotométrica de la Rodamina B utilizando CPE con Tritón X-100 fue comunicado en 2008 por Pourreza para el análisis de pastel suave, jabón líquido para manos, mezclas de colorantes textiles y puntas de cerillas (Tabla 16). Las muestras se diluyeron a 50 mL con agua y se filtraron antes de la coacervación. Este método proporcionó recuperaciones por encima del 96 % [105].

**Tabla 16.** Determinación de la rodamina B en diferentes muestras [105].

| Muestra | Rodamina B agregada (ng·mL ⁻¹) | Rodamina B encontrada ^a (ng·mL ⁻¹) | Recuperación (%) |
|--|--|---|------------------|
| Pastel suave 1 ^b | - | 31.0 ± 0.5 | - |
| | 50.0 | 78.0 ± 1.5 | 96.0 |
| | 100.0 | 135.0 ± 1.6 | 103.0 |
| Pastel suave 2 ^c | - | 16.5 ± 0.4 | - |
| | 20.0 | 37.0 ± 1.5 | 101.5 |
| | 40.0 | 56.5 ± 1.5 | 100.0 |
| Mezcla de colorantes textiles ^d | - | 23.5 ± 0.4 | - |
| | 25.0 | 50.0 ± 1.5 | 103.0 |
| | 50.0 | 76.0 ± 1.5 | 103.5 |
| Jabón líquido para manos ^e | - | 6.5 ± 0.2 | - |
| | 10.0 | 16.0 ± 0.5 | 97.0 |
| | 20.0 | 27.0 ± 0.9 | 102.0 |
| Puntas de cerilla ^f | - | 11.0 ± 0.5 | - |
| | 10.0 | 21.0 ± 0.6 | 100.0 |
| | 20.0 | 30.0 ± 0.9 | 97.0 |

^a n=3^b Cantidad de Rodamina B: 97.0 µg·g⁻¹^c Cantidad de Rodamina B: 51.0 µg·g⁻¹^d Cantidad de Rodamina B: 112.5 mg·g⁻¹^e Cantidad de Rodamina B en jabón líquido para manos: 5.3 µg·g⁻¹^f Cantidad de Rodamina B en puntas de cerilla: 770.8 µg·g⁻¹

Liu *et al.* han propuesto en 2007 un método para la extracción de colorantes de Sudán del polvo de chile. Se desarrolló un método CPE-HPLC (UV) para la determinación de colorantes Sudán (I-IV), se utilizó Tritón X-100 para extraer y preconcentrar los colorantes Sudán del polvo de chile antes de su determinación por HPLC-UV. La separación y determinación de los colorantes de Sudán se llevó a cabo en el sistema HPLC-UV con elución isocrática. Los autores concluyeron que era necesario investigar más para evitar el uso de este disolvente orgánico y propusieron la extracción asistida por microondas como una alternativa que estudiarían en futuros experimentos. En este sentido, un método de extracción más sencillo basado en SUPRAS utilizando micelas inversas de ácido decanoico proporciona recuperaciones superiores al 85 % para todos los colorantes de Sudán analizados en salsas que contienen chile [106].



Pourreza y Zareian elaboraron en 2009 un SUPRA con micelas mixtas de Tritón X-100 y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) para la extracción de Naranja II en los alimentos. El Naranja II es un colorante aniónico y forma un par de iones con el tensoactivo catiónico (CTAB) que se ha extraído en la fase tensoactiva de Tritón X-100. Las muestras de dulce y chicle se diluyeron con agua y se filtraron antes de la extracción. La fase rica en tensoactivos extraída se diluyó con agua y se midió su absorbancia con un espectrofotómetro, alcanzando recuperaciones entre el 99 % y el 102 %. Como también se muestra en la Figura 26, el espectro UV-vis del componente presente en el recubrimiento del chicle se correspondía muy bien con el espectro estándar del Naranja II (Figura 26). Dado que no existe un método oficial o estándar para la determinación del naranja II, la metodología desarrollada se validó mediante estudios de recuperación [80].

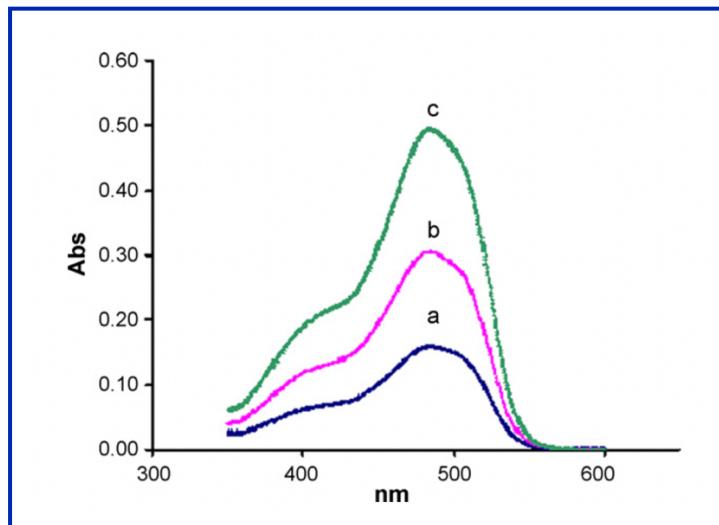


Figura 26. Espectros de absorción de (a) Solución de recubrimiento de chicle (b) Naranja II y, (c) una mezcla de solución de recubrimiento de chicle y Naranja II [80].

6.2.6 Disruptores endócrinos

Cantidades relativamente grandes de hormonas naturales y sintéticas entran en el medio ambiente a través de los vertidos de aguas residuales o por la aplicación de desechos animales, como el estiércol de ganado y aves de corral y otros biosólidos, a las tierras agrícolas.

Wang *et al.* desarrollaron en 2006 un método basado en la extracción en el punto de enturbiamiento para determinar cuatro tipos de estrógenos: estriol (E3), estradiol (E2), estrona (E1) y progesterona (P) en agua mediante separación por HPLC-UV. Se eligió el Tritón X-114 como disolvente de extracción. Se evaluaron y optimizaron los parámetros que afectan a la eficacia de la extracción, como las concentraciones de Tritón X-114 y Na₂SO₄, la temperatura de equilibrio, el tiempo de equilibrio y el tiempo de centrifugación. Bajo las condiciones óptimas, se obtuvieron factores de preconcentración de 99 para E3, 73 para E2, 152 para E1 y 86 para P en 10 mL de muestra de agua (Tabla 17) [107].

**Tabla 17.** Determinación y recuperaciones de muestras de agua enriquecidas con cuatro analitos [107].

| | Agregado (ng·mL ⁻¹) | Encontrado ^a (ng·mL ⁻¹) | Recuperación ^b (%) |
|-----------|------------------------------------|---|----------------------------------|
| Estrógeno | Aguas residuales | | |
| E3 | - | nd | - |
| | 10.0 | 9.9 | 99.0 ± 8.5 |
| E2 | - | nd | - |
| | 10.0 | 8.1 | 81.2 ± 11.5 |
| E1 | - | nd | - |
| | 10.0 | 9.8 | 81.2 ± 11.5 |
| P | - | nd | - |
| | 50.0 | 46.1 | 92.1± 10.1 |
| Estrógeno | Agua expuesta en el laboratorio | | |
| E3 | - | nd | - |
| | 100 | 9.9 | 99.5 ± 10.1 |
| E2 | - | 56 | - |
| | 10.0 | 154 | 99.0 ± 12.0 |
| E1 | - | nd | - |
| | 10.0 | 9.8 | 98.0 ± 10.5 |
| P | - | nd | - |
| | 50.0 | 49.5 | 99.0 ± 11.5 |

^a Media de tres determinaciones.^b Desviación estándar y media de tres determinaciones.

nd: No detectado.

Otro elemento importante a determinar por su presencia endocrina es el bisfenol (BP). Hasta la fecha se han propuesto varios métodos para la determinación del bisfenol A (BPA) en:

- En alimentos enlatados: García-Prieto *et al.* propusieron en 2008 el uso de coacervados basados en micelas inversas de ácido decanoico para la extracción de bisfenol A (BPA) de verduras y frutas enlatadas antes de su determinación por cromatografía líquida y detección por fluorescencia. El procedimiento consistió en la extracción de cantidades mínimas (300-700 mg) de muestra de alimentos homogeneizados con una solución acuosa que contenía un 10 % de THF y un 0.5 % de ácido decanoico. Las recuperaciones en las muestras oscilaron entre aproximadamente el 81-96 %. El método se aplicó con éxito a la determinación de BPA en el contenido sólido de ensalada de frutas en conserva, melocotones en almíbar, rodajas de mango, pimientos rojos, maíz dulce, judías verdes y guisantes [108].



