



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

---

**Trabajo de Tesis Doctoral:**

***Desarrollo de métodos de extracción empleando líquidos iónicos  
y polímeros monolíticos para la determinación de  
contaminantes ambientales en agua de río.***

---

**Tesista: Lic. Giselle Medina**

**Director/a: Dr. Mario Reta**

**Año: 2019**

El presente trabajo de Tesis fue realizado en el Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Métodos Analíticos (LIDMA) de la División Química Analítica de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección del Dr. Mario Reta.

El mismo se pone en 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. Giselle Medina**

**Dr. Mario Reta**  
**Director**



*“Nadie triunfa sin esfuerzo. Aquellos que  
triunfan deben su éxito a la  
perseverancia”*

***Ramana Maharshi.***

*“La educación es el arma más poderosa  
que puedes usar para cambiar el mundo”*

***Nelson Mandela***

## AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Exactas y a la Universidad Nacional de La Plata por haberme formado como Licenciada en Química y por darme lugar para mi formación postdoctoral.

Al CONICET por haberme otorgado la beca que me permitió la realización del presente trabajo de Tesis.

Al Dr. Mario Reta por haber dirigido el trabajo de tesis, por su predisposición, su tiempo dedicado, sus conocimientos compartidos y su apoyo constante. Gracias por la confianza para la toma de decisiones y el apoyo en las ideas.

A la Dra. Cecilia Castells por abrirme las puertas del LIDMA, por brindar su conocimiento y así impulsarme a seguir por este camino.

A todos y cada uno de mis compañeros del LIDMA, los cuales hicieron más llevaderas tantas horas de laboratorio, con tantos intentos fallidos pero tantos momentos lindos compartidos. Por todos los consejos, los debates diarios, las charlas y la ayuda incondicional. Gracias a Sonia, Leo, Lilian, Nico, Juan y Agus. Y muy en especial a las chicas LIDMA, a Car, Romi, Fiore y Estercita, por las charlas interminables que permitieron que el camino fuera más fácil de transitar.

A mi familia, por darme la posibilidad de estudiar en primer lugar, por acompañarme siempre y alentarme en cada momento. Gracias por estar siempre. A mis papás, mis hermanos, mis cuñados y mi sobrina.

Y, por último, pero no menos importante, a mi compañero de la vida, Gastón, al que siempre estuvo incondicionalmente conmigo alentándome para que siempre siga para adelante. Gracias por el amor, la enorme paciencia y el apoyo constante.



## ÍNDICE

✓ Abreviaturas y símbolos	1
✓ Resumen	3

### **Capítulo 1: CONTAMINANTES AMBIENTALES**

1.1. Contaminantes ambientales	6
1.2. Causas y consecuencias de la contaminación ambiental	6
1.3. Tipos de contaminantes	7
1.4. Contaminantes en agua	8
1.5. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	9
1.5.1. Características	9
1.5.2. Fuentes de formación	12
1.5.3. HAPs en agua	13
1.6. Antiinflamatorios no esteroideos	15
1.6.1. Características	15
1.6.2. AINEs derivados del ácido propiónico	16
1.6.3. AINEs en agua	18
1.7. Bibliografía	19

### **Capítulo 2: TÉCNICAS MODERNAS DE EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO Y EN FASE SÓLIDA.**

2.1. Métodos de preparación de muestras	26
2.2. Consideraciones fundamentales: Extracción líquido-líquido tradicional	26
2.3. Miniaturización de las técnicas de extracción tradicionales	28
2.4. Microextracción líquido-líquido	28
2.4.1. Microextracción líquido-líquido dispersiva	29
2.4.1.1. Solventes extractantes	29
2.4.2. Líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs)	31
2.4.2.1. Características	31

2.4.2.2. Propiedades de los RTILs	33
2.4.2.3. Aplicaciones de los RTILs	34
2.5. Extracción en fase sólida (SPE)	35
2.5.1. Sorbentes	36
2.5.2. Polímeros monolíticos orgánicos	38
2.5.2.1. Síntesis de polímeros monolíticos orgánicos	39
2.5.3. Caracterización de materiales porosos	40
2.5.3.1. Microscopía de barrido electrónico	41
2.5.3.2. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno	41
2.6. Bibliografía	43

### **Capítulo 3: CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE DE UN MÉTODO ANALÍTICO: VALIDACIÓN Y CIFRAS DE MÉRITO**

3.1. Validación	49
3.1.1. Calibración	49
3.1.2. Calibración por regresión lineal	50
3.1.3. Cifras de mérito	52
3.1.3.1. Selectividad y especificidad	52
3.1.3.2. Sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica	52
3.1.3.3. Límites de detección y cuantificación	53
3.1.3.4. Linealidad y rango lineal	56
3.1.3.5. Precisión, repetibilidad y exactitud	56
3.1.3.6. Factor de recuperación y factor de enriquecimiento	57
3.1.4. Metodologías para la calibración analítica	58
3.1.5. Efecto de matriz	59
3.2. Optimización de un método analítico	61
3.2.1. Diseño Central Compuesto	62
3.2.2. Función conveniencia u objetivo	64
3.3. Bibliografía	65

**Capítulo 4: DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN  
DISPERSIVA CON LÍQUIDOS IÓNICOS DE FOSFONIO: Aplicación a la  
determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de agua del Río  
de La Plata.**

4.1. Objetivos específicos	68
4.2. Metodología propuesta	68
4.2.1. Reactivos	68
4.2.2. Equipamiento	69
4.2.3. Condiciones cromatográficas	69
4.2.4. Purificación de los RTILs	70
4.2.5. Preparación de soluciones stock y estándares en agua	70
4.2.6. Aplicación de la metodología MELLD a muestras de agua del Río de La Plata	71
4.3. Resultados y discusiones	71
4.3.1. Optimización de los parámetros de extracción	71
4.3.2. Elección del RTIL	72
4.3.3. Elección del solvente dispersante	72
4.3.4. Efecto del volumen de solvente dispersante	74
4.3.5. Efecto del volumen del solvente extractante (RTIL)	75
4.3.6. Tiempo de extracción y centrifugación	75
4.3.7. Efecto salino	77
4.4. Descripción del procedimiento MELLD optimizado	79
4.5. Parámetros de performance de la metodología analítica	80
4.6. Performance de la metodología analítica aplicada a muestras reales	83
4.7. Comparación del método propuesto con estudios similares de la literatura	89
4.8. Conclusiones parciales	90
4.9. Bibliografía	91

**Capítulo 5: DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE EXTRACCIÓN EN FASE  
SÓLIDA MONOLÍTICA (m-SPE). Aplicación a la determinación de antiinflamatorios  
no esteroideos en muestras de agua.**

5.1. Objetivos específicos	92
5.2. Metodología propuesta	92
5.2.1. Reactivos	92
5.2.2. Equipamiento y materiales	93
5.2.3. Condiciones cromatográficas	93
5.2.4. Preparación de soluciones stock y estándares en agua	93
5.2.5. Muestreo y preparación de las muestras	94
5.2.6. Mezcla de polimerización	94
5.2.7. Síntesis de los polímeros monolíticos	95
5.3. Resultados y discusiones	95
5.3.1. Caracterización de los polímeros orgánicos	95
5.3.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	96
5.3.1.2. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno (BET)	97
5.3.2. Estudio de reproducibilidad entre cartuchos de extracción	100
5.3.3. Selección del solvente de elución	103
5.3.4. Diseño central compuesto	105
5.3.4.1. Experimentos y respuestas	106
5.4. Procedimiento de extracción optimizado	113
5.5. Performance analítica de la metodología m-SPE	113
5.6. Análisis de AINES en muestras de agua. Efecto de matriz y determinación de su concentración	117
5.6.1. Efecto de matriz	117
5.6.2. Análisis cuali/cuantitativo de AINEs en las muestras de agua estudiadas	119
5.7. Conclusiones parciales	128
5.8. Bibliografía	129
✓ Conclusiones generales	131
✓ Contribuciones científicas	133



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<b>ACN</b>	acetonitrilo
<b>AINEs</b>	antiinflamatorios no esteroideos
<b>ANOVA</b>	análisis de varianza
<b>BET</b>	Brunauer-Emmet-Teller
<b>CV</b>	coeficiente de variación
<b>[(C<sub>6</sub>)<sub>3</sub>C<sub>14</sub>P][Cl]</b>	Cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio
<b>[(C<sub>6</sub>)<sub>3</sub>C<sub>14</sub>P][Br]</b>	Bromuro de trihexil(tetradecil)fosfonio
<b>[(C<sub>6</sub>)<sub>3</sub>C<sub>14</sub>P][N(CN)<sub>2</sub>]</b>	Dicianoimida de trihexil(tetradecil)fosfonio
<b>DAD</b>	detector de arreglo de diodos
<b>DCC</b>	diseño central compuesto
<b>δ</b>	exactitud relativa
<b>EDMA</b>	etilenglicol dimetacrilato
<b>ELL</b>	extracción liquid-líquido
<b>EM</b>	efecto de matriz
<b>EtOH</b>	etanol
<b>FE</b>	factor de enriquecimiento
<b>FLD</b>	detector de fluorescencia
<b>HAPs</b>	hidrocarburos aromáticos policíclicos
<b>HEMA</b>	metacrilato de 1-hidroxietilo
<b>LOD</b>	límite de detección
<b>LOF</b>	falta de ajuste
<b>LOQ</b>	límite de cuantificación
<b>LPO</b>	lauril peróxido
<b>LSD</b>	test de Fisher de comparación de medias

<b>MELLD</b>	microextracción líquido-líquido dispersiva
<b>MeOH</b>	metanol
<b>RL</b>	rango lineal
<b>RSD</b>	desviación estándar relativa
<b>RTILs</b>	líquidos iónicos a temperatura ambiente
<b>S/N</b>	relación señal/ruido
<b>SEM</b>	microscopía de barrido electrónico
<b>SEN</b>	sensibilidad
<b>Sg</b>	superficie específica
<b>SPE</b>	extracción en fase sólida
<b>SR</b>	superficie de respuesta
<b>THF</b>	tetrahidrofurano
<b>US-EPA</b>	agencia de protección ambiental (Estados Unidos)
<b>Vp</b>	volumen de poro

## RESUMEN

En el presente trabajo de Tesis, se han desarrollado dos metodologías de extracción y análisis sensibles, rápidas, sencillas, económicas y benignas con el ambiente para la determinación de dos tipos de contaminantes ambientales en muestras de agua de río.

En el **Capítulo 1** se presentan las características principales de los contaminantes ambientales, causas y consecuencias de la contaminación, tipos y de contaminantes. Se hace especial hincapié en los contaminantes presentes en aguas, que es el tipo de muestra que se analiza en la presente Tesis. En especial, se comentan las principales características, fuentes de formación y su presencia en agua de los dos grupos de contaminantes que se estudian: hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

En el **Capítulo 2** se describen algunas metodologías tradicionales de preconcentración y análisis de muestras, en especial las dos metodologías más modernas (miniaturizadas) relacionadas a la presente Tesis: “microextracción líquido-líquido dispersiva” (MELLD) y la “extracción en fase sólida monolítica” (*m*-SPE) empleadas para el análisis de HAPs y AINEs en muestras de agua. Se dan fundamentos teóricos y detalles experimentales. Se describen las características fisicoquímicas, propiedades y aplicaciones más importantes de los solventes relativamente nuevos que se emplean en MELLD: los líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs). Por otra parte, se describen los tipos de fases sólidas empleadas en SPE, en especial los polímeros orgánicos monolíticos, características y propiedades y se comentan brevemente las técnicas de caracterización de estos materiales porosos.

