

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

Laboratorio de investigación y desarrollo de métodos analíticos

(LIDMA)



Trabajo de Tesis Doctoral

**“Determinación de aminas aromáticas
heterocíclicas en carnes cocidas mediante
extracción con microondas y líquidos iónicos”**

Tesista: Lic. Leidy Bibiana Agudelo Mesa

Director: Dr. Mario Roberto Reta

Junio, 2015

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. Leidy Bibiana Agudelo Mesa

Dr. Mario Reta
Director

“Para las personas creyentes, Dios está al principio. Para los científicos al final de todas sus reflexiones” *Max Planck*

“Queda prohibido no sonreír a los problemas, no luchar por lo que quieres, abandonarlo todo por miedo, no convertir en realidad tus sueños” *Pablo Neruda*

“Yo creo que todavía no es demasiado tarde para construir una utopía que nos permita compartir la tierra” *GABO*

AGRADECIMIENTOS

- ✓ Esta tesis no hubiese tenido un principio y un fin sin el apoyo, la inmensa paciencia, dedicación, y motivación personal y profesional del Dr Mario Reta, a quien debo mi mayor agradecimiento,
- ✓ A mis amigos y compañeros LIDMA: Ceci, Mario, Juancito, Sonia, Jaiver, Lilian, Agus, Marcos, Leo, Emi, Fiore y Romi, por abrirme un espacio en sus vidas y hacerme parte de ustedes, por la esencia particular del grupo, la sinceridad de cada integrante, la buena onda y disposición de todos, las risas, los enojos, los mates, los cafés, seminarios, congresos, cervecitas, etc...
- ✓ A la Dra. Alicia Califano por su colaboración con el Diseño central compuesto,
- ✓ Al Dr. Sebastian Cavalitto por su colaboración con la liofilización de las hamburguesas,
- ✓ A la Lic. Mauricia Shettino y a Oriela Dudulec, por el apoyo y concederme los espacios para trabajar en la recta final de escritura de esta tesis.
- ✓ A mis amigos de acá, de allá, los que estuvieron, los que se fueron, los que siguen, y los que han llegado,
- ✓ A mi amiga y hermana Natalia Moreno, por su lealtad, y por estar siempre,
- ✓ A mi papá y a mi mamá por su amor genuino, incomparable e incondicional, por sostener los lazos del corazón desde la distancia, porque por ellos estoy acá! A mis hermanitos Alex y Mauro por amarme tanto, por ser hombres ejemplares e íntegros, a mi hermanito juanes por ser el loquito que robó mi corazón y quien me enseñó a amar a los niños. Y a todos ellos por tenerme siempre en sus oraciones,
- ✓ Definitivamente a Juan, por caminar el día a día conmigo, por cada palabra y cada silencio, por alegrarse con mis alegrías y escuchar mis angustias, por cada aventura...por cuidarme, y por ser mi complemento. GRACIAS,
- ✓ A la ANPCYT y al CONICET, por otorgarme las becas para la realización de esta tesis,
- ✓ Y Finalmente a Dios, a quien debo todo...

TABLA DE CONTENIDO

Lista de figuras.....	8
Lista de tablas.....	10
Glosario.....	11
INTRODUCCIÓN	13
Objetivo General.....	15
Objetivos Específicos.....	15
CAPITULO 1: AMINAS AROMATICAS HETEROCICLICAS (AAHs) ...	16
1.1 Formación de las AAHs.....	18
1.2 Factores principales que afectan la formación de AAHs en alimentos...	20
1.3 Niveles de aminas heterocíclicas en alimentos.....	28
1.4 Métodos de determinación de AAHs.....	29
1.4.1 Pre-tratamiento de la muestra.....	29
1.4.2 Extracción de AAHs mediante técnicas tradicionales.....	31
1.4.3 Extracción de AAHs mediante técnicas de microextracción.....	33
1.4.4 Técnicas de separación y análisis de las distintas AAHs.....	35
CAPÍTULO 2: METODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS LIQUIDAS	37
2.1 Métodos para la preparación de muestras acuosas.....	37
2.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL).....	37
2.2 Técnicas de microextracción.....	40
2.3 Microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD).....	40
2.3.1 Fundamentos de la MELLD.....	41
2.3.2 Variables que afectan el proceso de extracción.....	42
CAPÍTULO 3: MÉTODOS MODERNOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS	45
3.1 Extracción con solvente asistida con microondas (MASE).....	45
3.1.1 Principios de la técnica.....	45
3.1.2 Mecanismos de extracción.....	47
3.1.3 Variables que afectan al proceso de extracción MASE.....	49
CAPÍTULO 4: EMPLEO DE LIQUIDOS IONICOS A TEMPERATURA AMBIENTE EN EL ANÁLISIS DE AAHs	52
4.1 Generalidades de los Líquidos Iónicos.....	52
4.2 Propiedades fisicoquímicas de los RTILs.....	55

4.3 Aplicaciones de los RTILs en la Química Analítica	58
4.4 Aplicación de los RTILs en la preparación de muestras	59
CAPÍTULO 5: DISEÑO DE EXPERIMENTOS	63
5.1 Introducción al diseño de experimentos	63
5.2 Optimización experimental	66
5.3 Diseños de cribado (screening).....	68
5.3.1 Diseño factorial completo a dos niveles	68
5.4 Diseños de optimización.....	71
5.4.1. Diseños factoriales secuenciales	71
5.4.2 Diseños factoriales simultáneos	72
5.5 Diseño central compuesto	75
CAPÍTULO 6: VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	79
6.1 Concepto de validación.....	79
6.2 Parámetros de calidad de un método analítico	80
6.2.1 Precisión.....	81
6.2.2 Exactitud	83
6.2.3 Linealidad y rango lineal.....	85
6.2.4 Límite de Detección (LOD)	87
6.2.5 Límite de cuantificación (LOQ).....	90
6.2.6 Selectividad, especificidad e interferencia	91
6.2.7 Sensibilidad.....	92
6.2.8 Robustez.....	93
6.3 Factor de enriquecimiento y recuperación.....	94
6.4 Estudio del efecto de matriz.....	96
CAPÍTULO 7: PARTE EXPERIMENTAL Y METODOLOGIA	99
7.1 Reactivos, Disoluciones, Instrumentación y Muestras	99
7.2 Separación cromatográfica de las AAHs	102
7.3 Toma de muestra.....	103
7.4 Acondicionamiento y limpieza de la muestra	104
7.4.1 Limpieza en medio básico.....	104
7.4.2 Limpieza en horno de microondas.....	104
7.4.2.1 Ensayo de solubilidad de las AAHs en el solvente de limpieza.....	104
7.4.2.2 Limpieza del material lipídico.....	105
7.4.2.3 Tratamiento en medio básico.....	106
7.4.2.4 Tratamiento en medio ácido.....	107
7.5 Optimización de la técnica de microextracción líquido-líquido iónico dispersiva (MELLID)	107

7.5.1 Optimización por “etapas”	107
7.5.2 Optimización mediante Diseño Central Compuesto.....	108
7.5.3 Técnica MELLID optimizada.....	110
CAPÍTULO 8: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	111
8.1 Optimización de la separación cromatográfica de estándares.....	111
8.2 Optimización de las condiciones de limpieza y de desorción de los analitos desde la matriz sólida.....	115
8.2.1 Limpieza del material lipídico.....	118
8.2.2 Limpieza del material proteico.....	121
8.3 Microextracción líquido- líquido Iónico Dispersiva (MELLID) “ <i>in situ</i> ”	121
8.3.1 Selección del líquido iónico precursor.....	121
8.3.2 Optimización “Etapa por Etapa.....	123
8.3.2.1 Efecto de la concentración NaPF ₆	124
8.3.2.2 Efecto de la cantidad de líquido iónico precursor.....	125
8.3.2.3 Efecto del pH.....	125
8.3.2.4 Efecto del tiempo de extracción.....	127
8.3.2.5 Efecto de la velocidad de centrifugación.....	128
8.3.2.6 Efecto Salino	129
8.3.3 Aplicación del método de análisis optimizado a muestras de hamburguesa comercial.....	131
8.4. Optimización de la técnica MELLID mediante diseño central compuesto (DCC).....	133
CAPÍTULO 9: VALIDACIÓN DEL METODO PROPUESTO.....	141
9.1 Precisión.....	141
9.2 Parámetros analíticos y cifras de mérito.....	142
9.3 Rectas de calibración y efectos de matriz.....	142
9.4 Recuperación y Factor de Enriquecimiento.....	145
9.5. Contenidos de AAHs presentes en hamburguesas de diferentes marcas comerciales y luego de diferentes formas de cocción	147
CAPÍTULO 10: CONCLUSIONES	151
BIBLIOGRAFÍA.....	153
PUBLICACIONES Y CONGRESOS	168

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema general de la reacción de Maillard	25
Figura 2: Esquema del mecanismo de formación de las aminas de tipo quinolinas y quinoxalinas a partir de la reacción de Maillard	26
Figura 3: Métodos tradicionales de preparación de muestra para la determinación de AAHs	34
Figura 4: Representación esquemática de la MELLD	42
Figura 5: Esquema de un horno MASE	48
Figura 6: celdas de extracción MASE estándar y para control de temperatura y presión	49
Figura 7: Evolución del número de publicaciones sobre líquidos iónicos en los últimos años	54
Figura 8: Cationes y aniones típicos empleados en la elaboración de líquidos iónicos	54
Figura 9: Algunas aplicaciones de los líquidos iónicos en procesos de separación y extracción	60
Figura 10: Principales etapas del diseño de experimentos	68
Figura 11: 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	70
Figura 12: Superficie de respuesta tridimensional y su gráfica de contorno	73
Figura 13: Diseños central compuesto para dos factores (a la izquierda), donde los puntos situados a una distancia α del centro conforman una estrella y para tres factores (a la derecha), donde los niveles están indicados sólo para x_1	77
Figura 14: Distribución de respuestas correspondientes al límite de decisión, L_C	88
Figura 15: Límite de decisión (L_C) y de detección (L_D) para $\alpha = \beta = 0,5$ (pequeños)	89
Figura 16: Medida de la altura del ruido y la altura de un pico cromatográfico cercano a su límite de detección	91
Figura 17: Síntesis del líquido iónico [OMIM] [BF ₄]	100
Figura 18: Separación isocrática de las AAHs mediante RP-HPLC (B=Metanol)	112
Figura 19: Espectros de absorción UV-vis de las AAHs estudiadas	113
Figura 20: Cromatograma de una mezcla de patrones de AAHs	114
Figura 21: Espectros emisión de las AAHs estudiadas	115
Figura 22: Pre-tratamiento con NaOH y heptano sin energía microondas	117
Figura 23: pre-tratamiento con NaOH y heptano utilizando energía MO	118
Figura 24: Optimización extracción MASE	120
Figura 25: Cromatograma obtenido, luego del pre-tratamiento de muestra (Sección 8.2.1)	120
Figura 26: Estructura de AAHs “no polares” estudiadas en éste trabajo	123
Figura 27: Influencia de NaPF ₆ en la extracción de las AAHs	124

Figura 28. Influencia de la Cantidad de [OMIM][BF ₄] en la extracción.....	126
Figura 29: Influencia del pH sobre la extracción.....	127
Figura30: Influencia del tiempo de extracción.....	128
Figura 31: Efecto de la Velocidad de Centrifugación.....	129
Figura 32: Influencia de la fuerza iónica de diferentes sales sobre la extracción,	130
Figura 33. Señales cromatográficas de fluorescencia para: A) los estándares puros, B) solución después de la extracción MASE y C) para el extracto de hamburguesa después de MELLID.....	132
Figura 34: Superficie de respuesta para la amina Trp-P-1.....	137
Figura 35: Superficie de respuesta para la amina PhIP.....	137
Figura 36: Superficie de respuesta para la amina Trp-P-2.....	138
Figura 37: Superficie de respuesta para la amina AαC.....	138
Figura 38: Superficie de respuesta para la amina MeAαC.....	139
Figura 39: Predicción de las condiciones óptimas de la MELLID-IL.....	139
Figura 40: Superficie de Respuesta para el compilado de AAHs.....	140
Figura 41: Cromatogramas obtenidos a diferentes temperaturas de cocción para hamburguesa: a) asada a la plancha a 133°C; b) asada en horno a 208°C; c) asada en horno a 253°C y d) asada en horno a 300°C (Se inyectó una dilución 1:5).....	149

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Ejemplos de AAHs y sus precursores.....	16
Tabla 2: Estructura y nomenclatura de las AAHs <i>térmicas</i>	21
Tabla 3: Estructura y nomenclatura de las AAHs <i>pirolíticas</i>	23
Tabla 4: Constante dieléctrica y factores de disipación para algunos de los disolventes utilizados en MASE.....	47
Tabla 5: Aplicaciones más recientes de los RTILs en la preparación de muestras ..	61
Tabla 6: Aplicaciones de extracción asistida por microondas (MASE) con ILs.....	62
Tabla 7: Matriz de experimentos para un diseño factorial completo del tipo 2^k	69
Tabla 8: DCC de dos factores.....	77
Tabla 9: DCC de tres factores	78
Tabla 10: Ecuaciones utilizadas en el análisis de regresión por cuadrados mínimos no ponderados (Unweighted Least-Square Regression, ULSR).....	87
Tabla 11: Contenido de materia grasa, proteínas e hidratos de carbono de las diferentes hamburguesas comerciales estudiadas	103
Tabla 12: Programas de temperatura utilizados en el procedimiento MASE de limpieza del material lipídico	106
Tabla 13: Diseño experimental para realizar el DCC, para un diseño factorial 2^{3110}	
Tabla 14: Gradiente utilizado en la separación de las AAHs mediante RP-HPLC	113
Tabla 15: Longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión de las AAHs Estudiadas.....	114
Tabla 16: Experimentos del DCC y respuestas obtenidas.....	133
Tabla 17: Condiciones experimentales óptimas para la extracción de las AAHs estudiadas.....	136
Tabla 18: Repetibilidad del procedimiento propuesto para cada amina después de MELLID.....	141
Tabla 19: Rectas de calibración- efecto de matriz.....	143
Tabla 20: LOD encontrados en este trabajo y en la literatura, LOQ y rango lineal (RL).....	144
Tabla 21: Recuperación porcentual (R%) y factor de enriquecimiento (EF) para las AAHs estudiadas.....	146
Tabla 22: Contenido de AAHs de la marca comercial patty (classic) cocidas a la plancha a 208°C	147
Tabla 23: Contenido de AAHs (ng/g) de diferentes marcas comerciales cocidas en Horno a 253°C.....	148
Tabla 24: Contenido de AAHs (ng/g) de diferentes marcas comerciales cocidas en horno a 300°C.....	150

Glosario

AAHs: Aminas aromáticas heterociclicas

RTILs: Room temperature ionic liquids

MELLD: Microextracción líquido-líquido dispersiva

MELLID: Microextracción líquido-líquido iónico dispersiva

MASE: Extracción con solvente asistida con microondas

DCC: Diseño Central Compuesto

LIs: Líquidos Iónicos

Pf: Punto de fusión (°C)

ϵ : Constante dieléctrica

HPLC: High-performance liquid chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Performance)

UV: Ultravioleta

DAD: Diode array detector

FLD: Fluorescence detector

K_D^0 : Constante termodinámica de distribución (o de reparto)

M: Molaridad

x: Fracción molar

k: Factor de retención

φ : Relación de fases

[OMim][PF₆]: Hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio

[OMim][BF₄]: Tetrafluorborato de 1-octil-3-metilimidazolio

ACN: Acetonitrilo

MeOH: Metanol

R²: Coeficiente de determinación

ELL: Extracción líquido-líquido

γ : Coeficiente de actividad

r: Relación entre los volúmenes de las fases

Va: Volumen de la fase acuosa
Vo: Volumen de la fase orgánica
FE: Factor de enriquecimiento
R%: Factor de recuperación porcentual
Co: 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 (Análisis de varianza)
k: Número de factores
pf: Puntos factoriales
pe: Puntos axiales o puntos estrellas
pc: Puntos centrales
DCC: Diseño central compuesto
RSD: Relative standard deviation (Desviación estándar relativa)
LOD: Límite de detección
LOQ: Límite de cuantificación
LC: Límite de decisión
t: Prueba-*t* de Student

INTRODUCCIÓN

La mayoría de los compuestos cancerígenos son además mutágenos, es decir, capaces de provocar alteraciones del material genético [1] En 1975, Bruce N. Ames describió un sencillo test que permitía cuantificar la actividad mutagénica de sustancias mediante el uso de bacterias (*Salmonella typhimurium*). Se observó que la potencia mutagénica indicada por el test de Ames podía correlacionarse con propiedades carcinogénicas, por lo que el test de mutagenicidad se develó como una manera rápida y económica de identificar compuestos posiblemente cancerígenos para el ser humano. Poco después, diversos científicos investigaban la mutagenicidad del humo de tabaco, el cual se sabía que era una de las principales causas de cáncer en seres humanos. El estudio estructural de las moléculas orgánicas derivadas de la pirólisis del tabaco reveló la presencia de varios tipos de agentes cancerígenos, incluyendo algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs). Este hecho hizo pensar que quizá el humo originado durante el cocinado de alimentos también podía presentar actividad mutagénica. Esto se confirmó cuando en 1977 Nagao y colaboradores, analizaron las partículas retenidas en un filtro de fibra de vidrio a través del cual se había hecho pasar el humo desprendido durante el asado de sardinas [2]. También se observó una elevada mutagenicidad en las partes más cocidas de carne de ternera y pescado asado, y se correlacionó con la presencia de proteínas y aminoácidos. El siguiente paso fue el aislamiento de las sustancias mutagénicas de pirolizados de aminoácidos y proteínas, principalmente mediante el uso de la cromatografía de líquidos a escala preparativa combinada con el test de Ames. Los compuestos aislados resultaron tener propiedades básicas y una estructura aromática con heteroátomos, por lo que fueron denominados *aminas aromáticas heterocíclicas* (HAAs de las siglas en inglés). Argentina es un país con consumo elevado de carne vacuna. Como estos compuestos se generan a nivel de trazas, resulta muy importante poder aislarlos y cuantificarlos correctamente en carnes cocidas, para

poder correlacionar las cantidades ingeridas de HAAs con su actividad cancerígena o mutagénica.

En el presente trabajo de Tesis, se ha desarrollado y optimizado una nueva metodología analítica para la determinación de aminas aromáticas heterocíclicas (AAHs) en hamburguesas comerciales. Los objetivos principales fueron desarrollar una técnica de preparación de la muestra y de análisis sensible, selectiva, rápida, sencilla, económica y benigna con el ambiente. Para ello, se empleó extracción asistida por microondas (MASE, de las siglas en inglés) para la extracción de las AAHs desde la matriz sólida y microextracción dispersiva líquido-líquido iónico (MEDLLI) *in situ* para la extracción/preconcentración desde la solución líquida resultante. En el análisis cuantitativo se empleó cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC-FLD) y, con propósitos de identificación, detección de arreglo de diodos (DAD)

OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar un método analítico para el análisis de AAHs en hamburguesas cocidas obtenidas en el mercado local, que involucre la extracción con microondas y pre-concentración con líquidos iónicos como método de preparación de muestra y cromatografía líquida con detección de fluorescencia y arreglo de diodos como método de separación y cuantificación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Desarrollar un método analítico confiable y reproducible para determinar AAHs a nivel de trazas, en hamburguesas cocidas empleando extracción acelerada con microondas (MASE) para extraer los componentes lipídicos y remover los analitos de la matriz sólida.
2. Optimizar los parámetros de extracción MASE (potencia de radiación, tiempo de exposición, temperatura) mediante el empleo de *n*-heptano en la celda de extracción.
3. Emplear la técnica MELLID, mediante el empleo de un líquido iónico soluble en la muestra acuosa con base en el catión metilimidazolio para generar *in situ*, mediante el agregado de una sal conteniendo el anión PF_6^- , un líquido iónico insoluble capaz de aislar y pre-concentrar las aminas desde el "extracto MASE". Optimizar la técnica mediante un procedimiento en etapas.
4. Realizar el análisis mediante HPLC de fase inversa empleando detección simultánea de fluorescencia (FLD) y diodos en serie (DAD) para aumentar la sensibilidad y selectividad del método.
5. Optimizar la técnica MELLID *in situ* mediante diseño central compuesto (CCD) y comparar con la optimización por etapas.
6. Determinar las cifras de mérito más importantes de los dos procedimientos analíticos optimizados (por etapas y mediante CCD), tales como rango lineal, límites de detección y cuantificación y reproducibilidad, recuperación y factor de enriquecimiento.

CAPITULO 1: “AMINAS AROMATICAS HETEROCICLICAS”

Entre los precursores del cáncer se encuentran algunas sustancias tóxicas que, mediante procesos químicos o enzimáticos, se forman en los alimentos durante las etapas de procesado, preparación y almacenamiento [3]. Estas sustancias se pueden originar en tratamientos a temperaturas elevadas. Entre ellas se destacan las aminas aromáticas heterocíclicas (AAHs), por ser sustancias cancerígenas reconocidas o potenciales. Su presencia en los alimentos se debe a procesos en los que se produce el calentamiento de aminoácidos, proteínas, creatinina y azúcares. Su formación depende de la temperatura, tiempo de calentamiento, pH, tipo y concentración de los precursores y la presencia de ciertos iones divalentes[4]. Las primeras referencias sobre la actividad mutagénica de estos compuestos datan de hace unos 30 años. En la **Tabla 1** se detallan algunas AAHs de interés y sus respectivos precursores.

Tabla 1: Ejemplos de AAHs y sus precursores.

Nombre	Abreviatura	Grupo	Precursor
2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol	AαC	Pirolíticas	Proteínas (globulina)
2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol	MeAαC	Pirolíticas	Proteínas (globulina)
3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3-b]indol	Trp-P-1	Pirolíticas	Triptofano
3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3-b]indol	Trp-P-2	Pirolíticas	Triptofano
2-amino-1,6-dimetilimidazol[4,5-b]piridina	DMIP	Térmicas	Creatina, glucosa
2-amino-1-metil-6-fenilimidazol[4,5-f]piridina	PhIP	Térmicas	Creatina, fenilalanina, glucosa
2-amino-3-metilimidazol[4,5-f]quinolina	IQ	Térmicas	Prolina, fructosa, glucosa
2-amino-3,4-dimetilimidazol[4,5-f]quinolina	MeIQ	Térmicas	Creatina, alanina y fructosa
2-amino-3,4,8-trimetilimidazol[4,5-f]quinoxalina	4,8 DiMeIQx	Térmicas	Creatina, alanina, treonina, lisina.

El estudio de mutágenos provenientes de procesos de cocción fue iniciado en 1939 en la Universidad de Lund, (Suecia) donde E. Widmark informó que los extractos de disolventes orgánicos procedentes de la carne de caballo asado a la parrilla causaban tumores en las glándulas mamarias de ratones cuando eran aplicadas repetidamente en la piel [5]. Además, en la corteza de dicha carne también se detectó la presencia de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) [6]. Se encontró que las AAHs se forman a partir de la pirólisis de grasas a altas temperaturas [7]. Poco tiempo después, fue desarrollado por Ames y colaboradores, un ensayo revolucionario para cuantificar la actividad mutagénica sobre la base de las cepas de *Salmonella typhimurium* [8]. Esto ayudó al grupo de Sugimura a dilucidar la causa de la alta actividad mutagénica de las partículas del humo producido por la cocción de los alimentos proteicos y en las partes carbonizadas de pescado y carne a la parrilla [2]. Actualmente se han identificado alrededor de 30 AAHs. En vista de que su formación depende en gran medida de la temperatura, las AAHs se clasifican en dos grupos:

1. *Aminas térmicas, tipo IQ o aminoimidazozaarenos (AIAs)*: se generan a partir de la reacción de aminoácidos libres, creatina, creatinina y hexosas, a temperaturas de cocción ordinarias, entre 100 y 300°C [9]. Estas aminas contienen en su estructura un grupo metilaminoimidazólico. Los mutágenos incluidos en este grupo (piridinas, quinolinas y quinoxalinas) son los más frecuentemente encontrados en la carne y el pescado cocido, por lo tanto son los que contribuyen mayormente a la mutagenicidad de este tipo de alimentos. A temperaturas superiores a 225-250°C estas aminas se degradan o reaccionan con otros compuestos [10,11] En la **Tabla 2** se muestran las estructuras de las aminas térmicas, su nomenclatura y la abreviatura por la cual son conocidas.

2. *Aminas pirolíticas o tipo no-IQ*: su formación tiene lugar a través de reacciones pirolíticas entre aminoácidos y proteínas. La pirólisis ocurre a temperaturas superiores a 300°C y produce muchos fragmentos reactivos a través de reacciones radicalarias. Estos fragmentos se cree que se condensan para formar nuevas estructuras heterocíclicas, y los mutágenos pirolíticos se deben formar a partir de reacciones con radicales libres. Algunos de estos mutágenos, conocidos como carbolinas, contienen una mitad de aminopiridina como estructura común.[12,13]. En la **Tabla 3** se muestran las estructuras, su nomenclatura y la abreviatura por la cual son conocidas.

Por lo tanto, las AAHs se empiezan a formar a 100°C y la cantidad formada y por consiguiente, la actividad mutagénica, aumenta con la temperatura hasta los 170°C o 200°C. Así en general, los tipos de cocción que implican temperaturas alrededor de los 100°C como hervir en agua, cocinar al vapor o estofar generan pocos agentes mutagénicos. Sin embargo, los tratamientos térmicos que implican un calentamiento mediante procesos conductivos de calor, como freír o asar, conducen a un aumento de la actividad mutagénica [14].

1.1 Formación de las AAHs

La cocción de la carne, pollo, pescado, y alimentos ricos en proteínas mejora sus cualidades organolépticas, ya que durante este proceso los alimentos se oscurecen y se generan sustancias de olor y sabor agradables. En 1916 Louis-Camille Maillard describió por primera vez las reacciones de oscurecimiento o *browning* mediante la aparición de pigmentos y polímeros oscuros producidos por la reacción entre los grupos amino de los aminoácidos y el grupo carbonilo de los azúcares [3,15]. La reacción de Maillard (glucosilación no enzimática de proteínas) se trata de un conjunto complejo de reacciones químicas que se dan al calentar los alimentos. En Figura 1 se muestra el esquema de dicha reacción. Se trata

básicamente de una especie de “caramelización” que ocurre en la superficie de los alimentos, como por ejemplo, en carnes asadas. Los productos mayoritarios de estas reacciones son moléculas cíclicas y policíclicas, que aportan sabor y aroma a los alimentos, aunque también pueden ser cancerígenas; en algunos pasos de la reacción se forman pirazinas, quinoxalinas y pirido[3,4-d]imidazoles, que están involucrados en la formación de las AAHs. Esta reacción se acelera con la temperatura de cocción y está influenciada por varios factores, tales como el pH, el tiempo de cocción, la concentración de sales, el uso de condimentos, etc; además, puede catalizarse con la presencia de algunos metales. Por lo tanto, la variación de cualquiera de estos factores altera la velocidad y los productos finales de la reacción.

La formación de las AAHs puede estudiarse en sistemas modelo donde se combinan los precursores mencionados anteriormente: aminoácidos, creatina y azúcares [3,10,16]. En la Figura 2 se muestra el esquema de formación de aminas de tipo quinolinas y quinoxalinas; la ventaja de estos sistemas modelo es la reducción de las reacciones secundarias de otros componentes de la carne, que no estén involucradas en la formación de las aminas. De hecho, al simplificar las matrices, algunas aminas fueron identificadas primero en dichos sistemas y posteriormente encontradas en las muestras de carnes cocida. En cambio, en los sistemas alimentarios reales, las variables de reacción aumentan y tanto su estudio como la determinación de los productos adquieren mayor dificultad. El primer sistema modelo donde fueron identificados los compuestos mutagénicos, consistía en una reacción de aminoácidos y proteínas. Las sustancias identificadas eran las mismas que las encontradas en las partes carbonizadas de las carnes y pescados asados [3,10,17].

1.2 Factores principales que afectan la formación de AAHs en alimentos

Se han estudiado extensivamente los factores que favorecen la generación de aminas mutagénicas durante el procesado térmico de la carne y el pescado. Las variables físicas como la temperatura, tiempo y método de cocción afectan significativamente a la actividad mutagénica de las muestras cocidas. Los contenidos de AAHs específicas varían con el tipo de carne, método y grado de cocción.

I. *Temperatura y tiempo de cocción*

La formación de las AAHs depende en gran medida del tiempo y temperatura de cocción [14]. En alimentos cocidos a temperaturas inferiores a 150°C los niveles encontrados de AAHs son bajos o no detectables, pero a temperaturas superiores la cantidad de aminas aumenta progresivamente a medida que aumenta la temperatura [18], siendo este incremento no lineal para aminas como PhIP, A α C y las β -carbolinas [13,19]. Las aminas NH y 4,8-DiMeIQx son más sensibles a los cambios de temperatura, al contrario que MeIQx y A α C [20]. Las AAHs pirolíticas no se encuentran en carnes cocidas a temperaturas inferiores a 200°C. Sin embargo, en muestras horneadas a 225°C y con sólo 30 segundos de calentamiento se pueden llegar a formar cantidades detectables de A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2, Glu-P-1 o Glu-P-2 [21]. Para tiempos un poco mayores, y dependiendo de la temperatura de cocción, se alcanza un nivel máximo en las cantidades formadas, después del cual la concentración se mantiene más o menos constante [18].

Tabla 2: Estructura y nomenclatura de las AAHs *térmicas*

Amina	Abreviatura	Estructura
Piridinas		
2-amino-1,6-dimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	DMIP	
2-amino-1,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	1,5,6-TMIP	
2-amino-3,5,6-trimetilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	3,5,6-TMIP	
2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	PhIP	
2-amino-1-metil-6-(4'-hidroxifenil)-imidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	4'-OH-PhIP	
2-amino-1,6-dimetil-furo[3,2- <i>e</i>]imidazo[4,5- <i>b</i>]-piridina	IFP	
Quinolinas		
2-amino-1-metil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinolina	iso-IQ	
2-amino-3-metil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinolina	IQ	
2-amino-3,4-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinolina	MeIQ	

Tabla 2: (continuación)

Amína	Abreviatura	Estructura
2-amino-1-metil-imidazo[4,5- <i>b</i>]-quinolina	IQ[4,5- <i>b</i>]	
Quinoxalinas		
2-amino-3-metil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	IQx	
2-amino-3,4-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	4-MeIQx	
2-amino-3,8-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	8-MeIQx	
...		
2-amino-3,7,8-trimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	7,8-DiMeIQx	
2-amino-3,4,8-trimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	4,8-DiMeIQx	
2-amino-4-hidroximetil-3,8-dimetil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	4-CH2OH-8-MeIQx	
2-amino-3,4,7,8-tetrametil-imidazo[4,5- <i>f</i>]-quinoxalina	TriMeIQx	

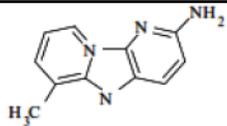
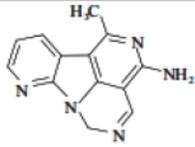
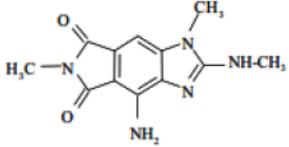
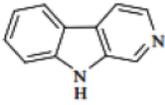
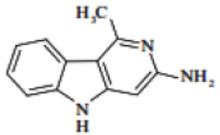
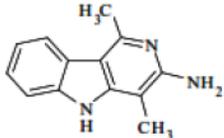
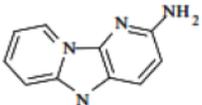
Tabla 2: (Continuación)

Amina	Abreviatura	Estructura
2-amino-1-metil-imidazo[4,5-g]-quinoxalina	IgQx	
2-amino-1,7-dimetil-imidazo[4,5-g]-quinoxalina	7-MeIgQx	
2-amino-1,6,7-dimetil-imidazo[4,5-g]-quinoxalina	6,7-DiMeIgQx	
2-amino-1,7,9-trimetil-imidazo[4,5-g]-quinoxalina	7,9-DiMeIgQx	

Tabla 3: Estructura y nomenclatura de las AAHs pirolíticas.

Amina	Abreviatura	Estructura
Fenilpiridina		
2-amino-5-fenilpiridina	Phe-P-1	
Piroindoles		
α-carbolinas		
2-amino-9H-pirido[2,3-b]indol	AαC	
2-amino-3-metil-9H-pirido[2,3-b]indol	MeAαC	
β-carbolinas		
1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol	H	

Tabla 4: (Continuación)

Amina	Abreviatura	Estructura
2-amino-6-metildipirido-[1,2- α :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-1	
Tetraazafluoranteno		
4-amino-6-metil-1H-2,5,10,10b-tetraazafluoranteno	Orn-P-1	
Benzimidazol		
4-amino-1,6-dimetil-2-metilamino-1H,6H-pirrol-3,4-f]benzimidazol-5,7-diona	Cre-P-1	
9H-pirido[3,4- <i>b</i>]indol	NH	
γ-carbolinas		
3-amino-1-metil-5H-pirido[4,3- <i>b</i>]indol	Trp-P-2	
3-amino-1,4-dimetil-5H-pirido[4,3- <i>b</i>]-indol	Trp-P-1	
Piridoimidazoles		
δ - carbolinas		
2-aminodipirido-[1,2- α :3',2'- <i>d</i>]imidazol	Glu-P-2	

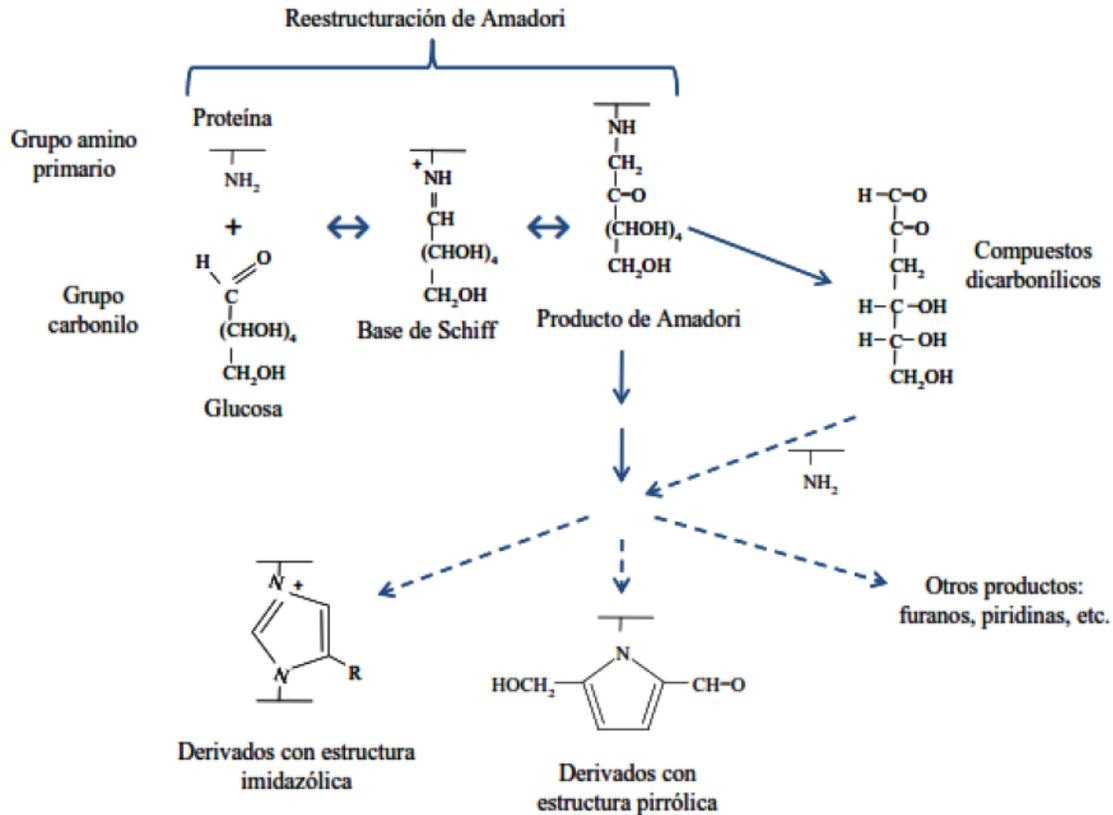


Figura 1: Esquema general de la reacción de Maillard.

I. Método de cocción

El método de cocción tiene una influencia considerable en la formación de las AAHs, ya que la temperatura utilizada y el mecanismo de transmisión de calor son muy disímiles en los diferentes métodos; los tipos de cocinado que implican temperaturas alrededor de 100°C (hervir, cocinar al vapor, etc) no generan agentes mutagénicos o la cantidad es tan pequeña que no es cuantificable [19]. Métodos que involucran convección indirecta, como es el caso del horno convencional, producen niveles bajos de aminas. La cocina con microondas se ha definido como una forma “suave” de tratamiento de los alimentos y la cantidad de AAHs formadas es casi nula probablemente debido a que el calor se genera en el interior

del alimento y la superficie no alcanza temperaturas superiores a la de otras partes. Sin embargo, se ha encontrado que provoca la formación de AAHs de la familia de las carbolinas [22].

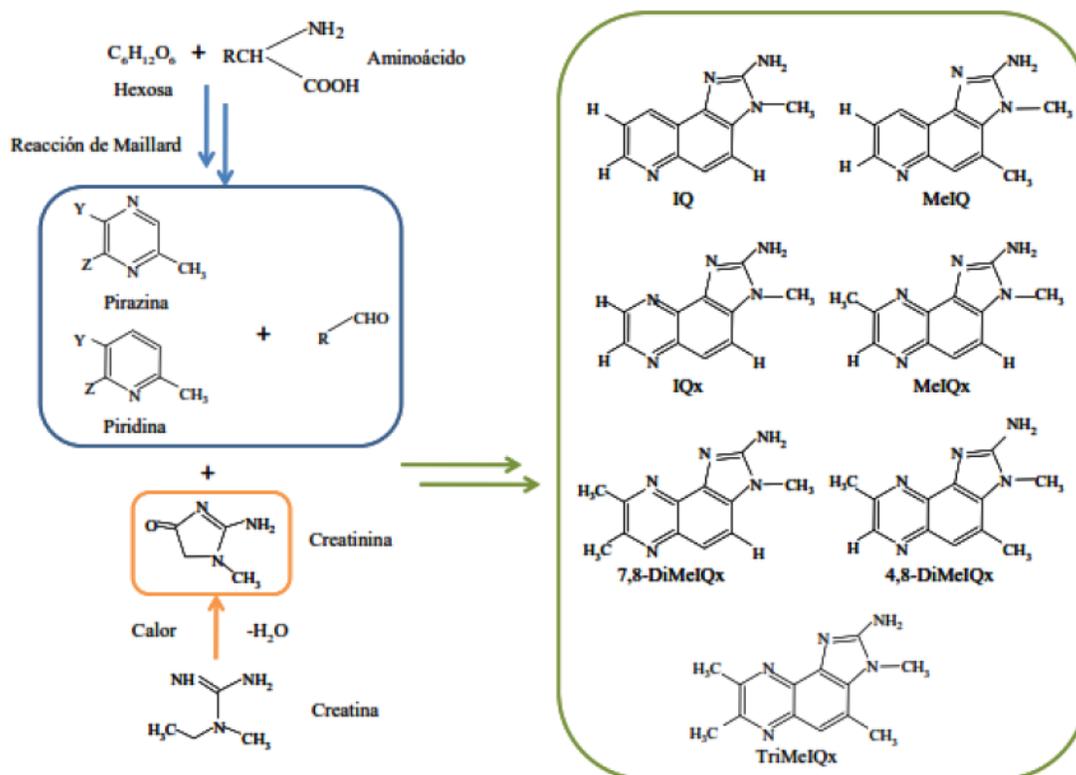


Figura 2: Esquema del mecanismo de formación de las aminas de tipo quinolinas y quinoxalinas a partir de la reacción de Maillard.