- Bebidas: Ballesteros-Gómez *et al.* evaluaron en 2009 SUPRAS de base anfíflica (ASS), que son líquidos inmiscibles en agua compuestos por agregados supramoleculares en los regímenes de nano y microescala dispersos en una fase continua, para la extracción de contaminantes traza en alimentos líquidos. Los ASS seleccionados estaban formados por micelas invertidas de ácido decanoico dispersos en THF-agua y los contaminantes utilizados como modelo fueron el bisfenol A (BPA), la ocratoxina A (OTA) y el benzo[a]pireno (BaPy). La OTA se encontró en muestras de vinagre, mosto y cerveza, con concentraciones que oscilaban entre 92 y 177 ng·L⁻¹, el BaPy se cuantificó en muestras de té y café con concentraciones entre 1.5 y 16.6 ng·L⁻¹, mientras que el BPA se detectó en dos refrescos enlatados y se cuantificó en uno de ellos (bebida de té) con un nivel de 2.3 g·L⁻¹ [16].
- Orina: El BPA urinario total se utiliza para evaluar la exposición humana a este contaminante. García-Prieto *et al.* proponen en 2008 el uso de coacervados formados por micelas inversas de ácido decanoico para la microextracción del BPA previo a su determinación por LC y detección por fluorescencia con el objetivo de simplificar el tratamiento de la muestra y reducir el tiempo y el costo de análisis en los estudios epidemiológicos. El procedimiento consiste en la hidrólisis enzimática de orina y, posteriormente, la adición de ácido decanoico y THF. Las recuperaciones en las muestras oscilaron entre el 88 y el 95 %. El factor de concentración proporcionado por el método fue de 38. El método se aplicó con éxito a la determinación del BPA total en la orina de ocho voluntarios sanos [32].

La mayoría de estas determinaciones utilizaron el disolvente supramolecular formado por agregados de micelas inversas de ácido decanoico. Este disolvente proporciona interacciones de van der Waals entre la región hidrofóbica del BPA y las colas de los tensoactivos en la superficie micelar, y puentes de hidrógeno entre los grupos de cabeza polares y los grupos hidroxilos del BPA en el núcleo micelar [15].



6.2.7 Fenoles

Los fenoles y sus derivados se utilizan ampliamente en la industria química y agrícola y también se producen de forma natural a partir de la descomposición de ciertos vegetales. Los compuestos fenólicos, y principalmente los clorofenoles, tienen propiedades tóxicas, siendo algunos de ellos clasificados como cancerígenos por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC). Un grupo de once fenoles ha sido incluido en la lista de contaminantes prioritarios de la EPA, y se han establecido niveles muy restrictivos en términos de normas de calidad del agua para el pentaclorofenol ($0.4\text{-}1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), lo que exige metodologías sensibles [15].

Para la extracción de los clorofenoles de las aguas naturales Jin *et al.* utilizaron en 1999 un SUPRA inducido por sal compuesto por micelas catiónicas acuosas de cetrimida en aguas naturales antes de la LC-UV, con la adición de una pequeña cantidad de cotonsoactivo (1-octanol) para promover la separación de fases contra la precipitación. La utilidad del procedimiento se demuestra mediante la aplicación de la determinación de clorofenoles seleccionados en el agua del río. Con este procedimiento se obtienen recuperaciones superiores al 95 % y límites de detección inferiores a 62 partes por billón para los clorofenoles seleccionados [109].

El tensoactivo no iónico Genapol X-080 se utilizó en 2022 para producir un SUPRA adecuado para la extracción de un total de 14 compuestos fenólicos (incluyendo nitrofenoles y clorofenoles) de aguas marinas y residuales (Tabla 18). El SUPRA se generó mediante la adición de NaCl. La adición de la sal tuvo dos efectos beneficiosos: por un lado, las dos fases formadas después de la extracción en el punto de turbidez con Genapol X-080 eran de densidades similares y se mezclaban casi inmediatamente después de la centrifugación, de modo que la sal facilitaba la separación de las dos fases. Por otro lado, el efecto de salazón se tradujo en un aumento de la eficiencia de extracción para los compuestos más polares. Se han obtenido límites de detección inferiores a $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para todos los compuestos estudiados. El método se ha aplicado a su determinación en muestras de agua de mar y aguas residuales depuradas [74].



Tabla 18. Porcentajes de recuperación de los compuestos fenólicos en el agua de mar y en las aguas residuales depuradas previamente adicionadas con los 14 derivados fenólicos estudiados [74].

| No. | Compuesto | Abreviación | t _R /min | λ/nm |
|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 1 | Fenol | PH | 53 | 270 |
| 2 | 4-Nitrofenol | 4-NP | 87 | 313 |
| 3 | 2,4-Dinitrofenol | 2,4-DNP | 103 | 260 |
| 4 | p-Cresol | PC | 119 | 279 |
| 5 | 2-Nitrofenol | 2-NP | 129 | 279 |
| 6 | 2-Clorofenol | 2-CP | 140 | 275 |
| 7 | 2,4-Dimetilfenol | 2,4-DMP | 247 | 280 |
| 8 | 4,6-Dinitro-orto-cresol | 4,6-DNOC | 253 | 280 |
| 9 | 4-Cloro- <i>m</i> -cresol | 4-CMC | 281 | 280 |
| 10 | 2,4,6-Trimetilfenol | 2,4,6-TMP | 291 | 280 |
| 11 | 2,4-Diclorofenol | 2,4-DCP | 294 | 280 |
| 12 | 4-Cloro-3,5-dimetilfenol | 4-C-3,5-DMP | 314 | 280 |
| 13 | 2,4,6-Triclorofenol | 2,4,6-TCP | 330 | 290 |
| 14 | Pentaclorofenol | PCP | 382 | 303 |
| Recuperación ^a (%) | | | | |
| Compuesto | Agua de mar | | Aguas residuales tratadas | |
| | 100 µg·L ⁻¹ agregado | 300 µg·L ⁻¹ agregado | 100 µg·L ⁻¹ agregado | 300 µg·L ⁻¹ agregado |
| PH | 69 ± 5 ^b | 67 ± 5 | 58 ± 5 | 61 ± 5 |
| 4-NP | 85 ± 3 | 82 ± 8 | 70 ± 3 | 77 ± 5 |
| 2,4-DNP | 71 ± 5 | 77 ± 5 | 66 ± 5 | 66 ± 5 |
| PC | 61 ± 10 | 81 ± 8 | 64 ± 10 | 63 ± 6 |
| 2-NP | 73 ± 7 | 76 ± 6 | 65 ± 7 | 68 ± 5 |
| 2CP | 74 ± 7 | 79 ± 7 | 70 ± 7 | 70 ± 7 |
| 2,4-DMP | 87 ± 11 | 84 ± 5 | 74 ± 11 | 84 ± 5 |
| 4,6-DNOC | 94 ± 4 | 98 ± 4 | 82 ± 4 | 87 ± 4 |
| 4-CMC | 99 ± 4 | 109 ± 2 | 92 ± 4 | 102 ± 4 |
| 2,4,6-TMP | 74 ± 8 | 79 ± 6 | 67 ± 8 | 67 ± 6 |
| 2,4-DCP | 97 ± 7 | 106 ± 5 | 101 ± 7 | 103 ± 6 |
| 4-C-3,5-DMP | 106 ± 13 | 100 ± 5 | 104 ± 13 | 98 ± 6 |
| 2,4,6-TCP | 107 ± 6 | 111 ± 11 | 102 ± 6 | 102 ± 6 |
| PCP | 110 ± 5 | 107 ± 9 | 104 ± 5 | 103 ± 5 |

^a Media de tres determinaciones.

^b Promedio de recuperación ± desviación estándar



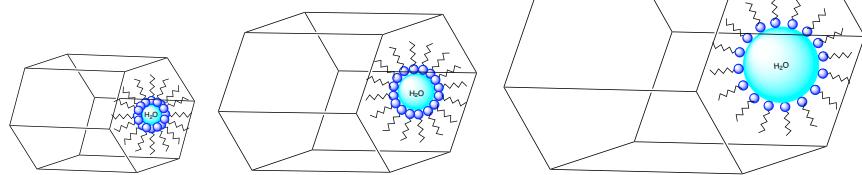
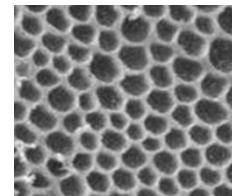
6.3 Adaptación de SUPRAS a tratamientos innovadores de muestras

Una de las características más destacadas de los SUPRAS deriva de las oportunidades que ofrece el autoensamblaje. Los SUPRAS pueden adaptarse mediante un diseño adecuado de los componentes (por ejemplo, seleccionando la estructura del anfífilo o el agente inductor de la coacervación) y/o del entorno (por ejemplo, seleccionando la composición de la solución o las condiciones de extracción). En cuanto al entorno, hay que tener en cuenta que las nanoestructuras ordenadas en el SUPRA se mantienen unidas por interacciones no covalentes, y en consecuencia, si el entorno cambia, estas nanoestructuras se reformarán y serán indistinguibles del original, por lo que se comportan como materiales adaptativos.