En el **Capítulo 3** se enumeran las características principales de performance de un método analítico y la determinación de las cifras de mérito más importantes para la validación del método. Se describen los métodos de cuantificación tradicionales, se discuten sus ventajas y desventajas. Se desarrollan las dos formas tradicionales de optimización de un método analítico, la optimización “etapa por etapa” (OVAT) y la optimización mediante diseño experimental (DCC) utilizando superficies de respuesta.

En el **Capítulo 4** se describe la metodología MELLD empleando un líquido iónico de fosfonio, para la determinación de HAPs en muestras de agua de río mediante HPLC en fase inversa con detección de fluorescencia y arreglo de diodos, y la optimización de dicha metodología mediante OVAT. Se

muestran y discuten los resultados del análisis de muestras de agua de dos canales aledaños a la destilería de YPF de la localidad de Berisso, que desembocan en el Río de La Plata. La metodología analítica fue validada internamente mediante la determinación de las cifras de mérito más relevantes del procedimiento analítico.

En el **Capítulo 5** se presenta el desarrollo de una nueva metodología analítica: la extracción en fase sólida monolítica (*m*-SPE). Se describe el procedimiento de fabricación de estas nuevas fases y su caracterización morfológica. El método fue optimizado mediante un diseño factorial de experimentos, diseño central compuesto (DCC) y, finalmente, validado internamente mediante la determinación de las cifras de mérito más importantes. La metodología fue aplicada a la determinación de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en muestras de agua de arroyos de la zona de La Plata. Como técnica determinativa se empleó cromatografía de líquidos en fase inversa con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

# **CAPÍTULO 1**

## **CONTAMINANTES AMBIENTALES**

## 1.1. Contaminantes ambientales

Existen varias definiciones de “contaminación”. En una de ellas se define a un contaminante como una sustancia que se encuentra presente en ciertas concentraciones que causan daño o exceden un estándar ambiental. Sin embargo, esta definición no contempla otros casos donde la contaminación no es causada por ninguna sustancia química, como, por ejemplo, la contaminación térmica, la cual afecta enormemente a la población marina. En otra definición, se refiere a la contaminación como cualquier cambio en el ambiente debido a la actividad humana. En este otro caso, no se tiene en cuenta la distinción entre comportamientos inocuos y actividades peligrosas producidas por los humanos. Además, es necesario hacer la aclaración de que no toda la contaminación es causada por actividad humana. Existen contaminantes ambientales “naturales” los cuales no fueron introducidos en el ambiente por el hombre. Este es el caso de depósitos naturales de minerales como, por ejemplo, metales pesados o desechos de actividad volcánica <sup>1</sup>.

Dentro de los contaminantes podemos encontrar sustancias químicas (plaguicidas, herbicidas, metales pesados, fármacos, etc.), petróleo, radiaciones, gases contaminantes, residuos urbanos, entre otros <sup>2</sup>. Todos ellos, en general, pueden producir graves daños en los ecosistemas, y la principal razón de su producción son las actividades humanas asociadas a la industria, el comercio, la explotación minera, etc.

En este sentido, la contaminación está generalmente asociada al desarrollo económico y social de las naciones, especialmente cuando este desarrollo se produce sin considerar las consecuencias que tiene en el ambiente. De allí que se sostenga que el desarrollo sustentable es la forma idónea para que puedan “caminar a la par” el desarrollo y la protección del ambiente <sup>3</sup>.

La contaminación ambiental es un problema global, que afecta a todos los habitantes del planeta, y que, por lo tanto, debe ser abordado con responsabilidad. Existen legislaciones y tratados, tanto a nivel nacional como internacional, que tienen como objetivo controlar la emisión de sustancias contaminantes, como es el caso por ejemplo, del Protocolo de Kioto sobre el cambio climático <sup>4</sup>.

## 1.2. Causas y consecuencias de la contaminación ambiental

El ser humano es el principal responsable de la contaminación ambiental: su desarrollo industrial y tecnológico y su crecimiento demográfico son algunas de las causas más evidentes del aumento de la contaminación en los últimos años. De este modo, las emisiones de gases contaminantes, la producción de desechos, la tala y quema de bosques, la explotación indiscriminada de los recursos naturales, actividades todas ellas ligadas a la industria, la minería, la agricultura, el comercio, la

explotación petrolera, así como a la vida cotidiana del ser humano, se encuentran entre las causas principales de la contaminación ambiental <sup>5</sup>.

La contaminación tiene consecuencias severas o muy graves sobre el ambiente: produce alteraciones en los ecosistemas que inciden directamente en las condiciones de vida de animales y plantas, afecta la salud de las personas, puede dar lugar a la extinción de especies, y en algunos casos, contribuye a la acentuación del calentamiento global en la Tierra como consecuencia de los gases que producen el efecto invernadero <sup>6</sup>.

### 1.3. Tipos de contaminantes

Los contaminantes químicos pueden ser compuestos orgánicos o inorgánicos que causen algún tipo de daño en el ambiente. Estas sustancias pueden ser emitidas directamente al ambiente o pueden resultar de reacciones químicas o fotoquímicas, o de transformaciones metabólicas ocasionadas por organismos vivos. El número de sustancias orgánicas e inorgánicas descritas excede los 127 millones, y la mayoría son compuestos orgánicos. Es por esto que, la mayor parte de los contaminantes son moléculas orgánicas <sup>7</sup>. Dentro de este tipo de compuestos se pueden distinguir *compuestos orgánicos volátiles (COVs)* y *compuestos orgánicos persistentes (COPs)*. Los COVs son moléculas con un número pequeño de átomos de carbono (no más de 10 o 12), lo cuales poseen bajos puntos de ebullición, y usualmente también, bajas presiones de vapor. Esta última característica permite que se evaporen rápidamente y tengan principal incidencia en la atmósfera. Sin embargo, también suelen encontrarse en aguas superficiales, aguas subterráneas o en el suelo. Los COPs están formados por moléculas semivolátiles que presentan gran toxicidad. Este grupo de compuestos posee una gran resistencia a la degradación química y biológica, por lo que poseen tiempos de vida largos <sup>8</sup>. Debido a su carácter mayormente no polar se encuentran preferentemente en partículas sólidas, como la materia orgánica del suelo, pero existen fenómenos de reparto ambiental en las partículas y el aire, por lo que pueden volatilizarse parcialmente, desde el suelo, la vegetación y cuerpos de agua, hacia la atmósfera. Esta característica junto con la alta resistencia a la degradación permite que “viajen” grandes distancias, lo que produce su acumulación aún en lugares alejados de donde son emitidos.

Según la US-EPA los contaminantes pueden clasificarse en dos grupos:

- Contaminantes prioritarios.
- Contaminantes emergentes.

Los *contaminantes prioritarios* son un grupo de sustancias químicas reguladas, que fueron seleccionadas de acuerdo a su conocida o sospechada carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad o alta toxicidad, para los cuales existen métodos de testeo analíticos bien definidos. La mayoría de estos compuestos se encuentran sujetos a regulaciones de los países o agencias plurinacionales. Dentro de este grupo podemos encontrar a los COPs, metales pesados, algunos pesticidas, o hidrocarburos policíclicos aromáticos (HAPs) <sup>7</sup>.

Los *contaminantes emergentes* (CEs) son sustancias químicas, comúnmente no reguladas, que pueden ser detectadas en bajas o muy bajas concentraciones mediante técnicas analíticas <sup>7</sup>. Por lo general, se trata de sustancias que entran al ambiente como resultado del desarrollo en áreas como la medicina, cosmética, agricultura, tecnologías renovables, etc. Estos avances tecnológicos producen efectos secundarios, que muchas veces son la introducción de sustancias en el ambiente, las cuales pueden tener efectos a largo plazo sobre el ecosistema y sobre la salud humana. Debido a que muchas veces los efectos de estos CEs no son del todo conocidos es que se presta especial interés en ellos <sup>9</sup>. Según el Servicio Ecológico de Estados Unidos (USGS) estos CEs pueden ser definidos como cualquier sustancia química o microorganismo que no es comúnmente monitoreada en el ambiente pero que tiene potencial para entrar en él y causar efectos adversos en el ecosistema o en la salud humana, los cuales son conocidos o sospechados <sup>10</sup>. Dentro de este grupo podemos encontrar a los productos farmacéuticos y veterinarios, desinfectantes y biocidas, drogas ilícitas, productos de cuidado personal, aditivos alimenticios, nanomateriales, toxinas biológicas, etc.

#### **1.4. Contaminantes en agua**

La contaminación en el medio acuático es particularmente relevante en el caso de los alimentos marinos, debido a que son mundialmente consumidos en grandes cantidades y el agua de mar de baja calidad puede ser una fuente de compuestos químicos dañinos para el ambiente. La presencia de contaminantes tóxicos en el agua está teniendo principal atención por parte de la comunidad científica y de las autoridades regulatorias, debido a que la presencia de cualquier contaminante detectable en alimentos marinos de consumo humano en niveles superiores a los permitidos es un riesgo innegable que puede producir impactos negativos en la salud de los consumidores, especialmente a largo plazo <sup>11</sup>.

El agua de las costas o continentales generalmente actúa como receptor de efluentes residuales, industriales y desechos rurales y urbanos <sup>12</sup>. Para algunos de ellos existen regulaciones en cuanto a los niveles permitidos en agua potable; sin embargo, muchos de ellos no tienen regulación.

Por lo tanto, es muy importante el desarrollo de técnicas analíticas sensibles y selectivas que permitan determinar contaminantes aún en bajas concentraciones y que sean compatibles con el ambiente o compatibles con la “Química Verde”, es decir con la química sostenible o sustentable.

Dado que muchos de estos compuestos se encuentran en concentraciones del orden de las  $\text{g L}^{-1}/\text{mg L}^{-1}/\mu\text{g L}^{-1}$  en matrices muy complejas, la determinación de estas sustancias requiere métodos previos de extracción y preconcentración. Por todo esto, las técnicas miniaturizadas de extracción han tomado especial interés debido a que son alternativas que permiten la reducción del consumo de solventes orgánicos, o que emplean solventes alternativos, como por ejemplo, los líquidos iónicos <sup>11</sup>, muchos de los cuales son eco-compatibles.

## **1.5. Hidrocarburos aromáticos policíclicos**

### **1.5.1. Características**

Los “hidrocarburos aromáticos policíclicos” (HAPs, o PAHs por sus siglas en inglés) son un grupo de compuestos orgánicos, formados por dos o más anillos bencénicos fusionados, y en algunos casos, pueden llegar a tener algún anillo pentagonal. Los HAPs observados en el ambiente son moléculas que poseen entre dos a siete anillos. Dentro de este rango, existe un gran número de estos compuestos con distintas estructuras, siendo el naftaleno el HAP más pequeño, con dos anillos aromáticos, mientras que el coroneno es el más grande, con siete anillos <sup>13</sup>.

El término “aromático” proviene del olor característico que posee el benceno, y el hecho de que la mayoría de ellos posean varios anillos bencénicos les otorga su carácter de “policíclicos”.

Los HAPs son moléculas neutras, hidrofóbicas y no polares. Sus características físicas y químicas, como la solubilidad en agua, hidrofobicidad y presión de vapor, varían de acuerdo a su peso molecular <sup>13</sup>. Algunas características se presentan en la Tabla 1 <sup>14</sup>.