Los métodos de cocción en los cuales la temperatura aplicada es elevada, como freír, asar, grillar y hornear, se consideran los mayores productores de AAHs debido al contacto directo del alimento con la fuente de calor. Además, cuando se aplican estos métodos de cocción, hay una disminución en el contenido de agua desde el interior hacia la parte exterior del alimento, y se produce la formación de una superficie relativamente seca, donde se concentran los precursores de las aminas; asar produce menores cantidades de aminas que freír y cocinar en un horno de carbón. Cuando se emplean hornos de convección a altas temperaturas y

altas velocidades de aire, se produce mayor cantidad de mutágenos[19,23-25]. La temperatura del aire es el parámetro que más influye en la producción de AAHs al cocinar en horno. En todos los casos, para el mismo grado de cocción, se obtienen niveles diferentes de aminos para cada tipo de carne, incluso con el mismo tipo de carne y grado de cocción, el lugar (restaurantes, restaurantes de comida rápida y casas particulares) o el método de cocción, pueden jugar un papel importante en el contenido de aminos. [25-27]. También se ha estudiado la frecuencia y número de veces que se da vuelta al alimento durante la cocción [28], encontrándose menores cantidades de AAHs totales en muestras que eran dadas vuelta cada minuto, comparada con las que sólo se las daba vuelta una vez.

El rebozado de los alimentos antes de freírlos es una práctica de cocción que a menudo se aplica a carnes y pescados. Se ha observado en muestras de algunos alimentos rebozados, que la actividad mutagénica es menor que cuando no se rebozan, probablemente debido a que el rebozado actúa como una capa aislante, disminuyendo la formación de AAHs. El adobar o marinar los alimentos con determinadas especias, como romero, mostaza, o jugo de limón, antes de cocinarlos, reduce la formación de AAHs. El efecto del adobado o marinado es atribuible a la presencia de compuestos antioxidantes, los cuales inhiben los procesos radicalarios [29-31]

II. *Aceites y antioxidantes*

Se ha descrito que la adición de aceites y antioxidantes puede favorecer o inhibir la formación de AAHs. Estos efectos opuestos dependen de distintos factores, como método y condiciones de cocción, factores tecnológicos y variedad y concentración de antioxidantes. Los compuestos fenólicos, particularmente aquellos procedentes del té y del aceite de oliva, parecen ser inhibidores de la formación de las AAHs, al menos en sistemas modelo. Los datos muestran que la

protección frente a la formación de AAHs depende no sólo de la calidad y concentración de los antioxidantes, sino también de sus niveles relativos y de la influencia de otros constituyentes menores de los alimentos [10,29,32]. También han sido evaluados los efectos del ajo y algunos compuestos organosulfurados en la formación y mutagenicidad global de AAHs [33,34]

1.3 Niveles de aminas heterocíclicas en alimentos

Se han publicado una gran cantidad de trabajos respecto al análisis cuali-cuantitativo de AAHs a fin de conocer el tipo y cantidades a la que los seres humanos están expuestos [14,35]. Aunque los niveles de concentración son muy variados, oscilan entre los 0,1 y los 40 ng/g, [9,14]. Se ha detectado la presencia de AAHs en algunas bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza, aunque lo más frecuente es encontrarlas en alimentos proteicos que han sido sometidos a tratamientos térmicos a elevadas temperaturas. Los primeros datos cuantitativos de la presencia de AAHs en alimentos fueron publicados a principios de las década de los 80. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios encaminados a la determinación de las concentraciones de estos mutágenos. Todas las AAHs conocidas, excepto TriMeIQx, LYs-P-1, Orn-P-1 y Cre-P-1, han sido detectadas a diferentes niveles en varios tipos de alimentos, dada la gran variabilidad tanto de las técnicas culinarias como de las diferentes matrices [36-39]. En general, las aminas encontradas más frecuentemente y en mayor cantidad dependen del tipo de alimento. Así, en la carne de ternera, las AAHs que se encuentran en mayor concentración son PhIP > AαC > MeIQx > IQ, mientras que en el caso del cerdo, se destaca la presencia de PhIP y MeIQx, aunque también se detectó 4,8-DiMeIQx y el comutágeno H (Harmano). En el pollo, PhIP se forma en niveles considerables, seguido de cantidades importantes de DMIP, MeIQx y AαC. En pescados se encuentran sobretodo H > AαC > IQ > PhIP. La mayor abundancia

de PhIP y DMIP en el pollo puede ser debida a la mayor cantidad de algunos aminoácidos libres tales como fenilalanina, mientras que el menor contenido identificado en otros tipos de carne puede ser debido al menor contenido de azúcares o de creatina/creatinina [40,41].

1.4 Métodos de determinación de AAHs

Para evaluar el riesgo que supone la presencia de AAHs en los alimentos es imprescindible disponer de metodologías analíticas capaces de identificar y determinar estos compuestos en niveles de concentración muy bajos, del orden de las ppb. Además, la complejidad de las muestras requiere frecuentemente la utilización de etapas de pre-concentración y purificación laboriosas que aumentan el tiempo de análisis y disminuyen la reproducibilidad de los resultados. Por ello es necesario establecer métodos de análisis que, además de ser selectivos y sensibles, sean rápidos, robustos e independientes de la matriz de la muestra. Las estrategias para conseguir una buena pre-concentración y una adecuada limpieza de la muestra han sido ampliamente estudiadas en los últimos años y el resultado ha sido el establecimiento de complejas metodologías analíticas que incluyen varias etapas, como se describe a continuación [7,42].

1.4.1 Pre-tratamiento de la muestra

El origen de la muestra condiciona el grado de limpieza requerido, y por lo tanto, la complejidad del tratamiento de muestra a aplicar. El pre-tratamiento de la muestra para el análisis de AAHs implica en general cuatro etapas, las cuales a su vez pueden comprender varios procesos: **1) *homogeneización*** para poder realizar una toma de muestra representativa. Este primer paso en general no se realiza en el caso de muestras líquidas (bebidas, orina, agua); **2) *extracción*** de los analitos

presentes, lo que supone una ruptura de las interacciones de las AAHs con los macro componentes de la matriz seguido de una separación física de ambos. Se consigue obtener un extracto crudo que contiene los contaminantes de interés; 3) *purificación*: en la cual se intenta eliminar el mayor número de interferencias posibles sin sacrificar la cantidad de analito; y finalmente 4) *concentración*: mediante la cual el extracto limpio obtenido se adapta a la técnica analítica instrumental seleccionada (concentración mínima detectable y/o compatibilidad del solvente en el cual se encuentra con la fase móvil).

En la etapa de **homoginización** se adiciona un solvente a la muestra sólida y se mezcla preferentemente mediante un mezclador mecánico. Se han empleado diferentes disolventes, tanto orgánicos (acetona, acetato de etilo, metanol, mezclas agua-alcohol, entre otros) como acuosos (agua, ácido hidroclicóric, o más frecuentemente, hidróxido sódico, etc.). Luego se debe eliminar el material proteico, por ejemplo mediante precipitación utilizando procedimientos convencionales (empleo de ácido trifluoracético, etc.) para separarlo por centrifugación, filtración o adsorción. En la etapa de **extracción**, se emplean disolventes orgánicos para aislar las AAHs del homogeneizado acuoso obtenido. En la etapa de **purificación** el extracto orgánico se somete a una etapa de limpieza más exhaustiva en la cual se intenta eliminar el mayor número posible de interferencias. Estos procedimientos consisten en una o más etapas de partición ácido-base o bien el empleo de sorbentes suficientemente específicos capaces de retener a las AAHs, como por ejemplo adsorbentes poliméricos, resinas de intercambio iónico, fases de octadecilsilano (ODS o C18), inmunoabsorbentes y más recientemente polímeros de huella molecular (imprinted polymers). Finalmente, la última etapa es la de **concentración**, mediante la cual se debe eliminar la mayor parte del solvente empleado a fin de conseguir un nivel de concentración adecuado (o cambiar la naturaleza de dicho solvente) para poder ser determinados mediante la técnica instrumental disponible o elegida [12,37,43].

1.4.2. Extracción de AAHs mediante técnicas tradicionales

La extracción líquido-líquido (ELL) es la técnica más empleada para la extracción de analitos en muestras acuosas. El fundamento de esta técnica se basa en la distribución o reparto de la muestra entre dos fases inmiscibles en las cuales el analito y la matriz tienen solubilidades diferentes. Cuando se utiliza la ELL, como método para extraer las AAHs desde la matriz de la muestra, se debe tener en cuenta el disolvente utilizado para homogeneizar las muestras. Cuando se emplearon solventes orgánicos insolubles en agua en la homogeneización (diclorometano, acetato de etilo o dietil éter), los analitos han sido extraídos con solución acuosa de HCl ya que la forma protonada de la amina será soluble en el medio acuoso. En cambio, cuando se utilizaron solventes acuosos (insolubles en agua), los analitos se extrajeron directamente con el solvente orgánico [1,12,44,45], aunque la extracción en medio básico produce mejores resultados ya que favorece el pasaje al solvente extractante debido a que las AAHs estarán neutras [27,44-47]. Frecuentemente, es necesario realizar más de un paso de extracción con solvente orgánico para mejorar la separación [48,49].

Hasta la fecha, el método más popular para la extracción de AAHs *polares* es el propuesto por Gross y Grüter [12] en 1990. Este método se inicia con una dispersión en medio alcalino de la muestra. A continuación, se lleva a cabo una ELL con diclorometano, utilizando tierra de diatomeas que actúa como un soporte sólido para la ELL. Luego, el extracto orgánico obtenido se somete a dos o tres etapas de extracción en fase sólida (SPE). En la primer etapa se emplea un cartucho de PRS (ácido propilsulfónico), que es un intercambiador catiónico en el cual las aminas protonadas quedan retenidas selectivamente. Luego, se lleva a cabo un lavado del intercambiador iónico haciendo pasar una mezcla de ácido clorhídrico/metanol/agua y, finalmente, el analito retenido se eluye mediante el paso de acetato amónico a pH 8, directamente a un cartucho de C18, menos

selectivo, acoplado en línea. Finalmente, las AAHs se eluyen con metanol:amoníaco, el solvente se evapora a sequedad y se reconstituye con un pequeño volumen de metanol. Una de las principales ventajas de esta técnica es que permite la elución de todos los compuestos en la misma fracción. Sin embargo, aunque el método funciona bien para muchos extractos de carne, no es adecuado para análisis de muestras más complejas. Numerosos autores han dirigido sus esfuerzos con el objetivo de aumentar tanto la selectividad como la recuperación de los analitos. Para ello, se han llevado a cabo modificaciones en las disoluciones de lavado y de elución, así como la introducción de etapas adicionales de purificación con diferentes adsorbentes. En 1992 Gross y Grüter , realizaron una modificación al procedimiento anterior [12,50]. La diferencia esencial radica en la recolección de los disolventes de lavado del cartucho de intercambio catiónico, los cuales contienen los *analitos menos polares*.

Entre los distintos procedimientos descritos en la bibliografía para la determinación de AAHs en extractos de carne mediante ELL y SPE en tándem, se pueden destacar cuatro, todos ellos con modificaciones al procedimiento de Gross. En la Figura 3 se muestran los cuatro procedimientos [7,37,51,52]. Los métodos A, B y D dan lugar a recuperaciones similares (en torno al 60-90%) [47]. Sin embargo, el método modificado A requiere menor cantidad de material y proporciona valores ligeramente más altos en las recuperaciones. Por otro lado, el método C da lugar a mayores eficiencias en los pasos de limpieza para algunas AAHs polares, aunque se obtienen recuperaciones más bajas y altas desviaciones estándar. Además, no se recuperan algunas de las AAHs no polares y coeluyen algunas sustancias interferentes. Por otra parte, el método B parece ser el más consistente para muestras que contienen *tanto AAHs polares como no polares* y el método D es el más rápido y adecuado para procedimientos de *screening* de materiales desconocidos [47,53,54]

1.4.3 Extracción de AAHs mediante técnicas de microextracción

Las técnicas de extracción tradicionales (ELL, SPE) están caracterizadas por algunas desventajas intrínsecas como es el uso de disolventes tóxicos en cantidades importantes y la reproducibilidad del empaquetamiento de los cartuchos. Estos inconvenientes pueden superarse mediante la microextracción en fase sólida ("solid phase micro extraction", SPME). Esta técnica permite una extracción y pre-concentración simultánea de los analitos desde matrices gaseosas, acuosas y sólidas. El principio de la SPME es el equilibrio de los analitos entre la matriz de la muestra y la fase polimérica que normalmente recubre una fibra de sílice fundida ligada con grupos de diferente polaridad. Al ser el volumen de la fase sólida despreciable respecto del volumen de muestra analizado, la cantidad de analito adsorbido por la fibra es directamente proporcional a la concentración inicial en la matriz [55]. Para aplicarlo a compuestos no volátiles o térmicamente inestables, la SPME debe realizarse en combinación con HPLC [56], o electroforesis capilar. Además de la simplificación del paso de limpieza, este método elimina las diferentes etapas de extracción en fase sólida requeridas en el análisis de AAHs, reduciendo el tiempo y las cantidades de disolventes orgánicos necesarios [57]. Sin embargo, el tiempo necesario para que el analito alcance el equilibrio de adsorción a la fibra, y posterior desorción para su análisis puede ser bastante considerable. Kataoka y colaboradores desarrollaron un método para la determinación de AAHs en alimentos mediante esta técnica. La muestra se trata con HCl y se centrifuga. Posteriormente, el sobrenadante se neutraliza con NaOH y las AAHs son extraídas empleando fibras de "Blue rayón" ("rayón" o celulosa cuyos grupos -OH fueron sustituidos con ftalocianina de cobre sulfonada), altamente selectivas para compuestos aromáticos policíclicos. El extracto se pasa a través de una jeringa con un microfiltro y se utiliza como un dispositivo SPME una columna capilar [45] que se coloca entre el *loop* y la aguja de inyección del muestreador automático. El

método es simple, rápido, automático, y presenta sensibilidades entre 3 y 20 veces superior en comparación con el método de inyección directa.

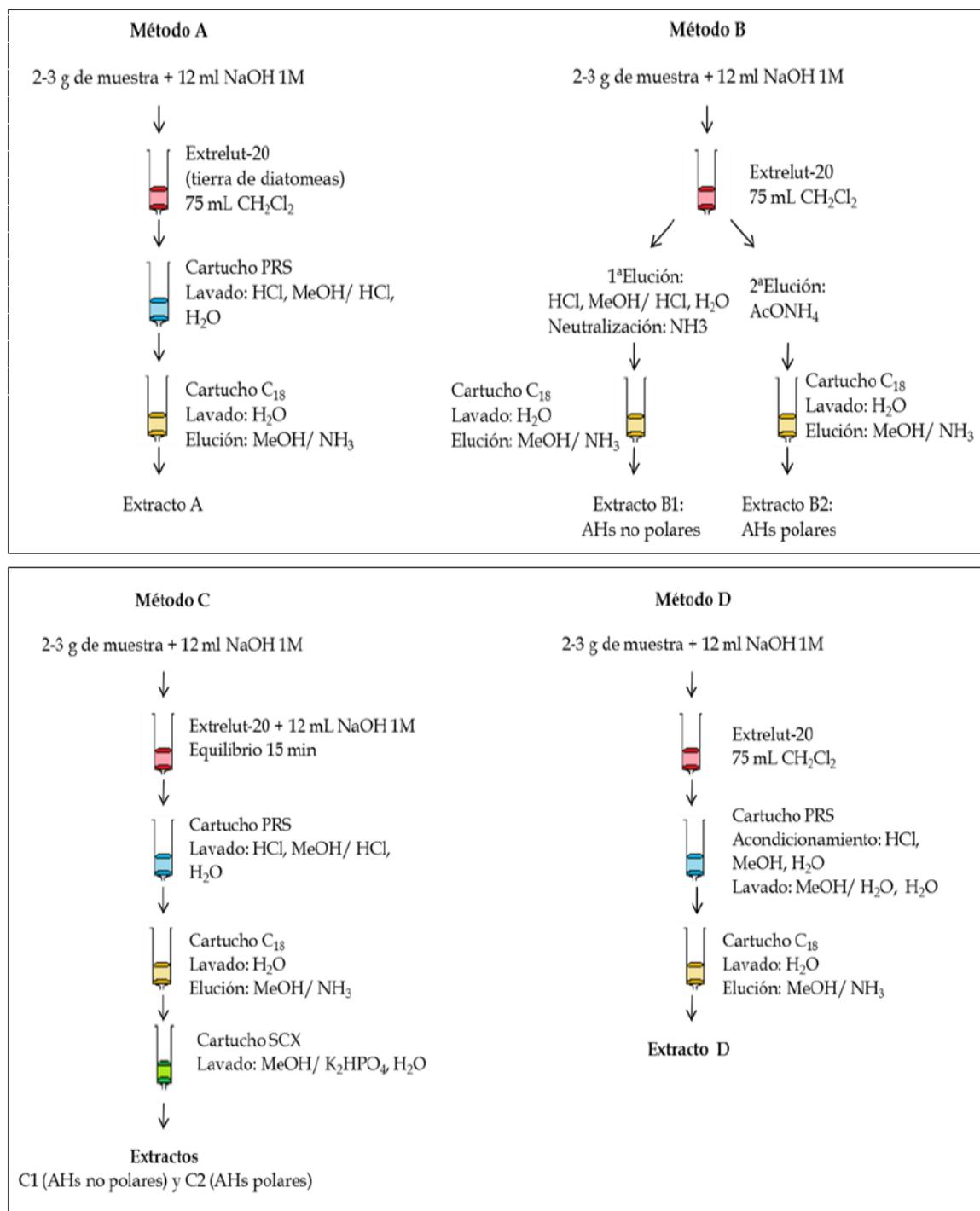


Figura 3: Métodos tradicionales de preparación de muestra para la determinación de AAHs.

1.4.4 Técnicas de separación y análisis de las distintas AAHs

Todas las aminas aromáticas heterocíclicas contienen de dos a cinco anillos aromáticos conjugados, generalmente tres, algunos de los cuales tienen uno o más átomos de nitrógeno y un grupo amino primario unido a uno de los anillos (Tablas 1 y 2). Debido a este tipo de estructuras de moderada polaridad e hidrofobicidad, la determinación de estos analitos puede llevarse a cabo utilizando cromatografía líquida de fase inversa como técnica de separación. Además, todas las AAHs tienen un espectro UV-vis característico con elevados coeficientes de extinción molar, pueden ser oxidadas electroquímicamente y algunas son fluorescentes, lo que hace posible la detección de todas con diferentes sensibilidades seleccionando el detector apropiado [58,59] Otra alternativa es acoplar un detector de masas (MS) con ionización a presión atmosférica a la salida de la columna, ya que las AAHs se protonan con facilidad proporcionando picos intensos adecuados para la cuantificación [60-62]. También se ha empleado electroforesis capilar (CE) y cromatografía de gases (GC) con detección de captura de electrones, selectiva de nitrógeno [37,58,63]. Sin embargo, en este último caso, debido a que la mayoría de estas aminas son relativamente polares y no volátiles, puede ser necesaria una derivatización previa. En la bibliografía también se encuentran trabajos que determinan AAHs mediante técnicas de inmunoensayo (ELISA), muy sensibles pero a la vez complejas y con el peligro de reacciones cruzadas [64,65].

Análisis mediante cromatografía líquida (HPLC)

Como se dijo anteriormente, debido al tipo de estructuras que presentan las AAHs, la cromatografía líquida con detección UV-vis, fluorescente y electroquímica se presenta como una de las técnicas que más se utilizan en la determinación de estos compuestos. La cromatografía líquida con detección fluorescente o electroquímica presenta una alta selectividad y sensibilidad pero no permiten determinar la identidad de los picos cromatográficos. La detección UV-

vis con diodos en serie (DAD) permite la identificación *on line* si los picos están obviamente bien resueltos y los espectros son lo suficientemente diferentes. Cuando es posible, la detección fluorescente (FLD) se utiliza como un complemento a la detección de diodos en serie para eliminar las interferencias de compuestos no fluorescentes o en caso que se requiera alta sensibilidad. Sin embargo, la detección de masas (MS) obviamente es la más útil ya que permite la detección de todos los compuestos y la elucidación de todas las estructuras. Sin embargo, estos detectores son mucho más caros y requieren de personal entrenado.

La absorción UV-vis es la técnica de detección más empleada, ya que permite detectar simultáneamente la mayoría de las AAHs a longitudes de onda de aproximadamente 260 nm. En estos casos, los límites de detección (LOD) para disoluciones patrón se encuentran generalmente entre 0,05 y 1 ng inyectados. En el caso de muestras reales, dependiendo de la complejidad de la matriz y de la eficiencia del método de tratamiento de muestra, los valores oscilan en general entre 0,1 y 1 ng/g para el caso de alimentos cocidos y entre 3 y 20 ng/g para extractos de carne. Por otra parte, el detector FLD, por las razones comentadas anteriormente, proporciona LODs mucho menores, del orden de 0,001 a 15 ng inyectados para disoluciones estándar y de 0,015 a 0,81ng/g para muestras reales. Desafortunadamente, con esta técnica se restringe el análisis a la determinación de carbolinas y/o PhIP, que son las únicas AAHs fluorescentes. Es por ello que muchos autores utilizan el detector de fluorescencia conjuntamente con otro tipo de detección, como UV-vis o electroquímica.

CAPITULO 2: “METODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS LÍQUIDAS”

A pesar de los considerables avances tecnológicos en el campo analítico, la mayoría de los instrumentos no pueden procesar matrices complejas directamente. En la mayoría de los casos se requiere una etapa previa de preparación de muestra, mediante la cual se debe obtener un extracto limpio, compatible con el sistema de análisis y, si es necesario, más concentrado. Así, generalmente las metodologías se componen de tres partes claramente diferenciadas: preparación de muestra, purificación de extractos y determinación.

2.1. Métodos para la preparación de muestras acuosas

2.1.1 Extracción líquido-líquido (ELL)

La ELL es una de las técnicas más antiguas y más utilizadas para la preparación de muestras [66] debido a la simplicidad del equipamiento necesario y a su rapidez. Estos factores han posibilitado su amplia utilización en métodos oficiales tales como los métodos de la Environmental Protection Agency (EPA). La técnica permite la separación de un analito, total o parcialmente, de las posibles interferencias presentes en la matriz y/o la pre-concentración previa a la medida, aumentando así la sensibilidad del método.

El fundamento de la extracción líquido-líquido se basa en la diferente distribución o reparto de los constituyentes de la muestra entre dos fases inmiscibles, a una temperatura dada, de acuerdo a la ley de Nernst (ecuación 1).

$$(K_D)_A = \frac{[C]_{org}}{[C]_{aq}} \quad (1)$$

donde K_D es el coeficiente de partición o distribución del analito, C_{org} y C_{aq} es la concentración del analito en la fase orgánica y acuosa, respectivamente. En la mayoría de los casos, la fase que contiene la muestra es acuosa y la otra un disolvente orgánico inmiscible. La muestra líquida se pone en contacto íntimo con 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" puede ser un volumen pequeño, o se puede evaporar para pre-concentrar el analito previo a su análisis.

El valor de K_D depende de la naturaleza química de ambas fases y de la temperatura. Por ejemplo, si un analito presenta baja solubilidad en agua y/o alta solubilidad en el solvente orgánico, tendrá un alto coeficiente de distribución y así la extracción se ve 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 octanol-agua, $P_{o/w}$, ya que está tabulado para numerosos compuestos orgánicos [67].

Para analitos ionizables el pH también afecta a K_D , por ello es que se emplea preferentemente la relación de distribución, D , para determinar la cantidad de analito total en cada fase (ionizado y neutro). Para la extracción de cationes (metálicos u orgánicos) la adecuada elección del agente complejante aumenta la relación de distribución, 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.

Una expresión más útil para estimar el rendimiento de la extracción de un analito no ionizable, es la fracción de analito extraída en la fase orgánica, E , la cual depende no solo de la constante de distribución, sino también de la "relación de fases", φ (ecuación 2).

$$E = \frac{C_0}{C_i} = \frac{K_D}{(1+K_D \phi)} \quad (2)$$

Donde $\phi = V_o / V_{aq}$, siendo V_o y V_{aq} los volúmenes de fase orgánica y acuosa, respectivamente.

Regularmente los procesos de extracción se llevan a cabo en ampollas de decantación y típicamente requieren varios mililitros para cada fase. Para extracciones de *una sola etapa*, la K_D debe ser grande (>10) para una recuperación cuantitativa del analito, ya que la relación de fases (ϕ) debe ser mantenida en un rango práctico de valores ($0,1 < \phi < 10$). Con frecuencia, el valor de K_D no es lo suficientemente grande, por lo cual para alcanzar una extracción lo más completa posible (recuperaciones $>99\%$) se necesitan varias extracciones con porciones frescas de disolvente orgánico [66,68,69]. Para n extracciones (*extracciones múltiples*), la fracción de analito extraída E , es calculada mediante la ecuación 3.

$$E = 1 - \left(\frac{1}{1+K_D \phi} \right)^n \quad (3)$$

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, lo que hace que esta técnica pueda ser cara, tediosa, tóxica 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.

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 micro gotas 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 a continuación.

2.2 Técnicas de microextracción

La etapa de preparación de muestra es la causa más frecuente de pérdida de analitos y de contaminaciones y generalmente origina un elevado consumo de tiempo, muestra y reactivos, en algunos casos caros y/o tóxicos. Por ello, la tendencia actual es eliminar o minimizar todos o parte de estos problemas. Una manera es la **miniaturización**, lo que se ha convertido en una tendencia dominante en la Química Analítica durante los últimos años debido a que se minimiza la cantidad de muestra, el consumo de reactivos y de disolventes caros y/o tóxicos, resultando un sistema más compatible con el ambiente [70].

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. [71] 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 (factor de enriquecimiento, en inglés enrichment factor EF). Debido a ello, la MELLD ha suscitado gran interés en los químicos analíticos. Desde su introducción para la pre concentración de analitos orgánicos desde muestras acuosas, un gran número de trabajos reportan una eficiente y rápida extracción de analitos orgánicos o inorgánicos [72–78]

2.3.1 Fundamentos de la MELLD

Se basa en un sistema de disolventes ternario, donde se utiliza una mezcla de un solvente inmiscible en agua que actúa como *extractante*, y un solvente polar, miscible en agua, que ejerce la función de *dispersante*. Los disolventes de extracción más comunes son disolventes orgánicos clorados como el clorobenceno, tetracloruro de carbono o cloroformo y los disolventes dispersantes pueden ser acetona, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. La mezcla extractante/dispersante se inyecta rápidamente en la muestra acuosa que contiene los analitos, el solvente dispersante abandona al solvente extractante debido a su miscibilidad en la muestra acuosa y esto da la formación de gotas muy finas que se dispersan a través de la muestra lo que produce una gran turbidez. En este instante inicial, el área superficial entre el disolvente de extracción y la muestra es muy elevada, por lo que el analito se transfiere rápidamente al solvente extractante, el cual se separa de la muestra acuosa (decanta o flota según la densidad). Para acelerar la separación de las fases se centrifuga. Debido a que se requieren normalmente altos factores de enriquecimiento, se utilizan pequeños volúmenes del extractante lo que puede dificultar su colección luego de la extracción, por lo que se requiere diseñar tubos de fondo cónico para extractantes más densos que el agua, o de cuello muy angosto para los menos densos que el agua [75,76,79]. En la Figura 4 se muestra un esquema de las diferentes etapas de la técnica MELLD. Finalmente, la gota de fase extractante es analizada mediante alguna técnica

separativa (cromatográfica o electroforética). Dependiendo de la técnica separativa, puede ser necesario fluidificar el solvente extractante o evaporarlo y retomarlo en algún solvente afín con la fase móvil, como es el caso de HPLC de fase inversa.

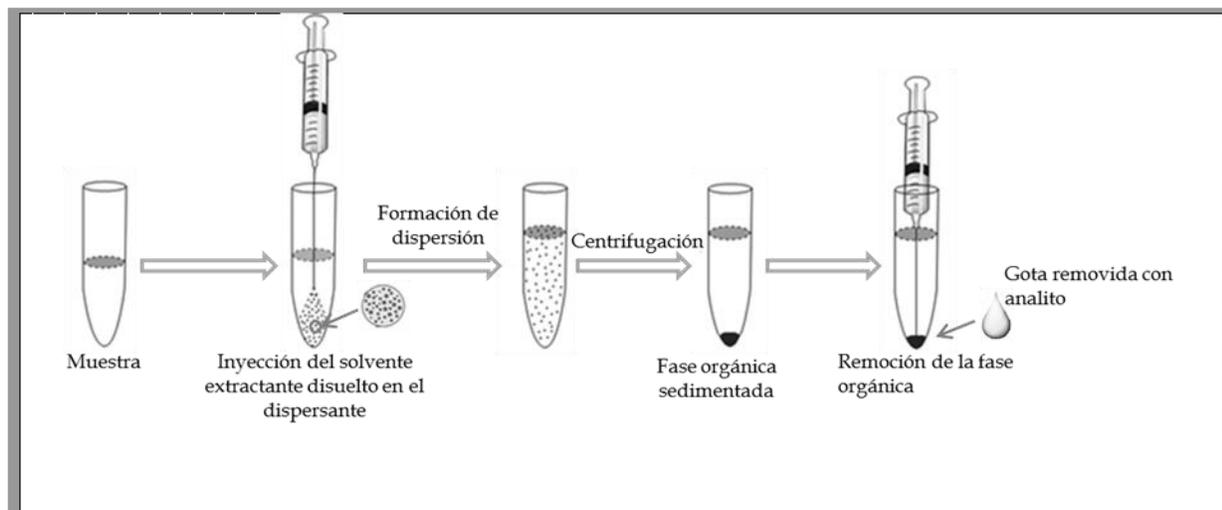


Figura 4: Representación esquemática de la MELLD

2.3.2 Variables que afectan el proceso de extracción:

Las variables que afectan al proceso de extracción se determinan de acuerdo a las características del experimento y al criterio químico. Por ejemplo, el pH es una variable obligatoria a optimizar para la extracción de compuestos ionizables pero no es una variable a considerar para la recuperación de compuestos neutros. Las variables se suelen optimizar de manera independiente mediante un procedimiento en etapas (“step by step” optimization) en el que se obtiene el valor óptimo (máximo o mínimo) de dicha variable de a una por vez, determinando las recuperaciones a diferentes valores de la misma, y al optimizarse las subsiguientes variables se trabaja con el valor óptimo de la variable anterior. Las variables también pueden ser interdependientes y pueden afectar la eficiencia de extracción de manera imprevista, lo cual sólo se detecta mediante algún procedimiento

factorial o diseño de experimentos, como por ejemplo, mediante un “diseño central compuesto” como veremos más adelante.

En el caso de la microextracción dispersiva líquido/líquido, las variables que se deben optimizar son:

- a. Tipo y volumen de solvente extractante: el *tipo* de solvente extractante es elegido en base a su solubilidad en agua, poder de solubilización por los compuestos de interés y buen comportamiento cromatográfico. Aunque la cantidad de analito extraída aumenta con el *volumen*, el aumento de esta variable disminuye el factor de enriquecimiento (“enrichment factor”, $EF = \text{concentración de analito en la fase extractante} / \text{concentración inicial}$) ya que disminuye la concentración del analito en la fase extractante y, por lo tanto, la detectabilidad. Sin embargo, la reducción del volumen de extractante a fin de aumentar la señal cromatográfica alcanza un límite si se desea obtener una gota (sedimentada o flotante) fácilmente manipulable [80]. Para facilitar la recuperación completa y en forma práctica de la gota, en el caso de líquidos con puntos de fusión cercanos a la temperatura ambiente, se emplea el modo “microextracción dispersiva mediante solidificación de la gota flotante (DLLME-SFO)” [81,82]
- b. Tipo y volumen de solvente dispersante: la miscibilidad del *solvente dispersante* con el solvente de extracción y con la fase acuosa, es esencial en la selección del mismo. El *volumen de disolvente dispersante* afecta al volumen de la fase extractante y al grado de dispersión del solvente de extracción en la fase acuosa (y por lo tanto, a la eficiencia de extracción). Para conseguir un volumen constante de la fase extractante, es necesario realizar simultáneamente cambios en los volúmenes de dispersante y extractante [71,83].

- c. 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 centrifugación. Generalmente, el tiempo no influye significativamente en la eficiencia de la extracción debido a que el área superficial inicial entre el disolvente de extracción y la fase acuosa es infinitamente grande, por lo que la transferencia de los analitos de la fase acuosa a la fase extractante es muy rápida [71,83–85]. No obstante, en ciertas aplicaciones se observó una influencia del tiempo en la eficiencia de la misma [72,86]
- d. 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 [344,339] y al factor de enriquecimiento, EF.
- e. Fuerza iónica: generalmente, la adición de sal favorece el pasaje de los analitos a la fase orgánica (“salting-out”) como se dijo anteriormente. Sin embargo, en el caso de emplear líquidos iónicos (ILs), el aumento de la fuerza iónica puede disminuir la cantidad de analito extraída debido a que las interacciones coulombicas líquido iónico-sal agregada produce un aumento de la solubilidad del IL en la fase acuosa [87,88].
- f. pH: como se dijo anteriormente, afecta la extracción de analitos ionizables, aunque en el caso de la extracción con líquidos iónicos, la recuperación puede cambiar con el pH de la fase acuosa, aún para analitos neutros, probablemente debido a las interacciones coulombicas de las especies iónicas del tampón empleado con los iones del RTIL, al igual que lo que ocurre con la fuerza iónica [89].

CAPÍTULO 3: “MÉTODOS MODERNOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS”.

3.1 Extracción con solvente asistida con microondas (“Microwave Assisted Solvent Extraction”, MASE)

Esta técnica ha despertado un gran interés en el campo de la Química Analítica, ya que constituye una herramienta poderosa, que permite la extracción rápida y eficiente de analitos, desde matrices sólidas de elevada complejidad. Los tiempos de extracción típicos se encuentran entre 5-30 min, por lo que se trata de una técnica relativamente rápida, con un consumo moderado de disolventes. Por otro lado, la técnica MASE ofrece mejoras respecto a las técnicas de extracción convencionales, ya que ofrece la posibilidad de realizar la extracción simultánea de un elevado número de muestras, y además permite la reducción del tiempo de extracción y del consumo de disolvente, superando así las principales limitaciones de extracciones tradicionales, como la extracción Soxhlet [90]. Un inconveniente que puede presentar la técnica MASE, es que, tras la etapa de extracción, se requiera una etapa de centrifugación y una o varias etapas de purificación de los extractos resultantes.

3.1.1 Principios de la técnica

Las microondas son ondas electromagnéticas cuyo intervalo de frecuencias se encuentra entre 300 y 3×10^6 MHz. En este intervalo de frecuencias, la radiación interacciona con la materia provocando el desplazamiento de iones y tránsitos rotacionales, pero no causa cambios en la estructura molecular [91,92]. La transformación de energía electromagnética en energía calorífica tiene lugar mediante dos mecanismos, la *conducción iónica* y la *rotación dipolar*. La conducción

iónica se produce por la migración electroforética de iones, cuando se aplica un campo electromagnético. La resistencia de la disolución a este flujo de corriente origina pérdidas de energía, debidas a la fricción, que origina el calentamiento de la disolución. La rotación dipolar está relacionada con el movimiento que sufren las moléculas con momentos dipolares (permanentes o instantáneos), cuando se someten a un campo eléctrico, puesto que tienden a alinearse con el mismo. Cuando deja de aplicarse el campo eléctrico, se restaura el desorden molecular, y se producen múltiples colisiones debidas a la agitación térmica, generando energía que se libera en forma de calor. A 2450 MHz, frecuencia utilizada en los aparatos comerciales, el proceso orden-desorden tiene lugar aproximadamente 5×10^9 veces por segundo, dando lugar a un calentamiento muy rápido [91,92].

La energía absorbida depende del “factor de disipación” ($\tan \delta$), que se define como el cociente de la pérdida dieléctrica de la muestra ϵ'' y la constante dieléctrica ϵ' a una dada frecuencia y temperatura. El factor ϵ'' expresa la eficiencia de la transformación de la energía electromagnética en calor, y ϵ' expresa la capacidad de una molécula para ser polarizada mediante un campo eléctrico [70,92].

$$\frac{\epsilon''}{\epsilon'} = \tan \delta \quad (4)$$

La energía absorbida por una muestra aumenta con el factor de disipación. En la **Tabla 4**, se listan algunos parámetros físicos, incluyendo las constantes dieléctricas y los factores de disipación de algunos de los disolventes más comunes, utilizados en MASE.

Tabla 4: Constante dieléctrica y factores de disipación para algunos de los disolventes utilizados en MASE.

Disolvente	ϵ'	ϵ''	$\tan \alpha \times 10^4$
Acetato de Etilo	6.02	3.2	5312
Acetona	21.1	11.5	5555
Acetonitrilo	37.5	2.3	620
Agua	76.7	12.04	15700
Etanol	24.3	1.62	2500
Heptano	1.9	1.9×10^{-4}	1
Metanol	23.9	15.29	6400
NaCl 0.1M	75.5	18.12	2400
Tetracloruro de Carbono	2.2	8.8×10^{-4}	4

3.1.2 Mecanismo de Extracción

La extracción MASE se basa en el uso de energía de microondas para conseguir que los compuestos de interés, pasen de la muestra (generalmente sólida) a un disolvente. De acuerdo a lo expuesto en la sección anterior, el calentamiento por acción de la radiación de microondas depende de la polaridad del solvente (o constante dieléctrica), más precisamente del “*factor de disipación*” ($\tan \delta$). En las extracciones realizadas con disolventes (o mezclas) polares, el calentamiento, que ocurre por rotación de dipolos, es mucho mayor ya que los valores de $\tan \delta$ son mucho mayores. Las altas temperaturas alcanzadas por el disolvente, aumentan la solubilidad del analito y aceleran la cinética de la desorción. Si la extracción se lleva a cabo con disolventes transparentes a la energía de microondas (valores de $\tan \delta$ bajos) el calentamiento es muy bajo y en estos casos se suelen utilizar buzos magnéticos en las celdas MASE que, a la vez que agitan la muestra, están diseñados para poder contener en su interior un solvente polar que permita el calentamiento. En el caso de matrices biológicas, alimenticias o ambientales, que se caracterizan por un elevado contenido en agua libre dispersada en su estructura, el calentamiento es importante. En algunos casos, el agua presente en los tejidos

puede provocar un sobrecalentamiento en determinados puntos de la matriz y extraer los analitos solubilizándolos hacia el solvente de extracción, aunque si el calentamiento localizado es muy grande puede carbonizar la muestra [90].

Instrumentación

La muestra se coloca en celdas de un material inerte, preferentemente en cantidades no mayores a 5 gr y debe estar completamente inmersa en el solvente (10 a 30 ml). Los equipos modernos permiten un control de la temperatura, (mediante sonda de fibra óptica o sensor infrarrojo), de la presión (en recipientes cerrados) y la potencia de la radiación empleada. De esta manera, se puede trabajar con gradientes de temperatura (con lo cual la potencia se ajusta para fijar esos valores) o de potencia (con lo cual la temperatura varía para ajustarse a los valores fijados). Existen dos tipos de recipientes para llevar a cabo extracciones MASE (Figura 6).