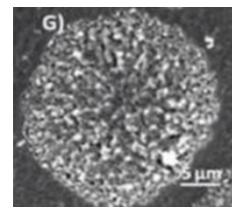
Lehn hizo un estudio exhaustivo en este tema en 2009, donde concluyó cómo la química supramolecular explora activamente los sistemas en proceso de autoorganización, es decir, los sistemas capaces de generar espontáneamente arquitecturas supramoleculares funcionales bien definidas mediante el autoensamblaje a partir de sus componentes, sobre la base de la información molecular almacenada en el entramado covalente de los componentes y entendimiento a nivel supramolecular mediante algoritmos interaccionales de reconocimiento molecular específicos, comportándose así como sistemas químicos programados. Las entidades supramoleculares, así como las moléculas que contienen enlaces reversibles, son capaces de experimentar un cambio continuo en su constitución mediante la reorganización y el intercambio de bloques de construcción. Esta capacidad define una Química Dinámica Constitucional (CDC) tanto a nivel molecular como supramolecular [110].

Así, la naturaleza reversible de los SUPRAS ofrece una forma sencilla de manipular las nanoestructuras ordenadas que los componen, lo que abre la puerta al diseño de disolventes para el desarrollo de tratamientos innovadores de muestras.

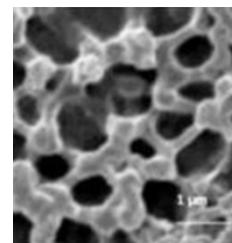
Un ejemplo de SUPRAS sensibles al medio ambiente de interés para la limpieza de muestras y el desarrollo de métodos independientes de la matriz son los sintetizados a partir de ácidos carboxílicos [21] y alcanos [50] en mezclas hidroorgánicas miscibles (normalmente agua-THF o agua-etanol). Estos SUPRAS consisten en agregados hexagonales invertidos en los que los grupos polares rodean las cavidades acuosas y las cadenas hidrocarbonadas están dispersas en el disolvente orgánico (Figura 27a). El tamaño de las cavidades acuosas de los agregados hexagonales puede adaptarse controlando el entorno (su tamaño aumenta a medida que lo hace la proporción fase orgánica/fase acuosa en la suspensión coloidal, Figura 27a), y esta propiedad se ha explotado para sintetizar SUPRAS con propiedades de acceso restringido (SUPRAS-RAM) [50]. La Figura 27b muestra tres micrografías obtenidas mediante criomicrografía de barrido (cryo-SEM) que representan el SUPRA completo, una sola gota de coacervado y su estructura interna. En todas ellas se observa la disposición hexagonal de los anfífilos a nivel nano y micro, una muestra de la adaptabilidad del arreglo que los SUPRAS pueden lograr.

**a****Incremento de proporción disolvente orgánica-agua****b**

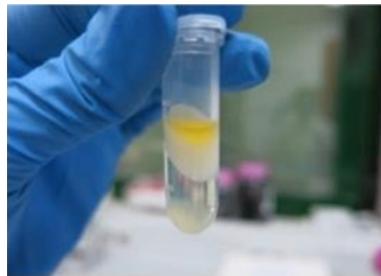
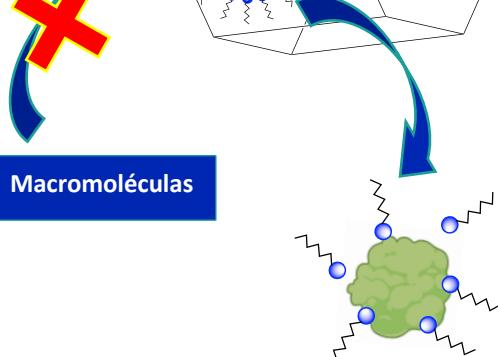
Estructura de los SUPRA



Gota individual de SUPRA



Estructura interna en una gota individual de SUPRA

c

Precipitación de proteínas

Figura 27. a) Esquema de disposición de los alkanos en agregados hexagonales invertidos y la variación del tamaño de las vacuolas en función de la composición de la solución sintética. b) Micrografías obtenidas por crio-SEM para un SUPRA basado en decanol a diferentes aumentos. c) Esquema ilustración de las propiedades de acceso restringido para los SUPRAS basados en alcanoles y fotografía de una muestra de suero después de la extracción con SUPRA [37].

La capacidad de los SUPRAS para comportarse como disolventes con propiedades de acceso restringido se demostró por primera vez en 2012 por Ballesteros-Gómez y Rubio extrayendo compuestos polares o iónicos con masas moleculares variables [50]. La Tabla 19 muestra las recuperaciones obtenidas para la extracción de tres compuestos (es decir, ocratoxina A de alimentos infantiles de cereales, y rojo ácido 97 y azul brillante G de lodos), que fueron esperados a solubilizarse en las cavidades acuosas de SUPRAS-RAM sintetizadas a partir de decanol en diferentes mezclas de THF y agua. Las recuperaciones de estos compuestos dependían en gran medida del porcentaje de THF en la suspensión coloidal y, en consecuencia, del tamaño de las cavidades acuosas de SUPRAS. Así, no se obtuvo ninguna recuperación cuantitativa para el



compuesto más voluminoso (es decir, el azul brillante G) y los resultados obtenidos para los SUPRAS formados en un entorno específico reflejaron claramente que las recuperaciones disminuían a medida que aumentaba el peso molecular de los analitos (por ejemplo, 80 %, 36 % y 5 % para la ocratoxina A, el rojo ácido 97 y el azul brillante G, respectivamente, para los SUPRAS sintetizados en un 30 % de THF).

Tabla 19. Recuperaciones obtenidas para la ocratoxina A, el rojo ácido 97 y el azul brillante G en función de la composición de la solución (THF-agua) para la coacervación del decanol [50].

| % THF en suspensión coloidal | Recuperación de ocratoxina A (%) |
|------------------------------|----------------------------------|
| 10 | 23 ± 5 |
| 20 | 45 ± 9 |
| 30 | 80 ± 1 |
| 50 | 109 ± 4 |

| % THF en suspensión coloidal | Recuperación de Rojo ácido 97 (%) |
|------------------------------|-----------------------------------|
| 10 | - |
| 20 | 18 ± 3 |
| 30 | 36 ± 1 |
| 50 | 100 ± 1 |

| % THF en suspensión coloidal | Recuperación de Azul Brillante G (%) |
|------------------------------|--------------------------------------|
| 10 | - |
| 20 | - |
| 30 | 5 ± 3 |
| 50 | 54 ± 1 |

Una clara consecuencia de las propiedades de acceso restringido de los SUPRAS es la no extracción de macromoléculas como los polisacáridos o los ácidos húmicos debido a su exclusión física. Por otro lado, las proteínas también quedan excluidas de la extracción por mecanismos químicos (es decir, precipitación por disminución de la constante dieléctrica en presencia del disolvente orgánico y floculación por asociación con el anfífilo). La Figura 27c muestra un esquema de estos mecanismos y una fotografía de una muestra de suero en la que se obtienen tres fases tras la extracción: el SUPRA en la parte superior que contiene los analitos, la capa de proteínas en el centro (precipitación-floculación) y el residuo de suero en la parte inferior. Así, los SUPRAS-RAM tienen el potencial de extraer analitos en un amplio rango de polaridad mientras excluyen las macromoléculas, lo que les da la posibilidad de integrar la extracción de analitos y la limpieza de la muestra en un solo paso y desarrollar tratamientos genéricos de la



muestra que sean independientes de la matriz. Este potencial ya se ha explotado en diversas aplicaciones. Algunos ejemplos son:

- La extracción de anfetaminas en muestras biológicas (Figura 28) donde Accioni *et al.* proponen en 2018 un tratamiento de muestras universal y de un solo paso, basado en SUPRAS para simplificar la confirmación de anfetaminas en siete matrices biológicas. El método se validó completamente para la anfetamina (AMP), la metanfetamina (MA), la 3,4-metilendioxianfetamina (MDA), la *N*-etil-3,4-metilendioxianfetamina (MDEA) y la *N*-metil-3,4-metilendioxianfetamina (MDMA). El SUPRA se formó espontáneamente e instantáneamente en la solución a granel por autoensamblaje y coacervación, pues el SUPRA, menos densa que el agua, se separó de la solución a granel como una capa superior [111].
- La extracción de ocratoxina A (OTA) en especias sujetas a la normativa de la Unión Europea (es decir, Capsicum spp., piper spp., nuez moscada, jengibre y cúrcuma) propuesta en 2018 por Caballero-Casero *et al.* Las propiedades del SUPRA-RAM permitieron la exclusión de macromoléculas por mecanismos químicos y físicos, y los pigmentos y aceites esenciales no influyeron en la extracción de la OTA. El tratamiento de la muestra duró 10 minutos y requirió cantidades mínimas de especia y volumen de SUPRAS [112].
- García-Fonseca y Rubio investigaron en 2016 la extracción de toxinas de fusarium en cereales. Exploraron la capacidad de los SUPRAS compuestos por agregados hexagonales invertidos de ácido oleico para que se comporte como un líquido con propiedades de SUPRAS-RAM. Las toxinas de fusarium se trajeron con el SUPRAS-RAM a base de ácido oleico para investigar la capacidad del disolvente de eliminar o reducir la supresión de la ionización y/o la mejora en el análisis de muestras complejas por MS [112].