Los HAPs de bajo peso molecular (generalmente aquellos que poseen 3 anillos aromáticos o menos) predominan en la atmósfera, y aquellos de mayor peso molecular (la mayoría) entran en el ambiente adsorbidos en el material particulado <sup>15,16</sup>.

La fluorescencia se presenta como una importante característica de estos compuestos, y suele ser utilizada para obtener una determinación más sensible de ellos, aunque existen algunas excepciones, como el acenaftileno <sup>13</sup>. Los sistemas conjugados de orbitales  $\pi$  de los HAPs son los responsables de su estabilidad química. Su estado de agregación a temperatura ambiente es sólido, y su volatilidad es baja. Son compuestos solubles en muchos solventes orgánicos, pero su solubilidad en agua es muy baja, la cual disminuye al aumentar su peso molecular, como puede verse en la Tabla 1 <sup>17</sup>. Aunque

son sustancias químicamente estables y prácticamente no se degradan por hidrólisis, en presencia de luz, son susceptibles a la oxidación o fotodegradación.

**Tabla 1.** Algunas propiedades fisicoquímicas de los HAPs.

Compuesto	Peso molecular	Presión de vapor (Pa)	Solubilidad en agua (mg/L)	log K <sub>o/w</sub>
Naftaleno	128	1,0x10 <sup>2</sup>	31	3,37
Acenaftileno	152	9,0x10 <sup>-1</sup>	16	4,00
Acenafteno	154	3,0x10 <sup>-1</sup>	3,8	3,92
Fluoreno	166	9,0x10 <sup>-2</sup>	1,9	4,18
Fenantreno	178	2,0x10 <sup>-2</sup>	1,1	4,57
Antraceno	178	1,0x10 <sup>-3</sup>	4,5x10 <sup>-2</sup>	4,54
Fluoranteno	202	1,2x10 <sup>-3</sup>	2,6x10 <sup>-1</sup>	5,22
Pireno	202	6,0x10 <sup>-4</sup>	1,3x10 <sup>-1</sup>	5,18
Benzo[ <i>a</i> ]antraceno	228	2,8x10 <sup>-5</sup>	1,1x10 <sup>-2</sup>	5,91
Criseno	228	5,7x10 <sup>-7</sup>	6x10 <sup>-3</sup>	5,91
Benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno	252	-	1,5x10 <sup>-3</sup>	5,80
Benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno	252	5,2x10 <sup>-8</sup>	8x10 <sup>-4</sup>	6,00
Benzo[ <i>a</i> ]Pireno	252	7,0x10 <sup>-7</sup>	3,8x10 <sup>-3</sup>	5,91
Dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno	278	3,7x10 <sup>-10</sup>	6x10 <sup>-4</sup>	6,75
Benzo[ <i>ghi</i> ]perileno	276	-	2,6x10 <sup>-4</sup>	6,50
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno	276	1,4x10 <sup>-8</sup>	1,9x10 <sup>-4</sup>	6,50

Debido a su fotomutagenicidad, la Agencia de Protección Ambiental (US-EPA) considera a dieciséis de estos compuestos como contaminantes prioritarios: Naftaleno (Nap), Acenafteno (Acp), Acenaftileno (Ace), Fluoreno (Flu), Fenantreno (Phe), Antraceno (Ant), Fluoranteno (Flt), Pireno (Pyr), Benzo[*a*]antraceno (B[*a*]A), Criseno (Cry), Benzo[*b*]fluoranteno (B[*b*]F), Benzo[*k*]fluoranteno (B[*k*]F), Benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), Dibenzo[*a,h*]antraceno (DBA), Benzo[*g,h,i*]perileno (Bpe) e Indeno[1,2,3-*cd*]pireno (InP) <sup>18</sup>. Sus estructuras se muestran en la Figura 1:

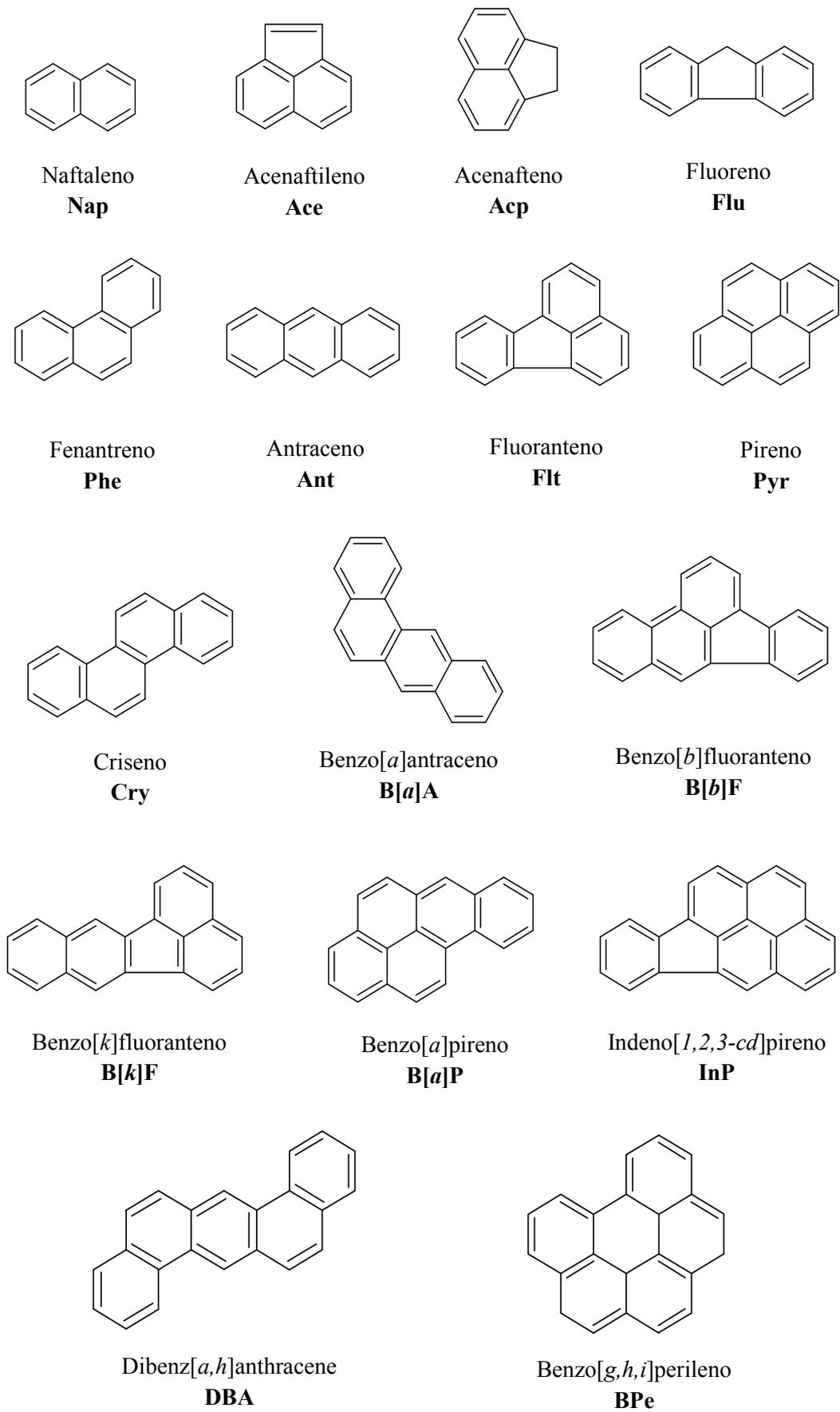


Figura 1. Estructuras químicas de los 16 HAPs prioritarios de la US-EPA.

### 1.5.2. Fuentes de formación

Los HAPs se forman por descomposición térmica de la materia orgánica que contiene carbono e hidrógeno. Su formación se basa en dos mecanismos principales:

1. Pirólisis o combustión incompleta
2. Procesos de carbonización

Las reacciones químicas que se producen en las llamas se originan por mecanismos de radicales libres, y se cree que es el mecanismo principal para la formación de HAPs. Este mecanismo fue propuesto por Badger (1965) a partir de los resultados observados en varios experimentos de pirólisis <sup>19</sup>.

Existe evidencia de otros mecanismos de formación alternativos, sin embargo, parecen ser menos importantes. A pesar del gran número de HAPs diferentes que podrían formarse durante las reacciones primarias, sólo un número limitado de ellos entran en el ambiente. La mayor parte de los compuestos que se forman en las reacciones primarias tienen tiempos de vida cortos en las condiciones de pirólisis. Los compuestos que se formarán a altas temperaturas serán aquellos más estables termodinámicamente, en la relación cuantitativa correspondiente. Estos compuestos son, principalmente, HAPs sin sustituyentes. Sin importar el tipo de material que se queme, a una misma temperatura, la relación de estos compuestos formados es, sorpresivamente, la misma <sup>20</sup>.

Los HAPs no se forman solamente por pirólisis a altas temperaturas, sino que varios procesos de carbonización permiten su formación a partir del decaimiento de material biológico a bajas temperaturas (por debajo de los 200°C) y altas presiones durante un período de millones de años <sup>16</sup>.

La emisión de HAPs proviene de dos fuentes, natural y antropogénica. La primera consiste en incendios forestales, erupción de volcanes y la síntesis por parte de plantas y microorganismos. Sin embargo, la cantidad de HAPs emitidos por procesos naturales es muy pequeña en comparación con la emisión proveniente de fuentes antropogénicas <sup>21</sup>.

Las fuentes antropogénicas pueden subdividirse en dos categorías: fuentes móviles y fuentes estacionarias. Las fuentes estacionarias incluyen las industrias, la generación de calor y energía, calefacción residencial, y fogatas. Dentro de la segunda categoría se encuentran los automóviles, camiones, aviones y barcos <sup>20</sup>.

Aunque su impacto ambiental es casi insignificante, el hombre también genera cantidades importantes de HAPs en distintas actividades sociales como, por ejemplo, el humo de tabaco y en alimentos cocinados, ya sea a la parrilla o sometidos a condiciones térmicas severas. En general, la cantidad de estos compuestos que pueden generarse en los alimentos, depende del tipo de combustible que se utilice y de las condiciones de combustión (temperatura, accesibilidad de oxígeno, presencia o ausencia de llama, etc.) <sup>22</sup>.

Otras fuentes de los cuales pueden derivar los HAPs incluyen al petróleo crudo, que contiene un 20% en peso de hidrocarburos bicíclicos y de mayor peso, y el petróleo de alto grado, cuyo contenido aromático es alrededor de un 50% <sup>23</sup>. Se estima que los desechos de las refinerías y las plantas petroquímicas contribuyen con aproximadamente 200.000 toneladas de productos petroleros y petróleo crudo en los océanos del mundo por año. Aunque no se encuentran disponibles valores para descargas en agua dulce, existen varios reportes sobre la contribución de contaminación de HAPs en ríos y lagos, proveniente de efluentes de refinerías <sup>12</sup>.

### 1.5.3. HAPs en agua

Para la población en general, las principales vías de exposición a estos compuestos son los alimentos, el agua y, el aire de ambientes internos y externos. La principal fuente de entrada de HAPs en aguas superficiales ocurre por depósito atmosférico, escurrimiento de agua de lluvia de sectores urbanos, efluentes municipales, efluentes industriales y derrames o fugas de petróleo. Los HAPs también pueden llegar al agua desde el suelo. Los niveles de HAPs registrados en suelos cercanos a refinerías han sido tan altos como 200.000  $\mu\text{g Kg}^{-1}$  de suelo seco <sup>24</sup>.