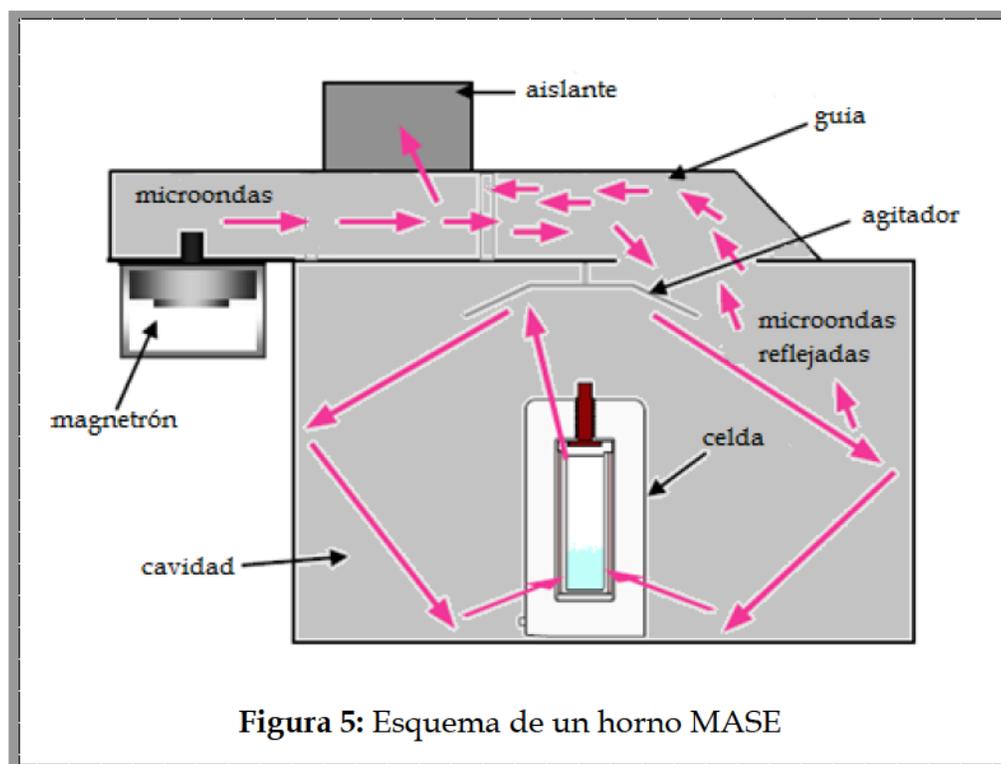


Figura 5: Esquema de un horno MASE

Recipientes cerrados: de un volumen máximo de 100 ml, permiten emplear menos de 1gr de muestra por celda y 5-10 ml de reactivo de extracción. Se pueden emplear rampas de temperatura hasta un valor de temperatura constante de 160-210 °C.

Recipientes abiertos: la temperatura máxima permitida está limitada por el punto de ebullición del reactivo. Los equipos modernos permiten disolución a presión atmosférica con adición automática de reactivo y rampa de temperatura.

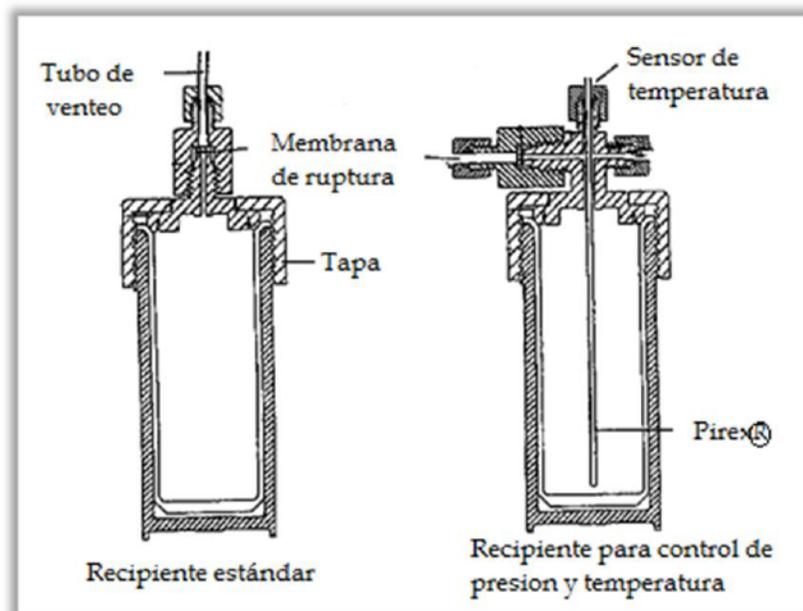


Figura 6: celdas de extracción MASE estándar y para control de temperatura y presión.

3.1.3 Variables que afectan al proceso de extracción MASE

La naturaleza y volumen de disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la naturaleza de la matriz, son las principales variables a tener en cuenta a la hora

de desarrollar un método de MASE [92,93]. La correcta elección del **solvente y su volumen**, es fundamental para obtener un proceso de extracción óptimo, debe realizarse en base a tres premisas fundamentales:

- 1) Las **propiedades de los disolventes frente a las microondas**. En el apartado 3.1.1 se ha explicado la relación proporcional entre la absorción de microondas y la constante dieléctrica del disolvente. Las moléculas polares y las disoluciones iónicas absorberán fuertemente la energía de microondas, ya que presentan un momento dipolar permanente. Sin embargo, disolventes no polares no se calentarán cuando se expongan a microondas.
- 2) La **interacción del disolvente con la matriz**. Es importante que el disolvente presente la capacidad de penetrar en los poros de la matriz, a la hora de conseguir extracciones cuantitativas.
- 3) La **solubilidad de los analitos** en el disolvente. El disolvente debería presentar alta selectividad por los analitos de interés, pero no para las sustancias indeseadas de los componentes de la matriz. En cuanto al **volumen de disolvente**, éste debe ser el suficiente para asegurar que toda la muestra esté inmersa en el mismo. Generalmente varía entre 10 y 30 mL, pero depende en gran medida del tipo y tamaño de muestra [70,92,94].

La **temperatura** es el parámetro más empleado como variable de ajuste, puesto que es un factor que afecta de manera importante a la eficiencia de la extracción. Si la extracción se lleva a cabo en vasos cerrados, pueden utilizarse temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente. De esta manera se favorece la desorción de los analitos de los sitios activos de la matriz. Además, los disolventes incrementan su capacidad de solubilización, al mismo tiempo que disminuye la

tensión superficial y la viscosidad, favoreciendo la penetración del disolvente en la matriz sólida.

La reproducibilidad es mejor si se hace una rampa de T y se mantiene por un periodo de tiempo. *Esto asegura que la inyección de radiación es la misma durante todo el programa para todas las muestras.*

El **tiempo de extracción** generalmente favorece la extracción durante los primeros minutos. En el caso de compuestos termolábiles, tiempos de extracción prolongados favorecen la degradación.

La **naturaleza de la matriz** y el contenido en humedad de la misma, también influyen en la extracción ya que como se comentó anteriormente el agua absorbe microondas, por lo que es importante controlar el contenido de humedad para obtener resultados reproducibles.

CAPÍTULO 4: “EMPLEO DE LIQUIDOS IONICOS A TEMPERATURA AMBIENTE EN EL ANÁLISIS DE AAHs”

Los líquidos iónicos (ILs) son sales con bajo punto de fusión (generalmente < 100 °C). Aquellos que son líquidos a temperatura ambiente (“*Room Temperature Ionic Liquids*”, RTILs) son los que presentan mayor interés en la mayoría de las aplicaciones. Los ILs se postulan como una alternativa eco-compatible a los disolventes orgánicos ordinarios, debido a sus propiedades únicas, tales como la baja o nula volatilidad, propiedades fisicoquímicas ajustables tales como viscosidad, poder de solubilización y miscibilidad con agua, y su mayor compatibilidad con el medio ambiente. Es por aquellas propiedades que se los están empleando en numerosos campos de la química analítica, como procesos de separación y purificación, la preparación de muestras, técnicas cromatográficas y electroforéticas, ente otros[95]. Sin embargo, el carácter de “solventes verdes” se puede referir únicamente a su nula volatilidad, pero la biodegradabilidad puede ser similar o peor aún que la de un solvente orgánico tradicional, y este comportamiento empeora cuanto más larga es la cadena alquílica del IL [96-99]. La Figura 7 muestra el contundente crecimiento del número de artículos relacionados con la utilización de los líquidos iónicos, tanto en el ámbito científico como en el de las aplicaciones industriales.

4.1 Generalidades de los Líquidos Iónicos

Los RTILs son sales formadas por un catión, de naturaleza orgánica, y un anión orgánico o inorgánico. El catión es el principal responsable del comportamiento químico y el anión el que aporta la mayor parte de las propiedades físicas. En vista que los ILs están formados por iones muy asimétricos y de gran tamaño, las

fuerzas atractivas catión-anión son más débiles que las fuerzas que intervienen en las sales iónicas convencionales y es por esto que generalmente son líquidos a temperatura ambiente (sales fundidas o “molten salts”) [100].

El aspecto de los RTILs es semejante al de un líquido clásico, generalmente un poco más viscoso, pero formados únicamente por iones, por lo que su estructura es completamente diferente a la de otros disolventes formados por moléculas neutras [101]. La principal característica que diferencia a los RTILs de las sales fundidas, es el amplio margen de temperaturas en el que los RTILs son líquidos comparados con las sales [102]. Los cationes orgánicos pueden contener en su estructura átomos de nitrógeno (por ej: alquilamonio, imidazol, pirrolidina, piridina, etc) o fósforo (fosfonios) asimétricamente sustituidos con grupos alquílicos, con aniones inorgánicos tales como cloruro, bromuro, hexafluorofosfato $[PF_6]^-$, tetrafluorborato $[BF_4]^-$ u orgánicos tales como trifluorometano sulfonato o “triflato” $[CF_3SO_3]^-$, bis(trifluorometil) sulfonilimida $[(CF_3SO_2)_2N]^-$, etc. Debido al gran número posible de combinaciones catión-anión, el número de RTILs puede ser muy grande y es por esto, que las diferentes combinaciones permiten obtener una amplia gama de líquidos con diferentes propiedades, cuyos valores son muy amplios, a diferencia de los solventes orgánicos tradicionales, y es por esto que a estos nuevos solventes se los conoce con el nombre de “solventes de diseño” o líquidos sintetizados “a medida”. Algunas combinaciones están disponibles comercialmente y las que no lo están, pueden obtenerse fácilmente mediante una reacción de metátesis. Por lo tanto, se puede lograr una gran flexibilidad en la selección del mejor IL para una aplicación determinada.

En la Figura 8 se muestran algunas estructuras de cationes y aniones típicos empleados en la fabricación de ILs.

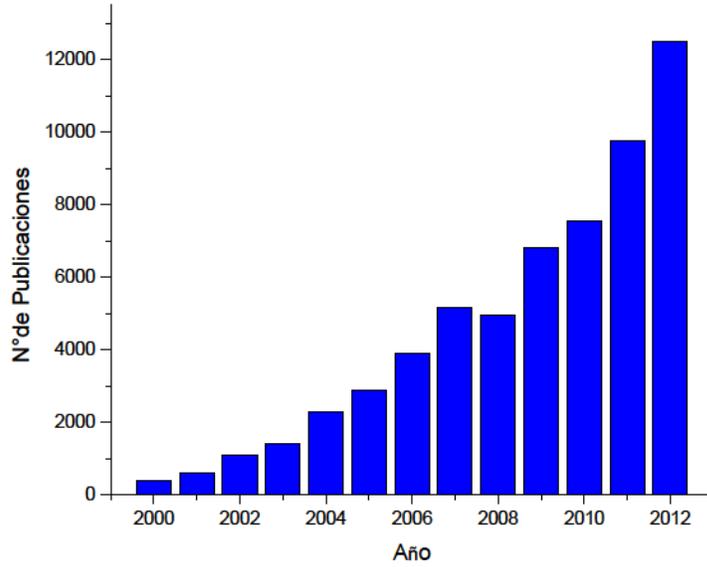


Figura 7: Evolución del número de publicaciones sobre líquidos iónicos en los últimos años.

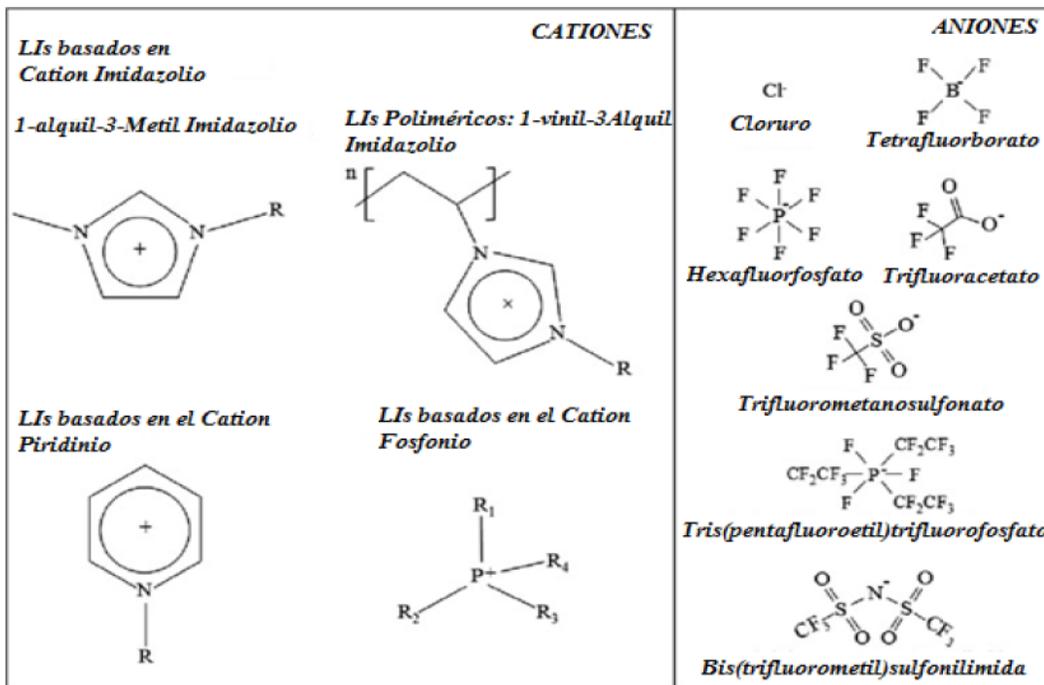


Figura 8: Cationes y aniones típicos empleados en la elaboración de líquidos iónicos.

Es así como, la elección del catión y del anión determina la capacidad de solubilización (y extracción) hacia un determinado analito, así como también determina su solubilidad y miscibilidad en agua y en disolventes orgánicos tradicionales. Los ILs presentan también una alta estabilidad térmica hasta temperaturas superiores a los 450°C en algunos casos, un alto calor específico, un amplio intervalo de potencial en el cual son estables (ventana electroquímica) y una elevada conductividad iónica lo que los hace potencialmente atractivos como electrolitos en diferentes dispositivos electroquímicos, empleándose como electrolitos en síntesis electroquímica, disolventes en electrodeposición de metales, baterías, súper condensadores, pilas de combustible, células solares y dispositivos basados en polímeros conductores como sensores electroquímicos, músculos artificiales y dispositivos electrocrómicos [103,104].

Respecto de la nomenclatura de los líquidos iónicos, se designa primero al catión seguido del anión pero al momento de representar a la sal, se los puede encontrar de diversas formas en la literatura. Por ejemplo el hexafluorofosfato de 1-Octil-3-metilimidazolio puede aparecer como: (OMIM-PF₆); [OMIm]⁺[PF₆]; [omim][PF₆]; [OMIM]⁺[PF₆]; [C₈C₁im][PF₆], etc. La representación que tomaremos para este trabajo de tesis debido a su simplicidad y mayor claridad es [OMim][PF₆] y los iones por separado tendrán la carga respectiva.

4.2 Propiedades fisicoquímicas de los RTILs

Punto de fusión: Son líquidos a temperatura ambiente e incluso algunos de ellos son líquidos a temperaturas inferiores a -80°C. El principal factor que influye en el punto de fusión de los ILs es la distribución de carga sobre los iones, la capacidad de formar enlaces mediante puentes de hidrógeno, la simetría de los iones y las interacciones de van der Waals. Comparando estos puntos de fusión tan bajos con los de las sales inorgánicas (por ejemplo, NaCl tiene un punto de fusión de 803°C),

algunos autores proponen que, en gran medida, la reducción de la temperatura de fusión se debe a la sustitución de los pequeños cationes inorgánicos por cationes orgánicos voluminosos y asimétricos lo que dificulta la formación del empaquetamiento del cristal. [105]

Densidad: Es una de las propiedades de los ILs más conocida y medida, ya que prácticamente todas las aplicaciones de los ILs requieren del conocimiento de esta propiedad. La mayoría de los ILs conocidos son más densos que el agua, pudiendo tomar valores de hasta 1,6 g/cm³[105]. Estos valores dependen de la masa molar del anión, que afecta significativamente a la densidad total del líquido iónico [106].

Viscosidad: En su mayoría son más viscosos que el agua, con viscosidades 2 o 3 órdenes de magnitud superiores a las de los disolventes orgánicos convencionales. El rango de viscosidades está comprendido entre 35 y 500 cP [105,107]. La viscosidad es un parámetro importante en extracciones líquido/líquido y en determinaciones mediante HPLC ya que RTILs altamente viscosos dificultan la manipulación de la gota o la inyección en la columna.

Polaridad y solubilidad: La polaridad de los líquidos iónicos ha sido evaluada utilizando la escala solvatocrómica normalizada de Reichardt, E_T^N , en la cual al agua se le asigna un valor de 1 y al tetrametilsilano, un solvente no polar, un valor de cero [108]. La mayoría de los ILs presentan un valor de E_T^N comprendido entre 0,64-0,68 [109], lo que se asemeja a la polaridad del etanol ($E_T^N = 0.65$) [110,111]. Los ILs con aniones nitrato y/o tiocianato presentan una polaridad superior, incluso cercana a la del agua [95].

Solubilidad en agua: la solubilidad de los líquidos iónicos en agua depende de la naturaleza del anión y del catión. Por ejemplo, los RTILs con base en el *cation imidazolio* que contienen aniones cloruro, bromuro o trifluoroacetato son muy

solubles en agua. Pero si contiene aniones hexafluorofosfato o bis-(trifluorometilsulfonil) imida tienen una solubilidad limitada en agua, formando fácilmente dos fases líquidas [101]. Sin embargo, los RTILs con base en el catión tetraalquilfosfonio que contienen los mencionados aniones cloruro o bromuro, son insolubles en agua, es decir que el catión también condiciona la solubilidad ya que el aumento de las cadenas alquílicas o anillos aumentan su hidrofobicidad.

Presión de vapor: Se caracterizan por poseer presiones de vapor prácticamente despreciables a temperatura ambiente, y en la mayoría de los casos estos valores no se pueden medir. Esta característica les confiere a los ILs la propiedad de no ser inflamables, por lo que podrían ser candidatos a sustituir a los disolventes orgánicos contaminantes [101,112]. Esta es la principal razón por la que los ILs fueron considerados rápidamente como solventes bio-compatibles o solventes “verdes” (por “green chemistry”) cuando todavía no existían estudios completos sobre su toxicidad. Sin embargo, estudios actuales muestran indicios sobre la significativa eco-toxicidad que presentan muchos ILs [113]. De todos modos, el hecho que no tengan prácticamente presión de vapor, es una ventaja importantísima a la hora de manipularlos o tener que trabajarlos a altas temperaturas como en procesos de purificación o síntesis.

Estabilidad térmica: Esta propiedad es una de las más atractivas en cromatografía gaseosa. Algunos estudios han demostrado que las temperaturas de descomposición de los ILs son generalmente superiores a 400°C, presentando una presión de vapor mínima por debajo de estas temperaturas [106]. En la actualidad ya se conocen algunos aspectos estructurales de los ILs que podrían estar relacionados con su estabilidad térmica: en general, aquellos ILs con aniones menos nucleofílicos presentan una mayor estabilidad térmica [114]. Así mismo, la naturaleza de la parte catiónica de los ILs ejerce una gran influencia en su estabilidad térmica [115], por ejemplo los ILs de la familia del amonio siempre

presentan una estabilidad térmica más baja que, por ejemplo, los ILs de la familia del imidazolio.

Tensión superficial: En general, los valores de tensión superficial líquido/aire para los ILs son ligeramente superiores a los que presentan los disolventes convencionales. Aunque no son tan altos como para el agua, estos valores están comprendidos entre 3.3×10^{-4} y 5.7×10^{-4} N cm⁻¹[106].

4.3 Aplicaciones de los RTILs en la Química Analítica

Los RTILs son capaces de extraer selectivamente un compuesto específico de una mezcla gaseosa o líquida [116–118]. Daí y colaboradores emplearon líquidos iónicos a base de imidazolio con aniones como [PF₆]⁻ y [NTf₂]⁻ como solventes de extracción para iones metálicos usando éteres como extractantes [119]. Carda Brosh y colaboradores, investigaron el comportamiento de partición de 38 compuestos diferentes en [BMim][PF₆] /agua. Concluyeron que los compuestos con grupos funcionales ácidos se reparten más en la fase acuosa; sin embargo, las aminas mostraron una tendencia contraria. Compuestos neutros o bipolares mostraron tendencias similares en ambos sistemas [111,120]. Wei y col. utilizaron [BMIm][PF₆] para la extracción de nanopartículas de oro y nanovarillas de oro de tamaño y forma deseados sin el uso de un tiol como agente de protección terminal [121]. Recientemente, se exploraron también tres líquidos ILs: cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio, cloruro de 1-alil-3-metilimidazolio, y acetato de 1-etil-3-metilimidazolio para disolver las cáscaras de naranja para la extracción de limoneno. Este estudio dio origen a otros estudios orientados a la remoción por ejemplo de pesticidas y herbicidas presentes en aceites esenciales, empleando en el tratamiento del aceite ILs con cationes específicos de dialquilimidazolio, trialquilimidazolio, dialquiltridinio y aniones alquilsulfato, dicianamida y alquilsulfonato [122,123]. Estos ILs también se emplearon para disolver diferentes

tipos de biomasa, tales como celulosa y quitina. Otro empleo particular incluye la extracción de biomoléculas incluyendo proteínas y ADN. Recientemente, se mostró por primera vez la extracción de ADN de doble cadena utilizando [BMIm][PF₆] sin que la misma sufriera modificaciones estructurales [124].

4.4 Aplicación de los RTILs en la preparación de muestras

Los métodos que se usan a menudo para realizar extracciones cuantitativas de compuestos orgánicos presentes en matrices sólidas son en general tediosos y lentos. Además suelen emplear solventes orgánicos de moderada a alta toxicidad e inflamables generando la situación paradójica de que algunos métodos analíticos son desarrollados para resolver problemas ambientales pero generando desechos tóxicos [125]. Por las propiedades y características mencionadas hasta el momento, los RTILs han ganado un interés creciente como nuevos solventes en procesos separativos.

En la **Tabla 5** se muestran algunas aplicaciones de los ILs como solventes extractantes en microextracción líquido-líquido (LLME) y en microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME).[76,85] La LLME es una técnica rápida, sencilla, económica y que emplea pequeños volúmenes de disolvente para la preparación de las muestras [126]. Esta técnica presenta eficiencias de extracción y reproducibilidades similares a las que se obtienen con la microextracción en fase sólida (SPME). La LLME puede realizarse tanto con una gota de disolvente generalmente pendiente de la aguja de una jeringa (Single Drop Micro-Extraction, SDME) [127] como con una pequeña porción de fibra hueca en cuyos poros se inmoviliza el disolvente (Hollow Fiber Microextraction, HFME) [85,127], llevándose a cabo generalmente mediante el modo de inmersión, aunque también es posible la extracción en espacio de cabeza. Una vez que los analitos están retenidos en la gota o en la fibra, se analizan mediante HPLC o GC [128-130]. En la

Figura 9 se resume gráficamente algunas aplicaciones de los ILs en estos procesos de separación y extracción.

Las metodologías publicadas incluyen la determinación de pesticidas piretroides [74,123] aminas aromáticas e hidrocarburos [78,131], insecticidas heterocíclicos [76] y fenoles [132,133], en muestras acuosas. También se han descrito algunas aplicaciones de microextracción dispersiva empleando líquidos iónicos (IL-DLLME) para la extracción de drogas antiinflamatorias no esteroides en orina [134,135], pesticidas en frutas (tras una etapa previa de extracción mediante ultrasonidos) [72], así como la extracción de algunos lantanoides en polvo de dióxido de uranio [136].

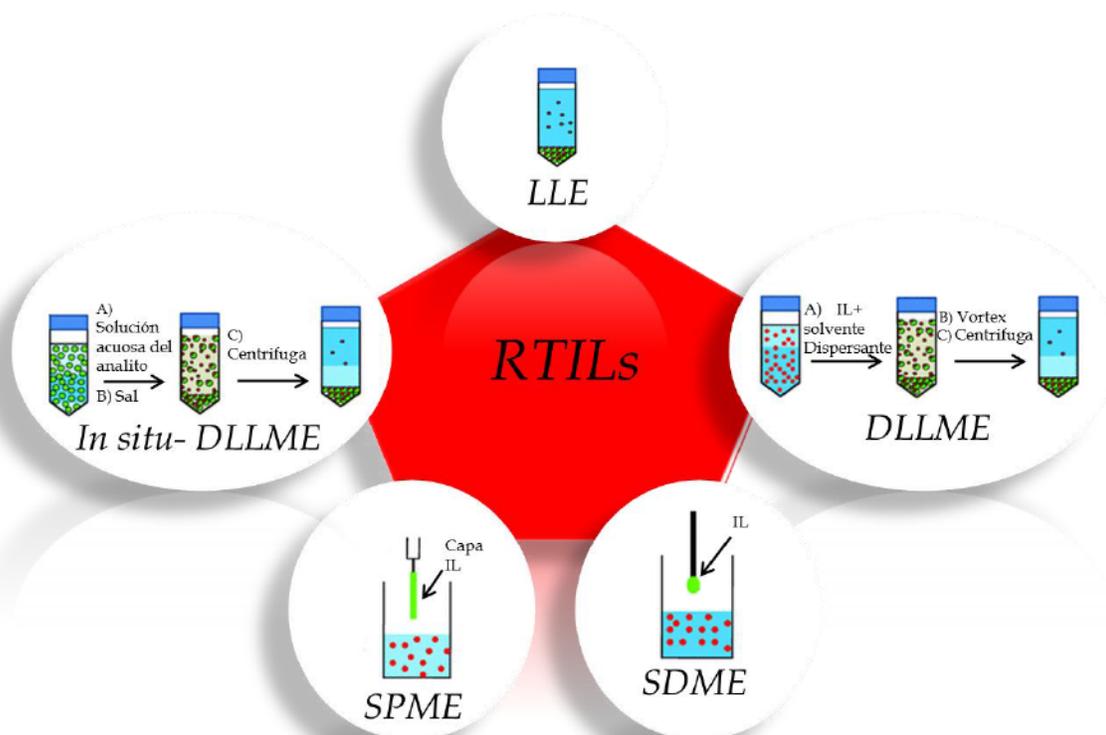


Figura 9: Algunas aplicaciones de los líquidos iónicos en procesos de separación y extracción.

Tabla 5: Aplicaciones más recientes de los RTILs en la preparación de muestras.

RTIL	Analito	Matriz	Ref.
<i>MELL</i>			
C ₄ MIm-PF ₆	Niquel diclorodifeniltricloroetano y sus metabolitos clorobenceno fenoles anilinas cloradas diclorometano, p-xileno y n- undecano plomo manganeso, cloro, mercurio,plomo	agua, te negro agua agua agua agua y alimentos agua muestras biológicas y ambientales	[137] [138][139] [71] [72] [79] [80] [81]
C ₆ MIm-PF ₆	Clorobenceno alquilfenoles 4-nonilfenol y 4-terc-octilfenol benzofenona-3	agua muestras acuosas agua harina	[82] [67] [67] [83]
C ₈ MIm-PF ₆	PAHs	Agua	[66]
HMIm-BF ₄	Mercurio	Agua	[84]
MOIm-PF ₆	isómeros de benceno, tolueno,	Agua	[85]
BMIm-PF ₆	etilbenceno y xileno		
<i>MELLID</i>			
HMIm-PF ₆	Cadmio	Agua	[86]
C _n MIm-PF ₆	PAHs		
n=4,6,8	pesticidas organofosforados	agua	[87]
n=6	insecticidas	agua	[88]
n=6	pesticidas	muestras	[89]
n=4, 6		ambientales plátanos	[90]

Recientemente se ha descrito un nuevo grupo de ILs, capaces de formar agregados en disolución acuosa [140–142]. Este comportamiento hace posible incluirlos en la categoría de compuestos capaces de formar medios organizados, como los surfactantes. La utilización de estos agregados en procedimientos de extracción de compuestos hidrofóbicos, que se encuentran en matrices sólidas, presenta ventajas ambientales frente a los solventes orgánicos convencionales y pueden considerarse mejores extractantes que los surfactantes catiónicos [143]. En la **Tabla 6** se reúnen

algunas aplicaciones que incluyen extracción asistida por microondas (MASE) que emplean líquidos iónicos convencionales y capaces de agregarse como los surfactantes.

Tabla 6: Aplicaciones de extracción asistida por microondas (MASE) con ILs

RTIL	Analito	Matriz	Ref.
[BMIm][X] X= Cl ⁻ , Br ⁻ , BF ₄ ⁻ , N(CN) ₂ ⁻ , H ₂ SO ₄ ⁻ ,	Compuestos fenólicos	plantas medicinales	[144]
[EMIm][Br] [HMIm][Br] [BMIm]2[SO ₄] [HDMIm][Br]	PAHs	sedimentos	[145]
BMIm-X X= Cl, Br, BF ₄	trans-resveratrol	Plantas	[146]

CAPÍTULO 5: DISEÑO DE EXPERIMENTOS

5.1 Introducción al diseño de experimentos

Los experimentos que se realicen en cualquier campo de la investigación y el desarrollo, se deben planificar cuidadosamente para que proporcionen la información buscada y que la misma sea de calidad. En dicha planificación se deben considerar dos aspectos importantes:

- ✓ El costo en tiempo y en recursos humanos.
- ✓ La selección de una metodología matemática y estadística que indique cómo planificar, diseñar u organizar la secuencia de experimentos de una forma óptima, de modo de minimizar el costo y la influencia del error experimental sobre la información buscada. Estas metodologías estadísticas se denominan "*diseño de experimentos*".

Diseño estadístico de experimentos o diseño experimental (DE)

El diseño experimental, DE, se aplica a sistemas en los cuales se observan una o más variables experimentales dependientes (*respuestas*), cuyo valor depende de los valores de una o más variables independientes controlables (*factores*). Las respuestas pueden estar influenciadas además por otras variables que no son controladas por el experimentador. Es decir que el DE es una técnica orientada a problemas multivariantes. En términos generales se puede afirmar que el DE propone, por un camino eficiente, obtener la optimización de un proceso o producto con un mínimo de experimentos. [147,148]

En Química Analítica, el DE se aplica en contextos tales como:

- ✓ Determinar la influencia de los factores sobre las respuestas observadas y cómo interaccionan entre ellos.
- ✓ Optimizar respuestas.
- ✓ Determinar la robustez de un sistema.
- ✓ Desarrollar modelos para los experimentos de calibración univariada y multivariada [149,150].

Un “*factor*” es una variable que puede ser manejada de un modo controlado para estudiar su efecto y que tiene (o podría tener) influencia sobre la respuesta estudiada. Se entiende por **niveles de un factor**, los diferentes valores que dicho factor toma y el *efecto de un factor* se define como el cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor. Se habla de *efecto principal* cuando nos referimos a los factores de interés primordial del experimento. Los factores se pueden clasificar en:

- i. cuantitativos: cuando sus posibles valores no se pueden ordenar numéricamente (por ej., en un ensayo de distintos solventes: agua, acetona y alcohol etílico).
- ii. cuantitativos: cuando los valores posibles se pueden ordenar numéricamente (pH, temperatura, concentración de reactivos, longitud de onda, caudales de gases o reactivos, volumen de muestra, etc).

En el diseño experimental, cada factor representa una dimensión espacial, de manera que cuando se trabaja con *varios factores*, se tendrá un espacio *multidimensional*. Para muestrear este espacio multidimensional se pueden utilizar

diferentes métodos, de acuerdo a las características de los problemas a resolver y las ventajas y desventajas intrínsecas de cada uno.

La aplicación del DE requiere considerar las siguientes etapas [151]:

- 1- Comprensión y planteamiento del problema. Al diseñar y analizar un experimento es necesario tener de antemano una idea clara de qué es exactamente lo que se va a estudiar y cuáles son los objetivos del experimento. Para obtener una comprensión profunda del sistema y del problema es necesario recopilar toda la información disponible sobre el sistema en estudio y que pueda ser relevante para la experimentación que se realizará.
- 2- Selección de la respuesta. La misma debe proveer la información buscada. Según el objetivo perseguido, puede ser necesario observar más de una respuesta y encontrar un compromiso entre ellas.
- 3- Elección de factores y niveles. Se deben identificar y listar todos los factores que pueden tener influencia en el proceso y en la respuesta. Se debe tener conciencia de la influencia potencial de cada factor y definir su dominio experimental, es decir el intervalo de valores que puede tomar. También se debe considerar la forma en que se controlarán dichos factores para mantenerlos en los valores deseados y cómo se los medirá. Para esto es necesario conocer el proceso estudiado, mediante una combinación de experiencia práctica y comprensión teórica.
- 4- Elección del diseño experimental. La experimentación se realiza frecuentemente en etapas secuenciales. La elección del diseño experimental para cada etapa depende de una serie de factores a considerar, tales como naturaleza del problema, información conocida y qué se desea obtener según el objetivo planteado, número de factores e interacciones que se

deben estudiar, complejidad de utilizar cada diseño, validez estadística y efectividad de cada diseño, restricciones operativas, de costo y tiempo, etc.

- 5- Realización de la experimentación. En esta etapa es necesario asegurar que todo se haga de acuerdo a lo planeado a los fines de evitar errores en el procedimiento que puedan anular la validez experimental.
- 6- Análisis de datos. Deben emplearse métodos estadísticos para analizar los datos ya que permiten comprobar si los efectos calculados son significativos comparándolos con el error experimental. Si se construye un modelo de superficie de respuesta (MSR), se pueden calcular los coeficientes por el método de cuadrados mínimos y se puede evaluar el modelo realizando réplicas de ciertos experimentos y aplicando ANOVA. Este modelo se puede usar para buscar la zona óptima matemáticamente.
- 7- Conclusiones y recomendaciones. Es importante notar que la realización de las etapas anteriores es cíclica. La información obtenida al realizar una serie de experimentos se debe integrar para planificar la experimentación posterior. Quizás entonces se comprende mejor el problema y se pueden redefinir o concretar más los objetivos, se pueden descartar factores que no eran importantes o modificar su dominio experimental. Con esto se planea una nueva experimentación y así sucesivamente.

5.2 Optimización experimental

La optimización puede definirse como un recurso basado en instrucciones que permiten mejorar los resultados de un procedimiento. Científicamente estas instrucciones se expresan a través de modelos matemáticos que permiten maximizar o minimizar alguna propiedad específica del sistema en estudio. Como se dijo antes, esta propiedad a ser optimizada se denomina *función objetivo o respuesta* (y), la que depende de una variedad de *factores experimentales* (x), bajo el control del operador. La relación entre ambas variables se puede representar según la siguiente ecuación:

$$(y_1, y_2, \dots, y_n) = f((x_1, x_2, \dots, x_n)) \quad (5)$$

Generalmente, las respuestas son tratadas de manera separada, por lo que la ecuación 5 se reduce a:

$$y = f((x_1, x_2, \dots, x_n)) \quad (6)$$

El proceso de búsqueda de los niveles óptimos de estos factores se conoce como **optimización** y se lleva a cabo mediante las siguientes etapas [152]:

- 1- Definición de la *función objetivo o respuesta*. A veces el criterio de optimización es simplemente una señal analítica o un tiempo de análisis. Otras veces el rendimiento de un método analítico se optimiza respecto a criterios de calidad analítica tales como: precisión, exactitud, sensibilidad, límite de detección o relación señal/ruido. Hay casos más complicados de respuestas múltiples donde la función objetivo puede estar compuesta de varios criterios.
- 2- Determinación de los *factores* más importantes, es decir de los factores que presentan influencias significativas sobre la respuesta a optimizar. Para esto se utiliza un diseño experimental simple o diseño de cribaje (*screening*).
- 3- Optimización propiamente dicha. Determinación de la combinación de los niveles de los factores seleccionados que resulte en la mejor respuesta (maximización o minimización). Para esto se utilizan diseños experimentales secuenciales o simultáneos.

Se comienza determinando qué factores influyen en la respuesta y en qué extensión. Luego se obtiene un modelo que describe cuantitativamente esos efectos. Se desean 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:

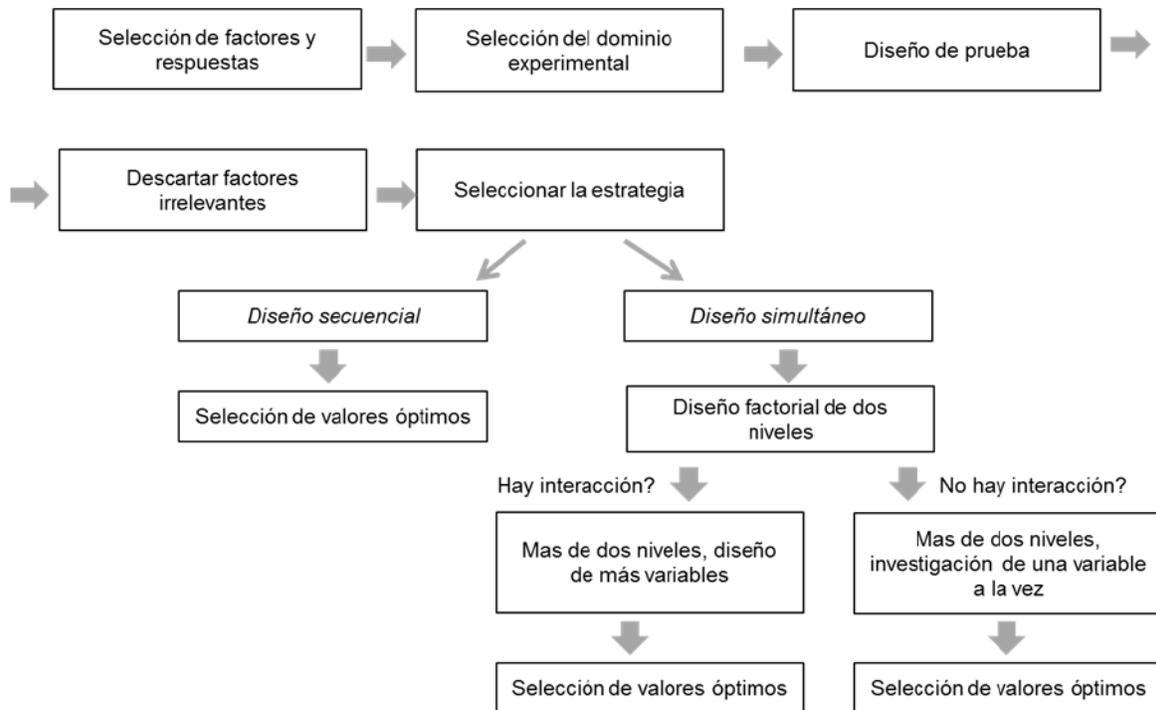


Figura 10: Principales etapas del diseño de experimentos.