En todos los casos, los extractos SUPRAS se analizaron directamente por LC-MS/MS [92 y 94] o LC-FL [93] utilizando una calibración externa.

Además de la extracción de macromoléculas, los SUPRAS-RAM formados a partir de anfífilos volátiles han sido sintetizados para su aplicación a muestras con un alto contenido en lípidos [24]. Los lípidos se extraen fácilmente con SUPRAS debido a la formación de agregados mixtos con los anfífilos que los componen. Después de la extracción, el extracto del SUPRA se evapora hasta sequedad y los analitos se extraen con un bajo volumen de disolvente orgánico del residuo que contiene la fracción lipídica.

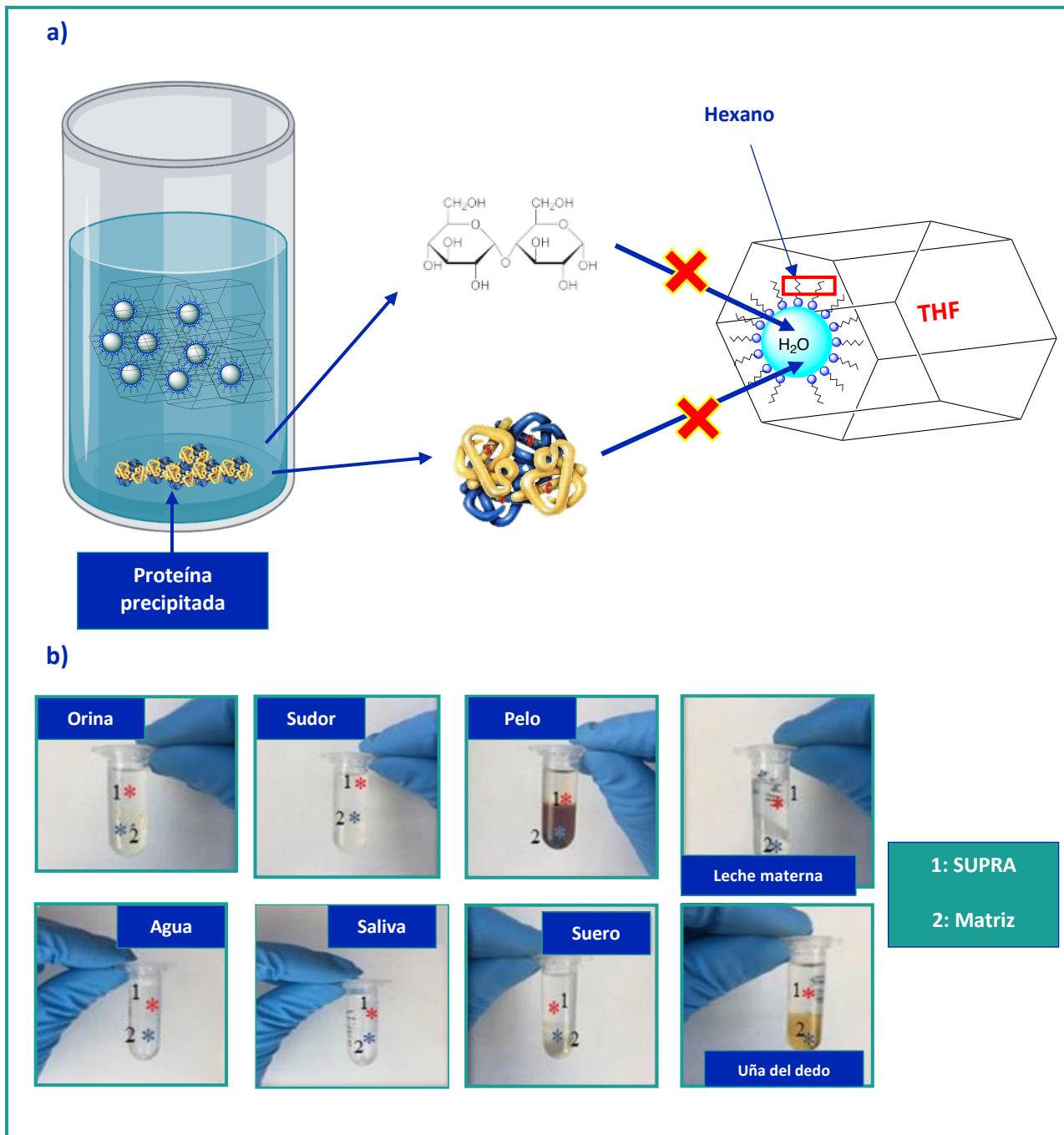


Figura 28. a) Esquema que muestra la estructura del SUPRAS y los mecanismos de eliminación de proteínas y carbohidratos y b) fotografías correspondientes a la extracción de ATS (estimulantes de tipo anfetamínico) de una solución acuosa enriquecida y de siete matrices biológicas con un SUPRAS-RAM a base de hexanol [111].



Desafíos de los SUPRAS en la preparación de muestras para cromatografía

Aún queda mucho por hacer en todos los temas tratados. En esta sección, la discusión se centra en la elucidación de las nanoestructuras de los SUPRAS, que es un requisito previo para avanzar en el diseño de SUPRAS con funciones programadas que permitan el desarrollo de tratamientos de muestras innovadores [87, 113, 114 y 115].

7.1 Elucidación de las nanoestructuras de los SUPRAS

El conocimiento de la disposición de los anfífilos en los SUPRAS es de primordial importancia para comprender los mecanismos que intervienen en la coacervación, que es la base para la adaptación de los SUPRAS con funciones programadas. Por otra parte, la elucidación de las nanoestructuras internas de los SUPRAS también es fundamental para la creación de esquemas de extracción basados en el conocimiento, en comparación con los procedimientos comunes de extracción basados en los SUPRAS que se basan principalmente en un enfoque de ensayo y error.

La caracterización estructural de los SUPRAS implica en primer lugar la comprobación de que la fase líquida separada es un coacervado, y por lo tanto está formada por gotas oleosas individuales. Las gotas de coacervado se observan fácilmente mediante microscopía de luz y su tamaño suele oscilar entre 1 y 100 μm . La Figura 29 a y b muestran micrografías correspondientes a dos SUPRAS reportadas por [37]. La mayoría de los estudios que incluyen extracciones basadas en SUPRAS incluyen este tipo de micrografías para la confirmación de la coacervación.

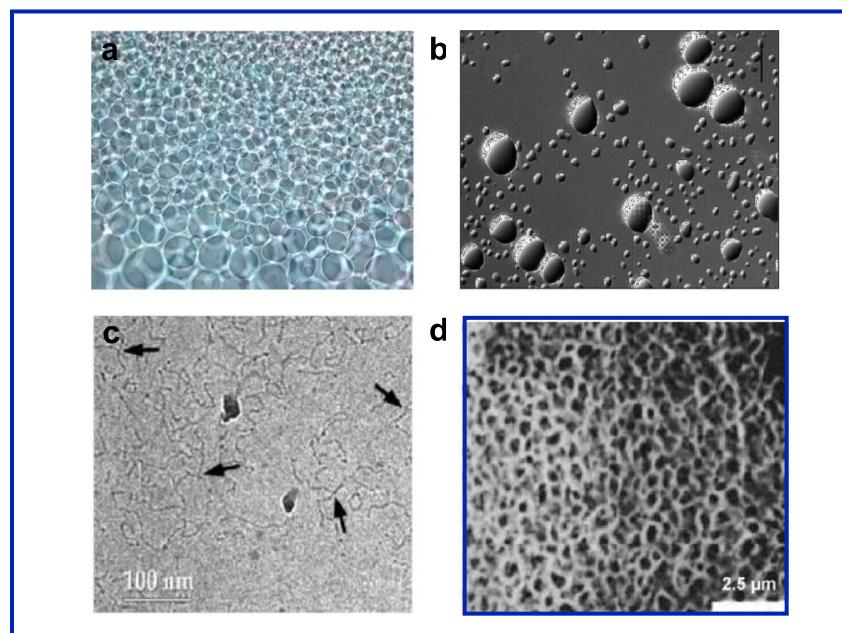


Figura 29. Coacervados obtenidos por microscopía óptica para SUPRAS sintetizados a partir de a) dodecilsulfato en ácido clorhídrico, b) ácido octanoico en THF-agua, c) imagen de Cryo-TEM del SUPRA basado en C_{12}E_5 que muestra micelas en forma de varilla, d) imagen de Cryo-HRSEM de un SUPRAS basado en tensoactivo gemínicos cuaternarios de fosfato-amonio que muestra una morfología de esponja [37].



La elucidación de la nanoestructura interna de un SUPRA es más compleja, ya que requiere condiciones de funcionamiento que mantiene la integridad de los agregados supramoleculares formados por enlaces no covalentes. Las principales técnicas utilizadas para este fin son la cryo-SEM (criomicroscopía electrónica de barrido) y la microscopía electrónica de transmisión por congelación-fractura (FF-TEM). La mayoría de los estudios en esta área se encuentran en la literatura de la fisicoquímica.