Además, varios de ellos han sido detectados en agua de lluvia, causado por el arrastre del material particulado de la atmósfera por parte de las gotas de agua <sup>25</sup>. Además se han detectado algunos de estos compuestos en peces provenientes de aguas contaminadas <sup>26</sup>.

Dentro de la gran cantidad de HAPs existentes, el más estudiado es el benzo[*a*]pireno, el cual es usado como marcador en aire y alimentos. Algunos estudios en animales experimentales sobre PAH individuales, más notablemente el benzo[*a*]pireno, muestran varios efectos toxicológicos, como efectos hematológicos, toxicidad reproductiva y en el desarrollo, e inmunotoxicidad <sup>27</sup>. Debido a su potencial carcinogénico y genotóxico los HAPs han atraído mucha atención en la comunidad científica <sup>28</sup>.

Es por esto que existen regulaciones en cuanto a la cantidad permitida de HAPs en aguas de consumo. El contenido máximo permitido por la EPA para este compuesto es de 0,2  $\text{mg L}^{-1}$  <sup>24</sup>.

Varios experimentos muestran una relación mecánica entre la formación de aductos en el ADN <sup>28</sup>, mutaciones, y aparición de cáncer seguido de la exposición con HAPs <sup>29</sup>. La piel contaminada con HAPs puede ser expuesta posteriormente a la radiación de la luz solar, y se ha sugerido que la exposición a compuestos químicos seguida de la exposición a la luz puede producir reacciones tóxicas, lo que se denomina fototoxicidad. Debido al sistema de múltiples anillos aromáticos que poseen estos compuestos, pueden absorber luz en el rango UV (320-400 nm), y algunos, en la región

visible, formando especies reactivas que pueden causar daños en los componentes celulares de los seres humanos <sup>18</sup>. El metabolismo de los HAPs incluye la formación de dihidrodioles, diol-epóxidos y otros metabolitos reactivos, entre los que se incluyen algunos presuntos metabolitos que pueden formar aductos con el ADN, lo que puede potencialmente inducir mutaciones <sup>30</sup>.

Sin embargo, aunque la genotoxicidad, es decir, la capacidad de ocasionar daño en el material genético, es un mecanismo admisible para la carcinogenicidad de los HAPs, la correlación entre los aductos en el ADN, mutagénesis y carcinogénesis de los HAPs no es tan directa. De hecho, se han detectado niveles comparables de aductos de ADN y mutaciones genéticas en tumores de tejidos de ratón “blanco” y no blanco, tratados con benzo[*a*]pireno, sugiriendo que los puntos finales genotóxicos solos no podrían predecir adecuadamente la aparición de tumores debido a mecanismos específicos órgano/tejido <sup>30</sup>. La contaminación humana con HAPs es inevitable, principalmente a través de la absorción por piel, inhalación, o a través del tracto intestinal por consumo de alimentos y agua <sup>28,31</sup>.

Debido a que los HAPs, junto con una variedad de otros contaminantes, generalmente se encuentran en agua a muy bajas concentraciones, se requieren técnicas de aislamiento y preconcentración para su determinación analítica dado que, en general, los límites de detección de los detectores comunes no son suficientes para asegurar su detectabilidad. Dentro de las técnicas más utilizadas para su aislamiento y preconcentración se encuentran la extracción líquido-líquido (ELL) <sup>32</sup>, la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD, o DLLME por sus siglas en inglés) <sup>25,33</sup>, la extracción en fase sólida (EFS, o SPE por sus siglas en inglés) <sup>34-36</sup> y la microextracción en fase sólida (MEFS, o SPME en inglés) <sup>12,37</sup>, mientras que para su determinación, los métodos más ampliamente utilizados son HPLC acoplado a detección UV <sup>38</sup> o fluorescencia (FLD) <sup>39,40</sup> y cromatografía gaseosa con detección de masas (GC-MS) <sup>41,42</sup>. Colombo *et al.* <sup>43</sup> determinaron el contenido de varios HAPs (0,003-2,1  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) en partículas en suspensión y sedimentos en distintas partes de la costa metropolitana de Buenos Aires en el Río de La Plata. En otro estudio, Arias *et al.* <sup>44</sup> determinaron los niveles de concentración de distintos HAPs en sedimentos del estuario de Bahía Blanca, encontrándose entre 15 a 10,260  $\text{ng g}^{-1}$ .

## 1.6. Antiinflamatorios no esteroideos

### 1.6.1. Características

Los compuestos farmacéuticos son clasificados según su propósito o actividad biológica, por ejemplo: antibióticos, analgésicos, antineoplásticos, antiinflamatorios, etc <sup>45</sup>.

Los Antiinflamatorios No Esteroideos, AINEs (o Non Steroidal Antiinflammatory Drugs, NSAIDs), constituyen un amplio grupo de analgésicos con propiedades antiinflamatorias y antitérmicas. El prototipo de este grupo es el ácido acetilsalicílico, el primer compuesto de este tipo. Sin embargo, la primera sustancia nombrada como AINE fue la fenilbutazona en 1952. Los AINEs son uno de los grupos terapéuticos más usados a nivel mundial. La gran utilización de este grupo de compuestos farmacéuticos se debe a que comparten sus efectos antiinflamatorios, analgésicos, antipiréticos y antiagregantes plaquetarios. Sin embargo, su utilización se ve limitada por la posible aparición de efectos adversos como la enfermedad ulcerosa péptica, hemorragias digestivas o cuadros de insuficiencia renal.<sup>46</sup>

Los AINEs son supresores de los síntomas y ayudan a bajar la inflamación, pero no a eliminarla. Al suprimir las características inflamatorias, bajan la actividad de la enfermedad, medida que funciona a través del control de los síntomas.<sup>47</sup> Los AINEs, como el ibuprofeno, actúan inhibiendo las isoformas de la ciclooxigenasa (COX), y de esta forma, la producción de prostangladinas, las cuales participan en las respuestas inflamatorias al estimular las terminales nerviosas del dolor <sup>48</sup>.

Existen varias formas de clasificar a los AINEs <sup>49</sup>. La clasificación según su mecanismo de acción se muestra a continuación:

- **Inhibidores no selectivos de la COX**

- *Derivados del ácido salicílico:* aspirina, salicilato de sodio, acetilsalicilato de lisina, salicilato, trisalicilato de magnesio y colina, diflunisal, sulfasalina, benorilato, ácido salicílico, salicilato de metilo, olsalacina, eterilato, fosfosal, salicilamida.
- *Derivados del paraaminofenol:* paracetamol, propacetamol, fenazopiridina.
- *Derivados de las pirazolonas:* metamizol, propifenazona, fenilbutazona, oxifenbutazona.
- *Derivados del ácido propiónico:* ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, oxaproxina, ketoprofeno, flurbiprofeno, piquetoprofeno, ácido tiaprofénico, fenbufeno, carprofeno, piroprofeno, indobufeno, suprofen.
- *Derivados del ácido acético:*
  - Indolacéticos: indometacina, oximetacina, acemetacina, glucametacina.

- Pirrolacéticos: tolmetina, ketorolaco, sundilaco.
  - Fenilacéticos; diclofenaco, alclofenaco, fentiazaco, nepafenaco.
  - Naftilacético: nabumetona.
  - *Derivados del ácido enólico (oxicams):* piroxicam, tenoxicam, ampiroxicam, pivoxicam, lornoxicam, cinnoxicam.
  - *Derivados del ácido antranílico (fenamatos):* ácido mefenámico, ácido meclofenámico, ácido flufenámico, floctafenina, glafenina.
- **Inhibidores selectivos de la COX-2**
    - *Oxicams:* meloxicam
    - *Sulfoanilida:* nimesulida
    - *Indolacéticos:* etodolaco
    - *Coxibs:* celocoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumiracoxib, parecoxib
  - **AINEs liberadores de óxido nítrico**

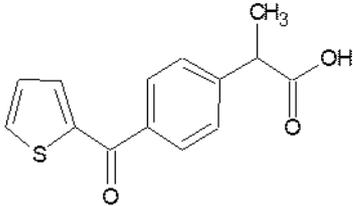
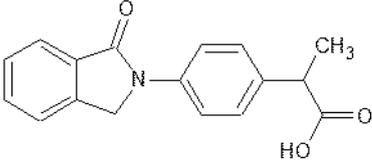
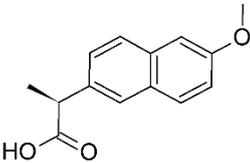
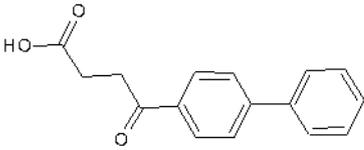
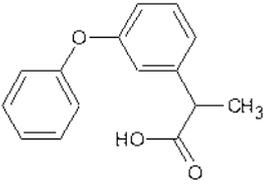
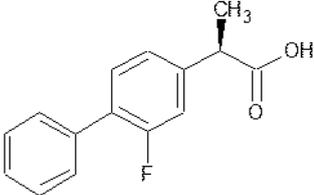
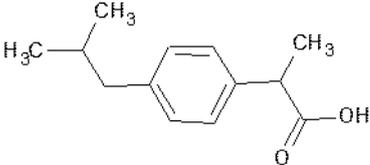
*Nitroxibutilésteres:* flurbiprofeno ONO<sub>2</sub>, ketoprofeno ONO<sub>2</sub>, diclofenaco ONO<sub>2</sub>, nitroaspirina.

### 1.6.2. AINEs derivados del ácido propiónico

Los compuestos farmacéuticos que son parte del objeto de estudio de esta tesis son los AINEs derivados del ácido propiónico. Sus estructuras químicas y algunas de sus propiedades físicas se detallan en la Tabla 2.

Esta clase de medicamentos permite una efectiva disminución del dolor con pocos efectos adversos. Uno de los efectos más importantes es la irritación gastrointestinal <sup>50</sup>. Estos compuestos son ampliamente metabolizados por el hígado, y se elimina más de un 90% de la dosis en la orina, como metabolito soluble o sus conjugados. Por esta razón, se pueden encontrar como desechos continuos en efluentes cloacales <sup>51</sup>.

**Tabla 2.** Estructuras y propiedades de algunos AINEs derivados del ácido propiónico.

Compuesto	Estructura	log P	pK <sub>a</sub>
Suprofeno		2,2	3,9
Indoprofeno		2,8	3,7
Naproxeno		3,2	4,2
Fenbufeno		3,2	4,2
Fenoprofeno		3,3	4,5
Flurbiprofeno		3,6	4,4
Ibuprofeno		4,0	4,9

### 1.6.3. AINEs en agua

El desarrollo humano conlleva al incremento en la actividad industrial con la consecuente liberación de un gran número de compuestos, incluidos pesticidas, hidrocarburos, productos de cuidado personal, solventes, detergentes y compuestos farmacéuticos en el ambiente acuático <sup>52</sup>. Los compuestos farmacéuticos se han convertido en importantes contaminantes ambientales, debido a su presencia en cuerpos de agua (a causa de una remoción incompleta en los tratamientos de aguas residuales o difusas fuentes de contaminación), amenazando el agua de consumo, y generando preocupación por posibles efectos adversos, tanto en la vida silvestre como en la humana <sup>53</sup>.

Una de las principales fuentes de emisión de compuestos farmacéuticos son los residuos urbanos, los cuales son generalmente excretados después de ser parcial o completamente convertidos en metabolitos solubles en agua, sin embargo, una cantidad significativa de la sustancia original permanece sin alteraciones <sup>54</sup>.