5.3 Diseños de cribado (screening)

5.3.1 Diseño factorial completo a dos niveles

Por diseño factorial se entiende aquel en el que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores en cada experiencia. Se utilizan para estudiar el efecto, un conjunto de varios factores sobre una respuesta y se basan en la variación simultánea de un número limitado de niveles de los factores. Los planeamientos factoriales del tipo 2^k , donde k es el número de factores

y 2 el número de niveles, son los más comunes. El diseño requiere un experimento para cada una de las posibles combinaciones de los 2 niveles y de los k factores considerados.

Consideremos el diseño experimental más sencillo posible: se mide la respuesta a dos niveles de un factor (**Figura 11a**). Este diseño define un espacio *unidimensional* limitado por los dos niveles a los cuales el experimento se realiza. El diseño *bidimensional* de la **Figura 11.b** es un diseño factorial de *dos* niveles en *dos* dimensiones. Por lo tanto son necesarios 4 experimentos ($2^k = 2^2$). En este caso, la matriz de experimentos para un diseño de este tipo se presenta en la **Tabla 7**. El diseño espacial en dos dimensiones que se obtiene se presenta en la **Figura 13b**, donde cada eje representa los niveles de un factor.

Tabla 7: Matriz de experimentos para un diseño factorial completo del tipo 2^k .

	X1	X2
1	+	-
2	+	+
3	-	-
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.

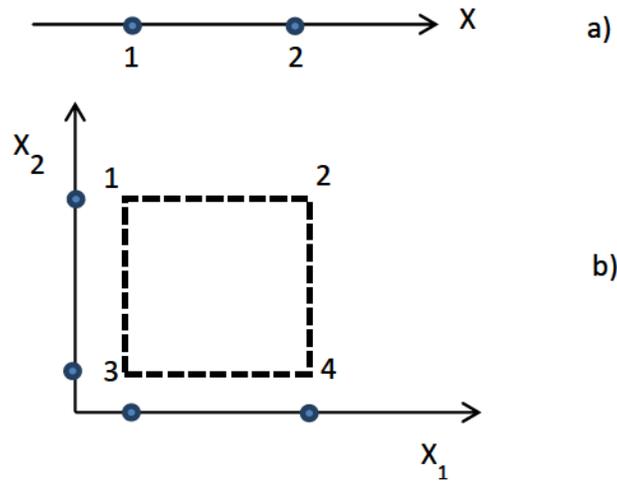


Figura 11: Mapeo del espacio multivariado. (a) Espacio unidimensional limitado por dos niveles del factor; (b) Espacio bidimensional limitado por los dos niveles de los dos factores.

Para obtener la máxima información deben tenerse algunos cuidados, como son la necesidad de hacer réplicas, es decir repeticiones de algunos ensayos para poder estimar el error experimental. Las $k+1$ réplicas deben ser repeticiones auténticas y todos los ensayos se deben realizar en forma aleatoria. El número de réplicas que un experimentador puede realizar está limitado frecuentemente por los recursos disponibles. Cuando se hace una repetición individual de un diseño 2^k , se tiene lo que se conoce como *diseño factorial no replicado*. Con sólo una réplica no hay estimación de error. Una aproximación al análisis de un diseño factorial no replicado consiste en suponer que ciertas interacciones de orden superior son despreciables, y combinar sus cuadrados medios para estimar el error. Para determinar si los efectos calculados son significativos se puede utilizar el ANOVA, calculando las sumas de cuadrados a partir de los efectos estimados. Se comparan luego los cuadrados medios con el cuadrado medio del error (residual). El análisis de la significancia de los efectos también se puede hacer utilizando un programa de diseño experimental.

5.4 Diseños de optimización

5.4.1. Diseños factoriales secuenciales

La optimización secuencial está basada en un diseño inicial de experimentos con sus respectivas mediciones y resultados, a raíz de los cuales se diseña otra serie de experiencias hasta encontrar en forma ascendente o descendente el punto óptimo.

Método Univariado

Este método de optimización, clasificado como un método secuencial, es también conocido como método del factor único o de estrategia de un factor por vez (*en inglés, one variable at a time, OVAT*). En este método, se fijan a un cierto nivel todos los factores que están siendo investigados, menos uno de ellos. Entonces este último es variado hasta que se encuentre la mejor respuesta. Después de esto este factor se fija y un nuevo factor sufre variación. Este proceso se repite hasta que todos los factores hayan sido adecuados para dar la mejor respuesta. Dado que un ciclo de variaciones no es suficiente para definir el óptimo con precisión, se deben efectuar tantos ciclos como sean necesarios hasta observar que no ocurre mejora en el resultado de la optimización. Este tipo de procedimiento es probablemente el método de optimización más comúnmente usado en química, sin embargo no asegura que la región óptima pueda ser localizada (*se considera como una mala práctica de optimización*). Este método presenta el inconveniente de que cuanto mayor sea la interacción entre las variables, mayor será la probabilidad de localización de un falso óptimo. Por otra parte, la localización del óptimo real depende de los valores iniciales escogidos para las variables a ser optimizadas.

5.4.2. Diseños factoriales simultáneos

En la optimización simultánea, la relación entre la respuesta y los factores se estudia llevando a cabo un diseño experimental, construyendo un modelo matemático e investigando la relación mediante un método de superficie de respuesta (*RMS, del inglés Responce Surface Method*). La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas muy utilizada para modelar y analizar problemas en los cuales una respuesta de interés es influenciada por varias variables, siendo el objetivo optimizar esa respuesta. La relación entre la respuesta y los efectos de los factores puede estar basada en modelos físicos, fisicoquímicos o en modelos empíricos tales como polinomios o ecuaciones de segundo orden. Estos modelos matemáticos pueden ser capaces de describir una superficie de respuesta lineal o curvilínea.

Si se tienen dos factores x_1 y x_2 , la respuesta y se relaciona con los factores de la siguiente manera:

$$y = f(x_1, x_2) + \varepsilon \quad (7)$$

donde ε representa el ruido o error observado en la respuesta y . Si la respuesta esperada se denota por $f(x_1, x_2) = \eta$, entonces la superficie de respuesta queda representada por la siguiente ecuación:

$$\eta = f(x_1, x_2) \quad (\text{¡Error! Marcador no definido.})$$

Como puede observarse en la **Figura 12**, la superficie de respuesta se representa como una superficie sólida en un espacio tridimensional y para visualizar mejor la forma de una superficie de respuesta se grafican los contornos de dicha superficie.

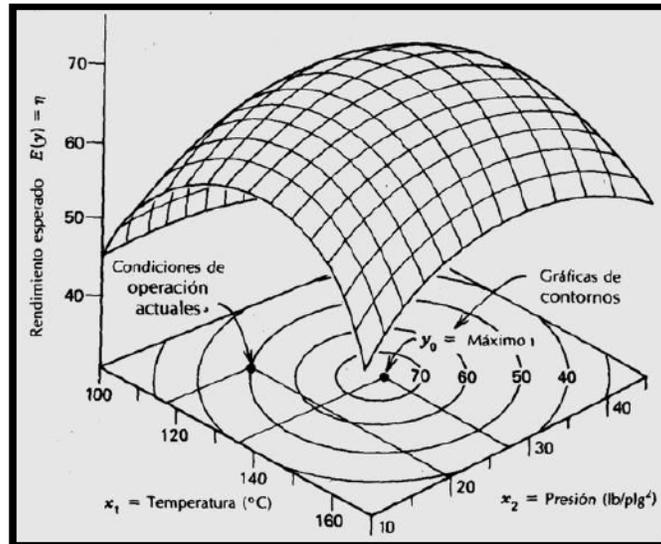


Figura 12: Superficie de respuesta tridimensional y su gráfica de contorno.

Esta gráfica de contorno se compone de líneas de respuesta constante, que corresponden a una altura específica de la superficie de respuesta. Generalmente la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce, por ello el primer paso en un método de superficie de respuesta es determinar una aproximación a la relación real entre la respuesta y el conjunto de variables independientes. Por lo general, se usa un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes. Si la respuesta se describe por una función lineal de las variables independientes, la función de aproximación es el modelo de primer orden y queda representada por:

$$\eta = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \quad (9)$$

Cuando existe curvatura en el sistema debe usarse un polinomio de mayor grado, por ejemplo un modelo de segundo orden. Para el caso de dos factores, el diseño conduce a la estimación de los coeficientes β_i a través de la siguiente ecuación:

$$y = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{11} x_1^2 + b_{22} x_2^2 + b_{12} x_1 x_2 \quad (10)$$

La precisión de los coeficientes b_i para estimar los β_i depende del diseño experimental y cuando estos coeficientes se obtienen por regresión múltiple, se pueden usar para predecir la respuesta y como una función de los factores x y construir superficies de respuesta y gráficas de contorno. El último término representa la interacción entre los factores.

Para determinar los niveles de los k factores que optimizan la respuesta, se deberá calcular el conjunto x_1, x_2, \dots, x_k tal que sus derivadas parciales sean cero. Dicho punto se denomina *punto estacionario* y podría representar un punto de respuesta máxima, un punto de respuesta mínima o un punto silla. Puede ocurrir que el modelo polinomial sea una aproximación razonable de la relación funcional real en regiones relativamente pequeñas del dominio de las variables independientes pero, probablemente, no en todo el dominio.

El método de cuadrados mínimos sirve para estimar los parámetros del polinomio de aproximación y el análisis de la superficie de respuesta se hace luego en términos de superficie ajustada. El ajuste y el análisis de superficie de respuesta se facilitan con la elección adecuada de un diseño experimental, siendo las características deseables para el mismo las siguientes [151]:

- 1) Proporcionar una distribución razonable de puntos de datos (y por lo tanto información) en toda la región de interés.
- 2) Permitir investigar la idoneidad del modelo, incluyendo la falta de ajuste.
- 3) Permitir la realización de experimentos en bloques.
- 4) Permitir la construcción secuencial de diseños de orden superior.
- 5) Proporcionar una estimación de error interna.
- 6) No requerir un número grande de ensayos.
- 7) No requerir demasiados niveles de las variables independientes.
- 8) Asegurar la simplicidad de los cálculos de los parámetros del modelo.

En química analítica, la relación entre la respuesta y los efectos de los factores se puede plantear mediante modelos empíricos generales de segundo orden y los diseños experimentales que se pueden usar para ajustar un modelo de segundo orden deben tener por lo menos tres niveles de cada factor. La *rotabilidad* es una propiedad muy importante de los diseños experimentales que se usa para ajustar superficies de respuesta. Se dice 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 desde el centro del diseño y no es una función de la dirección. Los diseños experimentales que se podrían utilizar para ajustar un modelo de segundo orden son el "*diseño central compuesto*" (DCC) y la "*red uniforme de Doehlert*". Estos modelos permiten derivar ecuaciones del tipo de la **ecuación 10** 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. A continuación se examina en detalle el DCC, en vista que fue el diseño empleado en esta tesis.

5.5 Diseño central compuesto (DCC)

El diseño central compuesto (DCC) es probablemente, el diseño experimental más utilizado para ajustar superficies de respuesta de segundo orden. Este diseño consiste en un diseño factorial completo (o factorial fraccionado) 2^k , aumentado por $2k$ puntos axiales y n_o puntos centrales. Es decir que este diseño en general consiste de tres partes:

- ✓ Un diseño factorial completo a dos niveles, que constituye la parte cúbica del diseño y donde el número de puntos o experimentos está dado por $n_c = 2^k$ con niveles -1 y $+1$. En **Tablas 8 y 9** se muestra en los primeros cuatro experimentos (renglones 1-4) el diseño para 2 y 3 factores, respectivamente. Corresponde a los 8 puntos del cubo de Figura 13 (a la izquierda).

- ✓ Un diseño “estrella”, que permite agregar más niveles y describir curvatura, adicionando puntos que se describen como una estrella y que están situados a una distancia α desde el centro del diseño. El número de puntos o experimentos está dado por $n_s = 2k$ y $\alpha = (n_s)^{1/4}$. Los niveles son $-\alpha$ y $+\alpha$. Los renglones 5 a 8 y 9-14 de las **Tablas 8 y 9**, son los “puntos estrella”. Están situados a una distancia α (en el ejemplo, 1,404 y 1,682, respectivamente) del centro del diseño. Corresponde a los 6 puntos alejados del cubo de **Figura 13** (a la izquierda).
- ✓ Puntos centrales con todos los niveles iguales a cero, del que generalmente se realizan varios replicados. El número de experimentos es n_o . Estas réplicas del punto central permiten tener una idea inmediata del error experimental y si se elige un valor adecuado de n_o , se puede alcanzar la ortogonalidad. Corresponde al punto del centro del cubo de **Figura 13** (a la izquierda).

De acuerdo a lo previamente dicho, se puede ver que cada factor se encuentra en cinco niveles posibles: $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ y que el número total de experimentos a realizar es:

$$N_T = n_c + n_s + n_o \quad (11)$$

En general hay, por lo tanto:

- a) $n_c = 2^k$ puntos “vértice” del cubo con niveles -1 y $+1$.
- b) $n_s = 2k$ puntos “estrella” o axiales con niveles α y $-\alpha$.
- c) $n_o =$ puntos centrales todos con niveles igual a 0 .

Como se ve en la **Figura 13** (derecha), el diseño central compuesto para dos factores ($k=2$) implica la realización de $[2^k$ “puntos factoriales” + $2k$ puntos “estrella” + *al menos* 1 punto central = *al menos* **nueve experimentos**, si el punto

central es un único replicado; y para tres factores (izquierda) el número total de experimentos es igual a **quince**. Este diseño permite optimizar la economía de los experimentos, ya que se trabaja con un número significativamente menor a los utilizados en los diseños factoriales.

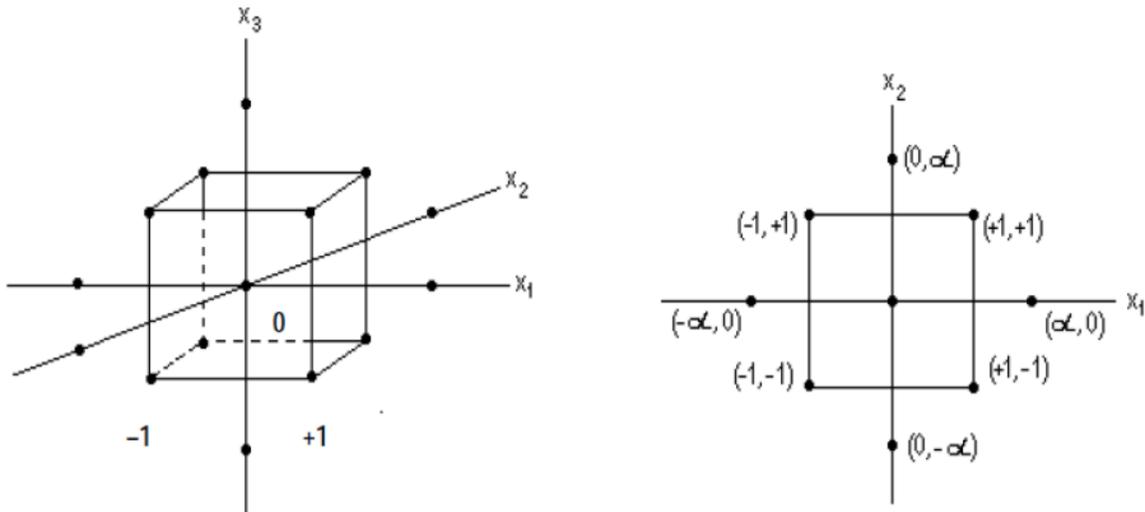


Figura 13: Diseños central compuesto para dos factores (a la derecha), donde los puntos situados a una distancia α del centro conforman una estrella y para tres factores (a la izquierda), donde los niveles están indicados sólo para x_1

TABLA 8: 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 9: 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
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

Es decir que 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 $16 n_c + 8 n_c + (\text{al menos } 1) n_0 = (\text{al menos}) 25$ experimentos, comparado con $3^4 = 81$ experimentos de un un diseño factorial completo de 3 niveles $(-1, 0, +1)$ con 4 factores (3-DFC). En las **Tablas 9 y 10**, 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.

CAPÍTULO 6: “VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO”

6.1 Concepto de validación

Cuando se desarrolla un nuevo método analítico, se debe demostrar que el mismo proporciona resultados fiables y adecuados para la finalidad o propósito perseguido (ISO/IEC 17025), ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos resultados proporcionan. Validar un método analítico consiste en verificar y documentar su validez, esto es, su adecuación a determinados requisitos, previamente establecidos, para poder resolver un problema analítico en particular.

La *validación* puede definirse como un proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que un método analítico determinado posee unas características de funcionamiento adecuadas a la aplicación que se le quiere dar [153].

Se pueden distinguir dos tipos diferentes de validación: la *validación interna o intra-laboratorio* y la *validación externa o inter-laboratorios*. La validación interna es la que se circunscribe al ámbito de un único laboratorio. La validación externa implica la realización de los llamados ejercicios colaborativos [148]. Es la manera más apropiada de evaluar un método analítico y permite comprobar la idoneidad de una nueva metodología o de un método recientemente modificado. En este tipo de ejercicios, participan laboratorios que han debido demostrar su competencia, analizando una misma muestra concreta, siguiendo tan fielmente como sea posible el procedimiento analítico propuesto.

Al validar un método analítico se deben tener en cuenta tres aspectos importantes [148]:

- Validación del proceso analítico en su conjunto, incluyendo las etapas de tratamiento de la muestra (disolución, extracción, pre-concentración), previas a la medida analítica.
- Validación en todo el intervalo de concentraciones en que se va a aplicar.
- Validación del método utilizando un juego representativo de las diferentes matrices que se van a analizar.

Diversos organismos internacionales tales como la AOAC (Association of Official Analytical Chemists), la USP (United States Pharmacopea) la FDA (Food and Drug Administration) y la ICH (Tripartite International Conference on Harmonization) tienen por objeto la elaboración y difusión de métodos analíticos de referencia para distintos campos de actividad y ofrecen criterios para la validación de métodos. En la práctica, los protocolos de validación se diseñan teniendo en cuenta el origen, el ámbito de aplicación y el tipo de método.

6.2 Parámetros de calidad de un método analítico

Los parámetros de calidad que con mayor frecuencia se utilizan para la caracterización de los métodos analíticos y se evalúan en los procedimientos de validación son los siguientes:

<i>Precisión</i>	<i>Límite de cuantificación</i>
<i>Exactitud</i>	<i>Selectividad</i>
<i>Linealidad</i>	<i>Rango</i>
<i>Límite de detección</i>	<i>Sensibilidad</i>
<i>Robustez</i>	

Estos criterios se denominan “estadísticos” porque la verificación de los mismos en procedimientos de ensayo, constituye una aplicación importante de la Estadística descriptiva y de la Inferencia estadística y aparecen también en la bibliografía como características de funcionamiento (en inglés, *performance characteristics*) o cifras de mérito (en inglés, *figures of merit*). Sin embargo, dos parámetros adicionales *no estadísticos* que caracterizan la performance de un método analítico son el *factor de enriquecimiento* (*enrichment factor*, EF, o *factor de pre concentración*) y el *factor de recuperación* o *recuperación porcentual* (R%).

6.2.1 Precisión

Es una medida del tamaño del error aleatorio y desde el punto de vista estadístico mide la dispersión de los resultados alrededor de la media, sin considerar si esta última es una representación correcta del valor verdadero [148] Según la IUPAC[154] la precisión se define como el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en condiciones bien definidas. Dado que el número de factores que pueden afectar a la precisión de los resultados es elevada, al evaluar la precisión de un método analítico es conveniente distinguir entre condiciones de mínima variación y condiciones de máxima variación. De esta manera, se pueden distinguir dos tipos extremos de precisión: *repetitividad* y *reproducibilidad*. La *repetitividad* es la precisión obtenida cuando las medidas se llevan a cabo en las mejores condiciones posibles (mismo laboratorio, mismo analista, mismos reactivos, mismos equipos y en un intervalo corto de tiempo) y la *reproducibilidad* es la precisión obtenida cuando las medidas se llevan a cabo en las condiciones más adversas posibles (diferentes laboratorios, diferentes analistas, diferentes reactivos, diferentes equipos).

Existen situaciones intermedias, en donde las mediciones se realizan dentro del mismo laboratorio, pero variando alguno de los factores antes mencionados (operador, equipo, reactivos, tiempo). En este caso la precisión obtenida se

denomina *precisión intermedia*. Para evaluar la repetitividad de un método analítico se pueden realizar de seis a ocho determinaciones replicadas, dentro de una misma corrida y por el mismo analista. El resultado se puede expresar como la desviación estándar, σ , estimada analíticamente por la *desviación estándar (SD)* o *desviación estándar relativa porcentual (%RSD)*, también denominado *coeficiente de variación porcentual (%CV)* de acuerdo a las ecuaciones 12 a 14.

$$SD = \sqrt{\sum \frac{(Y_i - \bar{Y}_i)^2}{N-1}} \quad (12)$$

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

$$RSD = \frac{SD}{\bar{Y}_i} \quad (13)$$

$$\%RSD = RSD \cdot 100 \quad (14)$$

Por otra parte, es importante tener en cuenta que todos los pasos del procedimiento deben ser replicados y si el blanco es una posible fuente de variación importante, también debe ser replicado. De este modo, el resultado considera las fuentes de variancia asociadas a todas las etapas del método. En ciertos casos puede resultar conveniente medir separadamente la repetitividad de un paso determinado del procedimiento, por ejemplo, de la inyección en las determinaciones cromatográficas. Se debe distinguir entre *precisión de un método* y *precisión instrumental*. Para el primer caso es necesario repetir todo el procedimiento, mientras que para el segundo se realizan mediciones replicadas. En el citado ejemplo, varias inyecciones de una solución estándar.

Otro aspecto que se debe considerar, es que la *precisión habitualmente depende de la concentración del analito*. Cuando el intervalo de concentraciones es amplio, con frecuencia se observa un fenómeno de *heterocedasticidad*, donde la desviación estándar aumenta con la concentración y el coeficiente de variación decrece y se estabiliza para altas concentraciones. Por esta razón se recomienda trabajar en *tres niveles* diferentes de concentración, los que deben incluir los límites *superior e inferior del rango lineal*.

Los requerimientos de precisión dependen de la aplicación del método analítico. Para ciertas áreas específicas, tales como análisis clínicos, métodos bioanalíticos y análisis farmacéutico, se han establecido criterios de aceptabilidad. Según Swartz en el 2003 para el caso de los métodos bioanalíticos, es decir para los métodos que se usan para cuantificar drogas y sus metabolitos en una matriz biológica compleja, como sangre, suero, plasma u orina, se acepta un CV de hasta un 15 % y de hasta un 20 % para el límite de cuantificación [155,156]. Por otra parte, en análisis farmacéutico para la determinación de componentes mayoritarios por métodos cromatográficos, se acepta un CV de hasta un 1% para la precisión instrumental y un coeficiente de variación de hasta un 2% para la repetitividad. Si se trata de componentes minoritarios, tales como impurezas, se acepta un coeficiente de variación de hasta un 5% para la precisión instrumental y de hasta un 10% para la reproducibilidad [157]. También existen tablas donde se establecen coeficientes de variación máximos aceptables para un método analítico, en función del porcentaje del analito en la muestra, según las teorías de Kolthoff y Hortwitz [158]

6.2.2 Exactitud

Los *errores sistemáticos* están caracterizados por términos tales como *veracidad* y *sesgo* (en inglés, *bias*) y están relacionados con el término *exactitud*. No existe

acuerdo en la comunidad científica internacional acerca de la definición de estos términos. Según ISO (1993), la *veracidad* es el grado de concordancia entre el valor medio de una serie importante de resultados y un valor aceptado como de referencia y la medición de la veracidad se expresa como *sesgo o bias*. Es decir que veracidad es el concepto y el sesgo o bias la forma de medirla. Un resultado es veraz, si está libre de error sistemático (o más rigurosamente, si los errores sistemáticos cometidos son aceptables). En la práctica la veracidad se verifica utilizando referencias. Por lo tanto decir que un resultado es veraz, es equivalente a afirmar que es trazable a la referencia utilizada.

Por otra parte, según ISO la *exactitud*, es el grado de concordancia entre el resultado de un ensayo y un valor de referencia aceptado. De acuerdo a este concepto, el término exactitud describe una combinación de componentes de error aleatorio y sistemático. Pudiéndose afirmar entonces que la exactitud es la suma de dos conceptos, como son la veracidad y la precisión y que *un resultado es exacto si es veraz (se encuentra libre de errores sistemáticos) y preciso (los errores aleatorios son aceptables)*.

La estimación del *sesgo o bias*, depende de la extensión del rango de concentraciones del analito en la muestra, de la disponibilidad de un blanco de matriz (matriz a ser analizada sin el analito a determinar), de la posibilidad de adicionar analito a un material de este tipo de manera representativa y de la disponibilidad de materiales de referencia y métodos analíticos adecuados para la comparación de resultados.

Es importante señalar, que los errores sistemáticos pueden ser *constantes* (absolutos) o *proporcionales* (relativos) [148] El *error constante* se expresa en unidades de concentración y es un error sistemático independiente de la concentración del analito. Las principales fuentes de este tipo de error son la selectividad insuficiente (presencia de otros componentes que también producen

una respuesta) y la utilización de blancos inadecuados. Por otro lado, el error proporcional depende de la concentración del analito y puede expresarse en unidades relativas, tales como porcentaje. Este tipo de error es causado fundamentalmente por la existencia del efecto matriz, es decir por el cambio de la pendiente de la curva de calibrado (alteración de la sensibilidad), producida por la matriz de la muestra. Además, la presunción incorrecta de linealidad sobre todo el rango de análisis, también puede causar este tipo de error relacionado a la concentración a determinar.

6.2.3 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 espuria o la limitación asociada al uso de una banda de longitudes de onda con ancho finito al realizar la detección UV [159]. 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 *recta de calibración*. En cromatografía se prefiere graficar el área de pico, en lugar de la altura, como función de la masa o concentración de patrón inyectada [160] ya que el área es menos dependiente de variaciones experimentales como temperatura, volumen

inyectado o caudal. 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. 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 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 [148]. La prueba F para falta de ajuste consiste en 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. 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.

Una vez que se ha establecido el intervalo de concentraciones en el que se va a trabajar, se preparan los patrones de calibración. Como mínimo se deberían preparar cinco patrones con concentraciones igualmente espaciadas y se debe procesar además un blanco. Posteriormente, se miden las respuestas analíticas por triplicado. También se mide por triplicado la respuesta analítica del blanco (valor cero de concentración). En ciertos métodos, como los cromatográficos con detectores de señal relativa, como lo son el UV-vis, la medición del blanco la hace el detector y la señal queda automáticamente corregida. Luego se hace un análisis de los datos de calibración obtenidos, adoptando una técnica de regresión por cuadrados mínimos ordinarios, que asume que la variable independiente (x , *concentración nominal de los patrones*) no está sujeta a error y que la variable

dependiente (*y*, *respuesta analítica de los patrones*) es homocedástica. En este trabajo de Tesis, se realizó un ajuste con un modelo de primer orden entre las áreas de pico (Y_i) por medio de un análisis de regresión por cuadrados mínimos no ponderados (Unweighted Least-Squares Regression, ULSR). Las ecuaciones utilizadas se muestran en **Tabla 10**

Tabla 10: Ecuaciones utilizadas en el análisis de regresión por cuadrados mínimos no ponderados (Unweighted Least-Square Regression, ULSR).

$\hat{Y} = b_0 + b_1 X_i$	(10a)	$\bar{X} = \frac{\sum X_{ij}}{N}$	(10b)
$Y = \frac{\sum Y_{ij}}{N}$	(10c)	$S_{XX} = \sum (X_{ij} - \bar{X})^2$	(10d)
$b_1 = \frac{\sum Y_{ij}(X_{ij} - \bar{X})}{S_{XX}}$	(10e)	$b_0 = \bar{Y} - b_1 \bar{X}$	(10f)
$s^2(b_1) = \frac{s_e^2}{S_{XX}}$	(10g)	$s^2(b_0) = \frac{s_e^2 \sum X_{ij}^2}{S_{XX} N}$	(10h)
$s_e^2 = \frac{\sum (Y_{ij} - \hat{Y})^2}{(N - 2)}$	(10i)	$Y_i = \hat{Y}_i \pm t_{(1-\alpha, \phi)} s_e \left[1 + \frac{1}{N} + \frac{(X_i - \bar{X})^2}{S_{XX}} \right]$	(10j)

6.2.4 Límite de Detección (LOD)

Es la mínima concentración detectable de manera confiable por el método, es decir es la mínima concentración de analito que proporciona una señal significativamente diferente de la media de las señales del blanco [148]. El límite de detección se calcula mediante una prueba de hipótesis estadística, donde se fija

una concentración llamada nivel crítico (L_C) a partir de donde se toma la decisión de aceptar o rechazar la presencia del analito, con un error suficientemente pequeño. Para concentraciones superiores al L_C , existe una probabilidad α de cometer un **error de tipo I** o falso positivo, es decir de aceptar erróneamente la hipótesis alternativa, admitiendo que el analito está presente cuando en realidad está ausente. Si se toma α igual a 0.05, una concentración superior al L_C tendrá un 5 % de probabilidad de constituir un falso positivo y la distancia desde L_C y el cero de la escala vale $t_{\alpha, \nu} S_0$, donde S_0 es la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra blanco [147].

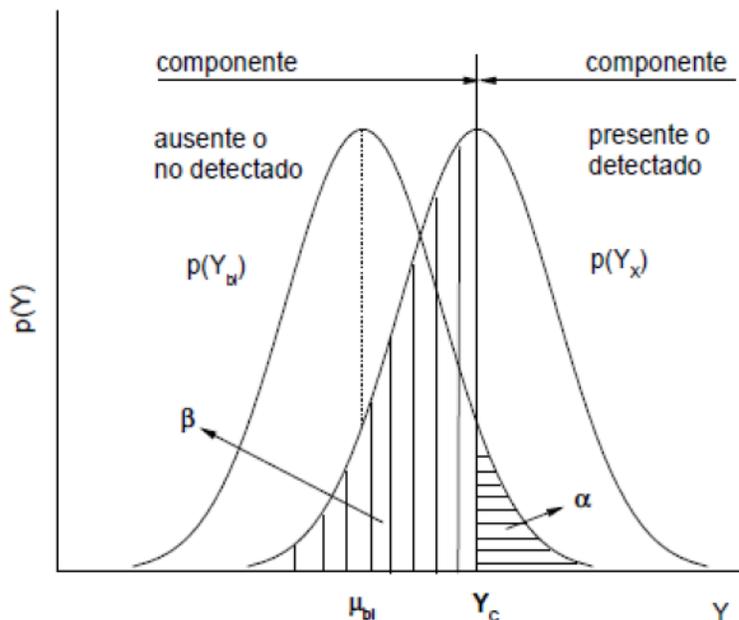


Figura 14: Distribución de respuestas correspondientes al límite de decisión, L_C .

También existe una probabilidad β de cometer un **error de tipo II** o falso negativo, es decir de aceptar erróneamente la hipótesis nula, admitiendo que el analito está ausente cuando en realidad está presente. En la **Figura 14** se muestran las distribuciones estadísticas para el blanco y para una muestra donde el límite de decisión, L_C , es tan bajo (o el ruido del blanco tan alto) que cometeríamos un error

de tipo II (β) y por lo tanto existe una probabilidad del 50% ($\beta = 0,5$) de decir que el analito no está presente, cuando en realidad está en la muestra. Por lo tanto, no podemos tomar a L_C como el LOD. Si, en cambio, tomamos β igual a 0.05, la probabilidad de tener un falso negativo será sólo del 5 % (**Figura 15**) y la distancia entre el L_C y la concentración por encima correspondiente a este valor de β , se puede considerar que vale $t_{\beta,v} s_0$. De este modo, se puede calcular el LOD [161]:

$$LOD = 2 t_{0.05, m-2} S_0. \quad (15)$$

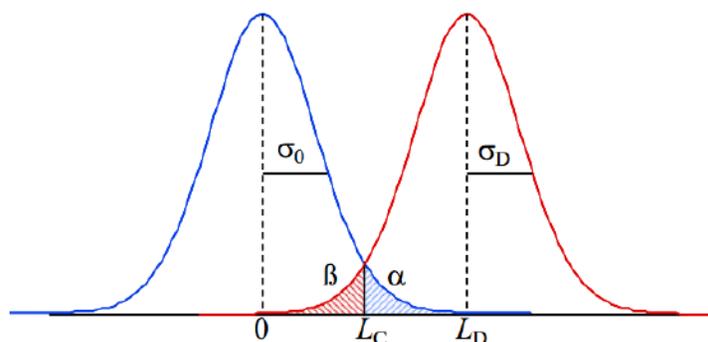


Figura 15: Límite de decisión (L_C) y de detección (L_D) para $\alpha = \beta = 0,5$ (pequeños)

En la práctica, dado que m es un número relativamente grande, el valor de $2 t_{0.05, m-2}$ tiende a 3.3, por lo que la ecuación que puede usarse para el cálculo de LOD es:

$$LOD = 3.3 s_0 \quad (16)$$

Para estimar S_0 se utiliza la ecuación que permite calcular la desviación estándar de la concentración predicha para una muestra incógnita, $S_{(X_{inc})}$, preferentemente diluida y lo más cercana posible al LOD , a partir de la recta de calibrado:

$$S(x_{inc}) = \frac{S_{Y/X}}{b} A = \pi r^2 \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(x_{inc} - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^m (x_i - \bar{x})^2}} \quad (17)$$

Donde b es la pendiente de la recta de calibración que se calcula de acuerdo a la ec. 10e de la **tabla 10** y $s_{x/y}$ (m es el número de réplicas de cada nivel y n el número de niveles).

6.2.5 Límite de cuantificación (LOQ)

Es la mínima concentración cuantificable en forma confiable. En otras palabras el LOQ es la concentración que puede determinarse con una desviación estándar relativa (*RSD*) máxima especificada y exactitud adecuada.

El nivel que se toma convencionalmente como la máxima desviación estándar relativa es del 10 %, por lo tanto el límite de cuantificación es la concentración correspondiente a 10 veces la desviación estándar del blanco (en unidades de concentración):

$$\text{LOQ} = 10 s_0 \quad (18)$$

Otra alternativa para la estimación del LOD y LOQ, ampliamente utilizada en la literatura, es el método basado en la relación señal/ruido (S/R). Este método es el más conocido y todavía se utiliza ampliamente en el análisis cromatográfico. Surgió a partir de la experiencia y sentido común de los químicos analíticos, pero carece de cualquier fundamento estadístico formal.

En la **Figura 16** se muestra la metodología de cálculo. 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. 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 [155].

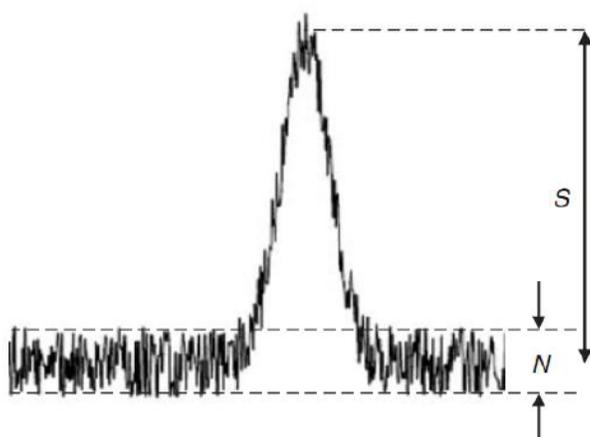


Figura 16: Medida de la altura del ruido y la altura de un pico cromatográfico cercano a su límite de detección.

6.2.6 Selectividad, especificidad e interferencia

No existe un acuerdo universal acerca del significado de los términos *selectividad*, *especificidad* e *interferencia*. La ICH habla de especificidad y la define como la habilidad para evaluar en forma inequívoca al analito en presencia de otros componentes que podría esperarse que estén presentes. La guía EURACHEM dice que la selectividad y la especificidad aseguran la confiabilidad de la medición del analito en presencia de interferencias y que la especificidad se considera generalmente como el 100 % de la selectividad [160]. Es decir que la selectividad extrema o perfecta, en el sentido de que únicamente el analito es el responsable de la señal medida, se denomina *especificidad*. Algunos autores consideran que no es conveniente usar el término especificidad para la caracterización de los

procedimientos de análisis cuantitativos, dado que este término se usa en el contexto del análisis cualitativo [148]. Un método es considerado *selectivo*, cuando es posible demostrar que las otras especies presentes no tienen respuesta por sí mismas. Para esto, habría que hacer una lista de los posibles interferentes y probar experimentalmente que dichas sustancias no tienen efecto sobre los resultados.

Por otra parte, una *sustancia interferente* o *interferencia* de un procedimiento analítico, es aquella que, a una concentración dada, causa un error sistemático en el resultado. Las interferencias relacionadas con la *selectividad* causan un error sistemático constante, en cambio las relacionadas con el llamado *efecto matriz*, causan un error sistemático proporcional. Estas interferencias pueden aumentar o deprimir la señal obtenida. En un método cromatográfico, el pico del posible interferente se puede separar, en principio, completamente del pico del analito. Por ejemplo, en el análisis farmacéutico, los excipientes, los productos intermedios de síntesis, los productos de degradación y las impurezas propias del proceso de obtención o elaboración del producto son posibles interferentes.

6.2.7 Sensibilidad

La *sensibilidad* da una indicación de cuanto cambia la señal con la concentración [148]. Según la IUPAC [154], en metrología y en química analítica, la sensibilidad se define como la pendiente de la recta de calibrado, porque un método con una pendiente importante es mejor para discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito. Esta sensibilidad se denomina *sensibilidad de calibración* ($SEN = b$), sus unidades son: $\text{señal} \cdot \text{concentración}^{-1}$ e indica la variación de la respuesta producida por una unidad de variación de concentración del analito.

No tiene mucho sentido incluir la sensibilidad como parámetro para caracterizar un método analítico, cuando se la define de esta manera. No es suficiente conocer la pendiente de la recta de calibrado, para determinar cuándo

dos concentraciones podrán discriminarse, sino que es necesario conocer además la desviación estándar de la señal.

Por otra parte, la sensibilidad de calibración no es adecuada para comparar dos métodos analíticos, cuando estos están basados en respuestas de diferente naturaleza (por ejemplo: absorbancia y fluorescencia, absorbancia y medidas electroquímicas, etc). En este caso se prefiere usar la llamada *sensibilidad analítica*(γ), definida por la relación entre la sensibilidad y el ruido instrumental:

$$\gamma = \text{SEN} / S_Y \quad (18)$$

La inversa de la sensibilidad analítica (γ^{-1}), se puede definir como la mínima diferencia de concentración estadísticamente discernible en cualquier punto de la recta de calibrado.

6.2.8 Robustez

Según la ICH, la robustez es la capacidad de un método analítico para que los resultados no se vean afectados por variaciones deliberadas en los parámetros del procedimiento, es decir es la *resistencia al cambio de respuesta ante pequeñas variaciones en las condiciones experimentales de trabajo* (por ejemplo: pH del medio, fuerza iónica, temperatura, concentración de algunos reactivos, composición de la fase móvil en cromatografía de líquidos, caudal de la fase móvil, etc). En las pruebas de robustez se introducen deliberadamente pequeños cambios en las variables que puede esperarse que razonablemente ocurran durante el empleo del método. Se observan los resultados, estudiando estadísticamente la influencia de las variables a los fines de determinar las que tienen un efecto más importante sobre la respuesta (puntos débiles experimentales, factores críticos) y sus intervalos de valores tolerables (rangos de trabajo de las variables).