Por ejemplo, está el estudio del desarrollo de tensoactivos para coacervación en soluciones acuosas desarrollado en 2014 por Wang y Wang, donde resumen el desarrollo de la coacervación que se produce en tensoactivos monoméricos, tensoactivos de una y dos colas, tensoactivos gemínicos y sus mezclas [116].

Aunque estos estudios en la literatura son muy valiosos y pueden proporcionar alguna orientación, muchos de estos coacervados no han encontrado aplicación en las extracciones analíticas. Por lo tanto, una colaboración más estrecha entre ambas áreas parece ser esencial para una comprensión más profunda de las nanoestructuras internas de los SUPRAS de interés en los procesos de extracción.

En general, la disposición de los tensoactivos en los SUPRAS depende en gran medida de su estructura. Así, para los SUPRAS inducidos por la temperatura compuestos por tensoactivos no iónicos del tipo C_nE_m , donde m representa el número de grupos oxietileno, hay dos disposiciones básicas que dependen de la relación n a m [22]. En el caso de los tensoactivos con una relación moderada (por ejemplo, $C_{12}E_5$), el aumento de la temperatura induce una transición de micela esférica a forma de vara, y este crecimiento micelar provoca la separación de fases (Figura 29 c) explicado en el 2000 por Bernheim-Groswasser *et al.* [117]. Por el contrario, para los tensoactivos con una relación más alta (por ejemplo, $C_{12}E_8$), el parámetro de empaquetamiento disminuye y las formas esféricas se vuelven predominantes, por lo que la separación de fases se produce como resultado de la interacción atractiva micela-micela [118 y 119].

La coacervación de tensoactivos zwitteriónicos a temperatura ambiente dan estructuras tipo esponja formadas por bicapas conectadas al azar, que se asemejan localmente a la topología de una fase cúbica bicontinua, pero que muestran un orden de corto alcance (por ejemplo la Figura 29 d y la Figura 30), por ejemplo el trabajo reportado en 2002 de Menger *et al.* [120].

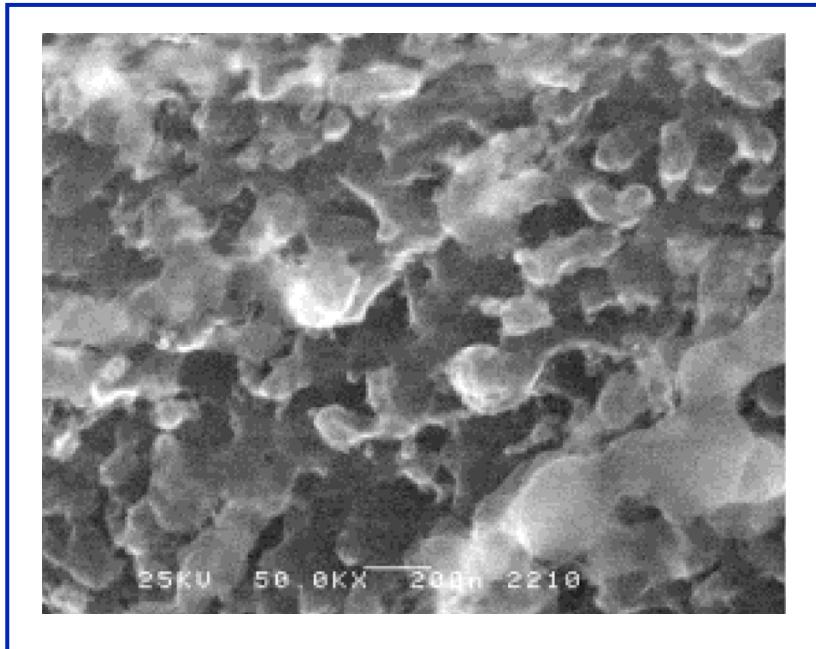


Figura 30. Criograbado-HRSEM del coacervado B (50000 x, -115 °C, 5 % en masa, 10 minutos de grabado). Barra de escala (5 mm) = 200 nm [120].

La elucidación de la disposición de la estructura interna de los coacervados formados a partir de alkanos en un medio THF-agua en agregados hexagonales invertidos sensibles al entorno (Figura 27) fue esencial para explotar sus propiedades de acceso restringido, lo que pone de manifiesto la necesidad de realizar este tipo de estudios.

En el caso de los SUPRAS inducidos por contraiones orgánicos, tanto la estructura del tensoactivo como el agente inductor determinan la estructura y las propiedades de los SUPRAS. Este es el caso de la coacervación de vesículas de ácido carboxílico-carboxilato (Figura 17) o de micelas de dodecilsulfato en presencia de iones de tetraalquilamonio expuesto en el año 2006 por Kabir-ud-Din *et al.* [121]. Estos iones neutralizan la carga aniónica de los grupos carboxilato y sulfato y forman puentes de tetraalquilamonio entre las vesículas o micelas uniendo los agregados en una red continua. En el caso de la coacervación del cetiltrimetilamonio inducida por la sal biliar desoxicolato de sodio que informaron en 2012 Manna *et al.*, se forma una red tridimensional de agregados entrelazados en forma de hilo debido al esqueleto esteroide rígido de la sal biliar representada en la Figura 31 [122].

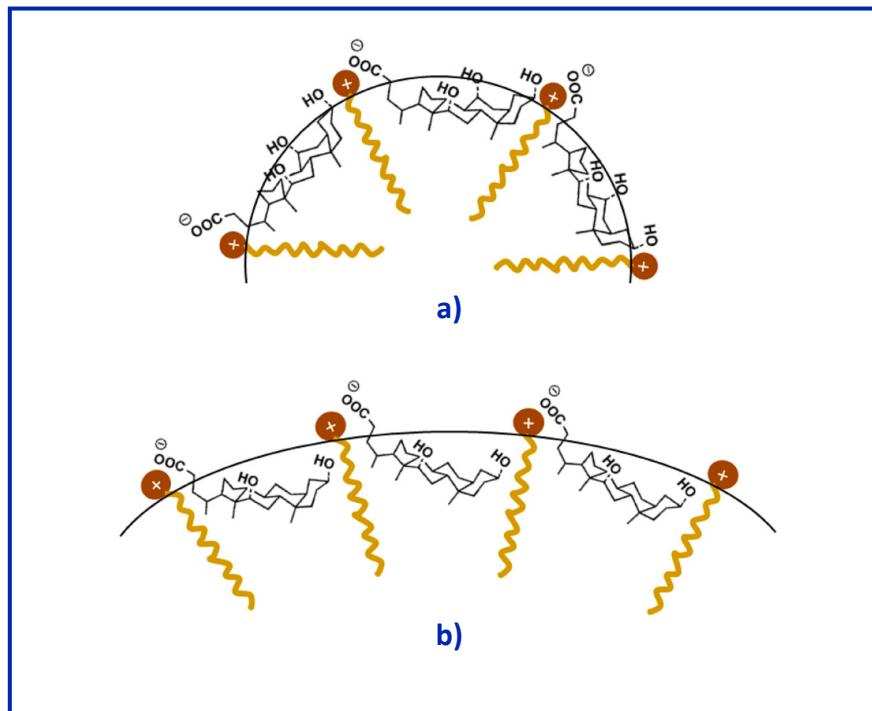


Figura 31. Formación de diferentes tipos de agregados para los sistemas tensoactivos mixtos de sales biliares C_nTABr : a) micelas esféricas (predominantes en los sistemas mixtos $C_nTABr-NaC$), b) micelas en forma de barra (predominantes en los sistemas mixtos $C_nTABr-NaDC$) [122].



8. Conclusiones

Esta actualización monográfica muestra que los avances en las últimas dos décadas en el desarrollo de SUPRAS y sus procedimientos para aplicarlos a extracciones de compuestos orgánicos previo a su análisis cromatográfico han sido sumamente asombrosos: práctico y teóricamente se han presentado métodos inteligentes y eficientes.

Al día de hoy, y con los conocimientos recabados en este trabajo, se posee mucha información que explica a detalle cómo actúan las fuerzas intermoleculares existentes en las extracciones, su comportamiento, propiedades y los fenómenos que se presentan en su ensamblaje. Esto permite establecer metodologías específicas a través de la información teórica que se ha recabado hasta el día de hoy sin la necesidad de recurrir a ensayos de prueba y error. Del mismo modo, estos conocimientos han demostrado ser eficaces para combinar la extracción por SUPRAS con técnicas cromatográficas específicas. Sin embargo, a pesar de toda la información recabada y las investigaciones realizadas, falta realizar mucha investigación para entender las características más particulares y de mayor interés de los SUPRAS, pues estos disolventes tienen la capacidad de extraer una amplia gama de compuestos no relacionados entre ellos estructuralmente, así como la capacidad de extraer analitos con propiedades tan particulares que no ha habido precedente alguno de su aislamiento.