En los últimos años ha crecido de manera considerable la atención sobre la liberación, presencia y potenciales efectos adversos de los compuestos farmacéuticos en el ambiente. Estos analitos son considerados como contaminantes ambientales debido a que son compuestos biológicamente activos <sup>51,55</sup>. Una vez que son administrados pueden ser liberados como el compuesto original o como metabolitos activos, y pueden llegar al ambiente en extensiones variables. Los compuestos farmacéuticos están diseñados para persistir, por lo que pueden tener tiempos de vida media largos en el ambiente, y por lo tanto, pueden acumularse alcanzando niveles detectables y peligrosos <sup>52</sup>. Los AINEs se encuentran entre los compuestos farmacéuticos más utilizados en el mundo y han sido aceptados como relativamente “seguros” hasta el punto de que varios de ellos se encuentran disponible sin prescripción médica <sup>56</sup>.

A diferencia de algunos contaminantes convencionales (como pesticidas, detergentes, combustibles, entre otros), los compuestos farmacéuticos son liberados en bajas cantidades pero de manera continua, lo cual pueden generar toxicidad aun sin altos valores de persistencia <sup>57</sup>. Además, aunque las concentraciones de estos residuos sean bajas en el ambiente acuático como para generar un riesgo grande individualmente, se desconoce si la combinación de medicamentos con un mecanismo de acción común pueden exhibir un mecanismo sinérgico <sup>56</sup>. SanJuan-Reyes *et al.* encontraron correlaciones positivas significativas entre la concentración de AINEs y varios marcadores de genotoxicidad y citotoxicidad en una especie de carpa <sup>52</sup>. Pamplona *et al.* <sup>58</sup> estudiaron el efecto de tóxico de la dipirona, un tipo de AINE, sobre especies de peces nativas de Brasil, encontrando que aún con bajas concentraciones del fármaco ( $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) existen daños en el ADN y en el hígado. Es por esto que

sugieren que la exposición constante de organismos acuáticos a este tipo de fármacos produce potenciales efectos tóxicos.

Debido a que los residuos farmacéuticos se encuentran generalmente en bajas concentraciones en el ambiente acuático <sup>59</sup>, es necesario el uso de técnicas de preconcentración y aislamiento. Se han desarrollado diversos métodos para la determinación de AINEs y sus metabolitos en matrices de agua ambientales, siendo la técnica más comúnmente utilizada, la SPE <sup>59-61</sup>. Además, se han utilizado las técnicas de SPME y IL-DLLME (microextracción dispersiva líquido-líquido con líquidos iónicos) <sup>62</sup>. Elorriaga et al. <sup>51</sup> determinaron el contenido de ibuprofeno en descargas de desechos municipales en aguas superficiales de distintas zonas de Argentina, encontrando concentraciones entre 0,4 y 13  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

### 1.7. Bibliografía

1. Farmer, A. *Managing environmental pollution*. (Routledge, 1997).  
doi:10.4324/9780203440117
2. Fiedler, H. *Persistent Organic Pollutants*. (Springer Berlin Heidelberg, 2002).
3. Segura, L. M. S. & Arriaga, J. A. L. *Principios básicos de contaminación ambiental*. (Universidad Autónoma del Estado de México, 2003).
4. Gordo, J. F. L. *Medio ambiente comunitario y protocolo de Kioto: la armonización de la imposición energética o un mercado sobre emisiones de gases de efecto invernadero*. (La Ley, 2008).
5. Alvarez, V. M. & de Jesús Figueroa Lara, J. *Contaminación ambiental: causas y control*. (Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco, 1996).
6. Rodríguez, B. E. S. *La contaminación ambiental y sus consecuencias Toxicológicas*. (Lulu.com, 2009).
7. Calvo-Flores, F. G., Isac-García, J., Jiménez, J. A. D. & Dobado, J. A. *Emerging Pollutants: Origin, Structure, and Properties*. (Wiley, 2018).
8. Downie, D. & Templeton, J. Persistent organic pollutants. *Routledge Handbook of Global Environmental Politics* 411–426 (2015). doi:10.4324/9780203799055

9. Bell, C. H., Gentile, M., Kalve, E. & Ross, I. *Emerging Contaminants Handbook*. (CRC Press, 2019).
10. Raghav, M., Eden, S., Mitchell, K. & Witte, B. Contaminants of Emerging Concern in Water. *Water Resour. Res. Center, Tucson, USA*. 1–12 (2013).
11. Wells, M. J. M. Emerging Pollutants. *Water Environ. Res.* **79**, 2192–2209 (2007).
12. Manoli, E. & Samara, C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: Sources, occurrence and analysis. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **18**, 417–428 (1999).
13. Hayakawa, K. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Environmental Behavior and Toxicity in East Asia*. (Springer Singapore, 2018).
14. Mackay, D., Shiu, W. Y., Ma, K. C. & Lee, S. C. *Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals*. (CRC Press, 2006).
15. Wild, S. R. & Jones, K. C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: A preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.* **88**, 91–108 (1995).
16. Howsam, M. & Jones, K. Sources of HAPs in the Environment. in *The Handbook of Environmental Chemistry* 137–174 (Springer, Berlin, Heidelberg, 1998). doi:10.1007/978-3-540-49697-7\_4
17. Mastandrea, C., Chichizola, C., Ludueña, B. & Héctor, S. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. *Acta bioquímica Clínica Latinoam.* **39**, 27–36 (2005).
18. Yan, J., Wang, L., Fu, P. P. & Yu, H. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **557**, 99–108 (2004).
19. Cohen, S. G., Streitwieser, A. & Taft, R. W. *Progress in Physical Organic Chemistry*. (Wiley, 2016).
20. Bjoerseth, A. & Ramdahl, T. *Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons, volume 2, emission sources and recent progress in analytical chemistry*. (CRC Press, 1985).
21. Edwards, N. T. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's) in the Terrestrial

- Environment—A Review. *J. Environ. Qual.* **12**, 427–441 (1983).
22. Boehm, P. D. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (HAPs). in *Environmental Forensics: Contaminant Specific Guide* 313–337 (Elsevier, 2010). doi:10.1016/B978-0-12-507751-4.50037-9
  23. Crompton, T. R. *Organic Compounds in Natural Waters: Analysis and Determination*. (CRC Press, 2013).
  24. Gehle, K. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs). in *Case studies in environmental medicine* (Stephen B. Thacker CDC Library collection, 2009).
  25. Guo, L. & Lee, H. K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5040–5046 (2011).
  26. Jánková, M., Tomaniová, M., Hajšlová, J. & Kocourek, V. Appraisal of ‘classic’ and ‘novel’ extraction procedure efficiencies for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives from biotic matrices. *Anal. Chim. Acta* **520**, 93–103 (2004).
  27. Gelboin, H. V. Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol. Rev.* **60**, 1107–1166 (1980).
  28. Pickering, R. W. A toxicological review of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Toxicol. - Cutan. Ocul. Toxicol.* **18**, 101–135 (1999).
  29. You, L., Wang, D., Galati, A. J., Nesnow, S. & Stoner, G. D. Tumor multiplicity, DNA adducts and K-ras mutation pattern of 5-methylchrysene in strain A/J mouse lung. *Carcinogenesis* **15**, 2613–2618 (1994).
  30. SCF (Scientific Committee on Food). *Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food*. (2002).
  31. Menzie, C. A., Potocki, B. B. & Santodonato, J. Exposure to carcinogenic HAPs in the environment. *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1278–1284 (1992).
  32. Titato, G. M. & Lanças, F. M. Comparison between different extraction (LLE and SPE) and

- determination (HPLC and capillary-LC) techniques in the analysis of selected HAPs in water samples. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **28**, 3045–3056 (2005).
33. Rezaee, M., Assadi, Y., Mohammad-Reza, M., Aghaei, E., Ahmadi, F., Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* **1116**, 1–9 (2006).
  34. Purcaro, G., Moret, S. & Conte, L. S. Original Paper Rapid SPE – HPLC determination of the 16 European priority polycyclic aromatic hydrocarbons in olive oils. *J. Sep. Sci.* **31**, 3936–3944 (2008).
  35. Ramirez, C. E., Wang, C. & Gardinali, P. R. Fully automated trace level determination of parent and alkylated HAPs in environmental waters by online SPE-LC-APPI-MS / MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 329–344 (2014).
  36. Busetti, F., Heitz, A., Cuomo, M., Badoer, S. & Traverso, P. Determination of sixteen polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous and solid samples from an Italian wastewater treatment plant. *J. Chromatogr. A* **1102**, 104–115 (2006).
  37. Nollet, L. M. L. & De Gelder, L. S. P. *Handbook of Water Analysis*. (CRC Press, 2000).
  38. Wang, W., Huang, Y., Shu, W. & Cao, J. Multiwalled carbon nanotubes as adsorbents of solid-phase extraction for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental waters coupled with high-performance liquid chromatography. **1173**, 27–36 (2007).
  39. Manoli, E. & Samara, C. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Waste Waters and Sewage Sludge: Extraction and Clean-up for HPLC Analysis with Fluorescence Detection. **43**, (1996).
  40. Fernandez, M., Clavijo, S., Forteza, R. & Cerdà, V. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using lab on valve dispersive liquidliquid microextraction coupled to High performance chromatography. *Talanta* **138**, 190–195 (2015).
  41. Lund, M., Duedahl-Olesen, L. & Christensen, J. H. Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from smoked fish using pressurized liquid extraction with integrated fat removal. *Talanta* **79**, 10–15 (2009).
  42. Dong, C. Di, Chen, C. F. & Chen, C. W. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons

- in industrial harbor sediments by GC-MS. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **9**, 2175–2188 (2012).
43. Colombo, J. C., Cappelletti, N., Laschi, J., Migoya, M. C., Speranza, E., Skorupka, C. N. Sources, Vertical Fluxes, and Equivalent Toxicity of Aromatic Hydrocarbons in Coastal Sediments of the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 734–740 (2006).
44. Arias, A. H., Vazquez-Botello, A., Tombesi, N. & Al., E. Presence, distribution, and origins of polycyclic aromatic hydrocarbons (HAPs) in sediments from Bahía Blanca estuary, Argentina. *Environ. Monit. Assess.* **160**, 301–314 (2010).
45. Kümmerer, K. The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges. *J. Environ. Manage.* **90**, 2354–2366 (2009).
46. Álamo, C. *Guía Farmacológica de Analgésicos*. (Arán Ediciones, 2006).
47. Dudley Hart, F. & Huskisson, E. C. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. Current status and rational therapeutic use (Part II). *Curr. Ther. (Seaforth)*. **25**, 91–107 (1984).
48. Lorenzo, M. G. L. L. H. M. S. P. P. & Fernández, P. L. Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica (eBook online)*. (Editorial Médica Panamericana S.A., 2015).
49. Saraf, S. *NSAIDs Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs: An Overview*. (PharmaMed Press, 2008).
50. Okeson, J. P. *Management of Temporomandibular Disorders and Occlusion - E-Book*. (Elsevier Health Sciences, 2019).
51. Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P. & Ronco, A. Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina. **90**, 397–400 (2013).
52. Sanjuan-Reyes, N. *et al.* Effluent from an NSAID-manufacturing plant in Mexico induces oxidative stress on *Cyprinus Carpio*. *Water. Air. Soil Pollut.* **224**, (2013).
53. Richardson, S. D. & Ternes, T. A. Water analysis: Emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* **86**, 2813–2848 (2014).
54. Owens, B. Pharmaceuticals in the environment. *Pharmaceutical Journal* **294**, 205–207 (2015).

