



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

***FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA***

Trabajo de Tesis Doctoral

**“Coeficientes de Partición entre líquidos iónicos y agua.
Aplicación a la microextracción dispersiva de
compuestos antichagásicos en muestras biológicas”**

Lic. Juan Manuel Padró

DIRECTOR: Dr. Mario Reta

2014

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Mario Reta. El mismo se pone a consideración de las autoridades de la Universidad Nacional de La Plata, con el objeto de acceder al GRADO ACADÉMICO de DOCTOR de la FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS.

Lic. Juan Manuel Padró

**Dr. Mario Reta
Director**

Objetos Perdidos

Por veredas de sueño y habitaciones sordas
tus rendidos veranos me acechan con sus cantos.
Una cifra vigilante y sigilosa
va por los arrabales llamándome y llamándome,

pero qué falta, dime, en la tarjeta diminuta
donde están tu nombre, tu calle y tu desvelo,
si la cifra se mezcla con las letras del sueño,
si solamente estás donde ya no te busco.

Julio Cortázar

"A través del otoño trágico llegaste guiado por una estrella a la casa vacía
de donde los versos convertidos en cenizas se extraviaron para siempre."

Anna Ajmátova

“Andábamos sin buscarnos pero sabiendo que andábamos para encontrarnos”

Julio Cortázar

A mis *bellezas*: Alejo, Tomás, Facundo, Emilia y Federica.

Esta página está destinada a expresar mi reconocimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo.

En primer lugar deseo agradecer especialmente al Dr. Mario Reta por su dirección y por haberme brindado la oportunidad de llevar a cabo esta tarea, por su apoyo constante, sus consejos, su tiempo, su paciencia y sus enseñanzas.

Mi más sincero agradecimiento a la estudiante Rocío Pellegrino por el trabajo “codo a codo”, hasta cualquier hora, cargadas de motivación y por las infinitas discusiones de las que tanto aprendí sumada a su completa disposición y su enorme generosidad.

Asimismo quisiera reconocer a las Dras. Cecilia Castells y Liliana Bruzzone por el constante apoyo, mates, café, conocimiento y consejos durante la ejecución de esta Tesis.

A todos mis compañeros y/o amigos del LIDMA. En especial y en orden cronológico a Leo, Javi, Roberta, Sonia, Jaiver, Marcos, Agus, Bibi, Emi, Fiore y Romi. Porque siempre me ayudaron en todo lo que necesité, por aceptarme como era, por todos los momentos que compartí: charlas, risas, enojos, mates, comidas, viajes, congresos, por su constante motivación, sobre todo cuando las cosas no salían como uno quería., etc. No podría haberlo hecho sin ustedes. En otras palabras, “*sin ustedes, no soy nada...*”

Al Dr. Agustín Ponzinibbio y la Lic. Gisela Diaz (*la Yiya*) por las “Síntesis de RTILs” y los miles de *mangazos* de reactivos, materiales varios y charlas de pasillo.

Al Dr. Guido Mastrantonio y la Bioq. María Elena Marsón por introducirme a la problemática social “Enfermedad de Chagas” y hacer de este tema la Aplicación de esta Tesis.

A la Dra. Alicia Califano por la ayuda en el diseño central compuesto.

A los Dres. Facundo García-Burnissen y Jaime Altcheh del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutierrez”, por las muestras de plasma humano, leche materna y los papers solicitados.

A mis amigos les agradezco los maravillosos momentos que pasamos juntos y les pido disculpas por las ausencias, *cuelgues* y la distancia que a veces impidieron que pasáramos más tiempo juntos, en especial a Nico, Romi, Elu, Dani, Kari, Pauli, Eva, Vero, Rocío, Marcos, Emi, Lalala, Leo, Adri, Fer y Fede.

A tres maravillosas personas que conocí en este camino: “Carlitos” Llerena Suster, Paula Berton y José Manuel Herrero, por sus gestos de amistad.

A mis compañeros de la carrera, en especial a Magui por la amistad brindada y a Juan Martín por su risa contagiosa.

A la gente del club “Estrella del Sur”, por compartir la misma pasión el “*club de mis amores*”, en especial a la Flia. Vivas por los gratos momentos compartidos.

A la Universidad Nacional de La Plata, por haberme formado desde el comienzo de mi carrera académica, abriéndome sus puertas de manera gratuita y haberme dado tan excelente formación.

Al CONICET, por otorgarme las becas para la realización de esta Tesis.

A Rachel y Fabi, *por darle un nuevo vuelo a mi alma...*

Finalmente, el agradecimiento más especial de todos a mi familia. A mi hermano y mi cuñada, por el tesoro máspreciado, *Federica*, a mis tías y primos. A mis papas por acompañarme en todos y cada uno de los pasos de este largo camino, por estar siempre, por ayudarme y porque gracias a ellos, a sus milanesas, ropa limpia y planchada fue posible llegar hasta acá.

Publicaciones en revistas científicas

1- “Predicting the partitioning of biological compounds between room-temperature ionic liquids and water by means of the solvation-parameter-model”.

Juan M. Padró, Agustín Ponzinibbio, Leidy B. Agudelo Mesa, Mario Reta*.

Anal. Bional. Chem., 2011, 399, (8), 2807-2820.

Editorial: Springer.

2- “Development of an ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of nifurtimox and benznidazole in human plasma”.

Juan M. Padró, María E. Marsón, Guido E. Mastrantonio, Jaime Altcheh, Facundo García-Bournissen, Mario R. Reta*.

Talanta, 2013, 107, 95-102.

Editorial: Elsevier.

3- “Partition coefficients of organic compounds between water and room-temperature ionic liquids based on the imidazolium, pyridinium and phosphonium cations”.

Juan M. Padró, Rocío B. Pellegrino Vidal, Mario Reta*

(en proceso de redacción).

4- “Development of an ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human breast milk. Optimization using a Central Composite Design (CCD)”

Juan M. Padró, Rocío B. Pellegrino Vidal, Alicia N. Califano, Mario R. Reta*

(en proceso de redacción).

Presentaciones a reuniones científicas nacionales e internacionales

1- “Development of a dispersive liquid–ionic liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human breast milk. Optimization using a Central Composite Design”.

Autores: **Juan M. Padró**, Rocío B. Pellegrino Vidal, Leidy Bibiana Agudelo Mesa, Alicia Califano, María E. Marson, Guido Mastrantonio, Mario Reta.

Nombre y lugar del evento: HPLC 2014, 41st International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, New Orleans, Louisiana, USA.

Fecha de realización del mismo: 11-15/05/14.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen. (Aceptado para su presentación).

Modalidad: Póster. (Con referato).

2- “Empleo de microextracción líquido–líquido iónico dispersiva para la determinación de fármacos antichagásicos en leche materna. Optimización mediante diseño central compuesto”.

Autores: **Juan M. Padró**, Rocío B. Pellegrino Vidal, Leidy Bibiana Agudelo Mesa, Alicia Califano, María E. Marson, Guido Mastrantonio, Mario Reta. Nombre y lugar del evento: VII Congreso Argentino de Química Analítica – Mendoza, Argentina.

Fecha de realización del mismo: 01-04/10/13.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

3- “Predicción de coeficientes de partición de compuestos de interés farmacológico entre líquidos iónicos y agua”.

Autores: **Juan M. Padró**, Rocío Pellegrino Vidal, Leidy Bibiana Agudelo Mesa, Mario Reta.

Nombre y lugar del evento: VII Congreso Argentino de Química Analítica – Mendoza, Argentina.

Fecha de realización del mismo: 01-04/10/13.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

4- “Obtaining partition coefficients of biological compounds between ionic liquids and water by using the “Solvation parameter model””.

Autores: Juan M. Padró, Rocío Pellegrino Vidal, Leidy Bibiana Agudelo Mesa, **Mario Reta**.

Nombre y lugar del evento: HPLC 2013, 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, The Netherlands.

Fecha de realización del mismo: 16-20/06/13.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

5- “Development of a dispersive liquid–ionic liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human breast milk”.

Autores: Juan M. Padró, Rocío B. Pellegrino Vidal, Leidy Bibiana Agudelo Mesa, Alicia Califano, María E. Marson, Guido Mastrantonio, **Mario Reta**.

Nombre y lugar del evento: HPLC 2013, 39th International Symposium on High-Performance-Liquid-Phase Separations and Related Techniques, Amsterdam, The Netherlands.

Fecha de realización del mismo: 16-20/06/13.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

6- “Determination of nifurtimox and benznidazole in human plasma by dispersive liquid–liquid microextraction using ionic liquids”.

Autores: **Padró, Juan Manuel**; Marsón, María E.; Altchek, Jaime; García-Bournissen, Facundo; Mastrantonio, Guido E.; Reta, Mario R.

Nombre y lugar del evento: COLACRO XIV – Latin American Congress of Chromatography and Related Techniques, Florianopolis, Brazil.

Fecha de realización del mismo: 1-5/10/12.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

7- “Partition coefficients of biological compounds between ionic liquids and water. Their prediction through the “Solvation Parameter Model””.

Autores: **Padró, Juan Manuel**; Pellegrino Vidal, Rocío B.; Diaz, Gisela; Ponzinibbio, Agustín; Reta, Mario R.

Nombre y lugar del evento: COLACRO XIV – Latin American Congress of Chromatography and Related Techniques, Florianopolis, Brazil.

Fecha de realización del mismo: 1-5/10/12.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

8- “Predicción de coeficientes de particion de compuestos de interés biológico entre líquidos iónicos y agua empleando el Modelo de Parámetro de Solvatación”.

Autores: **Padró, Juan Manuel**; Pellegrino Vidal, Rocío; Ponzinibbio, Agustín; Reta, Mario.

Nombre y lugar del evento: VI Congreso Argentino de Química Analítica, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina.

Fecha de realización del mismo: 26-29/09/11.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

9- “Determinación de fármacos antichagásicos mediante microextracción dispersiva líquido-líquido iónico (IL-DLLME) en muestras biológicas”.

Autores: **Padró, Juan Manuel**; Ponzinibbio, Agustín; Marson, María Elena, Mastrantonio, Guido; Reta, Mario.

Nombre y lugar del evento: VI Congreso Argentino de Química Analítica, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fé, Argentina.

Fecha de realización del mismo: 26-29/09/11.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

10- “Empleo del modelo de Abraham para predecir la extracción de compuestos orgánicos de interés biológico mediante el empleo de líquidos iónicos”.

Autores: **Padró, Juan Manuel**; Ponzinibbio, Agustín; Reta, Mario.

Nombre y lugar del evento: XXIX Congreso Latinoamericano de Química - CLAQ2010. Centro de Convenciones Julio Turbay de Ayala, Cartagena de Indias, Colombia.

Fecha de realización del mismo: 27/09-01/10/10.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen. (ISBN: 978-958-99607-0-7).

Modalidad: Póster. (Con referato).

11- “Estudio de la partición de analitos ionizables y neutros entre sistemas acuosos y líquidos iónicos (RTILs) mediante el modelo del Parámetro de Solvatación”.

Autores: **Padró, Juan Manuel**; Ponzinibbio, Agustín; Reta, Mario.

Nombre y lugar del evento: Jornadas de Ciencia y Técnica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, La Plata, Bs. As., Argentina.

Año de realización del mismo: 2009.

Modalidad: Póster.

12- “Estudio de la partición de analitos ionizables y neutros entre sistemas acuosos y líquidos iónicos (RTILs) mediante el modelo del Parámetro de Solvatación”.

Autores: **Padró, Juan Manuel**; Ponzinibbio, Agustín; Reta, Mario.

Nombre y lugar del evento: V Congreso Argentino de Química Analítica, Bahía Blanca, Bs. As., Argentina.

Fecha de realización del mismo: 02-06/11/09.

Indicar si es Resumen o Trabajo completo publicado en Actas del Congreso: Resumen.

Modalidad: Póster. (Con referato).

❖	ÍNDICE.	
❖	GLOSARIO.....	16
I.	Objetivos Generales.....	21
II.	Objetivos Específicos.....	21
❖	CAPÍTULO 1: “LÍQUIDOS IÓNICOS A TEMPERATURA AMBIENTE (RTILs)”....	22
	1.1. Definición, propiedades y aplicaciones generales.....	22
	1.2. Clasificación de los RTILs en base a su composición química.....	23
	1.3. Desarrollo histórico.....	25
	1.4. Métodos de preparación, purificación y caracterización.....	26
	1.4.1. Reacciones de cuaternización.....	27
	1.4.2. Reacciones de intercambio del anión.....	30
	1.4.2.1. Tratamiento con ácidos de Lewis.....	30
	1.4.2.2. Reacciones de metátesis.....	31
	1.5. Propiedades de los RTILs.....	32
	1.5.1. Presión de vapor.....	32
	1.5.2. Punto de fusión.....	33
	1.5.3. Estabilidad térmica.....	34
	1.5.4. Estabilidad química.....	34
	1.5.5. Viscosidad.....	34
	1.5.6. Densidad.....	35
	1.5.7. Miscibilidad en agua.....	38
	1.5.8. Solubilidades mutuas.....	39
	1.5.9. Poder de disolución.....	40
	1.5.10. Polaridad y constante dieléctrica.....	41
	1.5.11. Propiedades electroquímicas.....	42
	1.6. Los RTILs como solventes “biocompatibles”.....	43
	1.7. Aplicaciones generales de los RTIL.....	44
	1.8. Comercialización de los RTILs.....	45
	1.9. Bibliografía.....	46
❖	CAPÍTULO 2: “COEFICIENTES DE PARTICIÓN LÍQUIDO IÓNICO/AGUA. MECANISMO DE PARTICIÓN Y PREDICCIÓN DE LOS COEFICIENTES PARA COMPUESTOS DE INTERÉS BIOLÓGICO”.....	51
	2.1. Coeficientes de partición <i>RTIL/agua</i> ($P_{LI/a}$): consideraciones generales.....	51
	2.2. “Modelo de Kamlet-Taft” y “Modelo del Parámetro de Solvatación”.....	54
	2.3. Parámetros de soluto.....	57
	2.3.1. Volumen molar, V	58
	2.3.2. Polarizabilidad, E	58
	2.3.3. Polaridad/polarizabilidad, S	59
	2.3.4. Descriptores de enlaces de hidrógeno, A y B	59
	2.4. Parámetros empíricos de solvente.....	60
	2.5. Parte experimental.....	67
	2.5.1. Reactivos.....	67

2.5.2.	Materiales y equipos	68
2.5.3.	Síntesis de los RTILs	69
2.5.3.1.	<i>Preparación de tetrafluorborato de 1-octil-3-metilimidazolio, [C₈C₁im][BF₄]</i>	70
2.5.3.2.	<i>Preparación de NaBF₄</i>	70
2.5.3.3.	<i>Preparación de hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, [C₄C₁im][PF₆]</i>	71
2.5.3.4.	<i>Preparación de hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, [C₈C₁im][PF₆]</i>	71
2.5.3.5.	<i>Preparación de tetrafluorborato de N-octil-piridinio, [C₈pyr][BF₄]</i>	72
2.5.4.	Purificación de los RTILs con catión fosfonio	72
2.5.5.	Obtención de los coeficientes de partición	73
2.5.6.	Determinación de los parámetros de solvente	74
2.5.7.	Cálculo de los parámetros de soluto y regresiones multiparamétricas de mínimos cuadrados	74
2.6.	Resultados y discusiones	75
2.6.1.	Coeficientes de partición, $P_{LL/a}$	75
2.6.1.1.	<i>Particiones empleando RTILs con cationes nitrogenados</i>	75
2.6.1.2.	<i>Particiones empleando RTILs con cationes fosfonio</i>	76
2.7.	Parámetros de solvente obtenidos para los RTILs estudiados	89
2.7.1.	Parámetro π^*	89
2.7.2.	Parámetro β	90
2.7.3.	Parámetro α	90
2.7.4.	Parámetro E_T^N	91
2.8.	Construcción del “Modelo del Parámetro de Solvatación” (MPS)	92
2.9.	Evaluación del “Modelo del Parámetro de Solvatación” (MPS)	95
2.10.	Evaluación de las ecuaciones del MPS obtenidas: análisis de residuos y predicción de los $P_{LL/a}$ para la serie de prueba	99
2.11.	Bibliografía	101

❖ **CAPÍTULO 3: “TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)”105**

3.1.	ELL Convencional	105
3.2.	ELL Miniaturizadas	109
3.2.1.	Microextracción en fibra hueca (MEFH)	109
3.2.2.	Microextracción en gota colgante (MEGC)	111
3.2.3.	Microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD)	112
3.2.3.1.	<i>Variables que afectan al proceso de extracción en MELLD</i>	114
3.3.	RTILs en separaciones cromatográficas y pretratamiento de muestra	115
3.4.	Extracción líquido-líquido empleando líquidos iónicos	116
3.5.	Bibliografía	118

❖ **CAPÍTULO 4: “ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO: DISEÑO DEL EXPERIMENTO MEDIANTE UN DISEÑO CENTRAL COMPUESTO (DCC)”121**

4.1. Introducción.....	121
4.2. Factores.....	122
4.3. Selección de las respuestas.....	123
4.4. Estrategias de optimización.....	124
4.5. Funciones respuesta: <i>el modelo</i>	126
4.6. Diseños factoriales simultáneos.....	126
4.7. Diseño central compuesto (DCC).....	127
4.7.1. Selección del valor de α	130
4.7.2. Puntos centrales.....	131
4.8. Propiedades y/o características del DCC.....	132
4.8.1. Rotabilidad.....	132
4.8.2. Ortogonalidad.....	132
4.8.3. Precisión Uniforme.....	133
4.9. Función conveniencia u objetivo.....	133
4.10. Bibliografía.....	133
❖ CAPÍTULO 5: “CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE DE UN MÉTODO ANALÍTICO: VALIDACIÓN Y CIFRAS DE MÉRITO”.....	135
5.1. Validación de un método analítico.....	135
5.1.1. Método analítico y procedimiento analítico.....	137
5.2. Características de performance estudiadas: definición y procedimiento de medida.....	138
5.2.1. Precisión y exactitud.....	138
5.2.2. Linealidad y rango lineal.....	139
5.2.3. Límites inferiores del método.....	143
5.2.3.1. Límite de decisión (L_C) y límite de detección (L_D).....	143
5.2.3.2. Límite de cuantificación (L_Q).....	146
5.2.3.3. Determinación de L_D a partir de una recta de calibración calculada mediante ULSR.....	147
5.2.3.4. Métodos alternativos para la determinación del L_D	149
5.2.4. Factor de recuperación y factor de enriquecimiento.....	150
5.3. Efecto de matriz en la señal analítica: método de comparación de las pendientes.....	152
5.4. Bibliografía.....	154
❖ CAPÍTULO 6: “ENFERMEDAD DE CHAGAS”.....	156
6.1. Generalidades.....	156
6.2. El parásito.....	157
6.3. Vías de transmisión.....	158
6.3.1. Vía vectorial.....	158
6.3.2. Vía transfusional/trasplante de órgano sólido.....	160
6.3.3. Vía congénita.....	160
6.4. Evolución de la distribución de la enfermedad.....	161
6.5. Drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad.....	163
6.6. Antecedentes sobre la determinación de fármacos antichagásicos.....	166
6.7. Bibliografía.....	169

❖	CAPÍTULO 7: “MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO IÓNICO DISPERSIVA. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTICHAGÁSICOS DESDE PLASMA HUMANO Y LECHE MATERNA”	172
	7.1. Procedimiento “etapa por etapa”.....	172
	7.2. Parte experimental.....	173
	7.2.1. Reactivos y materiales.....	173
	7.2.2. Equipos.....	173
	7.2.3. Preparación de solución stock y soluciones estándar en agua y en la muestra.....	174
	7.3. Resultados y Discusiones.....	174
	7.3.1. <i>Optimización de la técnica MELLID desde una solución acuosa</i>	174
	7.3.1.1. <i>Selección del líquido iónico</i>	175
	7.3.1.2. <i>Selección del solvente dispersante</i>	177
	7.3.1.3. <i>Obtención del volumen óptimo de RTIL</i>	177
	7.3.1.4. <i>Obtención del volumen óptimo de solvente dispersante</i>	179
	7.3.1.5. <i>Selección del pH óptimo de extracción</i>	179
	7.3.1.6. <i>Estudio del efecto salino</i>	180
	7.3.1.7. <i>Influencia del tiempo de centrifugación y extracción</i>	181
	7.4. Procedimiento de extracción “etapa por etapa” optimizado.....	182
	7.4.1. Adaptación del procedimiento de extracción optimizado para muestras de plasma humano.....	183
	7.5. Performance analítica de la metodología de optimización “etapa por etapa”...183	
	7.6. Optimización de la técnica MELLID aplicada a leche materna mediante diseño central compuesto (DCC).....	189
	7.6.1. Experimentos y respuestas.....	191
	7.7. Procedimiento experimental optimizado mediante DCC.....	197
	7.8. Performance analítica de la metodología de optimización mediante DCC.....	197
	7.9. Análisis de muestras de leche de pacientes tratados con los fármacos antichagásicos.....	201
	7.10. Bibliografía.....	202
❖	CONCLUSIONES	204
❖	APÉNDICE	207
	Tabla 1	207
	Tabla 2	210

❖ Glosario

RTILs: Room Temperature Ionic Liquids

MELLID: Microextracción líquido-líquido iónico dispersiva

DCC: Diseño Central Compuesto

$P_{L/a}$: Coeficiente de Partición Líquido Iónico/agua

MPS: Modelo del Parámetro de Solvatación

LIs: Líquido Iónicos

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

USAF: United States American Force

Pf: Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)

$P_{\text{oct/w}}$: Coeficiente de Partición 1-octanol/agua

ϵ : Constante dieléctrica

$E_T(30)$: Parámetro solvatocrómico de Reichardt (30) (Parámetro de polaridad de solvente)

E_T^N : Reactivo solvatocrómico de Reichardt (30) normalizado (Parámetro de polaridad de solvente normalizado)

HPLC: High-Performance Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Performance)

UV: Ultravioleta

DAD: Diode Array Detector

K_D° : Constante termodinámica de distribución (o de reparto)

a: Actividad

M: Molaridad

P: Coeficiente de Partición

μ : Potencial químico

μ° : Potencial químico estándar

R: Constante de los gases

T: Temperatura absoluta

x: Fracción molar

RLEL: Relaciones Lineales de Energía Libre

LSER: Linear Solvation Energy Relationship

ΔG : Energía libre de Gibbs

k: Factor de retención

π^* : Parámetro empírico de solvente que mide polaridad-polarizabilidad

β : Parámetro empírico de solvente que mide la capacidad de aceptar puente H en la formación de puente
 α : Parámetro empírico de solvente que mide la capacidad de donar puente H en la formación de puente
 δ^2_{H} : Parámetro experimental de solvente que mide la energía cohesiva (Parámetro de solubilidad de Hildebrand)
 ξ : Parámetro empírico que mide la covalencia coordinada del enlace soluto-solvente
 ν : Frecuencia del máximo de una banda de absorción ($= 1/\lambda_{\text{máx.}} \cdot 1000 \text{ cm}^{-1}$)
 s : Polaridad
 b : Capacidad de aceptar puente de H
 a : Capacidad de donar puente de H
 m : Volumen molar (o área superficial) *del soluto*
 S : Polaridad/polarizabilidad del soluto
 A : Capacidad de donar puente H del soluto al medio o solvente
 B : Capacidad de aceptar puente H del soluto al medio o solvente
 E : Polarizabilidad debida a pares de electrones libres presentes en los heteroátomos de moléculas de soluto
 V : Volumen molar del soluto que pretende modelar la cohesividad y las interacciones dispersivas simultáneamente
 φ : Relación de fases
 R_g : Número total de anillos de la estructura química
 η : Índice de refracción
 K^{H}_{A} : Constante de acidez
 K^{H}_{B} : Constante de basicidad
 α^{H}_2 : Escala de acidez de enlace de hidrógeno
 β^{H}_2 : Escala de basicidad de enlace de hidrógeno
 IR : Espectroscopia infrarroja
 h : Constante de Planck
 c : velocidad de la luz en el vacío
 ΔH_{vap} : Entalpía molar de vaporización
 $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$: Hexafluorofosfato de *I*-butil-3-metilimidazolio
 $[\text{C}_6\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$: Hexafluorofosfato de *I*-hexil-3-metilimidazolio
 $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$: Hexafluorofosfato de *I*octil-3-metilimidazolio

[C₈C₁im][BF₄]: Tetrafluorborato de 1-octil-3-metilimidazolio
[C₈pyr][BF₄]: Tetrafluorborato de N-octilpiridinio
[(C₆)₃C₁₄P][Cl]: Cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio
[(C₆)₃C₁₄P][Br]: Bromuro de trihexil(tetradecil)fosfonio
[(C₆)₃C₁₄P][N(CN)₂]: Dicianoimida de trihexil(tetradecil)fosfonio
[(C₆)₃C₁₄P][NTf₂]: bis(trifluoro)sulfonil imida de trihexil(tetradecil)fosfonio
C_a: Concentración de soluto en equilibrio en la fase acuosa
C_i: Concentración de soluto inicial
HBD: Hydrogen Bond Donor
HBA: Hydrogen Bond Acceptor
ACN: Acetonitrilo
MeOH: Metanol
r²: Coeficiente de determinación
DS: Desviación estándar
ELL: Extracción líquido-líquido
γ: Coeficiente de actividad
MELLD: Microextracción líquido-líquido dispersiva
r: Relación entre los volúmenes de las fases
V_a: Volumen de la fase acuosa
V_o: Volumen de la fase orgánica
MEFH: Microextracción en fibra hueca
HFME: Hollow fiber microextraction
MEGC: Microextracción en gota colgante
FE: Factor de enriquecimiento
R%: Factor de recuperación porcentual
C_o: Concentración de soluto inicial en la fase acuosa
CG: Cromatografía de gases
CL: Cromatografía de líquidos
EM: Espectrometría de masas
EC: Electroforesis capilar
ANOVA: Analysis of variance
k: Número de factores
pf: Puntos factoriales

pe: Puntos axiales o puntos estrellas

pc: Puntos centrales

D: función conveniencia u objetivo de Derringer

RSD: Relative standard deviation (Desviación estándar relativa)

L_D : Límite de detección

L_Q : Límite de cuantificación

L_C : Límite de decisión

t: Prueba-*t* de Student

NFX: Nifurtimox

BNZ: Benznidazol

TLC: Thin layer chromatography

$E_r\%$: Error relativo porcentual

I. Objetivos Generales.

Obtener coeficientes de partición para analitos de diversa naturaleza química entre líquidos iónicos a temperatura ambiente y soluciones acuosas. Emplear estos coeficientes en el “Modelo del Parámetro de Solvatación” con la finalidad de predecir extracciones desde matrices acuosas con altos factores de recuperación. Emplear los resultados obtenidos en la “microextracción líquido-líquido iónico dispersiva” de compuestos antichagásicos (benznidazol y nifurtimox) presentes en plasma humano y leche materna.

II. Objetivos Específicos.

- a.** Obtener coeficientes de partición a 25 °C entre diferentes líquidos iónicos (con catión imidazolio, piridinio y fosfonio) y agua para analitos de diversa naturaleza química.
- b.** Emplear el “Modelo del Parámetro de Solvatación” para entender las interacciones involucradas en el mecanismo de partición y para obtener coeficientes de partición para analitos de interés biológico y farmacológico a fin de evaluar la capacidad predictiva del modelo.
- c.** Determinar parámetros de solvente para los líquidos iónicos estudiados a fin de interpretar los resultados obtenidos mediante el “Modelo del Parámetro de Solvatación”.
- d.** Emplear los líquidos iónicos para los cuales se obtuvieron coeficientes de partición elevados para realizar extracciones/preconcentraciones de drogas antichagásicas desde plasma humano y leche materna a través de la técnica de microextracción líquido-líquido iónico dispersiva.
- e.** Optimizar la microextracción dispersiva mediante un procedimiento “etapa por etapa” para la determinación de los compuestos antichagásicos en plasma humano.
- f.** Optimizar la técnica de extracción mediante un diseño central compuesto para la extracción desde leche materna.
- g.** Validar las metodologías analíticas mediante la determinación de algunas cifras de mérito tales como límites de detección y cuantificación, rangos lineales, reproducibilidad inter e intra-día, factores de recuperación y enriquecimiento.

❖ CAPÍTULO 1: “LÍQUIDOS IÓNICOS A TEMPERATURA AMBIENTE (RTILs)”.

1.1. Definición, propiedades y aplicaciones generales.

Los líquidos iónicos (LIs) son sales con bajo punto de fusión (generalmente < 100 °C). Aquellos que presentan puntos de fusión por debajo de la temperatura ambiente (room temperature ionic liquids: RTILs) son los que presentan mayor interés en la mayoría de las aplicaciones. La mayoría de los líquidos iónicos que aparecen en la literatura son líquidos a temperatura ambiente.

Los RTILs han suscitado un gran interés en los últimos años debido principalmente a que estos materiales, usados inicialmente en aplicaciones electroquímicas, presentan una gran utilidad como medios de reacción en procesos químicos [1, 2], bioquímicos [3, 2] y como medios de extracción [4–12]. Una ventaja muy importante de los RTILs es su baja o nula presión de vapor, lo cual los hace más benignos comparado con los disolventes orgánicos volátiles [13, 14].

Los RTILs son considerados como “solventes de diseño”, en el sentido de que se pueden modular sus propiedades físicas y químicas variando la naturaleza de los cationes y aniones presentes en sus estructuras específicas [15, 16].

Las propiedades de los RTILs se pueden resumir de la siguiente manera:

- Extremadamente baja volatilidad
- Bajo punto de fusión
- Elevada estabilidad térmica y química
- muy baja (o nula) inflamabilidad
- Elevada conductividad iónica
- Alta conductividad térmica
- Alta capacidad calorífica
- Amplia ventana de potencial electroquímico

Respecto de la eco-compatibilidad, las ventajas de los RTILs todavía no están muy claras, ya que los estudios sobre su toxicidad y biodegradabilidad son todavía escasos [13, 17–19].

1.2. Clasificación de los RTILs en base a su composición química.

Los RTILs están formados por iones muy asimétricos y de gran tamaño, de tal manera que las fuerzas atractivas anión-cación son más débiles que en una sal iónica convencional (sal fundida) y de esta manera, son líquidos aún a temperatura ambiente [20]. En el caso del cloruro de sodio, cuando se van uniendo los aniones cloruro con los cationes sodio se produce un elevado empaquetamiento entre ellos para formar el cristal. Sin embargo, a partir de dos iones poco uniformes y uno de ellos muy asimétrico (por ej. un catión orgánico) no puede lograrse un empaquetamiento que dé lugar a una estructura compacta. Basta un pequeño aporte de energía para separar los aniones y los cationes que configuran el sólido y transformarlo en un líquido. Este pequeño aporte se logra cuando se expone a temperaturas próximas a la ambiente.

Para fundir un cristal de cloruro de sodio se necesita aportar una gran cantidad de energía ya que hay que calentarlo a temperaturas superiores a 800 °C para lograr la separación de los iones que lo forman. En el caso de un RTIL con catión *1*-alquilimidazolio, por ejemplo, la estructura del cristal responde a una ordenación de las moléculas en capas debido a la separación que implica la cadena alquílica. Esta estructura puede destruirse fácilmente, por exposición a temperatura ambiente, dando lugar a un líquido.

Los RTILs están compuestos por cationes orgánicos que contienen nitrógeno (como en el caso de los derivados de imidazolio, alquilamonio, piridinio, pirrolidinio, etc.) o fósforo (alquilfosfonio). Los aniones pueden ser orgánicos (conteniendo nitrógeno, fósforo, azufre, etc.) o inorgánicos (tetrafluorborato, hexafluorofosfato, nitrato, bromuro, cloruro, etc.). En la **Figura 1.1** se muestran algunas estructuras típicas de cationes y aniones usualmente utilizados para la síntesis de RTILs. Actualmente en la literatura se los suele encontrar con diversas nomenclaturas, por ejemplo el hexafluorofosfato de *1*-butil-3-metilimidazolio se lo encuentra en diversos trabajos como: (BMIM-PF₆) [21]; [MBIm]⁺[PF₆]⁻ [10]; [bmim][PF₆] [22]; [BMIM]⁺[PF₆]⁻ [2]; [BmIm][PF₆] [23]; [C₄C₁im][PF₆] [24], etc. Fue esta última nomenclatura la adoptada para este trabajo de tesis debido a su simplicidad y mayor claridad.

Debido a que existen muchas combinaciones posibles de cationes y aniones, el número potencial de RTILs es enorme, del orden de 10¹⁸. Sintetizar un nuevo tipo de RTIL es relativamente fácil, pero determinar sus propiedades físicas, químicas y aplicaciones requiere una inversión mucho más sustancial de tiempo y dinero. Lo ideal, en todos los casos, sería encontrar un método que nos predijese las propiedades físicas y químicas a partir de la estructura química de un dado RTIL. Para ello sería necesario un mejor entendimiento de la relación estructura-propiedad, así como el

desarrollo de mejores métodos de cálculo.

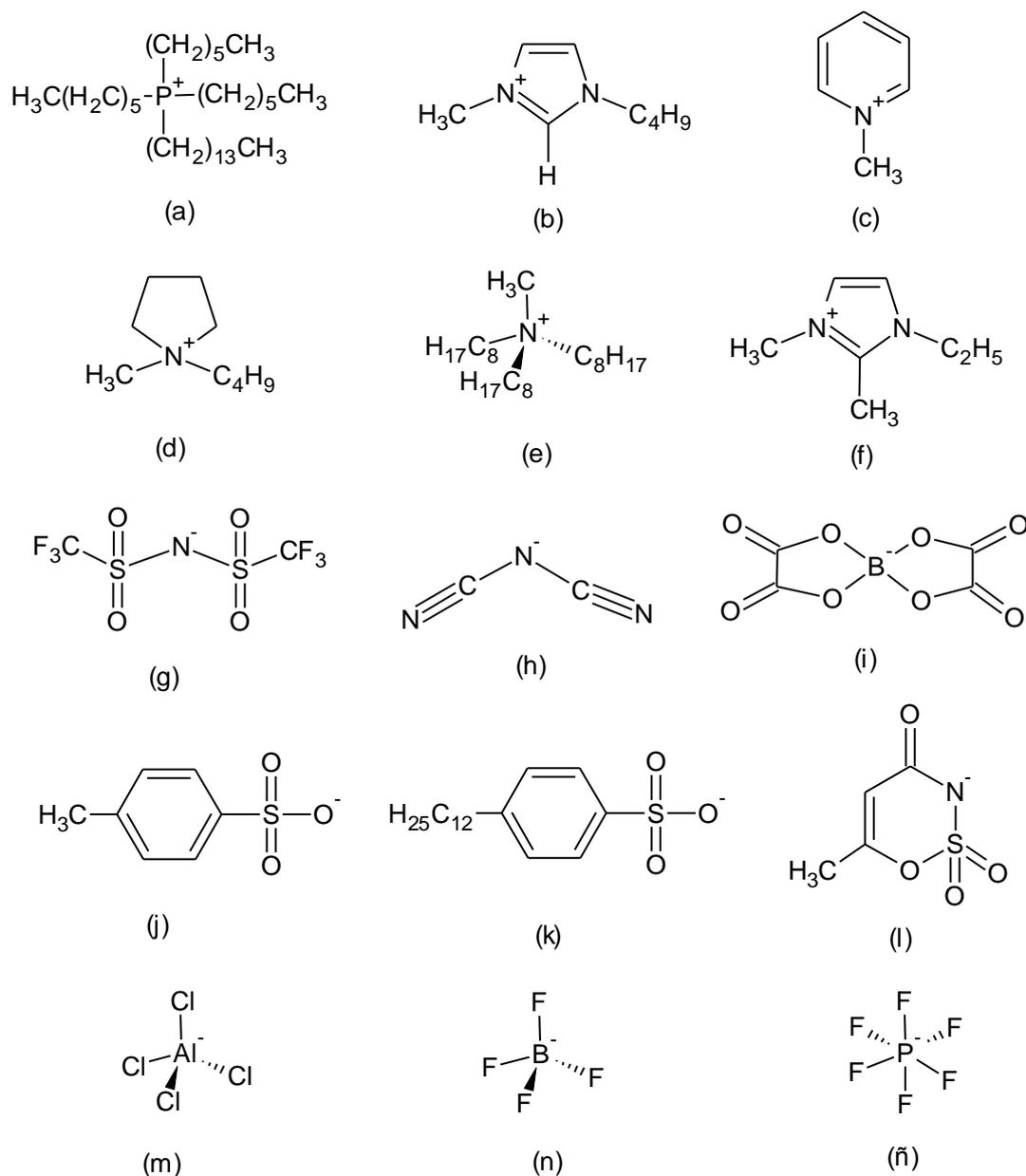


Figura 1.1: Ejemplo de estructuras moleculares de cationes y aniones usualmente utilizados para la síntesis de RTILs: (a) trihexil(tetradecil)fosfonio $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}]^+$; (b) *1*-butil-3-metilimidazolio $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}]^+$; (c) metilpiridinio $[\text{C}_1\text{pyr}]^+$; (d) *1*-butil-3-metilpirrolidinio $[\text{C}_4\text{C}_1\text{pyrr}]^+$; (e) trioctil(metil)amonio $[(\text{C}_8)_3\text{C}_1\text{N}]^+$; (f) *1*-etil-2,3-dimetilimidazolio $[\text{C}_2\text{m}_2\text{im}]^+$; (g) bis(trifluorosulfonil)imida $[\text{NTf}_2]^-$; (h) dicianoimida $[\text{N}(\text{CN})_2]^-$; (i) oxaloborato $[\text{OxB}]^-$; (j) tosilato $[\text{tos}]^-$; (k) ácido dodecilbencilsulfónico $[\text{adbs}]^-$; (l) acesulfamato $[\text{ace}]^-$; (m) tetracloaluminato $[\text{AlCl}_4]^-$; (n) tetrafluorborato $[\text{BF}_4]^-$; (ñ) hexafluorofosfato $[\text{PF}_6]^-$.

1.3. Desarrollo histórico.

A mediados del siglo XIX, en el transcurso de la reacción de Friedel-Crafts entre una sal formada por cloruro de aluminio, AlCl_3 , (la cual se usaba como catalizador) y compuestos aromáticos se obtuvo una fase líquida, a la que se denominó “*aceite rojo*”. Posteriormente, por técnicas de RMN, se descubrió que este aceite rojo era una sal, que se trataba de un líquido iónico [2]. En 1914, Paul Walden obtuvo algunos nitratos de alquilamonio líquidos, tales como el nitrato de etilamonio que es inodoro, transparente, ligeramente amarillento, líquido a temperatura ambiente, con un punto de fusión de $12\text{ }^\circ\text{C}$ y viscosidad del orden de 32 cp ($25\text{ }^\circ\text{C}$) [25]. El nitrato de etilamonio se lo usa como solvente “conductor” en electroquímica y como agente de cristalización de proteínas [26].

Durante los años 40 se utilizaron líquidos iónicos derivados del cloruro de aluminio en procesos de deposición electrolítica a alta temperatura. Más adelante, cerca de la década del 60, Yoke y col. comprobaron que las mezclas de cloruro de cobre (I) y cloruros de alquilamonio eran a menudo líquidas a temperatura ambiente [27]. En los años 70, J. L. Atwood y J. D. Atwood descubrieron una clase inusual de sales líquidas que llamaron “clatratos líquidos” [28]. La formulación de estos compuestos era $\text{M}[\text{Al}_2(\text{CH}_3)_6\text{X}]$, donde M se refería a un catión orgánico o inorgánico y X era un haluro. Ninguno de los compuestos que acaban de describirse son los antecesores directos de la actual generación de líquidos iónicos.

La mayoría de los actuales LIs derivan directamente de las sales fundidas a alta temperatura, en el intento de bajar su alto punto de fusión. En 1963 el Mayor (Dr.) Lowell I. A. King de la Academia de las Fuerza Aérea de los Estados Unidos (USAF), iniciaba un proyecto de investigación dirigido a reemplazar en las baterías térmicas las sales fundidas de LiCl/KCl . Aunque la mezcla eutéctica tiene una temperatura de fusión relativamente baja ($355\text{ }^\circ\text{C}$) para ser una sal inorgánica, esta temperatura puede dañar las baterías ya que resultaban muy corrosivas para los materiales con los que entraban en contacto. De ahí la necesidad de desarrollar nuevas sales que permaneciesen líquidas a temperaturas más bajas. De esta manera comenzó el interés científico y tecnológico por las sales líquidas a más bajas temperaturas. Los cloroaluminatos, que son una mezcla de un haluro alcalino y cloruro de aluminio, surgieron como sustituyentes de las anteriores sales fundidas, ya que tiene una temperatura de fusión mucho más baja que casi todas las demás sales eutécticas inorgánicas. De hecho, la sal eutéctica NaCl/AlCl_3 tiene un punto de fusión de $107\text{ }^\circ\text{C}$, curiosamente cercana a la de un RTIL. Las investigaciones llevadas a cabo en este sentido culminaron con una patente para baterías térmicas utilizando NaCl/AlCl_3 como electrolito. Desde entonces, el programa de

investigación sobre sales fundidas/LIs, fue continuando por tres investigadores principales: King, Wilkes y Carlin. Durante el transcurso de sus investigaciones en la búsqueda de nuevos electrolitos para baterías encontraron una patente donde se describía la conductividad iónica de mezclas de AlCl_3 y haluros de *l*-etilpiridinio, principalmente bromuros [29, 30]. Seguidamente se encontró que la mezcla de cloruro de *l*-butilpiridinio/ AlCl_3 tenía mejor comportamiento que la de haluros descubierta anteriormente [31]. Este punto es el comienzo de la era moderna para los LIs, ya que a partir de ese momento surge por parte de los químicos un gran interés por estos nuevos disolventes totalmente iónicos. Los cationes con más posibilidades de ser utilizados como electrolitos fueron las sales de dialquimidazolio siendo el *l*-etil-3-metil-imidazolio, $[\text{C}_2\text{C}_1\text{im}]^+$, el más utilizado. El $[\text{C}_2\text{C}_1\text{im}][\text{Cl}]$ mezclado con AlCl_3 daba lugar a LIs con temperaturas de fusión por debajo de la temperatura ambiente en un amplio rango de composiciones [32], hoy conocidos como RTILs.

Seguidamente a la síntesis y caracterización de estas nuevas sales, el grupo de investigación de la USAF llevó a cabo algunas reacciones orgánicas en estos medios, tales como las del tipo Friedel-Crafts, encontrándose que estos líquidos tenían un excelente comportamiento tanto como disolventes como catalizadores [33]. Respecto a su utilización como disolventes, parecían actuar como el acetonitrilo, con la diferencia de que eran totalmente iónicos y no se volatilizaban. Sin embargo, los LIs basados en cloroaluminato de piridinio o imidazolio presentaban la desventaja de reaccionar con el agua.

En 1990, Mide Zaworotko, durante su estancia en la USAF, preparó y caracterizó nuevas sales basadas en cationes de dialquilimidazolio y aniones del tipo tetrafluorborato, hexafluorborato, nitrato, sulfato y acetato que eran estables frente a la hidrólisis, al menos a temperatura ambiente [34]. Así, estas sales se impusieron como las mejores candidatas para ser utilizadas como electrolitos en baterías. Joan Fuller continuó durante varios años extendiendo el catálogo de RTILs estables en agua, descubriendo mejores rutas para su preparación. Fuller sintetizó un gran número de RTILs basados en el catión dialquilimidazolio, ampliando las series a los mono y trialquilimidazolio, combinando estos cationes con aniones de diverso tamaño como los aniones antes mencionados además del bromuro, cianuro, bisulfato, yodato, trifluorometilsulfonato, tosilato, fenilfosfonato y tartrato. Desde entonces, la síntesis de nuevos RTILs es continua al ser casi ilimitada la cantidad de aniones y cationes que pueden formar parte de su estructura.

1.4. Métodos de preparación, purificación y caracterización.

Como se ha comentado, los primeros RTILs que se sintetizaron fueron nitratos de

alquilamonio [25] y se prepararon mediante la adición de ácido nítrico a alquilaminas. Así, un método simple para la obtención de RTILs es la protonación de compuestos tales como aminas y fosfinas. Sin embargo, este método sólo puede ser utilizado para un pequeño número de sales, ya que muchas se descomponen mediante deprotonación.

En general, la síntesis de RTILs supone dos etapas bien diferenciadas: la formación del catión que constituirá el RTIL (reacción de cuaternización), y la reacción de intercambio iónico que generará el producto deseado. En **Figura 1.2** se muestra el esquema general para una amina como reactivo de partida para la obtención de sales de tetraalquilamonio.

Sólo en algunas síntesis es necesaria la primera etapa, como es el caso de la formación de nitrato de etilamonio. En muchos casos, el catión se puede adquirir en su forma comercial a un costo razonable, presentándose en la forma de sal de haluro. Así, lo único que se requiere para formar el RTIL es el intercambio del anión.

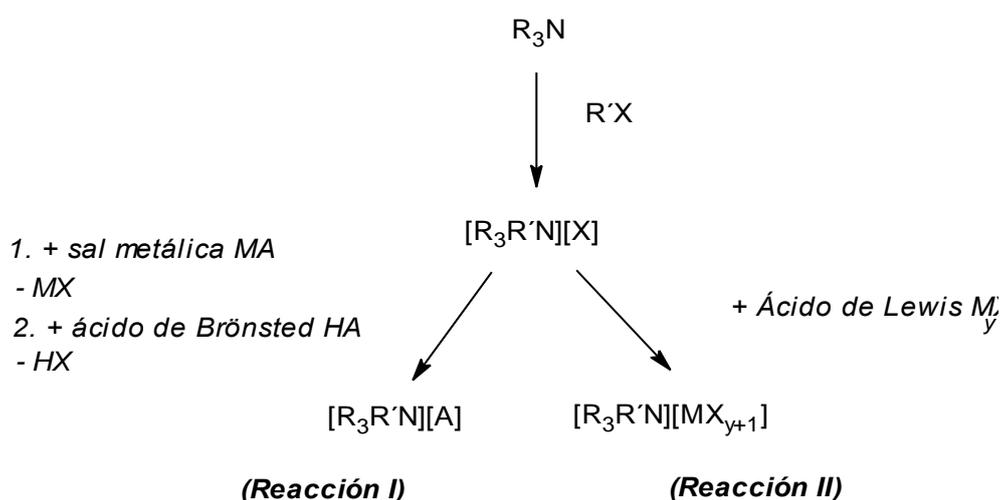


Figura 1.2: Síntesis de RTILs con catión tetraalquilamonio.

1.4.1. Reacciones de cuaternización.

La formación de los cationes (Reacción I de la **Figura 1.2**) que posteriormente constituirán los RTILs, puede ser llevada a cabo mediante la protonación con un ácido o por cuaternización de una amina o una fosfina, principalmente con un haloalcano. Las reacciones de protonación se usan para síntesis de sales tales como el nitrato de etilamonio, en la cual se adiciona ácido nítrico 3 M a una disolución acuosa enfriada de etilamina [35]. Las reacciones de cuaternización consisten en polisustituir una amina o una fosfina hasta conseguir hacerla cuaternaria, mediante reacción con un

haluro de alquilo. Los procesos de cuaternización poseen como ventajas el amplio rango de haloalcanos disponibles a bajo precio y el hecho de que las reacciones transcurren a temperaturas relativamente suaves. Además, las sales formadas pueden ser transformadas en sales de otros aniones. En general, la reacción puede ser llevada a cabo mediante cloroalcanos, bromoalcanos y iodoalcanos. Las temperaturas de reacción descienden en el orden $\text{Cl} < \text{Br} < \text{I}$, tal y como es de esperar en reacciones de sustitución nucleofílica.

En principio las reacciones de cuaternización son muy simples de llevar a cabo; en ellas, la amina o la fosfina, se mezclan con un determinado haloalcano y la mezcla de reacción se agita y calienta. En general, los *1*-alquilimidazoles son los productos de partida más utilizados en la síntesis de RTILs, sin embargo pueden ser sintetizados a partir del imidazolio como se observa en la **Figura 1.3 (a)**, en la misma se observa que (R) es la cadena de alquilo. En la **Figura 1.3 (b)** se observa de modo esquemático uno de sus métodos de síntesis de *1,3*-dialquilimidazoles a partir de un alquilimidazolio, donde R'X consiste en el haloalcano adicionado. También se han empleado otras aminas tales como piridina [36], *1*-metilpirrolidina [37] y trialquilaminas [38], así como también fosfinas [39].

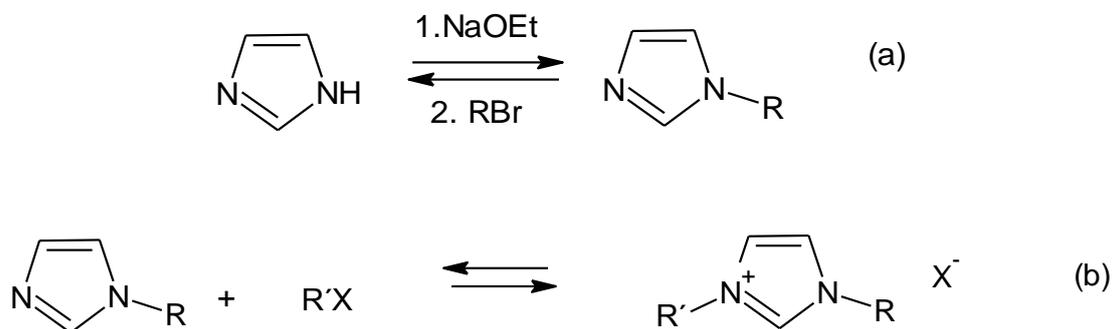


Figura 1.3: Reacciones básicas de alquilación.

La temperatura de reacción y el tiempo son muy dependientes del haloalcano empleado, siendo los cloroalcanos los menos reactivos y los iodoalcanos los más. La reactividad de los haloalcanos decrece con el incremento de la longitud de cadena. Para la reacción del *1*-metilimidazolio con cloroalcanos es necesario calentar a 80 °C durante dos o tres días para asegurarse que la reacción se ha completado. La misma reacción con bromoalcanos se completa a las 24 hs a temperaturas más bajas, entre 50 y 60 °C. La reacción con iodoalcanos se puede realizar a temperatura ambiente, pero como las sales de iodo generadas son sensibles a la luz, es conveniente

proteger el recipiente de reacción. Además, si es posible, la reacción debería llevarse a cabo bajo atmósfera de nitrógeno u algún otro gas inerte con el fin de evitar trazas de agua y oxígeno durante la reacción de cuaternización. La eliminación del oxígeno es un factor importante si se desea que la sal del haluro obtenida no presente color.

En general, el requerimiento más importante es que la mezcla de reacción se mantenga libre de humedad, ya que los productos de reacción son a menudo muy higroscópicos. La reacción puede llevarse a cabo sin el uso de disolventes, ya que los reactivos son generalmente líquidos y miscibles entre ellos y el producto de reacción, la sal del haluro, es normalmente inmisible con los materiales de partida. Sin embargo, a menudo se utilizan disolventes tales como el propio haluro de alquilo, *1,1,1*-tricloroetano [40], etanoato de etilo [41] o tolueno [42]. Estos disolventes presentan la particularidad de que son inmiscibles con la sal de haluro formada, separándose en una segunda fase. La sal de haluro se puede separar por decantación, eliminando los productos que puedan quedar en la misma por calentamiento a vacío. En el proceso de calentamiento no se deben sobrepasar los 80 °C ya que un calentamiento excesivo, puede conllevar una inversión de la reacción de cuaternización. Las sales de haluro sintetizadas son generalmente sólidas a temperatura ambiente, aunque algunos ejemplos tales como sales de *1*-metil-3-octilimidazolio, permanecen como aceites viscosos incluso a esta temperatura.

Si las reacciones se realizan a escala relativamente grande, se pueden aislar los productos con un rendimiento superior al 90%, incluso llevando a cabo una etapa de recristalización. El almacenamiento de los productos es conveniente que se realice en el interior del desecador, ya que las sales formadas tienden a ser higroscópicas especialmente cuando los sustituyentes alquílicos son de cadena corta.

Las posibles impurezas presentes en las sales obtenidas pueden ser productos de partida que no han reaccionado y disolvente. Las sales de haluro generalmente se usan como fuente del catión y deben ser eliminadas para la mayor parte de las aplicaciones, por lo que se ha de asegurar mediante RMN que el RTIL final está libre de estos compuestos.

No sólo las sales de haluro se pueden preparar mediante este procedimiento. Las reacciones de cuaternización entre *1*-alquilimidazoles y metiltriflato [40], trialquilaminas y metiltosilatos [43], y trifenilfosfina y octil tosilato se han usado para la preparación directa de RTILs, y, en principio, cualquier alquil compuesto que contenga un buen grupo saliente puede ser utilizado en esta vía de síntesis.

La mayoría de los RTILs son incoloros. La coloración más o menos leve que se pueda observar en algunos productos, es debida a la presencia de trazas de impurezas coloreadas, en su

mayoría originadas por oxidación o degradación térmica de cantidades insignificantes de los reactivos de partida. Pese a ello, la coloración de los RTILs también depende del tipo de catión y anión que estén involucrados en su estructura.

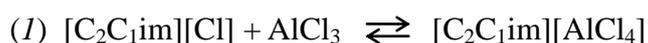
Las impurezas que dan color a los RTILs están generalmente presentes en ínfimas cantidades y es prácticamente imposible detectarlas por métodos analíticos convencionales, excepto por espectroscopia UV-Vis.

1.4.2. Reacciones de intercambio del anión.

Dentro de este tipo de reacciones (Reacción II de la **Figura 1.2**), se puede distinguir aquellas que consisten en el tratamiento directo de las sales del haluro con ácidos de Lewis y las reacciones que se conocen como metátesis aniónicas. Esa división en dos categorías radica en que los métodos experimentales utilizados para cada una de éstas son diferentes.

1.4.2.1. Tratamiento con ácidos de Lewis.

La formación de RTILs por tratamiento de sales de haluro con ácidos de Lewis (especialmente con AlCl_3) fue la principal vía de síntesis de RTILs durante los primeros años de su desarrollo. En términos generales, el tratamiento de haluros de sales cuaternarias Q^+X^- con ácidos de Lewis MX_n conduce a la formación de más de una especie aniónica, dependiendo de las proporciones relativas de los reactivos de partida. Esta reacción es generalmente bastante exotérmica, aunque estas sales son relativamente estables y el exceso local de calor puede dar lugar a la descomposición del RTIL. Por ejemplo para el caso de cloroaluminatos, el producto (1) se dará cuando él $[\text{C}_2\text{C}_1\text{im}][\text{Cl}]$ esté en exceso frente al ácido y el producto de reacción será un líquido iónico básico. Conforme se incremente la cantidad de ácido en la reacción, se darán de forma mayoritaria los equilibrios (2) y (3) que producirán RTILs de carácter ácido.



La sensibilidad al agua de la mayor parte de los reactantes al igual que el RTIL, supone que las reacciones tienen que llevarse a cabo en ausencia de trazas de agua. Del mismo modo, es conveniente que después de su síntesis los productos sean almacenados en un desecador al vacío.

Los cloroaluminatos no son los únicos RTILs preparados por esta vía. También se pueden emplear otros ácidos de Lewis tales como AlEtCl₂ [44], BCl₃ [45], CuCl [46] y SnCl₂ [47].

1.4.2.2. Reacciones de metátesis.

La primera preparación de RTILs basados en cationes 1,3-dialquil-metilimidazolio relativamente estables al agua y al aire, conocidos como líquidos iónicos de “segunda generación”, fue descrita por Wikes y Zaworotko [34] en 1992. La preparación de estos nuevos RTILs era llevada a cabo mediante reacciones de metátesis entre [C₂C₁im][I] y una serie de sales de plata (AgNO₃, AgNO₂, AgBF₄, AgAc, y Ag₂SO₄), utilizando como disolvente metanol o disoluciones acuosas de metanol. A continuación se muestra de modo esquemático la reacción general de formación a partir de sales de plata.



La baja solubilidad del AgI en estos disolventes permite su separación por simple filtración. La posterior eliminación del disolvente permite aislar el producto con altos rendimientos y purezas. Este método es considerado como el más eficiente para la síntesis de RTILs miscibles con agua, aunque está limitado por el alto costo de las sales de plata y las grandes cantidades de subproducto sólido formado. Posteriormente al método descrito, se publicó la primera síntesis de un líquido iónico inmisible con agua, [C₂C₁im][PF₆], obtenido por la reacción entre [C₂C₁im][Cl] y HPF₆ en una disolución acuosa [48].

Se describirá a continuación la síntesis de *RTILs insolubles en agua* que son los que se emplean en extracciones líquido/líquido típicas. La síntesis de estos RTILs es considerablemente más sencilla que sus análogos solubles. La solubilidad en agua depende de la naturaleza del anión y del catión de los que se compone, y en general decrece con el incremento del carácter orgánico del catión. La forma más común para la preparación de RTILs inmiscibles con agua consiste en preparar en primer lugar una disolución acuosa de la sal del haluro del catión a la que se añade el anión, en su forma ácida, como sal alcalina o de amonio, teniendo entonces lugar la reacción de intercambio aniónico. Métodos alternativos de síntesis suponen el uso de plata [34] o sales de plomo [49]. Cuando se utiliza como fuente del anión la forma ácida del mismo, la reacción se ve favorecida, liberándose al medio HCl, HBr o HI como subproducto que puede ser eliminado mediante lavado con agua. Se recomienda en estos casos que estas reacciones sean llevadas a cabo con enfriamiento

de la disolución de la sal de haluro mediante un baño de hielo, ya que las reacciones de metátesis son a menudo exotérmicas. En los casos en que la forma ácida no esté disponible o la presencia de trazas de ácido pudiera causar problemas, se podría sustituir por un metal alcalino o una sal de amonio. Cuando se utiliza la forma ácida como fuente del anión, el lavado de los RTILs sintetizados debería continuar hasta que las aguas de lavado fueran neutras, ya que las trazas de ácido pueden causar la descomposición del producto con el tiempo.

Las sales con base en el anión $[\text{PF}_6]^-$ tienen como problema particular la formación lenta de HF especialmente por calentamiento si el RTIL no está completamente libre de ácido. Cuando se opta por usar un metal alcalino o una sal de amonio, es recomendable realizar un lavado con agua y después analizar las aguas de lavado con el fin de detectar la presencia de haluros, por ejemplo mediante una valoración con nitrato de plata en el caso de que la reacción no se completase del todo.

Respecto a la purificación mediante lavado, la alta viscosidad de los RTILs hace difícil que este proceso se pueda llevar a cabo de manera eficiente. Algunos autores han recomendado la disolución de estos en CH_2Cl_2 o CHCl_3 , con el fin de disminuir la viscosidad del líquido iónico. Otra de las ventajas de este procedimiento es que la mezcla disolvente orgánico/RTILs, puede ser almacenada sobre un agente desecante tal como MgSO_4 anhidro antes de eliminar el disolvente orgánico, con el fin de reducir la cantidad de agua en el producto final. Se han empleado métodos similares a los comentados anteriormente para la preparación de sales con base en aniones $[\text{PF}_6]^-$ y $[\text{NTf}_2]^-$ [40, 41].

1.5. Propiedades de los RTILs.

Las propiedades físicas y químicas de los RTILs pueden ajustarse variando las estructuras de los cationes y aniones y sus combinaciones [50], siendo esta versatilidad una de las principales características de estos materiales. A continuación se describen algunas de las propiedades más relevantes de los RTILs:

1.5.1. Presión de vapor.

A diferencia de las sales fundidas, los RTILs presentan una débil interacción coulombica entre iones, que limitan la formación de pares iónicos necesarios para que se produzca la volatilización de las sales, por lo que estas sustancias tienen presión de vapor *muy baja o indetectable*. Esta característica los hace fácilmente manejables y al no evaporarse, permite la

utilización de la destilación para recuperar productos o sustratos volátiles disueltos en ellos en los procesos donde sean usados, ya sea en catálisis, extracciones líquido-líquido, etc. Por lo tanto, a diferencia de los solventes orgánicos tradicionales, no hace falta trabajar bajo campana cuando se manipulan RTILs a altas temperaturas.

1.5.2. Punto de fusión.

Los RTILs tienen *bajo punto de fusión* (Pf), normalmente debajo de la temperatura ambiente, pudiendo en algunos casos ser de $-82\text{ }^{\circ}\text{C}$ como en el caso de $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{BF}_4]$, $[\text{C}_6\text{C}_1\text{im}][\text{BF}_4]$ (ver **Tabla 1.1**). No existe una correlación entre temperatura de fusión y la estructura del catión o el anión. Sin embargo, se han encontrado ciertas tendencias como la disminución del Pf con la incorporación de cationes más grandes y más asimétricos [51]. Un incremento en la simetría de los iones, supone un aumento del Pf ya que permite un mayor empaquetamiento de los mismos. En el caso de cationes de alquilimidazolio, un incremento en la longitud de cadena supone una disminución en el Pf por cuestiones de empaquetamiento. Alrededor de los 6 a 8 átomos de carbono, el Pf llega a un mínimo y luego la tendencia se invierte debido a la fuerza de las interacciones hidrofóbicas entre las cadenas sustituyentes. De esta manera el Pf de los RTILs depende de forma muy marcada del tamaño del RTIL, de su carga y de la distribución de la misma, como se puede observar en la **Tabla 1.1**. En forma general, se puede decir que la existencia de puentes de hidrógeno y la deslocalización de carga conducen a un aumento del Pf.

En los últimos años se ha realizado un esfuerzo para poder comprender por qué ciertas combinaciones catión-anión dan lugar a puntos de fusión muy bajos [52] llegando a desarrollarse recientemente un modelo predictivo para calcular el punto de fusión de un líquido iónico dado a partir de su constante dieléctrica, ϵ , y viceversa con buena precisión en la mayoría de los casos. Esto resulta interesante sobre todo para líquidos iónicos desconocidos, debido a que la determinación del Pf proviene de una medida sencilla, mientras que la medición de ϵ es bastante difícil.

Los RTILs con aniones altamente fluorados ($[\text{BF}_4]^-$, $[\text{PF}_6]^-$, etc.) son generalmente líquidos a bajas temperaturas, formando estructuras cristalinas al solidificar, produciéndose una cristalización lenta. Empíricamente se ha observado que el punto de fusión decrece según el siguiente orden: $[\text{Cl}]^- > [\text{PF}_6]^- > [\text{BF}_4]^-$. Se ha comprobado [53] que los tetrafluorboratos de *1*-alquil-3-metilimidazolio con cadenas con un número de átomos de carbono $n=2$ a 10 cristalizan al enfriar por debajo de $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que con cadenas de $n=12$ a 18 son sólidos a temperatura ambiente con comportamiento de cristal líquido. Un comportamiento parecido se ha observado para las sales de hexafluorofosfato.

1.5.3. Estabilidad térmica.

Las temperaturas de descomposición térmica que presentan los RTILs usualmente coinciden con el límite superior de su forma líquida (Punto de ebullición, P_e), ya que la mayoría no son volátiles. La presencia de cationes orgánicos restringe las temperaturas superiores de estabilidad, teniendo lugar la pirolisis a temperaturas entre 350 y 450 °C, si no hay otros caminos de descomposición accesibles a menores temperaturas. La temperatura de descomposición depende de la naturaleza de los iones que conforman el RTIL. Así, la temperatura de descomposición es menor en el caso de sales de tetralquilamonio que en aquellas basadas en el catión *1,3*-dialquilimidazolio. Por ejemplo, el $[C_2C_{1im}][BF_4]$ es estable hasta los 300 °C y el $[C_2C_{1im}][NTf_2]$ hasta los 400 °C [40], mientras que los RTILs con cationes amonio o fosfonio pueden presentar mayor estabilidad térmica o comparables con algunos con base en el catión dialquilimidazolio [39], que en general son superiores a los 300 °C. Por ejemplo la temperatura de descomposición del $[(C_6)_3C_{14P}][N(SO_2CF_3)_2]$ ó $[(C_6)_3C_{14P}][NTf_2]$ tiene una temperatura de descomposición de 400 °C en atmósfera de N_2 [54]. Para las sales basadas en cationes $[RC_{1im}]^+$ la estabilidad para los diferentes aniones disminuye en la serie $[NTf_2]^- > [BF_4]^- > [PF_6]^-$, $[AsF_6]^- > [I]^-$, $[Br]^-$ y $[Cl]^-$. Así, los RTILs que contienen aniones más débilmente coordinados (aniones de igual carga de mayor tamaño) son más estables a la descomposición a altas temperaturas [40, 1, 55].