Finalmente, se concluye que los disolventes supramoleculares, disolventes generados a partir de coacervados mediados por anfífilos particulares, sí son una alternativa verde eficaz a los disolventes orgánicos convencionales en la extracción de analitos de interés en matrices orgánicas, biológicas y alimenticias



9. Bibliografía

1. Malachová A, Stránská M, Václavíková M, Elliott C T, Black C, Meneely J, Hajšlová J, Ezekiel C N, Schuhmacher R, Krska R. Advanced LC–MS-based methods to study the co-occurrence and metabolism of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Anal. Bioanal. Chem.* 2018, 410:801-825.
2. Ericsson M. Analytical challenges and solutions in doping control: a perspective from the Swedish Doping Control Laboratory. *Bioanalysis* 2016, 8:735-739.
3. Valsecchia S, Polesello S, Mazzoni M, Rusconi M, Petrovic M. On-line sample extraction and purification for the LC–MS determination of emerging contaminants in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 2015, 8:27-37.
4. Caballero-Casero N, Lunar L, Rubio S. 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* 2016, 908:22–53.
5. Haggarty J, Burgess K E V. Recent advances in liquid and gas chromatography methodology for extending coverage of the metabolome. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017, 43:77–85
6. Dominguez-Romero J, García-Reyes J F, Molina-Díaz A. Comparative evaluation of seven different sample treatment approaches for large-scale multiclass sport drug testing in urine by liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2014, 1361:34–42.
7. Görgens C, Guddat S, Orlovius A K, Sigmund G, Thomas A, Thevis M, Schänzer W. “Dilute-and-inject” multi-target screening assay for highly polar doping agents using hydrophilic interaction liquid chromatography high resolution/high accuracy mass spectrometry for sports drug testing. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407:5365–5379.
8. Hamidi S, Taghvimi A, Mazouchi N. Micro Solid Phase Extraction Using Novel Adsorbents. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2019, 51(2):103–114.
9. Debevere S, De Baere S, Haesaert G, Rychlik M, Fievez V, Croubels S. Development of an UPLC-MS/MS method for the analysis of mycotoxins in rumen fluid with and without maize silage emphasizes the importance of using matrix-matched calibration. *Toxins* 2019, 11:519.
10. Llompart M, Celeiro M, Dagnac T. Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products and industrial contaminants in the environment. *Trends Environ. Anal. Chem.* 2019, 116:136–150.



11. Chemat F, Vian M A, Cravotto G. Green extraction of natural products: concept and principles. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13:8615–8627.
12. Caballo C, Sicilia M D, Rubio S. Supramolecular solvents for green chemistry. In: Pena-Pereira F, Tobiszewski M, editors. *Appl. Green. Solv. Sep. Proc.* 2017, 111–137.
13. Melnyk A, Namieśnik J, Wolska L. Theory and recent applications of coacervate-based extraction techniques. *Trends Anal. Chem.* 2015, 71:282–292.
14. Melnyk A, Wolska L, Namieśnik J. Coacervative extraction as a green technique for sample preparation for the analysis of organic compounds. *J. Chromatogr. A* 2014, 1339:1–12.
15. Ballesteros-Gómez A, Sicilia M D, Rubio S. Supramolecular solvents in the extraction of organic compounds. A review. *Anal. Chim. Acta* 2010, 677:108–130.
16. Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D. Potential of supramolecular solvents for the extraction of contaminants in liquid foods. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216:530–539.
17. Casero I, Sicilia D, Rubio S, Pérez-Bendito D. An acid induced phase cloud point separation approach using anionic surfactants for the extraction and preconcentration of organic compounds. *Anal. Chem.* 1999, 71:4519–4526.
18. Watanabe H, Tanaka H. A non-ionic surfactant as a new solvent for liquid–liquid extraction of Zn(II) with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol. *Talanta* 1978, 25:585–589.
19. Menger F M, Peresypkin A V, Caran K L, Apkarian R P. A sponge morphology in an elementary coacervate. *Langmuir* 2000, 16:9113–9116.
20. Hinze W L, Pramauro E. A critical review of surfactant mediated phase separations (cloud-point extractions)—theory and applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 1993, 24:133–177.
21. Ruiz F J, Rubio S, Pérez-Bendito D. Water-induced coacervation of alkyl carboxylic acid reverse micelles: phenomenon description and potential for the extraction of organic compounds. *Anal. Chem.* 2007, 79:7473–7484.
22. Glatter O, Fritz G, Lindner H, Brunner-Popela J, Mittelbach R, Strey R, Egelhaaf S. Nonionic micelles near the critical point: micellar growth and attractive interaction. *Langmuir* 2000, 16:8692–8701.
23. Saitoh T, Hinze W L. Concentration of hydrophobic organic compounds and extraction of protein using alkylammoniosulfate zwitterionic surfactant mediated phase separations (cloud point extractions). *Anal. Chem.* 1991, 63:2520–2525.



24. Salatti-Dorado J A, Caballero-Casero N, Sicilia M D, Lunar M D, Rubio S. The use of a restricted access volatile supramolecular solvent for the LC/MS–MS assay of bisphenol a in urine with a significant reduction of phospholipid-based matrix effects. *Anal. Chim. Acta* 2017, 950:71–79.
25. Ballesteros-Gómez A, Luna L, Sicilia M D, Rubio S. Hyphenating supramolecular solvents and liquid chromatography: tips for efficient extraction and reliable determination of organics. *Chromatographia* 2019, 82:111–124.
26. Santalad A, Srijaranai S, Burakham R, Glennon J D, Deming R L. Cloud-point extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography for the determination of carbamate insecticide residues in fruits. *Anal. Bioanal. Chem.* 2009, 394:1307–1317.
27. Ferrer R, Beltrán J L, Guiteras J. Use of cloud point extraction methodology for the determination of PAHs priority pollutants in water samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection and wavelength programming. *Anal. Chim. Acta* 1996, 330:199–206.
28. Goryacheva I Y, Shtykov S N, Loginov A S, Panteleeva V. Preconcentration and fluorimetric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on the acid-induced cloud-point extraction with sodium dodecylsulfate. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382:1413–1418.
29. Jia G, Bi C, Wang Q, Qiu J, Zhou W, Zhou Z. Determination of etofenprox in environmental samples by HPLC after anionic surfactant micelle-mediated extraction (coacervation extraction). *Anal. Bioanal. Chem.* 2006, 84:1423–1427.
30. Zhang H, Choi H K. Analysis of meloxicam by high-performance liquid chromatography with cloud-point extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008, 392:947–953.
31. Ballesteros-Gómez A, Rubio S, Pérez-Bendito D. Determination of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater and surface water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry. *J. Chromatogr. A.* 2008, 1203:168–176.
32. García-Prieto A, Lunar L, Rubio S, Pérez-Bendito D. Determination of urinary bisphenol a by coacervative microextraction and liquid chromatography-fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 2008, 630:19–27.
33. Zong Y, Chen J, Hou J, Deng W, Liao X, Xiao Y. Hexafluoroisopropanol-alkyl carboxylic acid high-density supramolecular solvent based dispersive liquid-liquid microextraction of steroid sex hormones in human urine. *J. Chromatogr. A* 2018, 1580:12–21.
34. Dueñas-Mas M J, Ballesteros-Gómez A, Rubio S. Supramolecular solvent-based microextraction of emerging bisphenol a replacement (colour developers) in indoor dust from public environments. *Chemosphere* 2019, 222:22–28.



35. Koolivand A, Azizi M, O'Brien A, Khaledi M G. Coacervation of lipid bilayer in natural cell membranes for extraction, fractionation, and enrichment of proteins in proteomics studies. *J. Proteome Res.* 2019, 18:1595–606.
36. Caballo C, Sicilia M D, Rubio S. Enantioselective analysis of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in freshwater fish based on microextraction with a supramolecular liquid and chiral liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015, 407:4721–4731.
37. Rubio S. Twenty years of supramolecular solvents in sample preparation for chromatography: achievements and challenges ahead. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020, 412(24):6037-6058.
38. Sikalos T I, Paleologos E K. Cloud point extraction coupled with microwave or ultrasonic assisted back extraction as a preconcentration step prior to gas chromatography. *Anal. Chem.* 2005, 77:2544–2549.
39. Kori S. Cloud point extraction coupled with back extraction: a green methodology in analytical chemistry. *Forensic Sci. Res.* 2019, 6(1):19–33.
40. Feizi N, Yamini Y, Moradi M, Salamat Q. Nanostructured geminibased supramolecular solvent coupled with ultrasound-assisted back extraction as a preconcentration step before GC–MS. *J. Sep. Sci.* 2017, 40:4788–4795.
41. Shen J, Shao X. Determination of tobacco alkaloids by gas chromatography-mass spectrometry using cloud point extraction as a preconcentration step. *Anal. Chim. Acta* 2006, 561:83–87.
42. Takagai Y, Hinze W L. Cloud point extraction with surfactant derivatization as an enrichment step prior to gas chromatographic or gas chromatography-mass spectrometric analysis. *Anal. Chem.* 2009, 81:7113–7122.
43. Cacho J L, Campillo N, Viñas P, Hernández-Córdoba M. Cloud point extraction and gas chromatography with direct microvial insert thermal desorption for the determination of haloanisoles in alcoholic beverages. *Talanta* 2016, 160:282–288.
44. Salatti-Dorado J A, González-Rubio S, García-Gómez D, Lucena R, Cárdenas S, Rubio S. A high thermally stable oligomer-based supramolecular solvent for universal headspace gas chromatography: proof-of-principle determination of residual solvents in drugs. *Anal. Chim. Acta* 2019, 1046:132–139.
45. Zhou X, Hao L, Wang H, Li Y, Liu J. Cloud-point extraction combined with thermal degradation for nanoplastic analysis using pyrolysis gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chem.* 2019, 9:1785–1790.