Un estudio de robustez se debe planificar mediante un diseño experimental, donde la función objetivo o respuesta a seguir es alguno de los parámetros de calidad antes mencionados [162]. Para cada variable se estudian dos valores (niveles extremos) situados alrededor del valor indicado en el procedimiento (nivel nominal). Estos valores extremos se fijan a una distancia del valor nominal, de manera que la diferencia sea la que razonablemente se puede producir en la práctica (por ejemplo un $\Delta\text{pH} = 0,05$) y tratando de asegurar que se mida el máximo efecto posible. Dado que para cada variable se estudian dos niveles y para no tener que realizar muchas experiencias, generalmente se usan diseños experimentales de screening, tales como los factoriales fraccionados o los diseños Plackett Burman. Cuando se sospecha que los efectos son asimétricos, se deben utilizar diseños experimentales más complejos.

6.3 Factor de enriquecimiento (o preconcentración) y recuperación.

La *recuperación porcentual*, R%, caracteriza a un método analítico que involucra etapas de preparación de muestra, como filtrado o extracción, que puedan conducir a pérdidas en la cantidad de analito presente en la matriz. Por otra parte, el factor de enriquecimiento, EF, se emplea cuando el analito presente en la matriz es extraído no sólo para aislarlo de los interferentes, sino para preconcentrarlo a fin de posibilitar o maximizar la detección y así disminuir el LOD y LOQ. Ni el R% ni el EF son parámetros estadísticos de validación pero si pueden ser considerados como “cifras de mérito” del método analítico, puesto que caracterizan dos cualidades adicionales del mismo.

En el caso de una extracción líquido/líquido como lo es la microextracción dispersiva (MEDLL), los EFs se definen como la relación entre la concentración de un compuesto en la fase orgánica extractante (solvente orgánico, líquido iónico) respecto de la concentración en la muestra acuosa inicial (ecuación 20).

$$EF = \frac{C_{IL}}{C_a} \quad (20)$$

donde C_{IL} es la concentración de analito en la fase del “líquido iónico” y C_a la concentración en fase acuosa. Obviamente, se busca un EF alto ya que dará una señal mayor en la detección.

La recuperación porcentual, $R\%$, se define como la cantidad de analito extraída (en moles o en masa) respecto de la cantidad inicial presente en la muestra (ecuación 21).

$$R\% = 100 \frac{C_{IL} V_{IL}}{C_a V_a} = 100 \cdot EF \cdot \phi \quad (21)$$

donde V_{IL} y V_a son los volúmenes de la fase orgánica (fase de líquido iónico), y de la fase acuosa, respectivamente y ϕ es la relación de fases.

La recuperación se calcula (generalmente por triplicado) determinando la concentración de analito en la muestra original y en la solución del extractante luego de la extracción o, en caso de matrices sin el analito presente (en caso que esto sea posible), se realiza un sobreagregado o sembrado (spiking) de una cantidad conocida del analito de interés a la muestra inicial. La muestra sobreagregada es sometida al proceso analítico completo y, finalmente, se determina cuánto analito se recuperó en la fase extractante. Como la concentración desconocida en la fase acuosa original o en la fase extractante se determina a través de rectas de calibración para calcular EF, y como la relación de fases es conocida, entonces el cálculo de $R\%$ es directo. Hay que aclarar que la hipótesis para el cálculo de $R\%$ es que el analito que se sobreagrega a la matriz se incorpora a esta de la misma manera que el analito original, es decir, que interacciona con el resto de los componentes de la matriz con la misma intensidad (si es que esas

interacciones exaltan o deprimen la señal). Para asegurarnos de esto, el analito sembrado, luego que está perfectamente solubilizado, se deja en contacto con la muestra durante un tiempo suficientemente largo a determinar empíricamente.

6.4 Estudio del efecto de matriz

El efecto matriz en química analítica se define, de acuerdo con la IUPAC, como *el efecto de todos los componentes de la muestra, diferentes al analito, en la señal analítica medida*. A la hora de aplicar un método analítico, el *efecto de matriz* se traduce en un cambio de la sensibilidad analítica cuando se prepara un calibrado en un disolvente respecto de uno preparado en la matriz 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, en una matriz idéntica pero sin analito o mediante el método de adiciones de estándar a la matriz real), indica la presencia de efecto matriz. Cabe destacar que el *efecto de matriz* es un efecto indeterminado de las especies que rodean a la muestra que afectan a la sensibilidad. Cuando el efecto de una especie es determinado (y aditivo) se habla de *interferencia*.

En el procedimiento para detectar la presencia de efecto matriz, el primer paso es preparar una serie de patrones en el disolvente mayoritario de la muestra (agua u otro solvente) y un calibrado en la propia matriz añadiendo cantidades conocidas de analito. Obviamente, se debe trabajar en la zona del rango lineal. Se obtienen las rectas de calibración y se comparan las pendientes de las mismas. Si existe una *diferencia estadísticamente significativa entre las pendientes*, habrá **efecto de matriz**, lo que implica que deberemos trabajar en una matriz simulada idéntica a la matriz real, lo cual no es fácil de conseguir, o bien, empleando una matriz idéntica

en caso de ser posible (como por ejemplo, plasma en pacientes que no han sido tratados con una determinada droga) o mediante adición patrón a la propia matriz que contiene el analito.

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

$$t = \frac{b_{11}-b_{12}}{\sqrt{S_{b11}^2 S_{b12}^2}} \quad (22)$$

Donde s_{b11} y s_{b12} son las desviaciones estándar de las pendientes que se comparan, las cuales se calculan de las ecuaciones 23 y 24 que corresponden a las varianzas.

$$S_{b11}^2 = \frac{S_{e1}^2}{\sum_{i=1}^n (x_{i1}-\bar{x}_1)^2} \quad (23)$$

$$S_{b12}^2 = \frac{S_{e2}^2}{\sum_{i=1}^{n_2} (x_{i2}-\bar{x}_2)^2} \quad (24)$$

con n_1 y n_2 que corresponde al número total de puntos en cada regresión lineal.

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

$$S_{ep}^2 = \frac{(n_1-2)S_{e1}^2 + (n_2-2)S_{e2}^2}{n_1+n_2-4} \quad (25)$$

Se calcula un valor de t a partir de la ecuación 26 y se compara con los valores de t tabulados, con $n_1 + n_2 - 4$ grados de libertad con una dada significancia, α . Si el t calculado es mayor al tabulado, el efecto de la matriz será mayor al esperado por un mero ruido instrumental o proveniente de cualquier otra fuente que alteren la pendiente de una manera "al azar" y entonces decimos que hay efectos de matriz significativos en la señal del analito.

$$t = \frac{b_{11} - b_{12}}{\sqrt{S_{ep}^2 \left(\frac{1}{\sum (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum (x_{i2} - \bar{x}_2)^2} \right)}} \quad (26)$$

Si las varianzas s_{e1}^2 y s_{e2}^2 son distintas, puede utilizarse una prueba similar a la de Cochran para la comparación de dos medias con varianzas desiguales. 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' :

$$t' = \frac{t_1 S_{b_{11}}^2 + t_2 S_{b_{12}}^2}{S_{b_{11}}^2 + S_{b_{12}}^2} \quad (27)$$

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 [148]

CAPÍTULO 7: “PARTE EXPERIMENTAL”

7.1 Reactivos, Disoluciones, Instrumentación y Muestras

Reactivos:

Los estándares de las AAHs 3-Amino-1,4-dimetil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol(**Trp-P-1**), 3-Amino-1-metil-5*H* pirido [4,3-*b*] indol (**Trp-P-2**), 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-*b*]piridina (**PhIP**), 2-amino-9*H*-pirido-[2,3-*b*] indol (**AαC**), 2-amino-3-metil-9*H*-pirido [2,3-*b*] indol (**MeAαC**) y 2-Amino-1,6-dimetilimidazo [4,5-*b*]piridina (**DMIP**) 2-amino-3-metilimidazo[4,5-*f*]quinolina(**IQ**), 2-amino-3,4dimetilimidazo [4,5-*f*] quinolina (**MeIQ**), 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-*f*]quinoxalina (**MeIQx**) y 3-amino-1-metil-5*H*-pirido[4,3-*b*]indol fueron adquiridos a Toronto Research Chemicals (North York, ON, Canada).

Se prepararon disoluciones patrón en metanol que contenían 0,1mg mL⁻¹ de IQ; y de MeIQ; 1mg mL⁻¹ de MeIQx; 0,02mg mL⁻¹ de Trp-P-1; 2mg mL⁻¹ de Trp-P-2; 0,8mg mL⁻¹ de PhIP; 2mg mL⁻¹ de AαC y 2mg mL⁻¹ de MeAαC. A partir de estas disoluciones se prepararon las disoluciones de trabajo por dilución con agua: metanol (70:30). Las disoluciones se conservaron protegidas de la luz y refrigeradas a 0°C.

El agua se purificó por medio de un sistema de purificación Milli-Q (Simplicity, Millipore, Massachusetts, USA). El metanol usado (J. T. Baker) fue grado HPLC. Los reactivos empleados fueron hexafluorofosfato de Sodio (NaPF₆) 98.0% (Aldrich), *n*-heptano (Merck), ácido clorhídrico, (Merck), ácido fosfórico (Merck), hidróxido de sodio (Analar, Poole, England). Como estándares en GC se emplearon ácido mirístico, ácido palmítico y ácido esteárico (Analabs, West Virginia, USA). Todos los reactivos fueron de grado analítico o superior. Las soluciones y las muestras se filtraron a través de membranas de 0,22-μm (Micron

Separations, Westborough, MA, USA) antes de ser inyectadas en la columna HPLC. El líquido iónico tetrafluorborato de 1-octyl-3-metilimidazolio, [OMIM][BF₄] fue suministrado por colegas del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas, UNLP quienes lo sintetizaron siguiendo un procedimiento adaptado de literatura que no requiere solvente orgánico, es rápido y sencillo [120]. En **Figura 17** se muestra el esquema de síntesis.

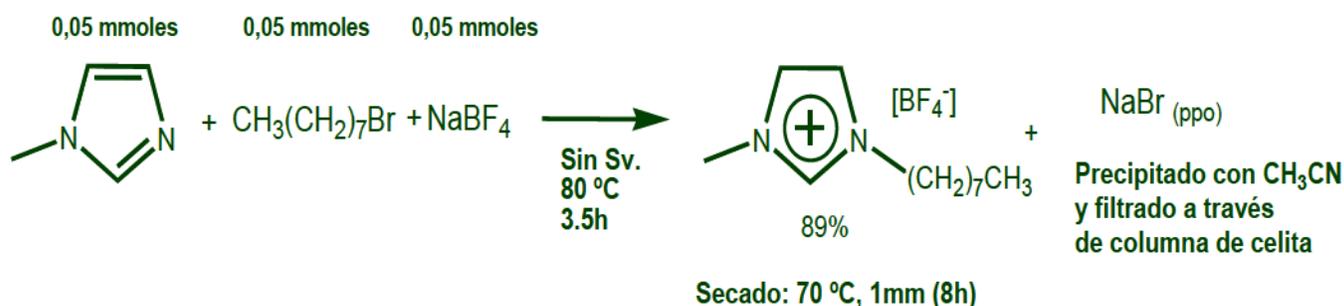


Figura 17: Síntesis del líquido iónico [OMIM] [BF₄].

Las fases móviles fueron filtradas a través de membranas de nylon de 0,45- μ m (Osmonics-Magna) para las fases orgánicas y filtros de nitrato de celulosa de 0,45- μ m (Micron Separations) para fases acuosas.

Instrumentación

Equipo HPLC: se empleó un cromatógrafo de líquidos Agilent 1100 equipado con desgasificador de vacío, bomba binaria, inyector automático, compartimiento de termostatación, detector de arreglo de diodos (DAD) y detector de fluorescencia (FLD) conectados en serie. Todos los módulos conectados a una Agilent Chemstation que permite operar y adquirir los datos.

Columna: se empleó una columna Zorbax SB-C18 de 25cm de longitud, 4,6cm de diámetro interno y partículas de 5µm conectada a una guarda-columna Zorbax SBC8 de 4,6mm de longitud y 12,5mm de diámetro interno y partículas de 5 µm.

Equipo de Microondas: Los experimentos se realizaron en un horno de microondas MARS-5 (CEM Corporation, Matthews, NC, EE.UU.) equipado con 24 celdas recubiertas de fluoropolímero y un microordenador programable que controla la potencia de la radiación, el tiempo y la temperatura en el interior de la celda a través de una sonda de infrarrojos. El equipo permite utilizar barras de agitación magnética en el interior de cada celda para mejorar el proceso de extracción. Tanto las barras agitadoras como trazas de agua en la muestra, permiten absorber la radiación, lo cual aumenta la temperatura de la celda, aunque se empleen solventes no polares o de baja constante dieléctrica en la etapa de extracción.

Homogeinizador: se utilizó una Minipimer Braun Multiquick 3Mr 320 de uso culinario para la molienda de la hamburguesa liofilizada.

Centrífuga y ultracentrífuga: se empleó una centrífuga Luguimac LC-20 (Luguimac S.R.L., Villa Lynch, Buenos Aires) y una ultracentrífuga Eppendorf 5417C/R con capacidad de operar hasta 4.200 rpm y 14.000 rpm, respectivamente. La primer centrífuga se usó para la separación del material proteico que fue precipitado con NaOH 0,5M, en tubos de polipropileno de fondo cónico de 15 ml. La segunda centrífuga se utilizó con micro-tubos de 1,5 ml Eppendorf de polipropileno para separar las fases después de la microextracción dispersiva.

Vortex: Se utilizó un agitador mecánico Vortex Genie 2T (Scientific Industries, USA) de intensidad regulable entre 600 y 3200rpm para disolver la gota de líquido iónico formada tras la dispersión que se obtiene en la microextracción.

Termómetro: Mediante un termómetro digital de perfil plano (Cole Parmer), se midió la temperatura que alcanza el horno doméstico donde se asaron las hamburguesas.

Cromatógrafo de gases: para los estudios de limpieza de los ácidos grasos presentes en las muestras de hamburguesa, se utilizó un cromatógrafo de gases HP 6890 con una columna capilar de cianopropilmetilfenilsiloxano como fase estacionaria (HP-225) de 30m x 530µm, espesor film 1µm detector FID y control electrónico de la neumática. La adquisición de datos se hizo mediante una placa conectada a una computadora personal con software Clarity® (DataApex, República Checa). El gas portador fue nitrógeno de grado cromatográfico. Se hicieron inyecciones en modo "split". La temperatura de la columna y la del inyector fue de 200 °C y la del detector 220°C. El volumen de inyección fue de 1 µl. Se utilizó metano como marcador del tiempo muerto.

Software empleado: para el tratamiento estadístico de los datos y los diseños experimentales se utilizó el paquete *Design Expert v. 8.0* para *Windows*.

7.2 Separación cromatográfica de las AAHs

Se realizaron ensayos iniciales en condiciones isocráticas con el fin de verificar si es posible separar a todas las aminos en este modo de cromatografía. Se realizaron ensayos a 40, 50, 60, 70, 80 y 100% de metanol en un rango de pH entre 2,5-3,5, pero las aminos Trp-P1 y Trp-P2 coeluyeron en todas las condiciones estudiadas. Por lo tanto, se ensayaron separaciones en gradiente en el mismo rango de pH (ver discusión en la Sección 8.1). Se estudiaron diferentes rampas entre 5 y 100% de metanol con diferentes tiempos de gradiente.

7.3 Toma de muestra:

Las muestras de hamburguesas de carne vacuna fueron adquiridas en supermercados locales. Se emplearon cuatro tipos de hamburguesas: 3 marcas comerciales y una adquirida en una carnicería local. En la **Tabla 11** se muestra el contenido nutricional declarado en la etiqueta de las 3 primeras. Para todas se utilizaron las siguientes formas de cocción a fin de comparar las metodologías y el impacto de la temperatura:

1. asadas en horno doméstico a temperaturas de 208, 253 y $\geq 300^{\circ}\text{C}$, durante 7 min de cada lado.
2. asadas a la parrilla, donde la temperatura máxima alcanzada fue de 133°C .

Posterior a la cocción se tomó la parte superficial de cada lado de la hamburguesa ya que es el área de mayor contacto directo con la superficie caliente (aproximadamente 3 mm de cada lado), se liofilizó y se reservó en freezer hasta su uso.

Tabla 11: Contenido de materia grasa, proteínas e hidratos de carbono de las diferentes hamburguesas comerciales estudiadas (g/55 g de muestra)

Tipo de hamburguesa	Materia Grasa	Proteínas	Hidratos de Carbono
"Patty Clásica"	11,00g	12,00g	0,5g
"Good Mark"	14,00g	15,00g	0
"Swift"	10,68g	9,24g	0

7.4 Acondicionamiento y limpieza de la muestra

Se emplearon dos procedimientos de limpieza del material graso y extracción de los analitos previos al análisis de la muestra: una limpieza en medio básico y una limpieza en horno de microondas.

7.4.1 Limpieza en medio básico

Se tomó una cantidad de la muestra liofilizada (correspondiente a la mitad de una hamburguesa) y se agregó 40 mL de NaOH. Se ensayaron dos concentraciones de base: 1M y 4M. Se agregó luego 10mL de etanol para precipitar las proteínas y solubilizar los lípidos, se centrifugó 6 minutos a 4200rpm, se solubilizó con éter de petróleo la materia grasa y se inyectó la fase acuosa.

7.4.2 Limpieza en horno de microondas

7.4.2.1 Ensayo de solubilidad de las AAHs en el solvente de limpieza:

En este caso se seleccionó *n*-heptano como solvente de limpieza. Antes de someter la muestra a la limpieza con el solvente orgánico en el horno de microondas, se realizó un ensayo de solubilidad de las AAHs en dicho solvente para no introducir una fuente de disminución de la recuperación. Para ello se tomaron diferentes volúmenes de las soluciones stock de las AAHs (correspondientes a cantidades entre 1 y 10 mg) y se adicionaron a 30 mL de *n*-heptano. La solución se colocó en las celdas del horno de microondas y se agregó un mini-buzo magnético. Se utilizaron diferentes temperaturas desde 50 hasta 110°C a fin de comprobar la resistencia de la muestra a la radiación y la solubilidad de las AAHs en el heptano. Si la potencia inicial seleccionada es muy alta, la velocidad de calentamiento para alcanzar la temperatura seleccionada es mayor. Sin embargo, una vez alcanzada la

temperatura deseada la potencia permanece en un valor constante para mantener dicha temperatura constante. Posteriormente se evaporó el *n*-heptano con nitrógeno gaseoso y se disolvieron las aminas en metanol, para luego inyectar una alícuota en la columna HPLC.

7.4.2.2 Limpieza del material lipídico:

Se empleó *n*-heptano como solvente de limpieza en el horno de microondas. Para verificar que todos los lípidos se extrajeran en el lavado, se seleccionaron como compuestos modelo para monitorear el proceso de limpieza tres ácidos grasos típicos que se encuentran mayoritariamente presentes en la carne: ácido palmítico, ácido esteárico y ácido mirístico [4]. Aunque el punto de ebullición del *n*-heptano es 90°C, las presiones dentro del recipiente de extracción son más altas ya que el mismo se encuentra herméticamente cerrado. En consecuencia, las temperaturas que se pueden alcanzar también serán mayores a las del punto de ebullición, lo cual podría favorecer el proceso de extracción. En el caso de que la presión en el interior de la celda MASE supere un determinado límite, se rompe la membrana de seguridad ubicada en la parte superior de la celda y el escape de vapor de solvente es detectado en el equipo lo cual interrumpe automáticamente el suministro de microondas.

El horno de microondas permite trabajar en tres potencias de radiación diferentes: 1600, 800 y 400 W. Para evitar, además, la pérdida de disolvente a través del tubo de ventilación, se decidió fijar la temperatura de extracción en lugar de la potencia. Al fijar la temperatura del horno, se inyectan las microondas necesarias (% de potencia) para alcanzar el valor requerido. Por lo tanto, se trabajó con gradientes de temperatura escalonados. Los gradientes de temperatura ensayados en el sistema MASE se muestran en **Tabla 12**.

Tabla 12: Programas de temperatura utilizados en el procedimiento MASE de limpieza del material lipídico.

POTENCIA (WATTS)	TEMPERATURA (°C)	t (min.)
1600	50-60-70	2 min/ cada T°
800	90-100-110 70-80-90 50-60-70	3 min /cada T°
400	90-100-110 70-80-90 50-60-70	3 min /cada T°

7.4.2.3 Tratamiento en medio básico

Se mezclaron 3 g de la muestra liofilizada, con *n*-heptano (9 ml en tres pasos de 3 ml cada uno) y se llevó al horno de microondas. Después de la aplicación del gradiente de temperatura óptimo (Sección 8.2.1), el *n*-heptano que contiene el material graso y la materia orgánica soluble en este disolvente se descartó. Después de esta limpieza, la ausencia de lípidos fue confirmada por cromatografía de gases utilizando como patrones los tres ácidos grasos empleados como modelo (Sección 7.4.2.2). Finalmente, una vez que se descarta el solvente orgánico, la muestra es tratada con solución de NaOH a fin de precipitar las proteínas y obtener las AAHs en estado neutro para poder extraerlas con mayor eficiencia.

7.4.2.4 Tratamiento en medio ácido:

- a) 3 g de la muestra liofilizada de hamburguesa se homogenizó con 12 mL de TFA al 5% durante 60seg. Se intentó estudiar el efecto del medio ácido en la remoción de los analitos desde la matriz, ya que la protonación de los mismos aumentaría la solubilidad en el medio acuoso. Después se adicionaron 10mL de *n*-heptano y se llevó al microondas en una rampa de 50-60-70°C (Sección 8.2) durante 1min en cada una a una potencia de 400W. Posteriormente se llevó a pH básico con NaOH 0,1M, se centrifugó y al sobrenadante se le realizó una MELLID de acuerdo a los parámetros establecidos en la sección 7.5.1, y se inyectó en la columna HPLC.
- b) Se realizó el mismo procedimiento anterior pero esta vez el tratamiento en microondas se realizó a 800 W.

7.5 Optimización de la técnica de microextracción líquido-líquido iónico dispersiva (MELLID)

Las diferentes variables experimentales de la técnica MELLID fueron optimizadas de acuerdo a dos procedimientos: 1) “un procedimiento por etapas” y 2) un procedimiento factorial denominado “Diseño Central Compuesto”.

7.5.1 Optimización por “etapas”

El “procedimiento en etapas” se realizó partiendo de una solución stock en metanol de las AAHs. A un volumen conocido de esta solución se le adicionan 200µl de [OMIM][BF₄] (18mg ml⁻¹) el cual es soluble en agua, y 240µL de NaPF₆ (120mg ml⁻¹). El número de moles de la sal inorgánica es 13 veces mayor que el

número de moles de líquido iónico (LI). Este exceso de sal es suficiente (Sección 8.3.2.1) para asegurar el desplazamiento de la reacción de metátesis hacia el producto de extracción que es el LI insoluble en agua, [OMIM][PF₆]. La solución se deja en reposo durante 5 min para que las pequeñas gotas colapsen en el fondo del tubo cónico y se centrifuga (9000 rpm para obtener una separación de fases completa); el sobrenadante obtenido se desecha. Al LI formado (8μL) se le añade 50 μL de metanol (la cantidad mínima necesaria para disolverlo completamente) a fin de disminuir la viscosidad de la fase extractante para que pueda ser inyectada en la columna cromatográfica; finalmente se inyecta 1μL. Los parámetros a optimizar fueron:

- ✓ Cantidad de NaPF₆
- ✓ Cantidad de LI soluble en agua
- ✓ Efecto del pH
- ✓ Tiempo de extracción
- ✓ Velocidad de centrifugación
- ✓ Efecto salino con diferentes concentraciones de KCL y MgSO₄

Empleando las variables optimizadas se aplicó el procedimiento anterior a las muestras de hamburguesa liofilizada y tratada de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 8.3.2

7.5.2 Optimización mediante Diseño Central Compuesto

Como se discutió en el **Capítulo 5**, 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 en etapas*” (**Sección 7.5.1**), se realizó luego una optimización de la técnica MELLID aplicada a las muestras de hamburguesa a través de un DCC. Podemos asumir que los parámetros experimentales de la “optimización en etapas” constituyen un punto de partida adecuado para realizar una optimización más precisa de las variables experimentales.

La respuesta a optimizar y para la cual se pretenden valores máximos, fue la recuperación porcentual ($R\%$). El tipo de extractante (IL) y dispersante (solvente orgánico soluble) fueron los mismos que los empleados 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:

- ✓ Cantidad de IL soluble en agua,
- ✓ Concentración de NaPF_6
- ✓ pH.

Los niveles que se eligieron para dichas variables corresponden a valores que se encuentran cercanos a los valores máximos del “procedimiento en etapas”. Las condiciones establecidas para cada experimento se describen en la **Tabla 13**.

Teniendo en cuenta lo desarrollado en la **Sección 5.5**, 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. El valor α fue de 1,682 para establecer la condición de capacidad de giro o “rotabilidad” [163,164].

TABLA 13: Diseño experimental para realizar el DCC, para un diseño factorial 2^3

Factor	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
[OMIM][BF ₄] (μ moles)	11,0	12,0	13,0	14,0	15,0
NaPF ₆ (μ moles)	150,0	162,5	175,0	187,5	200,0
pH	10,0	10,5	11,0	11,5	12,0

7.5.3 Técnica MELLID optimizada

De acuerdo a los resultados del diseño factorial anteriormente descrito, el procedimiento resultante fue el siguiente: i) la fase acuosa de la extracción MASE del medio básico, que contiene la muestra desgrasada se trató con 12mL NaOH 0,5M y se centrifugó por 6 minutos a 4200rpm; ii) la fracción acuosa se extrajo con pipeta, se filtró con filtros de 0,45 μ m, y a 1mL de ésta solución acuosa que contiene las aminos se le agregan 260 μ l de [OMIM] [BF₄] (18 mg/ml) y 180 μ l de una solución de NaPF₆(120mg/ml) para extraer y pre-concentrar las aminos; iii) La solución se dejó en reposo durante 5 min y se centrifugó (9000 rpm para obtener una separación de fases completa) y el sobrenadante obtenido se desechó; iv) al líquido iónico que decantó en la parte inferior del tubo de fondo cónico (8 μ L \pm 1 μ L medido 10 veces con jeringa de 10 μ L) se le añadió 50 μ L de metanol (la cantidad mínima necesaria para disolver completamente la fase de LI) y se inyectó 1 μ L en la columna cromatográfica.

CAPÍTULO 8 “RESULTADOS Y DISCUSIÓN”

8.1 Optimización de la separación cromatográfica de estándares

a) **Separación Isocrática:** Se inyectaron en la columna cromatográfica, soluciones de los patrones puros en metanol, a diferentes composiciones de metanol en la fase móvil. Se graficó el logaritmo del factor de retención, k , en función del porcentaje de metanol en la fase móvil ($\log k$ vs % metanol). El factor de retención se calculó empleando uracilo como marcador del tiempo muerto. En **Figura 18** se muestran los resultados obtenidos. Composiciones menores a 40% de metanol producen tiempos de retención prohibitivamente largos para las aminos más hidrofóbicas. Del gráfico se observa que la mezcla de estándares no se puede resolver en condiciones isocráticas, dado que las aminos PhIP y Trp-P-1 eluyen casi simultáneamente en todas las composiciones de metanol. Por otro lado, a bajas concentraciones de metanol, donde se podría anticipar un aumento de la resolución con el aumento de la retención, Trp-P-2 también coeluye con las mencionadas aminos. Por lo tanto, se recurrió al empleo de gradientes de elución para intentar resolver la mezcla.

b) **Separación mediante gradiente de elución:** Se empleó un gradiente binario a 1 ml/min con una fase móvil compuesta por 10% metanol-tampón fosfato 25 mM, pH 3.5 como *fase móvil A* y 60% metanol-tampón fosfato, pH 3.5 como *fase móvil B*. El gradiente escalonado se muestra en **Tabla 14**.

Se empleó detección DAD. Se registró el espectro completo de las diferentes aminos y se los almacenó en la librería de espectros del software para la futura identificación de los analitos en la muestra. En **Figura 19** se muestran los espectros UV-vis registrados con el detector DAD del equipo HPLC utilizado.

Debido a que las AAHs se encuentran a nivel de trazas en las muestras, se empleó detección de fluorescencia en la etapa de cuantificación para mejorar la sensibilidad del método, mientras que la confirmación de la identidad se realizó mediante la comparación del espectro UV-vis con el de la librería de espectros, además de verificar la coincidencia entre el tiempo de retención con el del correspondiente estándar puro. Dado que los espectros de fluorescencia para las aminos estudiadas tienen longitudes de onda para los máximos de las bandas que oscilan entre 265 y 414nm, emitiendo todas intensamente a 410 nm, y que la absorción UV-Vis a longitudes de onda de aproximadamente 260 nm permite detectar todas las AAHs estudiadas, se empleó ésta como longitud de onda de excitación y 410 nm como la longitud de onda de emisión. De esta manera se logró la separación de 8 AAHs: DMIP, MEIQx, 4,8DIMEIQx, PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC, MeAαC. En **Figura 20** se muestra el cromatograma obtenido.

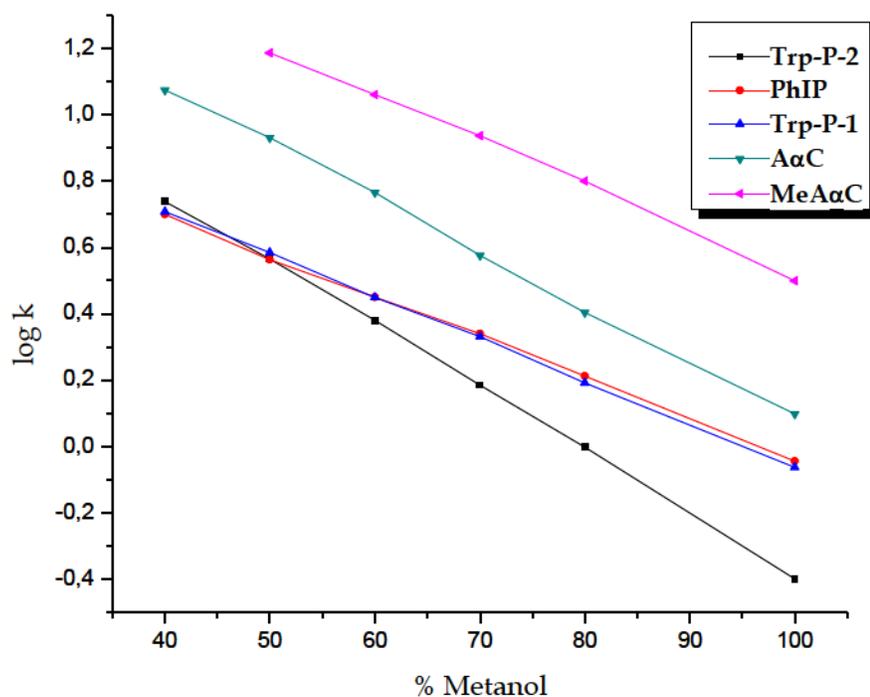


Figura 18: Separación isocrática de las AAHs mediante RP-HPLC

Tabla 14: Gradiente utilizado en la separación de las AAHs mediante RP-HPLC.

% fase móvil B	Tiempo (min)
0-20	0-5
20-45	5-15
60	15-17
90	17-20
93	20-25
93-100	25-30
100	35

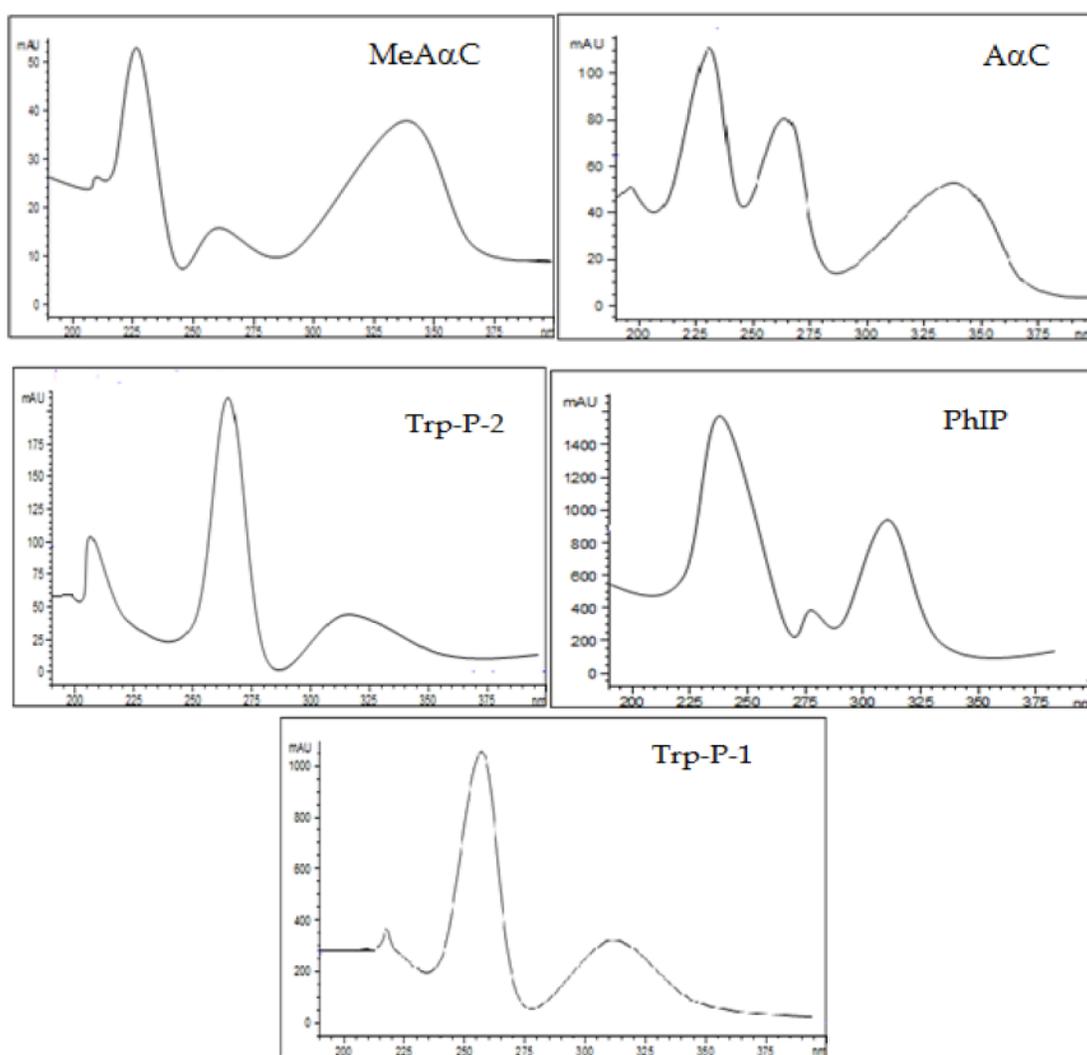


Figura 19: Espectros de absorción UV-vis de las AAHs estudiadas

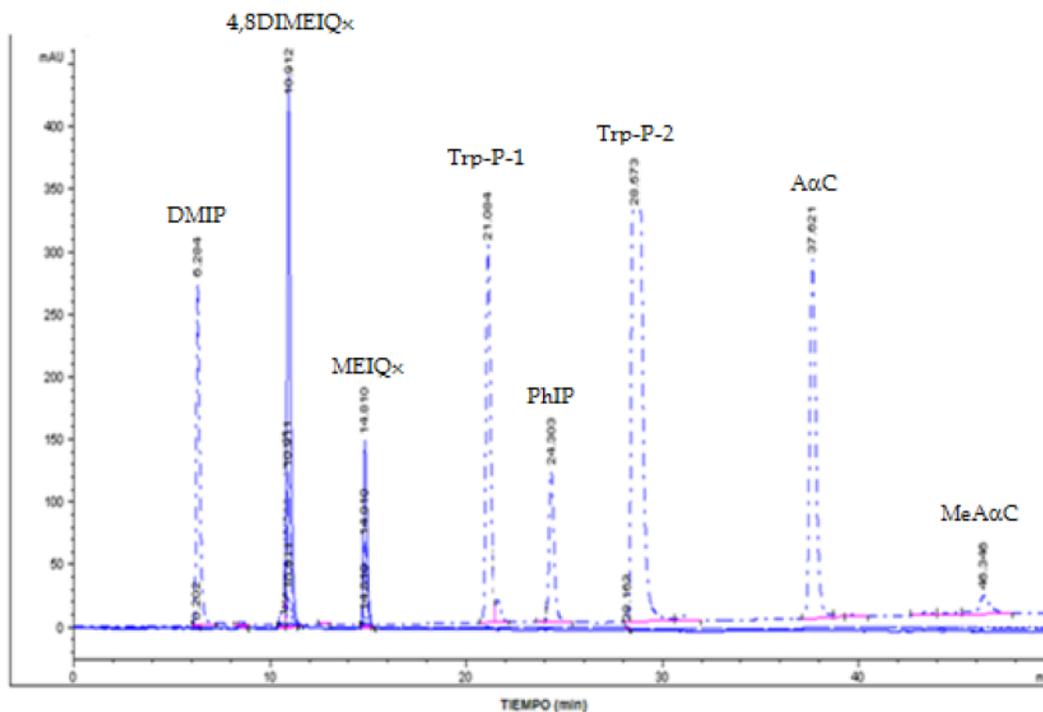


Figura 20: Cromatograma de una mezcla de patrones de AAHs (10-100ppm, volumen de inyección: 1 μ l. Detector DAD (línea Continua) y FLD (línea punteada).

Tabla 15: Longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión de las AAHs estudiadas.