1.5.4. Estabilidad química.

Los RTILs basados en el catión *1,3*-dialquilimidazolio son compuestos no inflamables [56] y químicamente inertes [57], a diferencia de los basados en cloroaluminatos que son muy sensibles a la humedad y, por tanto, necesitan ser escrupulosamente protegidos de ella y de otras impurezas de óxido. Además, muchos complejos de metales de transición y sustratos orgánicos no son inertes a los cloroaluminatos, pudiendo reaccionar con ellos. También estas sales reaccionan de manera muy exotérmica con el agua, produciendo HCl y un precipitado blanco, que se redisuelve por agitación [58].

1.5.5. Viscosidad.

Las viscosidades de los RTILs a temperatura ambiente van desde unos 10 cP hasta valores de más de 18870 cP (como es el caso del CYPHOS® IL 327), dependiendo su valor fuertemente de la

temperatura [59], la presión y las impurezas [60]. Para dar idea del orden de magnitud, la viscosidad del agua es de 1 cP (20 °C), *n*-heptano 0,408 cP (20 °C) y metanol 0,60 cP (20 °C). En **Tabla 1.1** se muestran valores de viscosidad de diferentes RTILs.

Como ejemplo, se ha medido la viscosidad del [C₄C₁im][PF₆], [61, 62] y aunque los valores se obtienen con una variación menor del 3%, los datos entre los distintos autores pueden llegar a diferir hasta en un 30% [63]. Gran parte de esta variabilidad se atribuye al contenido de impurezas, ya que la presencia de agua y disolventes orgánicos disminuyen la viscosidad, mientras que los cloruros la aumentan. Sin embargo, el agua es considerada la impureza más insidiosa debido a su ubicuidad [63].

Para RTILs con el mismo anión, la tendencia es que a cadenas alquílicas más largas, se obtienen fluidos más viscosos, pudiendo ser ésta disminuida por el uso de cadenas ramificadas [64]. Para el mismo catión, el cambio del anión afecta de manera muy importante a la viscosidad, disminuyendo su valor en la serie [Cl]⁻ > [PF₆]⁻ > [BF₄]⁻ ≈ [NO₃]⁻ > [NTf₂]⁻. En estos casos, los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y la basicidad del mismo. Así, la disminución en el tamaño del anión disminuye las interacciones de van der Waals, incrementado la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno.

Un conocimiento apropiado de la relación entre la estructura de los RTILs y la viscosidad es importante para poder escogerlo adecuadamente para una aplicación específica, así como para diseñar materiales nuevos [62]. Se han realizado estudios en los que se observa cómo las propiedades eléctricas de los RTILs dependen de la viscosidad, disminuyendo la conductividad al aumentar la cadena alquilo y por lo tanto la viscosidad [65].

1.5.6. Densidad.

Los valores de densidad para los RTILs medidos hasta el momento varían entre 0,8819 g cm⁻³ para el cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio, [(C₆)₃C₁₄P][Cl], conocido comercialmente como CYPHOS[®]IL 101 y 2,24 g cm⁻³ para [(CH₃)S]Br/AlBr₃ (34/66 mol%). En la **Tabla 1.1**, se reúnen valores de densidad extraídos de la literatura para RTILs de distinta naturaleza. Es importante destacar que la densidad es la propiedad física menos sensible a la variación de la temperatura [66]. Además, la presencia de impurezas tiene mucha menos influencia que en la viscosidad. Para un catión determinado, la densidad para diferentes aniones varía en la serie [CH₃SO₃]⁻ ≈ [BF₄]⁻ < [CF₃CO₂]⁻ < [CF₃SO₃]⁻ < [C₃F₇CO₂]⁻ < [NTf₂]⁻. Para el caso de cationes, la densidad decrece cuando el tamaño del anión se incrementa [67, 68]. La densidad es una propiedad muy importante a tener en

cuenta en extracción líquido-líquido ya que el diseño del experimento, la velocidad con que se separan las fases y la posibilidad de automatización dependen fuertemente de la densidad.

Tabla 1.1: Propiedades físicas de RTILs utilizados en Química Analítica.

Anión / Cation	Nomenclatura	Pf (°C) ^a	Densidad (g cm ⁻³) ^a	Viscosidad (cp) ^a	Índice de refracción ^a	Solubilidad en agua ^a
Anión: bis(trifluorometilsulfonil)imida						
<i>1,3</i> -dimetilimidazolio	[(C ₁) ₂ im][NTf ₂]	22	1,559	44	1,422	-
<i>1</i> -metil-3-etilimidazolio	[C ₂ C ₁ im][NTf ₂]	-17	1,518	18	1,4231	Insoluble
<i>1,3</i> -dietilimidazolio	[(C ₂) ₂ im][NTf ₂]	44	1,452	35	1,426	Insoluble
<i>1,2</i> -dimetil-3-etilimidazolio	[(C ₁) ₂ C ₂ im][NTf ₂]	20	1,495	88	1,4305	-
<i>1</i> -metil-3-butimidazolio	[C ₄ C ₁ im][NTf ₂]	-4	1,429	50	1,4271	-
<i>1,2</i> -dimetil-3-propilimidazolio	[(C ₁) ₂ C ₃ im][NTf ₂]	15	1,46	41	-	Insoluble
<i>1</i> -metil-3-hexilimidazolio	[C ₆ C ₁ im][NTf ₂]	-	1,364	71	1,429	-
<i>1</i> -metil-3-octilimidazolio	[C ₈ C ₁ im][NTf ₂]	-86	1,311	93	1,4326	-
<i>1</i> -metil- <i>N</i> -octilpiridinio	[<i>1</i> -C ₁ C ₈ pyr][NTf ₂]	7	1,29	-	-	-
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -propilpirrolidinio	[C ₃ C ₁ pyrr][NTf ₂]	10	1,40	63	1,420	-
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -butilpirrolidinio	[C ₄ C ₁ pyrr][NTf ₂]	-18	1,394	71	1,4230	Insoluble
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -hexilpirrolidinio	[C ₆ C ₁ pyrr][NTf ₂]	-	1,32	-	1,425	-
Tetrapentilamonio	[(C ₅) ₄ N][NTf ₂]	25,2	1,16	430	-	-
Tetrahexilamonio	[(C ₆) ₄ N][NTf ₂]	-7	1,11	435	-	-
Tetraheptilamonio	[(C ₇) ₄ N][NTf ₂]	11,2	1,1	453	-	-
metil(tributil)amonio	[(C ₄) ₃ C ₁ N][NTf ₂]	19	1,375	-	-	-
metil(trioctil)amonio	[(C ₈) ₃ C ₁ N][NTf ₂]	-50	1,1	800	-	Insoluble
Anión: hexafluorofosfato						
<i>1</i> -metil-3-butimidazolio	[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	10	1,382	400	1,409	Insoluble
<i>1</i> -metil-3-hexilimidazolio	[C ₆ C ₁ im][PF ₆]	-61	1,293	486	1,4165	Insoluble
<i>1</i> -metil-3-octilimidazolio	[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	-40	1,235	810	1,4235	Insoluble
Anión: tetrafluorborato						
<i>1</i> -metil-3-etilimidazolio	[C ₂ C ₁ im][BF ₄]	6	1,280	66	1,4109	Soluble
<i>1</i> -metil-3-propilimidazolio	[C ₃ C ₁ im][BF ₄]	-75	-	-	-	Soluble
<i>1</i> -metil-3-butimidazolio	[C ₄ C ₁ im][BF ₄]	-82	1,208	233	1,429	Soluble
<i>1,2</i> -dimetil-3-propilimidazolio	[(C ₁) ₂ C ₃ mim][BF ₄]	-17	1,225	-	-	-
<i>1</i> -metil-3-hexilimidazolio	[C ₆ C ₁ im][BF ₄]	-82	1,145	310	1,4265	Soluble

Tabla 1.1 (continuación).

<i>l</i> -metil-3-octilimidazolio	[C ₈ C ₁ im][BF ₄]	-79	1,099	439	1,4319	Parcialmente soluble
3-metil- <i>N</i> -butilpiridinio	[3-C ₁ C ₄ pyr][BF ₄]	-	1,185	230	1,451	Soluble
4-metil- <i>N</i> -butilpiridinio	[4-C ₁ C ₄ pyr][BF ₄]	-	1,183	-	1,452	Soluble
4-metil- <i>N</i> -octilpiridinio	[4-C ₁ C ₈ pyr][BF ₄]	-	1,08	-	-	Parcialmente soluble
Anión: tiocianato						
<i>l</i> -metil-3-etilimidazolio	[C ₂ C ₁ im][SCN]	-6	1,117	22	-	Soluble
<i>l</i> -metil-3-butimidazolio	[C ₄ C ₁ im][SCN]	-29	1,070	52	-	Soluble
<i>l</i> -metil-3-hexilimidazolio	[C ₆ C ₁ im][SCN]	-	-	-	-	Soluble
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -butilpirrolidinio	[C ₄ C ₁ pyrr][SCN]	22	1,125	109	-	-
Butilamonio	[C ₄ N][SCN]	20,5	0,949	97	1,5264	Soluble
<i>sec</i> -butilamonio	[<i>sec</i> -C ₄ N][SCN]	22,5	1,013	196	1,5264	Soluble
Dipropilamonio	[(C ₃) ₂ N][SCN]	5,5	0,964	86	1,5062	Soluble
Anión: nitrato						
<i>l</i> -metil-3-butimidazolio	[C ₄ C ₁ im][NO ₃]	23	1,153	266	-	-
Etilamonio	[C ₂ N][NO ₃]	12,5	1,122	32	1,4537	Soluble
Propilamonio	[C ₃ N][NO ₃]	4	1,157	67	1,4561	Soluble
Tributilamonio	[(C ₄) ₃ N][NO ₃]	21,5	0,918	637	1,4627	Soluble
Anión: dicianoimida						
<i>l</i> -metil-3-etilimidazolio	[C ₂ C ₁ im][N(CN) ₂]	-21	1,101	21	1,5134	-
<i>l</i> -metil-3-butimidazolio	[C ₄ C ₁ im][N(CN) ₂]	-6	1,059	37	-	Soluble
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -butilpirrolidinio	[C ₄ C ₁ pyrr][N(CN) ₂]	-55	0,93	50	-	-
Anión: triflato						
<i>l</i> -metil-3-etilimidazolio	[C ₂ C ₁ im][Trif]	-9	1,381	45	1,4332	Soluble
1,3-dietilimidazolio	[(C ₂) ₂ im][Trif]	23	-	53	1,4367	-
<i>l</i> -metil-3-butimidazolio	[C ₄ C ₁ im][Trif]	16	1,290	90	1,438	Soluble
<i>l</i> -metil-3-hexilimidazolio	[C ₆ C ₁ im][Trif]	29	-	160	-	Insoluble
<i>l</i> -metil-3-octilimidazolio	[C ₈ C ₁ im][Trif]	-20	1,12	-	-	-
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -butilpirrolidinio	[C ₄ C ₁ pyrr][Trif]	4,4	-	-	-	Soluble
Anión: tetracianoborato						
<i>l</i> -metil-3-etilimidazolio	[C ₂ C ₁ im][B(CN) ₄]	-	1,036	-	-	-
<i>l</i> -metil-3-decilimidazolio	[C ₁₀ C ₁ im][B(CN) ₄]	-	0,962	-	-	-

Tabla 1.1 (continuación).

Anión: trifluoracetato						
<i>I</i> -metil-3-butylimidazolio	[C ₄ C ₁ im][F ₃ Ac]	-14	1,209	35	1,4405	-
Anión: tris(pentafluoretil)trifluorofosfato						
<i>I</i> -metil-3-hexylimidazolio	[C ₆ C ₁ im][FAP]	-	1,550	88	-	-
Anión: acetato						
<i>I</i> -metil-3-etylimidazolio	[C ₂ C ₁ im][Ac]	-10	1,03	162	-	Soluble
<i>I</i> -metil-3-butylimidazolio	[C ₄ C ₁ im][Ac]	-7	1,058	485	1,4938	Soluble

Datos de Referencia: ^a [10].

1.5.7. Miscibilidad en agua.

La miscibilidad de los RTILs con el agua puede variar de completamente miscible a casi totalmente inmisible (ver **Tabla 1.1**). Los aniones pequeños del tipo de los haluros generalmente producen LIs solubles en agua, mientras que la presencia de aniones grandes, genera compuestos hidrofóbicos [63].

Todos los RTILs descritos hasta la fecha son higroscópicos. Mientras algunos son miscibles con agua en todas las proporciones, como es el caso de [C₄C₁im][BF₄], otros se saturan con agua, formando un sistema bifásico [69]. En este grupo se encuentran [C₄C₁im][PF₆] y [C₄C₁im][NTf₂]. La solubilidad depende en gran medida de la naturaleza del anión, debido a la fuerte interacción por puentes de hidrógeno que se produce entre éste y el agua; el catión parece tener un efecto secundario en esta propiedad [70]. Aun así, la lipofilidad de las sales de *I*,3-dialquilimidazolio se pueden incrementar mediante el aumento en la longitud de la cadena de los grupos alquílicos [71, 55]. El logaritmo del coeficiente de reparto de un líquido iónico entre *I*-octanol y agua ($\log P_{oct/w}$), se suele emplear como parámetro de medida relativa de su hidrofobicidad. El $\log P_{oct/w}$ puede resultar muy interesante para seleccionar RTILs como medios de reacción en síntesis enzimática. Así, Laane y colaboradores [72] pusieron de manifiesto la presencia de actividad enzimática en disolventes orgánicos con un $\log P_{oct/w}$ superior a 4. En la **Tabla 1.2** se muestra el $\log P_{oct/w}$ para distintos RTILs.

Según la propuesta de Laane y colaboradores [72] ninguno de los RTILs que se presentan en la **Tabla 1.2** serían adecuados como disolventes en reacciones biocatalíticas. Actualmente se sabe que no es así, ya que algunos de estos RTILs han sido utilizados como disolventes en biotransformaciones con excelentes resultados. Sin embargo, si bien el valor de $\log P_{oct/w}$ no es muy fiable a la hora de establecer qué medio de reacción es mejor que otro, sí se ha observado que, en general, cuanto más hidrofóbico es el RTIL, más adecuado es como disolvente en reacciones de

síntesis biocatalíticas.

Tabla 1.2: Valores de $\log P_{oct/w}$ de distintos RTILs.

RTILs	$\log P_{oct/w}$
[C ₈ C ₁ im][NTf ₂]	0,80-1,05 ^a
[C ₆ C ₁ im][NTf ₂]	0,15-0,22 ^a
[C ₄ C ₁ im][NTf ₂]	-0,21/-0,96 ^a
[C ₂ C ₁ im][NTf ₂]	-1,05/-0,96 ^a
[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	-1,66±0,03 ^a
[C ₄ C ₁ im][Cl]	-2,40±0,07 ^a
[C ₄ C ₁ im][NO ₃]	-2,42±0,02 ^a
[C ₄ C ₁ im][Br]	-2,48±0,13 ^a
[C ₄ C ₁ im][BF ₄]	-2,52±0,06 ^a
[C ₄ C ₁ im][Ac]	-2,77±0,11 ^b

Datos de Referencia: ^a [73]; ^b [74].

1.5.8. Solubilidades mutuas.

En la sección anterior se vio que algunos RTILs son prácticamente inmiscibles en agua generando *sistemas bifásicos*. Aunque en la mayoría de los estudios se han utilizado RTILs conteniendo cationes nitrogenados como imidazolio y piridinio, recientemente Marták y Schollosser [75] emplearon líquidos iónicos conteniendo el catión fosfonio para extraer ácido láctico (AL) desde sistemas acuosos. Curiosamente, esta extracción se produce por un mecanismo de coordinación a través de hidrógeno con la unión entre el RTIL y AL (ALH ...RTIL) y la formación final de complejos del tipo [ALH]_p[RTIL][H₂O]₂ (3≥p≥ 1) donde el agua disuelta juega un papel importante [75].

Se han hecho esfuerzos considerables para entender el efecto singular de agua en el comportamiento del RTIL. Por ejemplo, el agua puede actuar como un *co-solvente* como es en el caso del [ALH]_p[RTIL][H₂O]₂, lo que puede aumentar la miscibilidad líquido-líquido entre el ácido láctico y los RTILs, o como anti-solventes, por ejemplo, la reducción de la solubilidad de los gases en RTILs [76, 77]. La solubilidad experimental de varios líquidos iónicos y agua ya ha sido informada en la literatura. Sin embargo, esta información suele ser proporcionada por el fabricante a

temperatura ambiente. Además, al igual que otros solventes hidrofóbicos, la solubilidad del agua en la fase RTIL es también importante, ya que afecta de manera significativa las propiedades físicas de los RTILs puros tales como polaridad, viscosidad, densidad y tensión superficial [60, 69, 78, 79].

Por otra parte, el conocimiento de las normas internacionales y solubilidades mutuas de agua-RTIL es importante en la evaluación del medio ambiente. Se sabe que la ecotoxicidad de los RTILs puede estar ligada directamente a su lipofilidad [80, 81]. Los RTILs hidrofóbicos tienden a acumularse en las membranas biológicas, y por lo tanto su toxicidad puede aumentar con su carácter hidrofóbico. Por lo tanto, el previo conocimiento de la solubilidad mutua RTIL-agua pueden proporcionar una manera de predecir el riesgo ambiental de los mismos. En la **Tabla 1.3** se observan solubilidades mutuas de algunos RTILs de naturaleza hidrofóbica.

Tabla 1.3: Solubilidades mutuas de agua y algunos RTILs ligeramente hidrofóbicos a 25 °C.

RTILs	Solubilidad del RTIL en agua % (p/v)	Solubilidad del agua en el RTIL % (p/v)
[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	2,0±0,3 ^a / 1,88 ^b	2,3±0,2 ^a
[C ₆ C ₁ im][PF ₆]	0,75 ^b	0,88 ^b
[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	1,3±0,5 ^a / 0,2 ^b	0,7±0,1 ^a
[C ₆ C ₁ im][BF ₄]	12,2±0,1 ^c	6,7±0,1 ^c
[C ₈ C ₁ im][BF ₄]	1,8±0,5 ^a	10,8±0,5 ^a
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Cl]	14,4 ^d	-
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Br]	4,5 ^e	-
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][N(CN) ₂]	3,31 ^d	-
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][NTf ₂]	0,7 ^e	-

Datos de referencias: ^a [69]; ^b [82]; ^c [83]; ^d [75]; ^e Datos del proveedor.

1.5.9. Poder de disolución.

Como ya se ha discutido, los RTILs son disolventes polares, con polaridades similares a los alcoholes de cadena corta u otros disolventes apróticos polares como dimetilsulfóxido (DMSO) ó dimetilformamida (DMF). Ésta suele ser intermedia entre la del agua y la de los disolventes orgánicos clorados y varía dependiendo de la naturaleza del RTIL. Así, pueden ser utilizados en multitud de aplicaciones pues solubilizan un amplio número de especies, tanto orgánicas, inorgánicas y organometálicas [84, 15, 85].

1.5.10. Polaridad y constante dieléctrica.

La forma más común de medida de la polaridad es mediante la constante dieléctrica, sin embargo su medida requiere que el medio sea no conductor, lo cual no es el caso de los RTILs. Los estudios sobre la constante dieléctrica, ϵ , clasifican a estos materiales como disolventes moderadamente polares [86], en coincidencia con resultados obtenidos a partir de medidas solvatocrómicas como veremos más adelante. Los valores de ϵ se encuentran entre 8,9 y 15,2, disminuyendo este valor al aumentar la longitud de la cadena alquílica. Por lo tanto, para un mismo anión, la polaridad de los RTILs decrece al aumentar la longitud de cadena. Pero también tiene una cierta influencia el tipo de anión: $[\text{Trif}]^- > [\text{BF}_4]^- \approx [\text{PF}_6]^-$ [86]. Como puede verse, los valores de ϵ son marcadamente menores que los esperados de acuerdo a su carácter iónico [86]. Sin embargo, se debe tener en cuenta que las teorías establecidas para describir las interacciones dipolares en los líquidos moleculares no pueden trasladarse con facilidad a los RTILs, debido a su particular organización, por lo que conceptos como la polaridad de los RTILs requieren una interpretación cuidadosa.

Las medidas de polaridad en los RTILs pueden realizarse mediante estudios solvatocrómicos empleando para ello el reactivo de Reichardt (dye-30), también conocida como betaina *N*-fenóxido de piridinio (Figura 1.4), además de diferentes nitroanilinas y otros indicadores empleados para medir los parámetros de Kamlet y Taft, como se verá más adelante [15].

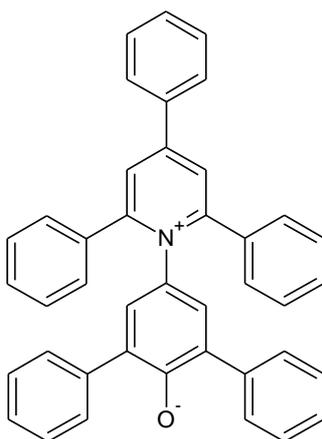


Figura 1.4: Reactivo de Reichardt (dye-30).

El reactivo de Reichardt (dye-30), 2,4,6-trifenilpiridinio-*N*-4-(2,6-difenilfenóxido)betaina,

(Figura 1.4) es un reactivo solvatocrómico que por su estructura se trata de una sal interna. Este compuesto es capaz de registrar efectos derivados de la polaridad del disolvente, puentes de hidrógeno a través de la carga negativa localizada sobre el átomo de oxígeno del anión fenóxido y por la misma razón también es sensible a la acidez de Lewis. De todas estas interacciones la más importante es el efecto dador de puentes de hidrógeno del disolvente hacia el fenóxido aceptor [87]. En la Sección 2.4 se detallará el método de cálculo del parámetro $E_T(30)$ que refleja dichas interacciones.

Las medidas de polaridad basadas en esta molécula indican que la polaridad de los RTILs es similar a la de alcoholes de cadena corta [85]. Los valores de $E_T(30)$ se han normalizado en la escala E_T^N para la cual se define $E_T^N = 0$ para tetrametilsilano y 1,000 para el agua, por lo que los valores de E_T^N se pueden calcular como $E_T^N = (E_{T(solvente)} - 30,7) / 32,4$ [88]. Para RTILs, el valor de E_T^N viene determinado fundamentalmente por la naturaleza del catión. Como puede observarse en la Tabla 1.4 el valor de E_T^N para las sales de imidazolio sustituidas depende de manera significativa de si la posición 2 del anillo está protonada o metilada, a la vez que los valores decrecen conforme aumenta la longitud de la cadena del catión. Este hecho es totalmente consistente con la importancia del efecto dador de hidrógeno de estos cationes en los valores de E_T^N . El efecto del anión en la polaridad del RTIL es menor que el del catión. Así, la diferencia en el valor de E_T^N entre $[C_4C_1im][BF_4]$ y $[C_4C_1im][PF_6]$ es de tan sólo 0,006, mientras la diferencia entre $[C_4C_1im][BF_4]$ y $[C_8C_1im][BF_4]$ es de 0,13.

1.5.11. Propiedades electroquímicas.

Como ya se mencionó, los RTILs fueron inicialmente desarrollados como disolventes para aplicaciones electroquímicas [91] por lo que poseen una serie de propiedades tales como: (i) amplio rango de potenciales electroquímicos, (ii) elevada conductividad iónica y térmica, (iii) efectividad en los fenómenos de transporte y (iv) capacidad de solvatar moléculas de casi cualquier tipo.

Por su parte la conductividad iónica da cuenta de la movilidad de los iones que transportan las cargas. En principio, se podría pensar que los RTILs, por estar constituidos por iones, tendrán una alta conductividad y efectivamente es así si se comparan con las conductividades de sistemas de electrolitos/disolventes no acuosos. Sin embargo, son menos conductores que las disoluciones acuosas concentradas de electrolitos, lo que puede atribuirse a los grandes tamaños de los iones, que limitan la movilidad de las cargas.

Tabla 1.4: Valores de E_T^N para diferentes RTILs y solventes de diferente naturaleza.

Disolvente	E_T^N
Agua	1,000
[C ₄ C ₁ im][BF ₄]	0,673
[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	0,667
Etanol	0,654
[C ₄ C ₁ im][NO ₃]	0,650
[C ₄ C ₁ im][NTf ₂]	0,642
[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	0,633
[C ₈ C ₁ im][NTf ₂]	0,630
[C ₄ C ₁ im][CF ₃ CO ₂]	0,620
[C ₄ C ₁ im][Ac]	0,570
[C ₈ C ₁ im][BF ₄]	0,543
Acetonitrilo	0,460
<i>n</i> -Hexano	0,009

Datos de las Referencias: [89, 90].

1.6. Los RTILs como solventes “biocompatibles”.

Los RTILs han sido propuestos como una alternativa “limpia” a los disolventes orgánicos convencionales y, por lo tanto, como candidatos a ser usados en la “química verde” (green chemistry) principalmente debido a su prácticamente baja o indetectable presión de vapor. Sin embargo, no se conocen muchos datos sobre toxicidad y biodegradabilidad. La volatilidad prácticamente nula de los RTILs reduce las potenciales vías de exposición, siendo el contacto directo con la piel y la ingestión las únicas vías posibles. La mayoría de los RTILs que se han investigado son irritantes y tienen una toxicidad comparable a los disolventes orgánicos convencionales [81]. También se ha observado que algunos RTILs son biodegradables, especialmente cuando presentan un grupo éster en la cadena alquílica lateral del catión [92, 93]. Recientemente se ha obtenido un RTIL a partir de materias primas biorenovables [94]. Así, aunque no se puede afirmar de forma general que los RTILs sean solventes no tóxicos o ecológicamente compatibles, si es cierto que los procesos químicos basados en el empleo de estos nuevos disolventes presentan notables beneficios medioambientales al reducir la generación de residuos (eliminando las pérdidas de disolvente por evaporación y mediante reutilización del RTILs) y el consumo de energía ya que en la recuperación

de los productos se elimina la etapa de evaporación del disolvente por calentamiento. Además, como se ha comentado con anterioridad, es posible el diseño de RTILs no tóxicos y biodegradables mediante la adecuada selección del catión y del anión.

1.7. Aplicaciones generales de los RTILs.

Los primeros RTILs fueron sintetizados con fines electroquímicos, para ser utilizados como electrolitos a baja temperatura libres de agua [2]. Comparado con los electrolitos habitualmente usados, los RTILs poseen similares potenciales electroquímicos y conductividades iónicas. Además, los RTILs permiten que algunos metales convencionalmente obtenidos de sales fundidas a altas temperaturas se depositen a temperatura ambiente sin problemas de corrosión [95, 96]. Los RTILs han sido utilizados en diferentes dispositivos electroquímicos tales como baterías [97, 98], placas solares [99] y condensadores electroquímicos [100, 101].

En la última década se ha constatado que estos nuevos disolventes presentaban una gran utilidad como medios de reacción tanto en procesos químicos como bioquímicos, lo que ha potenciado el desarrollo de nuevos RTILs. Así, se han utilizado como disolventes en reacciones nucleofílicas [102, 103]; y electrofílicas [104]; catalizadas tanto por ácidos como por complejos de metales de transición. También se han revelado como excelentes medios de reacción en biosíntesis [105, 106] presentando además en estos casos una gran capacidad para la estabilización enzimática en operaciones continuas [107].

Un campo de investigación más reciente en el que los RTILs han encontrado aplicación es en procesos de separación y purificación [108]. Los RTILs con cationes nitrogenados como $[C_4C_1im][PF_6]$ y $[C_4C_1im][BF_4]$ fueron utilizados para extraer selectivamente compuestos específicos de una mezcla gaseosa o líquida [41, 108, 14, 109]. Así, por ejemplo, el empleo de RTILs del tipo $[C_4C_1im][PF_6]$ y $[C_4C_1im][BF_4]$ ha permitido la eliminación de dióxido de carbono y sulfuro de hidrógeno de gas natural [14] mediante extracción selectiva. Algunos ejemplos de extracciones líquido/líquido son la eliminación de compuestos orgánicos de corrientes acuosas de residuos y la separación de compuestos aromáticos de alquenos [41, 109]. Más recientemente los RTILs han sido utilizados en membranas líquidas soportadas con propósitos de separación [110, 111].

La gran estabilidad térmica que presentan los RTILs ha hecho que se empleen como lubricantes. Concretamente el $[C_4C_1im][BF_4]$ ha demostrado ser un lubricante muy versátil aplicado a contactos acero/acero, acero/cerámica, acero/cobre, acero aluminio, etc. [112].

Un indicador del interés por explorar las posibilidades de estos compuestos iónicos a

temperatura ambiente como disolventes para procesos de separación y de reacciones químicas es el número de publicaciones que han aparecido en los últimos años. En la **Figura 1.5** se observa un crecimiento exponencial de los artículos científicos sobre líquidos iónicos.

El esfuerzo realizado para conseguir RTILs capaces de disolver los componentes de importantes reacciones industriales ha permitido conseguir información con la que valorar las posibilidades que tienen estos nuevos disolventes de sustituir a los convencionales.

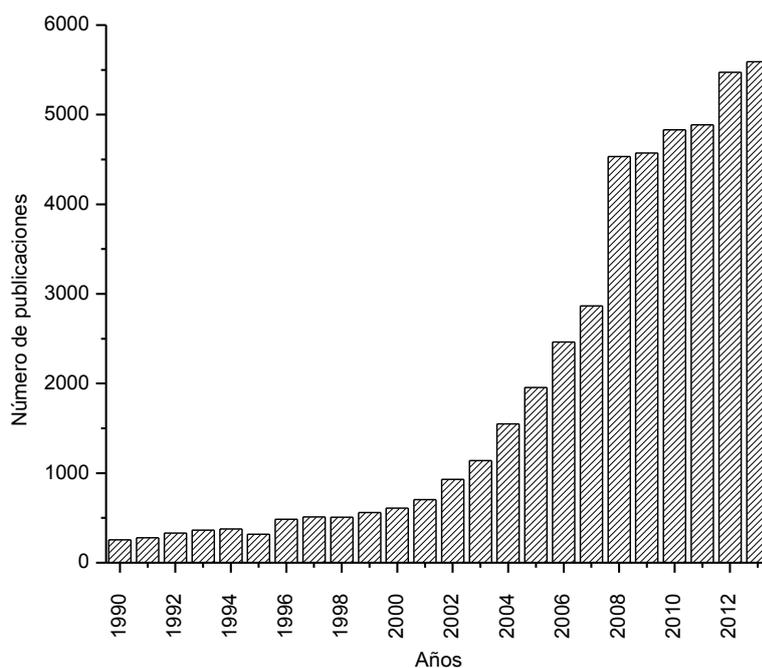


Figura 1.5: Evolución de las publicaciones sobre RTILs. (Fuente: <http://www.scopus.com/>).

1.8. Comercialización de los RTILs.

Son varias las empresas que comercializan estas sales líquidas: Merck [113], Solvent Innovation [114], Strem Chemicals [115], Sigma-Aldrich/Fluka [116], Degussa [117] y Cytec Industries [118].

Normalmente el precio de los RTILs es alto aunque está disminuyendo con el transcurso del tiempo. Los reactivos precursores pueden ser relativamente económicos tanto en el caso de los precursores del anión, o la sal del anión propiamente dicho, como del catión del RTIL [113]. Además, ha crecido la demanda de nuevos RTILs debido a las nuevas aplicaciones industriales que

éstos han encontrado. La primera aplicación industrial la llevó a cabo la empresa BASF (Alemania), que implantó el proceso BASIL® (Biphasic Acid Scavenging using Ionic Liquids) el que utiliza *N*-metilimidazol para eliminar el ácido que se forma en la producción de alcoxifenilfosfina, produciendo al mismo tiempo un líquido iónico [119]. Otra aplicación industrial es el almacenamiento de arsina, trifluoruro de boro y fosfina en líquidos iónicos (GASGUARD® Sub-Atmospheric Systems), desarrollado por la empresa Air Products [120]. El Instituto Francés del Petróleo (IFP) también ha patentado uno de sus procesos (DIFASOL®) con líquidos iónicos para fabricación de PVC por dimerización de olefinas de cadena corta [121].

1.9. Bibliografía.

- [1] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, *Clean Prod. Process.*, 1 (1999) 223–236.
- [2] P. Wasserscheid, T. Welton, *Ionic Liquid in Synthesis. Edited by Peter Wasserscheid, Thomas Welton Copyright © 2002 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.*, 2002.
- [3] F. van Rantwijk, R. Madeira Lau, R.A. Sheldon, *Trends Biotechnol.*, 21 (2003) 131–138.
- [4] L.C. Branco, J.G. Crespo, C.A.M. Afonso, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 41 (2002) 2771–2773.
- [5] J.-F. Liu, G.-B. Jiang, J.A. Jönsson, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 20–27.
- [6] G.A. Baker, S.N. Baker, S. Pandey, F. V Bright, *Analyst*, 130 (2005) 800–808.
- [7] S. Pandey, *Anal. Chim. Acta*, 556 (2006) 38–45.
- [8] J.L. Anderson, D.W. Armstrong, G.T. Wei, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 2892–2902.
- [9] M. Koel, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 35 (2005) 177–192.
- [10] W.E. Acree, L.M. Grubbs, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [11] E.M. Martinis, P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 1184–1201.
- [12] L.B. Escudero, A. Castro Grijalba, E.M. Martinis, R.G. Wuilloud, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 1–17.
- [13] P.T. Anastas, J.C. Warner, *Green Chemistry: Theory and Practice*, Oxford University Press, New York, NY, 1998.
- [14] J.L. Anthony, S.N.V.K. Aki, E.J. Maginn, J.F. Brennecke, *Int. J. Environ. Technol. Manag.*, 4 (2004) 105–115.
- [15] A.J. Carmichael, K.R. Seddon, *J. Phys. Org. Chem.*, 13 (2000) 591–595.
- [16] R. Hagiwara, Y. Ito, *J. Fluor. Chem.*, 105 (2000) 221–227.
- [17] J. Li, Y. Cai, Y. Shi, S. Mou, G. Jiang, *Talanta*, 74 (2008) 498–504.
- [18] R. Germani, M. V Mancini, G. Savelli, N. Spreti, *Tetrahedron Lett.*, 48 (2007) 1767–1769.
- [19] C.F. Poole, *J. Chromatogr. A*, 1037 (2004) 49–82.

- [20] B. Jastorff, R. Störmann, J. Ranke, K. Mölter, F. Stock, B. Oberheitmann, W. Hoffmann, J. Hoffmann, M. Nüchter, B. Ondruschka, J. Filser, *Green Chem.*, 5 (2003) 136–142.
- [21] S. Carda-Broch, A. Berthod, D.W. Armstrong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 191–199.
- [22] M.H. Abraham, A.M. Zissimos, J. Huddleston, C.G. Willauer, D. Heather, R.D. Rogers, W.E. Acree, W.E. Acree Jr., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 42 (2003) 413–418.
- [23] S. Katsuta, K.-I. Nakamura, Y. Kudo, Y. Takeda, H. Kato, *J. Chem. Eng. Data*, 56 (2011) 4083–4089.
- [24] M.A. Ab Rani, A. Brant, L. Crowhurst, A. Dolan, M. Lui, N.H. Hassan, J.P. Hallett, P.A. Hunt, H. Niedermeyer, J.M. Perez-Arlandis, M. Schrems, T. Welton, R. Wilding, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13 (2011) 16831–16840.
- [25] P. Walden, *Bull. l'Academie Imp. des Sci. Saint-Pétersbourg. St. Petersburg.*, 1800 (1914) 405–422.
- [26] J.A. Garlitz, C.A. Summers, R.A. Flowers II, G.E.O. Borgstahl, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, 55 (1999) 2037–2038.
- [27] J.T. Yoke, J.F. Weiss, G. Tollin, *Inorg. Chem.*, 2 (1963) 1210–1216.
- [28] J.L. Atwood, J.D. Atwood, *Non-Stoichiometric Liquid Enclosure Compounds ("Liquid Clathrates")*, American Chemical Society, Washington DC, 1976.
- [29] T.P.J. Wier, F.H. Hurley, (1948) 4 446 349.
- [30] T.P. Wier Jr., (1948) 4 446 350.
- [31] R.J. Gale, B. Gilbert, R.A. Osteryoung, *Inorg. Chem.*, 17 (1978) 2728–2729.
- [32] J.S. Wilkes, J.A. Levisky, R.A. Wilson, C.L. Hussey, *Inorg. Chem.*, 21 (1982) 1263–1264.
- [33] J.A. Boon, J.A. Levisky, J.L. Pflug, J.S. Wilkes, *J. Org. Chem.*, 51 (1986) 480–483.
- [34] J.S. Wilkes, M.J. Zaworotko, *Chem. Commun.*, 13 (1992) 965–967.
- [35] D.F. Evans, A. Yamauchi, G.J. Wei, V. Bloomfield, *J. Phys. Chem.*, 87 (1983) 3537–3541.
- [36] C. M. Gordon, J. D. Holbrey, A. R. Kennedy, K. R. Seddon, *J. Mater. Chem.*, 8 (1998) 2627–2636.
- [37] D.R. MacFarlane, P. Meakin, J. Sun, N. Amini, M. Forsyth, *J. Phys. Chem. B*, 103 (1999) 4164–4170.
- [38] J. Sun, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, *J. Phys. Chem. B*, 102 (1998) 8858–8864.
- [39] A. Stojanovic, C. Morgenbesser, D. Kogelnig, R. Krachler, B.K. Keppler, in: A. Kokorin (Ed.), *Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches* (Chapter 26), InTech, 2003.
- [40] P. Bonhôte, A.P. Dias, N. Papageorgiou, K. Kalyanasundaram, M. Grätzel, *Inorg. Chem.*, 35 (1996) 1168–1178.
- [41] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser, R.D. Rogers, *Chem. Commun.*, (1998) 1765–1766.
- [42] P. Lucas, N. El Mehdi, H.A. Ho, D. Belanger, L. Breau, *Synthesis (Stuttg.)*, (2000) 1253–1258.
- [43] P. Wasserscheid, H. Waffenschmidt, *J. Mol. Catal. A Chem.*, 164 (2000) 61–67.
- [44] Y. Chauvin, S. Einloft, H. Olivier, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34 (1995) 1149–1155.
- [45] S.D. Williams, J.P. Schoebrechts, J.C. Selkirk, G. Mamantov, *J. Am. Chem. Soc.*, 109 (1987) 2218–2219.

- [46] Y. Chauvin, H. Olivier-Bourbigou, *Chemtech*, 25 (1995) 26–30.
- [47] G.W. Parshall, *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 8716–8719.
- [48] J. Fuller, R.T. Carlin, H.C. De Long, D. Haworth, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, (1994) 299–300.
- [49] B. Ellis, (1996) 125, 114635.
- [50] M.J. Earle, K.R. Seddon, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 1391–1398.
- [51] H.L. Ngo, K. LeCompte, L. Hargens, A.B. McEwen, *Thermochim. Acta*, 357-358 (2000) 97–102.
- [52] I. Krossing, J.M. Slattery, C. Daguene, P.J. Dyson, A. Oleinikova, H. Weingärtner, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 13427–13434.
- [53] J.D. Holbrey, K.R. Seddon, *J. Chem. Soc. - Dalt. Trans.*, (1999) 2133–2139.
- [54] K.J. Fraser, D.R. MacFarlane, *Aust. J. Chem.*, 62 (2009) 309–321.
- [55] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, *Green Chem.*, 3 (2001) 156–164.
- [56] C. Ye, W. Liu, Y. Chen, L. Yu, *Chem. Commun.*, (2001) 2244–2245.
- [57] C.M. Gordon, *Appl. Catal. A Gen.*, 222 (2001) 101–117.
- [58] T.A. Zawodzinski Jr., R.A. Osteryoung, *Inorg. Chem.*, 29 (1990) 2842–2847.
- [59] S.N. Baker, G.A. Baker, M.A. Kane, F. V Bright, *J. Phys. Chem. B*, 105 (2001) 9663–9668.
- [60] K.R. Seddon, A. Stark, M.-J. Torres, *Pure Appl. Chem.*, 72 (2000) 2275–2287.
- [61] K.R. Harris, L.A. Woolf, M. Kanakubo, *J. Chem. Eng. Data*, 50 (2005) 1777–1782.
- [62] O.O. Okoturo, T.J. VanderNoot, *J. Electroanal. Chem.*, 568 (2004) 167–181.
- [63] J.A. Widegren, A. Laesecke, J.W. Magee, *Chem. Commun.*, (2005) 1610–1612.
- [64] D. Swartling, L. Ray, S. Compton, D. Ensor, *SAAS Bull. Biochem. Biotechnol.*, 13 (2000) 1–7.
- [65] T. Umecky, M. Kanakubo, Y. Ikushima, *J. Mol. Liq.*, 119 (2005) 77–81.
- [66] J. Vila, P. Ginés, J.M. Pico, C. Franjo, E. Jiménez, L.M. Varela, O. Cabeza, *Fluid Phase Equilib.*, 242 (2006) 141–146.
- [67] M. Ma, K.E. Johnson, in: *In proceeding of the Ninth International Symposium on Molten Salts* C. L. Hussey, D. S. Newman, G. Mamantov, Y. Ito, eds., 1994, pp. 179–186.
- [68] A.J. Sun, M. Forsyth, D.R. MacFarlane, 1998, pp. 5–6.
- [69] J.L. Anthony, E.J. Maginn, J.F. Brennecke, *J. Phys. Chem. B*, 105 (2001) 10942–10949.
- [70] L. Cammarata, S.G. Kazarian, P.A. Salter, T. Welton, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 3 (2001) 5192–5200.
- [71] S. V Dzyuba, R.A. Bartsch, *Chem. Commun.*, (2001) 1466–1467.
- [72] C. Laane, S. Boeren, K. Vos, C. Veeger, *Biotechnol. Bioeng.*, 30 (1987) 81–87.
- [73] L. Ropel, L.S. Belveze, S.N.V.K. Aki, M.A. Stadtherr, J.F. Brennecke, *Green Chem.*, 7 (2005) 83–90.
- [74] J.L. Kaar, A.M. Jesionowski, J.A. Berberich, R. Moulton, A.J. Russell, *J. Am. Chem. Soc.*, 125 (2003) 4125–4131.
- [75] J. Marták, S. Schlosser, *Sep. Purif. Technol.*, 57 (2007) 483–494.

- [76] S.P.M. Ventura, J. Pauly, J.L. Daridon, J.A. Lopes da Silva, I.M. Marrucho, A.M.A.M.A. Dias, J.A.P. Coutinho, *J. Chem. Thermodyn.*, 40 (2008) 1187–1192.
- [77] V. Najdanovic-Visak, L.P.N. Rebelo, M. Nunes Da Ponte, *Green Chem.*, 7 (2005) 443–450.
- [78] M.G. Freire, P.J. Carvalho, A.M. Fernandes, I.M. Marrucho, A.J. Queimada, J.A.P. Coutinho, *J. Colloid Interface Sci.*, 314 (2007) 621–630.
- [79] R.L. Gardas, M.G. Freire, P.J. Caryalho, I.M. Marrucho, I.M.A. Fonseca, A.G.M. Ferreira, J.A.P. Coutinho, *J. Chem. Eng. Data*, 52 (2007) 80–88.
- [80] J. Ranke, A. Müller, U. Bottin-Weber, F. Stock, S. Stolte, J. Arning, R. Störmann, B. Jastorff, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 67 (2007) 430–438.
- [81] K.M. Docherty, J. Kulpa Charles F., *Green Chem.*, 7 (2005) 185–189.
- [82] J. Liu, G. Jiang, Y. Chi, Y. Cai, Q. Zhou, J.-T. Hu, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 5870–5876.
- [83] J. Wang, Y. Pei, Y. Zhao, Z. Hu, *Green Chem.*, 7 (2005) 196–202.
- [84] S.N.V.K. Aki, J.F. Brennecke, A. Samanta, *Chem. Commun.*, (2001) 413–414.
- [85] M.J. Muldoon, C.M. Gordon, I.R. Dunkin, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (2001) 433–435.
- [86] C. Wakai, A. Oleinikova, M. Ott, H. Weingärtner, *J. Phys. Chem. B*, 109 (2005) 17028–17030.
- [87] M.J. Kamlet, R.W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 2886–2894.
- [88] C. Reichardt, *Solvent and Solvent effects in Organic Chemistry*. Copyright © VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1988.
- [89] C. Reichardt, *Chem. Soc. Rev.*, 21 (1992) 147–153.
- [90] C. Reichardt, *Green Chem.*, 7 (2005) 339–351.
- [91] M. Koel, in: *Physical and Chemical properties of ionic liquids based on the dialkylimidazolium cations*, 2000, pp. 145–155.
- [92] N. Gathergood, M.T. Garcia, P.J. Scammells, *Green Chem.*, 6 (2004) 166–175.
- [93] M.T. Garcia, N. Gathergood, P.J. Scammells, *Green Chem.*, 7 (2005) 9–14.
- [94] S.T. Handy, M. Okello, G. Dickenson, *Org. Lett.*, 5 (2003) 2513–2515.
- [95] W. Freyland, C.A. Zell, S.Z. El Abedin, F. Endres, *Electrochim. Acta*, 48 (2003) 3053–3061.
- [96] Q. Liao, W.R. Pitner, G. Stewart, C.L. Hussey, G.R. Stafford, *J. Electrochem. Soc.*, 144 (1997) 936–943.
- [97] S.-Y. Lee, H.H. Yong, Y.J. Lee, S.K. Kim, S. Ahn, *J. Phys. Chem. B*, 109 (2005) 13663–13667.
- [98] H. Sakaebe, H. Matsumoto, *Electrochem. commun.*, 5 (2003) 594–598.
- [99] D. Kuang, P. Wang, S. Ito, S.M. Zakeeruddin, M. Grätzel, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 (2006) 7732–7733.
- [100] M. Ue, M. Takeda, A. Toriumi, A. Kominato, R. Hagiwara, Y. Ito, *J. Electrochem. Soc.*, 150 (2003) A499–A502.
- [101] T. Sato, G. Masuda, K. Takagi, *Electrochim. Acta*, 49 (2004) 3603–3611.
- [102] F. D’Anna, V. Frenna, R. Noto, V. Pace, D. Spinelli, *J. Org. Chem.*, 70 (2005) 2828–2831.
- [103] L. Crowhurst, R. Falcone, N.L. Lancaster, V. Llopis-Mestre, T. Welton, *J. Org. Chem.*, 71 (2006) 8847–8853.
- [104] C. Chiappe, D. Pieraccini, *J. Phys. Org. Chem.*, 18 (2005) 275–297.

- [105] R.A. Sheldon, R.M. Lau, M.J. Sorgedraeger, F. van Rantwijk, K.R. Seddon, *Green Chem.*, 4 (2002) 147–151.
- [106] N. Jain, A. Kumar, S. Chauhan, S.M.S. Chauhan, *Tetrahedron*, 61 (2005) 1015–1060.
- [107] P. Lozano, T. De Diego, D. Carrié, M. Vaultier, J.L. Iborra, *Biotechnol. Lett.*, 23 (2001) 1529–1533.
- [108] J.F. Brennecke, E.J. Maginn, *AIChE J.*, 47 (2001) 2384–2389.
- [109] H. Zhao, S. Xia, P. Ma, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80 (2005) 1089–1096.
- [110] R. Fortunato, C.A.M. Afonso, M.A.M. Reis, J.G. Crespo, *J. Memb. Sci.*, 242 (2004) 197–209.
- [111] M. Matsumoto, Y. Inomoto, K. Kondo, *J. Memb. Sci.*, 246 (2005) 77–81.
- [112] J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors, T.A. Jones, *J. Mol. Biol.*, 235 (1994) 790–792.
- [113] <http://ildb.merck.de/ionicliquids/en/startpage.htm>.
- [114] http://www.solventinnovation.com/tech_properties.p.
- [115] <http://www.strem.com/code.index.ghc>.
- [116] <http://www.sigmaaldrich.com>.
- [117] <http://productkaleidoscope.degussa.com/productkale>.
- [118] <http://www.cyttec.com/business/Phosphine/Applicatio>.
- [119] http://www.basf.com/corporate/051004_ionic.htm.
- [120] <http://www.airproducts.com/NR/rdonlyres/9D919AAD-D>.
- [121] Y. Chauvin, H. Olivier, C.N. Wyrvalski, L.C. Simon, R.F. de Souza, *J. Catal.*, 165 (1997) 275–278.

❖ CAPÍTULO 2: “COEFICIENTES DE PARTICIÓN LÍQUIDO IÓNICO/AGUA. MECANISMO DE PARTICIÓN Y PREDICCIÓN DE LOS COEFICIENTES PARA COMPUESTOS DE INTERÉS BIOLÓGICO”.

2.1. Coeficientes de partición RTIL/agua ($P_{LL/a}$): consideraciones generales.

Una de las técnicas de purificación y preconcentración más antiguas es la extracción líquido-líquido (ELL). Esta técnica consiste en el reparto selectivo de los analitos a separar entre dos fases líquidas inmiscibles (*sistema bifásico*). El sistema bifásico puede consistir en agua y un solvente orgánico inmiscible (o muy poco miscible) tales como cloroformo/agua, *l*-octanol/agua o el sistema bifásico cloroformo/metanol-agua (*mezcla de Folch*) utilizada para la extracción de grasas en alimentos [1, 2]. Respecto del empleo de RTILs como fase extractante, se pueden citar sistemas bifásicos conteniendo agua, tal como $[C_4C_1im][PF_6]/$ agua, o un solvente orgánico no polar tal como $[C_4C_1im][PF_6]/n$ -heptano [3]. En el caso de los sistemas acuosos, se puede emplear un RTIL hidrofóbico como el anteriormente mencionado, o bien, un RTIL hidrofílico tal como $[C_4C_1im][BF_4]$, $[C_6C_1im][BF_4]$, etc., los cuales a una temperatura o concentración de sal dada, producen la formación de dos fases. Otros ejemplos del empleo de RTILs hidrofílicos para generar sistemas bifásicos son: $[C_6C_1im][Cl]$ con el agregado de K_2HPO_4 aplicado para la extracción de vitamina B₁₂ en muestras de orina [4] o $[C_2C_1im][Cl]$ y $[C_4C_1im][Cl]$ con el agregado de K_2HPO_4 para la extracción de la enzima *horseradish peroxidasa* (enzima del rabano picante) [5], etc.

Los sistemas bifásicos acuosos que contienen líquidos iónicos son cada vez más populares en los procesos de separación química de compuestos de bajo peso molecular (ej. testosterona [6], triptófano [7], etc.) y macromoléculas biológicas (ej. *thermomyces lanuginosus* lipasa [8], albúmina, tripsina, citocromo C y γ -globulinas [9], etc.). La fase RTIL que se forma generalmente es bastante transparente en la región espectral UV por lo que facilita el análisis de RTILs como extractantes mediante la inyección directa en un sistema HPLC con detector UV o DAD.

Para que el método de preconcentración/separación sea eficaz se requiere recuperación completa (o casi completa) del analito y alta selectividad. El reparto del soluto entre ambas fases está regida por la ley de distribución de Nernst, que queda expresada a través de una constante termodinámica de distribución (o de reparto), K_D^o (**Ecuación 2.1**). Esta constante es el cociente entre las actividades del analito (A) a dilución infinita en las dos fases constituidas por dos disolventes inmiscibles, *luego de que se alcance el equilibrio de reparto*. Por tanto, ese coeficiente mide la solubilidad diferencial de una sustancia entre esos dos disolventes.

$$(K_D^o)_A = \frac{a_{Ao}}{a_{Aa}} \quad (2.1)$$

Aquí a_A es la actividad del soluto A y los subíndices “ a ” y “ o ” se refieren a fases acuosas y orgánica, respectivamente. Dado que generalmente, la concentración del analito es muy baja, los coeficientes de actividad pueden reemplazarse por la respectiva concentración molar o molal y dado que las concentraciones son finitas, se suele usar directamente K_D . En la literatura se puede encontrar a esta constante con muchos nombres: coeficiente/constante de partición/distribución, etc. Además, se emplean otros símbolos tales como K , K_P y P . En este trabajo hemos optado por utilizar el término “*coeficiente de partición*” representada por el símbolo P cuando se hace referencia a la distribución de una especie entre dos fases inmiscibles.

En definitiva, el coeficiente de partición, P , es una medida relativa de la afinidad que tiene el analito por cada fase. Se pretende que el analito interactúe de manera preferencial con la fase extractante respecto a las “impurezas” para poder separarlos. Consideremos dos solventes inmiscibles o prácticamente inmiscibles, 1 y 2 . Al ponerlos en contacto, se formarán dos fases líquidas de un solvente saturado en el otro (sistema bifásico). Cuando un soluto A se introduce en el sistema bifásico, se distribuirá entre las dos fases. Si asumimos mezclas ideales, en la fase del solvente 1 , la energía libre de Gibbs de A , ó el potencial químico, μ_{1A} , se expresa por:

$$\mu_{1A} = \mu_{1A}^0 + RT \ln x_{1A} \quad (2.2)$$

donde μ_{1A}^0 es el potencial químico estándar del analito A a dilución infinita en la fase líquida 1 , x_{1A} es la fracción molar de A en el solvente 1 . R y T son la constante universal de los gases y la temperatura absoluta, respectivamente. Del mismo modo, en la fase 2 , el potencial químico, μ_{2A} , es:

$$\mu_{2A} = \mu_{2A}^0 + RT \ln x_{2A} \quad (2.3)$$

Si el potencial químico no es idéntico en las dos fases, ocurre transferencia de masa de A desde la fase de mayor a la de menor potencial químico y las fracciones molares cambiarán de manera que el potencial químico de A llegue a ser igual en ambas fases, es decir, se alcance el equilibrio. Entonces:

$$\mu_{1A}^0 - \mu_{2A}^0 = RT \ln \left(\frac{x_{2A}}{x_{1A}} \right) \quad (2.4)$$

en la que x_{2A}/x_{1A} es el coeficiente de partición, P , expresado por:

$$\frac{x_{2A}}{x_{1A}} = P_{1/2} = \exp \left[\frac{\mu_{1A}^0 - \mu_{2A}^0}{RT} \right] \quad (2.5)$$

En el caso de mezclas no ideales, las fracciones molares, x , deberían ser reemplazadas por las actividades, $a = x\gamma$, en la que γ es el coeficiente de actividad. El coeficiente de partición será constante sólo si los coeficientes de actividad son constantes, lo que no ocurre en soluciones concentradas [10]. Los coeficientes de partición por lo general se expresan como relación de molaridades.

Existen muy pocos datos en la bibliografía acerca de valores de coeficientes de partición entre líquidos iónicos y agua, $P_{L/a}$. Se han determinado valores de $P_{L/a}$ para compuestos tales como clorofenoles y nitrofenoles empleando RTILs con catión imidazolio y aniones del tipo $[\text{NTf}_2]^-$, $[\text{BF}_4]^-$ y $[\text{PF}_6]^-$ [11] y para diferentes compuestos fenólicos utilizando $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$ [12]. También ha habido pocas publicaciones que impliquen la partición de compuestos orgánicos entre RTILs e hidrocarburos no polares. Poole y colaboradores han medido coeficientes de partición entre RTILs de alquilamonio del tipo $[\text{C}_2\text{N}][\text{NO}_3]$, $[\text{C}_3\text{N}][\text{NO}_3]$, $[(\text{C}_3)_2\text{N}][\text{NO}_3]$, $[(\text{C}_3)_2\text{N}][\text{SCN}]$ y solventes orgánicos inmiscibles tales como *n*-hexano, benceno, tolueno, *l*-octanol o diclorometano [13] para varias anilinas substituidas, fenoles, y otros compuestos aromáticos. Los autores encontraron que los compuestos que presentan interacciones puente de hidrógeno “fuertes” con el RTIL, se solubilizaban preferencialmente en el líquido iónico, mientras que compuestos de baja polaridad y “débil” interacción puente hidrógeno permanecían preferentemente en el solvente orgánico. Es decir que los compuestos que no pueden formar puente H, y por lo tanto predominan las interacciones dispersivas, se disuelven preferencialmente en el solvente orgánico que en general es menos polar que el RTIL y los solutos polares o que pueden formar puente H, ya sea con el anión o con el átomo de nitrógeno del catión, se disuelven preferencialmente en la fase del líquido iónico.

Varios grupos de investigación midieron coeficientes de partición $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]/\text{agua}$ [14, 15, 12, 16, 3] y $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]/n\text{-heptano}$ [3] para diferentes tipos de analitos ionizables, tales como ácidos orgánicos, bases orgánicas, aminoácidos, antioxidantes y también para analitos neutros a diferentes valores de pH. Se encontraron marcadas diferencias en los coeficientes de partición entre

analitos ácidos, básicos y neutros. Por ejemplo los compuestos neutros y ácidos orgánicos permanecen preferencialmente en la fase RTIL a pH= 2, mientras que las bases orgánicas permanecen en la fase acuosa. Este comportamiento cambia de diferente manera para los distintos analitos al incrementar el pH. Por ejemplo, para las bases orgánicas los coeficientes de partición aumentan; por el contrario para ácidos orgánicos los valores disminuyen y como se puede esperar para los compuestos neutros, los coeficientes de partición se mantienen aproximadamente constantes con el cambio de pH. También se obtuvieron coeficientes de partición de clorofenoles y nitrofenoles entre [C₈C₁im][BF₄]/agua los que resultaron fuertemente afectados por el pH de la fase acuosa, como se esperaba. A bajo pH, estos fenoles sustituidos permanecían preferentemente en la fase RTIL como moléculas neutras. En estos estudios, también se vinculó la fuerza impulsora del proceso de partición con la interacción dispersiva entre los analitos disueltos con el catión del RTIL por un lado y con las interacciones puente de hidrógeno con el anión del líquido iónico [11].

2.2. “Modelo de Kamlet-Taft” y “Modelo del Parámetro de Solvatación”.

La relación funcional entre parámetros del soluto (o solvente) y procesos que dependen del soluto (o solvente) toman la forma de relaciones lineales de energía libre de Gibbs (RLEL o LFER en inglés) o en el caso particular de procesos de solvatación, relaciones lineales de energía de solvatación (RLES o LSER en inglés) [17, 18]. Estos modelos asumen que existe una relación lineal entre el proceso en estudio y diferentes parámetros (de solvente o soluto) que se proponen para modelar el comportamiento observado.

Las LSER asumen una relación lineal y aditiva entre los diferentes parámetros que reflejan las diversas interacciones posibles en el proceso en estudio y la propiedad fisicoquímica que se elige medir, PF , la cual debe estar relacionada a la energía libre (ΔG) del proceso.

$$\Delta G = -RT \ln PF \quad (2.6)$$

Donde R es la constante universal de los gases ideales, T es la temperatura absoluta y PF puede ser por ejemplo, la partición del analito entre dos fases, la retención cromatográfica, la solubilidad, la movilidad electroforética, la cinética de una reacción química, la constante de equilibrio de un dado proceso, etc. Por ejemplo, en el caso de un proceso cromatográfico, PF es el factor de retención, k , el que está relacionado a la energía libre de transferencia del analito entre la fase móvil y la fase

estacionaria a través de la expresión $\Delta G_{tr} = -RT \ln k + RT \ln \varphi$, (donde φ se lo define como la relación de fases) y en un proceso de partición líquido 1/líquido 2, $\Delta G_p = -RT \ln P_{1/2}$.

Las RLEL pueden estudiarse: *i.* en función del tipo de **solvente** para un soluto dado, o *ii.* en función del tipo de **soluto** para un solvente dado. Por ejemplo, para un proceso de partición fase orgánica/ fase acuosa, en el primer caso (*i*) la RLEL suele tomar la forma correspondiente al “**Modelo de Kamlet-Taft**”:

$$\log P_{f_o/f_a} = c + s (\pi^* + d\delta) + a \alpha + b \beta + e\zeta + m \delta_H^2 \quad (2.7)$$

En este caso, el tipo de fase orgánica (f_o) es la que se cambia respecto de la fase acuosa (f_a) y consecuentemente cambian los parámetros de solvente asociados a ella. Los parámetros *del solvente* π^* , β , α , δ_H^2 , reflejan la polaridad-polarizabilidad, capacidad de aceptar H en la formación de puente, capacidad de donar H en la formación de puente, energía cohesiva necesaria para formar una cavidad en el solvente para poder acomodar al soluto, respectivamente. El parámetro ζ de covalencia coordinada de la unión del soluto-solvente se utiliza para ubicar distintas familias de compuestos en la misma correlación y el parámetro δ de polaridad-polarizabilidad se utiliza cuando se estudian procesos de transferencia de un soluto de una fase a otra, por ejemplo en los procesos cromatográficos o en extracciones líquido-líquido. Los parámetros de solvente mencionados se describirán con mayor detalle en la **Sección 2.4**. Los coeficientes de la regresión son complementarios a estos parámetros y reflejan la sensibilidad **del soluto** a la propiedad medida. Así, s , b , a y m reflejarán la polaridad, capacidad de aceptar puente H, capacidad de donar puente H y alguna propiedad que dé cuenta del tamaño *del soluto* tal como el volumen molar o el área superficial. Dado que los parámetro δ y ζ son correcciones a los parámetros π^* y β , respectivamente, los coeficientes d y e tienen el mismo significado fisicoquímico que los coeficientes s y b . Como las escalas de solvente que se construyen con estos parámetros están normalizadas, los cocientes entre los distintos coeficientes que se obtienen al hacer una regresión multiparamétrica, permiten determinar el grado de contribución de los distintos efectos ejercidos sobre la propiedad medida.

En el segundo caso (*ii*) la RLEL toma la forma correspondiente al “**Modelo del Parámetro de Solvatación**”:

$$\log P_{f_o/f_a} = c + sS + aA + bB + eE + vV \quad (2.8)$$

Aquí, el **soluto varía** y el solvente (o sistema bifásico) permanece fijo. Los *parámetros de soluto* S , A , B , E y V reflejan: la polaridad/polarizabilidad, capacidad de donar H en la formación de puente, capacidad de aceptar H en la formación de puente, la polarizabilidad debida a pares de electrones libres presentes en los heteroátomos de las moléculas de soluto elegidas y el volumen molar de soluto que pretende modelar tanto la energía necesaria para formar la cavidad en el solvente para acomodar al soluto como las interacciones dispersivas simultáneamente. El parámetro V se puede calcular a través del algoritmo de McGowan [19]. En la ordenada al origen, c , de la regresión multiparamétrica aparece el factor de conversión entre el logaritmo decimal y el logaritmo natural, el término $-RT$ de la **Ecuación 2.8** y el valor de $\log P_{fo/fa}$ (hipotético) cuando los valores de todos los parámetros son cero.

El *Modelo del Parámetro de Solvatación* (MPS) [20–24] se aplicó exitosamente a numerosos procesos extractivos y separativos, procesos cinéticos, retención cromatográfica e inclusive a la explicación de actividad biológica [25–27]. Dichos parámetros de soluto se obtuvieron inicialmente mediante medidas de partición entre diclorometano y agua y posteriormente mediante retención cromatográfica (GC) pero esos valores fueron mejorados posteriormente mediante algoritmos apropiados (*back-calculation*) [25]. En la sección siguiente se retomará el tema explicándose la forma en que se obtienen estos parámetros. Los parámetros de soluto mencionados fueron obtenidos a fines de 1980 por Michael H. Abraham y se conocen para varios miles de compuestos, aunque generalmente para los analitos que son de mayor interés en farmacología, toxicología o química ambiental no están disponibles en la literatura [28, 29, 23]. Sin embargo es posible calcularlos de manera aproximada o exacta dependiendo de los casos, empleando un software diseñado para tal fin (ADME Boxes 5.0 de Pharma Algorithms). También es posible obtenerlos experimentalmente, aunque el procedimiento, si bien bastante sencillo, resulta obviamente más tedioso [25].