46. Quina F H, Hinze W L. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach. *Ind. Eng. Chem. Res.* 1999, 38:4150–4168.
47. Man B K-W, Lam M H-W, Lam P K S, Wu R S S, Shaw G. Cloudpoint extraction and preconcentration of cyanobacterial toxins (microcystins) from natural waters using a cationic surfactant. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36:3985–3990.
48. Garenne D, Navailles L, Nallet F, Grélard A, Dufourc E J, Douliez J-P. Clouding in fatty acid dispersions for charge-dependent dye extraction. *J. Colloid Interface Sci.* 2016, 468:95–102.
49. Ballesteros-Gómez A, Caballero-Casero N, García-Fonseca S, Lunar L, Rubio S. Multifunctional vesicular coacervates as engineered supramolecular solvents for wastewater treatment. *Chemosphere* 2019, 223:569–576.
50. Ballesteros-Gómez A, Rubio S. Environment-responsive alkanolbased supramolecular solvents: characterization and potential as restricted access property and mixed-mode extractants. *Anal. Chem.* 2012, 84:342–349.
51. Materna K, Szymanowski J. Separation of phenols from aqueous micellar solutions by cloud point extraction. *J. Colloid Interface Sci.* 2002, 255:195–201.
52. Robertson C C, Wright J S, Carrington E J, Perutz R N, Hunter C A, Brammer L. Hydrogen bonding vs. halogen bonding: the solvent decides. *Chem. Sci.* 2017, 8:5392–5398.
53. Ballesteros-Gómez A, Ruiz F J, Rubio S, Pérez-Bendito D. Determination of bisphenols A and F and their diglycidyl ethers in wastewater and river water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry. *Anal. Chim. Acta*. 2007, 603:51–59.
54. García-Fonseca S, Ballesteros-Gómez A, Rubio S. Restricted access supramolecular solvents for sample treatment in enzymelinked immuno-sorbent assay of mycotoxins in food. *Anal. Chim. Acta* 2016, 935:129–135.
55. Costi E, Sicilia M D, Rubio S. Supramolecular solvents in solid sample microextractions: application to the determination of residues of oxolinic acid and flumequine in fish and shellfish. *J. Chromatogr. A* 2010, 1217:1447–1454.
56. Moral A, Sicilia M D, Rubio S. Determination of benzimidazolic fungicides in fruits and vegetables by supramolecular solvent based microextraction/liquid chromatography/fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 2009, 1216:3740–3745.
57. López-Jiménez F J, Rubio S, Pérez-Bendito D. Single-drop coacervative microextraction of organic compounds prior to liquid chromatography: theoretical and practical considerations. *J. Chromatogr. A* 2008, 1195:25–33.



58. Moradi M, Yamini Y, Rezaei F, Tahmasebi E, Esrafil A. Development of a new and environment friendly hollow fiber supported liquid phase microextraction using vesicular aggregate based supramolecular solvent. *Analyst* 2012, 137:3549–3557.
59. Moradi M, Yamini Y. Application of vesicular coacervate phase for microextraction based on solidification of floating drop. *J. Chromatogr. A* 2012, 1229:30–37.
60. Ruiz J F, Rubio S, Pérez-Bendito D. Tetrabutylammonium-induced coacervation in vesicular solutions of alkyl carboxylic acids for the extraction of organic compounds. *Anal. Chem.* 2006, 78:7229–7239.
61. Giokas D L, Zhu Q, Pan Q, Chilvert A. Cloud point-dispersive μ -solid phase extraction of hydrophobic organic compounds onto highly hydrophobic core-shell $\text{Fe}_2\text{O}_3@\text{C}$ magnetic nanoparticles. *J. Chromatogr. A* 2012, 1251:33–39.
62. Gao N, Wu H, Chang Y, Guo X, Zhang L, Du L, Fu Y. Mixed micelle cloud point-magnetic dispersive μ -solid phase extraction of doxazosin and alfuzosin. *Spectrochim Acta Mol. Biomol. Spectrosc.* 2015, 134:10–16.
63. Zohrabi P, Shamsipur M, Hashemi M, Hashemi B. Liquid-phase microextraction of organophosphorus pesticides using supramolecular solvent as a carrier for ferrofluid. *Talanta* 2016, 160:340–346.
64. Safari M, Yamini Y, Tahmasebi E, Ebrahimpour B. Magnetic nanoparticle assisted supramolecular solvent extraction of triazine herbicides prior to their determination by HPLC with UV detection. *Microchim. Acta* 2016, 183:203–210.
65. Arghavani-Beydokhti S, Rajabi M, Asghari A. Combination of magnetic dispersive micro solid-phase extraction and supramolecular solvent-based microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of trace amounts of cholesterol-lowering drugs in complicated matrices. *Anal. Bioanal. Chem.* 2017, 409:4395–4407.
66. Yang D, Li X, Meng D, Wang M, Yang Y. Supramolecular solvents combined with layered double hydroxide coated magnetic nanoparticles for extraction of bisphenols and 4-tert-octylphenol from fruit juices. *Food Chem.* 2017, 237:870–876.
67. Moradi M, Yamini Y, Tayyebi M, Asiabi H. Ultrasound-assisted liquid-phase microextraction based on a nanostructured supramolecular solvent. *Anal. Bioanal. Chem.* 2013, 405:4235–4243.
68. Bezerra M D, Arruda M A Z, Ferreira S L C. Cloud point extraction as a procedure of separation and pre concentration for metal determination using spectroanalytical techniques: a review. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2005, 40:269–299.



69. Samaddar P, Sen K. Cloud point extraction: a sustainable method of elemental preconcentration and speciation. *J. Ind. Eng. Chem.* 2014, 20:1209–1219.
70. Bacon J R, Butler O T, Cairns W R L, Cook J M, Mertz-Krause R, Tyson J F. Atomic spectrometry update – a review of advances in environmental analysis. *J. Anal. At. Spectrom.* 2019, 34:9–58.
71. Arnold T, Linke D. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. *BioTechniques* 2007, 43:427–440.
72. Asenjo J A, Andrews B A. Aqueous two-phase systems for protein separation: a perspective. *J. Chromatogr. A* 2011, 1218:8826–8835.
73. Pino V, Ayala J H, Afonso A M, González V. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection following micelle-mediated preconcentration. *J. Chromatogr. A* 2002, 949:291–299.
74. Mahugo-Santana C, Sosa Z, Santana-Rodriguez J J. Use of nonionic surfactant solutions for the extraction and preconcentration of phenolic compounds in water prior to their HPLC-UV detection. *Analyst* 2002, 127:1031–1037.
75. Alabi A, Caballero-Casero N, Rubio S. Quick and simple sample treatment for multiresidue analysis of bisphenols, bisphenol diglycidyl ethers and their derivatives in canned food prior to liquid chromatography and fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 2014, 1336:23–33.
76. Merino F, Rubio S, Pérez-Bendito D. Mixed aggregate-based acid-induced cloud-point extraction and ion-trap liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of cationic surfactants in sewage sludge. *J. Chromatogr. A* 2003, 998(1-2):143–154.
77. Ebrahim Attia A B, Ong Z Y, Hedrick J L, Lee, P P, Ee P L R, Hammond P T, Yang Y-Y. Mixed micelles self-assembled from block copolymers for drug delivery. *COCIS* 2011, 16(3):182–194.
78. Zarei A R. Cloud point formation based on mixed micelle in the presence of electrolyte for extraction, preconcentration, and spectrophotometric determination of trace amounts of hydrazine in water and biological samples. *Anal. Biochem.* 2007, 369(2):161–167.
79. Kukusamude C, Santalad A, Boonchiangma S, Burakham R, Srijaranai S, Chailapakul O. Mixed micelle-cloud point extraction for the analysis of penicillin residues in bovine milk by high performance liquid chromatography. *Talanta* 2010, 81(1-2):486–492.
80. Pourreza N, Zareian M. Determination of Orange II in food samples after cloud point extraction using mixed micelles. *J. Hazard Mater.* 2009, 165(1-3):1124–1127.