55. Christensen, F. M. Pharmaceuticals in the Environment—A Human Risk? *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **28**, 212–221 (1998).
56. Farré, M., Petrovic, M. & Barceló, D. Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1203–1214 (2007).
57. Santos, L. H. M. L. M. *et al.* Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **175**, 45–95 (2010).
58. Pamplona, J. H. *et al.* Ecotoxicology and Environmental Safety Subchronic effects of dipyrone on the fish species *Rhamdia quelen*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **74**, 342–349 (2011).
59. Kosjek, T., Heath, E. & Krbavčič, A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environ. Int.* **31**, 679–685 (2005).
60. Quintana, B. & Reemtsma, T. Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion-pair reverse-phase liquid chromatography / tandem mass spectrometry. **18**, 765–774 (2004).
61. Gómez, M. J., Petrovic, M., Fernández-Alba, A. R. & Barcelo, D. Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters &. **1114**, 224–233 (2006).
62. Toledo-Neira, C. & Álvarez-Lueje, A. *Ionic liquids for improving the extraction of NSAIDs in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction by high performance liquid chromatography-diode array-fluorescence detection.* *Talanta* **134**, (Elsevier, 2015).

## **CAPÍTULO 2**

**TÉCNICAS MODERNAS DE EXTRACCIÓN  
LÍQUIDO/LÍQUIDO Y EN FASE SÓLIDA.**

## 2.1. Métodos de preparación de muestras

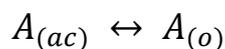
La preparación de muestra (“*sample preparation*”) constituye un paso crucial para el éxito del proceso analítico total. A pesar de los considerables avances tecnológicos y aún con el abastecimiento de instrumentación de avanzada, lo cierto es que la complejidad de las diversas muestras, requieren de procesos de extracción-preconcentración eficaces y selectivos a los compuestos de interés, conjuntamente con una limpieza del extracto apropiada. Los principales objetivos de esta etapa del método analítico son: enriquecimiento de los analitos de interés, transferencia de los mismos a un solvente compatible con el método analítico de detección, reducción de posibles interferencias y una eficiente limpieza de la matriz de la muestra <sup>1</sup>.

En esta sección se describe a la extracción líquido-líquido tradicional (LLE) como un método de extracción-preconcentración clásico y ampliamente establecido en la Química Analítica, y la microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD), que es una metodología LLE adaptada a escala miniaturizada mucho más moderna que ha sido utilizada en la presente Tesis. Por otra parte, se describe la extracción en fase sólida (SPE) como otro método de extracción-preconcentración también establecido y muy utilizado en Química Analítica, y finalmente, referido a la presente Tesis, el desarrollo de nuevas fases sólidas para SPE basadas en monolitos poliméricos orgánicos (*m*-SPE). Se describen los fundamentos y aspectos generales de los mismos.

## 2.2. Consideraciones fundamentales: Extracción líquido-líquido tradicional

La extracción líquido-líquido (LLE) es una de las técnicas de extracción más antiguas, utilizada generalmente, para muestras acuosas y/o matrices complejas. La LLE se basa en la transferencia de una o más sustancias entre dos fases líquidas inmiscibles puestas en contacto entre sí. El fundamento de la técnica es la diferencia de solubilidad de los solutos entre las dos fases, y las fuerzas puestas en juego se basan en procesos de partición, los cuales se encuentran dados por equilibrios de distribución. Generalmente, la fase que contiene los analitos es una fase acuosa y la que se utiliza para la extracción de los mismos, es una fase orgánica inmiscible en agua. Berthelot y Jungfleish concluyeron en 1872 que, en el proceso de extracción, la relación de concentraciones de un analito que se “reparte” entre dos solventes inmiscibles es *constante e independiente de la cantidad de analito* de la que se parte inicialmente, una vez que se alcanza el equilibrio. Nernst, veinte años más tarde, utilizando la regla de fases de Gibbs, publicó la “Ley de Distribución”, base termodinámica de los procesos de extracción.

Esta ley establece que, una vez alcanzado el equilibrio entre un soluto A que se reparte entre dos fases: acuosa (*ac*) y orgánica (*o*), en las cuales dicho soluto es soluble, los potenciales químicos del analito en ambas fases son iguales:  $\mu_{ac} = \mu_o$ , y se puede escribir el siguiente equilibrio de distribución:



Si consideramos que el analito A existe en una única forma (sin formar equilibrios de disociación o asociación con otros componentes del sistema) tanto en la fase acuosa como en la fase orgánica, podemos describir la constante termodinámica que representa el equilibrio anterior para el analito A, denominada “constante de partición”,  $(K^o_D)_A$ , de la siguiente forma:

$$(K^o_D)_A = \frac{(a_A)_o}{(a_A)_{ac}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Siendo  $(a_A)_o$  y  $(a_A)_{ac}$  las actividades del analito A en la fase orgánica y en la fase acuosa respectivamente. La constante que relaciona las concentraciones molares del analito A en ambas fases, se denomina “constante de distribución”,  $(K_D)_A$ , dada por la Ecuación 2:

$$(K_D)_A = \frac{[A]_o}{[A]_{ac}} \quad (\text{Ec. 2})$$

Siendo  $[A]_o$ , la concentración molar de la especie A en la fase orgánica, y  $[A]_{ac}$ , la concentración molar en la fase acuosa <sup>2</sup>. Para lograr la extracción del analito hacia la fase extractante es necesario maximizar el valor de  $K_D$ . Esto ocurre cuando el analito interactúa más favorablemente con el solvente extractante que con la matriz de la muestra, es decir, el solvente extractante provee un mejor ambiente (mayor solubilidad) para el analito. Un ambiente más favorable puede conseguirse seleccionando un solvente de polaridad similar al analito, o cambiando las condiciones experimentales que favorezcan la extracción como, por ejemplo, el empleo de surfactantes en la fase orgánica, sales en la fase acuosa (*salting-out*), cambios de pH o el empleo de ligandos iónicos para el caso de analitos iónicos o ionizables, cambios de temperatura, etc. <sup>3-5</sup>

Con frecuencia el valor de  $K_D$  no es lo suficientemente grande como para obtener una buena recuperación del analito con una sola operación de extracción, por lo que son necesarios más de un contacto de la fase acuosa con porciones “frescas” del solvente orgánico. Como resultado se obtienen varios extractos enriquecidos en el analito A. Sin embargo, los procedimientos analíticos que conllevan varios pasos resultan ser muy prolongados en el tiempo, son más laboriosos, y producen

un gran consumo de solventes orgánicos, generalmente, no compatibles con el medioambiente. Además, el riesgo de pérdida del analito o contaminación de la muestra aumenta con el número de operaciones que posee el método <sup>6</sup>. Es por estos inconvenientes que, con el objetivo de disminuir la cantidad de solvente orgánico utilizado y, a la vez, aumentar los factores de enriquecimiento, se han desarrollado técnicas microextractivas con el uso de un mínimo volumen de solvente orgánico o incluso con la eliminación total de solvente.

### 2.3. Miniaturización de las técnicas de extracción tradicionales

La implementación de técnicas de extracción miniaturizadas, o *microextracción*, reduce el gran consumo de solvente orgánico que requieren las técnicas de extracción convencionales. Estas técnicas están incluidas dentro de lo que se conoce como “química sustentable” o “green chemistry”, a menudo traducida como “química verde” <sup>6</sup>. Se han investigado tecnologías específicas en Química Analítica de manera de satisfacer los objetivos de la química verde. Dentro de las técnicas de microextracción también se pueden enmarcar aquellas que utilizan una mínima cantidad de sorbente sólido donde se extraen los analitos. De esta manera, podemos hacer una clasificación entre técnicas de *microextracción en fase líquida* y técnicas de *microextracción en fase sólida* <sup>1</sup>. Las técnicas medianamente modernas que cumplen con estos requisitos incluyen: extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés), microextracción líquido-líquido (MLL), microextracción dispersiva líquido-líquido (MELLD), microextracción dispersiva líquido-líquido basada en la solidificación de una gota orgánica flotante (SFO-DLLME), extracción asistida con ultrasonido (EAUS), microextracción en fase sólida (MEFS), extracción en fase sólida dispersa (EFSD), entre otros <sup>7-9</sup>.

### 2.4. Microextracción líquido-líquido

La MLL es similar a la técnica de extracción líquido-líquido convencional, pero donde el volumen de la fase extractante es pequeño <sup>10</sup>, generalmente formada por una pequeña gota de solvente orgánico o líquido iónico (1 a 5  $\mu\text{L}$ ), colocada directamente dentro del vial de extracción, o suspendida en la punta de una jeringa, en contacto directo con la matriz de la muestra o separada por algún polímero poroso como polipropileno, o en contacto con el espacio de cabeza (head-space) del vial de muestra.

### 2.4.1. Microextracción líquido-líquido dispersiva

La técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (MELLD) es una técnica MLL creada por Rezaee, M., *et al.*<sup>11</sup>. A diferencia de la MLL convencional, en la MELLD, el solvente extractante inmisible en agua (ejemplo: diclorometano, n-octanol, un líquido iónico, etc.) se dispersa junto a un solvente dispersante (ejemplo: metanol, acetona, isopropanol, etc.), en la matriz de la muestra. La técnica de MELLD consiste en un sistema ternario de solventes, en la cual la mezcla extractante-dispersante es inyectado rápidamente en una muestra acuosa utilizando una jeringa. El solvente dispersante debe cumplir la característica de ser miscible tanto en la fase acuosa como en la orgánica. Durante la dispersión producida, el solvente dispersante se mantiene soluble en la fase acuosa, y, simultáneamente, se produce la formación de pequeñas gotas del solvente de extracción, generalmente, de menos de 0,1  $\mu\text{m}$  de diámetro, incrementando de esta manera la transferencia de masa debido al dramático aumento del área superficial de contacto<sup>12</sup>. Debido a que la emulsión formada es termodinámicamente desfavorable, se produce la separación de las fases, donde las gotas de solvente extractante colapsan formando una fase orgánica, inmisible en agua, que queda en el fondo de un tubo cónico (si el solvente extractante utilizado es más denso que el agua)<sup>13</sup>. Este último proceso de separación de fases puede agilizarse mediante centrifugación.