Compuesto	Máximos de excitación (nm)	Máximos de emisión (nm)
DMIP	270	375
Trp-P1	263	400
Trp-P2	263	410
PhIP	320	380
MeA α C	335	380
A α C	335	380

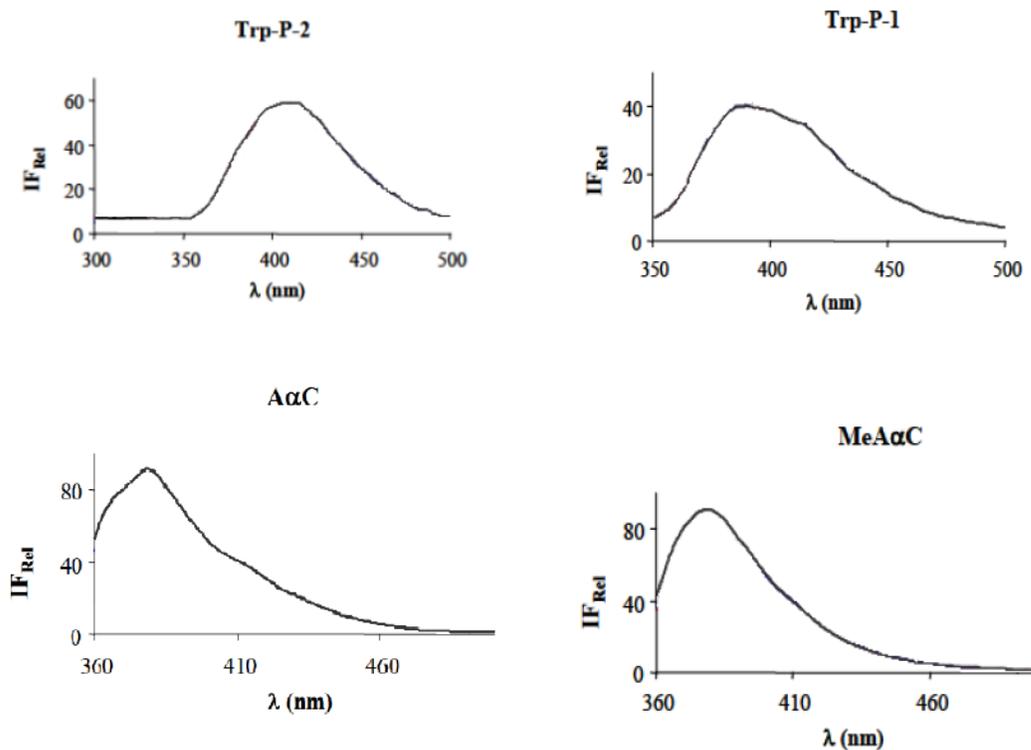


Figura 21. Espectros emisión de las AAHs estudiadas. [58]

8.2 Optimización de las condiciones de limpieza y de desorción de los analitos desde la matriz sólida

La composición aproximada de la carne vacuna es de 73% de su contenido en agua; 22% en proteína; 2,2% en grasa y 1,2% en minerales [165]. Se evaluaron diferentes posibilidades de eliminar el material lipídico de las muestras de hamburguesa cocida y de desnaturalización de proteínas ya que estos componentes afectan la separación cromatográfica y, luego de varias inyecciones se pueden observar cambios en los tiempos de retención y/o deformación de los picos (sobre todo si no se emplea una columna “guarda” o pre-columna) y con el tiempo se puede llegar a ocluir completamente la columna con los consecuentes

aumentos de la presión del sistema. Por lo tanto, se ensayaron diferentes procedimientos de limpieza.

Los primeros procedimientos que se detallan en la **Sección 7.4.2.4**, se realizaron en medio ácido y utilizando energía de microondas correspondiente a 400 y 800 W, respectivamente, a fin de verificar el rendimiento de extracción. Las proteínas precipitan en este medio. Las AAHs tienen grupos básicos y, por lo tanto, se debe estudiar a que pH será más eficiente la extracción. Si la extracción MELLID se hace a pH ácido, las aminos estarán protonadas, la solubilidad en el medio acuoso se favorecerá y por lo tanto, la extracción hacia la fase líquido iónico será menor, a menos que: *i*) las interacciones dispersivas predominen en el proceso de extracción por sobre el estado de protonación de los analitos o que *ii*) las aminos protonadas pudiesen interactuar con los aniones del RTIL.

Inicialmente, se optó por realizar ensayos mediante precipitación proteica directamente en medio básico y posterior tratamiento con etanol y éter de petróleo, sin el uso de energía de microondas, partiendo de la premisa que en medio básico las proteínas son precipitadas mediante la adición del etanol y el material lipídico será eliminado con el éter de petróleo. Por lo tanto, se espera que las grasas se solubilicen en éste medio. Sin embargo los resultados obtenidos no cumplieron con las expectativas ya que la extracción fue deficiente (**Figura 22**) y aparecieron problemas de aumento de la presión en la columna, y finalmente el taponamiento de la misma luego de un uso bastante prolongado.

Por lo tanto, se cambió de estrategia de limpieza y se decidió utilizar extracción en medio básico y un solvente no polar que solubilizara las grasas, utilizando el horno de microondas para acelerar el proceso y hacerlo más eficiente. Este procedimiento

se inició con una muestra homogénea de hamburguesas cocidas, liofilizadas y molidas mecánicamente. Inicialmente se empleó una solución de NaOH y heptano. Luego de someter la muestra a energía de microondas, a la fase acuosa obtenida se le aplicó el método MELIID (Sección 7.5.1). Los cromatogramas obtenidos (**Figura 23**) lucían normales a pesar que solo se notaba extracción para tres aminos (Trp-P-2, Trp-P-1 y MeA α C), con una señal detectable pero no cuantificable para MeA α C. Sin embargo nuevamente, este procedimiento, al cabo de tres meses producía aumentos de presión, deformación de picos y corrimientos de los tiempos de retención, lo cual fue atribuido a la presencia de lípidos que se depositaron en la fase estacionaria.

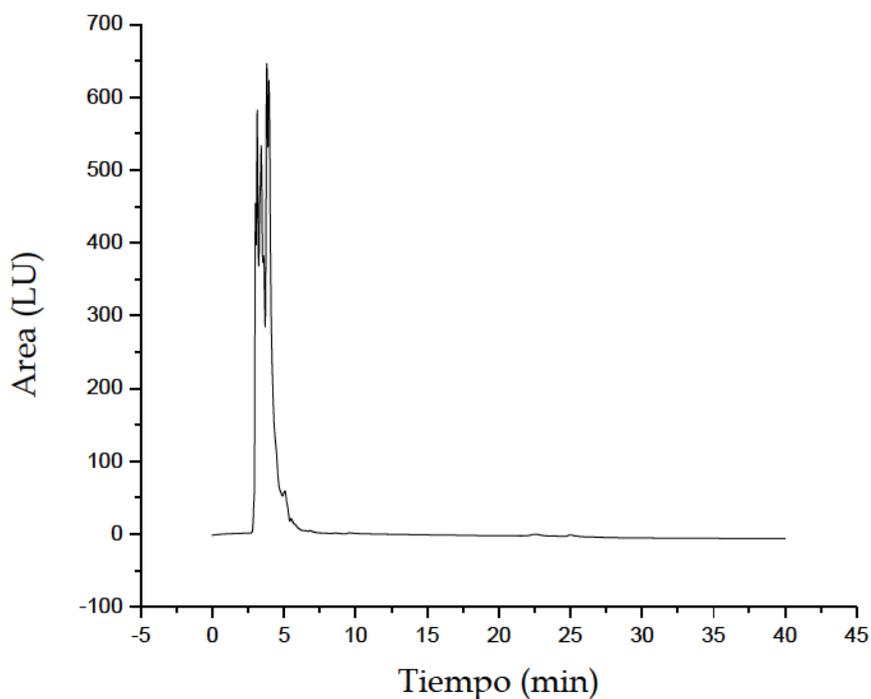


Figura 22: Pre-tratamiento con NaOH y heptano sin energía microondas.

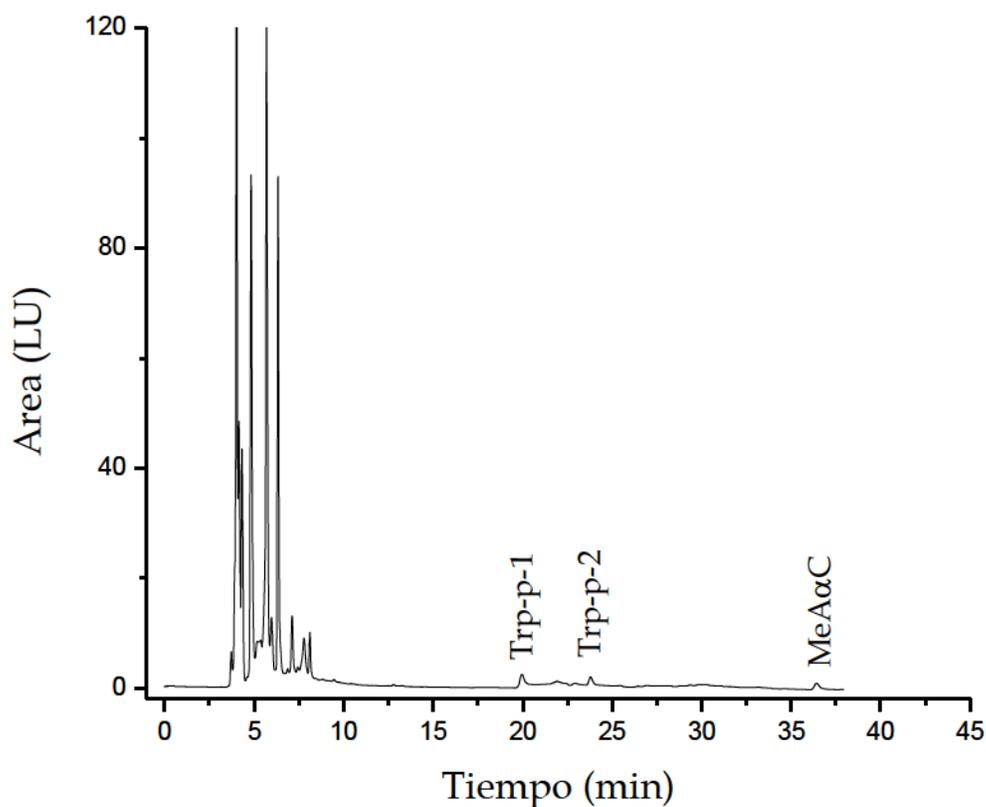


Figura 23:pre-tratamiento con NaOH y heptano utilizando energía MO

Nuevamente se cambió la estrategia de limpieza, la que finalmente consistió en dos etapas: una etapa inicial de extracción del material lipídico seguido de una etapa de limpieza del material proteico al pH necesario para la extracción MELLID.

8.2.1 Limpieza del material lipídico:

Como se mencionó en la Sección 7.4 el horno de microondas permite trabajar a tres potencias de radiación diferentes: 1600, 800 y 400 W. Sin embargo, la muestra se carboniza a 1.600W en menos de 1 min. Para evitar, además, la pérdida de disolvente a través del tubo de ventilación, se decidió fijar la temperatura de

extracción en lugar de la potencia. Al fijar la temperatura del horno se inyectan las microondas necesarias para alcanzar el valor requerido. Si el tiempo de irradiación es de 1 min a cada temperatura, el material graso no se elimina por completo (ver **Figura 24**).

Por lo tanto, se trabajó con gradientes de temperatura escalonados. Los gradientes de temperatura ensayados en el sistema MASE se muestran en **Tabla 12**. Se llegó a las mejores condiciones de limpieza cuando se usó la rampa de 90, 100 y 110°C. En estas condiciones la cantidad de material lipídico extraído alcanza un máximo a los 3 min. Como se puede observar en la **Figura 24**, se requieren 9 ml de n-heptano para eliminar todos los ácidos grasos presentes en 3 g de muestra. Cuando esta limpieza se realiza sin microondas, la cantidad de disolvente para extraer todo el material lipídico para la misma cantidad de muestra es de 42 ml, y a su vez toma alrededor de 42 minutos de trabajo experimental. Por lo tanto, es evidente que las microondas aceleran significativamente el proceso de limpieza y que al mismo tiempo ayudan a mejorar la eficiencia de la extracción de las aminas, ya que al mismo tiempo los analitos son gradualmente despegados de la matriz sólida, como se puede notar en la **Figura 25**. Por lo tanto la extracción MASE minimiza las etapas de "clean up", sobre todo comparado con los procedimientos tradicionales de SPE que se emplean habitualmente [166]

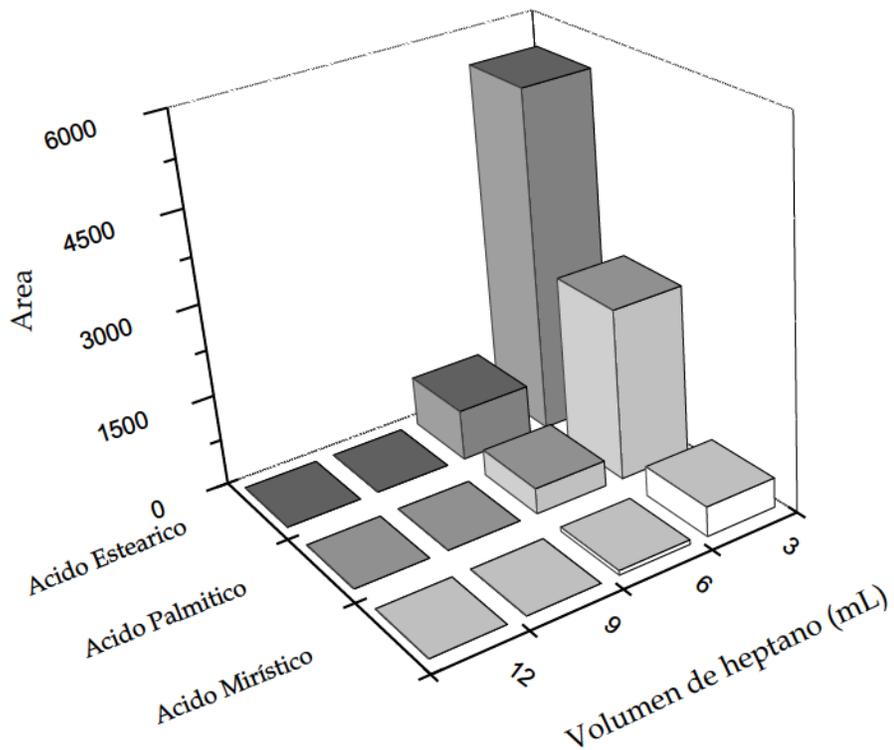


Figura 24: Optimización extracción MASE.

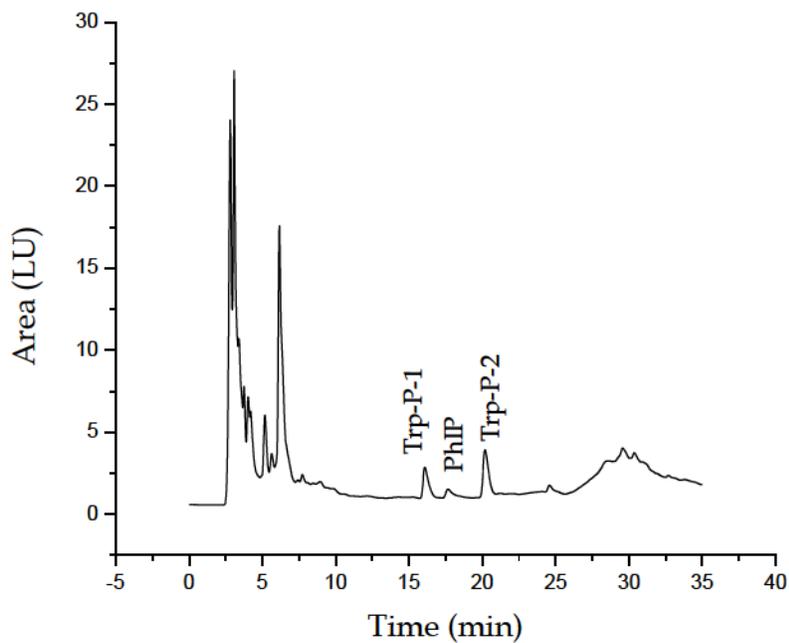


Figura 25: Cromatograma obtenido luego del pretratamiento de muestra de la Sección 8.2.1

8.2.2 Limpieza del material proteico:

A la muestra resultante de la etapa previa, se le agregó NaOH 0,5M a fin de precipitar proteínas y brindar el pH del medio, apropiado para después realizar la MELLID. También es benéfico el uso del hidróxido de sodio, pues en caso de quedar algún remanente lipídico, éste se transforma en los respectivos productos de saponificación, estrategia comúnmente usada en procedimientos de limpieza que emplean SPE. [167].

8.3 Microextracción líquido- líquido Iónico Dispersiva (MELLID) “*in situ*”

Para maximizar la sensibilidad y la selectividad, se estudió y se optimizó el efecto de los parámetros principales que afectan a la MELLID, tales como el pH, cantidad y tipo del “LI precursor” empleado como reactivo (soluble en agua) para obtener el solvente extractante, cantidad y tipo de sal (NaPF_6) que genera dicho extractante, así como también, el efecto salino y las condiciones de centrifugación.

8.3.1 Selección del líquido iónico precursor

Es difícil seleccionar un líquido iónico específico para una extracción dada, debido la gran variedad de RTILs con diferentes propiedades químicas y físicas que están disponibles comercialmente o que pueden ser sintetizados. Para la MELLID *in situ*, el LI obtenido debe ser inmiscible en agua (o muy poco miscible), mientras que el reactivo de partida debe ser soluble en agua. Además el LI formado debe ser líquido a temperatura ambiente y más denso que la disolución de la matriz para que las microgotas puedan decantar en el tubo de ensayo y puedan ser fácilmente extraídas; finalmente, el LI formado debe ser capaz de ser inyectado directamente en la columna cromatográfica. Sin embargo, este último

requisito no se cumple por lo general debido a la alta viscosidad del producto obtenido; por lo tanto, se requiere la adición de una pequeña cantidad de disolvente orgánico para fluidificar la fase, aunque este último paso disminuirá el factor de enriquecimiento, EF. Teniendo en cuenta todos estos requisitos, el [OMIM] [BF₄], soluble en agua y el NaPF₆ fueron elegidos como los reactivos de partida para la reacción *in situ*. Además, el LI de partida fue sintetizado en nuestro laboratorio. Es así como el [OMIM][BF₄] se obtuvo de acuerdo al esquema de **Figura 17** del inciso 7.1 y se adicionó a éste la sal NaPF₆ en exceso, con lo cual se generó el hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, [OMIM][PF₆].

Cuando le agregamos a la matriz acuosa que contiene las AAHs, el LI de partida y la sal inorgánica, se forma una dispersión en la cual se genera el extractante *in situ*, es decir, el [OMIM][PF₆] insoluble. De esta manera, se genera un área de contacto "infinitamente" grande entre las microgotas de LI y la fase acuosa, lo cual por ende, genera una mejor y más rápida extracción. El procedimiento MELLID descrito en la parte experimental se aplicó a 8 AAHs: PhIP, Trp-P-1, Trp-P-2, AcC, MeAcC, DMIP, 4,8DIMEIQx, MEIQ y MEIQx. Se emplearon concentraciones adecuadas de manera de no generar sobresaturaciones en la señal y/o desaparición de picos luego de la extracción. Se observó que solamente se extrajeron las 5 AAHs clasificadas como "no polares", puesto que las "polares" no fueron extraídas mediante ésta técnica. En la **Figura 26** se muestran las estructuras químicas de las aminas no polares que se van a estudiar.

Para seleccionar las mejores condiciones experimentales de la técnica MELLID *in situ*, se eligió inicialmente un procedimiento de optimización "paso a paso" y los resultados obtenidos se utilizaron posteriormente en un diseño factorial denominado "Diseño Central Compuesto".

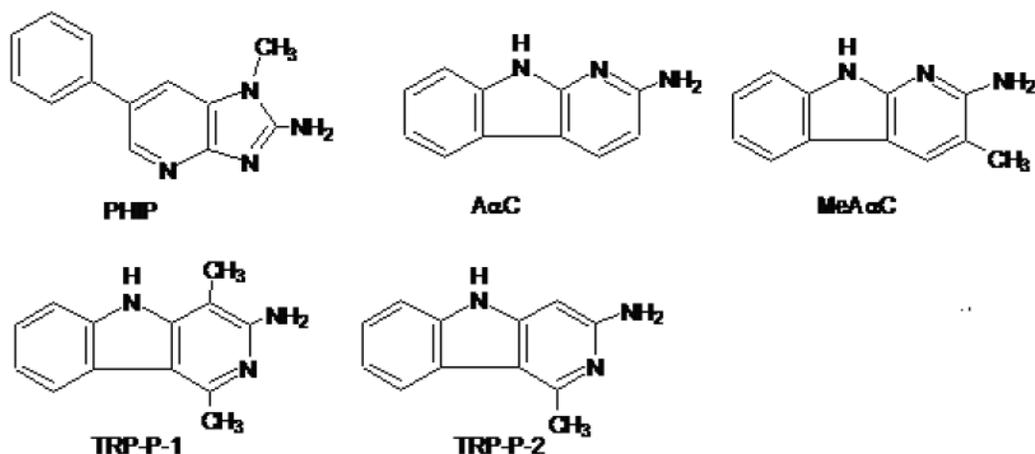


Figura 26: Estructura de AAHs "no polares" estudiadas en éste trabajo.

8.3.2 Optimización "Etapa por Etapa"

Los parámetros que afectan el rendimiento de la microextracción dispersiva dependen de varios factores, como se discutió en la **Sección 2.3.2** y dependen de la estructura química de los analitos (ionizables o no), tipo y cantidad de solvente extractante y muestra, temperatura, etc. En este caso se estudiaron todas las variables que, de acuerdo a trabajos previos, se considera que pueden afectar al rendimiento de la extracción:

- Relación entre la cantidad de sal empleada como reactivo de partida (NaPF_6) para un volumen fijo de RTIL precursor.
- Cantidad del líquido iónico extractante
- Efecto del pH
- Tiempo de extracción.
- Velocidad de centrifugación.
- Efecto salino con diferentes concentraciones de KCl y MgSO_4 .

8.3.2.1 Efecto de la concentración NaPF₆

La cantidad de NaPF₆ debe estar en exceso en comparación con la de [OMIM][BF₄] con el fin de favorecer la formación de RTIL insoluble en agua. Para una cantidad constante de micromoles de [OMIM][BF₄] de 12,8 μmol (obtenido a partir de 200 μL de una solución con una concentración de 18 mg/ml) la cantidad de micromoles de NaPF₆ se varió desde 35 μmol hasta 285 μmol. Como se puede observar en la **Figura 27** la cantidad de aminos extraídas aumenta con la cantidad de sal inorgánica añadida hasta 170 μmol. Por lo tanto, de acuerdo con este experimento, el número mínimo de moles de sal inorgánica debe ser, al menos, 13 veces mayor que la cantidad de RTIL.

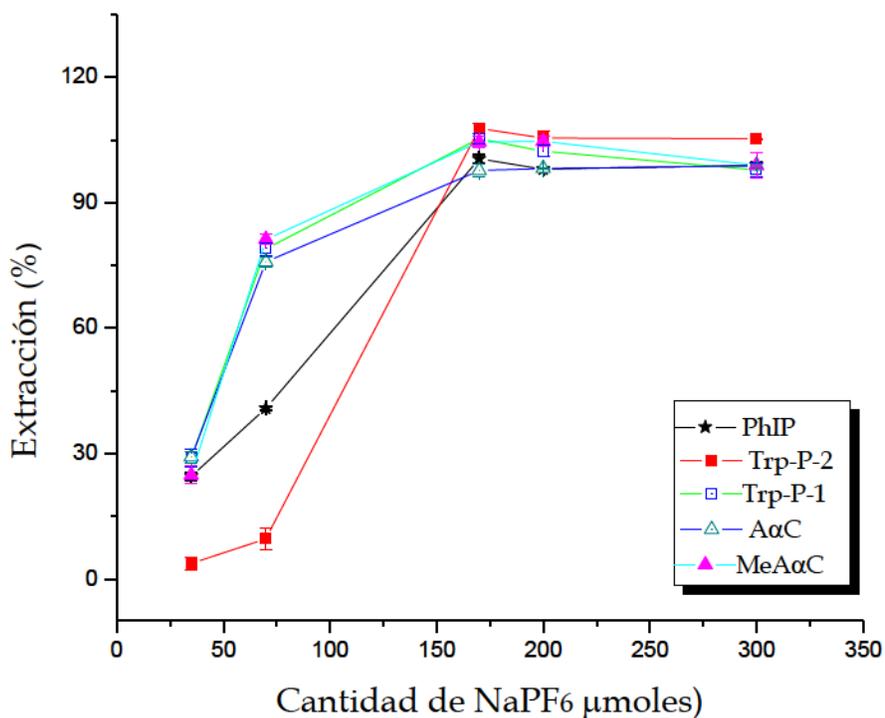


Figura 27: Influencia de NaPF₆ en la extracción de las AAHs.

8.3.2.2 Efecto de la cantidad de líquido iónico precursor.

El volumen de disolvente de extracción es un parámetro importante que afecta el rendimiento de la MELLID. Teóricamente, un mayor volumen de disolvente de extracción se traduciría en una mayor recuperación. Sin embargo, esto puede terminar siendo una dificultad debido a la viscosidad del RTIL y al hecho de que a mayor volumen se requiere mayor cantidad de disolvente orgánico para fluidificarlo a fin de poder realizar la inyección en la columna cromatográfica. Todo esto disminuye el factor de enriquecimiento, EF. Por otra parte, como se dijo anteriormente la generación *in situ* del LI aumenta la efectividad de la extracción. El efecto del volumen de RTIL preparado *in situ* se investigó mediante la adición de cantidades crecientes de la solución del RTIL precursor, [OMIM][BF₄], el cual es miscible en agua (18mg/ml) a una cantidad constante de NaPF₆ (170 μmol). En la **Figura 28** se puede observar que 12,8 μmol de la solución de LI puede ser considerado como una cantidad óptima para obtener una mejor eficiencia de extracción. Por lo tanto, la relación óptima entre la sal inorgánica y el RTIL es 13, de acuerdo con el resultado anterior.

8.3.2.3 Efecto del pH

El pH de la muestra determina el estado real de las AAHs en solución acuosa dado que, como se dijo anteriormente, son compuestos básicos. Por lo tanto el pH juega un papel determinante en la eficacia de la extracción. La extracción se puede incrementar favoreciendo: (i) las interacciones de van der Waals entre el analito con las cadenas alquílicas del RTIL y (ii) las interacciones electrostáticas entre el analito cargado y los iones del RTIL. Sin embargo, estas interacciones coulómbicas parecen no contribuir significativamente en el mecanismo de extracción mientras que las interacciones de van der Waals predominan en la

eficiencia de extracción [58]. Esta es la razón por la que se consideran a los RTILs como líquidos “asociados”. Los valores de pK_a para las AAHs estudiadas se encuentran entre 4,4 y 8,6 [58]. Por lo tanto, con el fin de obtener las aminas en estado neutro, se investigó el efecto de pH en el rango de 8.00-13.00 sobre la eficiencia de la extracción. Se puede observar de la **Figura 29** que la extracción aumenta hasta un pH de 11. Este resultado confirma que el estado no cargado de la molécula favorece el mecanismo de extracción. Por lo tanto, un pH = 11 se puede considerar como un valor óptimo para casi todas las aminas.

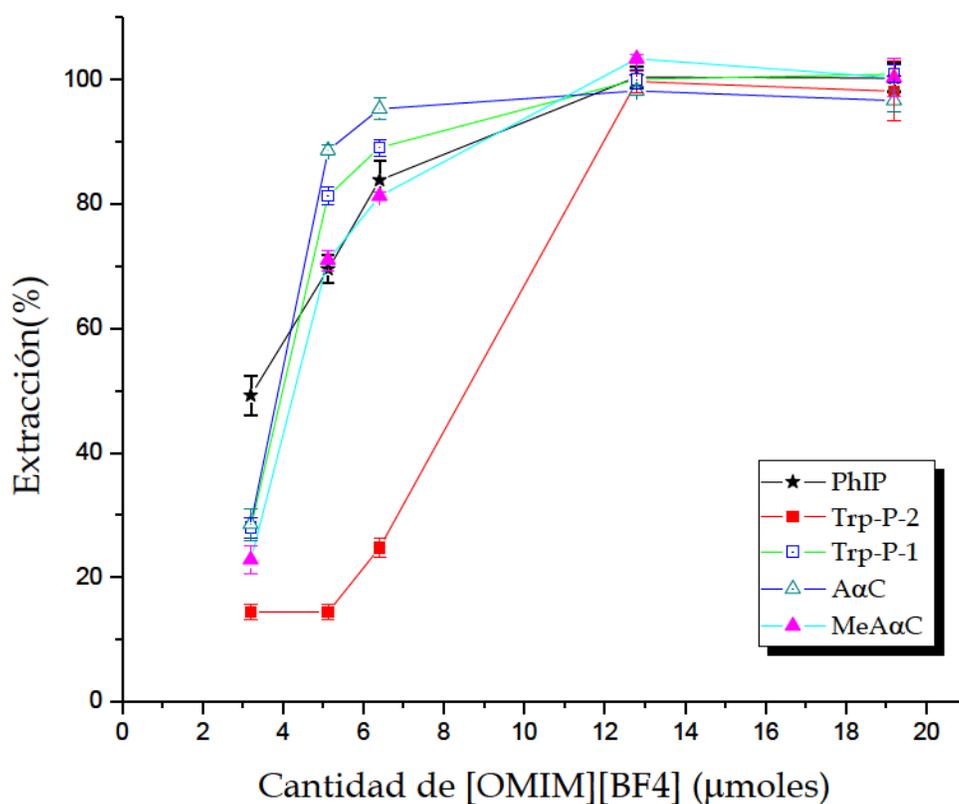


Figura 28. Influencia de la Cantidad de [OMIM][BF₄] en la extracción (Concentración de [OMIM][BF₄], 18mg/ml; [NaPF₆] =170 μmol).

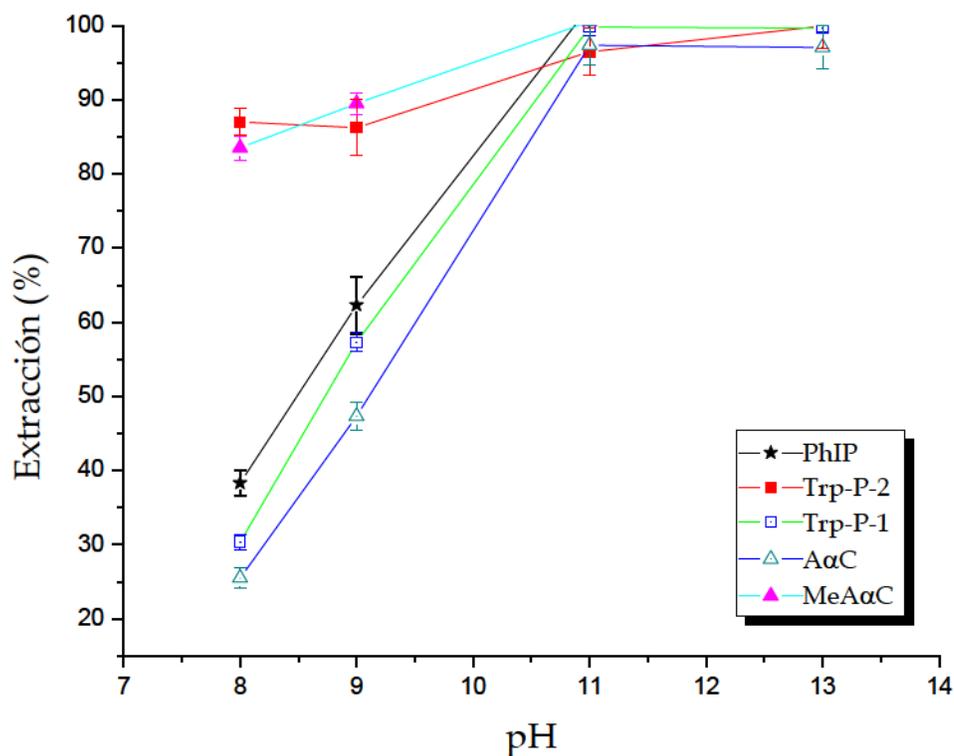


Figura 29: Influencia del pH sobre el % de extracción

8.3.2.4 Efecto del tiempo de extracción

Se definió el tiempo de extracción como el intervalo que comienza cuando se añade la solución de NaPF_6 , al LI soluble en agua, $[\text{OMIM}][\text{BF}_4]$ (para formar el RTIL insoluble en agua $[\text{OMIM}][\text{PF}_6]$) hasta que la mezcla se coloca en la centrífuga. Por lo tanto la mezcla se dejó en reposo variando dichos tiempos entre 1 y 15 min antes de centrifugar. En la **Figura 30** se puede observar que las señales aumentan hasta los 5 min y luego se mantienen constantes hasta los 8 min, luego de lo cual disminuyen levemente. Esto último podría deberse a que los analitos se encuentran inicialmente solubilizados en las microgotas de LI, y luego de alcanzarse el equilibrio un pequeño volumen de IL queda solubilizado en la fase

acuosa, arrastrando consigo una mínima cantidad de analito. Considerando los resultados, se puede notar que el tiempo de extracción óptimo es 5 min.

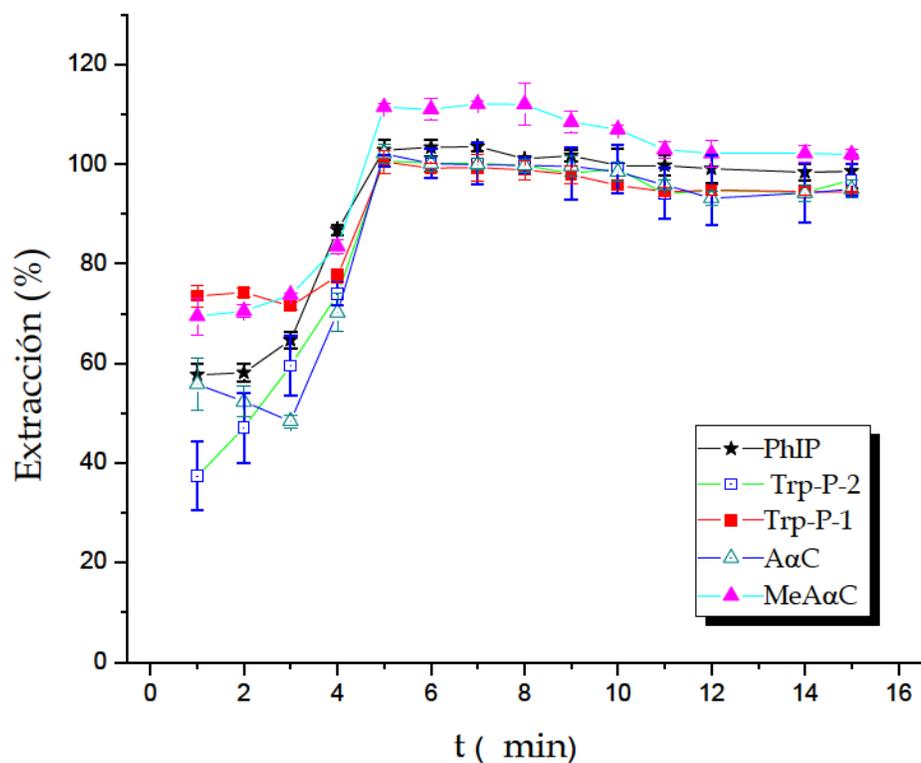


Figura: 30 Influencia del tiempo de extracción.

8.3.2.5 Efecto de la velocidad de centrifugación

La velocidad de centrifugación fue ensayada desde 4.000 a 14.000 rpm. Estos experimentos se realizaron trabajando en los valores óptimos de las variables previamente estudiadas. Como se puede observar en la **Figura 31** la extracción alcanza un valor óptimo cuando la velocidad de centrifugación es de aproximadamente 9,000 rpm. Este hecho se debe probablemente a una mejor separación de fases permitiendo una separación más completa.

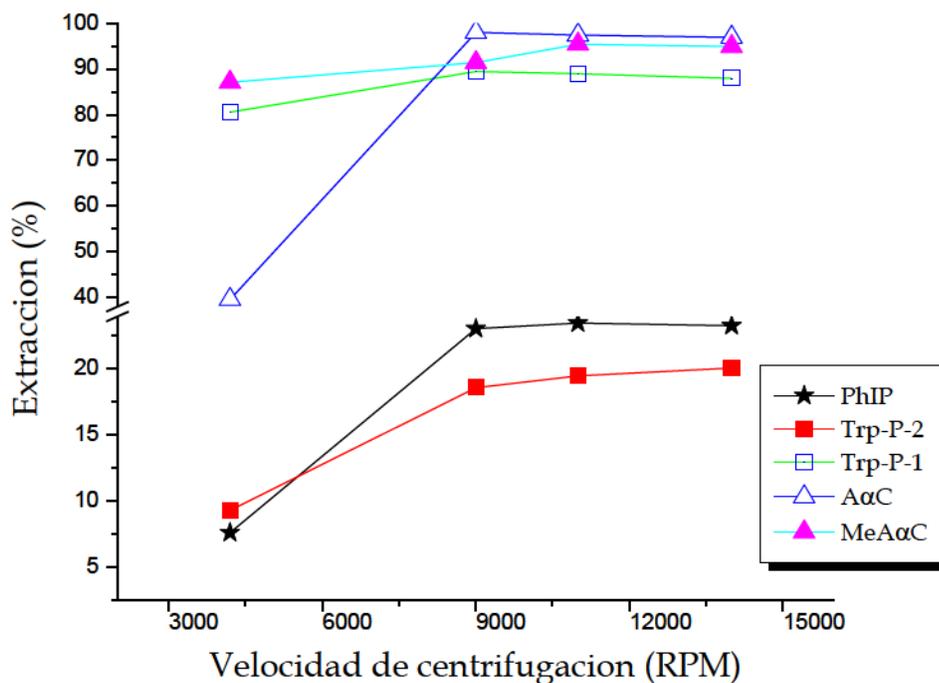


Figura 31: Efecto de la velocidad de centrifugación

8.3.2.6 Efecto Salino

Se estudió el efecto de la fuerza iónica, empleando KCl y MgSO₄, en la eficiencia de extracción de la MELLID mediante la adición de cada una de estas sales, en concentración molares comprendidas entre 0,5 y 2M. En general, como es conocido, el efecto salino hace disminuir la solubilidad en agua de la mayor parte de los compuestos orgánicos neutros. Sin embargo, como se observa en **Figura 32.a** y **Figura 32.b** en este caso se observó una disminución de la recuperación. Esto puede deberse probablemente a una interacción coulombica atractiva entre los iones del LI y los iones de carga opuesta de la sal agregada. Por lo tanto, no se utilizaron sales en la extracción de los analitos.

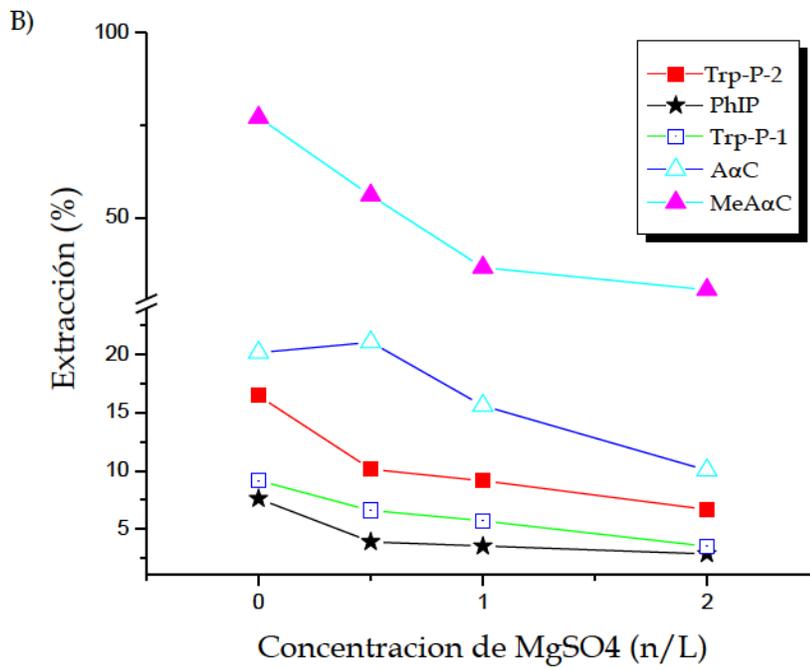
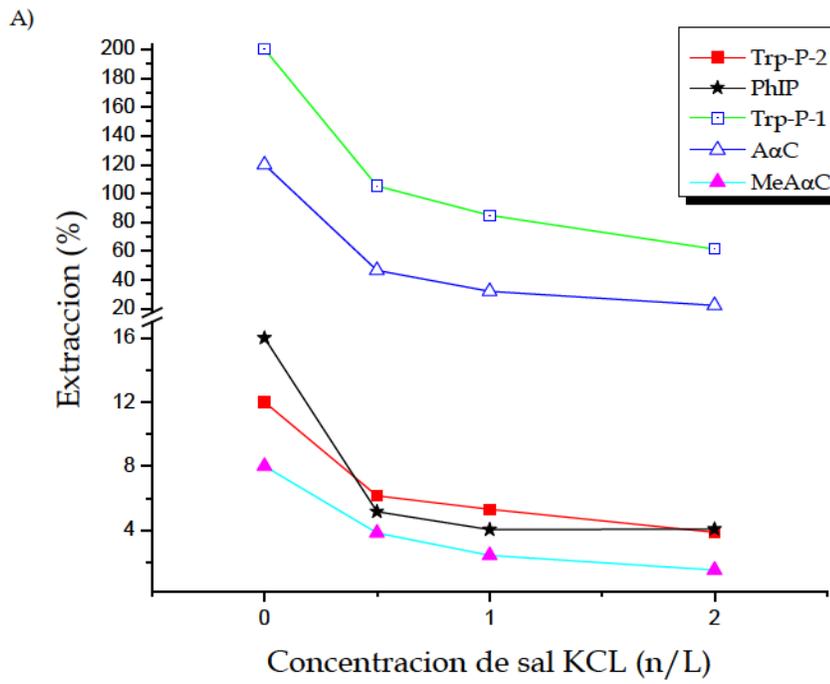


Figura 32: Influencia de la fuerza iónica de diferentes sales sobre la extracción.