81. De Wuilloud J C A, Wuilloud R G, Sadi B B M, Caruso J A. Trace humic and fulvic acid determination in natural water by cloud point extraction/preconcentration using non-ionic and cationic surfactants with FI-UV detection. *Analyst* 2003, 128(5):453–458.
82. Babaee S, Beiraghi A. Micellar extraction and high-performance liquid chromatography-ultra violet determination of some explosives in water samples. *Anal. Chim. Acta* 2010, 662(1):9–13.
83. Uskokovic V, Drofenik M. Synthesis of materials within reverse micelles. *Surf. Rev. Lett.* 2005, 12(2):239–277.
84. Ruiz F-J, Rubio S, Pérez-Bendito D. Vesicular coacervative extraction of bisphenols and their diglycidyl ethers from sewage and river water. *J. Chromatogr. A* 2007, 1163(1-2):269–276.
85. García Pinto C, Perez Pavon J L, Moreno Cordero B. Cloud Point Preconcentration and High Performance Liquid Chromatographic Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* 1994, 66(6):874–881.
86. Sicilia D, Rubio S, Pérez-Bendito D, Maniasso N, Zagatto E A G. Anionic surfactants in acid media: a new cloud point extraction approach for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples. *Anal. Chim. Acta* 1999, 392:29–38.
87. Li C F, Wong J W C, Huie C W, Choi M M F. On-line flow injection-cloud point preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons coupled with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2008, 1214(1-2):11–16.
88. Song G Q, Lu C, Hayakawa K, Lin J-M. Comparison of traditional cloud-point extraction and on-line flow-injection cloud-point extraction with a chemiluminescence method using benzo[a]pyrene as a marker. *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 384(4):1007–1012.
89. Luque N, Rubio S, Pérez-Bendito D. Use of coacervates for the on-site extraction/preservation of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzalkonium surfactants. *Anal. Chimi. Acta* 2007, 584(1):181–188.
90. Lucentini L, Pettine P, Stottmeister E, Menichini E. Chemical analysis of the quality of water for human consumption: Proposal for the revision of the performance requirements in the Drinking Water Directive 98/83/EC. *TRAC.* 2013, 45:37–47.
91. Jia G, Lv C, Zhu W, Qiu J, Wang X, Zhou Z. Applicability of cloud point extraction coupled with microwave-assisted back-extraction to the determination of organophosphorous pesticides in human urine by gas chromatography with flame photometry detection. *J. Hazard Mater.* 2008, 159(2-3):300–305.



92. Zhou J, Chen J, Cheng Y, Li D, Hu F, Li H. Determination of Prometryne in water and soil by HPLC–UV using cloud-point extraction. *Talanta* 2009, 79(2):189–193.
93. Zhou Z, Chen J, Zhao D, Yang M. Determination of Four Carbamate Pesticides in Corn by Cloud Point Extraction and High-Performance Liquid Chromatography in the Visible Region Based on Their Derivatization Reaction. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57(19):8722–8727.
94. Cantero M, Rubio S, Pérez-Bendito D. Determination of non-ionic polyethoxylated surfactants in sewage sludge by coacervative extraction and ion trap liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2004, 1046(1-2):147–153.
95. Ruiz F J, Rubio S, Pérez-Bendito D. Potential of coacervation processes for the extraction of amphiphiles (linear alkyl benzenesulphonates) from sewage sludge samples prior to liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2004, 1030(1-2):109–115.
96. Abdollahi H, Bagheri L. Simultaneous spectrophotometric determination of Vitamin K3 and 1,4-naphthoquinone after cloud point extraction by using genetic algorithm based wavelength selection-partial least squares regression. *Anal. Chim. Acta* 2004, 514(2):211–218.
97. Liu X, Chen X-H, Zhang Y-Y, Liu W-T, Bi K-S. Determination of arbidol in rat plasma by HPLC–UV using cloud-point extraction. *J. Chromatogr. B* 2007, 856(1-2):273–277.
98. Rukhadze M D, Tsagareli S K, Sidamonidze N S, Meyer V R. Cloud-Point Extraction for the Determination of the Free Fraction of Antiepileptic Drugs in Blood Plasma and Saliva. *Anal. Biochem.* 2000, 287(2):279–283.
99. Qin X Y, Meng J, Li X Y, Zhou J, Sun X L, Wen A D. Determination of venlafaxine in human plasma by high-performance liquid chromatography using cloud-point extraction and spectrofluorimetric detection. *J. Chromatogr. B* 2008, 872(1-2):38–42.
100. Han F, Yin R, Shi X, Jia Q, Liu H, Yao H, Xu L, Li S. Cloud point extraction-HPLC method for determination and pharmacokinetic study of flurbiprofen in rat plasma after oral and transdermal administration. *J. Chromatogr. B* 2008, 868(1-2):64–69.
101. Lee C-K, Se W-D. Nonionic Surfactant-Mediated Affinity Cloud-Point Extraction of Vancomycin. *Sep. Sci. Technol.* 1999, 34(16):3267–3277.
102. Zhou J, Sun X L, Wang S W. Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and imperatorin from Cnidium monnieri with analysis by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2008, 1200(2):93–99.
103. Shi Z, Zhu X, Zhang H. Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration for the analysis of aesculin and aesculetin in Cortex fraxini by HPLC. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 2007, 44(4):867–873.



104. Chen L, Zhao Q, Jin H, Zhang X, Xu Y, Yu A, Zhang H, Ding L. Determination of xanthohumol in beer based on cloud point extraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta* 2010, 81(1-2):692–697.
105. Pourreza N, Rastegarzadeh S, Larki A. Micelle-mediated cloud point extraction and spectrophotometric determination of rhodamine B using Triton X-100. *Talanta* 2008, 77(2):733–736.
106. Liu W, Zhao W, Chen J, Yang M. A cloud point extraction approach using Triton X-100 for the separation and preconcentration of Sudan dyes in chilli powder. *Anal. Chim. Acta* 2007, 605(1):41–45.
107. Wang L, Cai Y, He B, Yuan C, Shen D, Shao J, Jiang G. Determination of estrogens in water by HPLC–UV using cloud point extraction. *Talanta* 2006, 70(1):47–51.
108. García-Prieto A, Lunar L, Rubio S, Pérez-Bendito D. Decanoic acid reverse micelle-based coacervates for the microextraction of bisphenol A from canned vegetables and fruits. *Anal. Chim. Acta* 2008, 617(1-2):51–58.
109. Jin X, Zhu M, Conte E D. Surfactant-Mediated Extraction Technique Using Alkyltrimethylammonium Surfactants: Extraction of Selected Chlorophenols from River Water. *Anal. Chem.* 1999, 71(2):514–517.
110. Lehn J. M. Toward complex matter: supramolecular chemistry and self-organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99:4763–4768.
111. Accioni F, García-Gómez D, Girela E, Rubio S. SUPRAS extraction approach for matrix-independent determination of amphetamine-type stimulants by LC-MS/MS. *Talanta* 2018, 182:574–582.
112. Caballero-Casero N, García-Fonseca S, Rubio S. Restricted access supramolecular solvents for the simultaneous extraction and cleanup of ochratoxin A in spices subjected to EU regulation. *Food Control* 2018, 88:33–39.
113. Fang Q, Du M, Huie C W. On-Line Incorporation of Cloud Point Extraction to Flow Injection Analysis. *Anal. Chem.* 2001, 73(14):3502–3505.
114. Melchert W R, Rocha F R P. Cloud point extraction in flow-based systems. *Rev. Anal. Chem.* 2016, 35(2):41-52.
115. Rahimi M, Hashemi P, Nazari F. Cold column trapping-cloud point extraction coupled to high performance liquid chromatography for preconcentration and determination of curcumin in human urine. *Ana.l Chim. Acta* 2014, 826:35–42.



116. Wang M, Wang Y. Development of surfactant coacervation in aqueous solution. *Soft Matter*. 2014, 10:7909–7919.
117. Bernheim-Groszasser A, Wachtel E, Talmon Y. Micellar growth, network formation, and criticality in aqueous solutions of the nonionic surfactant C₁₂E₅. *Langmuir* 2000, 16:4131–4140.
118. Danino D, Talmon Y, Zana R. Aggregation and microstructure in aqueous solutions of the nonionic surfactant C₁₂E₈. *J. Colloid Interface Sci.* 1997, 186:170–179.
119. Ezrahi S, Tuval E, Aserin A. Properties, main applications and perspectives of worm micelles. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2006, 128–130:77–102.
120. Menger F M, Seredyuk V A, Apkarian R P, Wright E R. Colloidal assemblies of branched geminis studied by cryo-etch-HRSEM. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124:12408–12409.
121. Kabir-ud-Din, Sharma D, Khan Z A, Aswal V K, Kuma S. Clouding phenomenon and SANS studies on tetra-n-butylammonium dodecylsulfate micellar solutions in the absence and presence of salts. *J. Colloid Interface Sci.* 2006, 302:315–321.
122. Manna K, Chang C-H, Panda A K. Physicochemical studies on the catanionics of alkyltrimethylammonium bromides and bile salts in aqueous media. *Colloids Surf., A* 2012, 415:10–21.