Los coeficientes v , s , a , b y e de la **Ecuación 2.8** se obtienen mediante regresión lineal múltiple y el significado fisicoquímico está asociado al proceso en estudio. Por ejemplo, si P es el logaritmo del coeficiente de partición *l*-octanol/agua, $P_{oct/w}$, los coeficientes representan la propiedad *complementaria* al parámetro al cual se asocia [25], tal como ocurría con el modelo de Kamlet-Taft. Estos coeficientes ya no reflejarán directamente la interacción soluto-solvente sino la *diferencia* entre las interacciones soluto-solvente 1 y soluto-solvente 2. Así, v será una propiedad que sea sensible el tamaño del soluto, V , tal como la energía cohesiva del solvente y las interacciones dispersivas. En este caso, dicho coeficiente reflejará la *diferencia* de energía cohesiva y dispersiva del soluto entre la fase del *l*-octanol y la fase acuosa. La energía cohesiva se puede modelar a través del parámetro de solubilidad de Hildebrand, δ^2_H , como se dijo anteriormente. Lamentablemente no existe hasta la

fecha ningún parámetro que refleje solamente las interacciones dispersivas. De la misma manera, la propiedad complementaria a la polaridad del soluto, S , será la polaridad del medio o solvente, en este caso, el coeficiente s reflejará la *diferencia* de polaridades entre el 1-octanol y el agua. Por otra parte, la propiedad complementaria a la polarizabilidad del soluto, E , será la polarizabilidad del medio o solvente reflejada en el coeficiente e ; la propiedad complementaria a la capacidad de aceptar H en la formación de puente del soluto, B , será la capacidad de donar H del medio (diferencia entre las capacidades de donar H de ambas fases), reflejada en el coeficiente a . Lo contrario a esto último ocurre para el coeficiente b . Por simplicidad en la nomenclatura, de ahora en adelante, a la capacidad de aceptar H en la formación de puente la denominaremos “*basicidad*” y a la capacidad de donar H en la formación de puente la denominaremos “*acidez*”, aunque esto no debe entenderse como una transferencia de protones completa como se los conoce a estos términos en el sentido clásico.

Por lo tanto, para emplear el MPS se deben seleccionar un número mínimo de solutos “*serie de calibración*” (4 solutos por parámetro como mínimo para que el coeficiente obtenido de la regresión multiparamétrica sea estadísticamente significativo) cuyos valores de V , S , A , B y E sean conocidos y *mutuamente ortogonales* (para evitar correlación cruzada y así, evitar obtener valores para los coeficientes que no reflejen confiablemente el proceso que modelan). Si el modelo es correctamente empleado, es posible dilucidar cuáles interacciones intermoleculares serán las responsables del proceso de partición. Luego, empleando una serie de solutos diferentes a los solutos de la “*serie de calibración*” (a los cuales llamaremos “*serie de prueba*”) se podrán obtener valores de $\log P$ calculados o predichos para poderlos comparar con los valores experimentales y determinar la capacidad de predicción *cuantitativa* del modelo. Si se tiene en cuenta que, generalmente, se estudian procesos de extracción con solventes orgánicos (o en este trabajo de tesis, con RTILs) desde matrices acuosas, los mayores valores de $\log P_{L/a}$ predichos por el modelo para *cualquier* analito que se desee, se espera que estén de acuerdo con los rendimientos de extracción más altos. El MPS se ha aplicado satisfactoriamente para la predicción de valores de $\log P_{L/a}$ para $[C_4C_1im][PF_6]$ [3, 30], $[C_4C_1im][PF_6]$ y $[C_6C_1im][PF_6]$ [30] y también para $[C_4C_1im][PF_6]/n$ -heptano [3]. El modelo de Abraham proporciona así un método conveniente para predecir coeficientes de partición.

2.3. Parámetros de soluto.

De los cinco parámetros de soluto o descriptores utilizados en la **Ecuación 2.8**, sólo el volumen molar, V , y el parámetro de polarizabilidad, E , se pueden obtener mediante cálculo. Los otros tres descriptores deben ser determinados experimentalmente. Los métodos más utilizados para

la determinación de descriptores son los métodos cromatográficos, particiones líquido-líquido y medidas de solubilidad [31, 25, 32]. Para obtener “valores robustos” de estos parámetros es preferible una combinación de métodos. Por lo general, los valores de los descriptores se determinan grupalmente, ya que hay pocos métodos experimentales disponibles para su obtención de manera individual.

2.3.1. Volumen molar, V .

El volumen molar o volumen característico de McGowan, se lo define como el volumen de un mol de un compuesto cuando las moléculas están en estado estacionario. En el MPS, fue elegido como una medida de la “cavidad” que se debe formar en el solvente para acomodar al soluto, es decir, una medida proporcional a la energía resultante entre la que debe aportar el sistema para interrumpir las interacciones solvente-solvente y la que libera el sistema para formar las interacciones soluto-solvente.

Para cualquier compuesto, se calcula considerando valores tabulados para los diferentes átomos, número de enlaces y el número de anillos de acuerdo con la siguiente expresión:

$$V = \frac{\left[\sum (\text{contribución de todos los átomos}) - 6.56(N - 1 + R_g) \right]}{100} \quad (2.9)$$

donde N es el número total de átomos y R_g es el número total de anillos de la estructura química [21, 33, 19]. V tiene unidades de $\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}/100$. El cociente 100 sirve para escalarlo y así tener valores de similar magnitud a los otros descriptores. Es importante remarcar que el volumen molar calculado de esta manera es igual para todos los isómeros de un mismo compuesto, lo cual puede no ser útil al momento de predecir alguna propiedad fisicoquímica tal como retención cromatográfica o partición líquido-líquido.

2.3.2. Polarizabilidad, E .

La polarizabilidad, también conocida como refracción molar, E , pretende capturar la contribución adicional a las interacciones dispersivas para moléculas polarizables que contienen pares de electrones libres, más allá de lo que se puede atribuir a la formación de la cavidad y a las interacciones dispersivas (término νV). El parámetro E se calcula como la refracción molar del

solutos menos la refracción molar de un *n*-alcano hipotético con el mismo volumen molar [34, 35]. Para solutos líquidos se lo puede calcular a partir del índice de refracción a 20 °C con la línea D del sodio, η , empleando la **Ecuación 2.10**.

$$E = 10V \left[\frac{\eta^2 - 1}{\eta^2 + 2} \right] - 2.832V + 0.526 \quad (2.10)$$

E tiene unidades de $\text{cm}^3 \text{ mol}^{-1}/10$. Por definición, $E=0$ para *n*-alcanos y puede tener valores negativos para compuestos que son menos polarizables que los *n*-alcanos tales como compuestos fluorocarbonados y compuestos orgánicos de silicio. El cálculo del parámetro E para compuestos que son líquidos a 20 °C es sencillo, pero incluso para los sólidos, los valores de índice de refracción se calculan fácilmente mediante software tales como ChemSketch 11.0 (Advanced Chemistry Development, Inc., ACD/Labs, www.acdlabs.com) y ADME Boxes 5.0 (Pharma Algorithm, www.pharma-algorithms.com). Además, los valores para sólidos se pueden calcular a través de valores de E con valores asignados para fragmentos [26, 36]. Los resultados dependen de los programas informáticos utilizados.

2.3.3. Polaridad/polarizabilidad, S .

El descriptor de polaridad/polarizabilidad, S , refleja las interacciones asociadas con dipolos permanentes e inducidos [37, 38, 34]. Se lo determinó originalmente por cromatografía de gases empleando fases estacionarias polares en condiciones donde las interacciones puente hidrógeno eran despreciables [39–41]. Sin embargo, el descriptor S se lo obtiene más comúnmente de manera simultánea con los descriptores de enlaces de hidrógeno a partir de la partición entre solventes orgánicos apolares y agua [26, 42]. Para los *n*-alcanos, S se define como igual a 0. Para los compuestos menos polarizables que los *n*-alcanos, por ejemplo, compuestos fluorocarbonados y compuestos orgánicos de silicio, S puede tomar valores negativos.

2.3.4. Descriptores de enlaces de hidrógeno, A y B .

Las primeras escalas de capacidad donora o aceptora de puentes de hidrógeno se establecieron a partir de la formación de complejos entre *diferentes solutos donores* de H con un dado *aceptor* de H a 298 K en un solvente inerte tal como tetracloruro de carbono, o viceversa, es

decir, entre un soluto dado *acceptor* de H y *diferentes compuestos donores* de H [43, 20, 44]. Se encontró que cuando las constantes de formación de complejos de enlaces de hidrógeno ($\log K$) fueron obtenidas para un conjunto de ácidos contra una base de referencia determinado, los valores de $\log K$ se relacionaban linealmente con los valores de $\log K$ para el conjunto de los ácidos contra cualquier otra base de referencia. Esta observación pudo generalizarse mediante la definición de una escala de *acidez de enlaces de hidrógeno*, $\log K^H_A$, de forma tal que los valores de $\log K$ para ácidos contra cualquier base dada se relacione linealmente a $\log K^H_A$. Cuando las constantes de equilibrio para complejos de enlaces de hidrógeno fueron expresados en la escala molar, las rectas descriptas por las ecuaciones correspondientes a los diferentes complejos se entrecruzaban en el punto (-1,1). Esto proporcionó un cero definido para la escala por el cual la capacidad *donora* de H en la formación de puente (“acidez”) fue definido como $\alpha^H_2 = (\log K^H_A + 1,1)/4,636$. La constante 4,636 es un factor de normalización de escalas que se introdujo como un factor de escala para moderar la longitud de la misma [45]. Los compuestos sin H unido a un átomo electronegativo tienen $\alpha^H_2 = 0$ por definición.

Con el mismo razonamiento, las constantes de equilibrio para una serie de bases monoméricas contra ácidos monoméricos de referencia se convirtieron a una escala de capacidad de *aceptar* H en la formación de puente (“basicidad”) dada por $\beta^H_2 = (\log K^H_B + 1,1) / 4,636$. Para caracterizar los procesos de distribución en los que el soluto está rodeado de moléculas de solvente fue necesario ampliar estas escalas para incluir las múltiples interacciones soluto-solvente que se establecen [46, 43, 38]. De esta manera se establecieron las escala de acidez “efectiva” de enlace de hidrógeno, $\sum \beta^H_2$ y de basicidad “efectiva” de enlace de hidrógeno $\sum \alpha^H_2$. En la nomenclatura actual estos parámetros se designan como **B** y **A**, respectivamente.

Existen distintos comportamientos de basicidad entre diferentes familias de compuestos, por ejemplo sulfóxidos, alquilaminas, alquilpiridinas, anilinas y compuestos con heterociclos nitrogenados [39]. Por lo tanto, para sistemas bifásicos “acuosos” parcialmente miscibles, por ejemplo, 1-octanol/agua, acetato etilo/agua, sistemas micelares, fase móvil/fase estacionaria en RPLC, RTILs/agua, etc., se reemplaza el descriptor **B** utilizado en los sistemas “no acuosos” por un nuevo descriptor **B⁰** que contempla la diferente fuerza con que se forma el enlace de H [39].

2.4. Parámetros empíricos de solvente.

Debido a la complejidad de las interacciones soluto-solvente, no existe hasta el momento un modelo matemático completo y adecuado de aplicabilidad general que permita explicar el

comportamiento de una dada propiedad, tal como un coeficiente de partición líquido-líquido, la retención cromatográfica o el corrimiento de una banda espectroscópica, en función de las distintas interacciones existentes. Esto, sumado a la dificultad para definir a la polaridad del solvente en términos de constantes físicas simples, ha hecho que surgieran *parámetros empíricos* basados en procesos de referencia bien conocidos que dependan *del solvente*. Una aproximación común es tomar como proceso modelo la velocidad de alguna reacción, la posición de un equilibrio o el espectro de absorción de un compuesto dado, tomando como referencia una denominada “molécula de prueba” o “sonda”. Si el proceso es elegido apropiadamente y es suficientemente sensible al solvente, entonces se puede suponer que refleja todas las posibles interacciones soluto-solvente que estén presentes [47].

Cuando se aplican los *parámetros empíricos de solvente* mencionados anteriormente se supone tácitamente que la contribución de las fuerzas intermoleculares entre el solvente y un soluto de referencia seleccionado para reflejar a través de ese parámetro una dada interacción particular, es la misma que entre dicho solvente y el compuesto que se estudia. Por lo tanto, no es de esperar que estas escalas empíricas de solvente sean universales y útiles para toda clase de procesos químicos tales como reacciones químicas y absorciones espectroscópicas.

Los parámetros espectroscópicos de polaridad de solvente han sido derivados de compuestos estándar sensibles al solvente que absorben radiación en rangos correspondientes al espectro UV-visible, IR, RMN [48]. Dimroth y Reichardt [49] propusieron en 1969 un parámetro de polaridad de solvente denominado $E_T(30)$, basado en la energía de transición para la banda de absorción de mayor longitud de onda de la betaína N-fenóxido de piridinio. El parámetro está definido como:

$$E_T(30) = \frac{h\nu_{\max}}{hc} \quad (2.11)$$

Aquí, N_a es el número de Avogadro, c es la velocidad de la luz en el vacío y ν_{\max} es el número de onda (o inversa de la longitud de onda, $1/\lambda_{\max}$) correspondiente al máximo de la banda de transferencia de carga (la de mayor longitud de onda) del colorante mencionado. Esta banda presenta un corrimiento por solvente (solvatocromismo) muy marcado, desplazándose desde 810 nm en difeniléter ($E_T(30) = 35,3 \text{ kcal mol}^{-1}$) a 453 nm en agua ($E_T(30) = 63,1 \text{ kcal mol}^{-1}$). Debido a que el rango solvatocrómico está comprendido dentro del espectro visible, es posible hacer hasta una estimación visual cualitativa de la polaridad del solvente.

Se han determinado un gran número de valores de $E_T(30)$ en solventes puros y mezclas [47].

La desventaja de este indicador es que no se puede utilizar para estimar la polaridad de solventes ácidos, tales como ácidos carboxílicos, y aún de agua, debido a que desaparece la banda de transferencia de carga como consecuencia de la protonación del átomo de oxígeno fenólico (ver **Figura 1.4**).

Debido a la presencia de una carga negativa localizada sobre el átomo de oxígeno, este indicador mide, no sólo la polaridad del solvente, sino también la capacidad de formar puentes de H de solventes próticos [50], por lo que, dependiendo del sistema de estudio, habrá que descontar este efecto si estamos interesados en medir únicamente la polaridad.

Como se mencionó en la **Sección 2.2**, el *método de comparación solvatocrómica* es una aproximación muy útil para estudiar las interacciones a la que está sometido un soluto en un dado medio [51–53] y hace uso de las escalas empíricas de π^* de “polaridad-polarizabilidad”, β de “basicidad por puente H” y α de “acidez por puente H”.

La **escala π^*** [54] es denominada de esta manera debido a que fue derivada de los efectos de solvente sobre transiciones electrónicas $\pi^* \rightarrow \pi$ de una variedad de compuestos nitroaromáticos dipolares sin capacidad para formar puente de H (4-nitroanisol, *N,N*-dietil-3-nitroanilina, *N,N*-dietil-4-nitro-anilina, 4-metoxi- β -nitro-estireno, 1-etil-4-nitrobenceno, *N*-metil-2-nitro-*p*-toluidina y 4-dimetilaminobenzofenona) [54]. El efecto de solvente sobre los valores de $\nu_{m\acute{a}x}$ de estos siete indicadores, algunas de cuyas estructuras se muestran en **Figura 2.1**, ha sido empleado en la construcción inicial de la escala π^* , la que ha sido expandida y refinada haciendo uso de indicadores solvatocrómicos adicionales, cuyas estructuras están relacionadas a los de los indicadores primarios. Se ha elegido un rango normalizado cuyo valor $\pi^* = 0$ corresponde al ciclohexano y $\pi^* = 1$ para el dimetilsulfóxido. Se ha extendido esta escala a solventes perfluorados cuyos valores de π^* son negativos como por ejemplo: perfluorodimetildecalina, perfluorotributilamina, perfluoroheptano, y perfluorooctano cuyos valores son: -0,33; -0,36; -0,39; y -0.41, respectivamente [55].

La escala π^* debe ser modificada cuando los corrimientos de las bandas son hacia el azul (corrimientos hipsocrómicos), incluyendo un parámetro de corrección δ que mide polarizabilidad, y cuyo valor es 0 para solventes alifáticos no halogenados, 0,5 para solventes alifáticos polihalogenados y 1 para aromáticos [54, 56–59].

El valor de π^* para un solvente dado puede calcularse a partir de la siguiente expresión:

$$\pi^* = \frac{215 - \nu_{m\acute{a}x}}{318} \quad (2.12)$$

Donde $\nu_{m\acute{a}x}$ corresponde al número de onda y es medido en kiloKaysers ($1\text{kK} = 1000\text{ cm}^{-1}$) para la molécula prueba *N,N*-dietyl-4-nitroanilina y se lo determina a partir de la **Ecuación 2.13** en la cual $\lambda_{m\acute{a}x}$ es la longitud de onda del máximo de la banda de absorción del indicador en nanómetros:

$$\nu_{k\acute{a}c} = \frac{1}{\lambda_{m\acute{a}x} \times 10^4} \quad (2.13)$$

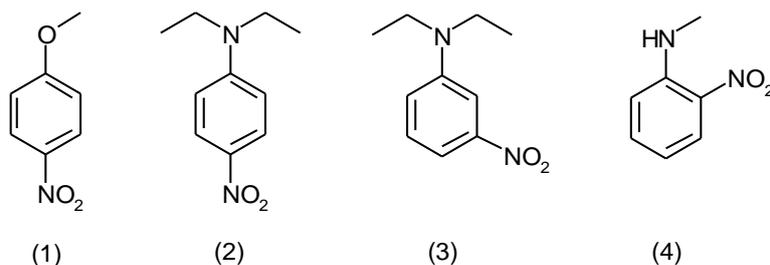


Figura 2.1: Moléculas de prueba utilizadas comúnmente para medir del parámetro de solvente π^* .
(1) 4-nitroanisol, (2) *N,N*-dietyl-4-nitroanilina, (3) *N,N*-dietyl-3-nitroanilina, (4) *N*-metil-2-nitroanilina.

Kamlet y col. [54], encontraron que el parámetro π^* est relacionado linealmente con el parámetro $E_T(30)$, si se excluyen de la correlación a los solventes prticos, polihalogenados o aromáticos. Entre cada familia de solventes se pudo observar una relación lineal entre π^* y el momento dipolar de los mismos, lo que indica que π^* est directamente relacionado con polaridad del solvente en familias estructuralmente relacionadas. Esto indica que estas familias de solventes tienen diferente polarizabilidad, y de aquí surge la necesidad de utilizar el parámetro δ para agruparlas dentro de la misma zona de correlación.

La **escala β** [54] provee una medida de la capacidad del solvente para aceptar H en la formación de puente con el analito. Fue desarrollada tomando como soluto indicador la 4-nitroanilina, que actúa como dador de H a través del grupo $-\text{NH}_2$. A la $\nu_{m\acute{a}x}$ observada en un dado solvente aceptor de puente H, se debe restar el efecto de polaridad. Esto se consigue midiendo la $\nu_{m\acute{a}x}$ de un soluto estructuralmente relacionado (homomórfico), en este caso *N,N*-dietyl-4-nitroanilina.

El efecto aceptor de los grupos $-\text{NO}_2$ se cancela al restar el efecto del soluto homomórfico. Tomando la hexametilfosforamida como solvente fuertemente aceptor de H como punto de referencia ($\beta = 1$), se miden los demás solventes y queda así definida la escala. La basicidad puede ser calculada de la siguiente manera empleando el par homomórfico 4-nitroanilina/*N,N*-dietyl-4-nitroanilina.

$$\beta = \frac{30\nu_a - 10\nu_i}{29} \quad (2.14)$$

Donde $\nu_{m\acute{a}x}$ es la frecuencia del máximo de la banda de transferencia de carga de la 4-nitroanilina y el valor de π^* corresponde al soluto homomórfico *N,N*-dietil-4-nitroanilina, obviamente disuelto en el mismo solvente.[57, 58].

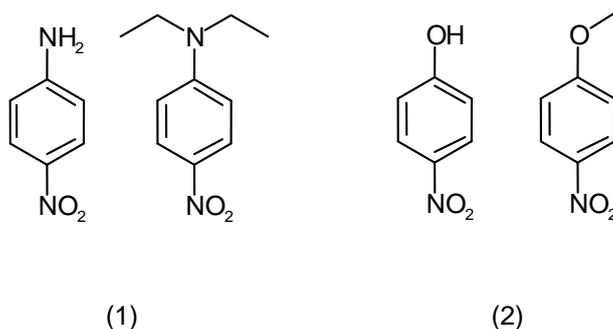


Figura 2.2: Pares homomórficos empleados en la construcción de la escala β . (1) 4-nitroanilina/*N,N*-dietil-4-nitroanilina y (2) 4-nitrofenol/4-nitroanisol.

Se observó que diferentes familias de solventes, cuya capacidad para aceptar puentes de H es muy distinta, no se agrupaban dentro de una misma correlación. Por ello, desarrolló la escala ζ de *covalencia coordinada*. Esta escala mide la intensidad relativa de los enlaces covalentes coordinados que se forman entre el soluto y el centro básico o donador de electrones del solvente. Su uso permite ubicar a distintas familias en la misma correlación. ζ vale -0,2 para bases que contienen el grupo funcional P=O; 0 para bases que contienen S=O y C=O (valor de referencia arbitrario); 0,1 para bases que contengan N en un enlace triple (ej. nitrilos); 0,2 para bases que contengan O con enlaces simples (teres, alcoholes), 0,6 para nitrógeno con hibridización sp^2 (por ej. piridinas) y 1 para N con hibridización sp^3 (aminas). La fuerza de la covalencia coordinada del aducto soluto-solvente (cido de Lewis) disminuye (ζ decrece) a medida que aumenta la electronegatividad del centro base del solvente (base de Lewis). Esto se debe a que la carga positiva creada por covalencia coordinada sobre un átomo muy electronegativo es desfavorable.

La **escala α** [60] de acidez por puente H describe la capacidad del solvente para donar H en la formación de un puente con el soluto. Se define mediante el mismo procedimiento de comparación solvatocrmica que para la escala β , tomando como solutos indicadores el 4-nitroanisol y la betaína $E_T(30)$. La acidez por puente H puede determinarse a partir de la siguiente ecuación:

$$\frac{194 - 387}{\alpha} = \frac{59}{59} \quad (2.15)$$

donde ν_{max} corresponde a la longitud de onda de la banda de máxima absorción de la betaína $E_T(30)$ y π^* corresponde al soluto homomórfico 4-nitroanisol [57, 59, 61]. Para definir un “extremo” de la escala, se eligió el metanol, un solvente fuertemente dador de H, como punto de referencia fijo ($\alpha=1$) y se miden a partir de él todos los demás solventes dadores de H [62].

Un parámetro muy utilizado en procesos de transferencia de fase, es el parámetro de solubilidad de Hildebrand, δ_H [47], que mide la presión cohesiva o energía asociada con las interacciones intermoleculares solvente-solvente. Es considerando como una medida de la energía de Gibbs necesaria para separar las moléculas de solvente para formar la cavidad requerida por el soluto. Está definido como:

$$\delta_H^2 = \frac{(\Delta H_p - RT)}{V^*} \quad (2.16)$$

Donde ΔH_{vap} es la entalpía molar de vaporización del líquido y V^* el volumen molar a 298 K.

Este término es importante en procesos tales como la transferencia del soluto de una fase a otra (procesos cromatográficos o de partición) que involucran la formación de una cavidad, pero no en efectos de solvente sobre propiedades espectrales [63], debido a que en estos procesos la cavidad está formada antes de que se produzca la transición espectroscópica. Este parámetro tiene valores grandes en solventes muy estructurados como el agua, formamida y 1,2-etanodiol ($\delta_H = 47,9; 39,3; 29,9 \text{ J}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$, respectivamente) mientras que es muy pequeño en solventes apolares que no forman puente H tales como *n*-hexano, ciclohexano y tetracloruro de carbono ($\delta_H = 14,9; 16,8; 17,6 \text{ J}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$, respectivamente)[47].

En la **Tabla 2.1**, se muestran algunos parámetros empíricos de solventes típicos, junto a algunas propiedades fisicoquímicas como la constante dieléctrica, ϵ , el índice de refracción, η y el parámetro de solubilidad de Hildebrand, δ_H .

Tabla 2.1: Parámetros empíricos de solventes.

Solvente	$\pi^{*(a)}$	$\alpha^{(a)}$	$\beta^{(a)}$	$\zeta^{(b)}$	$\delta_H^{(c)}$	$\epsilon^{(d)}$	$\eta^{(d)}$	$E_T(30)^{(a)}$
Ciclohexano	0	0	0	0	16,8	2,01	1,4235	30,9
Hexano	-0,08	0	0	0	14,9	1,88	1,3723	31,0
Benceno	0,59	0	0,10	0	18,8	2,27	1,5011	34,3
Tolueno	0,54	0	0,11	0	18,3	2,38	1,4969	33,9
<i>m</i> -Xileno	0,47	0	0,12	0	---	---	---	33,3
Éter etílico	0,27	0	0,47	0	15,8	4,33	1,3495	34,5
Acetato de etilo	0,55	0	0,45	0	18,6	6,02	1,3724	38,1
Acetonitrilo	0,75	0,19	0,40	0	24,3	37,50	1,3416	45,6
Tetrahidrofurano	0,58	0	0,55	0	18,6	7,58	1,4072	37,4
Dimetil sulfóxido	1,00	0	0,76	0	24,5	46,68	1,4773	45,1
Dimetil formamida	0,88	0	0,69	0	24,8	36,71	1,4282	43,8
2-Propanol	0,48	0,76	0,84	0,2	---	19,92	1,3772	49,2
Metanol	0,60	0,98	0,66	0,2	29,9	32,70	1,3265	55,4
Etanol	0,54	0,86	0,75	0,2	26,0	24,55	1,3594	51,9
Butanol	0,47	0,84	0,84	0,2	26,3	17,51	1,3973	50,2
<i>l</i> -Propanol	0,52	0,84	0,90	0,2	---	19,92	1,3752	50,7
Tripropilamina	0,15	0	0,56	1	---	---	1,4165	---
Tributilamina	0,16	0	0,62	1	---	---	1,4297	32,1
Dietilamina	0,24	0,03	0,70	1	---	3,58	1,3825	35,4
Dicloroetano	0,81	0	0,10	0	20,0	10,36	1,4421	41,3
Agua	1,09	1,17	0,47	---	47,9	78,3	1,3323	63,1

Datos de la Referencia: ^a [59]; ^b [62]; ^c [47]; ^d [64].

2.5. Parte experimental.

2.5.1. Reactivos.

El hexafluorofosfato de *l*-butil-3-metil-imidazolio, [C₄C₁im][PF₆], el hexafluorofosfato de *l*-octil-3-metil-imidazolio, [C₈C₁im][PF₆], el tetrafluoroborato de *l*-octil-3-metil-imidazolio, [C₈C₁im][BF₄] y el tetrafluoroborato de *N*-octil-piridinio, [C₈pyr][BF₄], fueron sintetizados en nuestro laboratorio (ver **Sección 2. 5.3.**). El hexafluorofosfato de *l*-hexil-3-metil-imidazolio, [C₆C₁im][PF₆], 97,0% (p/p), fue provisto por Fluka (Buchs, Suiza), el cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio, [(C₆)₃C₁₄P][Cl], (CYPHOS[®] IL 101), el bromuro de trihexil(tetradecil)fosfonio, [(C₆)₃C₁₄P][Br], (CYPHOS[®] IL 102), la dicianoimida de trihexil(tetradecil)fosfonio, [(C₆)₃C₁₄P][N(CN)₂], (CYPHOS[®] IL 105) y la bis(trifluorometilsulfonil)imida de trihexil(tetradecil)fosfonio, [(C₆)₃C₁₄P][NTf₂] (CYPHOS[®] IL 109) fueron provistos por Cytec Industries Inc. (New Jersey, EEUU). En la **Tabla 2.2** se observan algunas propiedades físicas y químicas de interés para los RTILs utilizados en este trabajo de tesis. Los reactivos utilizados fueron de grado analítico o superior: *l*-bromobutano, 99,0% (p/p) Riedel-de-Haën (Seelze, Alemania), hexafluorofosfato de potasio, 98,0% (p/p) Aldrich (Wisconsin, EEUU), *l*-metilimidazolio, 99,0% (p/p) Merck, (Hohenbrunn, Alemania), ácido tetrafluorbórico, 48,0% (p/v) y piridina, 99,0% (p/p) Sigma-Aldrich (St. Louis, EEUU), 1-bromooctano, 99,0% (p/p) Aldrich (Wisconsin, EEUU), ácido clorhídrico, 37,0% (p/p) y sulfato de sodio anhidro Merck (Buenos Aires, Argentina), ácido fosfórico, 98,0% (p/p) Merck (Hohenbrunn, Alemania), hidróxido de sodio e hidróxido de potasio Analar (Poole, Inglaterra), acetonitrilo y etanol anhidro, Carlo Erba (Divisione Chimica Industriale, Milan, Italia), acetona Merck (Industria Argentina), metanol y diclorometano calidad (HPLC) J. T. Baker (Estado de Mexico, Mexico). Las soluciones fueron preparadas con agua MilliQ[®]. Los solutos fueron provistos por: Sigma-Aldrich, St. Louis, EEUU (tiourea, acetanilida, timina, catecol, 2-nitroanilina benzamida, acetofenona, ácido 4-hidroxibenzoico, ácido 2,6-dimetilbenzoico, 4-nitrofenol, *o*-hidroxietilresorcinol, 2,6-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol, *o*-nitrofenol, 4-nitrotolueno, 2-nitrotolueno, 3-nitrotolueno, 4-metilanisol, 2-metilanisol, 3-metilanisol, 4-clorotolueno, *o*-tolualdehído, *m*-tolualdehído, benzonitrilo, clorobenceno, nitrobenceno, 2,4-dinitrofluorobenceno, reactivo de Reichardt (dye-30), acetaminofén, benzoina, indoprofeno, fenbufeno, suprofeno, ketoprofeno, ibuprofeno, fenoprofeno, flurbiprofeno, propranolol, cortisona, hidrocortisona y β -estradiol), Fluka, Buchs, Suiza (*p*-toluidina, *m*-toluidina, *o*-toluidina, benzaldehído, *p*-tolualdehído), Merck, Hohenbrunn, Alemania (4-nitroanilina, anilina, 3,4-dicloroanilina, 3-cloroanilina, 4-

cloroanilina, benceno, 2-nitrofenol, *p*-dimetilaminobenzaldehído), Riedel-de Haën, Seelze, Alemania (fenol), Carlo Erba Reagents, Milan, Italia (3-nitroanilina, ácido 4-nitrobenzoico), Frinton Laboratories, New Jersey, EEUU (*N,N*-Dietyl-4-nitroanilina), BDH Chemicals Ltd, Poole, Gran Bretaña (1,3,5-Trinitrobenzene), Industria Química Bonaerense, Buenos Aires, Argentina (1,4-benzoquinona, 2-naftol, resorcinol), Científica Central Jacobo Rapoport, Buenos Aires, Argentina (ácido benzoico), Roche, Buenos Aires, Argentina (benznidazol), Bayer, Leverkusen, Alemania (nifurtimox); ANMAT, Buenos Aires, Argentina (metronidazole) y Bagó, Buenos Aires, Argentina (cafeína).

Tabla 2.2: Parámetros fisicoquímicos de interés para los RTILs empleados recopilados de las **Tablas 1.1 y 1.3.**

RTIL	Densidad (g mL ⁻¹)	Viscosidad (cP)	Punto de fusión (°C)	Solubilidad en agua (g/100mL)
[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	1,382	400	10	2,0±0,3 / 1,88
[C ₆ C ₁ im][PF ₆]	1,293	486	-61	0,75
[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	1,235	810	-40	1,3±0,5 / 0,2
[C ₈ C ₁ im][BF ₄]	1,099	439	-79	1,8±0,5
[C ₈ pyr][BF ₄]	1,1127	-	-	-
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Cl] ^a	0,8819	1824	-	14,4
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Br] ^a	0,9546	2094	-61	4,5
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][N(CN) ₂]	0,8985	280	-	3,31
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][NTf ₂]	1,0652	293	-72,4	0,7

Datos de referencia: ^a Datos del proveedor.

2.5.2. Materiales y equipos.

Para las determinaciones cromatográficas, se empleó un cromatógrafo líquido HP 1100 (Agilent, EEUU) equipado con una bomba binaria, un termostizador de columna, desgasificador y un detector de longitud de onda variable conectado a un adquisidor de datos Data Apex CSW (Data Apex, República Checa). Se utilizó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent), 75×4,6-mm DI (3,5 μm) para analizar los diferentes compuestos.

En la fase móvil se empleó una mezcla metanol/buffer fosfato (pH= 2,70; 25 mM) en modo isocrático. Se varió la composición de solvente orgánico dependiendo del soluto o familia de solutos

a separar. El metanol fue previamente filtrado con membrana de nylon 0,22 μm (Osmonic- Magna) mientras que la fase acuosa fue filtrada con una membrana de 0,22 μm de nitrato de celulosa (Micron Separations).

En el detector se emplearon dos longitudes de onda diferentes: 254 y 300 nm, dependiendo de si el RTIL absorbía o no a la menor longitud de onda.

Se emplearon micropipetas Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Las soluciones fueron filtradas usando jeringas con filtro intercambiable (Popper & Sons Inc., New Hyde Park, NY, EEUU) con membranas de nitrato de celulosa de 0,22 μm de diámetro de poro.

Para la separación de las fases en los experimentos de determinación de los coeficientes de partición, se empleó una microcentrifuga Eppendorf 5417 C/R que opera hasta 14.000 rpm. También se empleó en estos experimentos un baño termostático Lauda T a $25,00 \pm 0,05$ °C, un agitador mecánico vortex Genie 2 (Scientific Industries, EEUU) y un electrodo combinado de vidrio Metrohm conectado a un pH-metro comercial Accument AR 25 pH/mV/Ion (Fisher Scientific).

Para la medición de los parámetros de solvente, se utilizó un espectrofotómetro UV-Vis de Helios-Gamma (Thermo) de simple haz con cubetas de cuarzo de 1 mm de camino óptico.

Los espectros de RMN de los RTILs en $(\text{CD}_3)_2\text{C}=\text{O}$ (o acetona- d_6) se registraron con un espectrómetro Varian Mercury Plus operando a 4,7 T. Las condiciones típicas espectrales fueron las siguientes: ancho espectral, 3,201 Hz; tiempo de la adquisición, 4,09 s; y 8 o 16 barridos por espectro. La resolución digital fue 0,39 Hz por punto. El solvente deuterado fue utilizado para obtener el lock y se usó también trimetilsilano como estándar interno. La concentración de la muestra fue de 20 mg mL^{-1} . Las mediciones fueron realizadas a 25 °C. Los espectros de ^{13}C -protón-acoplado y desacoplado se registraron con el mismo espectrómetro utilizando $(\text{CD}_3)_2\text{C}=\text{O}$ a 25 °C. Las condiciones espectrales fueron las siguientes: ancho espectral, 10.559 Hz; tiempo de adquisición, 1,303 s; y 512 o 1.000 scans por espectro. La concentración fue de 40 mg mL^{-1} y la resolución digital por punto fue de 1,29 Hz. Para complementar el estudio se realizaron espectros bidimensionales gCOSY y gHSQC con el mismo espectrómetro para completar la asignación de señales.

2.5.3. Síntesis de los RTILs.

La preparación de los RTILs empleados fue a partir de una adaptación de la síntesis propuesta por Fang y colaboradores y se detalla a continuación [65].

2.5.3.1. Preparación de tetrafluorborato de 1-octil-3-metilimidazolio, $[C_8C_1im][BF_4]$.

En un balón de tres bocas de 50 mL con refrigerante y con burbujeo de N_2 en el extremo superior y tapón de vidrio en la otra boca se agregaron 4.00 mL de 1-metilimidazolio (0,05 moles), 8,70 mL de 1-bromooctano (0,05 moles) y 5,49 g de $NaBF_4$ (0,05 moles) (ver preparación de $NaBF_4$ en la **Sección 2.5.3.2**). Se agitó durante 3,5 hs a 80 °C. Luego de enfriar la mezcla se disolvió en 50 mL de acetonitrilo. Se filtró en papel el precipitado de $NaBr$ y luego sobre un lecho de celita para terminar de remover el haluro residual.

Se eliminó el acetonitrilo en rotavapor a 40 °C y luego 6 hs a 80 °C con un evaporador rotativo (Büchi). El producto obtenido fue secado en bomba de vacío a 70 °C por 7 hs. No se encontró agua por espectroscopía RMN 1H . Los espectros 1H , ^{13}C , gCOSy y gHSQC fueron consistentes con la estructura del $[C_8C_1im][BF_4]$. El rendimiento obtenido fue del 95%. Se realizó el análisis estructural del líquido iónico por RMN en acetona- d_6 .

-RMN- 1H (200 MHz, acetona- d_6): (corrimientos químicos, δ , indicado en ppm) δ 9,12 (s, 1H, CH), 7,77 (t, 1H, CH), 7,77 (t, 1H, CH), 4,34 (t, 2H, CH_2), 4,03 (s, 3H, CH_3), 1,93 (m, 2H, CH_2), 1,20-1,41 (m, 10H, 5 x CH_2), 0,86 (t, 3H, CH_3).

-RMN- ^{13}C (50 MHz, acetona- d_6): δ 137,14; 123,97; 122,65; 49,62; 35,90; 31,82; 30,24; 29,29; 29,04; 26,14; 22,62; 13,72.

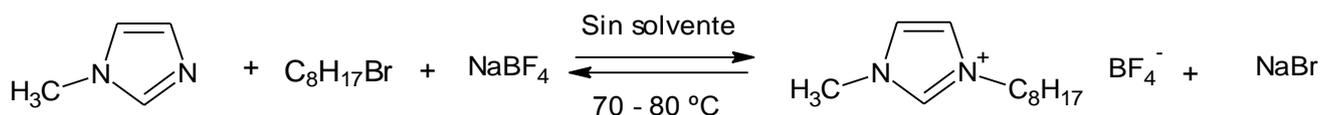
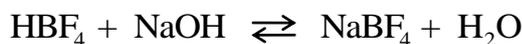


Figura 2.3: Procedimiento esquemático de la síntesis de $[C_8C_1im][BF_4]$.

2.5.3.2. Preparación de $NaBF_4$.

Se colocaron con probeta plástica 25 mL de HBF_4 en un balón de 50 mL de boca ancha y se agregó de a poco y en baño de hielo 8 g de perlas de $NaOH$ regulando el pH a 7 con el agregado de solución de $NaOH$ 1M o HCl 1M. Luego en un equipo de destilación y con trampa de agua se elimina el agua formada en la reacción.



2.5.3.3. Preparación de hexafluorfosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, [C₄C₁im][PF₆].

Empleando un dispositivo experimental idéntico al de la **Sección 2.5.3.1**, se mezclaron 4,00 mL de 1-metilimidazolio (0,05 moles), 5,40 mL de 1-bromobutano (0,05 moles) y finalmente 9,2 g de hexafluorfosfato de potasio (0,05 moles) pesados con Ar en el recipiente. Se agitó a 80 °C durante 3,5 hs. Se dejó enfriar y se lavó 4 veces con agua desionizada (4 x 15 mL). La ausencia de bromuros fue chequeada con solución de AgNO₃ (0,05 M). Luego se lavó 4 veces con éter etílico (4 x 15 mL). Se evaporó el éter en un evaporador rotativo a 50 °C durante 30 min y luego en evaporador Büchi a 120 °C durante 2 hs, el producto obtenido presentaba un color amarillo pálido. El producto obtenido fue secado en bomba de vacío a 70 °C por 7 hs. No se encontró agua por espectroscopía RMN-¹H. Los espectros ¹H, ¹³C, gCOSy y gHSQC fueron consistentes con la estructura del [C₄C₁im][PF₆] el rendimiento obtenido fue del 90%. Se realizó el análisis estructural del líquido iónico por RMN en acetona-d₆.

-RMN-¹H (200 MHz, acetona-d₆): (δ en ppm) δ 8,92 (s, 1H, CH), 7,70 (s, 1H, CH), 7,65 (s, 1H, CH), 4,34 (t, 2H, CH₂), 4,03 (s, 3H, CH₃), 1,93 (m, 2H, CH₂), 1,41 (m, 2H, CH₂), 0,96 (t, 3H, CH₃).
-RMN-¹³C (50 MHz, acetona d₆): δ 137,14; 124,47; 123,15; 49,82; 36,90; 32,32; 19,62; 13,72.

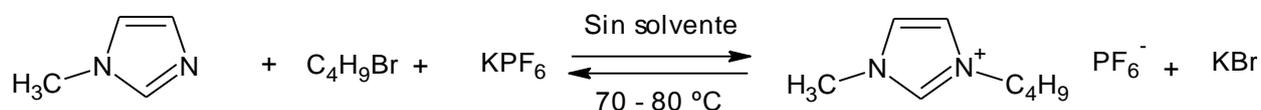


Figura 2.4: Procedimiento esquemático de la síntesis de [C₄C₁im][PF₆].

2.5.3.4. Preparación de hexafluorfosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, [C₈C₁im][PF₆].

Este líquido iónico fue sintetizado de igual forma que él [C₈C₁im][BF₄] con la diferencia que se agregó directamente 0,05 moles de la sal de KPF₆, en vez de NaBF₄.

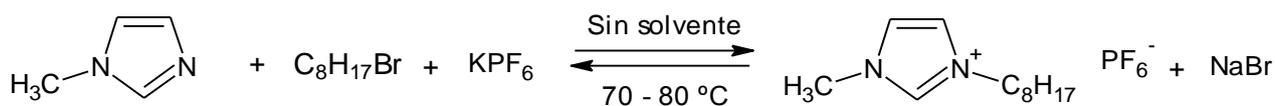


Figura 2.5: Procedimiento esquemático de la síntesis de [C₈C₁im][PF₆].

2.5.3.5. Preparación de tetrafluorborato de *N*-octil-piridinio, [C₈pyr][BF₄].

Empleando un dispositivo experimental idéntico al de la **Sección 2.5.3.1.**, se mezclaron 4,00 mL de piridina (0,05 moles), 8,70 mL de *I*-bromooctano (0,05 moles) y 5,49 g de NaBF₄. Se calentó la mezcla a 100 °C por 4 hs. Luego para la purificación y secado del RTIL obtenido se procedió como con la sección anterior.

Los espectros ¹H, ¹³C, gCOSy y gHSQC fueron consistentes con la estructura del [C₈pyr][BF₄]. El rendimiento obtenido fue del 94%. Se realizó el análisis estructural del líquido iónico por RMN como en los demás casos.

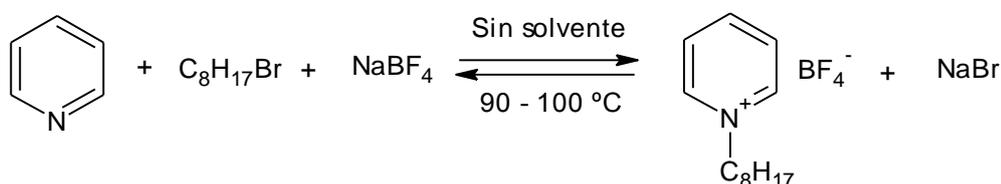


Figura 2.6: Procedimiento esquemático de la síntesis de [C₈pyr][BF₄].

2.5.4. Purificación de los RTILs con catión fosfonio.

Los RTILs con catión fosfonio fueron obtenidos comercialmente (**Sección 2.5.1.**) y lavados con solución alcalina. Se disolvió cada uno de los RTIL en diclorometano (DCM) en una relación 1:4 en tubos cónicos de polipropileno de 14 mL, la solución resultante fue lavada con una alícuota de 1,00 mL de solución de KOH 10⁻⁴ M, se agitó manualmente por 30 seg y luego con un agitador mecánico vortex por 10 min y se centrifugó por 10 min a 10.000 rpm. Se retiró la fase acuosa con ayuda de una pipeta Pasteur. Este procedimiento se realizó por quintuplicado, posteriormente se repitió este procedimiento pero con alícuotas de 1,00 mL de agua MilliQ para eliminar algún resto de solución alcalina (también por un total de 5 veces). La ausencia del anión del líquido iónico proveniente de los reactivos originales fue chequeada por reacción con solución de AgNO₃ 0,05 M en la solución acuosa. Luego, se agregó alrededor de 1 gr de Na₂SO₄ (anhídrido) para eliminar trazas de agua, se agitó con un agitador mecánico vortex por 15 min y se filtró a través de papel de filtro Whatman® 40. La fase orgánica fue concentrada con rotavapor y el RTIL fue secado por 48 hs a 40 °C. Los RTILs purificados fueron utilizados para medir los parámetros de solvente. Alícuotas de distintas moléculas prueba disueltas en DCM (diclorometano) fueron utilizadas para medir dichos

parámetros a 25 °C en un baño termostático utilizando un espectrofotómetro. La máxima longitud de onda obtenida a partir de las diferentes bandas de absorción fue usada para calcular los parámetros de solvente de Kamlet y Taft (π^* , β y α) y el parámetro de polaridad de Reichardt normalizado, E_T^N .

2.5.5. Obtención de los coeficientes de partición.

Las particiones fueron realizadas a cuatro niveles de concentración por triplicado a 25,00±0,05 °C. El coeficiente de partición, $P_{L/a}$, fue obtenido a partir del cálculo de la pendiente, mediante regresión lineal, que surge de graficar $C_{LI}(= C_i - C_a)$ vs. C_a , empleando la **Ecuación 2.18**.

$$P_{L/a} = \frac{C_{LI}}{C_a} = \frac{(C_i - C_a)}{C_a} \quad (2.17)$$

Donde C_a y C_i son las concentraciones de soluto remanente e inicial en la fase acuosa en equilibrio, respectivamente.

El procedimiento experimental fue llevado a cabo de la siguiente manera: una cantidad de soluto conocida (en un rango de concentración entre 1 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$, dependiendo de la solubilidad del compuesto) fue disuelta en 10,0 mL de solución HCl 0,01 M (pH= 2,00). Tanto la solución ácida como cada RTIL fueron previamente presaturadas. La determinación de los respectivos $P_{L/a}$ fueron efectuados en eppendorf de 1,5 mL. Como la medida de volúmenes de RTIL se veía dificultada por la alta viscosidad de los mismos, se procedió a pesar en cada eppendorf entre 20-50 mg utilizando una balanza analítica, tratando de utilizar la mínima cantidad posible de RTIL. Con los datos de densidad a temperatura ambiente, se calculó el volumen de cada líquido iónico. Luego se agregó 10 veces el volumen de solución acuosa que contenía el soluto en cuestión, de modo de obtener una relación de volúmenes constante e igual a 10, ($V_a/V_{LIS} = 10$). Las fases fueron mezcladas manualmente por 30 seg y luego en agitador mecánico vortex por 24 hs, se centrifugó a 10.000 rpm por 15 min y finalmente se termostatóizó en baño de agua a 25,00±0,05 °C por media hora. Este tiempo fue suficiente para permitir alcanzar el equilibrio entre ambas fases. Finalmente, una alícuota de 5 μL de la fase acuosa fue inyectada al sistema HPLC. La concentración de soluto en la fase acuosa, C_a , luego de la extracción, fue determinada de la gráfica de calibración (1-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para cada compuesto. Se prepararon 4 concentraciones iniciales, C_i , diferentes, cada nivel de concentración por triplicado.

Para analitos muy hidrofóbicos, tales como 2-naftol, flurbiprofeno, ketoprofeno, β -estradiol,

etc. que no se observan picos cromatográficos en la fase acuosa luego de la extracción, se tomaron 5 μL del RTIL correspondiente y se inyectaron previa dilución con 25 μL de metanol.

2.5.6. Determinación de los parámetros de solvente.

Para la determinación del parámetro π^* se disolvió 0,0044 g de *N,N*-dietil-4-nitroanilina (pesados con balanza analítica) con DCM, llevándose a volumen en un matraz de 25,0 mL con el mismo solvente. En un tubo cónico de polipropileno de 14 mL se agregó 0,60 mL del RTIL y se homogeneizó con ayuda de un agitador mecánico vortex. El DCM fue eliminado en una estufa de vacío a 40 °C durante 2 hs. Como los RTILs carecen de presión de vapor, estos quedan remanentes en el tubo con la molécula prueba.

Para la determinación del parámetro β se pesó 0,0042 g de 4-nitroanilina y se procedió de la misma manera que para el parámetro π^* .

Para la determinación del E_T^N y el parámetro α , se tomaron 0,60 mL del líquido iónico puro y secado a 50 °C por 5-8 hs, se agregó 0,50 mL de solución del reactivo de Reichardt (dye-30) preparada disolviendo 2,5 mg del reactivo en 5 mL de DCM. Se agitó por 10 min con un agitador mecánico vortex y se eliminó el DCM en una estufa de vacío a 40 °C por 2 hs. Se obtuvo una solución de diferente color del colorante en el líquido iónico, dependiendo de la polaridad de este. Si la solución resultante es incolora significa que la banda de transferencia de la carga desapareció como consecuencia de la protonación del anión fenolato debido a la presencia de moléculas de agua. En este caso, el procedimiento de lavado se repitió tantas veces como sea necesario para eliminar los restos de agua.

2.5.7. Cálculo de los parámetros de soluto y regresiones multiparamétricas de mínimos cuadrados.

Los parámetros de soluto no disponibles en la literatura fueron calculados con el programa ADME Boxes 5.0 (ACD/Labs/Pharma Algorithms Inc., Toronto, Canadá). Las regresiones multiparamétricas de mínimos cuadrados fueron calculadas utilizando Microsoft Office Excel 2007.

2.6. Resultados y discusiones.

2.6.1. Coeficientes de partición, $P_{L/a}$.

Los coeficientes de partición obtenidos con los diferentes RTILs se muestran en las **Tabla 2.3** a **2.6**, con sus respectivos intervalos de confianza. En **Tablas 2.3 y 2.4** se muestran los $P_{L/a}$, algunos de los cuales se emplearán en el “modelo del parámetro de solvatación”, MPS, como *serie de calibración* y *serie de prueba*, respectivamente, para los RTILs con catión imidazolio y piridinio, y en **Tablas 2.5 y 2.6** los respectivos $P_{L/a}$ para los RTILs de fosfonio. Las extracciones se realizaron a pH= 2,00 de manera de extraer a los fenoles y compuestos carboxílicos analizados en su forma neutra. En cambio, algunos compuestos tales como las toluidinas, anilina, cloroanilinas y acetanilida en la *serie de calibración* y acetaminofén y propanolol en la *serie de prueba*, están protonados a ese pH (los pK_a de todos los analitos utilizados se muestran en las respectivas tablas). Los analitos que estadísticamente quedaron incluidos en las regresiones del MPS, fueron todos neutros, exigencia que debe cumplirse en el modelo ya que los parámetros de soluto fueron obtenidos para moléculas neutras.

2.6.1.1. Particiones empleando RTILs con cationes nitrogenados.

Análisis de los compuestos de la serie de calibración (Tabla 2.3):

Para las **aminas** estudiadas (compuestos de 1 a 10), en general se obtuvieron coeficientes de partición con valores entre medianos y altos. Esto puede atribuirse a que las aminas están protonadas al pH experimental, con lo cual existiría una interacción electrostática fuerte con el anión del RTIL. Se puede observar también que los coeficientes de partición obtenidos para el RTIL $[C_6C_1im][PF_6]$ son los más grandes. Sin embargo, si consideramos únicamente las interacciones hidrofóbicas, se esperarían mayores coeficientes de partición para el $[C_8C_1im][PF_6]$. Para los demás compuestos nitrogenados (compuestos de 11 a 15), no se observa una tendencia clara, siendo los $P_{L/a}$ muy pequeños e inferiores a las aminas.

Para el caso de **ácidos y fenoles** en general se observa la siguiente tendencia: $[C_8pyr][BF_4] > [C_8C_1im][BF_4] > [C_8C_1im][PF_6] > [C_6C_1im][PF_6] > [C_4C_1im][PF_6]$. Estos resultados son consistentes con los reportados previamente en la literatura, ya que se planteó una interacción fuerte del tipo puente de hidrogeno entre analitos fenólicos y el ión $[BF_4]^-$ [67, 68]. Sin embargo, en estudios de partición entre $[C_8C_1im][BF_4]$ ó $[C_8pyr][BF_4]$ y agua, la mayor afinidad de analitos donores de

puentes de hidrogeno hacia la fase orgánica fue explicada como debido al mayor grado de solubilidad del agua en estos RTILs, ya que el analito es afín tanto al anión del RTIL como al agua [50].

Respecto de los **analitos no ionizables**, no se puede extraer una conclusión general debido a que no se obtuvieron suficiente número de datos. Sin embargo, los coeficientes de partición para $[C_8C_{1im}][PF_6]$ y $[C_8pyr][BF_4]$, son relativamente altos al igual que para el resto de los analitos estudiados.

Análisis de los compuestos de la serie de prueba (Tabla 2.4):

En este caso, los analitos con catión nitrogenado (**Tabla 2.4**), muestran mayores coeficientes de partición que los de la *serie de calibración*, y se pueden observar tendencias más claras. Para los RTILs con anión $[PF_6]^-$, los coeficientes de partición son mayores para el catión $[C_8C_{1im}]^+$ que es el más hidrofóbico. Por otro lado, para los RTILs con el anión $[BF_4]^-$, se observan valores de $P_{LL/a}$ más altos para el catión $[C_8pyr]^+$. Ahora, si comparamos los RTILs para los cuales se obtienen los $P_{LL/a}$ más altos ($[C_8C_{1im}][PF_6]$ y $[C_8pyr][BF_4]$), prácticamente la mitad de los compuestos es mejor extraído por uno de los RTILs y la otra mitad por el otro. Los altos coeficientes de partición obtenidos para la *serie de prueba*, respecto a la *serie de calibración* puede atribuirse a la elevada hidrofobicidad de dichos compuestos, reflejada en los mayores volúmenes molares (V) y en los mayores $\log P_{oct/w}$ (**Ver Apéndice Tabla 1**).

2.6.1.2. Particiones empleando RTILs con cationes fosfonio.

Análisis de los compuestos de la serie de calibración (Tabla 2.5):

En coincidencia con los RTIL que contienen cationes nitrogenados, no se observa tampoco en este caso una tendencia clara para el caso de las **aminas** (compuestos de 1 a 10), para las que se observan bajos coeficientes de partición (excepto para las nitroanilinas y para la 3,4-dicloroanilina). Para el **resto de los compuestos nitrogenados, ácidos carboxílicos y fenoles** (solutos 11 a 29) se observan altos coeficientes de partición. Los ácidos carboxílicos y fenoles se encuentran neutros al pH de extracción, lo cual favorece la solubilización en la fase orgánica. En todos los casos se observan mayores coeficientes de partición para los RTILs con aniones $[Cl]^-$ y $[Br]^-$. Esto puede

deberse a la formación de puentes de hidrógeno entre los analitos y estos aniones fuertemente aceptores de puente de hidrógeno [69], los cuales tienen una baja relación carga/masa. Este punto se tratará nuevamente en la **Sección 2.7**.

Por otra parte, para los **compuestos sin grupos ionizables** (compuestos 30 a 49) se obtienen también altos coeficientes de partición, siendo en general mayores para los aniones $[\text{NTf}_2]^-$ y $[\text{N}(\text{CN})_2]^-$. Esto puede deberse a que las interacciones dipolares con dichos aniones son más fuertes ya que son más polarizables que los aniones $[\text{Cl}]^-$ y $[\text{Br}]^-$.

Análisis de los compuestos de la serie de prueba (Tabla 2.6):

En este caso, los coeficientes de partición son mayores que los de la *serie de calibración*, independientemente del líquido iónico seleccionado. Aquí también, al igual que lo observado para los RTILs nitrogenados, se lo podría atribuir a la mayor hidrofobicidad de los analitos de la *serie de prueba*. Los mayores coeficientes de partición se obtienen para el anión $[\text{Br}]^-$ y, en el caso de los compuestos con grupos carboxílicos o fenoles (solutos 1 a 6), también para el anión $[\text{Cl}]^-$. Esta tendencia general se observa también para la *serie de calibración*, por lo que las conclusiones que se pueden extraer respecto de cuáles son los RTILs que permiten obtener mayores coeficientes de partición, son similares tanto para la *serie de calibración* como para la *serie de prueba*. Esta generalización no se pudo hacer para el caso de los RTILs con catión nitrogenado.

Es importante mencionar que si bien los coeficientes de partición de la *serie de prueba* en los RTILs con catión nitrogenado son mayores para $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, los valores obtenidos con los líquidos iónicos de fosfonio son en general mayores e incluso se obtienen valores de $P_{L/a}$ infinitos (no se detecta el pico cromatográfico en la fase acuosa luego de la partición). Si bien el $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$ es el que muestra mayores coeficientes de partición, los valores obtenidos con algunos compuestos para $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{N}(\text{CN})_2]$ y para $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Cl}]$ son también muy grandes, lo que los convierte en muy buenos candidatos para extracciones líquido-líquido.

Tabla 2.3: Coeficientes de Partición ($P_{LL/a}$), para la *serie de calibración* en los diferentes RTILs con cationes nitrogenados.

Serie de calibración		Compuestos	pK _a [*]	$P_{LL/a}$			
				[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	[C ₆ C ₁ im][PF ₆]	[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	[C ₈ C ₁ im][BF ₄]
1	<i>m</i> -Toluidina	4,72	4,4(±0,3)	5,2(±0,6)	4,6(±0,1)		0,32(±0,05)
2	<i>o</i> -Toluidina	4,45	4,1(±0,4)	6,5(±0,2)	4,3(±0,3)		0,010(±0,002)
3	<i>p</i> -Toluidina	5,09	4,4(±0,2)	6,4(±0,2)	1,39(±0,03)		0,17(±0,02)
4	Anilina	4,6	2,47(±0,04)	2,05(±0,03)	1,40(±0,08)	1,15(±0,05)	~ 0
5	3-Nitroanilina	2,46	12,1(±0,5)	14,1(±0,3)	11,9(±0,4)	14,1(±0,4)	6,6(±0,1)
6	4-Nitroanilina	1	14,8(±0,9)	32(±2)	18,0(±0,1)	22,2(±0,5)	28(±2)
7	2-Nitroanilina	-0,29					
8	4-Cloroanilina	3,99	24(±1)	31(±2)	0,49(±0,03)		
9	3-Cloroanilina	3,52			0,82(±0,04)	8,9(±0,4)	
10	3,4-Dicloroanilina	2,82 ^a	44(±2)	70(±3)	37,8(±0,8)	55(±1)	18,8(±0,1)
11	Timina	9,94 ^b	0,03(±0,02)	0,04(±0,02)	0,13(±0,03)	0,11(±0,03)	0,11(±0,02)
12	Tiourea	---	0,04(±0,02)		~ 0	0,07(±0,01)	NM
13	Benzamida	---	0,431(±0,005)	0,47(±0,04)	0,42(±0,01)	1,11(±0,05)	NM
14	Acetanilida	---	1,49(±0,05)	2,68(±0,06)	1,98(±0,08)	3,1(±0,1)	1,43(±0,08)
15	Cafeina	14,06 ^c	0,17(±0,03)		0,39(±0,03)	0,27(±0,03)	0,32(±0,01)
16	Ácido-2,6-dimetilbenzoico	3,36	1,65(±0,03)	1,66(±0,07)	~ 0	5,1(±0,2)	6,12(±0,06)
17	Ácido benzoico	4,2		1,35(±0,02)	1,38(±0,01)	4,9(±0,3)	15,7(±0,9)
18	Ácido-4-nitrobenzoico	3,42					15,8(±0,3)
19	Ácido-4-hidroxibenzoico	4,2	0,99(±0,08)		0,33(±0,03)	5,2(±0,3)	NM

Tabla 2.3 (continuación).

20	Fenol	9,97		1,68(±0,04)	1,53(±0,06)		
21	<i>p</i> -Nitrofenol	7,14	3,7(±0,2)	3,3(±0,1)	4,7(±0,4)	12,9(±0,8)	15,7(±0,9)
22	<i>m</i> -Nitrofenol	8,27			7,0(±0,3)		21,72(±0,05)
23	<i>o</i> -Nitrofenol	7,22					
24	2,6-Diclorofenol	6,79 ^a			4,8(±0,1)		53(±4)
25	2,4,6-Triclorofenol	6,42 ^a			3,22(±0,06)		
26	Resorcinol	9,81 ^a	0,33(±0,04)	0,20(±0,03)	0,15(±0,04)	1,90(±0,06)	1,2(±0,2)
27	Catecol	9,83 ^a		0,36(±0,08)	0,27(±0,01)	2,3(±0,1)	
28	2-Naftol	9,94 ^a	39(±4)	50(±9)	60(±1)	178(±35)	
29	<i>o</i> -Hidroxietilresorcinol	---	0,25(±0,05)	0,20(±0,04)	0,27(±0,07)		
30	1,4-Benzoquinona	NI	0,85(±0,02)	0,89(±0,03)	0,20(±0,03)	0,78(±0,05)	
31	Acetofenona	NI	18,4(±0,9)	31,6(±0,6)	20,2(±0,7)	12,91(±0,09)	6,24(±0,04)
32	<i>o</i> -Tolualdehído	NI					11,5(±0,03)
33	<i>m</i> -Tolualdehído	NI					12,99(±0,09)
34	<i>p</i> -Tolualdehído	NI					12,6(±0,2)
35	Benzaldehído	NI					5,15(±0,06)
36	<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldehído	NI					11,5(±0,3)
37	Nitrobenceno	NI			32,16(±0,08)		17,3(±0,3)
38	4-Nitrotolueno	NI			58(±3)		56(±2)
39	2-Nitrotolueno	NI					124(±3)
40	3-Nitrotolueno	NI					41,4(±0,9)

41	2,4-Dinitrofluorobenceno	NI		8,2(±0,4)
42	1,3,5-Trinitrobenceno	NI		50(±2)
43	Benzonitrilo	NI	5,9(±0,3)	
44	Benceno	NI	3,43(±0,04)	
45	Clorobenceno	NI	20(±1)	
46	4-Clorotolueno	NI	24,1(±0,7)	
47	3-Metilanol	NI	79(±1)	
48	4-Metilanol	NI	80(±1)	
49	2-Metilanol	NI	108(±13)	

Datos de la Referencia: * [70]; ^a [71]; ^b [72]; ^c [73]; NM: no medible por co-elución del RTIL; NI: compuesto no ionizables.

Tabla 2.4: Coeficientes de partición ($P_{LI/a}$), para la *serie de prueba* en los diferentes RTILs con cationes nitrogenados.

Serie de prueba		pK _a	$P_{LI/a}$				
			[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	[C ₆ C ₁ im][PF ₆]	[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	[C ₈ C ₁ im][BF ₄]	[C ₈ pyr][BF ₄]
1	Indoprofeno	4,40 ^a			533(±3)		1008(±10)
2	Ibuprofeno	4,58 ^a	2,71(±0,01)	6,16(±0,03)	78,8(±0,9)	27,8(±0,01)	55,81(±0,06)
3	Suprofeno	3,9 ^b	7,96(±0,06)	82,8(±0,7)	887(±6)	76,1(±0,6)	849(±4)
4	Ketoprofeno	4,47 ^a	4,90(±0,03)	123,2(±0,3)	1053(±11)	80,1(±0,2)	853(±10)
5	Fenoprofeno	4,5 ^c	8,7(±0,1)	97,8(±0,6)	697(±5)	85(±1)	749(±5)
6	Fenbufeno	4,43 ^d	2,52(±0,01)	71,3(±0,7)		53,0(±0,4)	
7	Fluorbiprofeno	4,24 ^d	59,5(±0,3)	487(±4)		303,1(±0,9)	
8	β-Estradiol	---	2,024(±0,007)	41,9(±0,2)		67,3(±0,6)	
9	Acetaminofén	9,5 ^c	0,0595(±0,0008)	0,00683(±0,0007)	0,125(±0,003)	0,538(±0,006)	0,84(±0,02)
10	Benzoina	---			224(±2)		236(±3)
11	Cortisona	---	0,0238(±0,0001)	26,8(±0,4)	633(±4)	2,26(±0,004)	123(±2)
12	Hidrocortisona	---	0,1429(±0,00006)	7,82(±0,05)	322(±2)	2,49(±0,02)	155(±2)
13	Benznidazol	---	0,360(±0,002)	28,1(±0,2)	93(±1)	4,30(±0,05)	51,8(±0,7)
14	Propranolol	9,47 ^e	1,744(±0,005)	98,0(±0,3)	603(±8)	27,4(±0,2)	1493(±13)
15	Nifurtimox	---	0,1097(±0,0004)	7,22(±0,07)	22,32(±0,06)	0,655(±0,003)	4,72(±0,06)
16	Metronidazol	2,5 ^f	0,1526(±0,0006)	1,196(±0,002)	0,672(±0,002)	0,544(±0,004)	0,81(±0,03)

Datos de la Referencia: ^a [74]; ^b [75]; ^c [73]; ^d [76]; ^e [77] y ^f [78]; NM: no medible por co-elución del RTIL; NI: compuesto no ionizables.