8.3.3 Aplicación del método de análisis optimizado a muestras de hamburguesa comercial.

Una vez obtenidos los valores óptimos para las variables que influyen en la eficiencia de la MELLID, y partiendo de la muestra libre de materia grasa, se procedió a aplicar la metodología descrita en la Sección 7.5 y la técnica separativa desarrollada en Sección 8.1 a muestras de hamburguesas comerciales marca "Patty". En **Figura 33** se muestra el cromatograma obtenido para una de las muestras. Se puede observar la presencia de las 5 AAHs "no polares" al comparar los tiempos de retención con los de los patrones puros y, a su vez, chequeando la identidad mediante la comparación de los espectros de cada pico (obtenidos con el detector DAD) con los espectros de la librería disponibles en el software.

En la **Figura 33** también se muestran las señales observadas para uno de los extractos obtenidos con la técnica (optimizada en etapas) MASE previo a la extracción dispersiva. El primer pico en el cromatograma corresponde a la amina DMIP, la cual es polar y fluorescente. Se puede observar que el tiempo de retención coincide con el del estándar puro, además de los espectros DAD. Este resultado podría indicar que la extracción MASE puede ser efectiva para determinar las aminas heterocíclicas polares, que no se extraen en la fase RTIL. También se observa en el cromatograma que Trp-P-1 y Trp-P-2 se detectan como picos muy pequeños antes del procedimiento MELLID, por lo cual las microondas efectivamente ayudan a despegar los analitos de la matriz. Después de la pre-concentración, los picos correspondientes a las cinco AAHs no polares aparecen claramente en el cromatograma. Las cantidades de Trp-P-1, Trp-P-2 y PhIP que se encuentran en la hamburguesa se muestran en la **Tabla 22** y se expresan como ng/ml y ng/g con el fin de comparar con los resultados de la literatura. La cantidad de PhIP encontrado en este estudio es muy similar a los reportados previamente para hamburguesas cocidas de una manera similar [13,35,168].

Además, concentraciones similares fueron encontradas en lomo de ternera y en muestras de pescado a la parrilla [7]. Las aminas A α C y MeA α C están presentes por debajo del límite de cuantificación lo cual también se observa en los trabajos citados anteriormente. Las cantidades de Trp-P-1 y Trp-P-2 que se detectaron en este trabajo son mucho más altos (aproximadamente 10 veces) que los encontrados en muestras de lomo de ternera y filet de pescado lo cual podría deberse al mayor contenido de grasa de la hamburguesa estudiada, debido a que esto favorece la formación de las aminas [4,167].

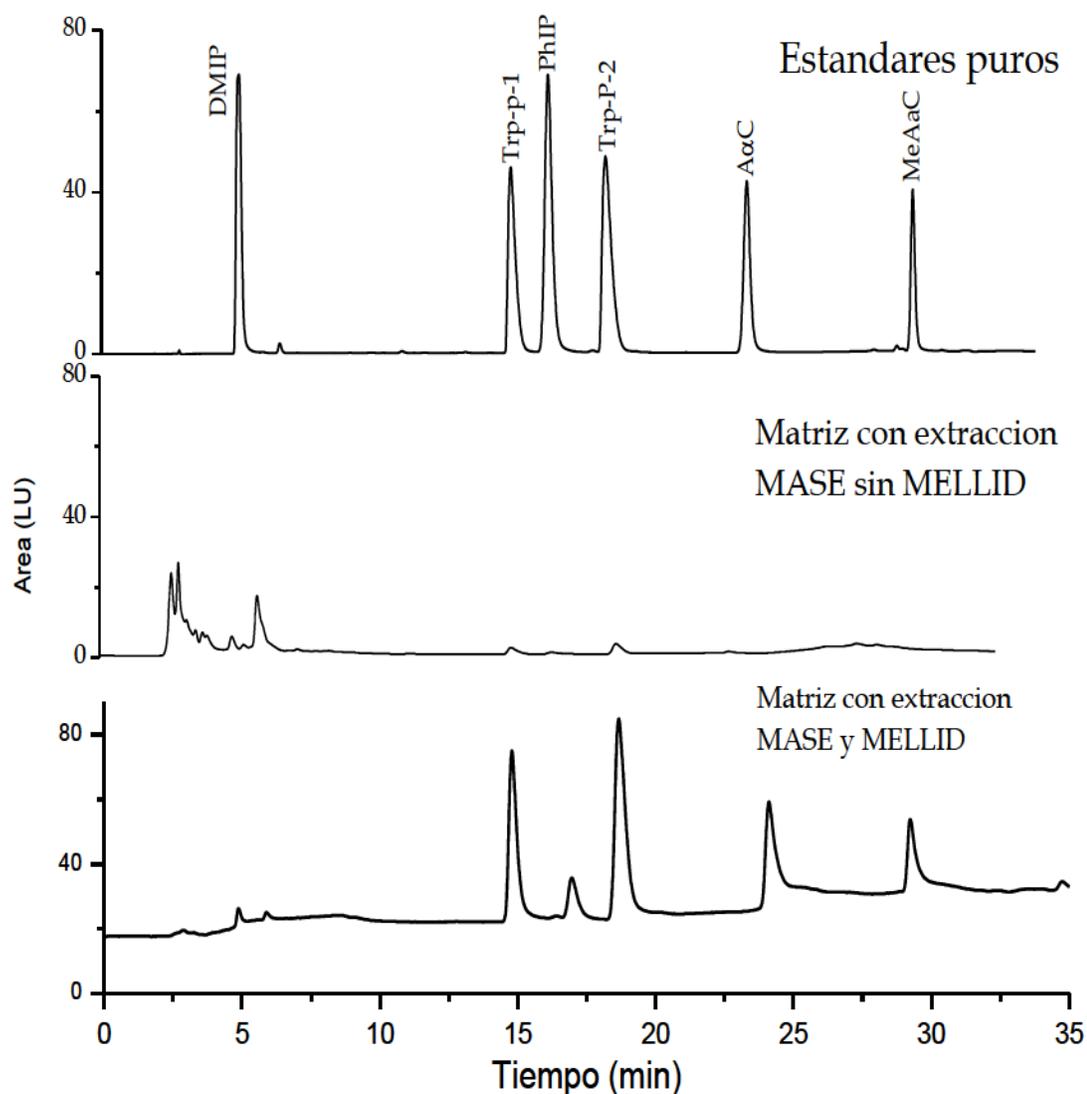


Figura 33. Señales cromatográficas de fluorescencia para: A) los estándares puros, B) solución después de la extracción MASE y C) para el extracto de hamburguesa después de MELLID

8.4. Optimización de la técnica MELLID mediante diseño central compuesto (DCC).

Los resultados obtenidos anteriormente mediante la técnica de optimización en etapas podrían estar alejados de los verdaderos valores óptimos y si esto ocurre, las cifras de mérito del procedimiento analítico se verían deterioradas. Es por ello que se aplicó el procedimiento de optimización factorial denominado Diseño Central Compuesto (DCC) descrito en la Sección Experimental 7.5.2. En la **Tabla 16** se muestra el diseño empleado (combinación adecuada de tipo y valores para las variables estudiadas) y las respuestas obtenidas para cada experimento. Los mismos fueron realizados en un orden aleatorio para asegurar la independencia de los resultados minimizando el efecto de los factores no controlados.

Tabla 16: Experimentos del DCC y respuestas obtenidas (IL: [OMIM][BF₄]; sal: [NaPF₆]; pH)

Ensayo	Tipo de punto	Variables			Respuestas % extracción				
		IL (μmol)	Sal (μmol)	pH	Trp-P1	PhIP	Trp-P-2	AaC	MeaAc
1	Factorial	14,2	189,9	10,4	95,86	68,01	80,54	63,11	75,39
2	Factorial	14,2	160,1	11,6	61,03	45,08	51,9	39,41	49,02
3	centro	13,0	175,0	11,0	96,09	66,87	80,43	65,12	72,31
4	Factorial	11,8	160,1	10,4	45,65	41,08	52,31	40,1	46,02
5	Centro	13,0	175,0	11,0	95,96	64,23	81,31	68,03	72,93
6	Axial	13,0	175,0	12,0	91,64	70,32	84,17	64,24	77,01
7	Centro	13,0	175,0	11,0	96,99	70,82	84,3	68,17	76,44
8	Factorial	14,2	189,9	11,6	101,07	73,11	90,4	69,01	85,54
9	Factorial	11,8	160,1	10,4	47	44,012	48,16	39,21	40,29
10	Axial	13,0	200,0	11,0	96,04	68,93	80,38	62,49	80,07
11	Centro	13,0	175,0	11,0	98,1	66,01	80,53	65,71	76,66
12	Factorial	11,8	189,9	11,6	62,26	42,72	54,06	40,31	48,55

Tabla 16: Continuación

13	Axial	11,0	175,0	11,0	61,19	45,64	58,09	40,01	51,91
14	Axial	13,0	175,0	10,0	96,23	72,75	76,91	59,09	70,16
15	Factorial	11,8	189,9	10,4	60,51	44,18	55,07	40,49	53,27
16	Factorial	11,8	160,1	11,6	49,01	36,95	50,09	41,26	37,33
17	Centro	13,0	175,0	11,0	94,98	66,76	78,43	62,93	74,02
18	Factorial	14,2	160,1	11,6	57,25	42,11	53,9	37,22	48,61
19	Axial	15,0	175,0	11,0	96,51	70,49	79,19	65,36	76,48
20	Centro	13,0	175,0	11,0	95,99	64,93	81,55	65,1	73,03
21	Factorial	14,2	189,9	11,6	94,12	69,07	87,92	74,34	87,99
22	Axial	15,0	175,0	11,0	100,65	75,44	84,32	68,09	73,27
23	Factorial	11,8	189,9	10,4	58,21	40,66	56	45,72	50,09
24	Axial	13,0	175,0	10,0	94,99	69,02	80,83	55,59	67,95
25	Centro	13,0	175,0	11,0	94,03	66,65	82,44	61,39	76,19
26	Axial	11,0	175,0	11,0	58,03	43,05	60,48	43,98	48,23
27	Centro	13,0	175,0	11,0	95,93	67,99	78,05	66,05	71,88
28	Factorial	14,2	160,1	10,4	62,33	50,27	53,72	43,81	55,15
29	Centro	13,0	175,0	11,0	96,84	66,79	80,67	66,9	72,54
30	Factorial	14,2	160,1	10,4	58,6	44,76	51,96	47,93	47,22
31	Axial	13,0	150,0	11,0	52,25	40,62	45,25	35,09	39,49
32	Axial	13,0	150,0	11,0	54,99	40,54	43,03	37,75	43,33
33	Axial	13,0	175,0	12,0	94,56	69,14	81,28	66,12	82,66
34	Axial	13,0	200,0	11,0	93,17	71,47	85,77	62,27	74,93
35	Centro	13,0	175,0	11,0	96,09	66,83	82,94	64,58	72,54
36	Factorial	14,2	189,9	10,4	97,99	67,56	81,25	64,32	77,48
37	Factorial	11,8	160,1	11,6	53,29	32,33	45,61	36,04	41,04
38	Factorial	11,8	189,9	11,6	65,03	47,93	51,72	38,99	50,12

En la **Figura 13** del Capítulo 5 puede verse un esquema representativo del DCC empleado en este caso. Como se vio en la **Sección 5.5**, 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 $\alpha = \pm \sqrt[4]{2^k} = \pm \sqrt[4]{8} = \pm 1,68$, equidistante a los puntos centrales del diseño. Las réplicas que se realizan para el punto central cumplen con los objetivos desarrollados en la Sección 5.5. Además, para obtener tipos de ensayos (bloques) balanceados incluimos un total de 5 puntos centrales en el diseño, distribuidos equitativamente entre los distintos bloques.

Por lo tanto, el DCC construido para $k=3$ factores, consistió en: $pf=2^3=8$, $pe=2 \times 3=6$ y $pc=5$ lo cual resulta en un total de *19 ensayos*. El DCC empleado en este trabajo se volvió a repetir una semana después resultando en un total de *38 experimentos*. Estos ensayos se dividieron en 3 bloques realizados en 4 días consecutivos. En el “*procedimiento en etapas*” previamente utilizado se realizaron un total de *108 experimentos*. Si bien estos se realizaron por triplicado, el número de experimentos es mucho mayor.

Los resultados obtenidos mediante el DCC se utilizaron para construir un modelo de superficie de respuesta (RSM) que considera las tres variables independientes (k) y las interacciones entre las variables:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^4 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^4 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 < i < j}^4 \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{1 < i < j < k}^4 \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \varepsilon \quad (28)$$

donde Y es la respuesta, x_i son las variables independientes codificadas, β_0 es un término constante, β_i representan los coeficientes de los parámetros lineales, β_{ii} corresponde a los coeficientes de los parámetros cuadráticos, β_{ij} los coeficientes de los parámetros de interacción y ε son los residuos asociados al experimento. 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 $p > 0,05$.

De acuerdo al modelo obtenido, las condiciones experimentales óptimas para la extracción de las aminas se resumen en la **Tabla 17** cuyos resultados son muy próximos a los obtenidos mediante la optimización “paso a paso”

Tabla 17: Condiciones experimentales óptimas para la extracción de las AAHs estudiadas.

Parámetros optimizados	Optimización “ Paso a paso”	Optimización mediante DCC
[OMIM][BF ₄]	12,8 μ moles	13,87 μ moles
[NaPF ₆]	170,0 μ moles	185,45 μ moles
pH	11,0	11,00

En las **Figuras 34-40** se muestran las superficies de respuesta para todas las AAHs, con los máximos encontrados para cada factor.

Design-Expert® Software

Original Scale

(TRPP1)²

101.07

45.65

X1 = A: IL

X2 = B: SALT

Actual Factor

C: pH = 11.00

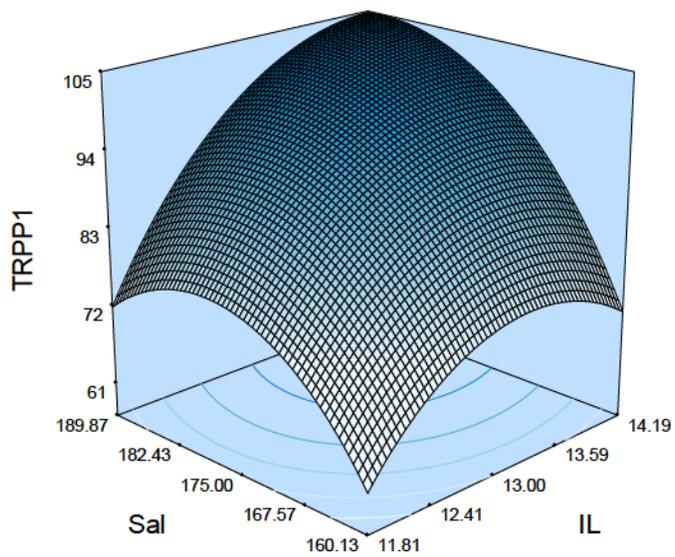


Figura 34: Superficie de respuesta para la amina Trp-P-1

Design-Expert® Software

Original Scale

(PHIP)^{1.5}

75.44

42.33

X1 = A: IL

X2 = B: SALT

Actual Factor

C: pH = 11.00

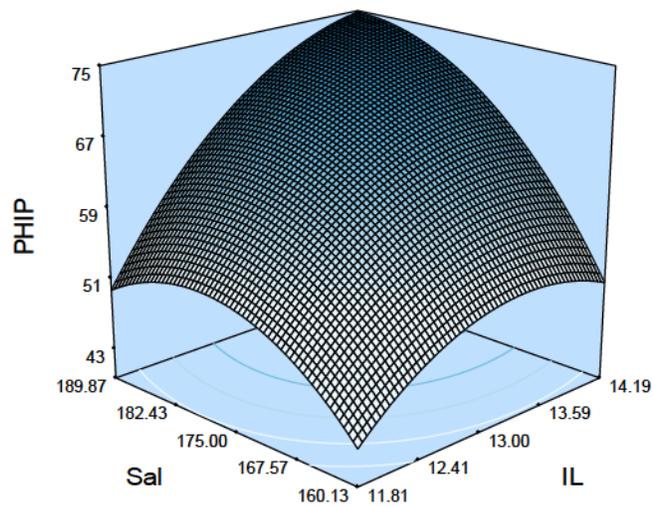


Figura 35: Superficie de respuesta para la amina PhIP

Design-Expert® Software

TRPP2



X1 = A: IL
X2 = B: SALT

Actual Factor
C: pH = 11.00

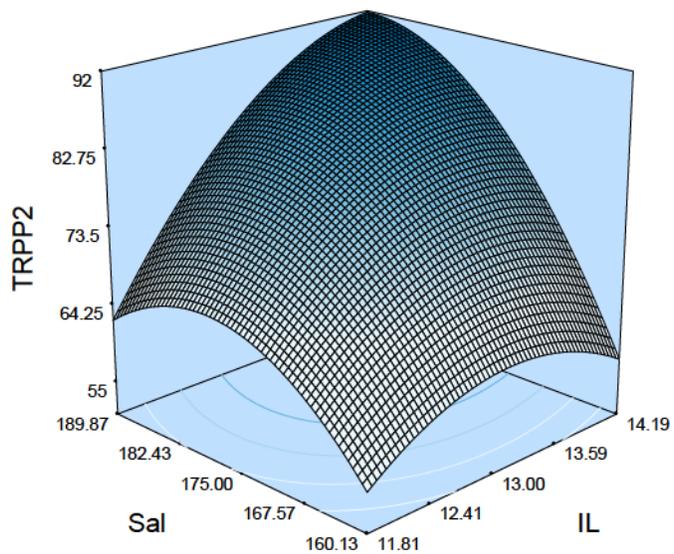


Figura 36: Superficie de respuesta para la amina Trp-P-2

Design-Expert® Software

AC



X1 = A: IL
X2 = B: SALT

Actual Factor
C: pH = 11.00

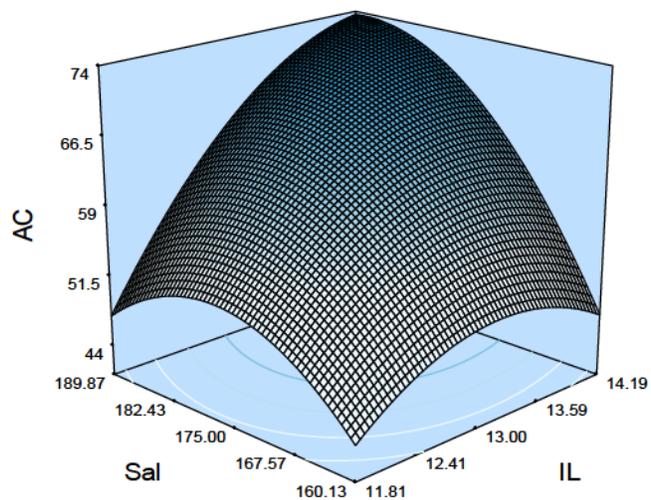


Figura 37: Superficie de respuesta para la amina AαC

Design-Expert® Software

MeAc

87.99

37.33

X1 = A: IL

X2 = B: SALT

Actual Factor

C: pH = 11.00

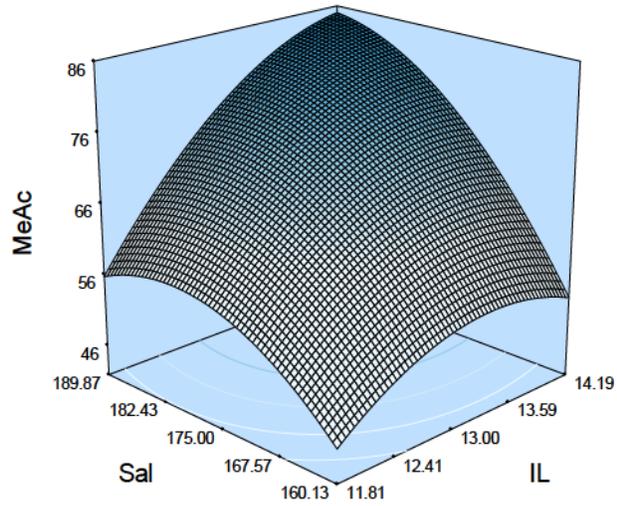


Figura 38: Superficie de respuesta para la amina MeAc

Design-Expert® Software

Desirability

1

0

X1 = A: IL

X2 = B: SALT

Actual Factor

C: pH = 11.00

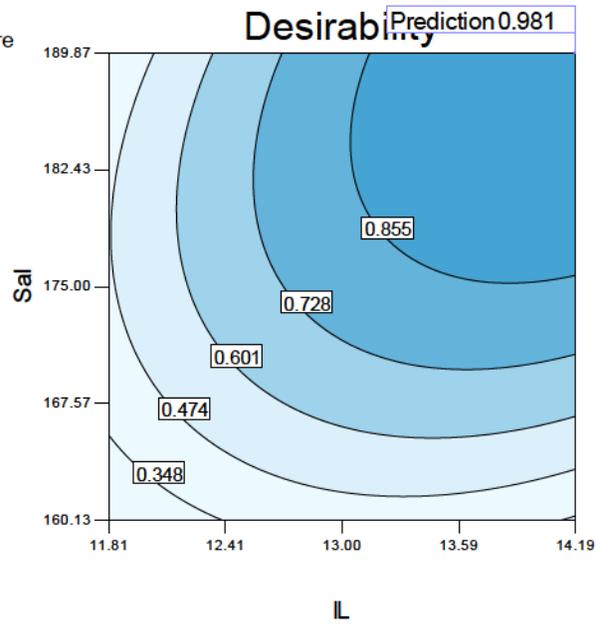


Figura 39: Predicción de las condiciones óptimas de la MELLID *in-situ*

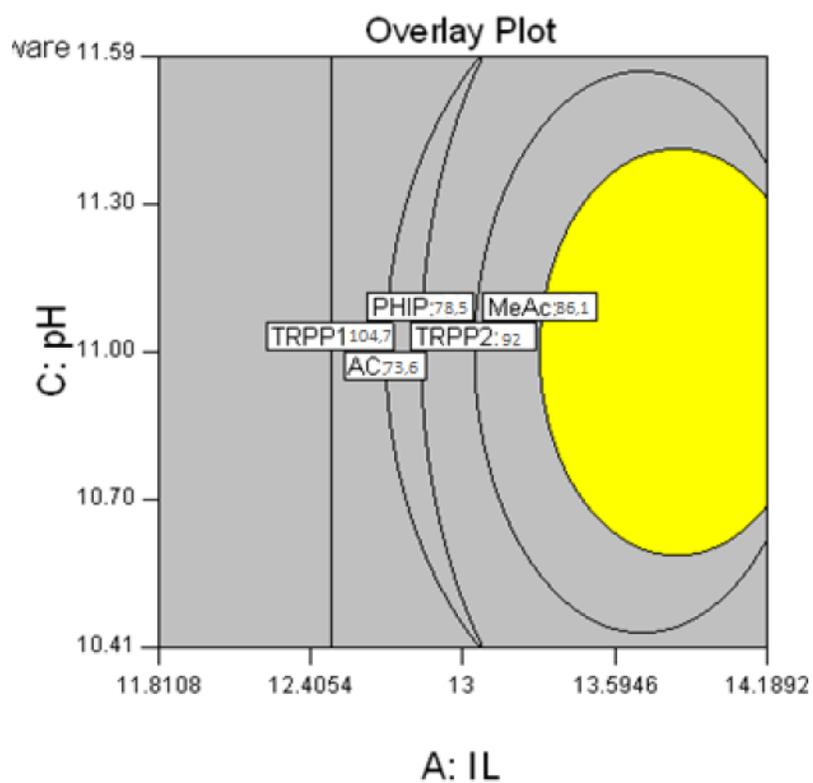


Figura 40: Superficie de Respuesta para el compilado de AAHs

CAPÍTULO 9 “VALIDACIÓN DEL METODO PROPUESTO”

La metodología MELLID se validó internamente mediante las cifras de mérito descritas en Sección 6.2 para verificar su desempeño: precisión, exactitud, reproducibilidad, recuperación, factor de enriquecimiento, límite de detección, límite de cuantificación y rango lineal.

9.1 Precisión

La precisión del método completo se evaluó en términos de “repetibilidad” y “precisión intermedia”. La *repetibilidad* fue evaluada en el mismo día por aplicación del método propuesto a tres muestras (réplicas experimentales) y la *precisión intermedia* se evaluó a partir de seis experimentos idénticos e independientes realizados durante tres días consecutivos con un procedimiento similar al del estudio de repetitividad. Los resultados se expresaron como desviaciones estándar relativas (RSD%) de las áreas de pico de acuerdo a la ecuación 14 y se muestran en la **Tabla 18** Como se puede observar, los resultados son muy aceptables teniendo en cuenta la complejidad y las etapas de preparación de la muestra.

Tabla 18: Repetibilidad del procedimiento propuesto para cada amina después de MELLID.

Amina	Area promedio	Repetibilidad n = 6	RSD% n= 6
TRPP-2	5130	8,48	10,60
PHIP	2212	5,00	5,40
TRP-P-1	615	4,30	6,90
A α C	6560	7,80	10,90
Me A α C	4279	6,70	8,50

9.2. Parámetros analíticos y cifras de mérito

Para la validación de la metodología MELLID optimizada mediante el procedimiento “etapa por etapa” se estudiaron las cifras de mérito más importantes para un método analítico, tal como límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ), rango lineal, exactitud y precisión, factores de enriquecimiento y recuperación.

La linealidad de la respuesta se estableció a partir de seis niveles de concentración muy diferentes realizados por triplicado para cada amina. 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 6.2.3**. Este procedimiento se aplica hasta que los datos se puedan ajustar a una línea recta de acuerdo a un criterio estadístico *F*.

9.3 Rectas de calibración y efectos de matriz

Las rectas de calibración se realizaron dentro del rango lineal, en presencia de matriz y sin la misma, a fines de estudiar si hay efectos de matriz en la señal observada (área de pico). Se construyeron 3 rectas de calibración: (1) recta de calibración para estándares (patrón puro) de cada amina disueltas en metanol, (2) por adición a la muestra obtenida después del procedimiento MASE de sucesivas cantidades de solución estándar y (3) por la adición estándar a la muestra obtenida luego del procedimiento MELLID. En el primer caso se utilizó metanol dada la baja solubilidad de las AAHs en agua. Sin embargo, el metanol eluye con el frente de solvente y las AAHs son detectadas en la fase móvil sin matriz de muestra, tal como hubiese ocurrido si se hubiesen preparado en agua pura. En la **Tabla 19** se

muestran las tres rectas de calibración mencionadas, etiquetadas como “metanol”, “matriz MASE” y “matriz MELIID”, respectivamente. Las pendientes obtenidas se compararon estadísticamente usando un test *t* de acuerdo a la ecuación 26 y 27 del Capítulo 6.

Se observa en la **Tabla 19** que las pendientes de las curvas de calibración son muy diferentes en estas matrices. De hecho, los valores de *t* calculados son más altos que el *t'* y, en consecuencia, hay efecto de matriz. Por lo tanto, se debe emplear el método de adición estándar para la cuantificación de las AAHs ya que permite corregir los efectos de la matriz.

Tabla 19: Rectas de calibración- efecto de matriz

Amina	Rango Lineal (mg/l)	Recta de Calibración (n=6)	R ²	Matriz	<i>t'</i> (eq.26)	<i>t</i> (tabulados)
Trp-P-1	0,0019- 0,24	$y = (22863 \pm 460)x + (888 \pm 84)$	0,99	metanol	---	---
		$y = (11710 \pm 141)x - (84 \pm 2)$	0,99	matriz MASE	23,18	2,46
		$y = (11813 \pm 215)x + (872 \pm 12)$	0,99	matriz MELIID	27,21	2,47
PHIP	0,002- 0,5	$y = (11833 \pm 165)x + (258 \pm 20)$	0,99	metanol	---	---
		$y = (9482 \pm 214)x + (112 \pm 23)$	0,99	matriz MASE	8,70	2,62
		$y = (14082 \pm 115)x + (47 \pm 7)$	0,99	matriz MELIID	10,6	2,92
Trp-P-2	0,001- 0,31	$y = (30327 \pm 734)x + (459 \pm 50)$	0,99	metanol	---	---
		$y = (41653 \pm 3100)x + (364 \pm 188)$	0,95	matriz MASE	3,55	2,86
		$y = (38421 \pm 687)x + (279 \pm 37)$	0,99	matriz MELIID	8,05	3,59
AαC	0,007- 0,35	$y = (21601 \pm 608)x + (332 \pm 104)$	0,99	metanol	---	---
		$y = (19376 \pm 423)x - (621 \pm 73)$	0,99	matriz MASE	3,00	2,91
		$y = (29374 \pm 774)x - (50 \pm 37)$	0,99	matriz MELIID	7,89	2,93
MeAαC	0,008-0,48	$y = (15718 \pm 296)x + (253 \pm 47)$	0,99	metanol	---	---
		$y = (15857 \pm 957)x - (200 \pm 80)$	0,99	matriz MASE	0,13	2,70
		$y = (23431 \pm 488)x - (6 \pm 1,7)$	0,99	matriz MELIID	13,51	3,89

Los límites de detección (LOD) se evaluaron como tres veces la relación señal a ruido (3S/N) con el fin de ser comparada con los reportados en la literatura, mientras que los límites de cuantificación (LOQ) se evaluaron como diez veces la relación señal a ruido (10S/N). Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 20**. Se puede observar que se lograron LOD muy bajos (entre 0,06 y 0,3 ng/mL). Para Trp-P-1, el LOD es similar a los reportados por otros autores, algo superiores para Trp-P-2 y PhIP y menores para AαC and MeAαC [14,27,56,57,145,167,169]. Hay que destacar que los LOD obtenidos en este trabajo son mucho más bajos que los obtenidos para el análisis de AAHs en muestras de carne por extracción mediante fluido supercrítico (SFE) combinada con electroforesis capilar y detección fluorimétrica [83]. Por otra parte, el LOQ para PhIP está muy cerca del encontrado por Murray en 1993 [44], que utiliza extracción líquido-líquido y GC-MS para analizar carnes rebosadas y carne frita.

Tabla 20: LOD encontrados en este trabajo y en la literatura, LOQ y rango lineal (RL)

Analito	LOD		LOQ		RL	LOD ^b (ng/mL)	
	ng/mL	ng/g	ng/mL	ng/g		[1]	[2]
Trp-P-2	0,58	0,06	1,90	0,21	1,96-120	0,30	0,41
PhIP	0,61	0,07	2,04	0,23	2,04-200	0,40	--
Trp-P-1	0,35	0,04	1,17	0,13	1,17-300	0,30	0,16
AαC	2,00	0,20	7,30	0,81	7,30-280	5,00	1,62
MeAαC	2,40	0,30	8,01	0,89	8,01-250	5,00	2,14

^b [1] K. Skog, K Augustsson, G. Steineck, M Stermberg, M Jägerstad, *Food Chem Toxicol.*, 35 (1997) 555. [2] A. Martín-Calero, V. Pino, J.H.Ayala, V. Gonzales, A.M Alfonso, *J. Liq. Chromatogr. Rel Technol.*, 30 (2007) 27.

9.4 Recuperación y Factor de Enriquecimiento

Dado que no se cuenta con muestras patrón de carnes cocidas, la exactitud de las determinaciones se calcularon mediante ensayos de recuperación. Por lo tanto, las concentraciones encontradas mediante el “método del sobreagregado” debe corregirse por el factor de recuperación (R%) encontrado. Se añadieron cantidades crecientes y conocidas, por triplicado, de cada AAH a la muestra pulverizada de hamburguesa. Las recuperaciones se calcularon de acuerdo a la ecuación 21 (Sección 6.3) donde C_{IL} es la concentración de cada amina luego de la extracción dispersiva y $C_{a,i}$ es la concentración respectiva en la fase acuosa inicial, la cual contiene la amina originalmente presente en la muestra determinada mediante el “método del sobreagregado” más la cantidad de amina aditivada.

Con dichas concentraciones se puede obtener el factor de enriquecimiento, EF, de acuerdo a la ecuación 20 de la sección 6.3. Empleando luego la ecuación 21, se calcularon las recuperaciones. Como se puede observar de **Tabla 21**, las recuperaciones más bajas fueron de 67% para Trp-P-2 y las más altas de casi 100% para Trp-P-1 mientras que los los EF más bajos son de 19 para Trp-P-2 y 30 para Trp-P-1. Las desviaciones estándar para las recuperaciones fueron muy bajos en todos los casos.

La R% debe ser considerada como una recuperación “hipotética o potencial” y no la “verdadera” recuperación ya que se asume en la determinación que los analitos adicionados interactúan con los componentes de la matriz de la misma manera que los analitos originalmente presentes en la muestra. Como las concentraciones en cada fase se determinan a través de rectas de calibración para calcular EF, y como la relación de fases es conocida, entonces el cálculo de R% es directo. Estas concentraciones se obtuvieron de las rectas de calibración de la **Tabla 19** (ecuaciones etiquetadas como “Matriz MASE” y “Matriz MELLID”, respectivamente).

Tabla 21: Recuperación porcentual (R%) y factor de enriquecimiento (EF) para las AAHs estudiadas.

Amina	Conc. Adicionada (ng/mL)	Conc. Encontrada (ng/ml)	EF	R%	RSD%
Trp-P-1	3,0	3,00	30	100	1,83
	1,5	1,47	29	98	1,37
	0,4	0,38	28	96	1,67
PhIP	2,0	1,58	21	79	1,07
	1,0	0,76	22	76	0,65
	0,5	0,38	22	77	1,60
Trp-P-2	12,0	8,04	19	67	0,06
	3,0	2,01	19	67	1,34
	3,0	2,04	20	68	0,87
AαC	7,0	4,90	20	70	0,30
	3,5	2,55	21	73	0,29
	1,5	1,06	21	71	1,57
MeAαC	5,0	4,20	24	84	0,81
	3,5	2,94	24	84	1,70
	1,5	1,26	24	84	0,38

Empleando las condiciones óptimas obtenidas mediante el DCC, se obtuvieron las siguientes recuperaciones para las diferentes AAHs:

- ✓ **Trp-P-1:** 104,68%
- ✓ **Trp-P-2:** 91,99%
- ✓ **PhIP:** 78,45%
- ✓ **AαC:** 73,61%
- ✓ **MeAαC:** 86,07%

9.5. Contenidos de AAHs presentes en hamburguesas de diferentes marcas comerciales y luego de diferentes formas de cocción

Se determinó el contenido de AAHs en hamburguesas de diferentes marcas comerciales, además de la estudiada en la anterior parte de la tesis, se emplearon diferentes formas de cocción (al horno y a la plancha) para hamburguesas de diferentes marcas comerciales, cocidas a 133, 208, 253 y 300°C. El análisis de las muestras se realizó mediante la técnica MELLID optimizada mediante DCC. En el caso de las hamburguesas cocidas a la plancha a 133°C, no se observó la aparición de ninguna de las AAHs en ninguna de las formas de cocción, excepto la AαC en el caso de la hamburguesa adquirida en una carnicería local, como se observa de la **Figura 41 A**). Sin embargo, la señal detectada está por debajo del LOQ, por lo que no pudo ser cuantificada. Estos resultados eran esperados ya que se conoce de la literatura que las aminas comienzan a aparecer a 200°C, como se dijo en la Sección 1.2 del Capítulo 1. A 208 °C, la máxima temperatura alcanzada en un grill o “plancha” se detectaron las aminas Trp-P-2, Trp-P-1 y phIP por encima del LOQ pero AαC y MeAαC no pudieron ser detectadas en **tabla 22** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 22: Contenido de AAHs de la marca Patty (classic) cocidas a la plancha a 208°C.

Aminas	Contenido de aminas	
	Hamburguesa Patty	
	(ng/g)	(ng/ml)
Trp-P-2	4,30±0,40	12,90
PhIP	1,90±0,20	5,70
Trp-P-1	0,42±0,04	1,26
AC	ND	--
MeAc	ND	--

La cocción en horno permitió alcanzar una temperatura mayor, 253°C. En este caso se estudiaron diferentes marcas comerciales. De **Tabla 23** se observa nuevamente la aparición de las mismas tres aminas detectadas en el caso anterior pero en el caso de la marca Patty se puede observar que la cantidad de aminas detectada es mayor. Para las marcas Good Mark y Swift se detectan cantidades menores a la marca Patty pero nuevamente en la muestra de hamburguesa obtenida en una carnicería local se obtienen cantidades mayores de Trp-P-2 y PhIP y similares de Trp-P-1. El mayor contenido de AAHs en la muestra de carnicería podría atribuirse a un mayor contenido de grasa.

Tabla 23: Contenido de AAHs (ng/g) de diferentes marcas comerciales cocidas en horno a 253°C

Aminas	Good Mark	Swift	Patty Clasic	Carnicería Local
TRP-P2	2,3±0,50	1,9±0,30	4,7±0,80	5,6± 0,6
PHIP	1,3±0,20	0,3±0,05	2,2±0,30	3,7± 0,5
TRP-P1	0,5±0,05	0,48±0,11	1,7±0,09	1,6± 0,3
AαC	ND	ND	ND	D /NQ
MeAαC	ND	ND	ND	D/NQ

A 300°C se observa de **Tabla 24** un marcado aumento de todas las aminas en casi todas las marcas comerciales comparado con las muestras cocidas a temperaturas inferiores. Inclusive aparecen las aminas AαC y MeAαC especialmente en la hamburguesa de carnicería. En **Figura 41** se muestran los cromatogramas obtenidos a las diferentes temperaturas.