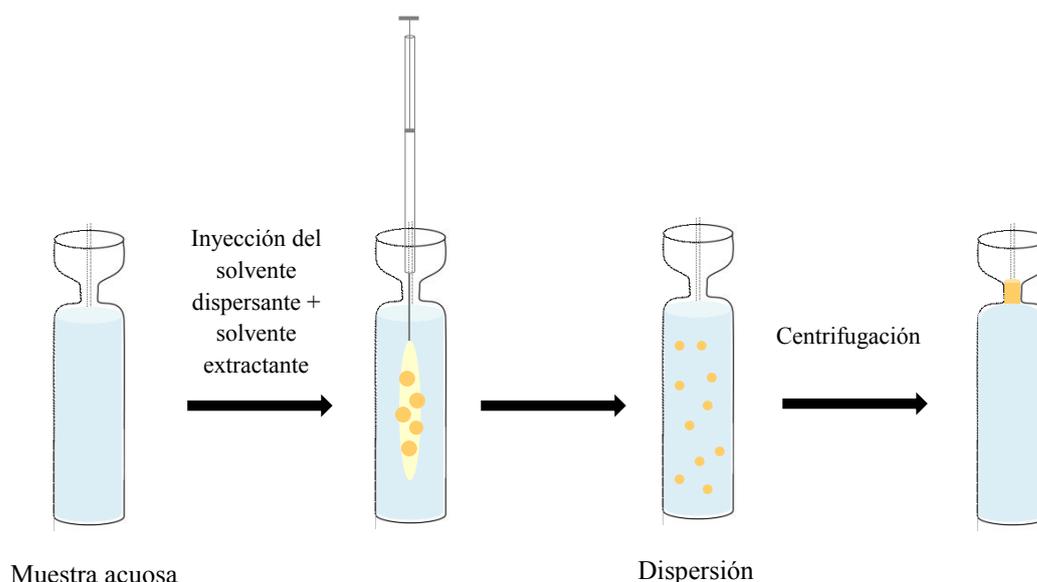
Si las interacciones entre los analitos y la fase extractante son lo suficientemente fuertes, estos quedarán disueltos en el pequeño volumen de fase orgánica, obteniéndose de esta forma, grandes factores de enriquecimiento (FE). Obviamente, la fracción de analito extraída en el solvente extractante depende de los mismos factores experimentales que se mencionan en la Sección 2.2 para ELL<sup>12</sup>.

Entre las ventajas más importantes que tiene la metodología MELLD sobre los métodos de extracción convencionales se pueden mencionar la rapidez, sencillez, bajo costo, grandes eficiencias de extracción y volumen mínimo de solvente orgánico, lo cual minimiza la exposición y el impacto ambiental, aún si los solventes que se emplean no son completamente inocuos<sup>13</sup>.

#### 2.4.1.1. Solventes extractantes

La principal característica que debe cumplir el solvente extractante es ser inmisible en agua. En general, los solventes extractantes que se utilizan son más densos que la fase acuosa, lo que permite que la fase orgánica quede en el fondo, por lo general, de un tubo cónico. Entre los más utilizados se encuentran los solventes clorados como, cloroformo, clorobenceno, y tetracloruro de carbono. Este modo de la técnica requiere bastante cuidado al descartar la fase acuosa que queda en la parte superior,

lo que hace que el método se vuelva lento. Sin embargo, existen algunos trabajos en los cuales se han utilizado solventes menos densos que el agua <sup>14</sup>, como n-hexano, isooctano y alcoholes de cadena larga, entre otros. Para este segundo modo se han diseñado tubos de cuello angosto <sup>15</sup>, lo que permite que los pocos microlitros del extractante queden alojados en esa sección del tubo y su recolección sea facilitada. El proceso de extracción puede ser representado en la Figura 2:



**Figura 2.** Esquema de una MELLD con un solvente extractante menos denso que el agua.

Debido a la toxicidad de los solventes orgánicos convencionales, los líquidos iónicos (LIs) se han introducido dentro de la Química Analítica como un nuevo grupo de solventes extractantes. Estos compuestos poseen la ventaja de ser menos tóxicos (la no toxicidad sólo se ha comprobado para algunos de ellos), no volátiles (lo que resulta una ventaja para evitar su inhalación) y, por lo tanto, menos contaminantes <sup>16</sup>.

En 2009, Shemirani y Baghdadi desarrollaron la microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos para la determinación de especies inorgánicas en soluciones salinas en las cuales las microgotas de solvente extractante, un líquido iónico, se formaban *in situ* (IL-LLME *in situ*) <sup>17</sup>, es decir, en la propia matriz de la muestra. En este caso, se generaba un líquido iónico insoluble en agua, el hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio, [HMIm][PF<sub>6</sub>], a partir de la mezcla de un líquido iónico soluble en agua, como es el tetrafluoroborato de 1-hexil-3-metilimidazolio, [HMIm][BF<sub>4</sub>], con NaPF<sub>6</sub>. En este caso, no se requiere el empleo de un solvente dispersante, que reduce la recuperación obtenida <sup>18</sup>.

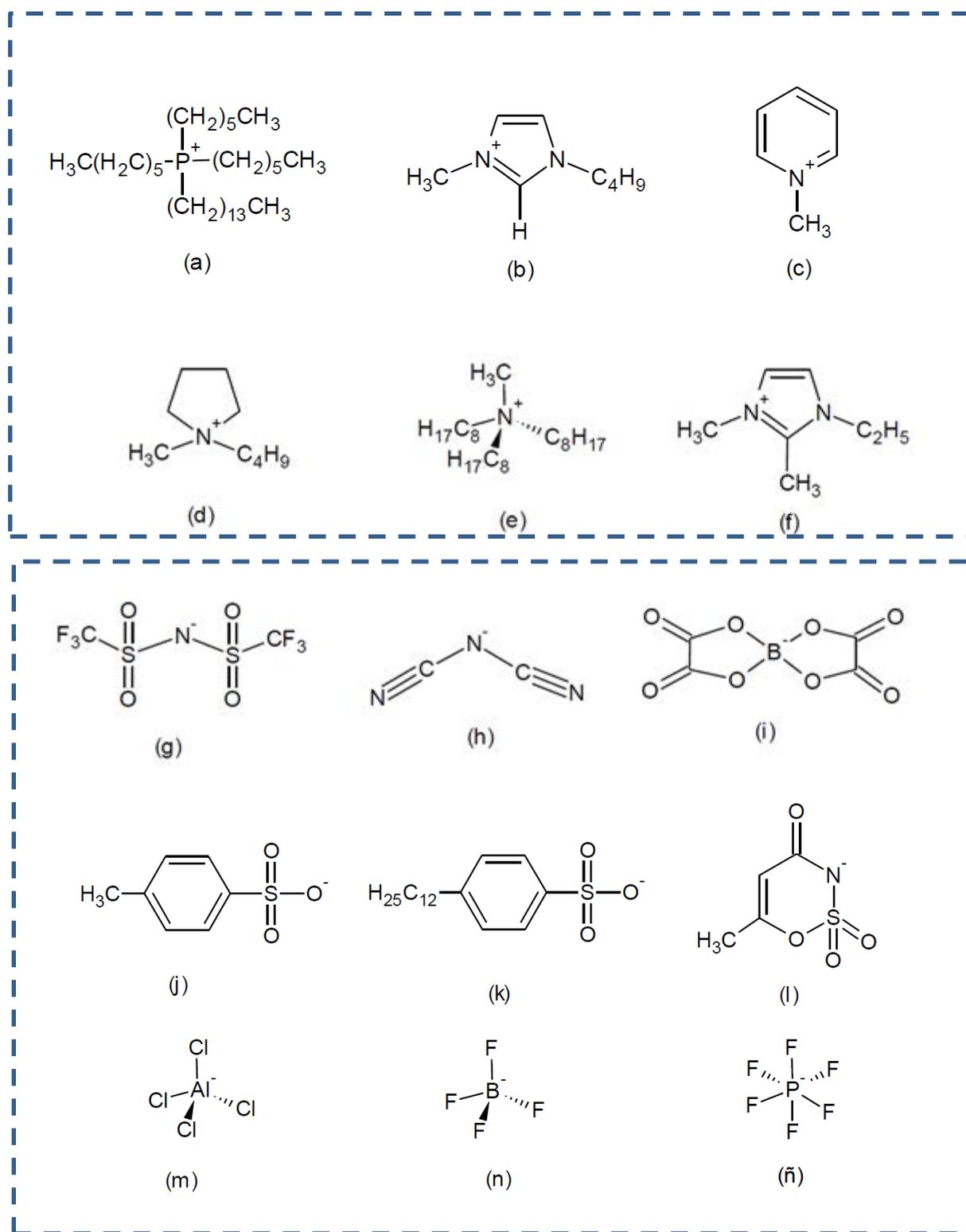
## 2.4.2. Líquidos iónicos a temperatura ambiente (RTILs)

### 2.4.2.1. Características

Los líquidos iónicos (ILs) son líquidos formados enteramente por iones, es decir, son sales con puntos de fusión menores a los 100°C. Si estas sales, además, son líquidas a temperatura ambiente, se los denomina “*líquidos iónicos a temperatura ambiente*” (Room Temperature Ionic Liquids, RTILs) los que han comenzado a utilizarse en la metodología MELLD hace pocos años<sup>19</sup>. Los RTILs pertenecen a un grupo de solventes formados por cationes orgánicos muy asimétricos y de gran tamaño, y aniones de diferente naturaleza (orgánica o inorgánica), de manera de que las fuerzas atractivas anión-cación son más débiles que en una sal iónica convencional y por lo tanto, permanecen líquidos a temperatura ambiente<sup>20</sup>.

La mayor parte de los RTILs investigados hasta el momento utilizan sólo un pequeño grupo de sales. Entre estos se encuentran cationes de amonio cuaternario, fosfonio, imidazolio o piridinio, combinados con contraiones inorgánicos con carga difusa (relación carga/radio baja). En la Figura 3 se muestran algunas estructuras típicas de los cationes y aniones más utilizados. En estas sales, el núcleo de los cationes se encuentra anexado a uno o más grupos orgánicos. Generalmente, estos grupos son fragmentos de hidrocarburos saturados<sup>21</sup>.

Se calcula que las posibles combinaciones de cationes y aniones de estos RTILs puede teóricamente producir  $10^{18}$  líquidos iónicos nuevos<sup>22</sup>. Debido a esta facilidad de intercambio de sus componentes han sido propuestos como materiales de estructura diseñable (líquidos de “diseño”) en el sentido de que, por ejemplo, la estructura del catión puede cambiarse fácilmente (variando la cantidad de grupos metileno, cantidad de átomos electronegativos, etc.), de manera de tener una enorme variedad de líquidos con propiedades fisicoquímicas próximas entre sí<sup>23</sup>, a diferencia de lo que ocurre con los solventes orgánicos convencionales, donde al cambiar de un líquido a otro las propiedades cambian completamente o de manera drástica.



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

### 2.4.2.2. Propiedades de los RTILs

Las propiedades más relevantes de los RTILs son: bajo punto de fusión, baja presión de vapor y volatilidad, alta conductividad eléctrica, alta densidad iónica, y en general, buena estabilidad química y térmica. Estas características únicas de los RTILs, se deben a su estructura y a la interacción entre los iones que los componen. Algunas investigaciones iniciales se han basado en desarrollar y comprender la relación entre la naturaleza y estructura de los cationes y aniones y sus características físicas <sup>20</sup>. A continuación, se describen algunas de las propiedades físicas más importantes de los RTILs, donde se pueden observar algunas de estas relaciones.

#### *Punto de fusión*

Los principales factores que influyen en el punto de fusión (pf) de los RTILs son: la carga de los iones, su distribución de carga, la simetría de los iones y su tamaño <sup>24</sup>. Un claro ejemplo es la comparación del pf del NaCl, 801 °C, y el del 1-propil-3-metilimidazolio, 60 °C, donde la disminución del pf se debe al reemplazo de un pequeño catión inorgánico por un catión orgánico voluminoso y asimétrico <sup>20</sup>. El aumento en la asimetría proporciona una disminución en el punto de fusión debido a que se reduce la capacidad de empaquetamiento de los iones. De manera similar ocurre con el incremento del tamaño de los aniones, lo que produce una disminución de las interacciones coulómbicas, disminuyendo el pf. Esto se puede ver claramente en el caso de una sal de sodio, donde el pf disminuye desde 801 °C hasta 185 °C para  $\text{Cl}^- > [\text{BF}_4]^- > [\text{PF}_6]^- > [\text{AlCl}_4]^-$ . Las atracciones coulómbicas en los líquidos iónicos son comparables en magnitud con las interacciones moleculares de líquidos moleculares <sup>24</sup>.