Tabla 2.5: Coeficientes de Partición ($P_{LI/a}$), para la *serie de calibración* en los diferentes RTILs con catión fosfonio.

Serie de calibración			$P_{LI/a}$			
Compuestos	pK _a [*]	[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Cl]	[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Br]	[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][N(CN) ₂]	[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][NTf ₂]	
1	<i>m</i> -Toluidina	4,72	0,24(±0,06)	0,28(±0,01)	0,24(±0,02)	0,37(±0,06)
2	<i>o</i> -Toluidina	4,45	0,11(±0,04)	0,29(±0,04)	0,41(±0,05)	1,3(±0,1)
3	<i>p</i> -Toluidina	5,09	0,16(±0,01)	0,19(±0,03)	0,22(±0,02)	0,15(±0,03)
4	Anilina	4,6	~ 0	~ 0	17,9(±0,7)	~ 0
5	3-Nitroanilina	2,46	8,9(±0,1)	21(±2)	88(±3)	0,91(±0,04)
6	4-Nitroanilina	1	∞	∞	72,1(±0,5)	20,1(±0,3)
7	2-Nitroanilina	-0,29			199(±5)	
8	4-Cloroanilina	3,99	0,28(±0,04)	0,7(±0,1)		0,05(±0,01)
9	3-Cloroanilina	3,52	0,60(±0,01)	0,784(±0,005)		0,31(±0,02)
10	3,4-Dicloroanilina	2,82 ^a	41(±1)	82(±3)	107(±3)	6,0(±0,3)
11	Timina	9,94 ^b	0,73(±0,04)	0,49(±0,06)	0,002(±0,001)	0,15(±0,03)
12	Tiourea	---	0,63(±0,04)	0,50(±0,04)	NM	~ 0
13	Benzamida	---	3,8(±0,3)	2,4(±0,1)	0,20(±0,02)	0,12(±0,01)
14	Acetanilida	---	26(±1)	30(±1)	0,50(±0,02)	0,89(±0,04)
15	Cafeina	14,06 ^c	0,51(±0,07)	0,41(±0,03)	0,30(±0,04)	0,22(±0,03)
16	Ácido-2,6-dimetilbenzoico	3,36	0,36(±0,04)	~ 0	0,26(±0,01)	0,06(±0,02)
17	Ácido benzoico	4,2	165(±22)	68(±6)		0,86(±0,01)

Tabla 2.5 (continuación).

18	Ácido-4-nitrobenzoico	3,42			27(±2)	
19	Ácido-4-hidroxibenzoico	4,2	∞	∞	NM	0,28(±0,04)
20	Fenol	9,97	134(±6)	128(±4)		1,2(±0,1)
21	<i>p</i> -Nitrofenol	7,14	∞	952(±11)	78(±2)	4,5(±0,3)
22	<i>m</i> -Nitrofenol	8,27	496(±17)	1696(±27)	202(±2)	7,8(±0,1)
23	<i>o</i> -Nitrofenol	7,22		164(±6)	55(±1)	
24	2,6-Diclorofenol	6,79 ^a	542(±3)	18,7(±0,1)		14,4(±0,9)
25	2,4,6-Triclorofenol	6,42 ^a	900(±4)			∞
26	Resorcinol	9,81 ^a	914(±37)	164(±6)		0,15(±0,04)
27	Catecol	9,83 ^a	∞	439(±19)		0,14(±0,04)
28	2-Naftol	9,94 ^a	∞	∞		56(±1)
29	<i>o</i> -Hidroxietilresorcinol	---	43(±3)	40,3(±0,3)		0,15(±0,01)
30	1,4-Benzoquinona	NI	5,82(±0,06)	38,7(±0,7)		0,18(±0,1)
31	Acetofenona	NI	11,1(±0,1)	11,8(±0,3)	7,6(±0,1)	12,1(±0,1)
32	<i>o</i> -Tolualdehído	NI			20,3(±0,8)	
33	<i>m</i> -Tolualdehído	NI				
34	<i>p</i> -Tolualdehído	NI			18,3(±0,9)	
35	Benzaldehído	NI			5,48(±0,07)	
36	<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldehído	NI			13,0(±0,6)	
37	Nitrobenzeno	NI	28(±1)	39,4(±0,9)	24(±2)	33(±1)

38	4-Nitrotolueno	NI	54(±1)	104(±1)	121(±7)	69(±4)
39	2-Nitrotolueno	NI	53,6(±0,3)	101,2(±0,3)	199(±20)	
40	3-Nitrotolueno	NI	55(±1)	100,0(±0,7)	89(±3)	
41	2,4-Dinitrofluorobenceno	NI			21(±1)	
42	1,3,5-Trinitrobenceno	NI			150(±3)	
43	Benzonitrilo	NI	11,3(±0,4)	18(±1)		14,3(±0,1)
44	Benceno	NI		13,7(±0,1)		5,8(±0,4)
45	Clorobenceno	NI		108(±10)		∞
46	4-Clorotolueno	NI	42(±1)	528(±17)		136(±4)
47	3-Metilanol	NI	74(±3)	93(±1)		95(±1)
48	4-Metilanol	NI	67(±3)	95(±7)		100(±3)
49	2-Metilanol	NI	91(±3)	148(±6)		153(±6)

Datos de la Referencia: * [70]; ^a [71], ^b [72], ^c [73]; NM: no medible por co-elución del RTIL; NI: compuesto no ionizables.

Tabla 2.6: Coeficientes de Partición ($P_{LL/a}$), para la *serie de prueba* en los diferentes RTILs con catión fosfonio.

Serie de prueba		pK _a	$P_{LL/a}$			
			[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Cl]	[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Br]	[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][N(CN) ₂]	[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][NTf ₂]
1	Indoprofeno	4,40 ^a	376(±2)	[3331]	[2963]	16,96(±0,02)
2	Ibuprofeno	4,58 ^a	[20791]	[7687]	31,11(±0,02)	8,93(±0,04)
3	Suprofeno	3,9 ^b	1334(±11)	[12416]	[3759]	58,72(±0,06)
4	Ketoprofeno	4,47 ^a	831(±7)	[9825]	[3962]	74,12(±0,06)
5	Fenoprofeno	4,5 ^c	[3785]	[14398]	[2851]	50,6(±0,8)
6	Acetaminofén	9,5 ^c	35,13(±0,06)	136(±2)	0,192(±0,002)	0,07(±0,01)
7	Benzoina	---	73,82(±0,07)	154(±2)	331(±5)	13,92(±0,05)
8	Cortisona	---	23,76(±0,03)	652(±5)	17,45(±0,05)	22,82(±0,06)
9	Hidrocortisona	---	105(±2)	[3215]	19,32(±0,08)	6,92(±0,03)
10	Benznidazol	---	3,06(±0,04)	60,3(±0,7)	25,76(±0,08)	9,77(±0,03)
11	Propranolol	9,47 ^d	220(±2)	156(±2)	973(±7)	5,47(±0,05)
12	Nifurtimox	---	2,35(±0,03)	6,16(±0,05)	0,24(±0,02)	3,58(±0,03)
13	Metronidazol	2,5 ^e	0,772(±0,001)	1,64(±0,02)	0,0512(±0,0004)	0,37(±0,02)

Datos de Referencia: ^a [74]; ^b [75]; ^c [73]; ^d [77] y ^e [78]; NM: no medible por co-elución del RTIL; NI: compuesto no ionizables; valores entre corchetes corresponden a $P_{LL/a}$ calculados utilizando la **Ecuación 2.8.**, tales valores no pudieron ser medidos experimentalmente por su baja concentración en la fase acuosa

En la literatura no se encontraron datos de $P_{LI/a}$ para muchos de los analitos empleados en este trabajo de Tesis. La mayoría de los valores reportados son para analitos volátiles o valores que han sido obtenidos de manera indirecta por diferencia entre el logaritmo del coeficiente de partición líquido iónico (*LI*)/fase gaseosa (*FG*) y el logaritmo del coeficiente de partición agua (*a*)/fase gaseosa ($\log P_{LI/a} = \log P_{LI/FG} - \log P_{a/FG} = \log P_{LI/FG} / P_{a/FG}$). Al comparar los coeficientes de partición de un dado analito, los resultados muestran en muchos casos una gran divergencia tanto entre diferentes publicaciones, como con los valores obtenidos en el presente trabajo. Estas diferencias pueden atribuirse a la variación de la calidad de los datos obtenidos en la literatura, así como también, posibles diferencias en la metodología experimental utilizada para determinar los valores de $P_{LI/a}$, la cual muchas veces no es clara en dichas publicaciones (**Tabla 2.7**). Por ejemplo, si esos coeficientes fueron obtenidos a partir de una sola medida experimental o de varios replicados, si se emplearon uno o varios niveles de concentración inicial o si se obtuvieron o no por regresión lineal entre la concentración del analito en el RTIL vs. la respectiva concentración en agua (como se hizo en este trabajo).

Tabla 2.7: Comparación entre los valores obtenidos de $P_{LI/a}$ para [C₄C₁im][PF₆] con los reportados en la literatura.

Compuesto	Ref. [3]	Ref. [79]	Ref. [30]	Presente trabajo
<i>Anilina</i>	0,33	0,2	----	2,47
<i>Benzamida</i>	4,7	---	0,63	0,43
<i>Ácido-4-hidroxibenzoico</i>	2,3	~20*	----	0,99

*Este valor fue estimado de la gráfica que muestra la referencia citada.

Se compararon los valores de los coeficientes de partición obtenidos con el conocido sistema octanol/agua ($P_{oct/w}$) que se utiliza normalmente como referencia. Los valores de $\log P_{oct/w}$ fueron obtenidos de literatura para la mayoría de los compuestos de la serie de calibración. Para el resto de los compuestos y para los de la *serie de prueba*, se los calculó mediante el programa ADME Boxes 5.0. En la **Figura 2.7** se muestran las gráficas entre los valores experimentales y calculados de $\log P_{oct/w}$ para los RTILs [C₄C₁im][PF₆], [C₆C₁im][PF₆] y [C₈C₁im][BF₄]. Se observa que la mayoría de los puntos están por debajo de la recta de pendiente unitaria (línea de puntos), lo cual indica por un lado, que el *l*-octanol tiene mayor capacidad de solubilización que cualquiera de los RTILs estudiados y por otro, la falta de correlación observada implica que los mecanismos de partición (peso relativo de las diferentes interacciones intermoleculares) son diferentes. Huddleston y col.[79] realizaron comparaciones similares y, si bien encontraron una correlación aceptable para una serie

limitada de 19 compuestos orgánicos, observaron que los $\log P_{oct/w}$ eran hasta un orden de magnitud mayores que en los sistemas bifásicos RTIL/agua.

También se observa de la **Figura 2.7** que para analitos próticos tales como ácidos orgánicos y fenoles, los valores de $\log P_{L/a}$ son menores que los $\log P_{oct/w}$, mientras que para las aminas, en general se observan coeficientes de partición más parecidos entre ambos sistemas, o incluso mayores. Carda-Broch y col. obtuvieron resultados similares al comparar el comportamiento de 38 compuestos en los sistemas $[C_4C_{1im}][PF_6]/$ agua y *I*-octanol/agua. Lo atribuyeron a la mayor basicidad por puente H del *I*-octanol, lo cual implicaría que la basicidad del anión del RTIL podría estar fuertemente disminuida por la presencia del catión, lo cual hace suponer que al menos algunos RTILs son líquidos fuertemente asociados (fuerte interacción anión-catión) [3].

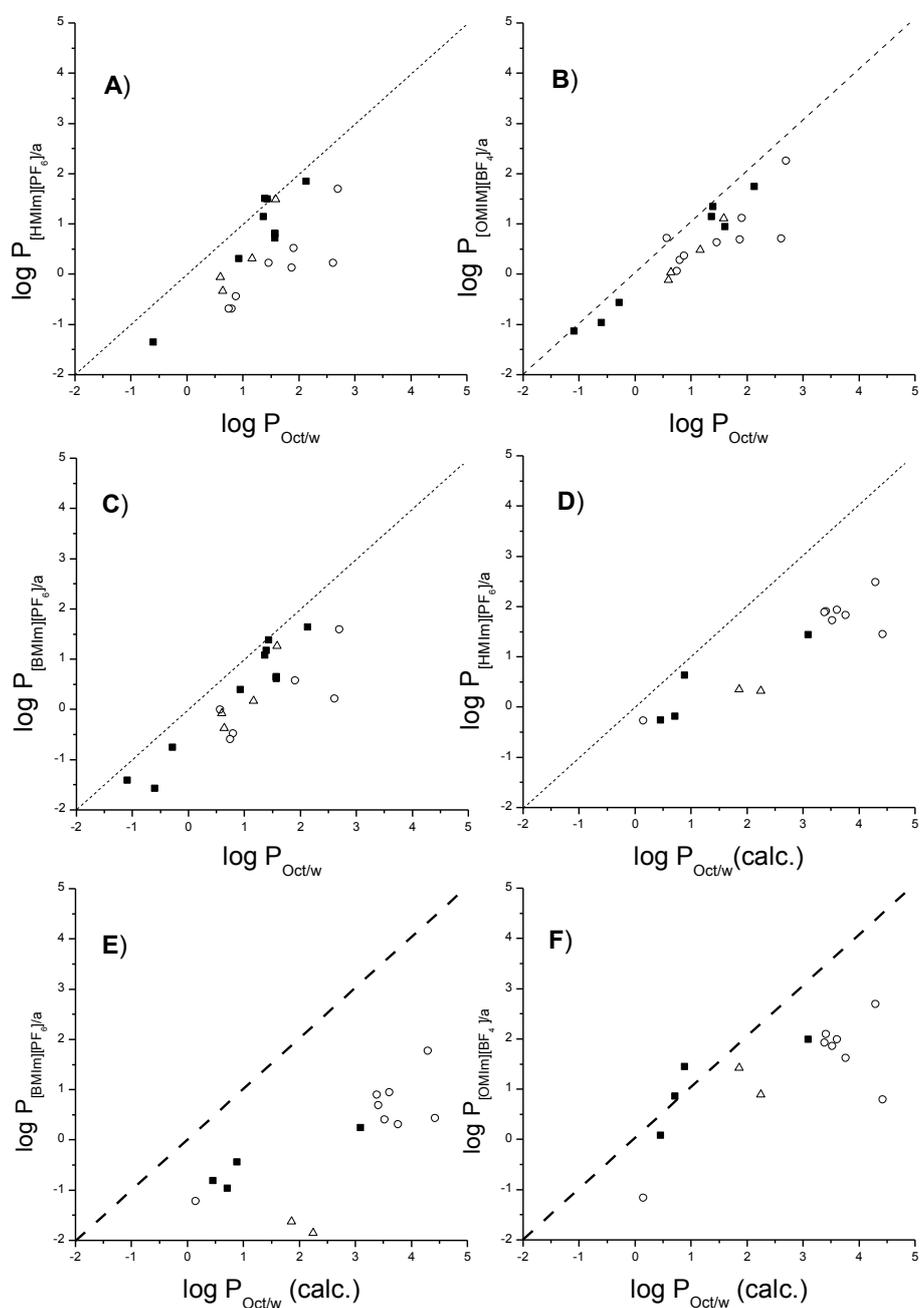


Figura 2.7: Comparación entre $\log P_{LI/a}$ y $\log P_{Oct/w}$ (la línea de puntos indica igual mecanismo de partición) ■ – aminas; ○ – ácidos carboxílicos; △ – compuestos no ionizables. *Serie de calibración:* gráficos A, B y C; *Serie de prueba:* gráficos D, E y F.

2.7. Parámetros de solvente obtenidos para los RTILs estudiados.

Como se explicó en la **Sección 2.2**, los coeficientes de la **Ecuación 2.8** correspondiente al “Modelo del Parámetro de Solvatación” (MPS) reflejan la propiedad complementaria al parámetro al cual se asocia, es decir, diferencia entre los parámetros complementarios correspondientes al líquido iónico y al agua. En la **Sección 2.8** se explicará más detalladamente este punto (**Ecuaciones 2.18 y 2.19**). Por lo tanto, se hace necesario tener una medida cuantitativa de los parámetros complementarios de polaridad, acidez y basicidad por puente H para los diferentes RTILs, ya que los parámetros correspondientes al agua son conocidos. Para ello, se midieron los parámetros empíricos de solvente β (capacidad aceptora de H), α (capacidad donora de H), π^* (polaridad-polarizabilidad) y el parámetro de polaridad de Reichardt normalizado (E_T^N), debido a que con este parámetro, combinados con los valores de π^* obtenidos para un dado RTIL, se obtuvieron los diferentes valores de α (capacidad donora de H). Los diferentes parámetros se obtuvieron empleando las **Ecuaciones 2.12, 2.14 y 2.15**. En **Tabla 2.8** se muestran los correspondientes valores para los RTILs estudiados, así como también para tres solventes orgánicos cuyos parámetros se conocen a fin de utilizarlos como control.

Para los RTILs con cationes nitrogenados, los valores obtenidos son muy próximos a los reportados por otros autores, lo cual valida tanto el método experimental utilizado para obtener los parámetros como el método de purificación de los líquidos iónicos utilizados. Con respecto a los RTILs de fosfonio, sólo hay una publicación en la que se emplea el MPS [80], pero los aniones utilizados (alanato y valinato) son muy diferentes a los de este trabajo. Los valores promedio reportados en dicho trabajo son: 0,95 para el parámetro π^* , 1,2 para β y 0,8 para α . Los valores de β y π^* concuerdan con los de la **Tabla 2.8**, pero los valores de α obtenidos son mayores, lo cual indica una mayor acidez por puente H para los aniones estudiados en este trabajo.

2.7.1. Parámetro π^* .

Como puede observarse en la **Tabla 2.8**, la polaridad-polarizabilidad medida a través de este parámetro es un poco mayor para los RTILs con catión nitrogenado que para los de fosfonio. Esto podría atribuirse a los anillos aromáticos del catión imidazolio. Los valores obtenidos son muy similares a los reportados por otros autores [81], siendo en algunos casos tan polares como el agua ($\pi^*= 1,09$). Los RTILs de fosfonio estudiados son menos polares que el agua, pero un poco más polares que, por ej., el acetonitrilo o el etanol.

2.7.2. Parámetro β .

Se observa que la basicidad obtenida para los RTILs con catión nitrogenado es moderada, siendo similar al del acetonitrilo y al acetato de etilo. Los RTILs de fosfonio tienen una mayor capacidad de aceptar hidrógeno, incluso mayor que el agua. Estos resultados concuerdan con los reportados por Breitbach y Armstrong, quienes concluyen que la basicidad de los líquidos iónicos es una de las interacciones más importantes con los diferentes analitos [85]. En su trabajo este comportamiento fue atribuido al anión cloruro, el cual por su alta relación carga/masa es un muy buen aceptor de H.

En el caso de los RTILs de fosfonio, el indicador utilizado para medir el parámetro β , la 4-nitroanilina, solo puede formar puentes de hidrógeno con los aniones del líquido iónico. Los valores de β para $[(C_6)_3C_{14}P][Cl]$ y $[(C_6)_3C_{14}P][Br]$ son mayores a los correspondientes valores para $[(C_6)_3C_{14}P][N(CN)_2]$ y $[(C_6)_3C_{14}P][NTf_2]$. Dado que el catión es el mismo y todos los aniones son monovalentes, se concluye que Cl^- y Br^- son los responsables de la mayor basicidad observada, lo cual concuerda con el trabajo de Breitbach y Armstrong mencionado anteriormente.

En el caso de los RTILs nitrogenados, β refleja las contribuciones tanto del anión como del catión. El aumento del parámetro β con el largo de la cadena alquílica del catión para el caso de los 3 primeros RTILs de la **Tabla 2.8** que tienen en común el mismo anión PF_6^- , sería inconsistente con la intuición química, salvo algún posible efecto inductivo que aumente con el tamaño de la cadena lo cual incrementa la capacidad aceptora de puente H. Si comparamos la basicidad entre el $[C_8C_1im][PF_6]$ y el $[C_8C_1im][BF_4]$, se podría decir que, dentro del error experimental son similares.

2.7.3. Parámetro α .

Los valores de α de los RTILs con catión nitrogenado oscilan entre 0,52 y 0,64, lo que muestra que la capacidad donora de puente hidrógeno es moderada. Para los derivados de imidazolio, esa capacidad puede atribuirse al átomo de H ubicado en posición α entre los dos N del anillo (**Figura 2.8**). Este átomo de H es lo suficientemente ácido como para permitir la formación de un carbeno frente a una base fuerte [69]. Recientemente, Skarmoutsos y col. mostraron que también los H de los grupos alquilo, ubicado en posición α al nitrógeno de *l*-butil y *l*-etil-3-metilimidazolio tienen un rol significativo en la red de enlaces de puente de hidrógeno, y que un gran porcentaje de cloruros se coordinan con múltiples cationes por medio de dichos hidrógenos [86].

Por otra parte, la capacidad donora de hidrógeno de los RTILs de fosfonio es muy baja, los valores de α oscilan entre 0,17 y 0,26, cercanos al correspondiente valor del acetonitrilo [59]. Breitbach y Armstrong usaron el MPS y obtuvieron coeficientes LSER que muestran que dichos RTILs tienen una cierta capacidad donora de puente H ($b \neq 0$) pero consideraron que esta observación va en contra de lo esperado intuitivamente. Si analizamos la estructura química de la **Figura 2.8.a**, no parece haber hidrógenos ácidos. Sin embargo, este comportamiento “extraño” podría explicarse si se tiene en cuenta la “acidez por puente de H” de los H α . Esta propiedad es la base para la reacción de Wittig [87], la cual lleva a la formación del carbeno $-P(-HC)R$ en presencia de una base fuerte como CO_3^- .

Table 2.8: Parámetros de solvente de los RTILs estudiados y de algunos solventes polares obtenidos de literatura.

RTILs	E_T^N	π^*	α	β
[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	0,662±0,004(0,669) ^a	1,03±0,04(1,032) ^a	0,64±0,02(0,634) ^a	0,21±0,02(0,207) ^a
[C ₆ C ₁ im][PF ₆]	0,654±0,002(0,66) ^b	1,01±0,03(1,02) ^b	0,62±0,02(0,63) ^b	0,22±0,03(0,24) ^b
[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	0,628±0,004 (0,633) ^c	0,87±0,04(0,88) ^c	0,58±0,03 (0,58) ^c	0,45±0,04 (0,46) ^c
[C ₈ pyr][BF ₄]	0,604±0,005 (0,606) ^d	0,97±0,03 (0,974) ^d	0,52±0,05 (0,535) ^d	0,33±0,03 (0,340) ^d
[C ₈ C ₁ im][BF ₄]	0,642±0,004(0,65) ^b	0,96±0,03(0,98) ^b	0,60±0,03(0,62) ^b	0,39±0,04(0,41) ^b
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Cl]	0,444±0,005	0,87±0,04	0,27±0,03	1,56±0,03
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Br]	0,397±0,007	0,87±0,05	0,17±0,04	1,57±0,05
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][N(CN) ₂]	0,433±0,006	0,93±0,05	0,20±0,03	1,36±0,05
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][NTf ₂]	0,420±0,003	0,89±0,03	0,20±0,02	1,24±0,04
<i>Etanol</i>	0,657±0,002 (0,654) ^e	0,60±0,05 (0,54) ^e	0,91±0,06 (0,86) ^e	0,75±0,03 (0,75) ^e
<i>Acetato de etilo</i>	0,23 ^e	0,55 ^e	0,00 ^e	0,45 ^e
<i>Acetonitrilo</i>	0,478±0,004 (0,459) ^e	0,78± 0,04(0,75) ^e	0,22±0,04 (0,19) ^e	0,37±0,03 (0,40) ^e
<i>Agua</i>	1,00 ^e	1,09 ^e	1,17 ^e	0,47 ^e

Datos de Referencia: ^a [82]; ^b [83]; ^c [84]; ^d [80]; ^e [59].

2.7.4. Parámetro E_T^N .

La “polaridad” de los RTILs con catión nitrogenado, medida a través del parámetro de Reichardt E_T^N oscila entre 0,6 y 0,66, cercana al valor para el etanol. Esto concuerda con los valores de E_T^N para sales de *1*-metil-3-alquilimidazolio [RC₁im][X] (0,53-0,75) y sales de piridinio (0,63-0,69) reportados en la literatura [58]. Puede observarse que a medida que crece el largo de las

cadenas alquílicas unidas al anillo de imidazolio, los valores de E_T^N , π^* y α disminuyen. Este comportamiento es el esperado para cualquier solvente, ya que el aumento de las cadenas alquílicas disminuyen su polaridad.

Para los RTILs de fosfonio, los valores de E_T^N son moderados, cercanos a los de la acetona ($E_T^N = 0,35-0,44$) [58], tomando valores entre 0,39 y 0,44, lo que está de acuerdo con los valores reportados por otros autores para sales de tetraalquilfosfonio.

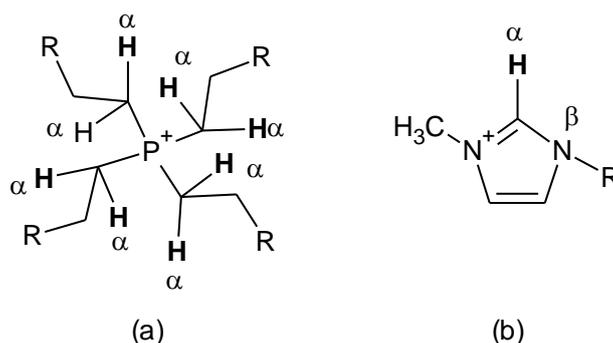


Figura 2.8: Átomos con capacidad donora y aceptora de puente H del catión tetraalquilfosfonio (a) y del catión dialquilimidazolio (b).

2.8. Construcción del “Modelo del Parámetro de Solvatación” (MPS).

Como se ha comentado en la **Sección 2.2**, el MPS, (**Ecuación 2.8**) se empleó en la literatura para determinar los coeficientes LSER para los sistemas $[C_6C_{1im}][PF_6]/\text{agua}$ y $[C_4C_{1im}][PF_6]/\text{agua}$ [3,32] por medio del contacto directo entre agua y líquido iónico, *sin saturar mutuamente las fases*. Cuando se compararon las desviaciones estándar de las regresiones (SD) y los coeficientes de determinación (r^2) para las ecuaciones multiparamétricas obtenidas, se obtuvieron resultados muy variados entre los nuestros y la literatura [88, 89, 3]. En algunos casos estos indicadores fueron bastante pobres y en otros fueron aceptables o buenos, pero hubo correlación entre las variables independientes, es decir entre los parámetros de soluto (“correlación cruzada”, ver **Sección 2.2**). Las diferencias en los resultados obtenidos entre diferentes autores se pueden adjudicar a varias razones, por ejemplo la baja calidad de las medidas experimentales utilizadas [81, 25], el empleo de menos de 4 solutos por parámetro al momento de hacer las regresiones, la existencia de “correlación cruzada” [3] y el empleo de solutos que estén ionizados al pH de trabajo, entre otras razones.

Estas deficiencias impiden obtener un modelo LSER robusto, aplicable a cualquier sistema, es decir, un modelo en el cual los coeficientes determinados no dependan de los analitos seleccionados en la serie de calibración, que posean significado químico y que no sean meras constantes de una regresión, y por lo tanto, no es posible predecir satisfactoriamente los coeficientes de partición. Vitha y Carr [25] han establecido una serie de recomendaciones para obtener un modelo LSER estadística y químicamente válido: **1)** los solutos de la serie de calibración deben ser químicamente variados, es decir, poseer parámetros de soluto lo más diferentes posible. En este estudio, los parámetros varían desde 0,7 a 1,5 para el parámetro de soluto **E**; 0,5 a 2,4 para el parámetro **S**; 0 a 1,1 para **A**, 0,1 a 1,3 para **B** y 0,5 a 1,4 para **V**; **2)** la propiedad a ser modelada debería variar al menos en un orden de magnitud, es decir, que para el caso de la propiedad “log $P_{LI/a}$ ”, el valor de $P_{LI/a}$ debe variar al menos 10 veces. Este requisito es logrado eligiendo analitos con propiedades fisicoquímicas diferentes (polaridad, hidrofobicidad, capacidad donora de H, etc.). Los $P_{LI/a}$ determinados en el presente trabajo se encuentran en un rango de casi cinco órdenes de magnitud; **3)** los parámetros de soluto no deben presentar una correlación significativa. Valores de covarianza de entre 0,5 y 0,6 son considerados bastante altos y valores superiores a 0,7 son considerados inaceptables. En este estudio, la covarianza entre parámetros de soluto fue prácticamente nula, siendo el mayor valor de 0,3822 para el coeficiente de regresión entre los parámetros **S** y **E** de la serie de calibración que se empleó en las particiones con $[C_8C_{1im}][BF_4]$; **4)** se necesitan por lo menos 4 solutos por cada coeficiente a determinar, dando un total de 20 analitos debido a que el modelo incluye 5 parámetros, por lo que en este trabajo fueron utilizados entre 20 y 25 compuestos para generar los MPS para cada RTIL. El cumplimiento simultáneo de estos cuatro requisitos puede ser muy difícil, ya que el método experimental de análisis además requiere que los solutos se repartan significativamente entre la fase agua y la fase LI de manera de obtener concentraciones cuantificables en ambas fases luego del equilibrio de reparto (o que la diferencia entre la concentración inicial y final en una de las fases sea cuantificable) para no obtener un $P_{LI/a} = 0$ o infinito y, por lo tanto, que no se pueda disponer de un valor finito utilizable en la regresión multiparamétrica. Además, es importante destacar que los parámetros de soluto se conocen (o se pueden calcular) para *analitos neutros*, por lo que los estudios de partición en este caso se deben realizar a pHs que aseguren que no hay ionización.

Los coeficientes del MPS obtenidos mediante la **Ecuación 2.8** se muestran para los nueve RTILs estudiados en la **Tabla 2.10**. En todos los casos se observan buenos coeficientes de regresión y bajas desviaciones estándar. Dichos coeficientes obtenidos mediante el MPS muestran una similitud (en magnitud relativa) con los obtenidos típicamente para fases estacionarias en RPLC con

fases móviles acuosas. En **Tabla 2.10** se muestran los coeficientes del MPS para dos fases estacionarias típicas [25]. Esta similitud se podría deber a que ambos sistemas contienen una fase orgánica y una fase acuosa, es decir en ambos sistemas el soluto se reparte entre dos fases, y también las interacciones dominantes en el proceso de partición en ambos sistemas son relativamente parecidas. Por ejemplo, la capacidad aceptora de puentes de hidrógeno (término b negativo) y el término combinado de interacciones dispersivas-formación de la cavidad (término v positivo) son las principales contribuciones en ambos sistemas. La mayor diferencia entre ambos es la magnitud del parámetro e del sistema LI/a. En la **Tabla 2.10** también se muestran los coeficientes para el sistema 1-octanol/agua como sistema de referencia conocido. Si se comparan dichos coeficientes con los demás sistemas bifásicos de la Tabla, se observan grandes diferencias fundamentalmente en el coeficiente a y e , lo que muestra que el mecanismo de partición en el sistema octanol/agua es muy diferente al correspondiente mecanismo en los sistemas formados por RTILs.

Por otro lado, los coeficientes del MPS contienen información química sobre la importancia relativa de cada tipo de interacción del analito con ambas fases, como se dijo en la **Sección 2.2**. Estos coeficientes reflejan la propiedad complementaria al parámetro de soluto que se está modelando, siendo esa propiedad una diferencia entre las interacciones que se establecen en ambas fases, como se muestra en la **Ecuación 2.18**.

$$\text{[REDACTED]} \quad (2.18)$$

Los subíndices “ LI ” y “ a ” denotan las fases líquido iónico (saturado en agua) y agua (saturada en líquido iónico), respectivamente. Los coeficientes a' , $b's'$, v' y e' son meros parámetros de ajuste. M. Reta y col. [27] propusieron desdoblar al término $v'(v_{LI} - v_a)V$ en dos componentes, uno que refleja las interacciones dispersivas y otro, la formación de la cavidad en el solvente:

$$\text{[REDACTED]} \quad (2.19)$$

Aquí σ denota una medida de la energía necesaria para formar la cavidad en el solvente, mientras que D representa la susceptibilidad del solvente para interactuar por medio de fuerzas de London. El parámetro σ podría ser modelado, por ejemplo, por el parámetro de solubilidad de Hildebrand, δ_H^2 [27]. Lamentablemente, estos valores se encuentran disponibles en bibliografía para pocos LIs, mientras que para el parámetro D , no hay hasta el presente ningún parámetro que mida su valor. Sin

embargo, la **Ecuación 2.19** es útil para explicar los valores del coeficiente ν obtenido, como se verá más adelante.

2.9. Evaluación del “Modelo del Parámetro de Solvatación” (MPS).

Coefficiente ν : refleja la cohesividad (σ) y la fuerza de las interacciones dispersivas (D) entre la fase RTIL y la acuosa. El término νV de la **Ecuación 2.8** puede ser expresado como $M(\nu_{LI} - \nu_a)V = M_1(\sigma_a - \sigma_{LI})V + M_2(D_{LI} - D_a)V$ (**Ecuación 2.19**). Como se observa en la **Tabla 2.10**, los coeficientes ν obtenidos son *grandes y positivos*. Según el MPS, esto indicaría, por un lado, que el RTIL es menos cohesivo y más polarizable que el agua y, por el otro, que las interacciones dispersivas con el RTIL son mayores que con el agua. Si se comparan los valores del parámetro de solubilidad, δ_H , para RTILs (**Tabla 2.9**) con el del agua ($\delta_H = 47,9 \text{ J}^{1/2} \text{ cm}^{-3/2}$), se observa que aquellos son menos cohesivos, lo cual es consistente con la conclusión anterior. Además, al contener los RTILs un ión orgánico, necesariamente aumentan las interacciones dispersivas. Por ejemplo, si se compara el coeficiente ν para $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, $[\text{C}_6\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$ y $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, se puede observar que aquel aumenta al crecer la cadena alquílica del catión. Esto se debe un aumento en las interacciones dispersivas y a una disminución de la cohesividad, como puede observarse de los valores de **Tabla 2.9**.

Tabla 2.9: Valores de parámetros de Hildebrand para diferentes LIs (disponibles a diferentes temperaturas).

RTILs	δ_H (MPa ^{1/2})
$[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Cl}]$	19,9 (30 °C) ^a
$[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{NTf}_2]$	18,7 (30 °C) ^a
$[(\text{C}_4)_3\text{C}_{16}\text{P}][\text{Br}]^b$	21,7 (100 °C)
$[(\text{C}_1)_3\text{C}_{18}\text{N}][\text{Cl}]^b$	26,4 (100 °C)
$[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$	29,8/ 30,2 (25 °C) ^c
$[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{BF}_4]$	24,2 (25 °C) ^c
$[\text{C}_6\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$	28,6 (25 °C) ^c
$[\text{C}_6\text{C}_1\text{im}][\text{BF}_4]$	23,3 (25 °C) ^c
$[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$	27,8 (25 °C) ^c
$[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{BF}_4]$	22,5 (25 °C) ^c

Datos de las referencia: ^a [92]; ^b [93]; ^c [94].

Tabla 2.10: Coeficientes del MPS obtenidos mediante la **Ecuación 2.8** a 25 °C.

RTILS	<i>v</i>	<i>b</i>	<i>a</i>	<i>s</i>	<i>e</i>	<i>c</i>	<i>N</i>	<i>SD</i>	<i>r</i>²
[C ₄ C _{1im}][PF ₆]	1,3±0,3	-3,3±0,1	-1,2±0,1	-0,5±0,1	1,0±0,2	0,9±0,3	21	0,16	0,98
[C ₆ C _{1im}][PF ₆]	2,1±0,3	-2,9±0,2	-1,8±0,1	-0,2±0,1	1,4±0,2	-0,3±0,3	21	0,16	0,97
[C ₈ C _{1im}][PF ₆]	3,5±0,3	-3,3±0,2	-1,4±0,1	-0,2±0,1	1,0±0,2	-1,4±0,3	25	0,16	0,97
[C ₈ C _{1im}][BF ₄]	1,9±0,3	-2,8±0,2	-0,3±0,2	-0,5±0,2	1,2±0,3	-0,1±0,3	20	0,2	0,96
[C _{8pyr}][BF ₄]	2,5±0,3	-2,7±0,2	-0,3±0,1	-0,7±0,2	2,2±0,4	-1,4±0,4	20	0,14	0,97
[(C ₆) ₃ C _{14P}][Cl]	3,5±0,4	-2,6±0,2	1,5±0,2	-1,1±0,2	---	0,0±0,4	20	0,19	0,96
[(C ₆) ₃ C _{14P}][Br]	3,6±0,3	-3,5±0,1	1,8±0,1	-0,2±0,1	---	-0,6±0,2	20	0,13	0,99
[(C ₆) ₃ C _{14P}][N(CN) ₂]	3,5±0,6	-5,3±0,2	-0,4±0,2	-0,8±0,2	3,5±0,4	-2,2±0,4	20	0,16	0,99
[(C ₆) ₃ C _{14P}][NTf ₂]	2,7±0,4	-3,4±0,2	-1,5±0,1	0,4±0,1	---	-0,4±0,4	21	0,19	0,97
<i>I</i>-octanol/agua^a	3,81	-3,46	0,03	-1,05	0,56	0,09			
RPLC (C18) (ACN/agua)^b	1,62±0,05	-1,77±0,06	-0,54±0,04	-0,32±0,03	0 ^a	-0,23±0,05		0,03	0,99
RPLC (C8) (ACN/agua)^c	1,47±0,03	-1,71±0,04	-0,41±0,04	-0,25±0,03	0 ^a	-0,28±0,03		0,06	0,99

Datos de las Referencias: ^a *I*-octanol/agua [30]; ^b Coeficientes para el sistema RPLC (C18), ACN/agua, 50:50 [90]; ^c Coeficientes para el sistema RPLC (C8), ACN/agua, 50:50 [91].

Por otro lado, como se observa en la **Tabla 2.10** el coeficiente ν es menor para $[\text{C}_8\text{C}_{14}\text{im}][\text{BF}_4]$ que para $[\text{C}_8\text{C}_{14}\text{im}][\text{PF}_6]$, lo cual indicaría que el anión $[\text{BF}_4]^-$ genera un solvente más cohesivo o bien, que las interacciones dispersivas son más débiles con dicho anión. Lamentablemente como ya hemos comentado, los parámetros de solubilidad de Hildebrand no se encuentran disponibles para la totalidad de los RTILs estudiados y tampoco se conoce a la actualidad ningún parámetro que refleje solamente las interacciones dispersivas, lo cual dificulta o imposibilita extraer conclusiones precisas a partir de los valores del coeficiente ν .

Para el caso de los RTILs de fosfonio se observa que tienen valores más bajos de δ_H que los RTILs con catión nitrogenado, lo que hace que la diferencia $(\sigma_a - \sigma_{LI})$ sea mayor. Además, debido al largo de las cuatro cadenas alquílicas del fosfonio, se espera que las interacciones dispersivas sean muy importantes. Esto es consistente con los valores obtenidos para el coeficiente ν mostrados en **Tabla 2.10**.

Coeficiente b: refleja la acidez por puente H del medio, con el soluto actuando como aceptor, y puede expresarse como $b = (\alpha_{LI} - \alpha_a)$. Los coeficientes b obtenidos son *negativos* y *grandes*, indicando que la fase LI es menos ácida que la acuosa. Esta observación está de acuerdo con el parámetro α de Kamlet-Taft para estos RTILs, cuyos valores oscilan entre 0,58 y 0,64 (**Tabla 2.8**) para los RTILs con catión nitrogenado y entre 0,17-0,27 para los RTILs con catión fosfonio, mientras que el α del agua es de 1,17. Como se dijo anteriormente, la baja acidez de los RTILs con catión nitrogenado ha sido asignada al H- α al átomo de nitrógeno del imidazolio [82, 95], mientras que la acidez de los RTILs con catión fosfonio, que es aún menor, se la puede atribuir al H- α al átomo de fósforo. Hay que considerar que la acidez de la fase RTIL puede aumentar por la presencia de agua disuelta.

Coeficiente a: refleja la basicidad por puente H, con el soluto actuando como donador, por lo que puede expresarse como $a = (\beta_{LI} - \beta_a)$. Para los RTILs con catión nitrogenado, el coeficiente a es negativo, indicando que la fase LI tiene una menor basicidad que el agua. Este resultado está de acuerdo con los parámetros β de Kamlet y Taft obtenidos en este trabajo (ver **Tabla 2.8**). Con respecto a los RTILs con catión fosfonio, el coeficiente a es positivo para $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Cl}]$ y $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$ y negativo para $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{N}(\text{CN})_2]$ y $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{NTf}_2]$. De los valores de β obtenidos, el coeficiente a debería ser siempre positivo para estos RTILs. La solubilidad mutua de agua en el RTIL y del RTIL en agua podría ser parte de la explicación de este resultado, ya que la presencia de RTIL en el agua aumenta su basicidad y viceversa.

La basicidad por puentes de hidrógeno puede atribuirse a la carga negativa del anión, pero en el caso de los RTILs con catión nitrogenado, también al catión, como se dijo anteriormente. Comparando los diferentes RTILs, cuyos cationes nitrogenados sólo difieren en el número de carbonos de las cadenas alquílicas laterales, se observa que las variaciones del coeficiente α se deben principalmente a la diferente basicidad de sus aniones. Es posible llegar a la misma conclusión analizando los valores de α para los RTILs con catión fosfonio estudiados. De acuerdo a los resultados obtenidos se puede establecer un orden de basicidad para los aniones: $[\text{Br}]^- > [\text{Cl}]^- > [\text{N}(\text{CN})_2]^- > [\text{NTf}_2]^-$. Esto puede explicarse por la disminución de la relación carga/masa de estos iones. Breitbach y Armstrong obtuvieron el mismo orden de basicidad con los aniones $[\text{Cl}]^-$, $[(\text{CN})_2]^-$ y $[\text{NTf}_2]^-$ que formaron parte de las fases estacionarias empleadas en cromatografía gaseosa [85].

Los coeficientes α para los dos RTIL con catión nitrogenado conteniendo el anión $[\text{BF}_4]^-$ son idénticos, es decir que la basicidad (β) debería ser igual, lo cual está bastante de acuerdo con los valores obtenidos en la **Tabla 2.8**. Por otro lado, los valores de dichos coeficientes son bajos (en valor absoluto), lo cual indica que la basicidad, aunque menor a la del agua, es similar. Para los tres RTIL con catión imidazolio y anión $[\text{PF}_6]^-$, los valores absolutos del coeficiente α son superiores a los obtenidos para el anión $[\text{BF}_4]^-$, debido a que poseen valores de β en general, más chicos.

Coficiente s : refleja las interacciones de polaridad-polarizabilidad entre el solvente y el soluto, y se expresa como $s = (\pi^*_{LI} - \pi^*_a)$. Exceptuando al $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Cl}]$, el coeficiente s es pequeño y negativo, mostrando que los RTILs son algo menos polares que el agua, de acuerdo con lo reportado por otros autores [81]. También es consistente con los valores de π^* obtenidos que se muestran en **Tabla 2.8**. Debido al carácter iónico de los RTILs se esperaba una polaridad mayor a la del agua. Esto nuevamente podría mostrar el carácter de líquidos asociados de estos nuevos solventes.

Coficiente e : refleja la polarizabilidad a través de pares de electrones libres (n) y electrones π con el sistema bifásico, y puede ser expresado como $e = (e_{LI} - e_a)$. Para todos los RTILs con catión nitrogenado y, en el caso de los RTILs de fosfonio, para el $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{N}(\text{CN})_2]$, este coeficiente es positivo y grande mostrando que son mucho más polarizables que el agua. En el caso de los RTILs nitrogenados, la interacción puede ocurrir sólo a través del catión (electrones libres del átomo de N y electrones π de los anillos aromáticos) ya que los aniones respectivos ni el catión $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}]^+$ presentan electrones n ni electrones π . En el caso del RTIL de fosfonio mencionado, el anión dicianoimida parece tener una gran

contribución en el coeficiente e , debido a sus electrones n y π . Podría esperarse, por lo tanto que el anión NTf_2^- presente interacciones similares. Sin embargo, el coeficiente cero obtenido mostraría que la polarizabilidad de este anión es mucho menor a la del $[\text{N}(\text{CN})_2]^-$.

2.10. Evaluación de las ecuaciones del MPS obtenidas: análisis de residuos y predicción de los $P_{LI/a}$ para la serie de prueba.

La calidad de las regresiones multiparamétricas obtenidas no fue evaluada simplemente por los coeficientes de determinación (r^2) y sus desviaciones estándar (SD), sino que se utilizaron otros dos procedimientos adicionales: *i*) la predicción del $\log P_{LI/a}$ por medio de las ecuaciones obtenidas para una serie de prueba químicamente diferente a la serie de calibración y su comparación con valores experimentales. *ii*) el análisis de los residuos (diferencia entre los $\log P_{LI/a}$ predichos por el modelo y los experimentales) *vs* un número arbitrario asignado a cada soluto de prueba. Si la serie tiene un “buen comportamiento” (ausencia de interacciones no previstas por el modelo, etc.) y las diferencias son al azar (sólo errores experimentales indeterminados), las gráficas deberían lucir como una distribución de puntos alrededor del cero de manera aleatoria. Así, este tipo de gráficas permite detectar puntos que se alejan más de lo esperado con respecto al promedio (outliers) lo que puede indicar la presencia de errores experimentales determinados (datos mal medidos) o algún tipo de interacción del analito en cuestión que no ha sido modelada por la **Ecuación 2.8**.

Los gráficos de residuos se muestran en la **Figura 2.9**. Se observa en todos los casos una distribución aleatoria de los errores en torno al cero, demostrando la ausencia de errores experimentales sistemáticos y efectos no modelados.

Por otro lado, la comparación de los valores de $\log P_{LI/a}$ predichos con los experimentales, es la forma más directa de probar la capacidad predictiva del modelo. La **Figura 2.10** muestra una gráfica de dichos valores para la serie de prueba. Las desviaciones estándar (SD) obtenidas son bajas (0,040 para $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, 0,072 para $[\text{C}_6\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, 0,065 para $[\text{C}_4\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, 0,095 para $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{BF}_4]$, 0,036 para $[\text{C}_8\text{pyr}][\text{BF}_4]$, 0,055 para $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Cl}]$, 0,108 para $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$, 0,051 para $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{N}(\text{CN})_2]$ y 0,030 para $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{NTf}_2]$) indicando que las predicciones son muy buenas y el modelo es químicamente significativo y robusto, adecuado para la predicción de $P_{LI/a}$.

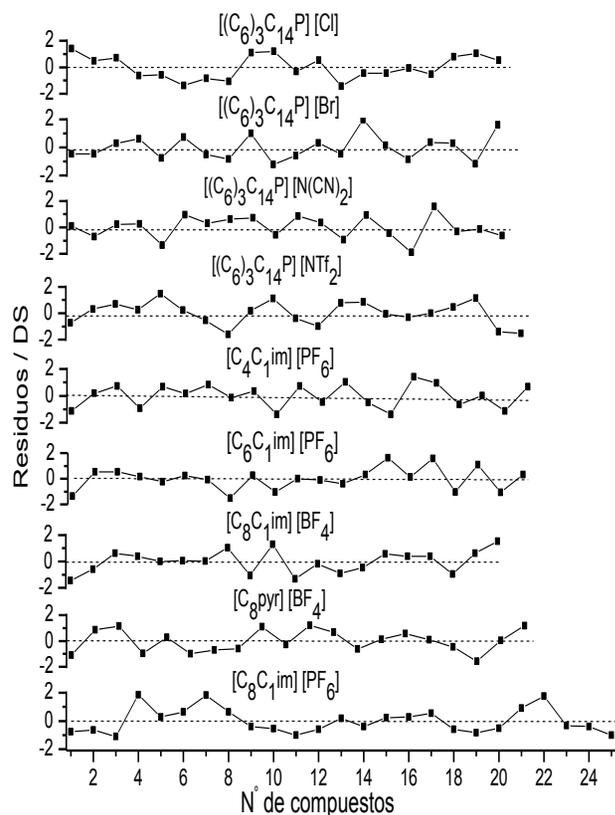


Figura 2.9: Residuos ($\log P_{exp.} - \log P_{predic.}$) normalizados (dividido por SD) para las regresiones multiparamétricas.

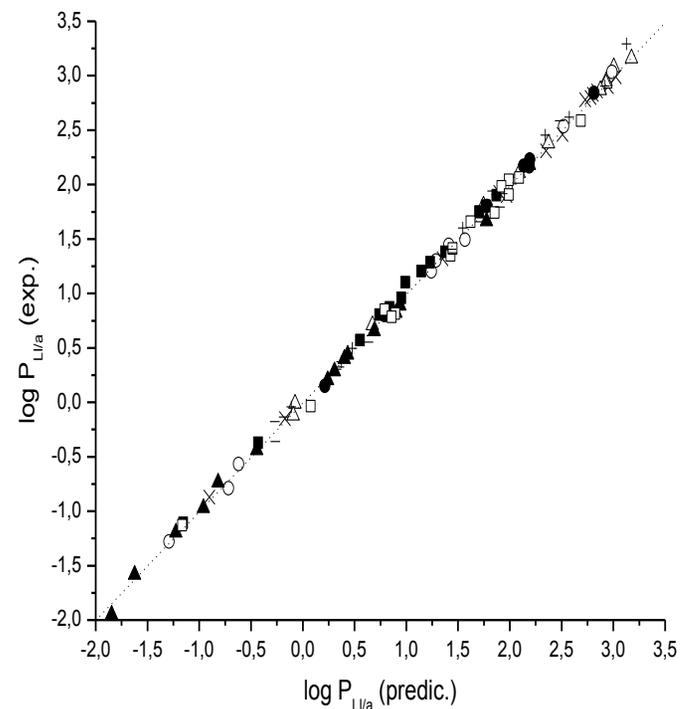


Figura 2.10: Comparación entre los coeficientes de partición experimentales y predichos por la **Ecuación 2.8** (\blacktriangle) $[C_4C_1im][PF_6]$; (\square) $[C_6C_1im][PF_6]$; ($-$) $[C_8C_1im][BF_4]$; (Δ) $[C_8pyr][BF_4]$; (\times) $[C_8C_1im][PF_6]$; (\bullet) $[(C_6)_3C_{14}P][Br]$; (\circ) $[(C_6)_3C_{14}P][N(CN)_2]$; ($+$) $[(C_6)_3C_{14}P][Cl]$; (\blacksquare) $[(C_6)_3C_{14}P][NTf_2]$.

2.11. Bibliografía.

- [1] J. Folch, M. Lees, G.H. Stanley Sloane, *J. Biol. Chem.*, 226 (1957) 497–509.
- [2] J. Qian, C.F. Poole, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 2326–2331.
- [3] S. Carda-Broch, A. Berthod, D.W. Armstrong, *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 191–199.
- [4] P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, *Talanta*, 97 (2012) 521–526.
- [5] Q. Cao, L. Quan, C. He, N. Li, K. Li, F. Liu, *Talanta*, 77 (2008) 160–165.
- [6] C. He, S. Li, H. Liu, K. Li, F. Liu, *J. Chromatogr. A*, 1082 (2005) 143–149.
- [7] C.M.S.S. Neves, S.P.M. Ventura, M.G. Freire, I.M. Marrucho, J.A.P. Coutinho, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 5194–5199.
- [8] F.J. Deive, A. Rodríguez, A.B. Pereiro, J.M.M. Araújo, M.A. Longo, M.A.Z. Coelho, J.N.C. Lopes, J.M.S.S. Esperana, L.P.N. Rebelo, I.M. Marrucho, *Green Chem.*, 13 (2011) 390–396.
- [9] Y. Pei, J. Wang, K. Wu, X. Xuan, X. Lu, *Sep. Purif. Technol.*, 64 (2009) 288–295.
- [10] J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, 1997.
- [11] S. Katsuta, K.-I. Nakamura, Y. Kudo, Y. Takeda, H. Kato, *J. Chem. Eng. Data*, 56 (2011) 4083–4089.
- [12] G. Inoue, Y. Shimoyama, F. Su, S. Takada, Y. Iwai, Y. Arai, *J. Chem. Eng. Data*, 52 (2007) 98–101.
- [13] P.H. Shetty, P.J. Youngberg, B.R. Kersten, C.F. Poole, *J. Chromatogr. A*, 411 (1987) 61–79.
- [14] K. Nakamura, Y. Kudo, Y. Takeda, S. Katsuta, *J. Chem. Eng. Data*, 56 (2011) 2160–2167.
- [15] Y. Shimoyama, K. Ikeda, F. Su, Y. Iwai, *J. Chem. Eng. Data*, 55 (2010) 3151–3154.
- [16] A. Berthod, S. Carda-Broch, *L'ambition la Chim.*, (2004) 24–30.
- [17] M.J. Kamlet, R.M. Doherty, G.R. Famini, R.W. Taft, *Acta Chem. Scand. B*, 41 (1987) 589–598.
- [18] M.J. Kamlet, R.W. Taft, *Acta Chem. Scand. B*, 39 (1985) 611–628.
- [19] M.H. Abraham, J.C. McGowan, *Chromatographia*, 23 (1987) 243–246.
- [20] M.H. Abraham, P.L. Grellier, D. V Prior, P.P. Duce, J.J. Morris, P.J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1989) 699–711.
- [21] M.H. Abraham, *Chem. Soc. Rev.*, 22 (1993) 73–83.
- [22] M.H. Abraham, H.S. Chadha, J.P. Dixon, A.J. Leo, *J. Phys. Org. Chem.*, 7 (1994) 712–716.
- [23] L.M. Sprunger, S.S. Achi, R. Pointer, B.H. Blake-Taylor, W.E. Acree Jr., M.H. Abraham, *Fluid Phase Equilib.*, 286 (2009) 170–174.
- [24] M.H. Abraham, P.L. Grellier, D. V Prior, J.J. Morris, P.J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1990) 521–529.
- [25] M. Vitha, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 1126 (2006) 143–194.
- [26] M.H. Abraham, A. Ibrahim, A.M. Zissimos, *J. Chromatogr. A*, 1037 (2004) 29–47.
- [27] M. Reta, P.W. Carr, P.C. Sadek, S.C. Rutan, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 3484–3496.

- [28] L.M. Grubbs, M. Saifullah, N.E. De La Rosa, S. Ye, S.S. Achi, W.E. Acree, M.H. Abraham, *Fluid Phase Equilib.*, 298 (2010) 48–53.
- [29] L.M. Sprunger, S.S. Achi, R. Pointer, W.E. Acree Jr., M.H. Abraham, *Fluid Phase Equilib.*, 288 (2010) 121–127.
- [30] M.H. Abraham, A.M. Zissimos, J. Huddleston, C.G. Willauer, D. Heather, R.D. Rogers, W.E. Acree, W.E. Acree Jr., *Ind. Eng. Chem. Res.*, 42 (2003) 413–418.
- [31] M.H. Abraham, C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Chromatogr. A*, 842 (1999) 79–114.
- [32] A.M. Zissimos, M.H. Abraham, A. Klamt, F. Eckert, J. Wood, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 42 (2002) 1320–1331.
- [33] K.B. Flanagan, W.E. Acree Jr., M.H. Abraham, *Fluid Phase Equilib.*, 237 (2005) 224–226.
- [34] M.H. Abraham, G.S. Whiting, R.M. Doherty, W.J. Shuely, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1990) 1451–1460.
- [35] J.D. Weckwerth, P.W. Carr, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4793–4799.
- [36] J.A. Platts, D. Butina, M.H. Abraham, A. Hersey, *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 39 (1999) 835–845.
- [37] J.S. Arey, W.H. Green, P.M. Gschwend, *J. Phys. Chem. B*, 109 (2005) 7564–7573.
- [38] O. Lamarche, J.A. Platts, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5 (2003) 677–684.
- [39] M.H. Abraham, *J. Phys. Org. Chem.*, 6 (1993) 660–684.
- [40] M.H. Abraham, G.S. Whiting, R.M. Doherty, W.J. Shuely, *J. Chromatogr. A*, 587 (1991) 213–228.
- [41] B.K. Callihan, D.S. Ballantine, *J. Chromatogr. A*, 893 (2000) 339–346.
- [42] A.M. Zissimos, M.H. Abraham, M.C. Barker, K.J. Box, K.Y. Tam, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (2002) 470–477.
- [43] M.H. Abraham, J.A. Platts, *J. Org. Chem.*, 66 (2001) 3484–3491.
- [44] M.H. Abraham, M. Berthelot, C. Laurence, P.J. Taylor, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2*, (1998) 187–191.
- [45] C.F. Poole, S.N. Atapattu, S.K. Poole, A.K. Bell, *Anal. Chim. Acta*, 652 (2009) 32–53.
- [46] I. Cacelli, S. Campanile, A. Giolitti, D. Molin, *J. Chem. Inf. Model.*, 45 (2005) 327–333.
- [47] C. Reichardt, *Solvent and Solvent effects in Organic Chemistry*. Copyright © VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany, 1988.
- [48] C. Reichardt, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 91 (1979) 119–131.
- [49] K. Dimroth, C. Reichardt, F. Siepmann, F. Bohlmann, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 727 (1969) 93–105.
- [50] T.W. Bentley, F.L. Schadt, P.V.R. Schleyer, *J. Am. Chem. Soc.*, 94 (1972) 992–995.
- [51] K.W. Street Jr., W.E. Acree Jr., *Analyst*, 111 (1986) 1197–1201.
- [52] M.J. Kamlet, R.W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 2886–2894.
- [53] M.J. Kamlet, J.L. Abboud, R.W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 8325–8327.
- [54] M.J. Kamlet, J.L. Abboud, R.W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 8325–8327.
- [55] J.E. Brady, *Anal. Chem.*, 54 (1982) 1751–1757.

- [56] C. Reichardt, *Green Chem.*, 7 (2005) 339–351.
- [57] Y. Migron, Y. Marcus, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 87 (1991) 1339–1343.
- [58] S. Coleman, R. Byrne, S. Minkovska, D. Diamond, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 11 (2009) 5608–5614.
- [59] Y. Marcus, *Chem. Soc. Rev.*, 22 (1993) 409–416.
- [60] M.J. Kamlet, R.W. Taft, *J. Am. Chem. Soc.*, 98 (1976) 377–383.
- [61] M. Reta, R. Cattana, J.J. Silber, *J. Solution Chem.*, 30 (2001) 237–252.
- [62] R.W. Taft, T. Gramstad, M.J. Kamlet, *J. Org. Chem.*, 47 (1982) 4557–4563.
- [63] E.A. Moelwyn-Hughes, *Physical Chemistry*, Pergamon Press (2nd Ed), 1961.
- [64] C.R. Noller, *Química Orgánica*, Editorial Interamericana (3ra Ed., 1968).
- [65] D. Fang, K. Gong, Q.-R.Q.-R. Shi, X.-L.X.-L. Zhou, Z.-L.Z.-L. Liu, J. Cheng, *J. Fluor. Chem.*, 129 (2008) 108–111.
- [66] J. Dupont, *J. Braz. Chem. Soc.*, 15 (2004) 341–350.
- [67] Y. Pei, J. Wang, K. Wu, Y. Zhao, J. Fan, *Zeitschrift für Phys. Chemie*, 221 (2007) 825–835.
- [68] J. Wang, Y. Pei, Y. Zhao, Z. Hu, *Green Chem.*, 7 (2005) 196–202.
- [69] S. Chowdhury, R.S. Mohan, J.L. Scott, *Tetrahedron*, 63 (2007) 2363–2389.
- [70] I.R. Christensen JJ, Hansen LD, *Handbook of proton ionization heats and related Thermodynamic Quantities*. Copyright © 1976 by John Wiley & Sons, Inc., 1976.
- [71] T. Hanai, K. Koizumi, T. Kinoshita, R. Arora, F. Ahmed, *J. Chromatogr. A*, 762 (1997) 55–61.
- [72] Y. Liu, D.J. Pietrzyk, *J. Chromatogr. A*, 920 (2001) 367–375.
- [73] H. Shaaban, T. Górecki, *Talanta*, 100 (2012) 80–89.
- [74] A.G. González, M.A. Herrador, *Anal. Chim. Acta*, 356 (1997) 253–258.
- [75] M. Fillet, I. Bechet, V. Piette, J. Crommen, *Electrophoresis*, 20 (1999) 1907–1915.
- [76] R. Ruiz, M. Rosés, C. Ràfols, E. Bosch, *Anal. Chim. Acta*, 550 (2005) 210–221.
- [77] E. Fuguet, C. Ràfols, M. Rosés, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 3928–3934.
- [78] M.B. Gholivand, M. Torkashvand, *Talanta*, 84 (2011) 905–912.
- [79] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser, R.D. Rogers, *Chem. Commun.*, (1998) 1765–1766.
- [80] N.D. Khupse, A. Kumar, *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010) 376–381.
- [81] C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2268–2286.
- [82] L. Crowhurst, P.R. Mawdsley, J.M. Perez-Arlandis, P.A. Salter, T. Welton, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5 (2003) 2790–2794.
- [83] A. Jeličić, N. García, H.-G. Löhmansröben, S. Beuermann, *Macromolecules*, 42 (2009) 8801–8808.
- [84] P. Wasserscheid, T. Welton, *Ionic Liquid in Synthesis*. Edited by Peter Wasserscheid, Thomas Welton Copyright © 2002 Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2002.

- [85] D.W. Armstrong, Z.S. Breitbach, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008) 1605–1617.
- [86] I. Skarmoutsos, D. Dellis, R.P. Matthews, T. Welton, P.A. Hunt, *J. Phys. Chem. B*, 116 (2012) 4921–4933.
- [87] Y. Moussaoui, K. Saïd, R.B. Salem, *Arkivoc*, 2006 (2006) 1–22.
- [88] K.J. Fraser, D.R. MacFarlane, *Aust. J. Chem.*, 62 (2009) 309–321.
- [89] W.E. Acree, L.M. Grubbs, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [90] L.C. Tan, P.W. Carr, M.H. Abraham, *J. Chromatogr. A*, 752 (1996) 1–18.
- [91] L.C. Tan, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, 799 (1998) 1–19.
- [92] P.K. Kilaru, P. Scovazzo, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 47 (2007) 910–919.
- [93] K. Fukunaga, H. Shirai, S. Ide, M. Kimura, *Nippon Kagaku Naishi*, 1148 (1980).
- [94] A. Marciniak, *Int. J. Mol. Sci.*, 11 (2010) 1973–90.
- [95] S.N. Baker, G.A. Baker, F. V Bright, *Green Chem.*, 4 (2002) 165–169.

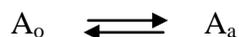
❖ CAPÍTULO 3: “TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL)”.

3.1. ELL Convencional.

La extracción líquido-líquido (ELL) es una de las técnicas más antiguas y más utilizadas para la preparación de muestras [1] debido a la simplicidad de su instrumentación y a la rapidez. Estos factores han posibilitado su amplia utilización en métodos oficiales tales como los métodos de la Environmental Protection Agency (EPA) y la Association of Official Agricultural Chemists (AOAC), entre otras. La técnica permite la separación de un analito, total o parcialmente, de las posibles interferencias presentes en la matriz y/o la preconcentración previa a la medida, aumentando así la especificidad y, eventualmente, la sensibilidad del método.