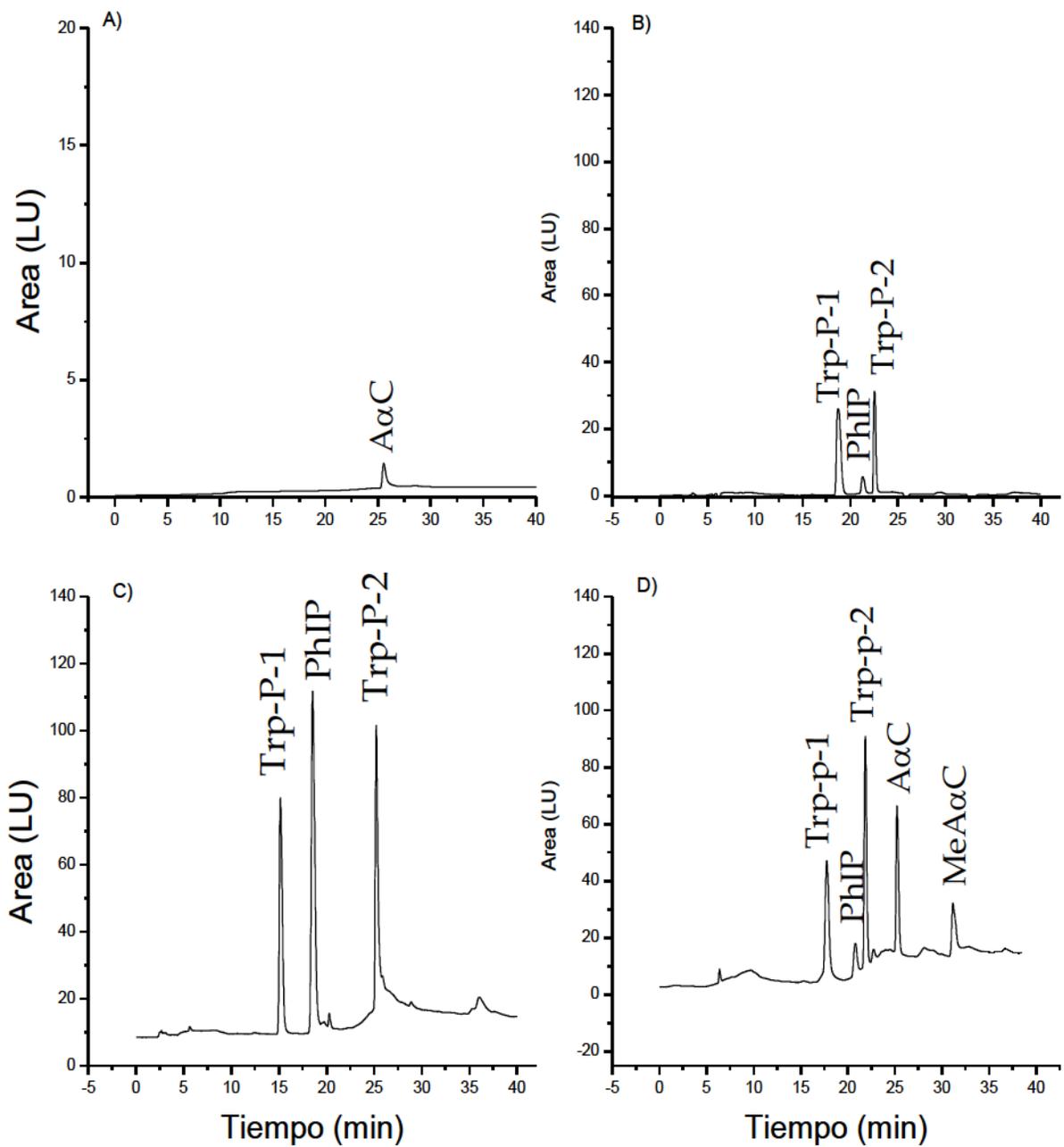


Figura 41: Cromatogramas obtenidos a diferentes temperaturas de cocción para hamburguesa: a) asada a la plancha a 133°C; b) asada en horno a 208°C; c) asada en horno a 253°C y d) asada en horno a 300°C (Se inyectó una dilución 1:5).

Tabla 24: Contenido de AAHs en (ng/g) de diferentes marcas comerciales cocidas en horno a 300°C.

Aminas	Good Mark	Swift	Patty Clasic	Carnicería Local
Trp-P-2	3,50±0,05	2,60±0,2	5,20±0,6	6,30±0,8
PhIP	2,30±0,30	0,70 ±0,4	4,65±0,3	5,10±0,7
Trp-P1	0,20±0,01	0,6±0,07	0,40±0,07	4,25±0,6
AαC	0,82±0,02	0,95±0,2	Nd	2,80±0,2
MeAαC	Nd	0,35±0,1	Nd	0,23±0,1

CAPÍTULO 10 “CONCLUSIONES”

- ✓ En este trabajo de Tesis se ha desarrollado una nueva metodología analítica para la determinación de aminas aromáticas heterocíclicas (AAHs) desde hamburguesas cocidas. La metodología consistió en una microextracción dispersiva líquido-líquido empleando un líquido iónico (MELLID) y posterior determinación mediante HPLC con detección de fluorescencia (FLD) para la cuantificación y de arreglo de diodos (DAD) para el análisis cualitativo.

- ✓ Se realizó un acondicionamiento y limpieza previa de la muestra empleando energía de microondas y *n*-heptano como solvente de limpieza. Este proceso ayudó a despegar los analitos de la matriz. El extracto obtenido fue sometido posteriormente a la MELLID *in-situ* (generando el líquido iónico extractante en la propia matriz) para extraer y pre-concentrar los analitos.

- ✓ Se optimizaron los parámetros del proceso de limpieza empleando extracción acelerada con microondas (MASE) tales como tiempo de extracción, potencia, cantidad del solvente de extracción y número de etapas, y posteriormente se estudiaron las variables que influyen en la eficacia de la técnica de extracción dispersiva, empleando un procedimiento “paso a paso” y un diseño factorial (Diseño Central Compuesto). Los valores optimizados mediante el procedimiento DCC fueron muy próximos a los obtenidos mediante la optimización “paso a paso”.

- ✓ La ventajas de la metodología MELLID *in-situ* para la extracción y cuantificación de estos compuestos cancerígenos/mutagénicos radican en la muy pequeña cantidad de líquido iónico empleada, la rapidez (alrededor 40 min/muestra) comparadas con otras técnicas tradicionales más tediosas como la extracción en fase sólida. Los altos rendimientos obtenidos, buena

reproducibilidad y los bajos límites de detección logrados comparados con otras técnicas; la precisión del método (tanto intra-día como inter-día), es aceptable en todos los casos de acuerdo a la complejidad de la muestra y los ensayos de recuperación realizados demuestran que el método propuesto asegura altos porcentajes de recuperación y adecuadas desviaciones estándar relativas, sobre todo al comparar con trabajos de la literatura realizados sobre matrices de carne.

✓ En resumen se puede decir que el procedimiento, aunque ha sido aplicado a una matriz sumamente compleja, es bastante robusto y eficiente, principalmente al combinar las ventajas de la técnica MASE (cortos tiempo de análisis, bajo costo, poco consumo de disolvente) con la MELLID (simple, rápida, eficiente, con altos factores de pre-concentración y bajo consumo de disolventes orgánicos), por lo que puede decirse que la técnica propuesta tiene muy bajo impacto ambiental.

BIBLIOGRAFÍA

1. Thibaud, H. P.; Paul, G. K.; Felton, J. S.; Hsieht, D. P. Mutagenicity and Chemical Analysis of Fumes from Cooking Meat. **1994**, 1502-1510.
2. Nagao, M.; Honda, M.; Seino, Y.; Yahagi, T.; Sugimura, T. Mutagenicities of smoke condensates and the charred surface of fish and meat. *Cancer Lett.* **1977**, 2, 221-226.
3. Jägerstad, M.; Skog, K.; Grivas, S.; Olsson, K. Formation of heterocyclic amines using model systems. *Mutat. Res.* **1991**, 259, 219-233.
4. Johansson, M.; Skog, K.; Jägerstad, M. Effects of edible oils and fatty acids on the formation of mutagenic heterocyclic amines in a model system. *Carcinogenesis* **1993**, 14, 89-94.
5. Kälble, T.; Tricker, A. R.; Berger, M.; Amelung, F.; Waldherr, R.; Hothorn, L.; Möhring, K.; Staehler, G. Tumor induction in a rat model for ureterosigmoidostomy without evidence of nitrosamine formation. *J. Urol.* **1991**, 146, 862-866.
6. Lijinsky, W. Summation and new approaches to diet and cancer. *Cancer Res.* **1983**, 43, 2441s-2443s.
7. Khan, M. R.; Busquets, R.; Santos, F. J.; Puignou, L. New method for the analysis of heterocyclic amines in meat extracts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1194, 155-60.
8. McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E.; Ames, B. N. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1975**, 72, 5135-5139.
9. Oz, F.; Kaban, G.; Kaya, M. Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with Oasis extraction method. *LWT - Food Sci. Technol.* **2010**, 43, 1345-1350.
10. Messner, C.; Murkovic, M. Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. **2004**, 802, 19-26.

11. Einarsson, H. The effect of time, temperature, pH and reactants on the formation of antibacterial compounds in the Maillard reaction. *Leb. und Technol.* **1987**, *20*, 51–55.
12. Gross, G. A. Simple methods for quantifying mutagenic heterocyclic aromatic amines in food products. *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 1597–1603.
13. Skog, K.; Johansson, M.; Jägerstad, M. Factors affecting the formation and yield of heterocyclic amines. *Princess Takamatsu Symp.* **1995**, *23*, 9–19.
14. Skog, K.; Steineck, G.; Augustsson, K.; Jägerstad, M. Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residues. *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 861–867.
15. Skog, K.; Jägerstad, M. Effects of monosaccharides and disaccharides on the formation of food mutagens in model systems. *Mutat. Res.* **1990**, *230*, 263–272.
16. Skog, K.; Johansson, M.; Jägerstad, M. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake. *Food Chem. Toxicol.* **1998**, *36*.
17. Jägerstad, M.; Olsson, K.; Grivas, S.; Negishi, C.; Wakabayashi, K.; Tsuda, M.; Sato, S.; Sugimura, T. Formation of new heterocyclic amine mutagens by heating creatinine, alanine, threonine and glucose. *Mutat. Res.* **1984**, *126*, 239–244.
18. M.G. Knize, F.A. Dolbeare, K.L. Carroll, D.H. Moore II, J. S. F. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food Chem. Toxicol.* **1994**, *32*, 595–603.
19. Maite Sanz Alaejos, A. M. A. Factors That Affect the Content of Heterocyclic Aromatic Amines in Foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf. V* **2011**, *10*, 52–108.
20. Chemistry, F. Heterocyclic Amines : 1 . Kinetics of Formation of Polar and Nonpolar Heterocyclic Amines. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *70*, 173–179.
21. Arvidsson, P.; Boekel, M. A. J. S. Van; Skog, K.; Solyakov, A.; Jägerstad, M. Formation of Heterocyclic Amines in a Meat Juice Model System. **1999**, *64*, 216–221.
22. Felton JS, Fultz E, Dolbeare FA, K. M. Effect of microwave pretreatment on heterocyclic aromatic amine mutagens/carcinogens in fried beef patties. *Food Chem Toxicol.* **1994**, *32*, 897–903.

23. Balogh, Z.; Gray, J. I.; Gomaa, E. A.; Booren, A. M. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem. Toxicol. an Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **2000**, *38*, 395–401.
24. Michael Murkovic Chemistry, formation and occurrence of genotoxic heterocyclic aromatic amines in fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* *106*, 777–785.
25. Liao, G. Z.; Wang, G. Y.; Xu, X. L.; Zhou, G. H. Effect of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and duck breast. *Meat Sci.* **2010**, *85*, 149–54.
26. Jägerstad, M.; Reuterswärd, A. L.; Grivas, S.; Olsson, K.; Negishi, C.; Sato, S. Effects of meat composition and cooking conditions on the formation of mutagenic imidazoquinoxalines (MeIQ_x and its methyl derivatives). *Princess Takamatsu Symp.* **1985**, *16*, 87–96.
27. Skog, K.; Augustsson, K.; Steineck, G.; Stenberg, M.; Jägerstad, M. Polar and non-polar heterocyclic amines in cooked fish and meat products and their corresponding pan residues. *Food Chem. Toxicol. an Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **1997**, *35*, 555–565.
28. Salmon, C. P.; Knize, M. G.; Panteleakos, F. N.; Wu, R. W.; Nelson, D. O.; Felton, J. S. Minimization of heterocyclic amines and thermal inactivation of *Escherichia coli* in fried ground beef. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 1773–1778.
29. Lan, C. M.; Kao, T. H.; Chen, B. H. Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *802*, 27–37.
30. Salmon, C. P.; Knize, M. G.; Felton, J. S. Effects of marinating on heterocyclic amine carcinogen formation in grilled chicken. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, *35*, 433–441.
31. Salmon, C. P.; Knize, M. G.; Felton, J. S.; Zhao, B.; Seow, A. Heterocyclic aromatic amines in domestically prepared chicken and fish from Singapore Chinese households. *Food Chem. Toxicol.* **2006**, *44*, 484–492.
32. Johansson, M. A. E.; Jigerstad, M. Influence of pro- and antioxidants on the formation of mutagenic-carcinogenic heterocyclic amines in a model system. **1996**, *56*, 3–9.

33. Shin, H. S.; Rodgers, W. J.; Strasburg, G. M.; Gray, J. I. Reduction of heterocyclic aromatic amine formation and overall mutagenicity in fried ground beef patties by organosulfur compounds. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 3304–3308.
34. Kikugawa, K. Prevention of mutagen formation in heated meats and model systems. *Mutagenesis* **2004**, *19*, 431–439.
35. Knize, M. G.; Salmon, C. P.; Pais, P.; Felton, J. S. Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1999**, *459*, 179–193.
36. Skog, K.; Solyakov, a Heterocyclic amines in poultry products: a literature review. *Food Chem. Toxicol.* **2002**, *40*, 1213–21.
37. Pais, P.; Knize, M. G. Chromatographic and related techniques for the determination of aromatic heterocyclic amines in foods. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.* **2000**, *747*, 139–69.
38. Busquets, R.; Bordas, M.; Toribio, F.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Occurrence of heterocyclic amines in several home-cooked meat dishes of the Spanish diet. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *802*, 79–86.
39. Agüí, L.; Peña-Farfal, C.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. Determination of beta-carboline alkaloids in foods and beverages by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection at a glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *585*, 323–330.
40. L.F. Bjeldanes, M. M. M. Mutagens from the cooking of food. II. Survey by Ames/Salmonella test of mutagen formation in the major protein-rich foods of the American diet. *Food Chem. Toxicol.* **1982**, *20*, 357–363.
41. Khan, M. R.; Bertus, L. M.; Busquets, R.; Puignou, L. Mutagenic heterocyclic amine content in thermally processed offal products. *Food Chem.* **2009**, *112*, 838–843.
42. Poole, C. F. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. *J. Chromatogr. A* **1037**, 49–82.
43. Oz, F. Quantitation of heterocyclic aromatic amines in ready to eat meatballs by ultra fast liquid chromatography. *Food Chem.* **2011**, *126*, 2010–2016.
44. Stephen Murray, Anthony M. Lynch, Mark G. Knize, N. J. G. Quantification of the carcinogens 2-amino-3,8-dimethyl- and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-

f]quinoxaline and 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine in food using a combined assay based on gas chromatography – negative ion mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **1993**, 616, 211–219.

45. Janoszka, B.; Blaszczyk, U.; Warzecha, L.; Strózyk, M.; Damasiewicz-Bodzek, a; Bodzek, D. Clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines (aminoazaarenes) from heat-treated meat samples. *J. Chromatogr. A* **2001**, 938, 155–65.

46. Kataoka, H. Methods for the determination of mutagenic heterocyclic amines and their applications in environmental analysis. *J. Chromatogr. A* **1997**, 774, 121–142.

47. Toribio, F.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract. *J. Chromatogr. A* **1999**, 836, 223–233.

48. Stavric, B.; Matula, T. I.; Klassen, R.; Downie, R. H. Analysis of commercial bouillons for trace levels of mutagens. *Food Chem. Toxicol.* **1993**, 31, 981–987.

49. Stavric, B.; Lau, B. P.; Matula, T. I.; Klassen, R.; Lewis, D.; Downie, R. H. Heterocyclic aromatic amine content in pre-processed meat cuts produced in Canada. *Food Chem. Toxicol.* **1997**, 35, 199–206.

50. Gross, G. A.; Gruter, A. Quantitation of mutagenic/carcinogenic heterocyclic aromatic amines in food products. In *Journal of Chromatography*; 1992; Vol. 592, pp. 271–278.

51. Fay, L. B.; Ali, S.; Gross, G. A. Determination of heterocyclic aromatic amines in food products: automation of the sample preparation method prior to HPLC and HPLC-MS quantification. *Mutat. Res.* **1997**, 376, 29–35.

52. Knize, M. G.; Felton, J. S. Formation and human risk of carcinogenic heterocyclic amines formed from natural precursors in meat. *Nutr. Rev.* **2005**, 63, 158–65.

53. Toribio, F.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Comparison of different commercial solid-phase extraction cartridges used to extract heterocyclic amines from a lyophilised meat extract. *J. Chromatogr. A* **2000**, 880, 101–112.

54. Rivera, L.; Curto, M. J. C.; Pais, P.; Galceran, M. T.; Puignou, L. Solid-phase extraction for the selective isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons, azaarenes and heterocyclic aromatic amines in charcoal-grilled meat. *J. Chromatogr. A* **1996**, 731, 85–94.

55. Yang, M. J.; Pawliszyn, J. Solid-Phase Microextraction. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 844–853.
56. Lord, H.; Pawliszyn, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. *J. Chromatogr. A* **2000**, *885*, 153–193.
57. Cardenes, L.; Ayala, J. H.; Afonso, A. M.; Gonzalez, V. Solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for the analysis of heterocyclic aromatic amines. *J Chromatogr A* **2004**, *1030*, 87–93.
58. Sanz Alaejos, M.; Ayala, J. H.; Gonzalez, V.; Afonso, A. M. Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *862*, 15–42.
59. Robert J Turesky, Jason Taylor, Laura Schnackenberg, James P Freeman, R. D. H. Quantitation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines and detection of novel heterocyclic aromatic amines in cooked meats and grill scrapings by HPLC/ESI-MS. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*(8), 3248–58.
60. Toribio, F.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Ion-trap tandem mass spectrometry for the determination of heterocyclic amines in food. In *Journal of Chromatography A*; 2002; Vol. 948, pp. 267–281.
61. Toribio, F.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Determination of heterocyclic aromatic amines in meat extracts by liquid chromatography-ion-trap atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. In *Journal of Chromatography A*; 2000; Vol. 869, pp. 307–317.
62. Barceló-Barrachina, E.; Moyano, E.; Galceran, M. T.; Lliberia, J. L.; Bagó, B.; Cortes, M. A. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of heterocyclic amines in food. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1125*, 195–203.
63. Sentellas, S.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M. T. Optimization of a clean-up procedure for the determination of heterocyclic aromatic amines in urine by field-amplified sample injection-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1032*, 193–201.
64. Vanderlaan, M.; Watkins, B. E.; Hwang, M.; Knize, M. G.; Felton, J. S. Monoclonal antibodies for the immunoassay of mutagenic compounds produced by cooking beef. *Carcinogenesis* **1988**, *9*, 153–160.
65. Vanderlaan, M.; Hwang, M.; Djanegara, T. Immunoaffinity purification of dietary heterocyclic amine carcinogens. *Environ. Health Perspect.* **1993**, *99*, 285–7.

66. Ashri, N. Y.; Abdel-Rehim, M. Sample treatment based on extraction techniques in biological matrices. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 2003–2018.
67. Berthod, A.; Carda-Broch, S. Determination of liquid-liquid partition coefficients by separation methods. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1037*, 3–14.
68. Snyder, L. R.; Glajch, J. L.; Kirkland, J. J. *Practical HPLC method development*; Wiley, Ed.; Wiley, 1997; Vol. 2nd ed.
69. Agudo, M.; Rios, A.; Valcarcel, M. Continuous liquid-liquid extraction with on-line monitoring for the determination of anionic surfactants in waters. *Analyst* **1994**, *119* (9), 2097–2100.
70. Mitra, S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry CHEMICAL ANALYSIS*; Mitra, S., Ed.; Chemical Analysis; Wiley-Interscience, 2003; Vol. 81.
71. Rezaee, M.; Assadi, Y.; Milani Hosseini, M.-R.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1116*, 1–9.
72. Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-Borges, J.; Asensio-Ramos, M.; Rodríguez-Delgado, M. A. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7336–7345.
73. Anthemidis, A. N.; Ioannou, K.-I. G. Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination. A review. *Talanta* **2009**, *80*, 413–421.
74. Zhao, R.-S.; Wang, X.; Li, F.-W.; Wang, S.-S.; Zhang, L.-L.; Cheng, C.-G. Ionic liquid/ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 830–836.
75. Yao, C.; Li, T.; Twu, P.; Pitner, W. R.; Anderson, J. L. Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid-liquid microextraction using functionalized ionic liquids. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 1556–66.
76. Liu, Y.; Zhao, E.; Zhu, W.; Gao, H.; Zhou, Z. Determination of four heterocyclic insecticides by ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction in water samples. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 885–91.
77. Ravelo-Pérez, L. M.; Hernández-Borges, J.; Herrera-Herrera, A. V; Rodríguez-Delgado, M. A. Pesticide extraction from table grapes and plums using ionic liquid

based dispersive liquid-liquid microextraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *395*, 2387–95.

78. Pena, M. T.; Casais, M. C.; Mejuto, M. C.; Cela, R. Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *J. Hazard. Mater.* **2010**, *1216*, 6356–6364.

79. Li, S.; Gao, H.; Zhang, J.; Li, Y.; Peng, B.; Zhou, Z. Determination of insecticides in water using in situ halide exchange reaction-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 3178–85.

80. Han, D.; Yan, H.; Row, K. H. Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction for sensitive determination of aromatic amines in environmental water. *J. Sep. Sci.* **2011**, *34*, 1184–1189.

81. Farahani, H.; Yamini, Y.; Shariati, S.; Khalili-Zanjani, M. R.; Mansour-Baghahi, S. Development of liquid phase microextraction method based on solidification of floated organic drop for extraction and preconcentration of organochlorine pesticides in water samples. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *626*, 166–173.

82. Lili, L.; Xu, H.; Song, D.; Cui, Y.; Hu, S.; Zhang, G. Analysis of volatile aldehyde biomarkers in human blood by derivatization and dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 2365–2370.

83. Rezaee, M.; Yamini, Y.; Faraji, M. Evolution of dispersive liquid - liquid microextraction method. *J. Chromatogr. A* **2010**, *1217*, 2342–2357.

84. Dadfarnia, S.; Haji Shabani, A. M. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals--a review. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *658*, 107–119.

85. Joshi, M. D.; Anderson, J. L. Recent advances of ionic liquids in separation science and mass spectrometry. *RSC Adv.* **2012**, *2*, 5470.

86. Fan, Y. C.; Hu, Z. L.; Chen, M. L.; Tu, C. S.; Zhu, Y. Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction of aromatic amines in water samples. *Chinese Chem. Lett.* **2008**, *19*, 985–987.

87. Li, S.; He, C.; Liu, H.; Li, K.; Liu, F. Ionic liquid-based aqueous two-phase system, a sample pretreatment procedure prior to high-performance liquid

chromatography of opium alkaloids. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *826*, 58–62.

88. Najdanovic-Visak, V.; Lopes, J. N. C.; Visak, Z. P.; Trindade, J.; Rebelo, L. P. N. Salting-out in Aqueous Solutions of Ionic Liquids and K₃PO₄: Aqueous Biphasic Systems and Salt Precipitation. *Int. J. Mol. Sci.* **2007**, *8*, 736–748.

89. Padró, J. M.; Marsón, M. E.; Mastrantonio, G. E.; Altchek, J.; García-Bournissen, F.; Reta, M. Development of an ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of nifurtimox and benznidazole in human plasma. *Talanta* **2013**, *107*, 95–102.

90. Chan, C.-H.; Yusoff, R.; Ngoh, G.-C.; Kung, F. W.-L. Microwave-assisted extractions of active ingredients from plants. *J. Chromatogr. A* **2011**, *1218*, 6213–25.

91. R. Cela, R. A. Lorenzo, M. C. C. *Técnicas de separación en química analítica; Síntesis*; Madrid, 2002.

92. Li, H.; Li, G. K.; Zhang, Z. X. Development of microwave assisted extraction. *Chinese J. Anal. Chem.* **2003**, *31*, 1261–1268.

93. Jung, K.-H.; Shin, H.-S. Influence of Microwave Pretreatment on the Formation of Heterocyclic Amines in Fried Beef Patties. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **2009**, *29*, 719–725.

94. Smith, F. E.; Arsenault, E. A. Microwave-assisted sample preparation in analytical chemistry. *Talanta* **1996**, *43*, 1207–1268.

95. Berthod, a; Ruiz-Angel, M. J.; Carda-Broch, S. Ionic liquids in separation techniques. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 6–18.

96. Docherty, K. M.; Kulpa, Jr., C. F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids. *Green Chem.* **2005**, *7*, 185.

97. Gathergood, N.; Scammells, P. J.; Garcia, M. T. Biodegradable ionic liquids Part III. The first readily biodegradable ionic liquids. *Green Chem.* **2006**, *8*, 156–160.

98. Gathergood, N.; Garcia, M. T.; Scammells, P. J. Biodegradable ionic liquids: Part I. Concept, preliminary targets and evaluation. *Green Chem.* **2004**, *6*, 166.

99. Garcia, M. T.; Gathergood, N.; Scammells, P. J. Biodegradable ionic liquids: Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chem.* **2005**, *7*, 9.

100. Feng, R. Revisiting Characteristics of Ionic Liquids: A Review for Further Application Development. *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif)*. **2010**, *01*, 95–104.
101. Wasserscheid, P.; Keim, W. Ionic Liquids-New “Solutions” for Transition Metal Catalysis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, *39*, 3772–3789.
102. Jastorff B., Störmann R., Ranke J., Mölter K., Stock F., Oberheitmann B., Hoffmann W., Hoffmann J., Nüchter M., O. B. and F. J. How hazardous are ionic liquids? Structure–activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chem.* **2003**, *5*, 136–142.
103. Visser, AE; Holbrey, JD; Rogers, R. Hydrophobic ionic liquids incorporating N-alkylisoquinolinium cations and their utilization in liquid-liquid separations. *Chem. Commun.* **2001**, *23*, 2484 – 2485.
104. D. R. MacFarlane, *† P. Meakin, † J. Sun, † N. Amini, and M. F. Pyrrolidinium Imides: A New Family of Molten Salts and Conductive Plastic Crystal Phases. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103* (20), 4164–4170.
105. Marsh, K. .; Boxall, J. .; Lichtenthaler, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures – a review. *Fluid Phase Equilib.* **2004**, *219*, 93–98.
106. Cinzia Chiappe*, D. P. Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 275–297.
107. Joglekar, H. G.; Rahman, I.; Kulkarni, B. D. The Path Ahead for Ionic Liquids. *Chem. Eng. Technol.* **2007**, *30*, 819–828.
108. Muldoon, M. J.; Gordon, C. M.; Dunkin, I. R. Investigations of solvent–solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **2001**, 433–435.
109. Park, S.; Kazlauskas, R. J. Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *J. Org. Chem.* **2001**, *66*, 8395–8401.
110. Berthod, A.; Talabardon, K. Centrifugal partition chromatography. Operating parameters and partition coefficient determination. *Chromatogr. Sci. Ser.* **1999**, *82*, 121–148.
111. Carda-Broch, S.; Berthod, A.; Armstrong, D. W. Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375*, 191–199.

112. Chauvin, Y.; Olivier-Bourbigou, H. Nonaqueous ionic liquids as reaction solvents. *Chemtech* **1995**, *25*, 26–30.
113. Alvarez-Guerra, M.; Irabien, A. Design of ionic liquids: an ecotoxicity (*Vibrio fischeri*) discrimination approach. *Green Chem.* **2011**, *13*, 1507.
114. Awad, W. H.; Gilman, J. W.; Nyden, M.; Harris, R. H.; Sutto, T. E.; Callahan, J.; Trulove, P. C.; DeLong, H. C.; Fox, D. M. Thermal degradation studies of alkyl-imidazolium salts and their application in nanocomposites. *Thermochim. Acta* **2004**, *409*, 3–11.
115. Yao C, A. J. Retention characteristics of organic compounds on molten salt and ionic liquid-based gas chromatography stationary phases. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216(10)*, 1658–1712].
116. Brennecke, J. F.; Maginn, E. J. Ionic liquids: Innovative fluids for chemical processing. *AIChE J.* **2001**, *47*, 2384–2389.
117. Anthony, J. L.; Aki, S. N. V. K.; Maginn, E. J.; Brennecke, J. F. Feasibility of using ionic liquids for carbon dioxide capture. *Int J Env. Tech Manag.* **2004**, *4*, 105–115.
118. Zhao, H.; Xia, S. Q.; Ma, P. S. Use of ionic liquids as “green” solvents for extractions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2005**, *80*, 1089–1096.
119. Dai, S.; Ju, Y. H.; Barnes, C. E. Solvent extraction of strontium nitrate by a crown ether using room-temperature ionic liquids. *J. Chem. Soc. Dalt. Trans.* **1999**, *2*, 1201–1202.
120. Padró, J. M.; Ponzinibbio, A.; Mesa, L. B. A.; Reta, M. Predicting the partitioning of biological compounds between room-temperature ionic liquids and water by means of the solvation-parameter model. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 2807–20.
121. Wei, G.-T.; Yang, Z.; Lee, C.-Y.; Yang, H.-Y.; Wang, C. R. C. Aqueous-organic phase transfer of gold nanoparticles and gold nanorods using an ionic liquid. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 5036–5037.
122. Bica, K.; Gaertner, P.; Rogers, R. D. Ionic liquids and fragrances - Direct isolation of orange essential oil. *Green Chem* **1997**, *13*, 1997–1999.
123. Mckee, M. A. Ionic liquids for agricultural residue removal from essential oils. *PCT Int Appl* 2013, 9pp.

124. Wang, J.-H.; Cheng, D.-H.; Chen, X.-W.; Du, Z.; Fang, Z.-L. Direct extraction of double-stranded DNA into ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate and its quantification. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 620–625.
125. Winefordner, J. D. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*; Primera.; Wiley-interscience 2003.
126. Ho, T. S.; Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E. Recovery, enrichment and selectivity in liquid-phase microextraction comparison with conventional liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A* **2002**, *963*, 3–17.
127. Fan, Y.; Zhang, S. Ionic liquid based in microextraction: A sample pretreatment technique for chromatographic analysis. **2011**, *2*, 282–288.
128. Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2005**, *817*, 3–12.
129. Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E. Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1184*, 132–142.
130. Atapattu, S. N.; Rosenfeld, J. M. Solid phase analytical derivatization as a sample preparation method. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1296*, 204–13.
131. Agudelo Mesa, L. B.; Padró, J. M.; Reta, M. Analysis of non-polar heterocyclic aromatic amines in beefburguers by using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-ionic liquid microextraction. *Food Chem.* **2013**, *141*, 1694–1701.
132. Xi, Z.; Hao, W.; Wang, P.; Cai, M. Ruthenium(III) chloride catalyzed acylation of alcohols, phenols, and thiols in room temperature ionic liquids. *Mol. Basel Switz.* **2009**, *14*, 3528–3537.
133. Hu, X.; Peng, J.; Huang, Y.; Yin, D.; Liu, J. Ionic liquids as mobile phase additives for high-performance liquid chromatography separation of phenoxy acid herbicides and phenols. *J. Sep. Sci.* **2009**, *32*, 4126–4132.
134. Cruz-Vera, M.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. Ionic liquid-based dynamic liquid-phase microextraction: application to the determination of anti-inflammatory drugs in urine samples. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1202*, 1–7.
135. Cruz-Vera, M.; Lucena, R.; Cárdenas, S.; Valcárcel, M. One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 6459–6465.

136. Mallah, M. H.; Shemirani, F.; Maragheh, M. G. Ionic liquids for simultaneous preconcentration of some lanthanoids using dispersive liquid-liquid microextraction technique in uranium dioxide powder. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 1947–1951.
137. Jafari, S. D. A. M. H. S. M. S. B. A. A. A novel ionic liquid/micro-volume back extraction procedure combined with flame atomic absorption spectrometry for determination of trace nickel in samples of nutritional interest. *J. Hazard. Mater* **2010**, *173*, 534–538.
138. Vidal, L.; Psillakis, E.; Domini, C. E.; Grané, N.; Marken, F.; Canals, A. An ionic liquid as a solvent for headspace single drop microextraction of chlorobenzenes from water samples. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *584*, 189–95.
139. Ye, C.-L.; Zhou, Q.-X.; Wang, X.-M. Headspace liquid-phase microextraction using ionic liquid as extractant for the preconcentration of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites at trace levels in water samples. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *572*, 165–71.
140. Miskolczy, Z.; Sebők-Nagy, K.; Biczók, L.; Göktürk, S. Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *400*, 296–300.
141. Bowers, J.; Butts, C. P.; Martin, P. J.; Vergara-Gutierrez, M. C.; Heenan, R. K. Aggregation behavior of aqueous solutions of ionic liquids. *Langmuir* **2004**, *20*, 2191–8.
142. Pino, V.; Germán-Hernández, M.; Martín-Pérez, A.; Anderson, J. L. Ionic Liquid-Based Surfactants in Separation Science. *Sep. Sci. Technol.* **2012**, *47*, 264–276.
143. Guerra-Abreu, L.; Pino, V.; Anderson, J. L.; Afonso, A. M. Coupling the extraction efficiency of imidazolium-based ionic liquid aggregates with solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. Application to polycyclic aromatic hydrocarbons in a certified reference sediment. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1214*, 23–9.
144. Du, F.-Y.; Xiao, X.-H.; Luo, X.-J.; Li, G.-K. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of polyphenolic compounds from medicinal plants. *Talanta* **2009**, *78*, 1177–84.
145. Pino, V.; Anderson, J. L.; Ayala, J. H.; González, V.; Afonso, A. M. The ionic liquid 1-hexadecyl-3-methylimidazolium bromide as novel extracting system for polycyclic aromatic hydrocarbons contained in sediments using focused microwave-assisted extraction. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1182*, 145–152.

146. Du, F.-Y.; Xiao, X.-H.; Li, G.-K. Application of ionic liquids in the microwave-assisted extraction of trans-resveratrol from *Rhizma Polygoni Cuspidati*. *J. Chromatogr. A* **2007**, *1140*, 56–62.
147. James N. Miller y Jane C. Miller *Estadística y Quimiometría para Química Analítica 4ed Miller-Miller*; Pearson Educación, S. ., Ed.; 4th ed.; Madrid, 2002.
148. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; Jong, S. De; J., L. P.; Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*; 1997; Vol. 38.
149. Anderson, M.; Whitcomb, P. Design of Experiments: Statistical Principles of Research Design and Analysis. *Technometrics* 2001, *43*, 236–237.
150. Kleijnen, J. P. C. Design of experiments: Overview. In *Proceedings - Winter Simulation Conference*; 2008; pp. 479–488.
151. C, M. D. *Diseño y análisis de experimentos*; 1991.
152. Swartz, M. E.; Krull, I. S. Validation of chromatographic methods. *Pharm. Technol.* 1998, *22*, 104–119.
153. *EURACHEM Guide. The fitness for Purpose of Analytical Method*; LGC Ltd.: Teddington, UK, 1998.
154. Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2002, *74*, 835–855.
155. Hartmann, C.; Smeyers-Verbeke, J.; Massart, D. L.; McDowall, R. D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1998, *17*, 193–218.
156. Van Eeckhaut, A.; Lanckmans, K.; Sarre, S.; Smolders, I.; Michotte, Y. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009, *877*, 2198–2207.
157. Topics, R. *The Fitness for Purpose of Analytical Methods A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*.
158. Horwitz, W. Evaluation of Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Anal. Chem* **1982**, *54*.

159. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A. *Principles of Instrumental Analysis*; 5th. Ed.; Harcourt Brace & Co.: Philadelphia.
160. Eurachem *EURACHEM Guide. The fitness for Purpose of Analytical Method. LGC Ltd.*
161. Currie, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995). *Anal. Chim. Acta* 1999, 391, 105-126.
162. Vander Heyden, Y.; Nijhuis, A.; Smeyers-Verbeke, J.; Vandeginste, B. G. M.; Massart, D. L. Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 2001; Vol. 24, pp. 723-753.
163. Aslan, N. Application of response surface methodology and central composite rotatable design for modeling and optimization of a multi-gravity separator for chromite concentration. *Powder Technol.* 2008, 185, 80-86.
164. Rajmohan, T.; Palanikumar, K. Application of the central composite design in optimization of machining parameters in drilling hybrid metal matrix composites. *Measurement* 2013, 46, 1470-1481.
165. Soján Uzcategui B., Nelson Huerta-Leidenz, L. A. Uzcátegui et al-ALAN1999.pdf 1999.
166. Proestos, C.; Komaitis, M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. *LWT - Food Sci. Technol.* 2008, 41, 652-659.
167. Santos, F. J.; Barceló-Barrachina, E.; Toribio, F.; Puignou, L.; Galceran, M. T.; Persson, E.; Skog, K.; Messner, C.; Murkovic, M.; Nabinger, U.; Ristic, a Analysis of heterocyclic amines in food products: interlaboratory studies. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2004, 802, 69-78.
168. Knize, M. G.; Dolbeare, F. A.; Carroll, K. L.; Moore, D. H.; Felton, J. S. Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties. *Food Chem. Toxicol.* 1994, 32, 595-603.
169. Fortunato, R.; Afonso, C. a. M.; Reis, M. a. M.; Crespo, J. G. Supported liquid membranes using ionic liquids: study of stability and transport mechanisms. *J. Memb. Sci.* 2004, 242, 197-209.

Publicación en revista científica

Analysis of non-polar heterocyclic aromatic amines in beefburguers by using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-ionic liquid microextraction L. B. Agudelo Mesa, J. M. Padró M. Reta, *Food Chemistry* 141, 1694–1701 Mayo 2013

Presentaciones a reuniones científicas nacionales e internacionales

1. **IV Congreso Iberoamericano de Química Analítica, X Encuentro Nacional de Química Analítica y Ambiental**, Extracción con Micro extracción dispersiva in situ liquido-liquido iónico de aminas aromáticas heterocíclicas en carnes cocidas. Concón-Chile, Noviembre 13-15 de 2010
2. **VI Congreso Argentino de Química Analítica**. Extracción Asistida por Microondas Combinada con Microextracción Dispersiva in situ Líquido-liquido Ionico de Aminas Aromáticas Heterocíclicas en Carnes Cocidas. Septiembre de 2011. Santa Fe, Argentina
3. **XIV Congresso Latino-Americano de Cromatografia e Técnicas Relacionadas (COLACRO)**. New method of Analysis of non-polar heterocyclic aromatic amines in beefburguers by using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction with a ionic liquid. Octubre 2012. Florianópolis (SC), Brasil
4. **39th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques in Amsterdam**. Determination of heterocyclic aromatic amines in beefburguers by using microwave-assisted extraction (MASE) and dispersive liquid-ionic liquid microextraction (DLILME). Optimization of the DLILME by using a Central Composite Design procedure. Junio 2013. Amsterdam, Holanda
5. **VII Congreso Argentino de Química Analítica** -Extracción con microondas y líquidos iónicos para la determinación de aminas aromáticas heterocíclicas

en hamburguesas comerciales. Optimización mediante Diseño Central Compuesto. Octubre 2013, Mendoza - Argentina