En la mayoría de los casos, la fase que contiene la muestra es acuosa y la otra un disolvente orgánico inmiscible, el “solvente extractante”. La ELL consiste en realizar uno o más contactos íntimos entre la muestra líquida y el solvente de extracción y, después de un período de agitación adecuado, se deja reposar produciéndose la separación de ambas fases. La fase orgánica extractante se puede evaporar para preconcentrar el analito previo a su análisis.

En 1872 Berthelot y Jungfleish pusieron de manifiesto que, en el proceso de extracción, la relación de concentraciones de un soluto que se reparte entre dos disolventes inmiscibles es constante e independiente de la cantidad del mismo, una vez alcanzado el equilibrio a una dada temperatura. Veinte años más tarde, Nersnt, a partir de la regla de las fases de Gibbs, dedujo la *ley de distribución*, que es la base termodinámica de los procesos de extracción. De acuerdo a esta ley, el soluto A se reparte entre dos fases inmiscibles y, una vez alcanzado el equilibrio, se establece que:



El subíndice “a” corresponde a la fase acuosa y “o” a la fase orgánica. Si el soluto A es no ionizable y se excluye la formación de dímeros, existirá en una única forma tanto en la fase acuosa como en la orgánica. La constante termodinámica de este equilibrio, definida en la **Sección 2.1**, se denomina “constante de distribución” (o de reparto), $K_D^o = a_o/a_a$. La **Ecuación 2.1** de la sección anterior, establece que en el equilibrio existe una relación constante entre las actividades del soluto en las dos fases para una temperatura dada. Esta constante de partición termodinámica sólo es válida cuando la concentración

de soluto A es pequeña. La constante de distribución, K_D , generalmente se emplea como una relación de concentraciones molares y no de actividades:

$$(K_D)_A = \frac{[A]_o}{[A]_a} \quad (3.1)$$

La constante de distribución, K_D , es proporcional a la solubilidad relativa del soluto entre ambas fases pero no puede calcularse directamente a partir de las solubilidades en cada fase, porque el coeficiente de actividad es distinto en cada una de ellas.

Para poder aplicar la ley de distribución de Nernst es imprescindible que se alcance un equilibrio dinámico entre ambas fases. El tiempo necesario para que se llegue a éste es un factor a optimizar en el proceso de extracción. La transferencia del soluto depende de la superficie de la interfase y de la velocidad de difusión del soluto en ambas fases. Estos dos factores se favorecen con la agitación.

K_D depende de la naturaleza química de ambas fases. Por ejemplo, si un analito presenta baja solubilidad en agua y/o alta solubilidad en el solvente orgánico, tendrá un coeficiente de distribución grande y así la extracción se verá favorecida. Por tanto, para aumentar el K_D se deben elegir solventes de polaridad similar al analito. Un índice de polaridad que nos permitiría la elección del solvente apropiado es el coeficiente de partición 1-octanol/agua, $P_{oct/w}$, ya que está tabulado para numerosos compuestos orgánicos [2, 3].

Para analitos ionizables el pH también afecta a K_D , mientras que para la extracción de cationes la adecuada elección del agente complejante puede aumentar dicha constante. Para la extracción de iones orgánicos o metálicos, la utilización de un reactivo formador de pares iónicos aumenta K_D . También el agregado de sales a la fase acuosa (efecto salino desplazante o “salting-out”), disminuye la solubilidad de cualquier analito aumentando, por consiguiente, la concentración del mismo en la fase orgánica.

Hay dos factores experimentales que no afectan el valor de K_D pero sí condicionan la cantidad de soluto extraído: el valor relativo de los volúmenes de las fases y el número de veces que se alcanza el equilibrio por el agregado de cantidades sucesivas de solvente puro. Ambos factores se discutirán más adelante.

Un aspecto importante que se debe considerar en cualquier proceso de transferencia de fases es la cinética del proceso. Algunos procesos de extracción presentan una cinética lenta, lo que provoca que los tiempos necesarios para alcanzar el equilibrio sean extremadamente largos. Una forma de acelerar este

proceso, es aumentar la superficie de contacto agua/solvente orgánico. Esto puede realizarse tradicionalmente por agitación rápida para generar microgotas del solvente extractante en la fase acuosa conteniendo el analito. La otra forma, mucho más moderna, es generar una dispersión del solvente orgánico como ocurre en la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) o en la MELLD *in-situ*. Estas técnicas serán descritas más adelante.

Las desventajas de la ELL convencional o en ampolla son la posible formación de emulsiones (aunque existen algunos procedimientos para evitarlas), el manejo de volúmenes grandes de muestra y disolventes y el empleo de disolventes tóxicos e inflamables. Estos factores hacen que esta técnica pueda ser cara, tediosa y no compatible con la preservación del ambiente. Es por esto que en los últimos años esta técnica está siendo reemplazada, al menos en determinaciones analíticas, por técnicas de extracción miniaturizadas evitando de este modo, todos o al menos la mayor parte de estos inconvenientes.

Al variar los volúmenes de las fases (V_a = fase acuosa y V_o = fase orgánica), la extracción se favorecerá hacia la fase que aumenta su volumen. Si C_a es la concentración inicial del soluto en la fase acuosa de volumen V_a , que se equilibra con un volumen V_o de un disolvente orgánico inmisible, luego de alcanzar el equilibrio de distribución, las concentraciones serán, C_a y C_o en las fases acuosa y orgánica, respectivamente. El balance de materia establece que, para una dada concentración inicial, i , de soluto:

$$C_i V_a = C_a V_a + C_o V_o \quad (3.2)$$

Si reemplazamos C_a de la **Ecuación 3.1** (con esta nomenclatura):

$$C_i V_a = \left(\frac{C_o}{K_D} \right) V_a + C_o V_o = C_o \left(\frac{V_a + K_D V_o}{K_D} \right) \quad (3.3)$$

De aquí se puede calcular la concentración del analito en la fase orgánica extractante, en función de la concentración inicial, los volúmenes de las fases y la constante de distribución. Dividiendo ambos términos por V_a :

$$C_i = C_o \left(\frac{1 + K_D r}{K_D} \right); \quad r = \frac{V_o}{V_a} \quad (3.4)$$

Con lo que:

$$C_o = \frac{C_i K_D}{(1 + K_D r)} \quad (3.5)$$

$$\frac{C_o}{C_i} = \frac{K_D}{(1 + K_D r)} \quad (3.6)$$

Se puede ver que la concentración en la fase orgánica será mayor, cuanto mayor sea la constante de distribución, K_D , aunque el crecimiento de la función $K_D / (1 + K_D r)$ es asintótico con K_D . Por otro lado, cuando el volumen relativo de las fases, r , disminuye (menor volumen de fase orgánica respecto de un volumen fijo de fase acuosa), C_o aumenta ya que la solución estará más concentrada. Esto no implica que los moles extraídos sean mayores.

Si p es la fracción extraída hacia la fase orgánica (moles en fase orgánica/moles en fase acuosa):

$$p = \frac{n_o}{n_i} = \frac{C_o V_o}{C_i V_a} \quad (3.7)$$

Reemplazando C_o/C_i de la ecuación anterior y V_o/V_a por r :

$$p = \frac{K_D r}{(1 + K_D r)} \quad (3.8)$$

Si por ejemplo, tomamos $K_D = 1$, se ve que tenemos una función asintótica como antes ($r/1 + r$), es decir los moles extraídos aumentan con r (y con V_o) pero lo hacen rápidamente al principio y luego r tiende a un valor constante.

La fracción extraída tiende a un valor constante pero los moles efectivamente extraídos decrecen rápidamente.

3.2. ELL Miniaturizadas.

Las extracciones miniaturizadas líquido/líquido o líquido/sólido han experimentado en los últimos años una enorme evolución en cuanto al tipo de técnica, tipo de muestra o cantidad de analito a extraer y también, en cuanto al grado de sofisticación. Las técnicas de microextracción líquido-líquido (MELL o LLME en inglés) aparecen en el año 1996 en su modalidad de microextracción en gota colgante (MEGC o SDME por “single drop microextraction”) [4], en el año 1999 en su modalidad de microextracción con fibra hueca (MEFH o HFME por “hollow fiber microextraction”) [5] y en el año 2006 aparece la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD o DLLME por “dispersive liquid-liquid microextraction”) [6]. Las dos primeras técnicas han sido utilizadas en el análisis de muestras de diferente naturaleza (gaseosas, líquidas y sólidas) y con todo tipo de analitos (orgánicos e inorgánicos). Por ello, es posible encontrar un elevado número de publicaciones al respecto. En la **Figura 3.1** se observa que junto con la microextracción en fase sólida (MEFS) son los dos tipos de técnicas de extracción más utilizadas en los últimos años debido a las ventajas que presentan, ya que se elimina o minimiza el empleo de disolventes orgánicos en muchos casos caros y/o tóxicos y cuyo uso está más restringido por las nuevas normativas (EPA, AOAC, etc.) y, además, la cantidad de muestra requerida para el análisis es pequeña.

3.2.1. Microextracción en fibra hueca (MEFH).

Esta técnica [8,9] fue desarrollada por Pedersen-Bjergaard y Rasmussen en 1999 [5]. En este caso, los poros de una fibra hueca son impregnados con un disolvente orgánico inmiscible en agua. Existen dos modalidades: con una interfaz, la modalidad líquido-líquido (LL) y con dos interfaces, la líquido-líquido-líquido (LLL). En el primer sistema, el analito es atrapado en el solvente orgánico que impregna los poros y difunde hacia el interior de la fibra, y finalmente es extraído con una jeringa. En el sistema LLL, utilizado para analitos ionizables, el analito es extraído desde una fase acuosa a bajo pH (fase dadora), migra en forma neutra a través del disolvente orgánico inmovilizado en los poros de la fibra hueca (fase orgánica) y finaliza en una fase acuosa a alto pH (fase aceptora) que se encuentra en el centro de la fibra. La fase orgánica en este último caso actúa como una barrera entre las disoluciones acuosas dadoras y aceptoras, impidiendo la mezcla de ambas fases. Finalmente el analito es extraído con una jeringa como se muestra en la **Figura 3.2**.

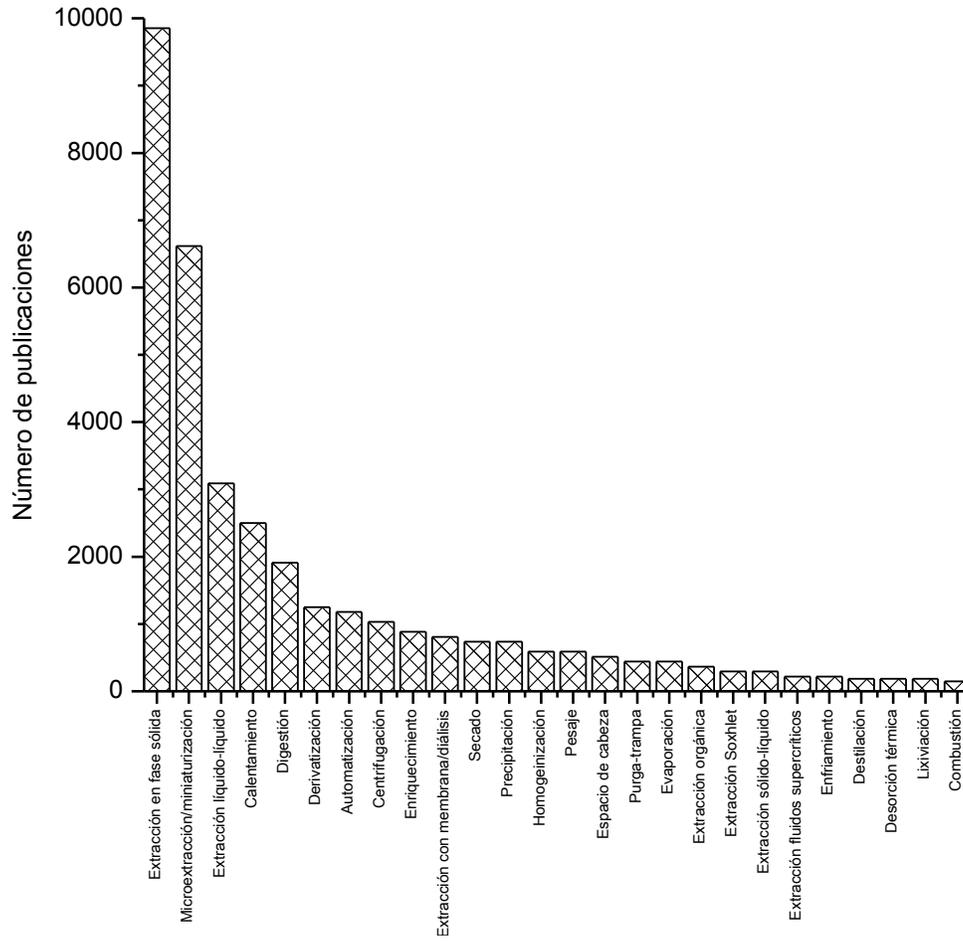


Figura 3.1: Número de publicaciones relacionadas con los diferentes métodos de preparación de muestra empleados en la década de 1997-2007 (Fuente: SciFinder Scholar® 2007).

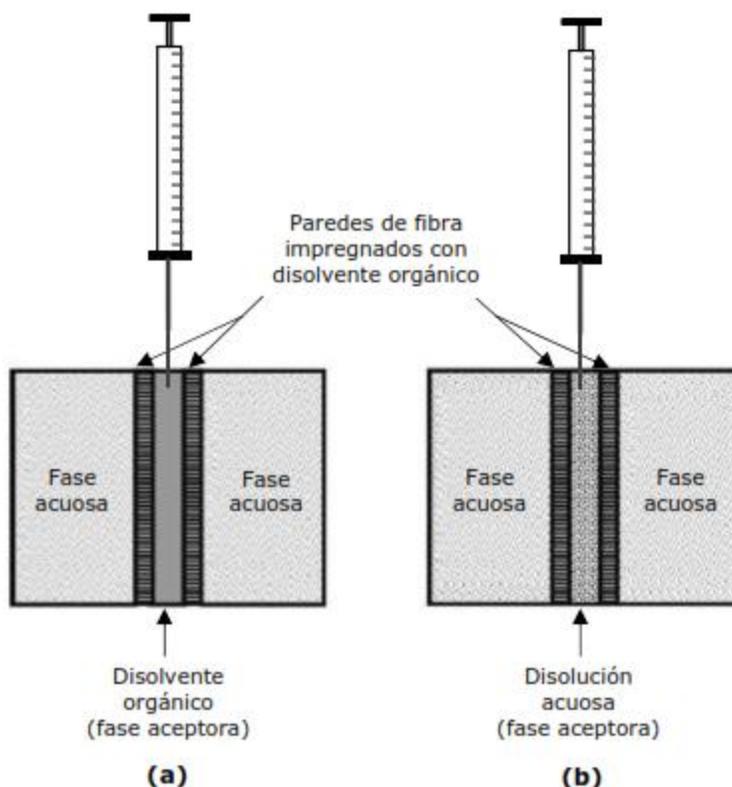


Figura 3.2: Sección transversal de la fibra hueca en el interior de la fase acuosa en un sistema de dos fases (a) y tres fases (b) [7].

3.2.2. Microextracción en gota colgante (MEGC).

En este caso, el solvente de extracción es sólo una gota de líquido de 1 a 5 μL , suspendida en la aguja de una jeringa viselada, que luego se sumerge directamente en la muestra líquida o se coloca en el espacio de cabeza para el caso de compuestos volátiles, como se muestra en **Figura 3.3**.

Desde su introducción en 1996 esta técnica ha experimentado un rápido desarrollo debido a la fácil manipulación, la rapidez, su bajo costo y la baja cantidad de solvente extractante que se necesita. Además de las ventajas indicadas anteriormente, los altos factores de preconcentración o enriquecimiento (*FE*), entre 10-1600, y el hecho de proporcionar un extracto listo para su análisis instrumental han sido sin duda claves para su rápido desarrollo. Las desventajas pueden ser que la técnica sea lenta si la transferencia de masa hacia la gota se dificulta debido a la viscosidad del solvente seleccionado y/o a la baja agitación, una alta solubilidad del solvente orgánico en la matriz acuosa, etc. La agitación no debe ser muy rápida ya que la gota se puede desprender. Esto depende de la tensión

superficial del extractante.

Un problema que podría aparecer es que al ser la gota insoluble en agua, si se inyecta al sistema cromatográfico en la modalidad “fase inversa” se puede generar una emulsión en la fase móvil que perturbe la detección de la señal. Por otra parte, el solvente puede quedarse adherido a la fase estacionaria, como es el caso de ciertos anfifilos o líquidos iónicos produciendo interferencias en la detección.

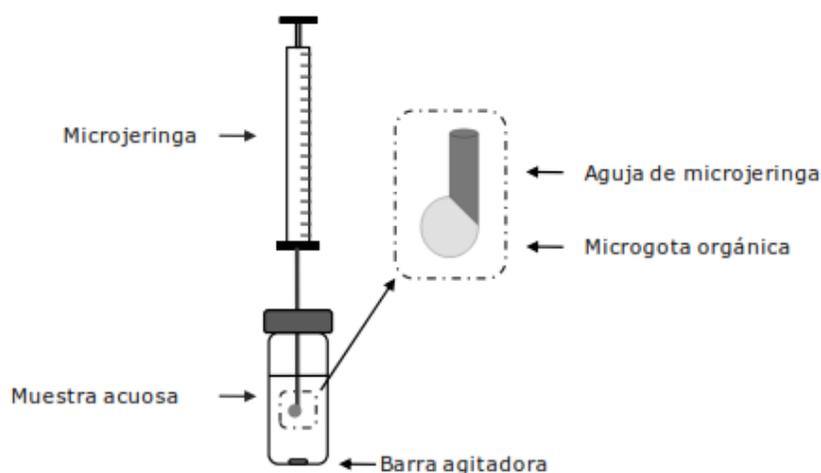


Figura 3.3: Sistema de microextracción en gota colgante.

3.2.3. Microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD).

Como se ha comentado anteriormente algunos de los objetivos de la Química Analítica moderna es la miniaturización, simplificación y automatización del procedimiento analítico completo, especialmente para acelerar la etapa de tratamiento de muestra, la cual es normalmente el cuello de botella del análisis. La introducción de la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) en 2006 por Assadi y col. [6] ha contribuido notablemente a la consecución de este objetivo, debido a su simplicidad, rapidez de operación y bajo consumo de disolventes y reactivos. Además este tipo de tratamiento de muestra permite obtener altos valores de factor de recuperación ($R\%$) y elevados FE . Debido a ello, la MELLD ha suscitado gran interés en los químicos analíticos. Desde su introducción para la preconcentración de analitos orgánicos desde muestras acuosas, un gran número de trabajos

reportan una eficiente y rápida extracción de analitos orgánicos o inorgánicos [9, 10].

El principio de la MELLD involucra dos pasos: (1) inyección de una mezcla soluble entre el solvente extractante (por ejemplo, cloruro de metileno, un RTIL, etc) y el solvente dispersivo (metanol, acetonitrilo, etc.) en el interior de la muestra acuosa que contiene los analitos. En este paso, el solvente extractante es dispersado dentro de la muestra acuosa favoreciendo el paso de los analitos al mismo en forma rápida, debido a que el área superficial de las microgotas generadas es muy grande. De este modo, se consigue rápidamente el estado de equilibrio. Ésta es la ventaja más importante de este método. (2) centrifugación de la disolución, luego de la cual los analitos se encuentran en la fase orgánica. Si ésta es más densa que el agua habrá sedimentado, pudiendo ser extraídos fácilmente del resto de la muestra acuosa con una jeringa [11]. Si es menos densa que el agua, permanecerá como la fase superior y la extracción con jeringa es directa. Los pasos de la MELLD se muestran en la **Figura 3.4**.

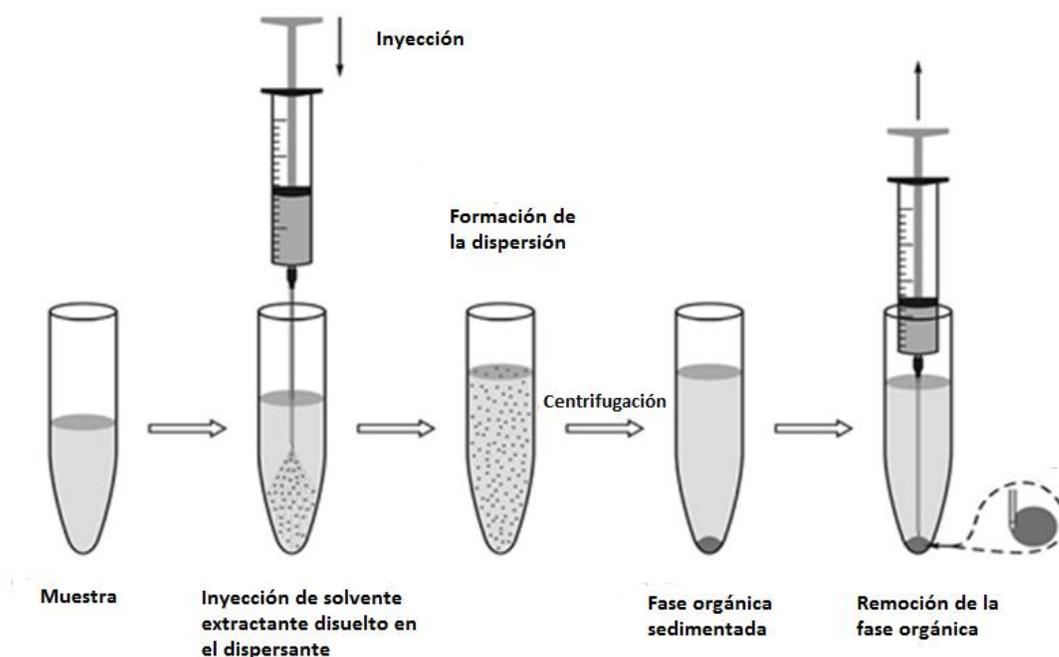


Figura 3.4: Procedimiento esquemático de la MELLD.

3.2.3.1. *Variables que afectan al proceso de extracción en MELLD.*

Los factores que afectan a la eficiencia de esta técnica son fundamentalmente el tipo y volumen de disolvente de extracción y el tipo y volumen de disolvente dispersante. Obviamente que en el caso de analitos ionizables, como en cualquier proceso de extracción, el pH también es una variable fundamental. Los disolventes orgánicos extractantes son elegidos en base a su baja miscibilidad con la muestra acuosa, capacidad de extracción por los compuestos de interés, su compatibilidad con el medio ambiente (si se conoce) y su buen comportamiento cromatográfico (ausencia de picos extras, adsorción en la fase estacionaria, etc). El **volumen del extractante** tiene un efecto importante en el FE. El incremento del volumen de extractante disminuye el FE, ya que la solución queda más diluída. Sin embargo, la reducción del volumen de extractante tiene un límite que es la necesidad de obtener una gota de un volumen mínimo tal que permita su fácil separación de la fase acuosa. Por lo tanto, el volumen de extractante debe ser optimizado para conseguir, por un lado los mejores FEs, y por otro, un volumen suficiente de fase orgánica que permita su análisis después de la centrifugación [6, 12].

La **miscibilidad del disolvente dispersante** con el disolvente de extracción y con la fase acuosa, es esencial en la selección del mismo, ya que permite la formación inicial de las microgotas deseadas. El **volumen de disolvente dispersante** afecta directamente al grado de dispersión del disolvente de extracción en la fase acuosa, y por lo tanto, a la eficiencia de extracción. Zhang y col. cuantificaron tres esteres ftálicos en muestras de agua utilizando la técnica MELLD, para la cual utilizan $[C_8C_{1im}][PF_6]$ como extractante y acetonitrilo como dispersante. Los autores observaron que el aumento del agregado de dispersante favorece el aumento del FE, hasta un valor límite a partir del cual disminuye. Esto se debe a que el acetonitrilo comienza a aumentar la solubilidad del extractante en la fase acuosa. De este modo los analitos se redisuelven en la fase acuosa disminuyendo el FE [13]. De este modo se puede concluir que variaciones en el volumen de solvente dispersante pueden originar cambios del volumen de la fase sedimentada. Para conseguir un volumen constante de la fase sedimentada, es necesario realizar simultáneamente cambios en los volúmenes de dispersante y extractante. El volumen de muestra y la solubilidad del disolvente de extracción, también juegan un papel importante en el volumen de la fase sedimentada. Para obtener un volumen constante de fase sedimentada es necesario realizar algunos experimentos iniciales de prueba y error [6, 12, 11].

Otros factores que conviene tener en cuenta son el tiempo de extracción, el tiempo de centrifugación y la fuerza iónica [12]. El **tiempo de extracción** se define como el intervalo entre la

inyección de la mezcla (dispersante/extractante) en la muestra acuosa, y el comienzo de la etapa de centrifugación. Generalmente, el tiempo influye poco o nada en la eficiencia de la extracción [6, 12, 11, 14, 15]. No obstante, en ciertas aplicaciones se observó una influencia del tiempo en la eficiencia de la misma. Fan y col. [16], en una determinación de aminas en muestras de agua, observaron que la eficiencia de extracción permanece constante entre 0-5 min para todos los analitos estudiados. Otra posibilidad para disminuir el tiempo de extracción y alcanzar el tiempo de equilibrio es aplicar **agitación** a la muestra justo después de la inyección de la mezcla de disolventes, para favorecer el contacto entre las fases acuosa y orgánica [17]. La agitación puede realizarse manualmente, con un agitador mecánico o en baño de ultrasonido.

En cuanto al **tiempo de centrifugación**, generalmente no afecta a la eficiencia de la extracción. Sin embargo es una etapa esencial para obtener dos fases diferenciadas, y por lo tanto puede afectar al volumen de la fase sedimentada y por lo tanto, al FE [17, 14].

La **fuerza iónica** también afecta al volumen de la fase sedimentada [12, 18, 19]. La adición de sal para mejorar la eficiencia de los procesos de extracción ha sido ampliamente utilizada en procesos como ELL, MEFS, microextracción en fase sólida (SPME) y microextracción en fase líquida (en inglés, liquid phase microextraction, LPME). Generalmente, la adición de sal disminuye la solubilidad de los analitos en la fase acuosa favoreciendo el paso de los mismos a la fase orgánica.

3.3. RTILs en separaciones cromatográficas y pretratamiento de muestra.

Las aplicaciones de los RTILs en química analítica [20–23] son numerosas debido a que, como se comentó previamente, poseen propiedades únicas. [24–26]. Desde finales de los noventa, se han publicado una gran cantidad de trabajos, que han demostrado el enorme potencial de los RTILs en ciencias de la separación, tales como extracción, electroforesis capilar y cromatografía [27–30]. En estas técnicas, es común utilizar los LIs (no necesariamente líquidos a temperatura ambiente) como aditivos en buffers de corrida a bajas concentraciones en electroforesis capilar (CE) y en cromatografía de líquidos (CL) y como agentes secuestrantes de aniones para detección de espectrometría de masas (EM) [31, 32].

Una de las propiedades que se les pretende atribuir a los LIs, es su compatibilidad con el medio ambiente para poder ser insertados dentro de la “química verde”. Sin embargo, durante los últimos años han aparecido diversos estudios que ponen en duda la ausencia de toxicidad de algunos LIs,

fundamentalmente en el medio acuoso [33]. Estudios de toxicidad, incluyendo ecotoxicidad, han demostrado que los LIs no son totalmente benignos y que algunos de ellos poseen cierto grado de toxicidad. Por ello, se ha estudiado la posibilidad de desarrollar LIs biodegradables [34–36].

Los LIs han captado el interés y la imaginación de la comunidad analítica [20, 37, 22, 23]. Así, en los últimos años han tenido un rol protagónico en separaciones analíticas, espectrometría de masas, electroquímica, espectroscopía y química de sensores [31, 32].

Como se comentó, uno de los campos donde los RTILs están teniendo cada vez mayores aplicaciones, es en el de la extracción de analitos tanto orgánicos como inorgánicos [24]. El primer trabajo publicado en el que se utilizó un RTIL como fase extractante data del año 1998 [38] y el primero dedicado a la microextracción en fase líquida del año 2003 [39]. Desde el año 2003 han aparecido numerosas publicaciones dedicadas a microextracción en gota colgante [39–45], en fibra hueca [46] y dispersiva [47]. Esto es debido a la gran variabilidad de RTILs con muy diversa densidad, viscosidad, polaridad y miscibilidad en agua.

Existe una limitación en cuanto al empleo de RTILs como fase extractante en cromatografía de gases (CG) debido a su baja presión de vapor, por lo que no pueden ser introducidos directamente al cromatógrafo de gases. Esta limitación hace el análisis se haga predominantemente mediante HPLC. Recientemente, Valcárcel y col. han presentado un dispositivo [48] que se coloca en el inyector del cromatógrafo de gases para realizar la desorción térmica de los analitos desde el LI, evitando así el contacto con la columna cromatográfica.

Por lo tanto, una de las nuevas tendencias relacionadas con la utilización de los RTILs en la microextracción líquida-líquida consiste en desarrollar dispositivos/interfases que sirvan para introducir directamente las microgotas del líquido extractante en un instrumento de CG, y así obtener unos menores límites de detección que los que se obtienen actualmente con líquidos iónicos en cromatografía de líquidos o utilizando disolventes orgánicos clásicos [48].

3.4. Extracción líquido-líquido empleando líquidos iónicos.

Los LIs se están empleando cada vez más en microextracciones líquido-líquido de analitos de diferente naturaleza, como iones metálicos [49–54] y moléculas orgánicas que incluyen compuestos de interés biológico, farmacológico y biomoléculas [28, 31]. Se los han utilizado para extraer hidrocarburos aromáticos y alifáticos de bajo peso molecular [55, 56], fenoles y aminas [57, 58], hidrocarburos

aromáticos policíclicos (PAHs) [56]. Diferentes RTILs tales como $[C_2C_1im][NTf_2]$, $[C_8OHC_1im][NTf_2]$, $[C_2C_1OC_1im][NTf_2]$, $[C_4(C_1)_3sim][PF_6]$, $[C_6C_1im][Br]$ se emplearon para extraer proteínas [59–61] y DNA obteniendo muy altas recuperaciones. Empleando RTILs derivados del catión imidazolio se pudo extraer albúmina de suero bovino, tripsina, citocromo C y γ -globulinas con recuperaciones entre 75 y 100% sin pérdida significativa de la actividad de las mismas [61]. Wang y colaboradores extrajeron por primera vez ADN de doble hebra utilizando $[C_4C_1im][PF_6]$ [62]. Las extracciones fueron cuantitativas con bajos límites de detección ($< 5 \text{ ng L}^{-1}$) y no observaron interferencias provenientes de proteínas o metales. Concluyeron que las interacciones entre el catión $[C_4C_1im]^+$ y los enlaces P–O del grupo fosfato del DNA desempeñan un papel importante en estas extracciones. Este método es superior al método de fenol/cloroformo debido a que no desnaturaliza el ADN y no requiere del uso de disolventes nocivos.

La extracción selectiva de Cs^+ fue investigada en soluciones acuosas que contenían otros iones metálicos como Na^+ , K^+ y Sr^{2+} en contacto con BobCalixC6-cargado en $[C_4C_1im][NTf_2]$. Se pudieron determinar los coeficientes de selectividad para el Cs^+ en presencia de otros iones, al igual que la separación selectiva de Sr^{2+} y Cs^+ en RTILs con cationes nitrogenados en contacto con éteres corona monoaza-sustituidos [51, 63, 64], compuestos que contienen azufre [65] y proteínas [61]. Se observó que para catión Cs^+ el coeficiente de reparto en general aumenta con la disminución de la longitud de la cadena alquílica del *1*-alquil-3-metilimidazolio [51] pero para la extracción de proteínas se observó lo contrario [61]. Así mismo, los coeficientes de partición entre dodecano y RTILs con diferentes cationes para el dibenzotiofeno siguen el orden: dimetilpiridinio $>$ metilpiridinio $>$ piridinio \sim pirrolidinio \sim imidazolio [65].

Cruz-Vera y colaboradores determinaron seis fármacos no-esteroidales anti-inflamatorios en muestras de orina por microextracción en fase líquida, MEFL [66, 67]. Emplearon $[C_4C_1im][PF_6]$ como fase aceptora y un sistema de flujo automático logrando un aislamiento selectivo de los medicamentos de la matriz permitiendo también su preconcentración. Se obtuvieron límites de detección entre 38 y 70 $ng L^{-1}$, reproducibilidades menores a 3,8% y recuperaciones porcentuales entre 72,8 y 82,2%.

Los LIs también se aplicaron en microextracciones en fibra hueca, MEFH, combinada con HPLC para determinar sulfonamidas y clorofenoles en muestras de agua [46, 68]. Vidal y col. analizaron ocho clorobencenos también en muestras de agua de río empleando RTILs, con límites de detección entre 0,102 y 0,203 $\mu g L^{-1}$, reproducibilidad inferior a 5,1% y recuperación superior a 99,3% [69].

La MELLID con $[C_6C_{1im}][PF_6]$ como extractante y análisis mediante HPLC se empleó para detectar 5 piretroides, con mejor eficiencia de extracción que MEGC convencional [47]. También se utilizó $[C_8C_{1im}][PF_6]$ para extraer 18 hidrocarburos aromáticos policíclicos desde agua con análisis mediante HPLC, con precisión de entre 1,2 y 5,7%, con recuperaciones porcentuales entre 90,3 y 103,3% [70]. La técnica MELLID también se utilizó con $[C_6pyr][PF_6]$ como un solvente de extracción para preconcentrar zinc en muestras de agua y leche [71]. Se presentó y se evaluó un nuevo modo de MELLID utilizando un montaje con jeringa, en un solo paso para la determinación de fármacos antiinflamatorios no esteroideos en muestras de orina [72]. Comparado con el tradicional MELLID, aquel método fue más sencillo porque se evitó el paso de centrifugado.

3.5. Bibliografía.

- [1] I. Kolthoff, E. Sandell, E. Meehan, S. Bruckenstein, *Quantitative chemical analysis*, Macmillan, 1969.
- [2] J. Sangster, *Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, England, 1997.
- [3] M.J. Kamlet, R.M. Doherty, P.W. Carr, D. Mackay, M.H. Abraham, R.W. Taft, *Environ. Sci. Technol.*, 22 (1988) 503–509.
- [4] H. Liu, P.K. Dasgupta, *Anal. Chem.*, 68 (1996) 1817–1821.
- [5] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 2650–2656.
- [6] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A*, 1116 (2006) 1–9.
- [7] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 565–574.
- [8] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 23 (2004) 1–10.
- [9] A. V Herrera-Herrera, M. Asensio-Ramos, J. Hernández-Borges, M.Á. Rodríguez-Delgado, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 728–751.
- [10] H. Chen, R. Chen, S. Li, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 1244–1248.
- [11] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2342–2357.
- [12] S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.-R. Milani Hosseini, E. Aghaee, *J. Chromatogr. A*, 1123 (2006) 1–9.
- [13] H. Zhang, X. Chen, X. Jiang, *Anal. Chim. Acta*, 689 (2011) 137–42.
- [14] M.A. Farajzadeh, M. Bahram, J.Å. Jönsson, *Anal. Chim. Acta*, 591 (2007) 69–79.
- [15] H. Farahani, P. Norouzi, R. Dinarvand, M.R. Ganjali, *J. Chromatogr. A*, 1172 (2007) 105–112.
- [16] Y.C. Fan, Z.L. Hu, M.L. Chen, C.S. Tu, Y. Zhu, *Chinese Chem. Lett.*, 19 (2008) 985–987.
- [17] M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 1166 (2007) 9–15.

- [18] R.R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.-R.M. Hosseini, M.R. Jamali, *Talanta*, 72 (2007) 387–393.
- [19] D. Nagaraju, S.-D. Huang, *J. Chromatogr. A*, 1161 (2007) 89–97.
- [20] J.-F. Liu, G.-B. Jiang, J.A. Jönsson, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 20–27.
- [21] S. Pandey, *Anal. Chim. Acta*, 556 (2006) 38–45.
- [22] J.L. Anderson, D.W. Armstrong, G.T. Wei, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 2892–2902.
- [23] M. Koel, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 35 (2005) 177–192.
- [24] H. Zhao, S. Xia, P. Ma, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80 (2005) 1089–1096.
- [25] H. Olivier-Bourbigou, L. Magna, *J. Mol. Catal. A Chem.*, 182–183 (2002) 419–437.
- [26] J. Dupont, R.F. de Souza, P.A.Z. Suarez, *Chem. Rev.*, 102 (2002) 3667–3692.
- [27] A. Berthod, M.J. Ruiz-Ángel, S. Carda-Broch, *J. Chromatogr. A*, 1184 (2008) 6–18.
- [28] L.B. Escudero, A. Castro Grijalba, E.M. Martinis, R.G. Wuilloud, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 1–17.
- [29] C.F. Poole, S.K. Poole, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 2268–2286.
- [30] X.-H. ZANG, Q.-H. WU, M.-Y. ZHANG, G.-H. XI, Z. WANG, *Chinese J. Anal. Chem.*, 37 (2009) 161–168.
- [31] P. Sun, D.W. Armstrong, *Anal. Chim. Acta*, 661 (2010) 1–16.
- [32] W.E. Acree, L.M. Grubbs, in: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [33] D. Zhao, Y. Liao, Z. Zhang, *CLEAN – Soil, Air, Water*, 35 (2007) 42–48.
- [34] N. Gathergood, M.T. Garcia, P.J. Scammells, *Green Chem.*, 6 (2004) 166–175.
- [35] M.T. Garcia, N. Gathergood, P.J. Scammells, *Green Chem.*, 7 (2005) 9–14.
- [36] N. Gathergood, P.J. Scammells, M.T. Garcia, *Green Chem.*, 8 (2006) 156–160.
- [37] G.A. Baker, S.N. Baker, S. Pandey, F. V Bright, *Analyst*, 130 (2005) 800–808.
- [38] J.G. Huddleston, H.D. Willauer, R.P. Swatloski, A.E. Visser, R.D. Rogers, *Chem. Commun.*, (1998) 1765–1766.
- [39] J. Liu, G. Jiang, Y. Chi, Y. Cai, Q. Zhou, J.-T. Hu, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 5870–5876.
- [40] J. Zhang, T. Su, H.K. Lee, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 1988–1992.
- [41] J. Liu, Y. Chi, G. Jiang, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 87–91.
- [42] J. Peng, J. Liu, G. Jiang, C. Tai, M. Huang, *J. Chromatogr. A*, 1072 (2005) 3–6.
- [43] J. Liu, J. Peng, Y. Chi, G. Jiang, *Talanta*, 65 (2005) 705–709.
- [44] C.-L. Ye, Q.-X. Zhou, X.-M. Wang, *Anal. Chim. Acta*, 572 (2006) 165–171.
- [45] C. Ye, Q. Zhou, X. Wang, J. Xiao, *J. Sep. Sci.*, 30 (2007) 42–47.
- [46] J.-F. Peng, J.-F. Liu, X.-L. Hu, G.-B. Jiang, *J. Chromatogr. A*, 1139 (2007) 165–170.
- [47] Q. Zhou, H. Bai, G. Xie, J. Xiao, *J. Chromatogr. A*, 1177 (2008) 43–49.
- [48] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel, *Anal. Chem.*, 80 (2007) 793–800.

- [49] S. Dai, Y. H. Ju, C. E. Barnes, *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.*, 0 (1999) 1201–1202.
- [50] M.L. Dietz, S. Jakab, K. Yamato, R.A. Bartsch, *Green Chem.*, 10 (2008) 174–176.
- [51] H. Luo, S. Dai, P. V Bonnesen, A.C. Buchanan, J.D. Holbrey, N.J. Bridges, R.D. Rogers, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 3078–3083.
- [52] K. Shimojo, M. Goto, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 5039–5044.
- [53] N. Hirayama, H. Okamura, K. Kidani, H. Imura, *Anal. Sci.*, 24 (2008) 697–699.
- [54] E.M. Martinis, P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 29 (2010) 1184–1201.
- [55] A. Arce, M.J. Earle, S.P. Katdare, H. Rodríguez, K.R. Seddon, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 10 (2008) 2538–2542.
- [56] L. Guerra-Abreu, V. Pino, J.L. Anderson, A.M. Afonso, *J. Chromatogr. A*, 1214 (2008) 23–29.
- [57] V.M. Egorov, S. V Smirnova, I. V Pletnev, *Sep. Purif. Technol.*, 63 (2008) 710–715.
- [58] Y. Lu, W. Ma, R. Hu, X. Dai, Y. Pan, *J. Chromatogr. A*, 1208 (2008) 42–46.
- [59] K. Shimojo, N. Kamiya, F. Tani, H. Naganawa, Y. Naruta, M. Goto, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 7735–7742.
- [60] D.-H. Cheng, X.-W. Chen, Y. Shu, J.-H. Wang, *Talanta*, 75 (2008) 1270–1278.
- [61] Y. Pei, J. Wang, K. Wu, X. Xuan, X. Lu, *Sep. Purif. Technol.*, 64 (2009) 288–295.
- [62] J.-H. Wang, D.-H. Cheng, X.-W. Chen, Z. Du, Z.-L. Fang, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 620–625.
- [63] H. Luo, S. Dai, P. V Bonnesen, *Anal. Chem.*, 76 (2004) 2773–2779.
- [64] S. Chun, S. V Dzyuba, R.A. Bartsch, *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3737–3741.
- [65] J.D. Holbrey, I. Lopez-Martin, G. Rothenberg, K.R. Seddon, G. Silvero, X. Zheng, *Green Chem.*, 10 (2008) 87–92.
- [66] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. B*, 877 (2009) 37–42.
- [67] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, 1202 (2008) 1–7.
- [68] Y. Tao, J.-F. Liu, X.-L. Hu, H.-C. Li, T. Wang, G.-B. Jiang, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6259–6266.
- [69] L. Vidal, E. Psillakis, C.E. Domini, N. Grané, F. Marken, A. Canals, *Anal. Chim. Acta*, 584 (2007) 189–195.
- [70] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6356–6364.
- [71] H. Abdolmohammad-Zadeh, G.H. Sadeghi, *Anal. Chim. Acta*, 649 (2009) 211–217.
- [72] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 6459–6465.

❖ **CAPÍTULO 4: “ESTRATEGIAS DE OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO: DISEÑO DEL EXPERIMENTO MEDIANTE UN DISEÑO CENTRAL COMPUESTO (DCC)”.**

4.1. Introducción.

El término “*diseño de experimentos*” es usado en dos contextos, el primero es para describir una serie de experimentos que se llevan a cabo con la intención de desarrollar un modelo (por ej. un modelo de regresión o un modelo ANOVA) y en el segundo contexto el diseño se aplica para determinar las condiciones óptimas requeridas para obtener un producto o proceso. Debido a que éste último contexto es el que se utilizará en esta Tesis, es el que se desarrollará a continuación.

Nos interesará determinar una serie de condiciones o “*factores*”, siendo un *factor* una variable que se cambia de una manera controlada para estudiar su efecto en un determinado proceso (por ejemplo, sobre la eficiencia de una extracción líquido-líquido). Debido a que generalmente hay varios factores a optimizar, el diseño experimental es *multivariado*. Las características del proceso a ser optimizado se llaman, a menudo, “*respuestas*”, y pueden considerarse como variables que describen la performance de dicho proceso. Podemos ver que hay dos tipos de variables, las *respuestas* y los *factores*. Las respuestas son las variables *dependientes* (y) y los factores las variables *independientes* (x).

$$(y_1, y_2, \dots, y_n) = f((x_1, x_2, \dots, x_n)) \quad (4.1)$$

Generalmente, las respuestas son tratadas de manera separada, por lo que la **Ecuación 4.1** se reduce a:

$$y = f((x_1, x_2, \dots, x_n)) \quad (4.2)$$

El modelo que relaciona la respuesta al efecto de los factores se llama “*función de respuesta*”, o debido al carácter multivariado, “*superficie de respuesta*”. Por lo tanto, el diseño de experimentos implica que éstos no se realizan de manera aleatoria sino de una manera cuidadosamente planeada [1].

El diseño de experimentos implica obtener un producto o proceso con características deseadas de manera eficiente. Esto implica entender el efecto de los factores y modelar la relación entre y y x con un *mínimo de experimentos*, lo cual requiere un “mapeo” eficiente y ordenado del espacio experimental

para ahorrar costos.

Se comienza determinando qué factores influyen en la respuesta y en qué extensión. Luego se obtiene un modelo que describe cuantitativamente esos efectos. Se desea optimizar el valor de los factores que permitan obtener la mejor respuesta (por ej. la máxima extracción de un analito). Finalmente se utiliza el diseño experimental para optimizar las respuestas. El valor óptimo puede ser el valor más alto o el más bajo de las respuestas pero pueden haber otras posibilidades. Puede ocurrir también que no se desee un resultado óptimo sino una región en donde el resultado sea “suficientemente bueno”. En el esquema siguiente se resumen las diferentes etapas del *diseño de un experimento* [1].

El diseño de experimentos se aplica en muchas áreas de la química y ciencias relacionadas [1–3].

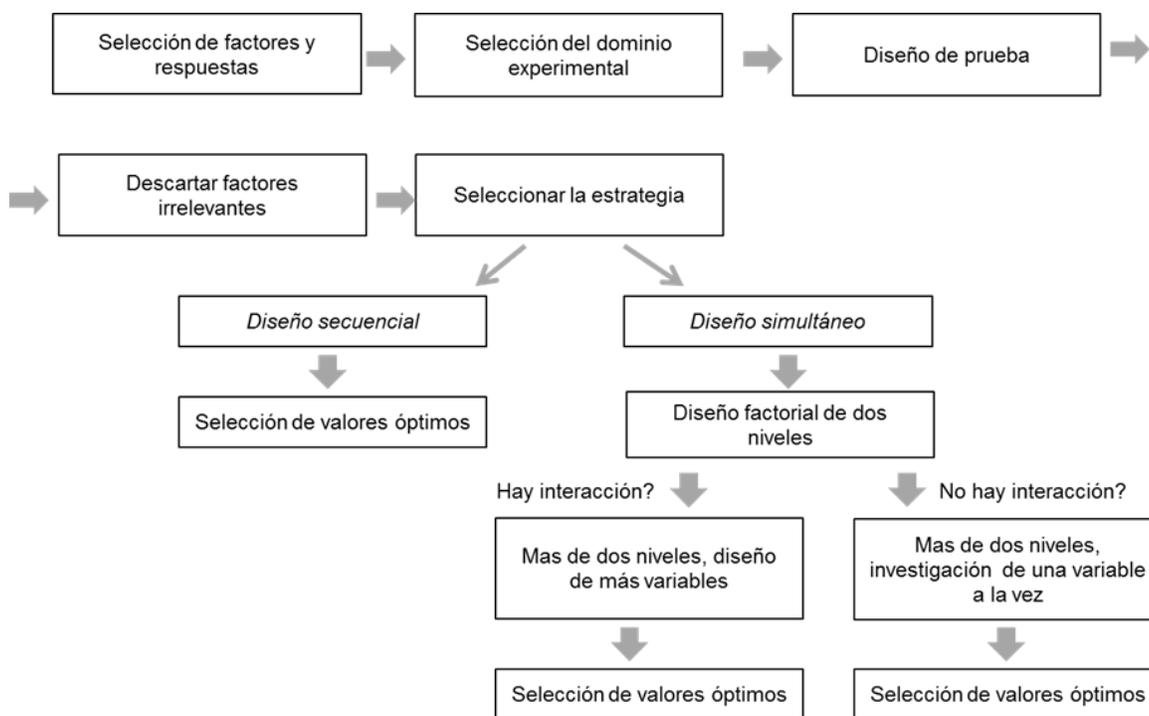


Figura 4.1: Principales etapas del diseño de experimentos.

4.2. Factores.

Los factores pueden ser *cualitativos* o *cuantitativos*. Por ejemplo, si se está interesado en estudiar el efecto de diferentes tipos de catalizadores y de solventes en el rendimiento de un producto de síntesis orgánica, los factores serán *cualitativos*. Si es el pH o la concentración de catalizador, los factores serán *cuantitativos*. Los diferentes valores que se le da a un factor se llaman *niveles*. Si el diseño requiere

experimentos, por ejemplo, a pH 5 y 9, entonces hay *dos niveles* de pH, el nivel **alto** y el **bajo**. Pero esta nomenclatura se usa también para los factores cualitativos.

Consideremos el diseño experimental más sencillo posible: se mide la respuesta a dos niveles de un factor (**Figura 4.2.a**). Este diseño define un espacio *unidimensional* limitado por los dos niveles a los cuales se realiza el experimento. El diseño *bidimensional* de la **Figura 4.2.b** es un diseño factorial de *dos niveles* en *dos* dimensiones. Por lo tanto son necesarios 4 experimentos ($2^2 = 4$).

Se deben definir los niveles y sus límites. Límites demasiado grandes generalmente requieren experimentos en condiciones no útiles y conducen a insuficiente precisión del modelo en el área investigada. Los límites que son muy pequeños pueden conducir a perder el valor óptimo buscado.

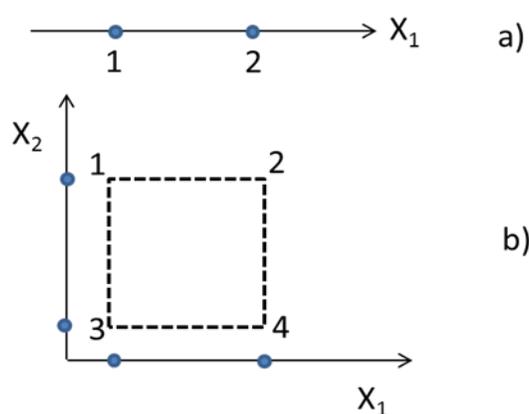


Figura 4.2: Mapeo del espacio multivariado. (a) espacio unidimensional limitado por dos niveles del factor. (b) espacio bidimensional limitado por los dos niveles de los dos factores.

4.3. Selección de las respuestas.

Generalmente las respuestas se modelan separadamente y se encuentran los valores del factor que producen las respuestas más altas (por ej. el producto principal de un producto de síntesis orgánica) o más bajas (por ej. productos secundarios de dicha síntesis). En situaciones reales, es común que haya más de una respuesta y que los resultados obtenidos sean conflictivos. Por ejemplo, en HPLC la separación generalmente mejora cuando la retención incrementa. Sin embargo, el tiempo total de análisis también aumenta, lo cual perjudica al método en cuanto a productividad y economía. Por lo tanto, en este ejemplo no se trata de encontrar los valores óptimos de las respuestas (tiempo requerido, calidad de la separación) sino una situación de compromiso. Existen distintos tipos de técnicas para tratar este tipo

de situaciones [1, 4–7].

4.4. Estrategias de optimización.

Asumamos de ahora en adelante que se buscan los valores de respuesta más altos, es decir, buscamos el máximo en la *superficie de respuesta*. Para facilitar ver un gráfico en tres dimensiones, a veces se prefieren emplear *gráficos de contorno*, en la cual cada figura (círculos, óvalos, etc) en dos dimensiones representan *líneas de iso-respuesta*. En **Figura 4.3** se muestran ejemplos típicos de superficies de respuesta.

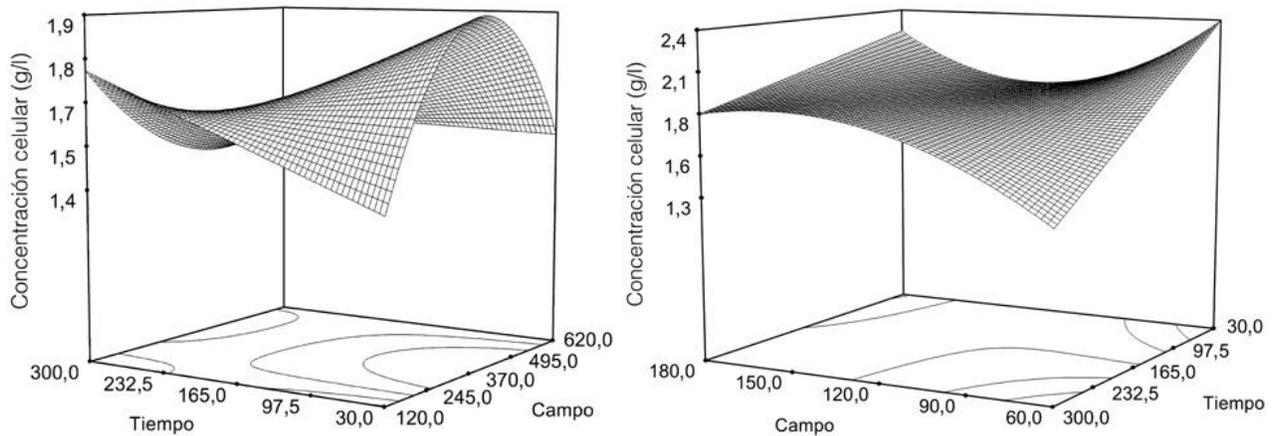


Figura 4.3: Superficies de respuesta y diagramas de contorno típicos.

Comparemos un diseño experimental, que es una aproximación multivariada, con la estrategia clásica univariada de cambiar un factor a la vez (optimización “etapa por etapa” o “*step-by-step optimization*”). Consideremos el ejemplo de la **Figura 4.4.a**. Esta es una optimización con dos factores. El punto de partida es **A** y el óptimo es alcanzado en **O**. En la primera etapa se realizan un número de experimentos para optimizar el factor x_1 a un valor constante de x_2 y obtener **B**. La subsecuente optimización de x_2 en el valor de **B** para x_1 conducirá a obtener el valor **O** deseado.

Este no es el caso que se obtiene en la **Figura 4.4.b**. La aproximación univariada conduciría a obtener el valor **C** como el óptimo, lo cual está muy alejado de la realidad. El óptimo se hubiese obtenido repitiendo el procedimiento (manteniendo x_2 constante y optimizando x_1 nuevamente, lo cual conduciría a obtener el valor **D** y así sucesivamente) pero este procedimiento requeriría un gran número

de experimentos. Peor aún si hubiesen más de dos variables involucradas. La ineficiencia de este procedimiento es debido a la *interacción de los factores* x_1 y x_2 .

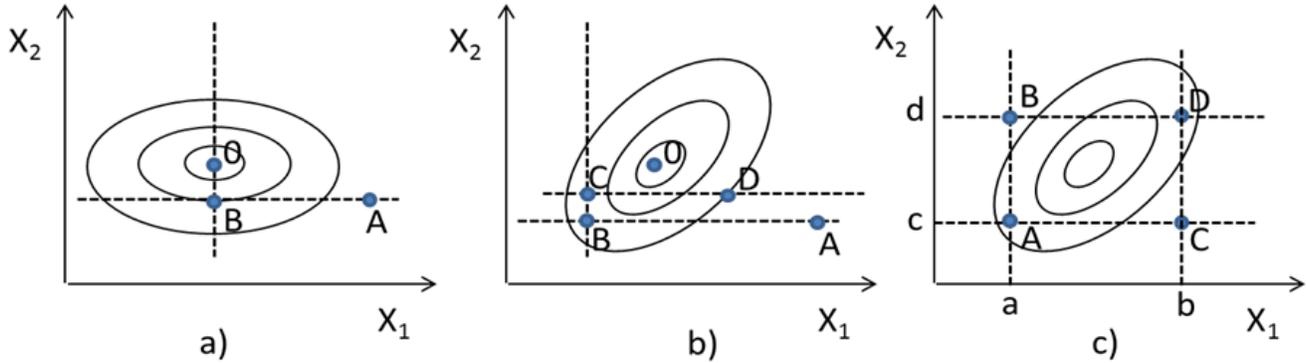


Figura 4.4: Optimización de un factor por vez, en un experimento de dos factores. (a) cuando no hay interacción. (b) cuando hay interacción. (c) el efecto de x_2 es diferente en los niveles **a** y **b** de x_1 .

La existencia de interacción se demuestra en la **Figura 4.4.c**. Supongamos que se quiere investigar el efecto de x_2 en los niveles **a** y **b** de x_1 y en los niveles **c** y **d** de x_2 . Se miden entonces las respuestas en los puntos **A**, **B**, **C** y **D**. Las respuestas en los puntos **A** y **B** indicarían que cuando x_2 incrementa, la respuesta disminuye. En otras palabras, el efecto de x_2 en la respuesta depende del valor de x_1 : esto se define como una *interacción*. Esto no ocurriría en la situación de la **Figura 4.4.a**, ya que no hay interacción. Por lo tanto, se concluye que *la aproximación univariada es eficiente cuando no hay interacción* y que en casos donde hay interacción la aproximación *debe ser multivariada*. Desafortunadamente, en la mayoría de los casos reales hay interacciones entre las variables y se requieren aproximaciones multivariadas.

Hay dos tipos de estrategias de optimización multivariadas: *simultáneas* y *secuenciales*. Se pueden emplear aproximaciones combinadas pero requieren un número relativamente grande de experimentos cuidadosamente planeados. Los diseños factoriales pertenecen al grupo de las estrategias simultáneas [1, 2, 8]. Más adelante hablaremos de estas estrategias.

4.5. Funciones respuesta: *el modelo*.

El diseño experimental se utiliza para desarrollar modelos empíricos, ya que en la práctica, no es posible en la gran mayoría de los casos derivarlos a partir de la teoría. Las funciones de respuesta típicas para dos factores, x_1 y x_2 son del tipo:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (4.3)$$

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (4.4)$$

Los factores se suelen codificar para facilitar el diseño. Por ejemplo, si x_1 y x_2 son dos concentraciones diferentes (por ej. 0,1 y 0,3 M) se les asigna los valores codificados -1 y +1. El nivel 0 (0,2 M en este caso) es el *centroide*. En este caso, b_0 describe el valor de y en el centroide. El último término en las dos ecuaciones previas corresponde al *término de interacción*. Generalmente no se necesitan términos de interacción de orden superior a 2. Los coeficientes **b** de las **Ecuaciones 4.3 y 4.4** se obtienen por regresión múltiple y obviamente, el número de experimentos debe ser igual o superior al número de coeficientes. A través de análisis estadísticos ANOVA se debe:

- a) corroborar si todos los términos de las **Ecuaciones 4.3 y 4.4** son necesarios.
- b) validar el modelo.
- c) obtener de la manera más precisa posible los valores de los coeficientes.
- d) predecir el valor óptimo con el menor error posible.

4.6. Diseños factoriales simultáneos.

Se pueden distinguir dos clases principales de diseños:

- 1) *Los diseños en los cuales el énfasis se hace en detectar cuáles son los factores que influyen en la respuesta y se basan en diseños factoriales de dos niveles. En estos diseños se considera cada factor a dos niveles y los experimentos se realizan a cada combinación posible de los dos niveles. Estos diseños permiten la estimación del efecto de todos los factores y sus interacciones y la construcción de modelos de primer orden incluyendo interacciones binarias. Los dos niveles son los límites del dominio experimental de la **Ecuación 4.3**. y la respuesta óptima necesariamente se encontrará dentro de esos límites. Si el número de factores se incrementa el número de*

experimentos puede ser muy grande. Para ello se utilizan *diseños factoriales fraccionales*, limitando el número de experimentos con la consiguiente pérdida de información acerca de las interacciones. Si no interesa detectar dichas interacciones, sino solamente qué factores influyen, se puede emplear un diseño tipo Plackett-Burman [9].

- 2) *Los diseños en los cuales se hace énfasis en el modelo*: estos diseños requieren que seamos capaces de obtener funciones curvilíneas y, por lo tanto, se necesitan modelos de segundo orden. Consecuentemente, se deben considerar al menos tres niveles de cada factor ya que tendremos tres coeficientes. Diseños típicos son el “*diseño central compuesto*” y la “*red uniforme de Doehlert*”. Estos modelos permiten derivar ecuaciones del tipo de la **Ecuación 4.4** y obtener las superficies de respuesta. Generalmente se aplica como primer paso un diseño de dos niveles para decidir qué factores son los más importantes y luego se aplica el modelo de segundo orden.

4.7. Diseño central compuesto (DCC).

Es un diseño que permite ahorrar experimentos y por lo tanto tiempo y dinero. Consiste de tres partes:

- 1) Un diseño factorial de dos niveles (2^k experimentos, donde k es el número de factores). En **Tablas 4.1 y 4.2** se muestra en los primeros cuatro experimentos (renglones 1 a 4) el diseño para 2 y 3 factores, respectivamente.
- 2) Un diseño tipo “estrella” para agregar más niveles y poder describir la curvatura. Los renglones 5 a 8 y 9 a 14 de las Tablas antes mencionadas, son los “puntos estrella”. Están situados a una distancia α (en el ejemplo, 1,404 y 1,682, respectivamente) del centro del diseño. (más adelante se verá cómo se decide el valor de α).
- 3) El punto central, el cual a menudo se replica (puntos 9 y réplicas, 15 y réplicas de las tablas mencionadas).

En la **Figura 4.5** puede verse un esquema representativo del DCC para dos factores y en la **Figura 4.6** para tres factores, respectivamente.

Tabla 4.1: DCC de dos factores.

Experimento	x_1	x_2
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	$-\sqrt{2}$	0
6	$+\sqrt{2}$	0
7	0	$-\sqrt{2}$
8	0	$+\sqrt{2}$
9, etc..	0	0

Tabla 4.2: DCC de tres factores.

Experimento	x_1	x_2	x_3
1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1
3	-1	+1	-1
4	+1	+1	-1
5	-1	-1	+1
6	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	+1	+1	+1
9	-1,682	0	0
10	+1,682	0	0

Tabla 4.2 (continuación).

11	0	-1,682	0
12	0	+1,682	0
13	0	0	-1,682
14	0	0	+1,682

15, etc.. 0 0 0

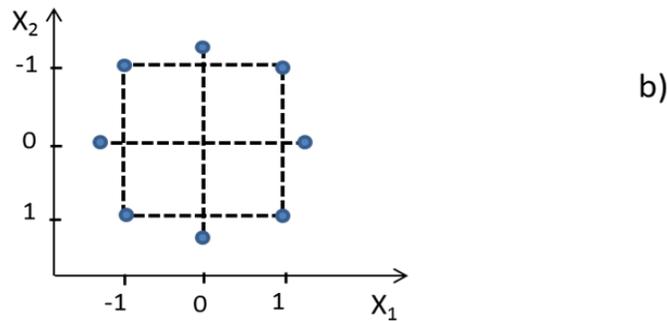
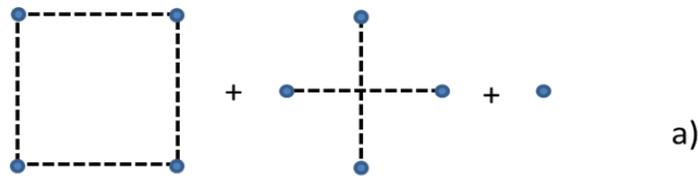


Figura 4.5: DCC de dos factores. (a) diseño factorial 2^2 , diseño tipo “estrella” y punto central. (b) diseño compuesto.

En general hay, por lo tanto:

- **Puntos factoriales** (pf), (2^k) , que son aquellos que forman parte de un diseño factorial de dos niveles y tienen factores en niveles -1 o +1.
- **Puntos axiales** o también llamados **puntos estrella** (pe), $(2k)$, que son aquellos que se encuentran a una distancia $\pm\alpha$ del punto central.
- **Puntos centrales** (pc), que son aquellos que tienen todos los factores en nivel 0. puntos centrales todos con niveles igual a 0. Generalmente se hacen réplicas de este punto para obtener la estimación del error.

El número de experiencias es $E= 2^k+2k+pc$. De acuerdo a lo previamente dicho se puede ver que cada factor se encuentra en cinco niveles posibles: $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ y cuando α toma el valor de la raíz cuarta de f , siendo f el número de puntos factoriales, se dice que el diseño es **rotable**.

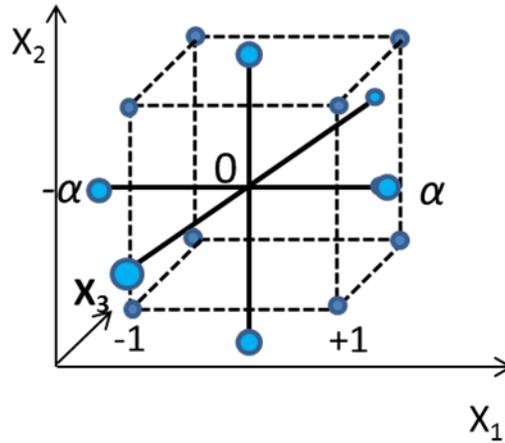


Figura 4.6: DCC para 3 factores (los niveles se indican solo para x_1).

Cada factor se encuentra a 5 niveles ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$). Por ejemplo, si el factor es el pH y el punto central es $\text{pH} = 6$, entonces los niveles serán: $\text{pH} = 6 - 1,414 = 4,586$; $6 - 1 = 5$; $6 - 0 = 6$; $6 + 1 = 7$ y $6 + 1,414 = 7,414$. El número de experimentos es mucho menor que en un diseño de 3 niveles ($3^3 = 27$ experimentos). Para 4 factores, con el DCC se necesitan 2^4 (pf) + $2 \cdot 4$ (pe) + al menos 1 (pc) = al menos 25 experimentos, comparado con $3^4 = 81$ experimentos de un diseño factorial completo de 3 niveles ($-1, 0, +1$) con 4 factores (3-DFC). En las **Tablas 4. 1. y 4. 2.**, se muestran los valores más usuales para $+\alpha$ ($= +\sqrt{2} = 1,414$ y $+\sqrt[4]{8} = 1,68$ para $k=3$) pero otros valores son posibles.

4.7.1. Selección del valor de α .

El valor de α determina la ubicación de los puntos estrella y generalmente varía de un valor 1 a un valor \sqrt{k} siendo el operador el que fija este valor de acuerdo a la región de interés y las condiciones de operabilidad del dominio experimental. Si se fija el valor de $\alpha = 1$ se crea un DCC **centrado en las caras**, lo que reduce a tres los niveles de cada variable. Si $\alpha = \sqrt{k}$, los puntos factoriales y los puntos estrella quedan ubicados en una hiper-superficie con forma de hiper-esfera y en este caso el diseño se denomina **esférico**. Finalmente cuando α toma el valor de la raíz cuarta de f , siendo f el número de puntos factoriales, se dice que el diseño es **rotable**, como ya se ha comentado. La **rotabilidad** de un diseño es una propiedad del mismo que implica que el error en la predicción de la respuesta por parte del

modelo ajustado es constante a una distancia dada desde el centro del diseño. Esta propiedad se puede comprobar obteniendo una gráfica de contornos perfectamente circulares cuando se representa el error estándar del diseño en función de las coordenadas experimentales.

Sin embargo, en los diseños esféricos y en los estrictamente rotables para varios factores los puntos “estrella” pueden quedar ubicados muy lejos del punto central. Esta distancia aumenta a medida que crece el número de factores y esto implica correr el riesgo de dejar toda una región intermedia sin investigar. También podría ocurrir que el valor para algunos de los factores resulte en magnitudes imposibles de lograr por restricciones del dominio experimental [10]. En estos casos, otra opción aceptable es tomar un valor **práctico** para α . Otra forma sería que α se fije como la raíz cuarta de k . De esta manera se obtienen puntos estrella más cercanos al punto central y, en general, resultan en experimentos que pueden realizarse sin inconvenientes. En esta situación el modelo obtenido con este diseño aún puede predecir las respuestas con una varianza más o menos semejante para una misma distancia del punto central. A este tipo de diseños se los denomina entonces **cuasi-rotable** [11].

4.7.2. *Puntos centrales.*

Las réplicas que se realizan del punto central tienen dos objetivos principales:

1. Proporcionar una medida del **error puro**, es decir el error que puede esperarse en la respuesta de un experimento realizado en forma independiente.
2. Estabilizar la **varianza** de las respuestas predichas dentro de la región experimental del diseño.

Para cumplir el primero de estos objetivos la cantidad de puntos centrales necesarios dependerá en cada caso de la precisión esperada para las respuestas. Para el segundo caso se ha demostrado que los diseños rotables necesitan de 3 a 5 puntos centrales para evitar que se produzca una variabilidad muy grande en la varianza de las predicciones entre las zonas más o menos cercanas al centro del diseño [12].

4.8. **Propiedades y/o características del DCC.**

4.8.1. *Rotabilidad.*

Box y Hunter [2] establecieron que un diseño experimental es “rotable” o “girable” si la varianza de la respuesta predicha y , en algún punto x , es función sólo de la distancia al punto central del diseño y no de la dirección. Un DCC se hace rotatable mediante una elección apropiada del espaciamiento axial α . Si el diseño es rotatable, la desviación estándar (o la varianza) de la respuesta predicha y es constante en todos los puntos que están a la misma distancia del centro del diseño. Si consideramos, por ejemplo, que la respuesta a medir es el rendimiento, la predicción de éste tendrá la misma precisión para todos los puntos que se encuentran a la misma distancia del centro del diseño. Esta propiedad de rotabilidad cobra importancia en la exploración de una superficie de respuesta, porque la precisión de la superficie estimada no depende de la orientación del diseño con respecto a la superficie de respuesta real o a la dirección de búsqueda de las condiciones óptimas. Dado que la finalidad del diseño de superficies de respuesta es la optimización y se desconoce la localización del óptimo antes de realizar el experimento, tiene sentido usar un diseño que proporcione estimaciones igualmente precisas en todas direcciones.

4.8.2. Ortogonalidad.

Otra propiedad, que también es de importancia considerar en los diseños, es la ortogonalidad. Para un modelo de primer orden, esta es la propiedad de diseño óptima, ya que minimiza la varianza de los coeficientes de regresión. Se considera que un diseño es ortogonal cuando los coeficientes estimados en el modelo ajustado, no están correlacionadas entre sí. Una propiedad de los diseños centrales compuestos es que mediante la elección apropiada de los puntos centrales, el diseño puede hacerse ortogonal, esto es, que las estimaciones de los parámetros para el modelo de segundo orden, están mínimamente correlacionados con las estimaciones de otros parámetros [13].

4.8.3. Precisión Uniforme.

Se dice que un diseño es de precisión uniforme si la varianza de la respuesta predicha en el centro del diseño (radio $r= 0$), es la misma que en la esfera de radio $r= 1$, esto es, se tiene una varianza constante dentro de la esfera unitaria [2].

4.9. Función conveniencia u objetivo.

A partir de una simple inspección visual de las superficies de respuestas obtenidas, no es posible encontrar las condiciones experimentales óptimas; es decir la mejor combinación de los niveles de los k factores para alcanzar simultáneamente valores aceptables para la respuesta evaluada. En estos casos es de gran utilidad la aplicación de la **función conveniencia u objetivo** de Derringer [14] ya que puede ser aplicada a sistemas de respuestas múltiples, utilizando el correspondiente modelo ajustado y seleccionando el criterio de optimización a lograr en cada caso. Los factores también deberán ser incluidos en el procedimiento de optimización simultánea a los fines de priorizar el uso de ciertas condiciones más convenientes dentro de la región experimental. En ambos casos se seleccionaron los rangos más deseables para las variables y se estableció si la misma debía maximizarse, minimizarse, mantenerse dentro de un rango o alcanzar un valor objetivo. El criterio utilizado en este trabajo de Tesis fue el de maximizar el $R\%$.

Para cada respuesta a optimizar $y_i(\mathbf{k})$ se debe calcular una función conveniencia u objetivo individual $d_i(y_{ii})$. Esta función siempre toma valores entre 0 y 1, donde para cualquier valor no deseable de la respuesta $d_i(y_i)$ es igual a 0; mientras que $d_i(y_i)$ igual a 1 representa un valor completamente deseable o conveniente, es decir una *respuesta ideal*. Los valores intermedios de $d_i(y_i)$ representan respuestas aceptables más o menos deseables.

4.10. Bibliografía.

- [1] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. Dejong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A.*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [2] G.E.P. Box, W.G. Hunter, J.S. Hunter, *Statistics for Experimenters, An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*, Wiley, New York, 1978.
- [3] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd. Ed., E. Horwood, London, 1998.
- [4] D.E. Long, *Anal. Chim. Acta*, 46 (1969) 193–206.
- [5] S. L. Morgan, S. N. Deming, *J. Chromatogr. A*, 112 (1975) 267–285.
- [6] B. Bourguignon, D.L. Massart, *J. Chromatogr. A*, 586 (1991) 11–20.
- [7] J.L. Glajch, J.J. Kirkland, K.M. Squire, J.M. Minor, *J. Chromatogr. A*, 199 (1980) 57–79.
- [8] R. Sundberg, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 24 (1994) 1–17.
- [9] R.L. Plackett, J.P. Burman, *Biometrika*, 33 (1946) 305–325.
- [10] B. Dejaegher, Y. Vander Heyden, *Acta Chromatogr.*, 21 (2009) 161–201.

- [11] R.H. Myers, D.C. Montgomery, *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, John Wiley & Sons, Ltd, 2002.
- [12] A.M. Bezerra, R. Erthal Santelli, E. Padua Oliveira, L. Silveira Villar, A.L. Escaleira, *Talanta*, 76 (2008) 965–977.
- [13] G.E.P. Box, K.B. Wilson, *J. R. Stat. Soc. B*, 13 (1951) 1–45.
- [14] G. Derringer, R. Suich, *J. Qual. Technol.*, 12 (1980) 214–219.

❖ **CAPÍTULO 5: “CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE DE UN MÉTODO ANALÍTICO: VALIDACIÓN Y CIFRAS DE MÉRITO”.**

5.1. Validación de un método analítico.

Cuando una analista aplica un método analítico para una determinación cuantitativa confía en que los resultados generados poseen cierto nivel de veracidad. A la hora de establecer la utilidad y la bondad de un método es frecuente escuchar la palabra “validación”. Existen muchas definiciones que tratan de explicar este concepto como, por ejemplo, la establecida por la farmacopea de los Estados Unidos (USP XXIII):

Validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, a través de estudios de laboratorio, que las características de performance del método cumplen con los requisitos de la aplicación analítica para la cual el método está destinado.[1].

Las características de performance, también conocidas con el nombre de criterios de performance o *cifras de mérito*, constituyen un conjunto de parámetros que intentan definir el desempeño cualitativo o cuantitativo del método, que deben ser medidas en el laboratorio durante el proceso de validación. Los criterios de performance citados por la USP son:

- a. Exactitud
- b. Precisión
- c. Especificidad
- d. Límite de detección
- e. Límite de cuantificación
- f. Linealidad
- g. Rango
- h. Rudeza
- i. Robustez

Los procedimientos analíticos pueden involucrar desde determinaciones altamente confiables hasta la evaluación subjetiva de ciertos atributos. Considerando este amplio panorama, no debe sorprendernos la existencia de distintos esquemas de validación. Si bien hay un acuerdo bastante general acerca de cuáles son las características de la performance que deben ser medidas en cada caso, la

diversidad de procedimientos es muy grande. También se encuentran diferencias acerca del significado de algunos de los términos en columnados.

La ICH (Internacional Conference on Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use), entidad que regula la terminología utilizada en el análisis farmacéutico, coincide en términos generales con la USP pero su definición es aún más clara y tajante.

El objeto de la validación de un procedimiento analítico es demostrar que es adecuado para el propósito para el que se lo destina [2].

Otra definición es la propuesta por Taylor y Oppermann:

La validación de un método consiste en documentar la calidad de un procedimiento analítico, estableciendo requisitos adecuados para criterios de performance como exactitud, precisión, límite de detección, etc. y midiendo los valores de dichos parámetros [3].

Implícito en esta definición está el hecho de que deben considerarse las características de la matriz así como también entre qué límites oscila la cantidad de analito. Es importante destacar que los resultados de la evaluación deben volcarse a un documento junto con el procedimiento empleado para su medición.

Se pueden considerar dos tipos de validación:

- **Validación interna:** Todas las etapas del proceso de validación se realizan en un único laboratorio. Es necesaria cuando un laboratorio ha desarrollado un nuevo método, o cuando se ha implementado un método proveniente de otra fuente y se necesita verificar si conduce a resultados aceptables, o bien cuando un método ya validado ha sido sometido a modificaciones críticas.
- **Validación inter-laboratorio:** Los resultados obtenidos por un mismo método se confrontan entre varios laboratorios. Se realiza en los casos en que existe un interés compartido entre las partes involucradas, o bien cuando se ha desarrollado un método que es de interés general para la comunidad científica y alguna institución profesional u organismo regulador lo va a dar a conocer bajo la forma de una *norma*, es decir un documento donde el procedimiento está suficientemente detallado de modo que cualquier operador lo pueda ejecutar sin necesidad de

información adicional.

5.1.1. *Método analítico y procedimiento analítico.*

En principio ambos vocablos se refieren al conjunto de operaciones que ejecutadas secuencialmente que conducen al resultado analítico. Cuando un método se aplica sobre un tipo determinado de muestra real se deben tomar recaudos para que la matriz no afecte los resultados, lo que usualmente obliga a adicionar etapas (extracción, adsorción, etc.) previas o posteriores al método en sí. Se dice entonces que el *método* se ha transformado en un *procedimiento*. De un mismo método pueden también derivar diferentes procedimientos con distintos niveles de exigencia, con lo que los protocolos de validación también serán diferentes.

Cuando un analista ha desarrollado un método nuevo partiendo de conceptos básicos relacionados con la técnica instrumental elegida y las propiedades químicas y físicas del analito, es necesario evaluar su potencialidad. El desarrollo raramente se lleva a cabo trabajando con muestras reales; generalmente se utilizan soluciones del analito de pureza elevada y, de ser posible, con un patrón certificado. En casos como el presente trabajo se considera que la etapa de desarrollo ha finalizado cuando se han determinado las condiciones experimentales que maximizan el rendimiento de extracción de los analitos y se ha alcanzado una separación cromatográfica adecuada de los mismos entre sí y respecto de cualquier otra sustancia que eventualmente pudiera aparecer en la matriz de interés.

A continuación se debe proceder a realizar una evaluación del comportamiento cuantitativo del método. Es discutible si esa evaluación puede ser incluida dentro de la definición de validación pues no se practica sobre muestras reales sino sobre soluciones patrones. Se suele llamar entonces *validación exploratoria*. La performance observada al trabajar con soluciones patrones probablemente sea lo máximo que se pueda esperar del método en estudio, y esto otorga una percepción acerca de si es potencialmente adecuado para las muestras reales a las cuales se lo destina. Además es importante la *validación definitiva* del método, para detectar efectos de matriz por comparación entre los resultados obtenidos con patrones puros y los resultados medidos frente a muestras reales.

La *validación exploratoria* también podría considerarse como parte integral del desarrollo de un método nuevo. Al respecto, EURACHEM [4] enfatiza que los límites entre el desarrollo de un método y su validación son difusos, y que muchos de los parámetros asociados con la validación son comúnmente evaluados, al menos aproximadamente, como parte del desarrollo del método analítico.

Para evitar confusiones de cualquier tipo el término *validación* no será empleado en este trabajo; esto no constituye un obstáculo para utilizar aquellos criterios de performance definidos en protocolos de validación que se consideran necesarios en esta etapa, así como también los procedimientos propuestos para evaluarlos. Los criterios de performance considerados pertinentes en esta etapa son:

- i. Precisión
- ii. Exactitud
- iii. Rango lineal
- iv. Límite de detección
- v. Límite de cuantificación

5.2. Características de performance estudiadas: definición y procedimiento de medida.

5.2.1. Precisión y exactitud.

La precisión es una medida de la dispersión alrededor de su media de los resultados obtenidos en mediciones independientes realizadas en forma repetitiva sobre una misma muestra. El valor de la media no será necesariamente una representación correcta del valor verdadero; el grado de coincidencia entre la media y el valor verdadero define otro parámetro importante: la exactitud. Mientras que la exactitud está relacionada con la magnitud de los errores sistemáticos, la precisión es una medida de los errores aleatorios que afectan al método y se pueden expresar a partir de la desviación estándar (*SD*), la desviación estándar relativa (*RSD*) ó la desviación estándar relativa porcentual *RSD (%)* de los resultados experimentales (Y_i):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - \bar{Y}_i)^2}{(N-1)}} \quad (5.1)$$

Donde $\bar{Y}_i = \frac{\sum Y_i}{N}$, es el valor medio correspondiente al conjunto de las N medidas realizadas.

$$RSD = \frac{SD}{\bar{Y}_i} \quad (5.2)$$

$$RSD (\%) = RSD \cdot 100 \quad (5.3)$$

Existen dos tipos extremos de precisión: la *repetibilidad* y la *reproducibilidad*. La primera de ellas expresa la dispersión que existe entre una serie de medidas independientes realizadas por un único analista en un equipo dado durante un corto periodo de tiempo y representa el nivel más básico de evaluación de la precisión [2], es decir la precisión medida en las mejores condiciones. La segunda corresponde a la precisión medida en las condiciones más adversas: diferentes analistas, en diferentes laboratorios, con distintos instrumentos, a lo largo de un tiempo dado. Entre estos extremos se pueden establecer grados de precisión intermedia. ISO [5] define un factor M (M= 1, 2 ó 3) para expresar los distintos niveles de precisión intermedia; así M= 1 significa que sólo uno de los tres factores (analistas, instrumento o tiempo) es diferente, y su estimación interesa, por ejemplo, cuando el instrumento ha sido recalibrado; M= 2 ó 3 se corresponde con la variación de dos o de todos los factores entre dos medidas sucesivas, respectivamente. El término precisión intermedia también ha sido aceptada por la ICH [6].

En una evaluación preliminar, la *repetibilidad* es el único criterio de precisión que interesa determinar. Por ejemplo, la técnica de HPLC con derivatización precolumna involucra una serie de etapas previas al análisis cromatográfico que inevitablemente ocasionan pérdidas de precisión; Snyder y col. [7] estiman un aumento de *RSD (%)* desde 1-2% para métodos que incluyen sólo operaciones pre-cromatográficas sencillas (pesada y disolución de la muestra) hasta valores de 5-10% para aquellos métodos con una etapa de derivatización, o aún mayores si los analitos están presentes al nivel de trazas [8, 9].

Por otro lado, la precisión alcanzada generalmente depende de la concentración a la cual se determina, con lo cual es necesario medir la *repetibilidad* a varios niveles de concentración del analito. ICH [10] sugiere un mínimo de 9 medidas independientes extendidas a lo largo del rango lineal (por ejemplo, tres niveles de concentración con tres réplicas cada uno).

5.2.2. Linealidad y rango lineal.

Linealidad es la capacidad que posee un método para producir respuestas proporcionales a la cantidad de analito presente. El rango define el intervalo de cantidades de analito dentro del cual se ha demostrado que una variación en dicha cantidad produce una variación en la respuesta. El rango lineal es

el intervalo de concentraciones para el cual el método se comporta *linealmente*. El extremo inferior de este rango se corresponde con el *límite de cuantificación* (LOQ); el extremo superior usualmente está definido por factores instrumentales, como por ejemplo la radiación espúrea ó la limitación asociada al uso de una banda de longitudes de onda con ancho finito al realizar detección UV [11]. Por otro lado debe tenerse en cuenta que las etapas pre-cromatográficas también pueden acortar notoriamente el rango lineal del método, por ejemplo, cuando procesos de distribución (extracción, adsorción) de los analitos entran en una región de comportamiento no-lineal.

Uno de los primeros pasos que sigue un analista a la hora de realizar una cuantificación involucra la construcción de una curva de calibración; en cromatografía, debido a la variabilidad del volumen inyectado, se prefiere graficar el área de pico como función de la masa del patrón inyectada [4] o la concentración. No es imperativo que los datos obtenidos sean ajustables a la ecuación de una recta, aunque esto es altamente deseable; por lo tanto es necesario en primer lugar verificar la extensión del rango lineal. El rango lineal del método se suele estimar a partir de un análisis de regresión de la curva de calibración, usando el valor del coeficiente de correlación como un primer indicador de linealidad. A pesar de que esta práctica es bastante frecuente, suele originar estimaciones erróneas [12]. Una inspección visual de la curva de calibración y del gráfico de residuos en función de la cantidad inyectada puede resultar ilustrativa, aunque es conveniente recurrir a pruebas más objetivas, como la prueba de F para falta de ajuste (*lack-of-fit*), o bien determinando la significancia del término cuadrático obtenido al ajustar los datos experimentales con un polinomio de segundo grado [13]. Vial y Jardy propusieron un procedimiento alternativo basado en los límites de confianza resultantes del análisis de regresión [14], objetable en razón que dichos límites resultan de las contribuciones de la falta de ajuste y del error experimental. Si se detectara no-linealidad con cualquiera de las pruebas anteriormente sugeridas, lo usual es reducir el rango de trabajo eliminando el valor superior y repitiendo el ensayo estadístico con los puntos restantes; este proceso se realiza iterativamente hasta no detectar falta de ajuste a la ecuación de una recta. Las ecuaciones utilizadas se emplean por medio de un análisis de regresión por cuadrados mínimos no ponderados (Unweighted Least-Squares Regression, ULSR) se muestran en la **Tabla 5.1**. Este procedimiento se aplica en primera instancia al conjunto completo de valores y se realiza una prueba F para detectar si los datos experimentales se ajustan al modelo de primer orden propuesto. Por razones de conveniencia computacional, el ANOVA utilizado se aplica más sencillamente usando sumatoria de cuadrados. La suma de cuadrados totales (SS_T) describe la variación total de las respuestas Y_{ij} alrededor del valor medio general \bar{Y} y está dada por:

$$SS_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \quad (5.4)$$

Donde el subíndice i se refiere a cada uno de los k niveles de concentración seleccionados y el subíndice j a cada una de las n réplicas efectuadas a cada nivel.

Tabla 5.1: Ecuaciones utilizadas en el análisis de regresión por cuadrados mínimos no ponderados (regresión por cuadrados mínimos no ponderados, Unweighted Least-Squares Regression, ULSR).

$\hat{Y} = b_0 + b_1 X_i$	(a.1)		
$\bar{X} = \frac{\sum X_{ij}}{N}$	(a.2)	$Y = \frac{\sum Y_{ij}}{N}$	(a.3)
$S_{XX} = \sum (X_{ij} - \bar{X})^2$	(a.4)		
$b_1 = \frac{\sum Y_{ij} (X_{ij} - \bar{X})}{S_{XX}}$	(a.5)	$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$	(a.6)
$s^2(b_1) = \frac{s_e^2}{S_{XX}}$	(a.7)	$s^2(b_0) = \frac{s_e^2 \sum X_{ij}^2}{S_{XX} N}$	(a.8)
$s_e^2 = \frac{\sum (Y_{ij} - \hat{Y})^2}{(N - 2)}$	(a.9)		
$Y_i = \hat{Y}_i \pm t_{(1-\alpha, \phi)} s_e \left[1 + \frac{1}{N} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{S_{XX}} \right]$	(a.10)		

Puede demostrarse que:

$$SS_T = SS_{PE} + SS_{LOF} + SS_{REG} \quad (5.5)$$

Donde:

1. SS_{PE} : es la suma de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones experimentales a un nivel X_i dado respecto a la media en dicho nivel. Esta cantidad es independiente del modelo matemático elegido; sólo depende del error experimental.

$$SS_{PE} = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (Y_{ij} - \bar{Y})^2 \quad \bar{Y}_i = \frac{\sum_{j=1}^n Y_{ij}}{n} \quad (5.6)$$

2. SS_{LOF} : Es la suma de los cuadrados de las desviaciones de las medias a cada nivel de X_i respecto de la respuesta estimada por la recta de regresión a dicho nivel. Esta cantidad depende del error experimental y del modelo matemático elegido. Si éste es incorrecto SS_{LOF} contendrá el error debido a la falta de ajuste, mientras que si el modelo es el adecuado SS_{LOF} será un estimador del error experimental.

$$SS_{LOF} = n \sum_{i=1}^k (\bar{Y}_i - \hat{Y}_i)^2 \quad (5.7)$$

3. SS_{REG} : Explica las desviaciones de la respuesta estimada respecto del valor medio general. Esta cantidad se denomina *suma de cuadrados debida a la regresión* dado que depende de la existencia de una regresión entre X e Y , haciéndose cero si Y no cambia al variar X . Es una contribución útil a la hora de evaluar la significación de la regresión.

$$SS_{REG} = n \sum_{i=1}^k (\hat{Y}_i - \bar{Y})^2 \quad (5.8)$$

Por otro lado, la suma $SS_{PE} + SS_{LOF} = SS_R$, mide la variación que no puede ser explicada por la línea de regresión y se denomina *suma de cuadrados debida a la regresión*. Estas contribuciones pueden ser arregladas en una tabla de ANOVA (**Tabla 5.2**) en la cual los cuadrados medios, MS, se obtienen dividiendo las SS por los grados de libertad (GL) correspondientes. La prueba F para probar la falta de ajuste se realiza comparando $F = MS_{LOF}/MS_{PE}$ con la distribución F para $(k-2)$ y $[k(n-1)]$ grados de libertad. Si esta relación es significativa al nivel de probabilidad elegido (MS_{LOF} significativamente mayor que MS_{PE}) se concluye que el modelo es inadecuado debido a que la variación de las medias a cada nivel respecto de la recta de calibración obtenida no puede ser explicada en términos del error experimental puro. En algunas situaciones se practica también una prueba de F para el cociente MS_{REG}/MS_R , con 1 y $(k n-2)$ grados de libertad, para detectar si la regresión es significativa; esta prueba es irrelevante en situaciones de calibración, que se basan en que la respuesta del instrumento cambia con

la cantidad de analito.

Tabla 5.2: ANOVA de un modelo de regresión simple con observaciones repetidas a cada nivel.

Fuente de variación	SS	GL	MS	F
Regresión	SS_{REG}	1	MS_{REG}	$\frac{MS_{REG}}{MS_R}$
Residual	SS_R	$kn-2$	MS_R	
Falta de ajuste	SS_{LOF}	$k-2$	MS_{LOF}	$\frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}}$
Error experimental	SS_{PE}	$k(n-1)$	MS_{PE}	
Total	SS_T	$kn-1$		

5.2.3. Límites inferiores del método.

El *límite de detección*, L_D , es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser detectada con un grado de certeza específico, pero no necesariamente cuantificada. El *límite de cuantificación*, L_Q , corresponde a la menor cantidad de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con un nivel aceptable de precisión y exactitud.

5.2.3.1. Límite de decisión (L_C) y límite de detección (L_D).

Ha habido una gran confusión con la definición del L_D , y más aún respecto del procedimiento empleado para evaluarlo. En términos generales se puede decir que el L_D corresponde a una cantidad de analito que produce una respuesta significativamente diferente de la señal del blanco. El blanco es, en principio, una muestra idéntica a la muestra de interés excepto que el analito a ser medido está ausente. Es inevitable considerar que las respuestas obtenidas en el caso del blanco (Y_{bl}) también están sujetas a error, de modo que pueden suponerse distribuidas en forma normal alrededor de un valor medio verdadero, μ_{bl} , con una desviación estándar σ_{bl} , tal como se muestra en la **Figura 5.1**.

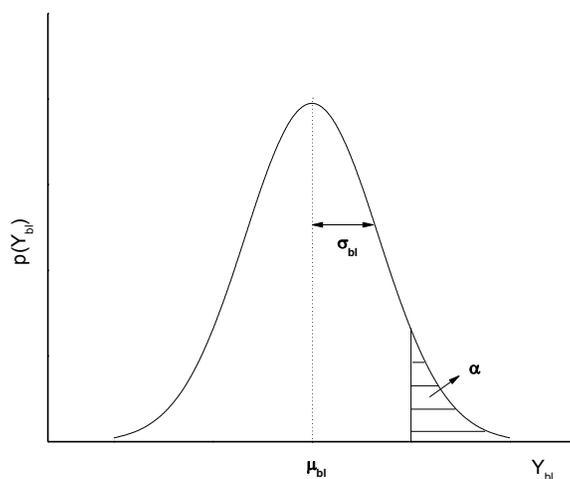


Figura 5.1: Distribución normal de las respuestas del blanco.

Se define una respuesta Y_C como:

$$Y_C = \mu_{bl} + k_C \sigma_{bl} \quad (5.9)$$

Existe una probabilidad α de que $Y_{bl} \leq Y_C$, tal que respuestas mayores que Y_C indicarán la presencia de analito; cuanto menor sea el valor de α más pequeño será el riesgo de asignar erróneamente al analito una señal debida al blanco, en otras palabras, de decir que el analito está presente cuando de hecho no lo está (error **tipo I**).

Se considera ahora una muestra de concentración verdadera L_C tal que las respuestas medidas para dicho nivel se distribuyen normalmente alrededor del valor medio Y_C con una desviación estándar $\sigma = \sigma_{bl}$ (**Figura 5.2**). A partir de la figura se deduce que el 50% de las respuestas observadas para la muestra serán menores que el valor crítico Y_C ; la probabilidad de no detectar el analito cuando realmente está presente en concentración L_C es de hecho $\beta = 0,50$ (error **tipo II**). El nivel del analito L_C se denomina *límite crítico* o *límite de decisión* y se corresponde con la cantidad para la cual se puede decidir si el analito está presente o no. Se debe notar que si se tomara como el límite de detección a la cantidad de analito que produce una señal Y_C , la probabilidad de cometer un error tipo I (decir que un analito está presente cuando en realidad no está) es muy baja pero la probabilidad de cometer un error tipo II (decir que un analito está ausente cuando en realidad está presente) es inadmisiblemente

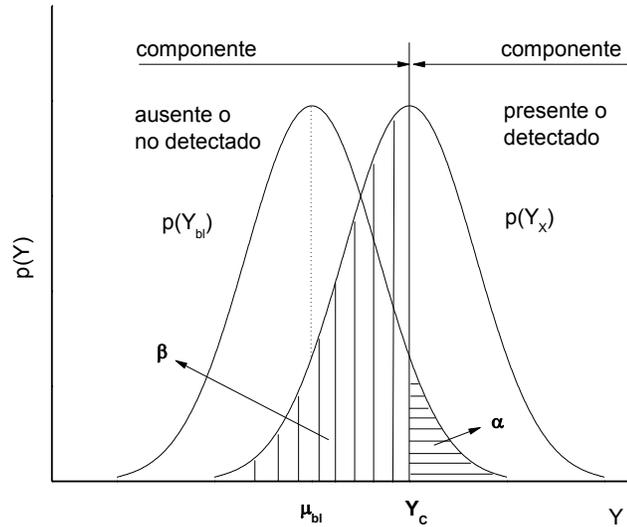


Figura 5.2: Distribución de respuestas correspondientes al límite de decisión, L_C .

elevada. Para equilibrar ambos errores las dos distribuciones se deben separar un poco más, tal como representa la **Figura 5.3**; suponiendo que las medidas realizadas cuando existe una cantidad L_D de analito presente se distribuyen normalmente alrededor de Y_D , que σ sigue siendo igual a σ_{bl} y definiendo $\alpha = \beta$, la respuesta verdadera estará dada por:

$$Y_D = Y_C + k_D \sigma_{bl} = \mu_{bl} + (k_C + k_D) \sigma_{bl} \quad (5.10)$$

De este modo sólo un $\alpha\%$ de las respuestas serán asignadas al analito cuando en realidad esté ausente, mientras que un $\beta\%$ de las medidas caerán por debajo de Y_C y serán indistinguibles respecto del blanco. El nivel de analito correspondiente a Y_D se denomina **límite de detección, L_D** .

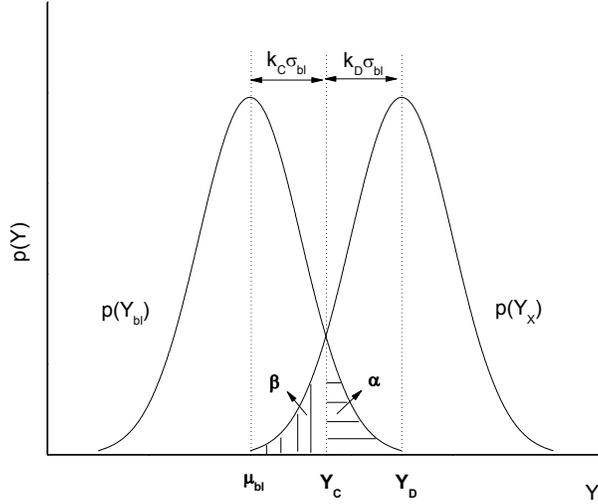


Figura 5.3: Relación entre las distribuciones normales de las respuestas obtenidas para un ensayo en blanco y para una cantidad de analito correspondiente al límite de detección, L_D .

5.2.3.2. Límite de cuantificación (L_Q).

Sobre la base de las consideraciones realizadas en la sección anterior la respuesta correspondiente a L_Q estará dada por:

$$Y_Q = \mu_{bl} + k_Q \sigma_{bl} \quad (5.11.)$$

IUPAC [15] propone $k_Q = 10$. La definición anterior asume que σ al nivel de cuantificación es igual a σ_{bl} .

Para pasar del dominio de señales (Y) al de concentraciones o masa de analito (L) se requiere una función de calibración:

$$Y = \mu_{bl} + b_1 L \quad (5.12)$$

A partir de las **Ecuaciones 5.9 a 5.11**, pueden entonces plantearse las siguientes igualdades:

$$Y_C = \mu_{bl} + k_C \sigma_{bl} = \mu_{bl} + b_1 L_C \quad \therefore \quad L_C = k_C \left(\frac{\sigma_{bl}}{b_1} \right) \quad (5.13)$$

$$Y_D = \mu_{bl} + (k_C + k_D) \sigma_{bl} = \mu_{bl} + b_1 L_D \quad \therefore \quad L_D = (k_C + k_D) \left(\frac{\sigma_{bl}}{b_1} \right) \quad (5.14)$$

$$Y_Q = \mu_{bl} + k_D \sigma_{bl} = \mu_{bl} + b_1 L_Q \quad \therefore \quad L_Q = k_Q \left(\frac{\sigma_{bl}}{b_1} \right) \quad (5.15)$$

La propuesta de IUPAC es hacer $\alpha = \beta = 0,05$, con lo que $k_C = k_D = 1.645$. Ya se ha mencionado que la propuesta para $L_Q = 10$.

La suposición de que la desviación estándar de la señal es independiente de la concentración e igual al valor en el blanco puede estar alejada de la realidad en un gran número de casos. IUPAC [15] considera someramente esta situación modificando las **Ecuaciones 5.10 y 5.11**:

$$Y_D = Y_C + k_D \sigma_{L_D} = \mu_{bl} + 1.645(\sigma_{bl} + \sigma_{L_Q}) \quad (5.16)$$

$$Y_Q = \mu_{bl} + k_Q \sigma_{L_Q} \quad (5.17)$$

Donde σ_{LD} y σ_{LQ} denotan las desviaciones estándares de la señal a las concentraciones L_D y L_Q , respectivamente.

5.2.3.3. Determinación de L_D a partir de una recta de calibración calculada mediante ULSR.

En 1970 Hubaux y Vos [16] desarrollaron un método a través del cual las prescripciones actuales de la IUPAC respecto del límite de detección pueden ser implementadas por medio de una curva de calibración y de los límites de predicción asociados con la misma, tal cual son obtenidos por ULSR. Estos últimos son las líneas que encierran la región donde se podría encontrar una futura respuesta del método con una probabilidad $1-\alpha-\beta$: el $100\alpha\%$ de los puntos caerán arriba del límite de predicción superior y el $100\beta\%$ de los puntos debajo del límite inferior. En la **Figura 5.4** se ha esquematizado un gráfico de calibración con sus límites de predicción; sobre el mismo es posible ubicar dos importantes puntos utilizando las siguientes relaciones de probabilidad, Pr:

$$\Pr[Y > \hat{Y}_C \text{ cuando } X = 0] = \alpha \quad (5.18)$$

$$\Pr[Y \leq \hat{Y}_C \text{ cuando } X = L_C] = 0,5 \quad (5.19)$$

$$\Pr[Y \leq \hat{Y}_C \text{ cuando } X = L_D] = \beta \quad (5.20)$$

Las relaciones **5.18** a **5.20** son usadas en un documento reciente de IUPAC; en realidad no agregan nada nuevo a los conceptos detallados con anterioridad, y de hecho resumen lo expresado a través de las **Ecuaciones 5.9 y 5.10** de la **Figura 5.4**.

La **Ecuación a.10** de la **Tabla 5.1** es la expresión para los límites de predicción; con ella y la **Figura 5.4** puede escribirse:

$$\hat{Y}_C = b_0 + t_{(1-\alpha, \phi)} s_e \left[1 + \frac{1}{N} + \frac{\bar{X}^2}{S_{XX}} \right]^{1/2} = \hat{Y}_D - t_{(1-\beta, \phi)} s_e \left[1 + \frac{1}{N} + \frac{(L_D - \bar{X})^2}{S_{XX}} \right]^{1/2} \quad (5.21)$$

donde $t_{(1-\alpha, \phi)}$ es el factor t de Student (de una cola) asociado con una probabilidad α de ser superado en una distribución con $\Phi = N-2$ grados de libertad; para el nivel inferior se define similarmente $t_{(\beta-1, \phi)}$. Al combinar las **Ecuaciones 5.21** y **a.1** de la **Tabla 5.1** se obtiene:

$$L_C = \left[\frac{t_{(1-\alpha, \phi)} s_e}{b_1} \right] \left[1 + \frac{1}{N} + \frac{\bar{X}^2}{S_{XX}} \right]^{1/2} \quad (5.22)$$

y

$$L_D = L_C + \left[\frac{t_{(1-\beta, \phi)} s_e}{b_1} \right] \left[1 + \frac{1}{N} + \frac{(L_D - \bar{X})^2}{S_{XX}} \right]^{1/2} \quad (5.23)$$

El cálculo de L_D por medio de la **Ecuación 5.23** requiere la aplicación de un proceso iterativo.

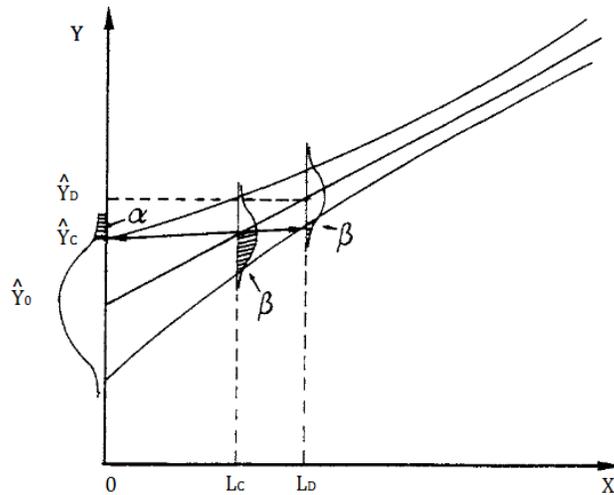


Figura 5.4: Esquema de una recta de calibración (línea central) con sus límites de predicción inferior y superior. L_C es el nivel crítico y L_D es el límite de detección.

El método propuesto por Hubaux y Vos es interesante en cromatografía y en otras técnicas analíticas en las cuales no es factible medir la desviación estándar del blanco. Debido a esta dificultad se han propuesto otros métodos para estimar el límite de detección, los que se describen en el punto siguiente. Por otro lado, es la aproximación sugerida por distintas asociaciones como la AOAC [17], la IUPAC [18] y el German Normative Institute [19].

5.2.3.4. Métodos alternativos para la determinación del L_D .

La ICH [10] ha propuesto dos alternativas para la estimación de los límites de detección y cuantificación. La más utilizada desde temprana época en el análisis cromatográfico es, sin duda, el método basado en la relación señal/ruido (S/R). Surgió a partir de la experiencia y sentido común de los analistas y carece de cualquier fundamento estadístico formal.

Sobre un cromatograma correspondiente a un ensayo en blanco sometido al método analítico en estudio se mide el ruido pico-a-pico de la línea de base, N , durante un intervalo de tiempo especificado antes y después del tiempo de retención del analito, como se muestra en **Figura 5.5**. Este valor se compara con la altura del pico de analito, S , medida en las mismas condiciones a partir de muestras conteniendo una cantidad conocida y pequeña, X , de la sustancia problema. La expresión $L = k N X / S$, permite calcular L_D si $k = 2$ (ó 3) y L_Q si $k = 10$. La SFSTP (Société Française des Sciences et Technique Pharmaceutiques) recomienda determinar el ruido pico-a-pico durante un intervalo de tiempo igual a 20

veces el ancho a mitad de altura de pico correspondiente al analito [20].

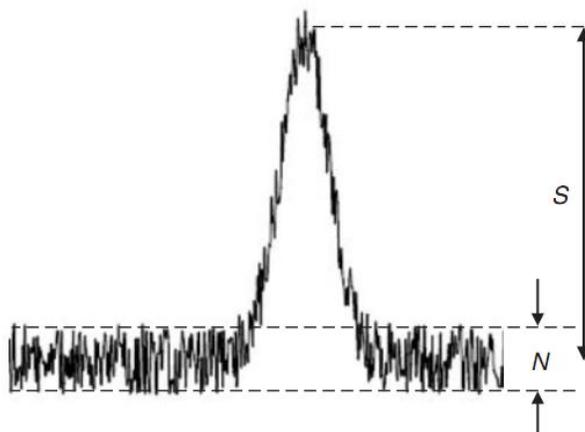


Figura 5.5: Medida de la altura del ruido y de un pico cromatográfico cercano a su límite de detección.

La segunda alternativa propuesta por ICH [10] se basa en los resultados de una curva de calibración obtenida usando soluciones patrones cuyas concentraciones sean del orden del límite de detección. Así σ_{bl} en las **Ecuaciones 5.14** y **5.15** puede ser estimado con la desviación estándar de su ordenada al origen, $s(b_0)$. En 1988, Miller y Miller [21] habían realizado una proposición similar; sin embargo, su sugerencia consistió en el uso de la ordenada, b_0 , y de s_e como estimadores de μ_{bl} y σ_{bl} , respectivamente. Cuando la precisión de las medidas es independiente de la concentración y el modelo adecuado (no se detecta falta de ajuste), s_e es una estimación de la desviación estándar σ de las medidas, es decir, del error experimental [13]. Por otro lado, $s(b_0)$ puede diferir significativamente de s_e puesto que su valor se ve afectado por la distribución seleccionada de los valores de concentración dentro de la curva de calibración. Esta propuesta de la ICH no será empleada en este trabajo.

5.2.4. Factor de recuperación y factor de enriquecimiento.

Dos cifras de mérito adicionales a las descritas anteriormente para un procedimiento analítico que involucra etapas de extracción/preconcentración, tal como el caso de la técnica DLLME, son la recuperación porcentual ($R\%$) y el factor de enriquecimiento (FE) o de preconcentración.

La $R\%$, se define como el porcentaje de la cantidad total de soluto extraída en el solvente de extracción, Q , en relación con la cantidad total de soluto inicial presente en la muestra, Q' . Para una sustancia A ,

$$R_A \% = \frac{Q_A}{Q'_A} 100 \quad (5.24)$$

Para el caso de un analito neutro, el $R\%$ es el factor p de la **Ecuación 3.7** multiplicado por 100:

$$R\% = p \ 100 = \frac{\text{milimoles en la fase de extracción}}{\text{milimoles iniciales en la muestra}} 100 \quad (5.25)$$

Para el caso de una muestra acuosa que tiene n_T moles totales de un analito dado, la $R\%$ resultará:

$$R\% = \frac{n_o}{n_T} 100 = \frac{C_o V_o}{C_a V_a + C_o V_o} 100 \quad (5.26)$$

Donde n_o es el número de moles extraídos en la fase orgánica, C_a y C_o son las concentraciones en fase acuosa y orgánica luego de la extracción, respectivamente, mientras que V_o y V_a son los respectivos volúmenes.

El FE se define como la relación entre la concentración del compuesto en la fase extractante (C_o) y su concentración inicial en la muestra (C_a):

$$FE = \frac{C_o}{C_a} \quad (5.27)$$

Si definimos a la relación de volúmenes como:

$$\varphi = \frac{V_o}{V_a} \quad (5.28)$$

La $R\%$, por ende, se puede calcular de la siguiente manera:

$$R\% = \frac{C_o V_o}{C_a V_a} 100 = FE \ \varphi \ 100 \quad (5.29)$$

5.3. Efecto de matriz en la señal analítica: método de comparación de las pendientes.

El efecto de la matriz se define, de acuerdo con la IUPAC, como: *el efecto de todos los componentes de la muestra diferentes al analito en la medida de la señal analítica*. A la hora de aplicar un método analítico, el efecto de matriz se traduce en una diferencia de sensibilidad del mismo cuando se realiza una calibración en un disolvente frente a uno preparado en el mismo entorno de la muestra. La sensibilidad debe entenderse como la variación de la señal analítica frente a la concentración de la especie a determinar, es decir, la pendiente de la curva de calibrado. Por lo tanto, la diferencia entre las pendientes de calibrado en un disolvente determinado (*calibración externa*) y en la matriz de la muestra (ya sea simulada o mediante el *método de adiciones estándar o sobreagregado*), indica la presencia de efecto de matriz. Es un efecto *indeterminado* de las especies que rodean a la muestra que *exaltan o deprimen* la señal. Cuando el efecto de una especie es *determinado* (y aditivo) se habla de interferencia [13].

En pos de explicar esta situación, veremos el procedimiento para detectar la presencia de efecto de matriz. Por lo tanto, el primer paso es preparar una serie de patrones en el disolvente mayoritario de la muestra (agua u otro solvente) y realizar un calibrado en la propia muestra añadiendo cantidades conocidas de analito. Como ya hemos discutido, procuramos trabajar en un rango de concentraciones en el que la relación señal-concentración sea lineal. Se obtienen las ecuaciones de ambas rectas de calibrado y comparamos las pendientes de las mismas. Si existe efecto matriz, habrá una diferencia *estadísticamente significativa* entre las pendientes, lo que implica que deberemos trabajar en una matriz simulada (si está disponible) o realizar un sobreagregado.

La comparación de pendientes de dos regresiones lineales (representadas como b_{11} y b_{12} , respectivamente), puede realizarse por medio de un test- t [13]:

$$t = \frac{b_{11} - b_{12}}{\sqrt{s_{b11}^2 + s_{b12}^2}} \quad (5.30)$$

Donde s_{b11} y s_{b12} son las desviaciones estándar de las dos pendientes a comparar, las cuales pueden ser determinadas de la siguiente expresión:

$$s_{b11}^2 = \frac{s_{e1}^2}{\sum_{i=1}^{n_1} (x_{i1} - \bar{X}_1)^2} \quad (5.31)$$

$$s_{b12}^2 = \frac{s_{e2}^2}{\sum_{i=1}^{n_2} (x_{i2} - \bar{X}_2)^2} \quad (5.32)$$

siendo n_1 y n_2 el número total de puntos en cada regresión lineal.

Si las varianzas, estimadas por s_{e1}^2 y s_{e2}^2 , son similares estadísticamente (la comparación se puede realizar por medio de un test- F), la varianza combinada se calcula como:

$$s_{ep}^2 = \frac{(n_1 - 2)s_{e1}^2 + (n_2 - 2)s_{e2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad (5.33)$$

En este caso, la prueba t se realiza mediante:

$$t = \frac{b_{11} - b_{12}}{\sqrt{s_{ep}^2 \left(\frac{1}{\sum_{i=1}^{n_1} (x_{i1} - \bar{X}_1)^2} + \frac{1}{\sum_{i=1}^{n_2} (x_{i2} - \bar{X}_2)^2} \right)}} \quad (5.34)$$

El valor obtenido debe compararse con el valor de t tabulados, con $n_1 + n_2 - 4$ grados de libertad y con una dada significancia, α .

Si las varianzas son distintas, puede realizarse una “prueba de Cochran” para la comparación de dos medias con varianzas desiguales ($\sigma_{b11}^2 \neq \sigma_{b12}^2$). Los valores teóricos t_1 y t_2 son obtenidos de tablas con un determinado grado de significancia y n_1-2 y n_2-2 grados de libertad, respectivamente. Luego se calcula un t' :

$$t' = \frac{t_1 s_{b11}^2 + t_2 s_{b12}^2}{s_{b11}^2 + s_{b12}^2} \quad (5.35)$$

y se compara con el valor de t obtenido de la **Ecuación 5.30**. No es necesario calcular t' si el número de puntos de las regresiones en cuestión son iguales ($n_1 = n_2$), ya que $t' = t_1 = t_2$. La comparación de pendientes de dos regresiones lineales es una herramienta comúnmente utilizada a la hora de validar un método analítico [13].

5.4. Bibliografía.

- [1] *USP XXIII, United States Pharmacopoeia. <1225> Validation of Compendial Methods.*, 1995.
- [2] *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Text on Validation of Analytical Procedure. ICH4.*, .
- [3] J.K. Taylor, H. V Oppermann, *Handbook for the Quality Assurance of Metrological Measurementn.*, Lewis Publ., 1988.
- [4] *EURACHEM Guide. The fitness for Purpose of Analytical Method*, LGC Ltd., Teddington, UK, 1998.
- [5] *ISO Standard 5725 (1 to 6). Accuracy (trueness and precisión) of measurements, methods and results*, 1994.
- [6] in: Validation of analytical procedures. Stability of new drug substances and products and Impurities in new drug substances.
- [7] L.R. Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, *Practical HPLC Method Development.*, 2nd. Ed.; ., John Wiley & Sons, New York, 1997.
- [8] L. Romero, S. Keunchkarian, M. Reta, *Anal. Chim. Acta*, 565 (2006) 136–144.
- [9] L. Romero, J.O. Grisales, M. Reta, *Talanta*, 81 (2010) 1431–1437.
- [10] *ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH4.*, .
- [11] D.A. Skook, F.J. Holler, T.A. Nieman, *Principles of Instrumental Analysis*, 5th. Ed., Harcourt Brace & Co., Philadelphia.
- [12] *Analytical Chemistry Committes, Royal Society of Chemistry.*, *Analyst*, 119, 2363, London, 1994.
- [13] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. Dejong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A.*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [14] J. Vial, A. Jardy, J. High Resolut. Chromatogr., 22 (1999) 217–221.
- [15] *IUPAC, prepared by L. A. Currie, IUPAC Commission on Analytical Nomenclature, Recommendations in evaluation of Analytical Methods including Detection and Quanification Capabilities, Pure Appl. Chem.*, 67, 1995.
- [16] A. Hubaux, G. Vos, *Anal. Chem.*, 42 (1970) 849–855.
- [17] G.T. Wernimont, W. Spendley, *Use of Statistics to Develop and Evaluate Analytical Methods*, AOAC, Arlington, VA, 1985.
- [18] *Pure Appl. Chem.*, 66 (1994) 595–608.
- [19] *German Normative Institute, DIN 32545*, Beuth, Berlin, 1994.

[20] *SFSTP, STP Pharma Practiques*, 1992.

[21] J.C. Miller, J.N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, 2nd. Ed., E. Horwood, London, 1998.

❖ CAPÍTULO 6: “ENFERMEDAD DE CHAGAS”.

6.1. Generalidades.

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, es endémica de los países del continente americano comprendidos entre México y el sur de Argentina y Chile, presentando elevados índices de mortalidad y morbilidad. El protozoo es transmitido por un insecto conocido a través de diversos nombres en diferentes regiones: *vinchuca* (desde Ecuador hasta la Patagonia), *chipo* (Venezuela), *pito* (Colombia) y *barbeiro* (Brasil), entre otros. La enfermedad fue descubierta hace más de un siglo, todavía hoy en día se estima que existen entre 8 y 10 millones de personas crónicamente infectadas en el mundo, que 50.000 nuevos casos ocurren cada año [1] y que cerca de 28 millones están en riesgo de infectarse. Además, continúa siendo la causa más frecuente de cardiomiopatía en América Latina, siendo la principal causa de muerte cardiovascular en pacientes con edades comprendidas entre 30 y 50 años [2].

Su historia se remonta a mucho tiempo antes de su descubrimiento, ya que se ha detectado rastros del protozoo en momias suramericanas de 9.000 años de antigüedad. Años más tarde, Charles Darwin describió el vector transmisor en Argentina y se dice que probablemente él mismo muriera de la enfermedad. Finalmente, en 1909, el médico brasileño Carlos Chagas pasó a la historia por describir la enfermedad, su agente causal, el vector y el ciclo evolutivo. Por lo tanto, la enfermedad de Chagas ha acompañado a los habitantes de Sur América a lo largo de su historia y ha prevalecido, al igual que lo ha hecho la pobreza, en esta zona del planeta, generando escaso interés tanto en lo que se refiere a su investigación como a su impacto mediático [3].

Por todo esto, fue clasificada por la Organización Mundial de la Salud (OMS), al igual que otras enfermedades tropicales infecciosas como la leishmaniasis o la “*enfermedad del sueño*”, como una de las “enfermedades olvidadas”, debido principalmente a que afectan a las poblaciones más pobres del planeta y, por lo tanto, no representan un retorno lucrativo suficiente que justifique una inversión de la industria farmacéutica en investigación y desarrollo de nuevos medicamentos para su tratamiento. Como consecuencia, a pesar de afectar a millones de personas en todo el mundo, a la fecha, no existen tratamientos eficaces o adecuados para ellas. En el caso de la enfermedad de Chagas, desde hace más de cuatro décadas sólo existen dos drogas disponibles en el mercado para su tratamiento: nifurtimox y benznidazol (**Figura 6.1.a** y **6.1.b**, respectivamente), y su utilidad en la fase crónica de la enfermedad

todavía está por demostrarse [3].

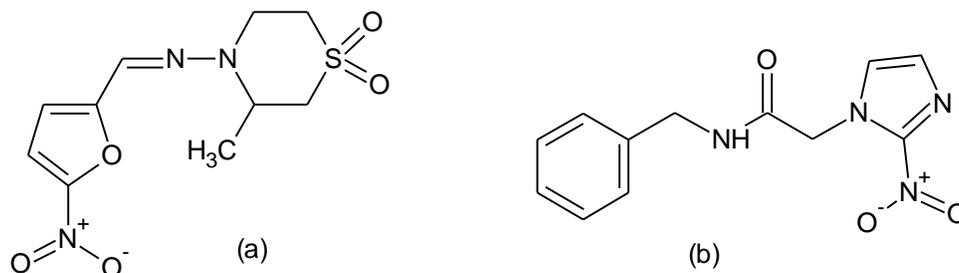


Figura 6.1: (a) Nifurtimox (NFX); (b) Benznidazol (BNZ).

Otras enfermedades olvidadas a las que se les ha dado mayor importancia en los últimos años debido, entre otras cosas, a que también han afectado en gran medida a países occidentales, son la malaria, el VIH y la tuberculosis. Así en un informe reciente de la OMS [3] se puede ver que, aproximadamente el 80% del presupuesto global dedicado a las “enfermedades olvidadas” se empleó en estas tres enfermedades, relegando aún más al olvido a otras como la enfermedad de Chagas.

6.2. El parásito.

T. cruzi es un protozoo de la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida* y género *Trypanosoma*. Este género está constituido por cerca de 20 especies de las que dos son patógenas para el ser humano, *T. cruzi*: *i.* agente etiológico de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana y *ii.* *T. brucei*: agente etiológico de la enfermedad del sueño o Tripanosomiasis africana. Cada una de estas dos especies está delimitada a un continente diferente, sin que exista solapamiento de sus áreas endémicas.

T. cruzi pasa por tres fases morfológicas: epimastigote, amastigote y tripomastigote. Se multiplica en el huésped mamífero de manera discontinua en forma de amastigote y completa su desarrollo en el intestino posterior del vector, transformándose en tripomastigote (forma infectiva) que saldrá con las heces. Las aproximadamente 130 especies de vinchucas se alimentan de sangre de vertebrados, pica a un ser humano o a otros mamíferos y puede transmitirle la infección a través de sus heces, ya que a la vez que se alimenta de sangre, el insecto defeca. Tras la picadura, cualquier pequeña solución de continuidad o el contacto con la conjuntiva permite al parásito entrar en la circulación

sanguínea. Al ingresar en el organismo, el tripomastigote es fagocitado por los macrófagos en cuyo citoplasma se transforma en amastigote y se divide por fisión binaria. A los 5 días vuelve de nuevo al estadio de tripomastigote, se rompe la célula y se distribuye por el organismo a través de la circulación sanguínea y linfática, penetrando en las células de los tejidos por los que tiene especial tropismo (tejido miocárdico y tubo digestivo principalmente), donde se transforma de nuevo en amastigote.

Periódicamente estos amastigotes intracelulares pasan al estadio de tripomastigotes metacíclicos y se liberan a sangre, momento en el que pueden ser ingeridos por otro insecto vector no infectado. En el interior del vector pasa a la porción media del tubo digestivo donde se diferencia a epimastigote (forma de reproducción asexual en el vector), se multiplica por fisión binaria y migra a la porción final del tubo digestivo quedando anclado a la pared por su flagelo donde se transforma de nuevo a tripomastigote metacíclico y sale con las heces la próxima vez que el insecto se alimenta, infectando a otro ser humano y cerrando así el ciclo.

Los huéspedes definitivos son, además del ser humano, animales vertebrados domésticos (perros y gatos) y silvestres (armadillos, zarigüeyas, murciélagos y ratas comunes), los cuales además de por la picadura pueden infectarse comiendo estos insectos. Animales de los que puede también alimentarse el vector pero que son refractarios a la infección son: pájaros, reptiles y anfibios.

Se han descrito tres linajes diferentes de *T. cruzi* [4]:

- T. cruzi I*: asociado con enfermedad en el ser humano en todos los países endémicos al norte del Amazonas, predomina en el ciclo selvático y parece ser menos resistente a fármacos.
- T. cruzi II*: asociado con daño orgánico en el ser humano en los países del Cono Sur como Brasil y Argentina, predomina en el ciclo doméstico y parece responder peor al tratamiento.
- T. cruzi III*: recientemente descrito (2006), no se ha relacionado claramente con ningún grado de afectación orgánica.

6.3. Vías de transmisión.

6.3.1. Vía vectorial.

En más del 80% de los casos de transmisión en área endémica, ésta se produce a través de la picadura de vinchucas que se introducen en las grietas de las casas de adobe dónde viven, picando a sus habitantes por la noche. Estos insectos hematófagos pertenecen a la familia *Hemiptera reduviidae*. El

tamaño de los insectos adultos varía entre 1,5 y 2 cm de longitud y el color es variable según la especie. Se reproducen mediante huevos, poniendo cada hembra cientos de ellos cuando empiezan los primeros calores y posteriormente durante todo el verano y parte del otoño. La eclosión tiene lugar entre los 15 y 50 días, según la temperatura ambiente, tras la cual experimentan una metamorfosis incompleta (huevo, ninfa y adulto) pasando las ninfas por cinco estadios antes de llegar a adulto.

Para pasar de un estadio a otro necesitan alimentarse, los estadios 1, 2 y 3 pueden realizar la muda con una ingesta sanguínea completa, pero los estadios 4 y 5 normalmente requieren comer más de una vez para mudar. Los adultos suelen picar cada quince días, aunque en ausencia de alimento pueden permanecer activos unos cuatro meses. Tanto los machos como las hembras se alimentan de sangre en cantidad que puede llegar hasta 8 ó 9 veces su propio peso. El vector se vuelve infectante a los 30-40 días de haber ingerido la sangre infectada, puede ser infectivo en todos sus estadios desde que comienza a alimentarse y persiste infectado toda su vida (un año aproximadamente).

Todas las especies de vinchucas pueden vivir tanto en el ambiente extra como intra domiciliario del hombre, y todas son capaces de transmitir *Trypanosoma cruzi*. Las especies con mayor capacidad vectorial y con mayor distribución geográfica son *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* [4].

Según el hábitat preferido del insecto se distinguen tres ciclos de transmisión de *T. cruzi* en los que interviene el vector [5]:

- *Ciclo doméstico*: La estructura de las casas rurales o peri-urbanas las hace especialmente vulnerables: las paredes de adobe, los techos de paja y las grietas ofrecen un hábitat ideal para estos insectos. Además, la estrecha asociación presente entre los habitantes de estas casas y los animales domésticos constituye una fuente de sangre abundante y de fácil acceso, por lo que se alcanzan grandes densidades del vector en el interior de estas viviendas.

- *Ciclo peri-doméstico*: Sirve de nexo entre el ciclo doméstico y el selvático. En él intervienen gran variedad de mamíferos (roedores, marsupiales, perros) que entran y salen libremente de las viviendas, y vinchucas selváticas que son atraídos a las casas por la luz y el alimento.

- *Ciclo selvático*: Intervienen vinchucas selváticas que infectan a numerosas especies y subespecies de mamíferos salvajes, terrestres o arbóreos. En este ciclo selvático, los mamíferos pueden adquirir la infección también al ingerir vinchucas infectadas.

El número de picaduras infectivas que reciba una persona dependerá de la densidad vectorial existente en su casa, así como del número de animales y de habitantes que vivan en ella. La probabilidad de adquirir la infección después de una picadura de una vinchuca es de un 1% aproximadamente [6].

6.3.2. Vía transfusional/trasplante de órgano sólido.

La transfusión sanguínea, de sangre completa o de hemoderivados, es la segunda forma más frecuente de adquirir la infección, después de la transmisión vectorial, en diversas zonas de América. Sin embargo, en áreas urbanas donde no es habitual encontrarse el vector, así como en zonas fuera del área endémica, se produce la principal vía de transmisión.

Aproximadamente un 20% de las personas que reciben una transfusión de un donante infectado adquieren la infección [7], dependiendo el riesgo de diferentes factores como la concentración de parásitos en la sangre del donante, el componente transfundido (parece ser mayor en la transfusión de plaquetas) o de la cepa del parásito [8].

El trasplante de órgano sólido también puede transmitir la infección. El trasplante cardiaco de un donante con enfermedad de Chagas crónica está totalmente contraindicado debido al alto riesgo de que el receptor desarrolle una miocarditis chagásica en el momento de la inmunodepresión. No existe consenso acerca del uso de otros órganos de donantes infectados. En el caso de que se realice el trasplante, se recomienda un seguimiento estrecho del receptor con serología y técnicas parasitológicas desde la primera semana postrasplante. Si se demuestra la existencia de infección se deberá realizar tratamiento profiláctico con benznidazol 30-60 días o con nifurtimox 90-120 días [9].

6.3.3. Vía congénita.

Una mujer embarazada puede transmitir el parásito al feto en cualquier estadio de la infección y en cualquier momento del embarazo, incluso durante el parto. Los mecanismos implicados en la transmisión no se conocen con exactitud: se sabe que *T. cruzi* invade y se multiplica en las células de Hofbauer de la placenta, desde donde libera tripomastigotes al embrión. Para que se produzca la infección trasplacentaria debe de existir parasitemia detectable en la mujer embarazada, siendo por tanto más frecuente en la fase aguda, pero llama la atención el hallazgo de placentas parasitadas sin infección en el neonato. Además una misma mujer puede dar a luz niños con infección congénita en uno o más

embarazos y a su vez una hija infectada podrá transmitir en un futuro la infección a sus hijos, lo que se conoce como Chagas congénito de segunda generación. De esta forma, la vía de transmisión maternofetal puede propagar la infección en áreas no endémicas e incluso en personas que nunca han vivido en área endémica.

La tasa descrita de transmisión congénita oscila entre un 1 y un 10%. En un estudio realizado en Bolivia, se observó una tasa de transmisión congénita del 5-6% [10], similar a la descrita en Argentina [11] pero mayor que en Brasil [12] o Paraguay [13]. Recientemente se ha publicado un estudio realizado en mujeres latinoamericanas embarazadas residentes en Barcelona que ha demostrado una tasa de transmisión vertical del 7.3%, sin observarse complicaciones en el curso del embarazo ni en el recién nacido. Además se han obtenido unas cifras de seroprevalencia en mujeres latinoamericanas en edad fértil del 3.4%. Teniendo en cuenta el número de mujeres latinoamericanas inmigrantes en ese rango de edad y que estas mujeres pudieran tener cada una un niño en los próximos 10 años, los autores hicieron una estimación tras la que esperan encontrar unas 24.000 mujeres en edad fértil infectadas y 1.750 neonatos infectados [14].

Otras posibles vías de transmisión, que se han dado en ocasiones, pero siempre de manera esporádica (<1%), incluyen:

- Accidente de laboratorio: vía conjuntival por aerosoles producidos tras centrifugar muestras contaminadas o por pinchazos con agujas infectadas.
- Ingestión oral: se han dado brotes tras la ingestión de jugos de caña de azúcar y de agua contaminada con heces de vinchuca, principalmente descritos en Brasil y en Venezuela [15]. Estos casos generalmente se presentan de forma aguda con una alta parasitemia y una alta mortalidad [16].

6.4. Evolución de la distribución de la enfermedad.

La enfermedad de Chagas era inicialmente una enfermedad exclusiva de zonas rurales y cálidas dónde habitaba el vector transmisor y dónde el ser humano entró en contacto de manera accidental con sus focos naturales. Así al trabajar las tierras de las áreas enzoonóticas, se forzó a las vinchucas infectadas a ocupar las viviendas humanas dónde encontraron un refugio y suficiente alimento en la sangre humana y en la de los animales domésticos. El aislamiento geográfico de estas zonas, el escaso desarrollo rural, el hábitat propicio para la vinchuca, la falta de integración y la carencia de trabajo y de recursos para sus habitantes, así como los obstáculos que éstos presentan para acceder a la información y

a los procesos educativos, consolidan un escenario difícil de abordar.

Aún así y debido a los altos índices de morbilidad descritos para esta enfermedad [17], comenzaron a llevarse a cabo diferentes iniciativas de control vectorial en distintos países endémicos. Surgieron así las Iniciativas de los países del Cono Sur: Argentina, Brasil, Bolivia, Chile, Paraguay y Uruguay (INCOSUR: 1991), de los Países Andinos (IPA: 1997), de Centro América (IPCA: 1997) y del Amazonas (AMCHA: 2004). Su objetivo es disminuir la principal vía de transmisión mediante la fumigación de las viviendas con insecticidas de efecto residual (piretroides), la vigilancia continua de su reinfección por las vinchucas, así como el control de la sangre usada en los centros de transfusiones.

Estudios posteriores han demostrado que estos controles han reducido la incidencia de la enfermedad en un 70% en los países del Cono Sur, observándose por ejemplo en Argentina reducciones del 92% en las tasas de infestación domiciliar en todas las provincias endémicas. Bolivia es uno de los países más retrasados a este respecto, debido a que no se pusieron en marcha estos programas hasta el año 1998; aun así en ciertas áreas donde el porcentaje de casas infestadas era del 70%, después de la fumigación ha disminuido a un 3%. Países como Uruguay, Chile y Brasil fueron declarados libres de transmisión por *Triatoma infestans* en los años 1997, 1998 y 2006 respectivamente. Además se ha visto una disminución en las tasas de infección en niños menores de 5 años.

Aun así, queda mucho por hacer debido a la existencia de focos difíciles de evaluar por su pobre acceso, el riesgo de reinfección debido a la probable inclusión de *Triatoma infestans* en un ciclo selvático, principalmente en Bolivia y la aparición de resistencias de las vinchucas a los productos insecticidas en algunas zonas de Argentina.

A principios del siglo XXI, los movimientos migratorios a las ciudades cambiaron las características epidemiológicas de la enfermedad: las personas infectadas que migraron buscando mejores oportunidades de trabajo se establecieron en los cinturones de pobreza alrededor de las grandes ciudades, donde existe menor densidad vectorial pero donde comenzaron a cobrar mayor importancia otras vías de transmisión de la infección diferentes a la vectorial, como la transmisión vertical o las transfusiones sanguíneas, y donde las posibilidades de acceder a una atención médica adecuada son escasas. Actualmente se estima que alrededor del 70% de la población latinoamericana vive en áreas urbanas, cuando las cifras en los años 30 mostraban que el 70% habitaba en áreas rurales.

Años más tarde, los movimientos migratorios a otros continentes llevaron la enfermedad a países donde no se había considerado antes el diagnóstico, como Europa y América del Norte. España ha sido tradicionalmente un destino atractivo para la población latinoamericana, debido fundamentalmente a los

vínculos históricos, culturales y lingüísticos existentes. Así, en los últimos años se ha producido un aumento exponencial de inmigración latinoamericana, lo cual ha tenido implicaciones de salud pública debido a la posibilidad de transmisión de la infección por distintas vías.

Así, como podemos ver en la **Figura 6.2**, la distribución geográfica inicial de esta infección se ha visto ampliada debido a los movimientos poblacionales, traspasando los límites de distribución del vector y llegando a otros continentes donde la transmisión ha continuado a través de otras vías diferentes a la vectorial [18–22].

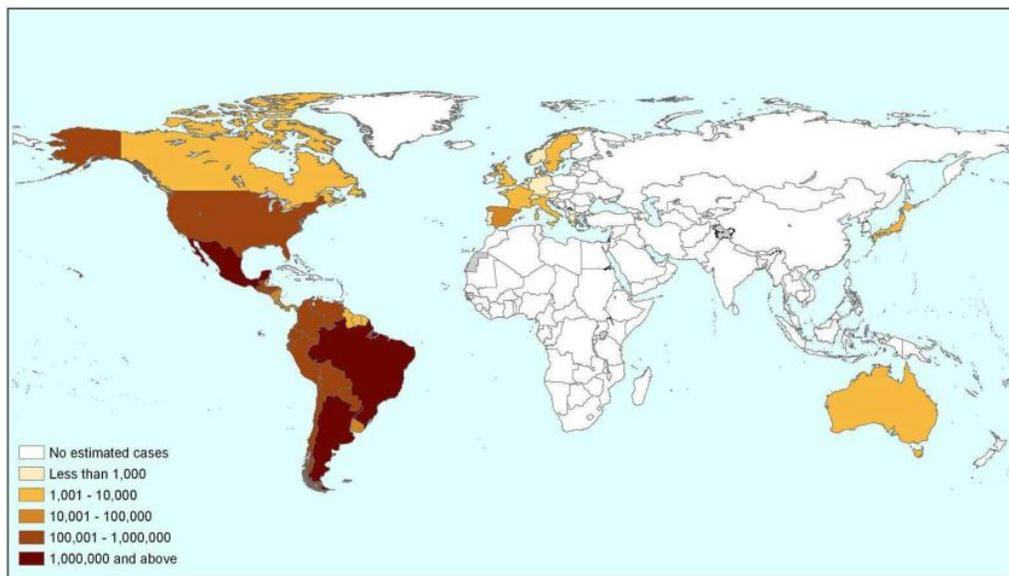


Figura 6.2: Estimación de la población infectada por *T. cruzi* a nivel mundial, 2009.

Aproximadamente el 90% de la población argentina vive en zonas urbanas, lo que explica la gran cantidad de nuevas infecciones en niños que nacen o viven en áreas densamente pobladas como la ciudad de Buenos Aires. Un estudio llevado a cabo en centros de salud de la ciudad de Buenos Aires reveló una prevalencia de infección por *T. Cruzi* del 2% de la población pediátrica estudiada [23].

6.5. Drogas disponibles para el tratamiento de la enfermedad.

Como se ha comentado, actualmente sólo existen dos drogas disponibles: nifurtimox (3-metil-*N*-[(5-nitro-2-furanyl)-metilen]-4-tiomorfolinamina-1,1-dioxido, NFX) y benznidazol (*N*-bencil-2-(2-

nitroimidazol-1-il)acetamida, BNZ), ambos pertenecientes al grupo de los benzimidazoles (**Figura 6.1**) [24–26]. A pesar de que benznidazol y nifurtimox fueron desarrolladas hace más de 40 años, sus propiedades farmacológicas no han sido estudiadas en detalle. En especial, la información disponible sobre la farmacocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación) de estas drogas es rudimentaria en el mejor de los casos, y virtualmente inexistente en poblaciones especiales como los niños, los ancianos y las mujeres embarazadas o lactantes. Este déficit de conocimiento acarrea numerosas complicaciones y riesgos asociados al tratamiento de la enfermedad de Chagas, riesgos que son particularmente notables en aquéllas poblaciones más vulnerables y para las que la información es más escasa, como son los niños. Aunque el tratamiento farmacológico de la enfermedad de Chagas es efectivo si se administra durante la etapa aguda de la infección, los medicamentos disponibles requieren de administración prolongada (más de 30 días) y presentan toxicidad significativa, especialmente en adultos [27–29].

Por otro lado, el benznidazol y el nifurtimox tienen una efectividad limitada en el tratamiento de la enfermedad crónica, y se asocian a importantes eventos adversos que llevan comúnmente a la suspensión del tratamiento [30, 31]. Las reacciones más severas asociadas al benznidazol tales como reacciones mucocutáneas severas y granulocitopenia se observan con frecuencia en adultos [27], pero son raras y casi universalmente leves en los niños [32, 33].

De manera similar a lo observado en el tratamiento con benznidazol, la toxicidad asociada a nifurtimox parece aumentar en frecuencia con la edad, existiendo informes de excelente tolerancia del medicamento en lactantes y niños pequeños. Los mecanismos detrás de las diferencias observadas en tolerancia no han sido explicados adecuadamente hasta el momento y la posibilidad de que la producción de metabolitos tóxicos o activos juegue un papel importante en este aspecto no ha sido evaluada hasta el momento. Las reacciones adversas asociadas al uso de nifurtimox presentan un espectro similar a las de benznidazol, pero con una mayor prevalencia de neuropatía periférica, anorexia severa, pérdida de peso, y reacciones hematológicas [34].

No se han desarrollado fármacos nuevos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas en las últimas tres décadas, a excepción de una droga reciente, posaconazol, que se encuentra actualmente en evaluación clínica [35, 36]. Sin embargo, los costos de drogas nuevas podrían volver prohibitivo el tratamiento de la enfermedad en los lugares donde ésta es endémica, que coinciden con áreas donde la pobreza también lo es.

Nifurtimox se comercializó por Bayer en 1967 con el nombre de Lampit y benznidazol por Roche en 1972 como Rochagan® o Radanil. Actualmente ninguna de las dos compañías farmacéuticas continúa con la producción por la falta de intereses económicos y por tanto actualmente es difícil obtener estos fármacos. La producción de benznidazol ha sido recientemente transferida a los laboratorios Lafepe, en Pernambuco, Brasil, donde también se está desarrollando una formulación pediátrica [25]. La producción de nifurtimox se suspendió por parte de Bayer en Argentina en 1997. En el año 2000, y para cumplir los compromisos con la OMS para el tratamiento de la enfermedad del sueño, se reinició la producción en la planta de Bayer en Ilopango, El Salvador. Actualmente hay un acuerdo con el laboratorio farmacéutico por el que la producción de nifurtimox queda garantizada mientras exista demanda. Junto a esto, Bayer llegó a un acuerdo con la OMS para donar el fármaco durante cinco años para cubrir las necesidades de los países latinoamericanos.

Benznidazol se dosifica generalmente de 5 a 7,5 mg/kg/día, en dos o tres tomas, durante 30 a 60 días y está disponible en comprimidos de 100 mg. Nifurtimox se administra en dosis de 8 a 10 mg/kg/día, dividido en tres o cuatro tomas, durante 90 a 120 días y está disponible en comprimidos de 30 y 120 mg. El mecanismo de acción de ambos fármacos no se conoce con exactitud; parece que actúan a través de la generación de radicales nitrogenados producidos por las nitroreductasas humanas que, en presencia de oxígeno se transforman en radicales libres. La deficiente actividad detoxificadora de estos compuestos por *T. cruzi* le haría mucho más sensible que las células humanas [34, 37]. La mayor parte del metabolismo de estos fármacos se lleva a cabo en el hígado por el sistema citocromo p 450, y en mucha menor medida, por las enzimas xantina oxidorreductasa y aldehído oxidasa. Dado que en experimentos con animales se ha visto que atraviesan la placenta y son teratogénicos, no se recomienda su administración a mujeres embarazadas [34].

Ambos fármacos demostraron rápidamente su eficacia frente a *T. cruzi*, pero presentan una serie de inconvenientes: *i.* su eficacia varía en función del tiempo que el paciente lleve infectado, disminuyendo según aumenta el tiempo de evolución; *ii.* Su tolerancia no es buena, presentando efectos secundarios principalmente, en el caso del benznidazol que es el más usado, en forma de hipersensibilidad cutánea, lo que conlleva a una tasa de abandono de un 15% aproximadamente. *iii.* La duración del tratamiento es prolongada, lo que junto con su elevado precio y la necesidad de seguimiento estrecho disminuye la adherencia; *iv.* No existen formulaciones pediátricas adecuadas.

Por otra parte, se han realizado diferentes estudios con otros fármacos disponibles, sin obtener resultados alentadores hasta el momento, como son la combinación de ketoconazol y de ofloxacino con benznidazol [38].

Dos nuevos fármacos están listos para entrar en estudios clínicos en humanos: el ravuconazol, prodroga que se ha mostrado su eficacia en estudios *in vitro* y en estudios en animales [39, 40] y el posaconazol, que ha demostrado eficacia en la erradicación de amastigotes intracelulares en cardiomiocitos *in vitro* [41] y en algún caso aislado *in vivo* [42].

6.6. Antecedentes sobre la determinación de fármacos antichagásicos.

En los estudios modernos de farmacocinética poblacional se enfoca a un sector de la población (por ej. la población pediátrica), en lugar de la evaluación de cada individuo en particular [43, 44]. Esto permite obtener conclusiones de parámetros poblacionales promedio, con una mejor idea de cómo se comporta el medicamento a gran escala. Estos estudios requieren un número pequeño de muestras por cada individuo, pero de un número más elevado de participantes. La limitada intervención al individuo, hace que los estudios poblacionales sean el diseño ideal, y en algunos casos, el único posible para la investigación farmacológica en niños [45]. Este diseño ha sido recomendado como el método estándar para los estudios de farmacocinética en la población pediátrica.

García-Bournissen y col. han publicado el primer estudio de farmacocinética poblacional aplicando un modelo al fenómeno de pasaje de medicamentos a la leche materna, tratándose en este caso de NFX [46]. Se utilizó una estrategia de análisis de datos pre-existentes de pacientes adultos combinado con modelos de farmacocinética poblacional y simulación para demostrar que la probabilidad de exposición significativa a través de la leche materna al NFX es limitada, por lo que **la suspensión de la lactancia en una madre tratada con el fármaco no debería ser considerada obligatoria**, en base a la información disponible. Sin embargo, es necesario estudiar más en detalle la transferencia (o ausencia de la misma) de NFX a la leche materna para poder realizar esta recomendación de manera universal. En particular, se necesita poner a punto las técnicas para el dosaje de NFX en leche, una matriz que presenta una particular dificultad desde el punto de vista analítico. Este paso está contemplado dentro de los objetivos de la presente propuesta, así como la extensión de la metodología al estudio del BNZ.

Dentro de las posibles técnicas aplicables a la cuantificación de BNZ, NFX y sus metabolitos, la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) es la mejor aceptada, y considerada la metodología

de referencia. Sin embargo, los protocolos disponibles en la literatura sólo contemplan la detección y cuantificación de las drogas madres, sin incluir sus respectivos metabolitos [47–49]. Por otro lado, no se ha desarrollado una cantidad suficiente de metodologías analíticas y pre-analíticas para ser utilizadas en diferentes matrices biológicas (sangre, plasma, etc.), encontrándose en la literatura escasos estudios para matrices no tradicionales (por ej. leche materna, muestras de tejidos, pelo, etc.) ó métodos de muestreo adecuados para el estudio poblacional o de metabolitos.

Existen varios trabajos publicados sobre determinaciones analíticas de BNZ. Raaflaub y Ziegler investigaron la biodisponibilidad del compuesto en plasma mediante polarografía diferencial de pulsos, los autores obtuvieron recuperaciones porcentuales de 78% y una reproducibilidad de 3,5% [50]. Walton y Workman determinaron BNZ y sus derivados de amina metabolizada en plasma humano mediante HPLC-UV con una $R\%= 90\%$ y un reproducibilidad de 3,2% [51]. Barbeira y colaboradores han cuantificado BNZ por polarografía diferencial de pulsos en formulaciones farmacéuticas, obteniendo $L_D = 4 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ y un $RSD (\%) = 2\%$ (comparado con el valor suministrado por el fabricante) [52]. LaScalea y col. investigaron el comportamiento voltamperométrico de BNZ con un electrodo de carbono vítreo y un biosensor de ADN [53]. Este último permitió el estudio de las interacciones BNZ–DNA mediante el uso de ADN inmovilizado en la superficie del electrodo. Algunos autores han desarrollado métodos cromatográficos para cuantificar BNZ en plasma u orina con el objetivo de estudiar la farmacocinética en humanos [50, 54–57]. Guerrero y col. han determinado BNZ en plasma a partir de un método simple que consiste en la precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético, obteniendo una $R\%= 94,6\%$ con L_D y L_Q de 0,8 y 1,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente y $RSD (\%)$ intra-interdía de 1,1 y 3,9%, respectivamente.

Se han publicado algunos métodos para la determinación de NFX en fluidos biológicos, incluyendo cromatografía en capa fina (TLC) con detección óptica [58] y HPLC-UV [54, 49]. Los resultados obtenidos por TLC de ensayos en suero, plasma y orina tras la administración oral de NFX en ratas, perros y seres humanos permitió una determinación cuantitativa de la droga con una sensibilidad menor a 0,5 mg mL^{-1} . Esto dio lugar al desarrollo de un procedimiento fácil de preparación de muestras para estudios farmacocinéticos en pacientes con insuficiencia renal crónica [58]. Paulos y col. cuantificaron NFX en plasma humano a partir de una técnica HPLC-UV, obteniendo una $R\%= 90,6\%$, $L_D = 77 \text{ ng mL}^{-1}$ y $RSD (\%)$ intra-interdía de 3,5 y 4%, respectivamente.

La determinación de *cuál es la concentración real de BNZ o NFX en plasma* es un punto especialmente relevante en el contexto de esta Tesis, ya que sería muy importante conocer si los límites

de detección (L_D) y cuantificación (L_Q) alcanzados por los diferentes procedimientos analíticos actualmente disponibles son suficientes o se deben mejorar (bajar). Esto significa que se requiere del desarrollo de técnicas con límites de detección muy bajos, adecuados para obtener conclusiones válidas para la aplicación clínica. En este sentido, las técnicas de preconcentración se vuelven necesarias en el momento del abordaje de matrices complejas con bajas concentraciones de los analitos. Aparentemente, existen dos contextos diferentes: las concentraciones plasmáticas en adultos y en niños. Originalmente se propuso un rango terapéutico entre 3 y 6 mg mL⁻¹ en las muestras de plasma de un adulto, para ambas drogas, sobre la base de datos *in vitro* y resultados de estudios farmacocinéticos, pero valores más bajos fueron observados en los pacientes pediátricos [49, 59, 60]. Recientemente, Altcheh y col. informaron una alta concentración de BNZ en plasma pediátrico, a diferencia de las bajas concentraciones informada en adultos. Por lo tanto, *la concentración plasmática de estas drogas en el límite inferior de significancia clínica todavía debe determinarse definitivamente*, especialmente en el área pediátrica [60].

Como se ha comentado, la leche materna humana es una muestra biológica de gran importancia para el análisis de estos medicamentos, ya que la exposición no deseada a este alimento puede resultar en efectos farmacológicos en el lactante. *El objetivo del análisis de estas drogas en leche materna es investigar el nivel de exposición del recién nacido a un fármaco durante la lactancia y también evaluar los riesgos potenciales de la terapia*. De todos modos, la evaluación de los posibles riesgos para el recién nacido y los lactantes no se limita sólo a la determinación de las concentraciones de la droga en la leche, sino que también debe incluir estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos (ej. reacciones adversas), y los riesgos potenciales de interrupción de la lactancia materna, entre otros factores. Por estas razones, *la valoración de riesgos requiere el conocimiento exacto de las concentraciones de estos fármacos en la leche materna para poder estimar la exposición infantil*.

El traslado de drogas desde el plasma humano a la leche materna se produce principalmente por difusión pasiva según el peso molecular, ionización del fármaco, solubilidad en lípidos, proteína vinculante y flujo sanguíneo mamario [61–64]. Sin embargo, se desconoce hasta qué punto NFX o BNZ son transportados a la leche materna. Sin este conocimiento, la mayoría de los médicos que tratan a pacientes adultos con enfermedad de Chagas, se niegan a tratar a las mujeres durante la lactancia. De hecho, en ninguno de los pocos formularios que incluyen BNZ ó NFX (ej. formulario modelo de WHO; <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/>) indican que no es compatible con la lactancia. En definitiva, el formulario no facilita ninguna información en lactancia, o declara que no es compatible

debido a la falta de datos suficientes. Sin embargo, partiendo de un análisis teórico, se supone que la transferencia de NFX a la leche materna es limitada y que es improbable que conduzca a una exposición significativa de los infantes [46].

La falta de información sobre la transferencia de estas drogas a la leche materna y el potencial impacto público sobre la salud que podría proporcionar el tratamiento de lactantes con enfermedad de Chagas, nos plantea un ensayo clínico para estudiar el grado de transferencia de estas drogas. En este contexto, se necesita desarrollar un procedimiento adecuado para el tratamiento previo de la muestra con un posterior método de análisis para la determinación confiable de estas drogas en esta matriz biológica, caracterizada por su complejidad y variabilidad.

6.7. Bibliografía.

- [1] J.A. Rassi, A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 104 (2009) 152–158.
- [2] A. Moncayo, Salud OMDl. Rep. sobre la Enferm. Chagas. 17–20 abril 2005. Actualizado en julio 2007., (1997) 195–198.
- [3] A.P. de A. Balzola, (2011) 95.
- [4] A.J. Rassi, A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Lancet, 375 (2010) 1388–1402.
- [5] F. Rosas, D. Venegas, M. Cabrales, Eds., *Enfermedad de Chagas.*, Sociedad Colombiana de Cardiología y Cirugía Vascul. Sociedad Española de Cardiología, 2007.
- [6] J.E. Rabinovich, C. Wisnivesky-Colli, N.D. Solarz, R.E. Gurtler, Bull World Heal. Organ, 68 (1990) 737–746.
- [7] G.A. Schmunis, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 94 (1999) 93–101.
- [8] C. Bern, S.P. Montgomery, L. Katz, S. Caglioti, S.L. Stramer, Curr. Opin. Infect. Dis., 21 (2008) 476–482.
- [9] P. Martín-Davila, J. Fortun, R. Lopez-Velez, E. Al., P. Martín-Dávila, J. Fortún, R. López-Velez, F. Norman, M. Montes de Oca, P. Zamarrón, M.I. Gongález, A. Moreno, T. Pumarola, G. Garrido, A. Candela, S. Moreno, Clin. Microbiol. Rev., 21 (2008) 60–96.
- [10] F. Torrico, C. Alonso-Vega, E. Suarez, E. Al., Am. J. Trop. Med. Hyg., 70 (2004) 201–209.
- [11] M.A. Basobrio, J. Nasser, M.A. Segura, E. Al., Med. (B. Aires), 59 (1999) 143–146.
- [12] A.L. Bittencourt, Ann. Soc. Belg. Med. Trop. (1920)., 65 (1985) 103–106.
- [13] G. Russomando, M.M. de Tomassone, I. de Guillen, E. Al., Am. J. Trop. Med. Hyg., 59 (1998) 487–491.
- [14] J. Muñoz, O. Coll, T. Juncosa, E. Al., Clin. Infect. Dis., 48 (2009) 1736–1740.
- [15] J.P. Dias, C. Bastos, E. Araujo, A. Al., Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 41 (2008) 296–300.

- [16] K.S. Pereira, F.L. Schmidt, A.M. Guaraldo, R.M. Franco, V.L. Dias, L.A. Passos, *J. Food Prot.*, 72 (2009) 441–446.
- [17] World Bank WDR, Oxford University Press, New York, NY, 1993, pp. 216–218.
- [18] OPS. *Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. OPS/HDM/CD/425-06*, 2006.
- [19] R.A. Guerri-Guttenberg, D.R. Grana, G. Ambrosio, J. Milei, *Eur. Heart J.*, 29 (2008) 2587–2591.
- [20] G.A. Schmunis, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102 (2007) 75–85.
- [21] A. Pérez de Ayala, J.A. Pérez-Molina, F. Norman, R. López-Vélez, *Emerg. Infect. Dis.*, 15 (2009) 607–8.
- [22] J.M. Paricio-Talayero, M.J. Benlloch-Muncharaz, J. Ignacio Collar-del-Castillo, A. Rubio-Soriano, C. Serrat-Pérez, J. Magraner-Egea, L. Landa-Rivera, M. Sánchez-Palomares, B. Beseler-Soto, L. Santos-Serrano, M. Ferriol-Camacho, J. Mut-Buigues, M. Tomás-Vila, M. del Carmen Alonso-Jiménez, V. Domínguez-Márquez, R. Igual-Adell, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 26 (2008) 609–613.
- [23] A. Berenstein, A. Tarlovsky, S. Siniawsky, A. Delliafonte, S. Ibarra, J. Callepa, G. Moscatelli, M. Biancardi, M.E. Folini, M. Garcia, H. Freilij, J. Altcheh, in: *Estudio de prevalencia de enfermedad de Chagas en Centros de Salud de la ciudad de Buenos Aires*, 2006.
- [24] F. Garcia-Bournissen, J. Alcheh, N. Giglio, G. Mastrantonio, C.O. Della Vedova, G. Koren, *Pediatr. Drugs*, 11 (2009) 33–37.
- [25] J. Jannin, L. Villa, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102 (2007) 95–97.
- [26] f S. Machado, H.B. Tanowitz, M.M. Teixeira, *Br. J. Pharmacol.*, 160 (2010) 258–259.
- [27] A.L. de Andrade, F. Zicker, R.M. de Oliveira, E. Al., *Lancet*, 348 (1996) 1407–1413.
- [28] A.G. Schijman, J. Altcheh, J.M. Burgos, E. Al., *J. Antimicrob. Chemother.*, 52 (2003) 441–449.
- [29] E.S. Sosa, E.L. Segura, A.M. Ruiz, E. Velazquez, B.M. Porcel, C. Yampotis, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 59 (1998) 526–529.
- [30] J.A. Marin-Neto, A.J. Rassi, C.A. Morillo, E. Al., *Am. Heart J.*, 156 (2008) 37–43.
- [31] J.A. Marin-Neto, A.J. Rassi, A.J. Avezum, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104 (2009) 319–324.
- [32] J. Altcheh, G. Moscatelli, S. Moroni, F. Garcia-Bournissen, H. Freilij, *Pediatrics*, 127 (2011) 212–218.
- [33] H. Freilij, J. Altcheh, *Clin. Infect. Dis.*, 21 (1995) 551–555.
- [34] J.A. Castro, M.M. de Mecca, L.C. Bartel, *Hum. Exp. Toxicol.*, 25 (2006) 471–479.
- [35] B.P. Olivieri, J.T. Molina, S.L. de Castro, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 36 (2010) 79–83.
- [36] W. Apt, *J. Drug Des. Dev. Ther.*, 4 (2010) 243–253.
- [37] J.D. Maya, B.K. Cassels, P. Iturriaga-Vasquez, E. Al., *Comp. Biochem. Physiol. - Part A Mol. Integr. Physiol.*, 146 (2007) 60120.
- [38] M.S. Araujo, O.E. Martins-Filho, M.E. Pereira, Z.A. Brener, *J. Antimicrob. Chemother.*, 45 (2000) 819–824.
- [39] J.A. Urbina, G. Payares, C. Sanoja, R. Lira, A.J. Romanha, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 21 (2003) 27–38.

- [40] R. Reithinger, R.L. Tarleton, J.A. Urbina, U. Kitron, R.E. Gurtler, *BMJ*, 338 (2009) b1283.
- [41] J.A. Urbina, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 104 (2009) 311–318.
- [42] M.J. Pinazo, G. Espinosa, P.L. Lopez-Chejade, J.A. Urbina, J. Gascon, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82 (2010) 583–587.
- [43] L.B. Sheiner, J.-L. Steimer, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 40 (2000) 67–95.
- [44] E.I. Ette, P.J. Williams, *Ann. Pharmacother.*, 38 (2004) 1907–1915.
- [45] P.I.D. Lee, *Pharm. Res.*, 18 (2001) 75–82.
- [46] F. Garcia-Bournissen, J. Altchek, A. Panchaud, S. Ito, *Arch. Dis. Child.*, 95 (2010) 224–228.
- [47] M.J. Morilla, P. Benavidez, M.O. Lopez, L. Bakas, E.L. Romero, *Int. J. Pharm.*, 249 (2002) 89–99.
- [48] M.J. Morilla, P.E. Benavidez, M.O. Lopez, E.L. Romero, *J. Chromatogr. Sci.*, 41 (2003) 405–409.
- [49] C. Paulos, J. Paredes, I. Vasquez, G. Kunze, G. González-Martin, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 433 (1988) 359–362.
- [50] J. Raaflaub, W.H. Ziegler, *Arzneimittelforschung.*, 29 (1979) 1611–1614.
- [51] M.I. Walton, P. Workman, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 375 (1986) 190–196.
- [52] P.J.S. Barbeira, G.M. Silva, M. de L.P.M. Beatriz, N.R. Stradiotto, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 20 (1999) 723–726.
- [53] M.A. La-scalea, S.H.P. Serrano, E.I. Ferreira, A.M. Oliveira Brett, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 29 (2002) 561–568.
- [54] R.F. Bulffer, J.A. Castro, S.L. Fanelli, *Acta bioquímica clínica Latinoam.*, 45 (2011) 463–470.
- [55] L.C. Bartel, M. Montalto de Mecca, C. Rodríguez de Castro, F.M. Bietto, J.A. Castro, *Hum. Exp. Toxicol.*, 29 (2010) 813–822.
- [56] R. Moreira da Silva, L. Teixeira Oliveira, N.M. Silva Barcellos, J. de Souza, M. de Lana, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 56 (2012) 3344–3348.
- [57] L. Guerrero, M.J. Pinazo, E. Posada, J. Gascón, J. Ribas, D. Soy, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 49 (2011) 77–82.
- [58] H. Medenwald, K. Brandau, K. Schlossman, *Arzneimittelforschung.*, 22 (1972) 1613–1617.
- [59] G. González-Martin, S. Thambo, C. Paulos, I. Vásquez, J. Paredes, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 42 (1992) 671–673.
- [60] J. Altchek, G. Moscatelli, G. Mastrantonio, S. Moroni, N. Giglio, G. Koren, H. Freilij, F. Garcia-Bournissen, pp. 162–692.
- [61] L.J. Scott, C.M. Perry, *Drugs*, (2000) 139–176.
- [62] T.P. Gibson, *Am. J. Med.*, 101 (1996) 47S–53S.
- [63] C.R. Lee, D. McTavish, E.M. Sorkin, *Drugs*, 46 (1993) 313–340.
- [64] K.A. Lehmann, *Drugs*, 47 (1994) 19–32.

❖ **CAPÍTULO 7: “MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO IÓNICO DISPERSIVA. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS ANTICHAGÁSICOS DESDE PLASMA HUMANO Y LECHE MATERNA”.**

Se evaluó la técnica de microextracción líquido-líquido iónico dispersiva (MELLID) para la determinación de benznidazol (BNZ) y nifurtimox (NFX) en plasma humano y leche materna. Se pretende maximizar la eficiencia de extracción ($R\%$) y el factor de enriquecimiento (FE) para minimizar los límites de detección y cuantificación. Para ello se optimizaron todas las variables experimentales relevantes de la técnica mediante un procedimiento “**etapa por etapa**” para el caso de plasma humano (**Sección 7.1**) y mediante “**diseño central compuesto**” para el caso de leche materna (**Sección 7.6**). Para las determinaciones cuantitativas se empleó cromatografía de líquidos de fase inversa con detección UV-visible.

7.1. Procedimiento “etapa por etapa”.

El método experimental elegido inicialmente para llevar a cabo la microextracción (MELLID) de los fármacos antichagásicos desde plasma humano fue un procedimiento “etapa por etapa” (“*step-by-step*”). El mismo consiste en evaluar diversos *factores que se considera que influyen en la respuesta o señal analítica* (por ej., tipo de extractante, volumen de dispersante, pH, etc.). Se evalúa *un factor por vez* mientras los demás se mantienen constantes y se obtiene una *respuesta* que dependerá sólo de ese factor. En este caso, la respuesta elegida es el área del pico cromatográfico, la cual se empleará para calcular el $R\%$ y FE . Estas respuestas se buscan maximizar para minimizar otros dos parámetros fundamentales en la validación interna del procedimiento analítico, el límite de detección (L_D) y el límite de cuantificación (L_Q). Luego, se evalúa un *segundo factor*, pero trabajando en el valor o respuesta *óptima del primer factor*. Ese valor puede ser *máximo* o *mínimo*, dependiendo de los casos, pero en este trabajo se busca maximizar la respuesta. De este modo se obtiene una *respuesta óptima para el primer y segundo factor* combinados, y así sucesivamente se continúa con el procedimiento.

La ventaja de esta metodología es la sencillez del diseño experimental, dado que no se requieren procedimientos matemáticos previos al desarrollo del experimento. Sin embargo, presenta la desventaja de requerir un *gran número* de experimentos, los que aumentan n veces para los n factores, algunos de los cuales puede que no tengan ninguna influencia en la respuesta y, además, no se tienen en cuenta las *interacciones entre factores*.

7.2. Parte experimental.

7.2.1. Reactivos y materiales.

Se emplearon los siguientes RTILs: [C₆C₁im][PF₆], [C₄C₁im][PF₆], [C₈C₁im][BF₄] y [C₈C₁im][PF₆] (ver **Sección 2.5.3**). Los reactivos utilizados fueron de grado analítico o superior: benznidazol (Roche, Buenos Aires, Industria Argentina), nifurtimox (Bayer, Leverkusen, Germany), cloruro de potasio, cloruro de sodio, ácido tricloroacético, fosfato anhídrido dibásico de sodio y bicarbonato de sodio (Anedra, Argentina), fosfato de potasio (Matheson, Coleman & Bell, Norwood, OH, EEUU), ácido fosfórico 85% (p/p) y ácido perclórico 70% (p/p) (Merck, Hohenbrunn, Germany), hidróxido de sodio e hidróxido de potasio (Analar, Poole, England), sulfafo de magnesio hepta-hidratado (Biopack, Argentina), ftalato monobásico de potasio (Fluka, Buchs, Suiza) y borato de sodio (Baker's Analyzed, Phillipsburg, NJ, EEUU), metanol grado HPLC (Baker's Analyzed, Phillipsburg, NJ, USA), acetona (Anedra, Argentina), acetonitrilo y etanol anhidro (Carlo Erba, Divisione Chimica Industriale–Milano, Italy). Las soluciones fueron preparadas con agua MilliQ.

Para los experimentos de optimización se utilizaron tubos cónicos graduados de polipropileno línea azul (17 x 120 mm, 15 mL).

Plasma humano libre de fármacos antichagásicos y drogas de abuso fue obtenido de pacientes voluntarios del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutierrez” de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Las muestras fueron almacenadas en frascos de polipropileno con tapa a -20 °C hasta el momento del análisis.

7.2.2. Equipos.

El cromatografo HPLC es el empleado en la **Sección 2.5.2**. Se empleó una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent, EEUU), 250×4,6-mm DI (5 μm) fue utilizada para separar y cuantificar-los diferentes compuestos. Se empleó también metanol/buffer fosfato en modo isocrático (58:42 v/v, pH= 2,70; 25 mM), filtrados como se explicó en dicha sección. Las longitudes de onda fueron: 320 nm para el BNZ y 395 nm para el NFX. A esta longitud de onda los RTILs no absorben la radiación. El bucle de inyección fue de 5μL y el caudal de la fase móvil 1 mL min⁻¹.

Se empleó una centrifuga LUGUIMAC LC-20 que opera hasta 4.200 rpm con tubos de 15 mL de polipropileno, para los experimentos de optimización y una microcentrifuga Eppendorf 5417C/R que opera hasta 14.000 rpm para los experimentos de validación interna realizados con las condiciones óptimas. El agitador mecánico vortex y el pH-metro fueron los empleados en la **Sección 2.5.2**. Se empleó nuevamente agua MilliQ.

7.2.3. Preparación de solución stock y soluciones estándar en agua y en la muestra.

La solución stock de NFX y BNZ fue preparada disolviendo los compuestos en metanol (940 y 560 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente). La solución resultante fue sonicada por unos pocos minutos, almacenada en un frasco color caramelo y conservada en freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1 mes. Su estabilidad fue controlada diariamente comparando las áreas de los picos cromatográficos con las áreas de la solución inicial.

Las soluciones estándar para las curvas de calibración fueron preparadas en agua (*método del estándar externo*) y en plasma humano sin los analitos presentes (*calibración en matriz o “matrix-matched calibration”*) para verificar la presencia de efecto de matriz. Las curvas de calibración en agua fueron preparadas por dilución de la solución stock con agua MilliQ y filtradas con membranas de nitrato de celulosa de 0,22 μm . Las curvas de calibración en la matriz fueron preparadas en plasma humano libre de las drogas antichagásicas. Las muestras fueron sembradas con diferentes volúmenes de soluciones estándar. Las soluciones así obtenidas fueron extraídas por la aplicación del procedimiento experimental optimizado descrito en la **Sección 7.4**. Se inyectaron 5 μL del sedimento del RTIL en el sistema HPLC. Debido a que la viscosidad permitió la inyección directa del RTIL, no se empleó ningún solvente orgánico para fluidificar. Las curvas de calibración se obtuvieron mediante regresión lineal entre las áreas de pico vs. las concentraciones de los analitos.

7.3. Resultados y discusiones.

7.3.1. Optimización de la técnica MELLID desde una solución acuosa.

Un volumen constante de 5,00 mL de la solución stock diluida a 9,4 y 5,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFX y BNZ, respectivamente, fue utilizado en todos los experimentos de optimización. En estos experimentos la concentración seleccionada es irrelevante, ya que lo que interesa reflejar es la cantidad de analito

extraída referido a una concentración inicial constante y, por ende, los resultados que se muestran corresponden directamente a las áreas del pico cromatográfico. Los parámetros que afectan el rendimiento de extracción y que fueron optimizados mediante el procedimiento “etapa por etapa” son: tipo y volumen del solvente de extracción (RTIL), tipo y volumen de solvente de dispersante, tiempo de extracción y de centrifugación, pH y el tipo y concentración de sal.

7.3.1.1. Selección del líquido iónico.

La selección de un determinado líquido iónico para una extracción particular es una tarea complicada puesto que son muchos y muy variados los RTILs disponibles comercialmente [1–3]. El RTIL elegido, como ya hemos mencionado, tiene que ser inmisible o muy poco miscible en agua, ser más denso que la matriz de la muestra para que las microgotas puedan sedimentar rápidamente y poder así separar fácilmente ambas fases, tener buen comportamiento cromatográfico y una fuerte afinidad química por los analitos, debe ser económico y que preferentemente pueda inyectarse directamente en el sistema HPLC sin dilución con solvente (fluidificar para que pueda ser inyectado fácilmente), lo cual disminuiría el *FE*.

Para realizar una elección más racional del RTIL necesario para la aplicación deseada, se hizo una estimación indirecta de la eficiencia de extracción a través de la predicción de los coeficientes de partición, $P_{L/a}$ para los compuestos antichagásicos empleando el “modelo del parámetro de solvatación” (MPS), desarrollado en el **Capítulo 2**. Los valores predichos se comparan con los experimentales en la **Tabla 7.1** para ambos compuestos antichagásicos para resaltar la capacidad predictiva del modelo. Se observa que las predicciones del modelo son muy buenas para todos los RTILs, como ya se demostró en el **Capítulo 2**. Se puede ver que los valores más altos de $P_{L/a}$ para los dos compuestos antichagásicos se obtienen con el $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, uno de los más hidrofóbicos de todos los estudiados.

Se puede observar también de la **Tabla 7.1**, que con algunos otros RTILs hidrofóbicos tales como $[\text{C}_6\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$, $[\text{C}_8\text{pyr}][\text{BF}_4]$, $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$, $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{NTf}_2]$ y, para el caso de BNZ, $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{NTf}_2]$, también se obtienen coeficientes de partición muy altos. Sin embargo se evitó el uso de los RTILs con catión fosfonio porque son menos densos que el agua lo cual hace más engorrosa la técnica a la hora de separarlos de la fase acuosa, además de que habría que fluidificar antes de inyectar. Por este motivo, y debido a la sencillez de la síntesis de los RTILs con catión *imidazolio*, es que se decidió emplear este tipo de solventes en las extracciones con las matrices reales.

Tabla 7.1: Comparación entre los $\log P_{LL/a}$ experimentales y predichos por el MPS para BNZ y NFX.

RTILs	NFX		BNZ	
	$\log P_{LL/a(\text{exp.})}$	$\log P_{LL/a(\text{pred.})}$	$\log P_{LL/a(\text{exp.})}$	$\log P_{LL/a(\text{pred.})}$
[C ₄ C ₁ im][PF ₆]	-0,959	-0,970	-0,443	-0,438
[C ₆ C ₁ im][PF ₆]	0,859	0,786	1,448	1,412
[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	1,348	1,321	1,968	1,897
[C ₈ C ₁ im][BF ₄]	-0,183	-0,133	0,633	0,554
[C ₈ pyr][BF ₄]	0,674	0,712	1,714	1,697
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Cl]	0,373	0,336	0,477	0,496
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][Br]	0,790	0,798	1,780	1,804
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][N(CN) ₂]	-0,620	-0,568	1,411	1,446
[(C ₆) ₃ C ₁₄ P][NTf ₂]	0,790	0,798	1,714	1,697

Como la extracción de un analito no depende únicamente del $P_{LL/a}$, como se discutió en el **Capítulo 3**, podría ocurrir que optimizando las variables experimentales, se obtengan mejores extracciones con algún otro RTIL que tenga también alto coeficiente de partición para los analitos en estudio. Por esto, seleccionamos diferentes RTILs *de imidazolio* para los ensayos iniciales: [C₆C₁im][PF₆], [C₈C₁im][PF₆] y [C₈C₁im][BF₄].

La **Figura 7.1** compara el rendimiento de la extracción de los tres RTILs seleccionados, en las condiciones experimentales de la **Sección 7.3.1.1.**, las cuales son muy similares a las de la **Sección 2.6.1.1.**, excepto que en este caso el pH fue 2,00. Se observa que el [C₈C₁im][PF₆] produce el mejor rendimiento de extracción para ambas drogas antichagásicas, en acuerdo con lo predicho por el Modelo del Parámetro de Solvatación de **Tabla 7.1**. Por lo tanto, ese RTIL fue utilizado para todos los experimentos subsiguientes.

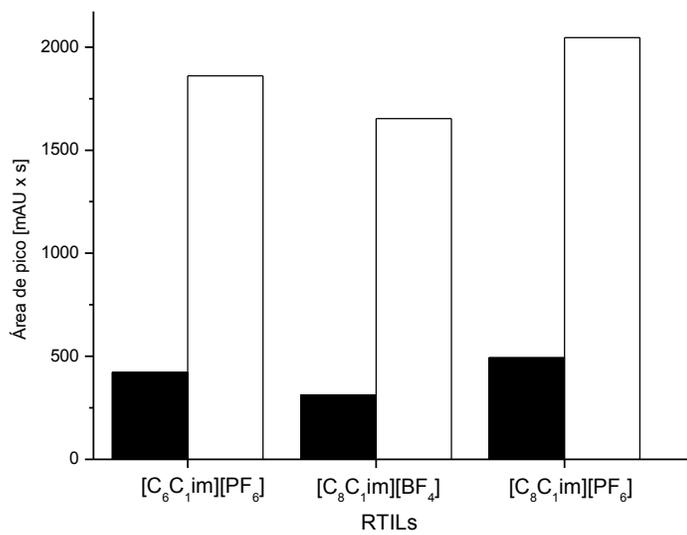


Figura 7.1: Efecto del tipo de RTIL sobre la eficiencia de extracción (columnas rellenas: BNZ; columnas vacías: NFX).

7.3.1.2. Selección del solvente dispersante.

Una característica fundamental a la hora de seleccionar el solvente dispersante es la miscibilidad del mismo tanto con el líquido iónico como con la fase acuosa. De esta manera acetona, etanol, acetonitrilo y metanol fueron considerados como candidatos para este experimento. Una serie de soluciones estándar fueron extraídas con 40 μL de $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$ disueltos en 0,50 mL de cada solvente dispersante. En la **Figura 7.2** se observan las áreas cromatográficas obtenidas. Se puede observar que se obtiene mayor rendimiento de extracción con metanol como dispersante, para los dos fármacos, por lo que dicho solvente fue elegido para los experimentos subsiguientes.

7.3.1.3. Obtención del volumen óptimo de RTIL.

Para evaluar el efecto de la cantidad de RTIL, un volumen constante e igual a 0,50 mL de metanol fue agregado a diferentes volúmenes de $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$. Se observó de **Figura 7.3** un aumento en la eficiencia de extracción al incrementar la cantidad de RTIL, para ambos fármacos, hasta un volumen máximo de 125 μL de RTIL, a partir del cual comenzó a disminuir el rendimiento. En

consecuencia, se utilizaron 125 μL de líquido iónico como la cantidad óptima para la extracción en la muestra.

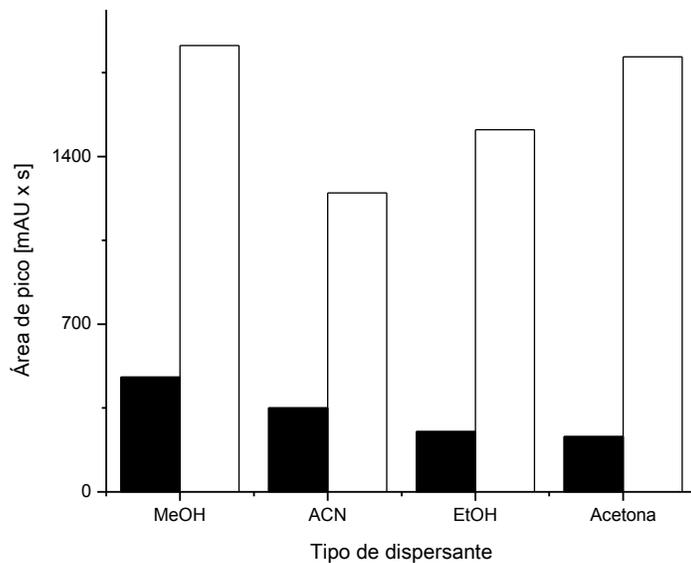


Figura 7.2: Efecto del tipo de dispersante sobre la eficiencia de extracción (columnas rellenas: BNZ; columnas vacías: NFX).

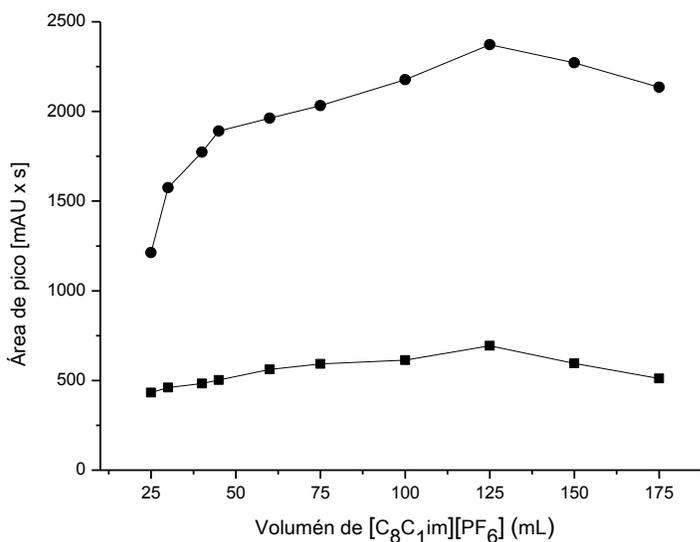


Figura 7.3: Efecto del volumen de $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$ sobre la eficiencia de extracción (■: BNZ; ●: NFX).

7.3.1.4. *Obtención del volumen óptimo de solvente dispersante.*

El volumen de solvente dispersante afecta la solubilidad del solvente de extracción en la solución acuosa y, por tanto, el volumen de la fase de sedimentada. Para obtener el volumen óptimo, se realizaron experimentos con diferentes volúmenes de metanol que contienen la cantidad óptima de RTIL. Se observa de **Figura 7.4** que la extracción aumenta hasta un agregado de 0,30 mL de metanol como resultado de una mejor solubilización con el RTIL, permitiendo la generación de muy pequeñas microgotas que van creciendo en volumen. Al aumentar el volumen de metanol por encima del valor óptimo, sin embargo, el rendimiento de extracción disminuyó debido al mayor contenido de ese solvente orgánico en la fase acuosa, lo que aumenta la solubilidad los analitos. Por lo tanto, 0,30 mL de metanol fue seleccionado como el volumen óptimo.

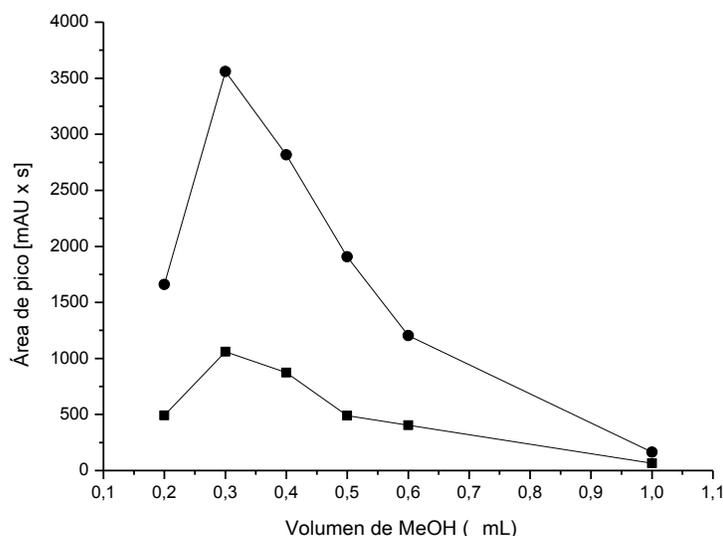


Figura 7.4: Efecto del volumen de dispersante sobre la eficiencia de extracción (■: BNZ; ●: NFX).

7.3.1.5. *Selección del pH óptimo de extracción.*

El efecto del pH sobre la eficiencia de extracción se llevó a cabo dentro del intervalo de pH 2,39–10,03 (**Figura 7.5**). Se utilizaron diferentes buffers en función del pH deseado (ftalato monobásico de

potasio para pH= 1,96 y 4,52, fosfato de sodio para pH= 6,12, borato de sodio para pH= 8,44 y bicarbonato de sodio para pH= 10,03), con fuerza iónica constante e igual a 0,1 M en todos los casos. De este modo, una mezcla de 0,30 mL de metanol y 125 μ L de $[C_8C_{1im}][PF_6]$, fue agregado rápidamente a las soluciones estándar conteniendo los analitos. Como se observa de la figura, la extracción fue máxima a pH= 6,12 para ambos compuestos. Los valores de pK_a de estos compuestos no están disponibles en la literatura, por lo cual no es posible explicar el comportamiento observado. Por lo tanto, aquel pH fue elegido para los experimentos subsiguientes.

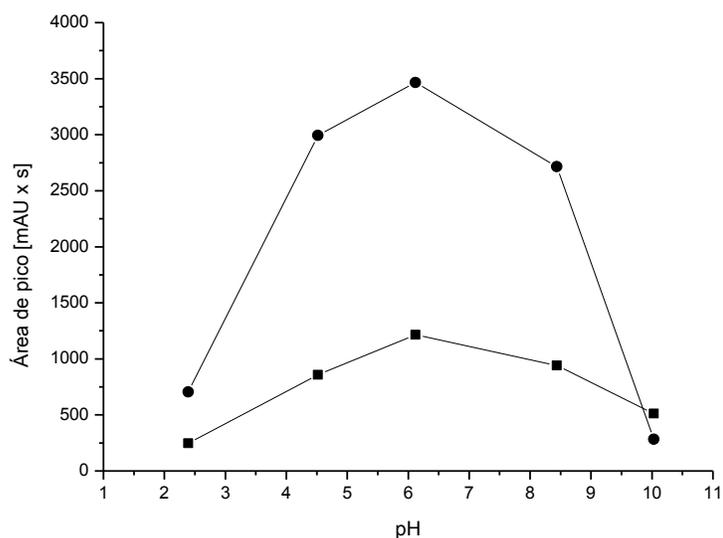


Figura 7.5: Efecto del pH sobre la eficiencia de extracción (■: BNZ; ●: NFX).

7.3.1.6. Estudio del efecto salino.

Se estudió el efecto salino empleando cuatro sales diferentes: NaCl, KCl, $MgSO_4$ y K_3PO_4 . En la **Figura 7.6** se observan distintos comportamientos de acuerdo al tipo y concentración de sal utilizada. Para $MgSO_4$ y KCl se observa un aumento inicial del área de pico (aumento del rendimiento de extracción) a medida que aumenta la concentración de sal hasta llegar a un valor máximo, luego de lo cual el área del pico disminuye. Por otro lado, para K_3PO_4 se observa un aumento en área de pico en el rango de concentración salina estudiado, mientras que para el NaCl ocurre lo contrario. El aumento del área de pico puede interpretarse como consecuencia del clásico efecto salino (salting-out), mientras que la disminución del mismo podría deberse a que comienzan a predominar las interacciones entre los iones

de la sal y los iones del líquido iónico. En la literatura se ha reportado que cuando ciertas sales se utilizan para la extracción con RTILs, la interacción electrostática entre los iones de sal y los iones del RTIL pueden llegar a *aumentar* la solubilidad de éste en la fase acuosa y así obtener *menor* eficiencia de extracción [5–7]. Por otra parte, de la **Figura 7.6** se observa que cuando se emplea KCl, la cantidad de analito recuperado fue mucho mayor que con las demás sales (las áreas de pico son mucho mayores). En este caso, se llegó a un máximo de 2,00% (p/v) en la concentración de sal, de modo que este valor fue utilizado para los experimentos remanentes.

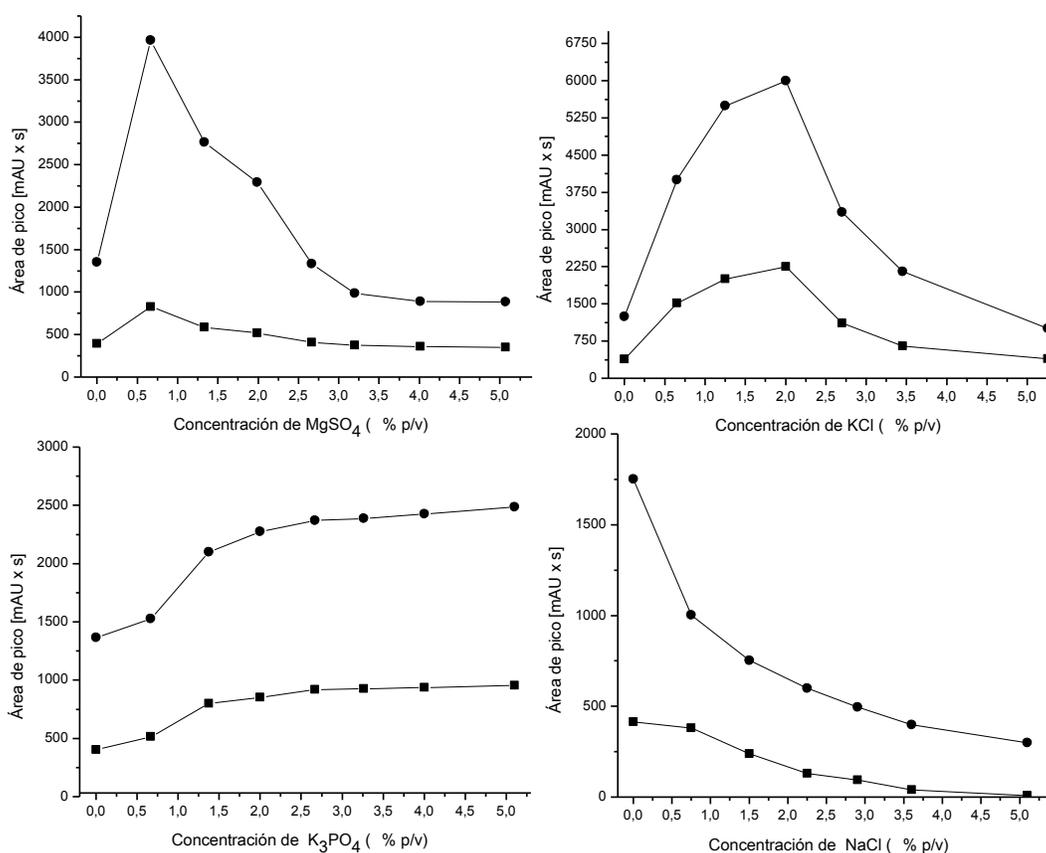


Figura 7.6: Efecto del tipo y concentración de sal sobre la eficiencia de extracción (■: BNZ; ●: NFX).

7.3.1.7. *Influencia del tiempo de centrifugación y extracción.*

El *tiempo de extracción* es el período que comienza cuando se agrega la solución del RTIL en metanol a la solución de los estándares y finaliza al momento de colocar el tubo en la centrífuga.

Durante este tiempo, ambas fases permanecen en agitación manual, mecánica o ultrasonido. En nuestro caso en particular se optó por agitación mecánica asistida por un vortex. Este tiempo de extracción se varió entre 1 y 20 minutos. Se puede observar de **Figura 7.7** que la eficiencia de extracción aumentó hasta los 6,0 min y luego llegó a un valor constante. Evidentemente, antes de los 6 minutos la cantidad de gotas de RTIL formadas es baja y a medida que estas crecen, la extracción va aumentando. Una vez formada la fase orgánica, la cantidad de analito extraída permanece constante.

El *tiempo de centrifugación* fue definido como el tiempo que permaneció el tubo dentro de la centrífuga. Dicho tiempo se varió entre 3,0 a 60,0 min a la máxima velocidad de la centrífuga (4.200 rpm). En la **Figura 7.7** se observa que la mayor área de pico fue lograda a los 20,0 min, luego de lo cual se mantuvo constante (**Figura 7.7**). La centrifugación evidentemente decantó las microgotas que permanecían en la fase acuosa, arrastrando consigo al analito y acelerando la separación entre las fases. Por lo tanto, 20,0 min fue considerado el tiempo de centrifugación óptimo.

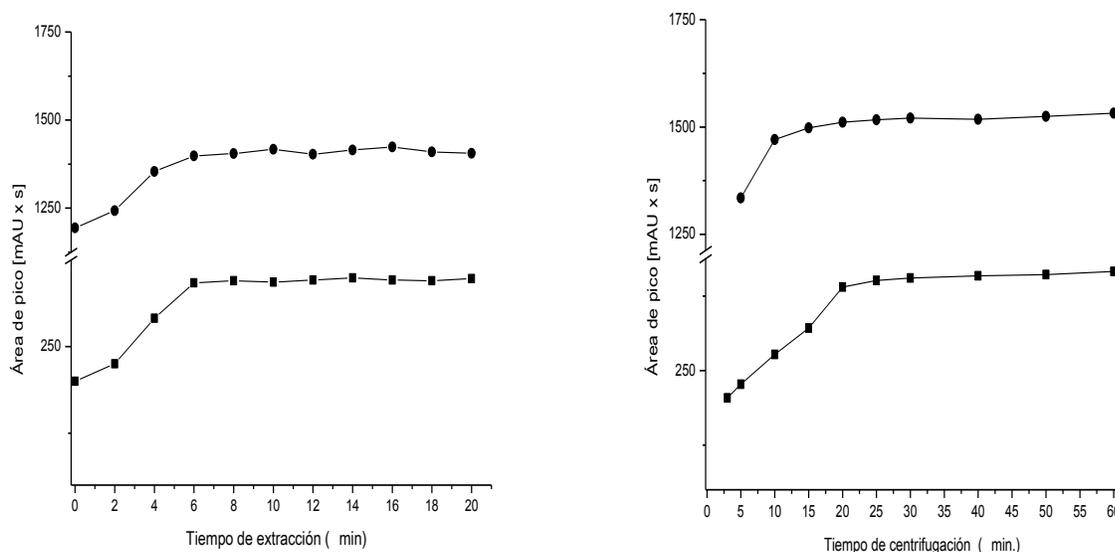


Figura 7.7: Efecto del tiempo de centrifugación y tiempo de extracción sobre la eficiencia de extracción (■: BNZ; ●: NFX).

7.4. Procedimiento de extracción “etapa por etapa” optimizado.

Considerando los resultados previos, se arribó al siguiente procedimiento optimizado:

A 5,00 mL de solución acuosa sembrada con $9,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $5,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BNZ y NFX, respectivamente, en un tubo cónico de centrífuga de 15 mL, se agregó 0,1 g de KCl y se ajustó el pH a

6,12. Se le adicionó una mezcla de 125 μL de $[\text{C}_8\text{C}_{1\text{im}}][\text{PF}_6]$, homogeneizado previamente con 0,30 mL de metanol, se agitó en un agitador mecánico por 6 min y se centrifugó a 4.200 rpm por 20 min. La fase acuosa que quedó en la parte superior fue removida con pipeta Pasteur. La fase RTIL formada fue de 120 ± 5 μL . De ésta se tomaron 5 μL y se inyectó en la columna cromatográfica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7.4.1. Adaptación del procedimiento de extracción optimizado para muestras de plasma humano.

El plasma humano fue sembrado con diferentes cantidades de NFX y BNZ en un rango de 0-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se acidificó con solución 30% (p/v) de solución de ácido tricloroacético (0,10 mL en 1,00 mL de muestra) para remover el material proteico. La mezcla fue agitada en un agitador mecánico vortex por 6 min y centrifugada por 20 min a 4.200 rpm. El sobrenadante fue filtrado con membranas de nitrato de celulosa de 0,22 μm y almacenadas dentro de un tubo cónico de centrifuga limpio y seco. Debido a que no se disponen de grandes cantidades de plasma para los análisis, la técnica MELLID fue llevada a cabo a partir de una adaptación a microescala del procedimiento de extracción optimizado de la sección anterior: 1) 540 μL del sobrenadante fueron transferidos a un tubo eppendorf de polipropileno de 1,5 mL, inmediatamente se agregó una mezcla de 32,4 μL de metanol con 13,5 μL de $[\text{C}_8\text{C}_{1\text{im}}][\text{PF}_6]$; 2) se adicionaron 30 μL de NaOH 1 M para ajustar el pH a 6,12 y se agregó 0,011 g de KCl; 3) la emulsión resultante fue agitada en un agitador mecánico por 6 min y centrifugada por 20 min a 4.200 rpm; 4) 5 μL de la fase orgánica fueron inyectados en el sistema HPLC para su cuantificación.

7.5. Performance analítica de la metodología de optimización “etapa por etapa”.

Se evaluaron las siguientes cifras de mérito: precisión, exactitud, reproducibilidad (inter-intradía), límite de detección (L_D), límite de cuantificación (L_Q), rango lineal (RL), factor de enriquecimiento (FE) y recuperación porcentual ($R\%$).

Las rectas de calibración (**Tabla 7.2**) fueron obtenidas mediante regresión lineal entre las áreas de pico vs la concentración de ambos fármacos en agua (13 niveles dentro del rango lineal) y en plasma humano luego de la técnica MELLID (8 niveles), respectivamente. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 7.2: Rectas de calibración para NFX and BNZ

i. en agua (estándar externo)				
Analito	Recta de calibración	r^{2a}	SD^b	N^c
BNZ	$y = (4,0 \pm 2,1) + (2,05 \pm 1,18)(x10^4)x$	0,9997	0,2	39
NFX	$y = (9,3 \pm 4,8) + (4,47 \pm 2,83)(x10^4)x$	0,9998	0,5	39

ii. en plasma humano incluida la técnica MELLID				
Analito	Recta de calibración	r^{2a}	SD^b	N^c
BNZ	$y = (0,16 \pm 0,08) + (2,10 \pm 1,10)(x10^4)x$	0,9993	9,6	24
NFX	$y = (1,5 \pm 0,1) + (2,72 \pm 0,8)(x10^4)x$	0,9992	22,0	24

^a coeficiente de la determinación; ^b desviación estándar; ^c número de datos.

Con el fin de investigar la presencia de efectos de matriz que puedan exaltar o deprimir la señal analítica, se compararon las pendientes de las curvas de calibración, de acuerdo al método explicado en la **Sección 5.3 (Ecuación 5.30)**, obtenidas por el método del *estándar externo* (analitos disueltos en agua) y mediante calibración en matriz empleando plasma sin contenido inicial de las drogas (*matrix-matched calibration*) sembrado con NFX y BNZ, aplicando la metodología de extracción de la **Sección 7.4.1**. Por lo tanto, se realizó un análisis de las varianzas para ambas metodologías de cuantificación y para los dos fármacos, para verificar si existían diferencias significativas entre las mismas. Se encontró que existe diferencia significativa entre las varianzas, ya que $F_{exp} > F_{crit}$ para ambos compuestos. Como consecuencia, se determinó un t' (t-combinado) a partir de la **Ecuación 5.35** para cada compuesto debido a que el número de datos de cada regresión es distinto, obteniéndose $t' = 2,045$ para el BNZ y $t' = 2,025$ para NFX. Los valores de t_{exp} de la **Ecuación 5.30** resultaron 3,07 y 58,95 para el BNZ y NFX, respectivamente. Como se puede observar, el $t_{exp} > t'_{crit}$, por lo que se concluye que *las pendientes son estadísticamente distintas*, indicando la presencia de efecto de matriz. Como consecuencia de ello, para la cuantificación de BNZ y NFX en muestras de plasma, se empleó el método de las *adiciones de estándar*.

El límite de detección (L_D) en plasma humano fue calculado utilizando diferentes procedimientos debido a que se lo debe comparar con los obtenidos de la literatura, los cuales no siempre se calculan de la misma manera por ejemplo, mediante la relación señal/ruido (S/N) con $k = 2$ o 3 , como se vió en la **Sección 5.2.3.4**, o mediante la definición de la IUPAC (**Ecuación 5.14**) con $k = 3,29$.

El límite de cuantificación (L_Q) en plasma fue evaluado utilizando $S/N= 10$ (**Sección 5.2.3.4**) y utilizando la definición de la IUPAC (**Ecuación 5.15**) con $k_Q= 10$. El fin del rango lineal o *límite superior de cuantificación* fue determinado utilizando un ensayo de falta de ajuste (*lack-of-fit*) como se explicó en la **Sección 5.2.2**. Este procedimiento se aplica hasta que los datos se puedan ajustar a una línea recta de acuerdo a un criterio estadístico F . En la **Tabla 7.3** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7.3: Límite de detección (L_D) y de cuantificación (L_Q) para BNZ y NFX en plasma humano ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

Compuesto	Rango lineal ^a	L_D ^b	L_D ^c	L_D ^d	L_Q ^b	L_Q ^e
BNZ	0,1323-500,5	0,1009	0,0265	0,0397	0,3058	0,1323
NFX	0,0784-908,7	0,0829	0,0157	0,0235	0,2514	0,0784

^a el comienzo del rango lineal se consideró en $S/N= 10$; ^b de la definición IUPAC; ^c $S/N = 2$; ^d $S/N= 3$; ^e $S/N= 10$.

El FE y la $R\%$ para ambos compuestos fueron calculados a partir de las **Ecuaciones 5.27** y **5.29**, respectivamente. Para ello, las muestras de plasma humano fueron sembradas con concentraciones conocidas de NFX y BNZ (2,5; 5,0; 7,5 y 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y dentro del intervalo lineal de las rectas de calibración. Los analitos se dejaron en contacto con la matriz de plasma durante 1 h antes de la extracción. Se obtuvieron las áreas de pico en la matriz acuosa inicial, A_{aq} , y en la fase RTIL luego de la extracción, A_{LI} . El FE se calculó como A_{LI}/A_{aq} .

La $R\%$ se determinó midiendo el volumen inicial de muestra y el volumen final de la fase RTIL luego de la extracción, y empleando el correspondiente FE (**Ecuación 5.29**). En **Tabla 7.4** se reúnen los valores obtenidos a diferentes niveles de concentración. Como se puede ver, las recuperaciones son constantes, dentro del error experimental, siendo para NFX superiores a las de BNZ. En la **Figura 7.10** se muestran los cromatogramas típicos de los dos fármacos antichagásicos antes y después de la técnica MELLID donde se puede apreciar claramente el abrupto incremento de las señales, luego de la preconcentración.

Con el fin de evaluar la precisión y exactitud del método aplicado a plasma humano, cada muestra se enriqueció con los fármacos en concentraciones dentro del intervalo lineal de la curva de calibración. La precisión del ensayo intra e interdía se determinó con muestras que contenían 5,0; 7,5 y 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de NFX y BNZ en plasma. La precisión RSD (%) fue calculada según la **Ecuación 5.3**.

Los mismos experimentos se realizaron durante tres días consecutivos para determinar la precisión inter-día. La precisión intra-día, en cambio, fue realizada durante la mañana, tarde y noche. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y a 9 niveles de concentración. La exactitud en cambio, fue determinada a partir del cálculo del error relativo porcentual, considerando la concentración encontrada y la concentración preparada, de acuerdo a la **Ecuación 7.1**. Los resultados se reúnen en la **Tabla 7.5**.

$$E_r \% = \frac{C_{prep} - C_{enc}}{C_{prep}} 100 \quad (7.1)$$

Tabla 7.4: *FE* y *%R* para muestras de *plasma humano* con diferentes niveles de concentración de NFX y BNZ.

Cantidad sembrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	NFX			BNZ		
	<i>FE</i>	<i>R%</i> ^a	<i>RSD (%)</i> ^b	<i>FE</i>	<i>R%</i> ^a	<i>RSD (%)</i> ^b
2,5	38,7	96,8	0,5	31,7	79,4	1,7
5	39,0	97,5	0,2	31,2	78,1	0,1
7,5	39,2	98,1	0,1	31,3	78,2	0,3
10	39,2	98,0	0,1	31,9	79,8	0,6

^a n= 3, ^b *RSD (%)* de la recuperación porcentual.

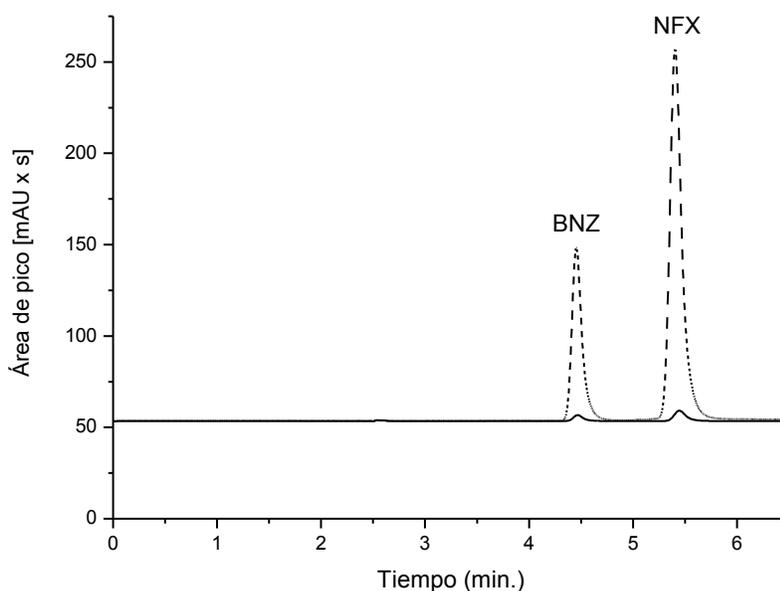


Figura 7.10: Cromatogramas para una muestra acuosa sembrada con $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada compuesto y desproteneizada (línea continua) y para la fase RTIL luego de la extracción (línea de puntos).

Tabla 7.5: Exactitud y reproducibilidad de la determinación cuantitativa de NFX and BNZ en muestras de plasma humano (concentraciones en $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Analito	Concentración Preparada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Concentración Encontrada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)^a	Error (%)^b	RSD (%)
<i>NFX</i>				
Intra-día	5,0	$4,9 \pm 0,2$	-2,00	1,79
Inter-día	5,0	$4,9 \pm 0,2$	-2,00	2,13
Intra-día	7,5	$7,3 \pm 0,1$	-2,66	0,76
Inter-día	7,5	$7,4 \pm 0,2$	-2,00	1,53
Intra-día	10,0	$9,8 \pm 0,2$	-2,00	0,97
Inter-día	10,0	$9,8 \pm 0,2$	-2,00	1,02
<i>BNZ</i>				
Intra-día	5,0	$5,0 \pm 0,2$	0	1,56
Inter-día	5,0	$5,0 \pm 0,2$	0	1,59

Tabla 7.5 (continuación).

Intra-día	7,5	$7,6 \pm 0,2$	1,33	1,31
Inter-día	7,5	$7,6 \pm 0,3$	1,33	1,89
Intra-día	10,0	$10,0 \pm 0,5$	0	2,52
Inter-día	10,0	$9,7 \pm 0,7$	-3,00	3,66

^a 9 niveles por triplicado; ^b error relativo porcentual (**Ecuación 7.1**).

Algunas de las cifras de mérito, la cantidad de muestra necesaria para el análisis y el tipo y cantidad de disolvente de extracción se muestran en **Tabla 7.6**. En dicha tabla se hace una comparación con otros métodos de la literatura, varios de los cuales no incluyen la etapa de preconcentración, mientras que algunos incluyen la etapa de desproteneización (*clean-up*). Los métodos comparados incluyen fundamentalmente determinaciones por HPLC con detección UV-visible, aunque también se incluye un trabajo de cromatografía en capa fina (TLC).

Tabla 7.6: Comparación de la metodología desarrollada con otros procedimientos descritos en la literatura para la determinación de BNZ y NFX en plasma humano (NR: no reportado; NI: no incluye extracción).

Método	Cantidad de muestra (mL)	Solvente de extracción (mL)	Volumen de extractante (mL)	Rango Lineal ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	L_D ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	L_Q ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	R (%)	RSD (%) ^d	Ref.
BNZ									
HPLC-UV	0,075	NI	---	1,6–100	0,8	1,6	94,9	1,1	[8]
HPLC-UV	0,2	ACN–DMSO	0,4	0,7–25	NR	0,7 ^c	70–97	6,4	[9]
HPLC-UV	NC	NI	---	0,5–1000	0,2–0,5 ^b	NR	≥ 90	3,2	[10]
HPLC-UV	2,0	Acetato de etilo	4,0	0,1–20	0,14 ^c	0,3 ^f	89	10	[11]
MELLID-HPLC-UV	0,54	[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	0,013	0,1–500	0,04 ^a	0,1 ^c	78,8	1,3	Presente trabajo
NFX									
HPLC-UV	1	CH ₂ Cl ₂	3,5	0,08–2,3	0,08 ^b	NR	90,6	3,5	[12]
TLC	10	Acetato de etilo	40	0,5–10	0,1-0,2	NR	80	NR	[13]
MELLID-HPLC-UV	0,54	[C ₈ C ₁ im][PF ₆]	0,013	0,08–908,7	0,02 ^a	0,08 ^c	97,6	0,76	Presente trabajo

^a S/N= 3; ^b S/N= 2; ^c S/N= 10; ^d intra-día; ^e 3.3 s₀; ^f 9 s₀.

De acuerdo a estos resultados, se puede concluir que la técnica MELLID-HPLC-UV requiere pequeñas cantidades de solvente de extracción (unos pocos microlitros de líquido iónico), exhibe un amplio rango lineal, los límites de detección y cuantificación son muy bajos, y es muy reproducible intra e inter-día, obteniéndose recuperaciones porcentuales muy altas para NFX y moderadamente elevadas para BNZ. Así, la metodología desarrollada puede ser aplicada análisis de muestras de plasma humano en pacientes infectados con la enfermedad de Chagas.

7.6. Optimización de la técnica MELLID aplicada a leche materna mediante diseño central compuesto (DCC).

Como se discutió en el **Capítulo 4**, la metodología DCC tiene la ventaja de disminuir el número de ensayos permitiendo encontrar con mayor precisión los valores óptimos de los distintos factores y/o detectar la presencia de interacciones entre las variables estudiadas. Cada variable se optimiza mediante un diseño de superficie de respuesta, que se construye por varios diseños superpuestos con el fin de determinar las condiciones óptimas del proceso de extracción.

Empleando los parámetros experimentales óptimos obtenidos en el procedimiento “*etapa por etapa*” para las determinaciones en plasma humano (**Sección 7.1**), se realizó luego una optimización a través de un DCC para el caso del análisis de leche materna. Si bien las matrices son muy diferentes, se puede asumir que los parámetros experimentales de la optimización en plasma constituyen un punto de partida adecuado para realizar una optimización más precisa de las variables experimentales. Por lo tanto, se “escalaron” los valores óptimos del diseño “*etapa por etapa*”, de modo tal de poder trabajar a microescala, ya que la cantidad de matriz disponible fue baja. Por otra parte, el gasto de reactivos es menor. El procedimiento en microescala se detalla en la **Sección 7.7**.

La respuesta a optimizar y para la cual se pretenden valores máximos, fue la recuperación porcentual ($R\%$). El tipo de extractante (RTIL) y dispersante (solvente orgánico soluble) fueron los utilizados en el procedimiento “*etapa por etapa*”. Por lo tanto los factores remanentes que se incluyeron en el DCC, por considerarse los más influyentes para las respuestas fueron:

- *Volumen de RTIL, V_{RTIL} .*
- *Volumen de dispersante, V_{MeOH} .*
- *pH.*
- *Efecto salino, C_{KCl} .*

Los niveles que se eligieron para dichas variables corresponden a valores que se encuentran cercanos a los correspondientes valores óptimos o máximos. Teniendo en cuenta lo desarrollado en la **Sección 4.7**, los ensayos requeridos por el DCC incluyen distintas clases de puntos (ensayos) dentro del dominio experimental:

Puntos factoriales, pf , que son aquellos que forman parte de un diseño factorial de dos niveles y tienen los factores en niveles -1 o $+1$.

Puntos centrales, pc , que son aquellos que tienen todos los factores en nivel 0.

Puntos axiales o **puntos estrella**, pe , que son aquellos que se encuentran a una distancia $\pm\alpha$ del punto central.

En la **Figura 4.6** puede verse un esquema representativo del DCC empleado en este caso. Como se vio en la **Sección 4.7**, el valor de α determina la ubicación de los puntos “estrella” y generalmente varía desde un valor de 1 hasta \sqrt{k} , siendo el operador el que fija este valor de acuerdo a la región de interés y las condiciones de operabilidad del dominio experimental. Considerando los niveles estudiados para nuestros factores y ante la situación de ajustar el pH en valores tan cercanos entre niveles, elegimos

para el diseño un valor práctico de $\alpha = \sqrt{k} = \pm 2$, equidistante a los puntos centrales del diseño. Las réplicas que se realizan para el punto central cumplen con los objetivos desarrollados en el inciso 4.7.2. Además, para obtener tipos de ensayos (bloques) balanceados incluimos un total de 6 puntos centrales en el diseño distribuidos equitativamente entre los distintos bloques.

Por lo tanto, el DCC construido para $k=4$ factores, consistió en: $pf=2^4=16$, $pe=2 \times 4=8$ y $pc=6$ lo cual resulta en un total de 30 ensayos. El DCC empleado en este trabajo se volvió a repetir una semana después de modo de obtener un duplicado (o sea necesitamos un total de 60 experimentos). Estos ensayos se dividieron en tres bloques realizados en tres días consecutivos. En el diseño “*etapa por etapa*” utilizado para la determinación de los fármacos antichagásicos en plasma humano, se realizaron un total de 237 experimentos. Si bien, estos se realizaron por triplicado, al involucrar todas las variables mencionadas en la Sección 7.3.1, el número de experimentos es mucho mayor y los óptimos encontrados podrían encontrarse bastante alejados de los verdaderos valores.

Los resultados obtenidos mediante el DCC se utilizaron para construir un modelo para cada respuesta ajustando a una ecuación polinómica del tipo $y = a + b \cdot x + c \cdot x_1$ para el caso del compuesto BNZ y $y = a + b \cdot x + c \cdot x \cdot x_1$ para NFX, debido a que estos modelos (del tipo lineal con interacciones) son los que mejor explicaban el comportamiento de las respuestas en función a los factores analizados. En cada modelo, los coeficientes fueron calculados por regresión múltiple aplicando la estrategia de eliminación por retroceso. Esta estrategia consiste en construir inicialmente un modelo completo y evaluar luego cada término a través de un ANOVA para eliminar uno a uno los términos no significativos ($\alpha = 0,10$). Esta iteración se detiene cuando todos los términos restantes cumplen con el nivel de probabilidad fijado. De esta manera se obtuvo para cada respuesta un modelo simplificado incluyendo en cada caso los términos significativos. Cada modelo se validó finalmente verificando que el mismo resultara significativo para la prueba de ANOVA con un $p < 0,05$ y que su falta de ajuste fuera no significativa con un $p > 0,05$.

7.6.1. Experimentos y respuestas.

Las condiciones establecidas en cada experimento se enumeran en la **Tabla 7.7**. Los materiales y el equipamiento empleado en esta sección son los enumerados en la **Sección 7.2.1** y **7.2.2**, respectivamente, con la diferencia que la fase móvil empleada fue metanol/agua (45:65 v/v).

Leche materna libre de fármacos antichagásicos y drogas de abuso fue obtenida de madres voluntarias del Hospital de Niños “Dr. Ricardo Gutierrez” de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Las muestras fueron almacenadas en frascos de polipropileno con tapa a -20 °C hasta el momento del análisis.

Tabla 7.7: Niveles y factores elegidos para la aplicación del DCC.

Factor	-α	-1	0	+1	+α
V_{RTIL} (μL)	28	31,5	35	38,5	42
V_{MeOH} (μL)	56	70	84	98	112
C_{KCl} % (p/v)	1	1,5	2	2,5	3
pH	5	5,5	6,0	6,5	7

En la **Tabla 7.8** se presentan los experimentos realizados y las respuestas obtenidas en cada uno de ellos. Los mismos fueron realizados en un orden aleatorio para asegurar la independencia de los resultados minimizando el efecto de los factores no controlados.

Tabla 7.8: Experimentos del DCC y respuestas obtenidas.

<i>Ensayo</i>	<i>Tipo de punto</i>	D: C_{KCl} %				%R (BNZ)	%R (NFX)
		A: V_{LI} (μL)	B: V_{Met} (μL)	C: pH	(p/v)		
1	Factorial	31,5	70	5,5	1,5	75,9	86,0
2	Factorial	31,5	70	5,5	1,5	64,3	79,5
3	Factorial	38,5	70	5,5	1,5	76,2	85,6
4	Factorial	38,5	70	5,5	1,5	67,7	83,6
5	Factorial	31,5	98	5,5	1,5	74,5	84,9
6	Factorial	31,5	98	5,5	1,5	73,3	89,1
7	Factorial	38,5	98	5,5	1,5	79,3	89,9
8	Factorial	38,5	98	5,5	1,5	72,2	82,8
9	Factorial	31,5	70	6,5	1,5	53,6	75,4
10	Factorial	31,5	70	6,5	1,5	66,2	86,2
11	Factorial	38,5	70	6,5	1,5	78,5	90,9
12	Factorial	38,5	70	6,5	1,5	68,8	84,8
13	Factorial	31,5	98	6,5	1,5	69,5	85,2
14	Factorial	31,5	98	6,5	1,5	62,6	89,0
15	Factorial	38,5	98	6,5	1,5	73,0	87,5
16	Factorial	38,5	98	6,5	1,5	62,3	81,2
17	Factorial	31,5	70	5,5	2,5	65,2	75,0

18	Factorial	31,5	70	5,5	2,5	70,5	86,2
19	Factorial	38,5	70	5,5	2,5	79,2	90,7
20	Factorial	38,5	70	5,5	2,5	74,2	83,6
21	Factorial	31,5	98	5,5	2,5	51,1	73,8
22	Factorial	31,5	98	5,5	2,5	62,4	84,2
23	Factorial	38,5	98	5,5	2,5	76,1	91,5
24	Factorial	38,5	98	5,5	2,5	67,7	82,8
25	Factorial	31,5	70	6,5	2,5	65,8	83,2
26	Factorial	31,5	70	6,5	2,5	54,6	71,2
27	Factorial	38,5	70	6,5	2,5	67,8	78,1
28	Factorial	38,5	70	6,5	2,5	71,4	89,1
29	Factorial	31,5	98	6,5	2,5	66,1	80,8
30	Factorial	31,5	98	6,5	2,5	60,6	82,6
31	Factorial	38,5	98	6,5	2,5	74,6	87,0
32	Factorial	38,5	98	6,5	2,5	69,3	87,3
33	Axial	28	84	6	2	40,1	78,0
34	Axial	28	84	6	2	52,2	71,9
35	Axial	42	84	6	2	73,0	88,6
36	Axial	42	84	6	2	68,1	82,2
37	Axial	35	56	6	2	69,1	80,5
38	Axial	35	56	6	2	59,8	82,6
39	Axial	35	112	6	2	60,3	80,1
40	Axial	35	112	6	2	56,4	76,2
41	Axial	35	84	5	2	68,3	84,9
42	Axial	35	84	5	2	66,2	86,0
43	Axial	35	84	7	2	62,1	80,6

Tabla 7.8 (continuación).

44	Axial	35	84	7	2	63,1	84,6
45	Axial	35	84	6	1	64,3	83,0
46	Axial	35	84	6	1	69,2	87,3
47	Axial	35	84	6	3	70,6	85,4
48	Axial	35	84	6	3	67,0	86,0
49	Centro	35	84	6	2	64,6	82,0
50	Centro	35	84	6	2	66,8	82,1
51	Centro	35	84	6	2	63,7	80,4
52	Centro	35	84	6	2	67,0	83,3
53	Centro	35	84	6	2	67,0	83,9
54	Centro	35	84	6	2	66,8	84,5
55	Centro	35	84	6	2	70,4	88,1
56	Centro	35	84	6	2	69,3	90,8
57	Centro	35	84	6	2	68,1	85,7
58	Centro	35	84	6	2	66,8	83,7
59	Centro	35	84	6	2	66,8	82,3
60	Centro	35	84	6	2	67,7	82,9

En la etapa final del diseño, se desarrolló un modelo de superficie de respuesta teniendo en

cuenta todas las interacciones significativas en el DCC. El análisis de datos permite obtener una expresión semi-empírica de $R\%$ en función de las variables optimizadas, de acuerdo a las **Ecuaciones 7.2 y 7.3**, para el BNZ y NFX, respectivamente:

$$\%R(\text{BNZ}) = 44,61 + 1,15V_{LI} - 3,01pH \quad (7.2)$$

$$\%R(\text{NFX}) = 116,82 - 0,87V_{LI} - 27,66C_{KCl} + 0,75V_{LI}C_{KCl} \quad (7.3)$$

De las ecuaciones anteriores se puede observar que para el BNZ los términos significativos son el volumen de LI y el pH, mientras que para el NFX los términos significativos fueron volumen de LI, la concentración de KCl y la interacción de ambas variables ($V_{LI}C_{KCl}$).

El siguiente paso fue encontrar las condiciones de los factores (volumen de líquido iónico, volumen de dispersante, concentración de KCl y pH) que maximizan la respuesta. Las **Figuras 7.11 a y b**, muestran las superficies de respuesta más relevantes para nuestro diseño. Para el BNZ, el diagrama de superficie (**Figuras 7.11.a**) muestra que, la recuperación porcentual ($R\%$) aumenta *linealmente* con la disminución del pH y el aumento de la cantidad de LI. Para el NFX el diagrama de superficie (**Figuras 7.11.b**) muestra que $R\%$ aumenta *linealmente* con el aumento del volumen de RTIL y con la disminución de la concentración de KCl. Este último comportamiento es contrario a lo esperado, y se puede deber a que las interacciones coulombicas entre el LI y la sal aumentan la solubilidad de aquel en la fase acuosa. De las **Ecuaciones 7.2 y 7.3** obtenidas se observa, además, que para ambos fármacos el volumen de dispersante es irrelevante en la recuperación.

Como puede apreciarse, con una simple inspección visual de las superficies de respuestas obtenidas no es posible encontrar las condiciones experimentales óptimas; es decir la mejor combinación de los niveles de los cuatro factores para alcanzar simultáneamente valores aceptables para la respuesta evaluada. En estos casos es de gran utilidad la aplicación de la **función conveniencia u objetivo** de Derringer [15] para cada respuesta ya que puede ser aplicada a sistemas de respuestas múltiples o respuestas individuales (como es en este caso), utilizando el correspondiente modelo ajustado y seleccionando el criterio de optimización a lograr en cada caso. Los factores también fueron incluidos en el procedimiento de optimización simultánea a los fines de priorizar el uso de ciertas condiciones más convenientes dentro de la región experimental. En ambos casos se seleccionaron los rangos deseables para las variables y se estableció si la misma debía maximizarse, minimizarse, mantenerse dentro de un

rango o alcanzar un valor objetivo. El criterio utilizado en este caso corresponde a maximizar la $R\%$.

Para cada respuesta a optimizar, $y_i(k)$, se debe calcular una función conveniencia u objetivo individual, $d_i(y_i)$. Esta función siempre toma valores entre 0 y 1, donde para cualquier valor no deseable de la respuesta, $d_i(y_i) = 0$, mientras que $d_i(y_i) = 1$ representa un valor completamente deseable o conveniente, es decir una respuesta ideal. Los valores intermedios de $d_i(y_i)$ representan a respuestas aceptables más o menos deseables. Para evaluar el comportamiento global del sistema se calcularon con el programa Design Expert 8, numerosos valores de D (*función conveniencia u objeto*). Para esto se utilizaron las funciones d_i creadas para cada respuesta y se obtuvieron los resultados de las mismas para muchas combinaciones diferentes de los factores en el espacio experimental. La función de conveniencia global en estas condiciones, fue igual a **0,957** y **1,000** para el **BNZ** y **NFX**, respectivamente, valores que muestran que *los modelos DCC obtenidos predicen correctamente la máxima recuperación porcentual de los analitos*, sobre todo teniendo en cuenta el número de variables que se optimizaron simultáneamente.

En resumen, las condiciones experimentales óptimas para maximizar la microextracción dispersiva de cada compuesto con $[C_8C_{1im}][PF_6]$ son:

Para el BNZ: $V_{LI} = 42 \mu L$; $V_{MeOH} = 101,2 \mu L$; $pH = 5,00$; $C_{KCl} = 1,98 \%$ (p/v)

El valor máximo (no observable del **Gráfico 7.11.a** debido al rango mostrado para las variables independientes) se alcanza cuando la $R\% = 78,0\%$.

Para el NFX: $V_{LI} = 42 \mu L$; $V_{MeOH} = 80,0 \mu L$; $pH = 5,91$; $C_{KCl} = 2,97 \%$ (p/v)

La $R\%$ máxima se alcanza al **91,6%** (no observable del **Gráfico 7.11.b** por las mismas razones mencionadas anteriormente).

Los valores óptimos encontrados previamente con el método “*etapa por etapa*” para ambos compuestos en agua fueron:

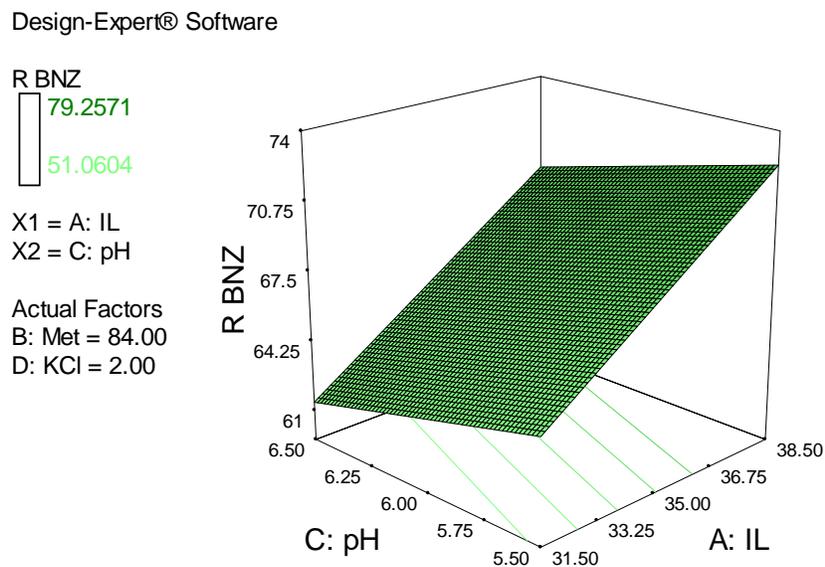
$V_{LI} = 35 \mu L$; $V_{MeOH} = 84 \mu L$; $pH = 6,12$; $C_{KCl} = 2,00 \%$ (p/v)

Los tiempos de centrifugación y extracción no se consideraron en el DCC porque el aumento de uno o dos factores, aumentaban considerablemente el número de ensayos. Por lo tanto, seleccionamos

los valores óptimos del procedimiento “etapa por etapa”: 6,0 min como tiempo de extracción y 20,0 min como tiempo de centrifugación.

Como puede observarse al comparar los dos diseños, los valores óptimos son muy parecidos en algunos casos pero muy diferentes en otros. Esto tiene sentido, puesto que la optimización DCC es un procedimiento mucho más riguroso que la optimización por etapas, el cual no considera por ejemplo, las interacciones que pueden haber entre las variables. Por lo tanto se espera que los valores óptimos que arroja el procedimiento DCC estén mas cercanos a los valores reales. Además las matrices “leche materna” y “plasma humano” son muy diferentes.

El volumen de LI predicho por el DCC realizado para la matriz “leche materna” es algo menor al determinado en el procedimiento “etapa por etapa” donde los fármacos se encontraban disueltos en agua. Para el caso del volumen del dispersante (metanol) y la concentración de KCl se obtuvieron valores intermedios a los obtenidos con el procedimiento “etapa por etapa”, mientras que el pH predicho por el diseño factorial es mayor. Estas diferencias se pueden atribuir al hecho que el DCC se realizó sobre la matriz biológica y no sobre agua pura, sumado a que desconocemos el estado de protonación de las fármacos debido a que no contamos con los valores respectivos de pK_a .



(a)

Design-Expert® Software

R NFX

91.492

71.1681

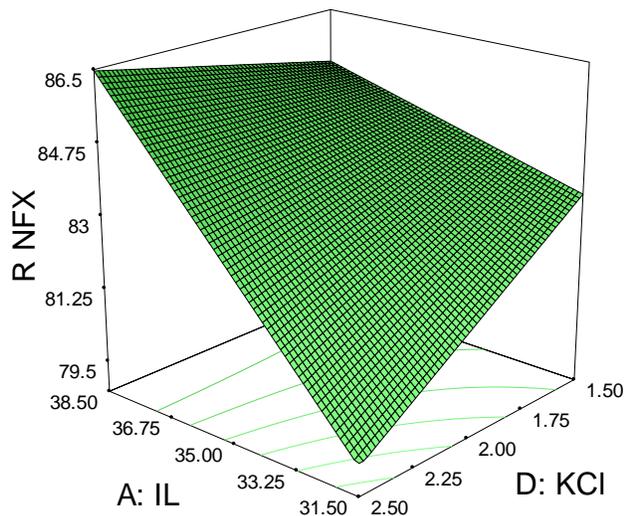
X1 = A: IL

X2 = D: KCl

Actual Factors

B: Met = 84.00

C: pH = 6.00



(b)

Figura 7.11: Superficies de respuesta para (a) BNZ y (b) NFX.

7.7. Procedimiento experimental optimizado mediante DCC.

Las microextracciones fueron realizadas de acuerdo al siguiente procedimiento:

A un tubo eppendorf conteniendo 250 μL de leche materna (en ausencia de los fármacos) se agregó 5 μL de BNZ 486 mg L^{-1} y NFX 574 mg mL^{-1} y 800 μL de una mezcla de HClO_4 (0,15M): H_3PO_4 (0,15M):MeOH para desproteínizar. Luego de varias mezclas desproteneizantes ensayadas, algunas obtenidas de la literatura, esta combinación resultó ser la más eficiente [16]. Se agitó en un agitador mecánico vortex durante 2,0 min, seguidamente se incubaron las mezclas durante 60,0 min en un baño de agua a 80 °C, se centrifugó durante 20 min a 10.000 rpm y se separó el sobrenadante del material sólido (lipidos y proteínas) con ayuda de una pipeta Pasteur. Se agregaron 200 μL más de la mezcla desproteneizadora sobre el residuo remanente para extraer los restos de los analitos y se repite el procedimiento de incubación/centrifugación, separando el sobrenadante y adicionandolo al primer extracto. **I)** Para el caso de NFX, se continúa con el agregado de 50 μL de solución de NaOH 2M para

llevar al pH optimizado mediante la técnica “etapa por etapa”. Luego para incrementar la eficiencia de extracción, se agrega 150 μL de solución de KCl 30% (p/v). Finalmente, se agrega 122 μL de una mezcla de 42 μL de $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$ y 80 μL de MeOH (extractante y dispersante) y se lleva a 1,5 mL con agua MilliQ. **II)** para el caso de BNZ, se agrega 100 μL de solución de KCl 30% (p/v) y 45 μL de solución de NaOH 2 M. Estas pequeñas diferencias en las cantidades empleadas, comparadas con las de NFX se debe a que los valores óptimos fueron ligeramente diferentes. Finalmente, se agrega 143 μL de la mezcla de 42 μL de $[\text{C}_8\text{C}_1\text{im}][\text{PF}_6]$ y 101 μL de MeOH) y se lleva 1,5 mL con agua MilliQ. Se mezcla en un agitador mecánico vortex, se agita por 6,0 min y se centrifuga a 10.000 rpm por 20,0 min. La fase acuosa que quedó en la parte superior fue removida con pipeta Pasteur. La fase RTIL fue de 40 ± 5 μL . Finalmente, 5 μL del extractante se inyectaron a la columna cromatográfica. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

7.8. Performance analítica de la metodología de optimización mediante DCC.

Para la metodología MELLID–HPLC-UV optimizada mediante DCC, se evaluaron las mismas cifras de mérito que para la metodología desarrollada para la extracción desde plasma. Las rectas de calibración fueron realizadas a 8 niveles dentro del rango lineal en 3 muestras de leche materna sin contenido inicial de las drogas y se muestran en **Tabla 7.9**. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

Tabla 7.9: Rectas de calibración para NFX and BNZ en 3 muestras de leche materna sin contenido inicial de las drogas.

Analito	Recta de regresión	r^2 , ^a	N ^b
BNZ(1)	$y = (-24,0 \pm 8,2) + (3,5 \pm 0,2)x$	0,9724	24
NFX(1)	$y = (-38,1 \pm 16,1) + (4,5 \pm 0,4)x$	0,9327	22
BNZ(2)	$y = (-14,2 \pm 4,7) + (4,0 \pm 0,1)x$	0,9900	19
NFX(2)	$y = (-54,2 \pm 9,8) + (6,8 \pm 0,2)x$	0,9936	22
BNZ(3)	$y = (-12,2 \pm 4,3) + (4,42 \pm 0,08)x$	0,9969	19
NFX(3)	$y = (-121 \pm 18) + (7,9 \pm 0,3)x$	0,9929	22

^a r^2 = coeficiente de determinación; ^b N = número de puntos.

Con el fin de investigar la presencia de efectos de matriz, se aplicó el procedimiento detallado en la **Sección 5.3** y la aplicación de la **Ecuación 5.30** (prueba-*t*) de la **Sección 5.3**. Previamente se realizó un análisis de varianzas, encontrándose que $F_{exp} > F_{crít}$, para ambos compuestos, lo cual muestra que las diferencias son significativas. Posteriormente se determinó un t' combinado (**Ecuación 5.35**) para cada compuesto en las distintas muestras, debido a que el número de datos de cada regresión es distinto. Para las 6 muestras se obtuvo que $t'_{crít} < t_{exp}$ con lo cual se concluye que, estadísticamente, las pendientes son distintas por lo que *existe efecto de matriz*. Como consecuencia de ello, para la cuantificación de BNZ y NFX en muestras de leche materna se empleó el método de las adiciones de estándar o sobreagregado. En la **Tabla 7.10** se comparan las pendientes entre las 3 muestras y se muestran los valores de t_{exp} y $t'_{crít}$ obtenidos.

En la **Figura 7.12** se muestra el efecto de la preconcentración de BNZ y NFX mediante el procedimiento de microextracción optimizado y en la **Tabla 7.11** se muestran los factores de enriquecimiento (*FE*), los cuales van desde 32,8-33,8 para el NFX y de 28,8-29,6 para el BNZ, dependiendo de la concentración inicial. Por otro lado también se observa que los valores de recuperación porcentual (*R%*) aplicando la metodología experimental optimizada se asemeja a los valores de recuperación porcentual que arroja el modelo DCC: 76,8-78,8 % comparado con 78,0 % empleando DCC para **BNZ** y 87,8-90,8 % comparado con 91,6 % empleando DCC para **NFX**. Si comparamos ahora los valores de recuperación porcentual logrados a partir del método “etapa por etapa” aplicado a plasma humano.

Tabla 7.10: Comparación de pendientes para detectar efectos de matriz.

Comparación de pendientes	<i>t</i> (calc.)	<i>t'</i>(crít.)
<i>BNZ</i>		
<i>Comparación (1-2)</i>	2,020	2,010
<i>Comparación (1-3)</i>	4,660	2,084
<i>Comparación (2-3)</i>	2,843	2,109
<i>NFX</i>		
<i>Comparación (1-2)</i>	5,374	2,090
<i>Comparación (1-3)</i>	7,200	2,042
<i>Comparación (2-3)</i>	3,464	2,042

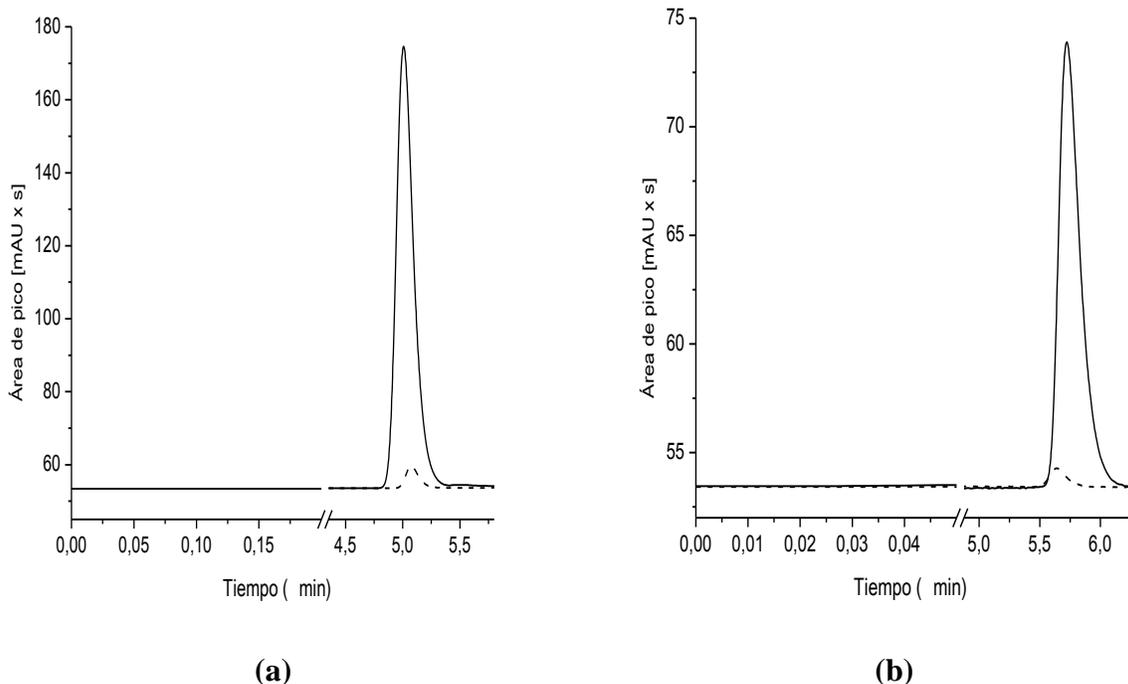


Figura 7.12: Cromatogramas para muestra de leche materna sembrada con: (a) $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de BNZ y (b) $2,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NFX. Muestras desproteinizadas antes de preconcentrar (línea de puntos) y luego del procedimiento MELLID optimizado mediante DCC (línea continua).

Tabla 7.9: Factor de enriquecimiento (FE) y recuperación porcentual ($R\%$) para muestras de leche materna con diferentes niveles de concentración sembrados con NFX y BNZ.

$C (\mu\text{g mL}^{-1})$	NFX			BNZ		
	FE	$R (\%)^a$	$RSD (\%)^b$	FE	$R (\%)^a$	$RSD (\%)^b$
2,5	33,8	90,0	1,2	28,8	76,8	1,5
5	33,5	89,3	0,8	29,0	77,3	0,9
7,5	33,0	90,8	0,8	28,6	76,3	0,9
10	33,0	90,6	1,0	29,3	78,1	1,0
15	32,8	87,8	0,7	29,6	78,9	0,6

^a Recuperación porcentual ($n = 3$), ^b $RSD (\%)$ para la recuperación.

El límite de detección (L_D) fue calculado aplicando la definición de la IUPAC y utilizando la relación señal/ruido (S/N) con $k= 3$ y el límite de cuantificación (L_Q) fue evaluado a partir de la

definición de la IUPAC y utilizando la relación S/N con un $k=10$, como se vio en la **Sección 5.2.3.4**. El límite superior de cuantificación fue determinado utilizando un ensayo de falta de ajuste como se explicó en la **Sección 5.2.2**. En la **Tabla 7.12** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 7.12: Límite de detección (L_D) y límite de cuantificación (L_Q) en $\mu\text{g mL}^{-1}$ obtenido para BNZ y NFX en leche materna.

Compuesto	Rango lineal	L_D^a	L_D^c	L_Q^b	L_Q^c
BNZ	0,30-29,16	0,09	0,29	0,30	0,88
NFX	0,20-34,40	0,06	0,18	0,20	0,55

^a S/N= 3; ^b S/N= 10; ^c De la curva de calibración (definición de la IUPAC).

A fin de evaluar la reproducibilidad del método de extracción, se determinó la precisión inter-día (5 días, $n=3$) e intra-día ($n=5$). La exactitud se evaluó a través del cálculo del error relativo (**Ecuación 7.1**) sembrando cantidades conocidas a muestras de leche materna libres de las drogas. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 7.13**. El *RSD* (%) es inferior a 6,3% en todos los casos. Se puede ver de la **Tabla 7.13**, que las cantidades encontradas son algo inferiores a las presentes en las muestras iniciales, es decir, se comete un error por defecto. Esto puede ser consecuencia de la pérdida de analito en las etapas de microextracción. La concentración encontrada para ambos fármacos antichagásicos fue corregida por las respectivas recuperaciones porcentuales.

Tabla 7.13. Determinación cuantitativa de NFX and BNZ en muestras leche materna sembradas. Exactitud y reproducibilidad de la técnica MELLID optimizada.

Fármaco	$C_{\text{agregada}} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$C_{\text{encontrada}} (\mu\text{g mL}^{-1})$	Error (%) ^a	<i>RSD</i> (%)
NFX				
<i>Intra-día</i>	5,0	4,8±0,3	-4,16	4,16
<i>Inter-día</i>	5,0	5,2±0,5	3,85	5,77
<i>Intra-día</i>	10,0	9,7±0,3	-3,09	1,55
<i>Inter-día</i>	10,0	9,8±0,3	-2,04	2,04
<i>Intra-día</i>	15,0	14,5±0,2	-3,44	0,68
<i>Inter-día</i>	15,0	14,8±0,4	-1,35	2,02
BNZ				
<i>Intra-día</i>	5,0	5,1±0,2	1,96	1,96
<i>Inter-día</i>	5,0	4,8±0,4	-4,16	6,25
<i>Intra-día</i>	10,0	9,8±0,3	-2,04	2,04

<i>Inter-día</i>	10,0	9,7±0,4	-3,09	2,06
<i>Intra-día</i>	15,0	14,7±0,3	-2,04	1,36
<i>Inter-día</i>	15,0	14,6±0,5	-2,73	2,05

^a Error relativo porcentual (**Ecuación 7.1**).

7.9. Análisis de muestras de leche de pacientes tratados con los fármacos antichagásicos.

De la sección anterior, se puede concluir que la performance de la metodología de extracción es muy buena, ya que reúne varias ventajas como ser reproducible y permitir alcanzar muy bajos límites de detección y cuantificación. Por lo tanto, se aplicó la técnica MELLID para cuantificar los fármacos antichagásicos en muestras de leche materna de madres en período de lactancia tratadas con las drogas.

Se obtuvieron ocho muestras de leche materna de diferentes pacientes de madres lactantes con enfermedad de Chagas tratados con BNZ ó NFX (BNZ 5 mg/kg/día cada 12 horas por 30 días, o NFX 10–15 mg/kg/día cada 8 horas por 30 días), que se inscribieron en un estudio clínico aprobado por el Comité de Ética del Hospital Pediátrico “Dr. Ricardo Gutiérrez” de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. Dicho estudio clínico tuvo en consideración como criterio de inclusión a mujeres lactantes que no estaban tomando drogas de abuso o cualquier otro medicamento a excepción de BZN ó NFX y como criterios de exclusión a mujeres lactantes con antecedentes de alergia o efectos adversos severos asociados al benznidazol o nifurtimox o alguno de sus excipientes, en la madre o en el bebé amamantado, a mujeres embarazadas, pacientes con enfermedades sistémicas que podrían interferir con la interpretación de los resultados, madres cuyos bebés lactantes se encuentren recibiendo medicamentos que pudieran presentar eventos adversos similares a los de los medicamentos antichagásicos (vómitos, diarrea, cefaleas o reacciones cutáneas alérgicas, etc.) y madres cuyos bebés lactantes presenten enfermedades sistémicas significativas que puedan interferir con la interpretación de los resultados.

Se recogió alrededor de 5 mL de leche materna por paciente en frascos estériles de polipropileno con tapa, sin aditivos. Debido a la presencia de efectos de matriz detectados en la sección anterior, se empleó el método del sobreagregado. Los resultados se muestran en la **Tabla 7.14**.

Tabla 7.14: Concentración de BNZ y NFX encontradas en muestras de leche materna de pacientes tratados con las drogas. Las muestras fueron analizadas por triplicado.

BNZ		NFX	
Muestra	C (µg mL ⁻¹)	Muestra	C (µg mL ⁻¹)

Muestra 1	7,1±0,3	Muestra 1	NC
Muestra 2	5,2±0,4	Muestra 2	8,2±0,3
Muestra 3	3,1±0,3	Muestra 3	8,1±0,4
Muestra 4	NC	Muestra 4	NC

NC= Debajo del L_Q (no cuantificable).

En la literatura existe un único trabajo para la determinación analítica de BNZ en leche materna. La metodología llevada a cabo por los autores es muy sencilla y consiste en tres pasos: una precipitación del material proteico, seguida de una micro-filtración en tandem y por último la introducción al sistema cromatográfico [17]. La recuperación porcentual obtenida por los autores fue del 70%, con una reproducibilidad < 10%, L_D y L_Q de 0,3 y 0,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Como puede observarse, los resultados obtenidos en este trabajo de tesis mejoran sensiblemente estas cifras de mérito.

7.10. Bibliografía.

- [1] X.-H. ZANG, Q.-H. WU, M.-Y. ZHANG, G.-H. XI, Z. WANG, Chinese J. Anal. Chem., 37 (2009) 161–168.
- [2] R.R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.-R.M. Hosseini, M.R. Jamali, Talanta, 72 (2007) 387–393.
- [3] J.G. Huddleston, A.E. Visser, W.M. Reichert, H.D. Willauer, G.A. Broker, R.D. Rogers, Green Chem., 3 (2001) 156–164.
- [4] K.E. Gutowski, G.A. Broker, H.D. Willauer, J.G. Huddleston, R.P. Swatloski, J.D. Holbrey, R.D. Rogers, J. Am. Chem. Soc., 125 (2003) 6632–6633.
- [5] J.-F. Peng, J.-F. Liu, X.-L. Hu, G.-B. Jiang, J. Chromatogr. A, 1139 (2007) 165–170.
- [6] L. Fu, X. Liu, J. Hu, X. Zhao, H. Wang, X. Wang, Anal. Chim. Acta, 632 (2009) 289–295.
- [7] Q. Zhou, H. Bai, G. Xie, J. Xiao, J. Chromatogr. A, 1177 (2008) 43–49.
- [8] L. Guerrero, M.J. Pinazo, E. Posada, J. Gascón, J. Ribas, D. Soy, Clin. Chem. Lab. Med., 49 (2011) 77–82.
- [9] M.J. Morilla, P.E. Benavidez, M.O. Lopez, E.L. Romero, J. Chromatogr. Sci., 41 (2003) 405–409.
- [10] M.I. Walton, P. Workman, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 375 (1986) 190–196.
- [11] M.E. Marsón, D.D. Dana, J. Altcheh, F. García-Bournissen, G. Mastrantonio, J. Clin. Lab. Anal., 27 (2013) 384–390.
- [12] C. Paulos, J. Paredes, I. Vasquez, G. Kunze, G. González-Martin, J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl., 433 (1988) 359–362.
- [13] H. Medenwald, K. Brandau, K. Schlossman, Arzneimittelforschung., 22 (1972) 1613–1617.

- [14] A.M. Bezerra, R. Erthal Santelli, E. Padua Oliveira, L. Silveira Villar, A.L. Escaleira, *Talanta*, 76 (2008) 965–977.
- [15] G. Derringer, R. Suich, *J. Qual. Technol.*, 12 (1980) 214–219.
- [16] N. Mestorino, M.L. Marchetti, E. Turic, J. Pessoa, J. Errecalde, *Anal. Chim. Acta*, 637 (2009) 33–39.
- [17] M.E. Marson, J.M. Padró, M.R. Reta, J. Altcheh, F. García-Bournissen, G. Mastrantonio, *Ther. Drug Monit.*, 35 (2013) 522–526.

❖ CONCLUSIONES.

- ❖ Se determinaron de manera precisa los coeficientes de partición a 25°C entre agua y nueve líquidos iónicos a temperatura ambiente con cationes nitrogenados y fosforados para compuestos de diversa naturaleza química, que incluyen compuestos de interés biológico y farmacológico.
- ❖ Los coeficientes de partición de la denominada “serie de calibración” fueron utilizados en el Modelo del Parámetro Solvatación (MPS) para dilucidar las principales interacciones responsables del mecanismo de reparto de diversos compuestos orgánicos, como así también para poder predecir coeficientes de partición para cualquier otro compuesto diferente a los de la serie de calibración.
- ❖ El MPS permitió seleccionar el RTIL más eficiente para llevar a cabo la extracción líquido-líquido propuesta para dos compuestos antichagásicos, ya que el mayor coeficiente de partición predicho por el modelo correspondió a un líquido iónico que permitió obtener las recuperaciones más altas a partir de las matrices en las que se encuentran.
- ❖ Se sintetizaron cuatro líquidos iónicos, empleando un procedimiento modificado respecto de un método publicado en la literatura. Dicho procedimiento es más rápido y más sencillo, el rendimiento de la síntesis es más alto y requiere poco volumen de solvente orgánico en la etapa de limpieza.
- ❖ Se midieron los parámetros empíricos de solvente de Kamlet-Taft, π^* , de polaridad-polarizabilidad, α de capacidad donora de puente hidrógeno y β de capacidad aceptora de puente hidrógeno, así como también el parámetro E_T^N de Reichardt para los diferentes líquidos iónicos a temperatura ambiente estudiados. El objetivo fue poder entender mejor el significado fisicoquímico de los coeficientes obtenidos en las regresiones multiparamétricas del MPS. Para el caso de los líquidos iónicos cuyos parámetros de solvente se encuentran en la literatura, la coincidencia con los valores obtenidos en este trabajo fue excelente, dentro del error experimental, lo cual valida el procedimiento experimental utilizado.
- ❖ Para el caso del coeficiente b (*acidez por puente H del sistema bifásico*) del MPS, se obtuvieron valores negativos, diferentes de cero, tanto para los líquidos iónicos con catión nitrogenado, como para los que tienen cationes fosfonio. Este resultado está de acuerdo con valores obtenidos

para el parámetro empírico α (*acidez por puente H del líquido iónico*) finitos, menores al valor del agua, obtenidos para todos los líquidos iónicos estudiados. La causa se debe a la presencia de H ácidos en la estructura del catión, sin dejar de considerar un aumento de la acidez por la presencia de agua disuelta. Para el caso del coeficiente a (*basicidad por puente H del sistema bifásico*), se obtuvieron valores negativos, diferentes de cero. Este resultado está de acuerdo con los valores obtenidos para el parámetro empírico β (*basicidad por puente H del líquido iónico*) finitos, menores al valor del agua para la mayoría de los líquidos iónicos estudiados, excepto para $[(C_6)_3C_{14}P][Cl]$ y $[(C_6)_3C_{14}P][Br]$. La solubilidad en agua de estos dos líquidos iónicos es la más alta de todos los líquidos iónicos estudiados, por lo que la presencia de agua, la cual presenta una basicidad moderada, puede ser la causa de aquel comportamiento. Finalmente, el coeficiente s (*polaridad del sistema bifásico*) muestra que en general todos los líquidos iónicos estudiados son polares, con valores menores a la polaridad del agua pura, ya que el valor es finito y negativo, lo cual está de acuerdo con los valores obtenidos para el parámetro empírico π^* .

- ❖ La técnica de microextracción dispersiva con líquidos iónicos acoplada a HPLC con detección UV, se ha utilizado por primera vez para la determinación analítica de benznidazol (BNZ) y nifurtimox (NFX) en muestras de plasma humano y leche materna. Se optimizaron las variables experimentales de la técnica de microextracción mediante un procedimiento “etapa por etapa” para el caso de plasma humano y mediante un diseño factorial (diseño central compuesto) para el caso de leche materna. Si se comparan los valores óptimos obtenidos para las variables experimentales más significativas mediante los dos procedimientos de optimización, se encuentra muy buena coincidencia o diferencias importantes, dependiendo del compuesto y la variable que se compare. Esto puede atribuirse a varios factores: 1) a la mejor capacidad predictiva del diseño factorial el cual, al ser más riguroso y tener una base estadística, se espera que tenga una mejor performance que un procedimiento totalmente empírico e intuitivo como lo es el método “etapa por etapa”; 2) a que nos encontremos ante un sistema de respuestas individuales cuya superficie de respuesta no permite arrojar valores simultáneos óptimos, o 3) a que la optimización se realizó para el caso de dos matrices diferentes y la influencia de los componentes de la matriz en las respuestas puede ser diferente.
- ❖ Como podría esperarse de acuerdo a la intuición química, cuanto mayor es el volumen de líquido iónico mayor es la extracción, tal como lo predice el diseño factorial. También el diseño central

compuesto predice que la eficiencia de la extracción aumenta cuanto mayor es la cantidad del solvente dispersante (metanol), lo cual es consistente con la formación de microgotas más pequeñas en la matriz de la muestra al iniciarse la dispersión, lo cual acelera la transferencia de masa hacia el líquido iónico. Sin embargo, para el caso de la fuerza iónica el valor arrojado por el procedimiento “etapa por etapa” es levemente menor al predicho por el diseño factorial para el benznidazol y algo mayor para el caso del nifurtimox. Por otro lado, el pH predicho por el diseño factorial es mayor que el procedimiento “etapa por etapa”, aunque la interpretación de este resultado esta limitada al no disponer de los valores de pK_a para los fármacos estudiados.

- ❖ De acuerdo a las cifras de mérito obtenidas para evaluar la performance analítica de los procedimientos desarrollados, se puede concluir que la técnica de microextracción dispersiva empleada resulta ser más simple, rápida, sensible, eficiente y más amigable con el medio ambiente. Esto se debe a que se obtuvo mejor o similar reproducibilidad que la informada en la literatura para otras metodologías, las recuperaciones son altas (casi completas para nifurtimox y más bajas para benznidazol), los límites de detección y de cuantificación disminuyeron notablemente respecto de los valores de literatura, y se requirió de mucha menor cantidad de solvente de extracción. Por otra parte, la técnica requiere muy pequeñas cantidades de muestra, lo cual es una característica muy práctica y deseable en este tipo de matrices biológicas que no están disponibles en grandes cantidades.

❖ APÉNDICE.

Tabla 1: Descriptores de soluto para la serie de calibración y la serie de prueba empleada en el Modelo del Parámetro de Solvatación.

Serie de calibración		<i>Descriptores de soluto</i>				
<i>Compuestos</i>		<i>E</i>	<i>S</i>	<i>A</i>	<i>B^a</i>	<i>V</i>
1	<i>m</i> -Toluidina	0,946	0,95	0,23	0,55	0,9571
2	<i>o</i> -Toluidina	0,966	0,92	0,23	0,59	0,9571
3	<i>p</i> -Toluidina	0,923	0,95	0,23	0,55	0,9571
4	Anilina	0,955	0,96	0,26	0,50	0,8162
5	3-Nitroanilina	1,200	1,71	0,40	0,35	0,9904
6	4-Nitroanilina	1,220	1,91	0,42	0,35	0,9904
7	2-Nitroanilina	1,180	1,37	0,30	0,36	0,9904
8	4-Cloroanilina	1,060	1,13	0,30	0,35	0,9386
9	3-Cloroanilina	1,053	1,10	0,30	0,36	0,9386
10	3,4-Dicloroanilina	1,160	1,24	0,35	0,25	1,0610
11	Timina	0,800	1,00	0,44	1,03	0,8925
12	Tiourea	0,840	0,82	0,77	0,87	0,5696
13	Benzamida	0,990	1,50	0,49	0,67	0,9728
14	Acetanilida	0,870	1,36	0,48	0,67	1,1137
15	Cafeina	1,500	1,72	0,05	1,28	1,3632
16	Ácido-2,6-dimetilbenzoico	0,730	0,90	0,59	0,57	1,2135
17	Ácido benzoico	0,730	0,90	0,59	0,40	0,9317
18	Ácido-4-nitrobenzoico	0,990	1,07	0,68	0,54	1,1059
19	Ácido- 4-hidroxibenzoico	0,930	0,90	0,81	0,56	0,9904
20	Fenol	0,805	0,89	0,60	0,30	0,7751
21	<i>p</i> -Nitrofenol	1,070	1,72	0,82	0,26	0,9493
22	<i>m</i> -Nitrofenol	1,050	1,57	0,79	0,23	0,9493
23	<i>o</i> -Nitrofenol	1,015	1,05	0,05	0,37	0,9493
24	2,6-Diclorofenol	0,900	0,90	0,38	0,24	1,0199
25*	2,4,6-Triclorofenol	1,070	0,94	0,42	0,15	1,1423

Tabla 1 (continuación).

26	Resorcinol	0,980	1,11	1,09	0,52	0,8338
27	Catecol	0,970	1,10	0,88	0,47	0,8338
28	2-Naftol	1,520	1,08	0,61	0,40	1,1441
29*	<i>o</i> -Hidroxiethylresorcinol	1,070	1,20	0,73	0,92	1,1743
30	1,4-Benzoquinona	0,750	0,55	0,00	0,81	0,7908
31	Acetofenona	0,818	1,01	0,00	0,48	1,0139
32	<i>o</i> -Tolualdehído	0,870	0,96	0,00	0,40	1,0139
33	<i>m</i> -Tolualdehído	0,840	0,97	0,00	0,42	1,0139
34	<i>p</i> -Tolualdehído	0,862	0,87	0,00	0,47	1,0139
35	Benzaldehído	0,820	1,00	0,00	0,39	0,8730
36*	<i>p</i> -Dimetilaminobenzaldehído	1,050	1,40	0,00	0,76	1,2546
37	Nitrobenceno	0,871	1,11	0,00	0,28	0,8906
38	4-Nitrotolueno	0,870	1,11	0,00	0,28	1,0315
39	2-Nitrotolueno	0,866	1,11	0,00	0,28	1,0315
40	3-Nitrotolueno	0,874	1,10	0,00	0,25	1,0315
41	2,4-Dinitrofluorobenceno	1,006	1,69	0,00	0,45	1,0824
42	1,3,5-Trinitrobenceno	1,430	2,42	0,00	0,55	1,2390
43	Benzonitrilo	0,742	1,11	0,00	0,33	0,8711
44	Benceno	0,610	0,52	0,00	0,14	0,7164
45	Clorobenceno	0,718	0,65	0,00	0,14	0,7164
46	4-Clorotolueno	0,705	0,74	0,00	0,05	0,9797
47	3-Metilanisol	0,709	0,78	0,00	0,30	1,0569
48	4-Metilanisol	0,699	0,77	0,00	0,30	1,0569
49	2-Metilanisol	0,725	0,75	0,00	0,30	1,0569
Serie de prueba						
1*	Indoprofeno	1,920	2,30	0,57	1,17	2,1100
2	Ibuprofeno	0,730	0,59	0,59	0,81	1,7771
3*	Suprofeno	1,510	1,89	0,57	0,81	1,9026
4	Ketoprofeno	1,650	2,26	0,55	0,89	1,9779
5*	Fenoprofeno	1,390	1,63	0,57	0,78	1,8800
6	Acetaminofén	1,060	1,63	1,04	0,86	1,1724
7*	Fenbufeno	1,780	1,8	0,62	1,05	1,9779

Tabla 1 (continuación).

8*	Fluorbiprofeno	1,500	1,51	0,57	0,58	4,2960
9*	β – Estradiol	1,800	1,77	0,86	1,10	2,1988
10*	Benzoina	1,800	1,77	0,86	1,1	2,1988
11	Cortisona	1,960	3,50	0,36	1,87	2,7546
12	Hidrocortisona	2,030	3,49	0,71	1,90	2,7975
13*	Benznidazol	1,780	2,88	0,26	1,23	1,8565
14*	Propranolol	1,880	1,43	0,17	1,42	2,1480
15*	Nifurtimox	1,310	2,20	0,00	1,44	1,8848
16	Metronidazol	1,050	1,6	0,18	1,03	1,1919

^a Los parámetros B^o fueron usados para moléculas que contienen átomos de nitrógeno, ^{*} Descriptores de soluto obtenidos mediante el software ADME BOXES 5.0.

Tabla 2: Matrices de correlación para los parámetros de soluto de la serie de calibración empleada en el Modelo del Parámetro de Solvatación.

[C₄C₁im][PF₆]					
	E	S	A	B	V
E	1				
S	0,3466	1			
A	0,0003	0,0133	1		
B	0,0055	0,0389	0,0277	1	
V	0,2541	0,1497	0,0319	0,0181	1

[C₆C₁im][PF₆]					
	E	S	A	B	V
E	1				
S	0,3053	1			
A	0,0361	0,0879	1		
B	0,1449	0,1137	0,0129	1	
V	0,1079	0,0706	0,0015	0,0052	1

[C₈C₁im][BF₄]					
	E	S	A	B	V
E	1				
S	0,3822	1			
A	0,0132	0,0017	1		
B	0,0014	0,0125	0,0697	1	
V	0,2541	0,1637	0,1022	0,0465	1

[C₈C₁im][PF₆]					
	E	S	A	B	V
E	1				
S	0,357	1			
A	0,219	0,163	1		
B	0,001	0,042	0,027	1	
V	0,095	0,031	0,008	0,004	1

[C₈pyr][BF₄]					
---	--	--	--	--	--

Tabla 2 (continuación).

	E	S	A	B	V
E	1				
S	0,257	1			
A	0,080	0,058	1		
B	0,123	0,042	0,003	1	
V	0,002	0,000	0,041	0,047	1

[(C₆)₃C₁₄P][Cl]					
	S	A	B	V	
S	1				
A	0,001	1			
B	0,189	0,136	1		
V	0,180	0,118	0,022	1	

[(C₆)₃C₁₄P][Br]					
	S	A	B	V	
S	1				
A	0,173	1			
B	0,167	0,099	1		
V	0,235	0,073	0,104	1	

[(C₆)₃C₁₄P][N(CN)₂]					
	E	S	A	B	V
E	1				
S	0,275	1			
A	0,009	0,105	1		
B	0,067	0,011	0,000	1	
V	0,235	0,269	0,071	0,277	1

[(C₆)₃C₁₄P][NTf₂]					
	S	A	B	V	
S	1				
A	0,095	1			
B	0,037	0,001	1		
V	0,139	0,055	0,265	1	