#### *Presión de vapor*

Desde un punto de vista de las aplicaciones, las presiones de vapor de los RTILs son despreciables, lo que facilita su manejo como solventes y lo que los hace parte de la “química verde”, a diferencia de los solventes orgánicos comúnmente utilizados como diclorometano, cloroformo, metanol, etc.<sup>25</sup>. Sus presiones de vapor son muy bajas como para ser detectadas y esto se debe a las fuertes interacciones coulómbicas entre sus iones <sup>26</sup>. Sin embargo, se conoce que su presión de vapor aumenta con el aumento de la temperatura permitiendo que algunos de ellos puedan ser destilados en su rango de estabilidad térmica, por debajo de los 500 K <sup>25</sup>.

### *Densidad*

La mayor parte de los RTILs conocidos son más densos que el agua con valores de densidad entre 1,12-2,4 g cm<sup>-3</sup>. La densidad decrece con el incremento del largo de la cadena alquílica sustituyente en los cationes orgánicos (para un mismo anión) <sup>20</sup>. Para RTILs con el mismo catión (1-butil-3-imidazolio) la densidad decrece con el peso molecular de los aniones <sup>23</sup>. En general, los LIs con cationes imidazolio son más densos que el agua, sin embargo, las densidades de los LIs con cationes amonio y fosfonio varían significativamente y, muchos de ellos suelen ser menos densos que el agua <sup>26</sup>.

### *Viscosidad*

La mayoría de los RTILs son líquidos con viscosidades comparables a los aceites, siendo entre dos y tres órdenes más grandes que los valores reportados para los solventes orgánicos convencionales <sup>20</sup>. La viscosidad alta es su mayor desventaja en métodos de extracción a temperatura ambiente, ya que esta característica dificulta la transferencia de masa <sup>26</sup>, y además, se requiere gran potencia de agitación cuando se necesita mezclarlos en un sistema líquido-líquido heterogéneo (por ejemplo, en ELL o MELLD). En general, los LIs con cationes de fosfonio presentan menores viscosidades en comparación a los correspondientes con cationes de amonio. La viscosidad no sólo depende del tipo y tamaño del catión, sino también del anión. Nuevamente esta característica física está íntimamente relacionada con las interacciones coulómbicas entre sus iones <sup>26</sup>.

#### **2.4.2.3. Aplicaciones de los RTILs**

Los RTILs, son utilizables para una amplia variedad de funciones:

- Solventes de uso alternativo en procesos industriales, reemplazando compuestos orgánicos volátiles, contaminantes para el medio ambiente;
- Catalizadores de reacciones homogéneas en síntesis orgánica e inorgánica;
- Medio de almacenamiento inerte para el transporte de gases (como CO<sub>2</sub>, arsina, fosfina o boranos) o como medio de tratamiento y purificación de gas natural;
- Medio de almacenamiento y conducción de energía en celdas solares;
- Solventes para procesos de extracción <sup>27</sup>

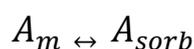
Debido a que los RTILs pueden solubilizar una gran variedad de compuestos orgánicos, organometálicos e inorgánicos sus aplicaciones en la química analítica han recibido una importante atención en los últimos años<sup>28</sup>. Considerando la naturaleza líquida de los RTILs, la primera aplicación natural ocurre con las técnicas de preparación de muestras que incluyen microextracción en fase líquida (ELL<sup>22,29</sup>, MELLD<sup>18,30</sup>). Sin embargo, también han tenido gran aplicación en el campo de la extracción y microextracción en fase sólida (SPE<sup>28</sup> y SPME<sup>31</sup>).

El uso de RTILs en MELLD ha avanzado rápidamente<sup>18,32</sup> ya que ofrecen importantes ventajas comparado con los solventes orgánicos usados normalmente. Usualmente se han utilizado RTILs con cationes de imidazolio, sin embargo, tienen la desventaja de su alto costo por lo que normalmente se los sintetiza a partir de precursores de más bajo costo, dado que la síntesis es muy sencilla<sup>5,18,30</sup>. Los RTILs derivados del catión fosfonio no han sido tan estudiados o empleados en Química Analítica como los derivados de imidazolio y, además, son muchos más económicos. En general, tienen mayor estabilidad térmica y química, mejores propiedades de solvatación, y muchos de ellos son menos densos que el agua, lo que facilita su recolección en métodos como la MELLD<sup>33,34</sup>.

## 2.5. Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción en fase sólida (solid phase microextraction, SPE) es una técnica ya establecida en Química Analítica, utilizada para el aislamiento y/o enriquecimiento de compuestos de interés y/o la limpieza de la matriz, por lo general, desde muestras de agua. La SPE, generalmente, implica poner una muestra acuosa en contacto con una fase sólida o sorbente *particulado*, por lo que el analito es selectivamente retenido en la superficie del sólido hasta la elución final con algún solvente “fuerte”. La fase sólida es usualmente empaquetada dentro de pequeños tubos o cartuchos plásticos<sup>35</sup>. Se han desarrollado varias tecnologías que incluyen nuevos formatos (discos, tips de micropipetas y microplacas de múltiples pozos), nuevos materiales (ej: sílice o lechos poliméricos y lechos mixtos) y el desarrollo de sistemas automáticos y on-line<sup>36</sup>. Cualquiera sea el diseño que se utilice, la muestra que contiene al analito es forzada mediante presión o vacío a pasar a través del sorbente particulado. El extracto obtenido es finalmente utilizado para el análisis<sup>36</sup>.

La interacción del analito con la fase estacionaria ocurre por adsorción a la superficie o partición en las capas moleculares externas (de acuerdo a mecanismos que dependen de la naturaleza de dicha fase: polar/ no polar/ hidrofóbica/ intercambio iónico/ afinidad/ etc.) desarrollándose el siguiente equilibrio:



Siendo  $A_m$  y  $A_{sorb}$  el analito en la muestra y el analito adsorbido en el sorbente, respectivamente. Se puede definir una constante de distribución,  $K_D$ , la cual indica que una porción del analito permanece en solución y otra es adsorbida sobre (o disuelta en) la fase sólida (Ecuación 3).

$$K_D = \frac{[A]_{sorb}}{[A]_m} \quad (\text{Ec. 3})$$

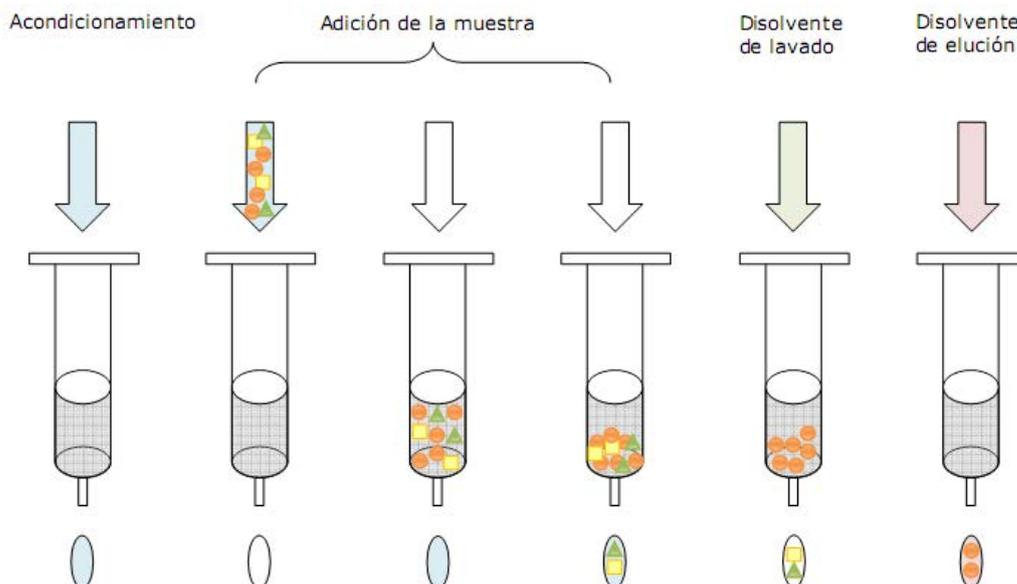
Además de una adecuada elección del material de relleno, hay otros factores a tener en cuenta para obtener una efectiva aplicación del método. El número de sitios activos disponibles en la fase sorbente no debe ser menor que el número de moléculas del compuesto a retener. Por lo tanto, es importante asegurar la suficiente capacidad de los cartuchos de SPE que se van a utilizar. Además, es importante controlar el flujo con el que la muestra pasa a través del sorbente, ya que un flujo demasiado alto disminuye el tiempo de contacto del analito con la fase estacionaria, lo que puede resultar en una retención poco efectiva<sup>36</sup>. El paso siguiente a la adsorción/partición es la desorción/solubilización de los analitos hacia la fase móvil, por lo que otro factor a considerar, y no menos importante que los anteriores, es el solvente de elución, el cual debe proveer un mejor ambiente (solubilidad) para el analito que el que le ofrece la fase sólida. Cuanto más fuerte es el solvente (más afín con el analito), menor es el volumen necesario para la elución completa, lo que permite obtener una mayor preconcentración. En el caso de la SPE, a diferencia de las técnicas de extracción líquido-líquido, el solvente de extracción puede ser miscible con el solvente de la muestra (por lo general, agua), ya que estos nunca entran en contacto directo<sup>36</sup>.

Un paso intermedio a la elución de los analitos es la de limpieza del cartucho con un solvente de fuerza intermedia, la cual permite eliminar interferencias de la matriz que hayan quedado retenidas, antes del paso del solvente de extracción.

Un esquema que representa los pasos del método SPE se muestra en la Figura 4.

### 2.5.1. Sorbentes

La selectividad de una extracción está relacionada con la capacidad del sorbente para discriminar entre los analitos de interés y los demás compuestos de la matriz. Dentro de los materiales más utilizados para la técnica de SPE se encuentran las partículas de sílice, “desnudas” o químicamente ligadas (C8, C18, cianopropil, diol, etc.), polímeros entrecruzados y carbono grafito con partículas de sílice, o fases mucho más selectivas como las formadas por polímeros impresos<sup>37,38</sup>.



**Figura 4.** Esquema de los pasos de un proceso de SPE.

La mayoría de los sorbentes utilizados en SPE se encuentran en forma de lecho. Generalmente, estos lechos se empaquetan en un cartucho o columna. Sin embargo, el principal problema de los materiales particulados es su imposibilidad de rellenar todo el espacio disponible. Los huecos entre las partículas reducen la eficiencia de extracción, por lo que columnas cortas no pueden ser utilizadas a caudales altos <sup>39</sup>. Debido a las limitaciones que presentan estos materiales, como la presencia de grupos silanoles libres, áreas superficiales relativamente bajas, un rango estrecho de pH en el cual son estables y el volumen entre partículas, los soportes basados en polímeros monolíticos surgen como una alternativa viable <sup>39</sup>. Estos lechos monolíticos han sido ampliamente utilizados en cromatografía de líquidos (HPLC) o electroforesis capilar (CE) y pueden ser de naturaleza **orgánica** (poliméricos) o **inorgánica** (sílice). Están formados por una única estructura porosa, caracterizados por poseer diferentes tipos de poros interconectados: *macroporos* que permiten el flujo convectivo de la fase móvil, *mesoporos* que permiten el rápido intercambio de adsorción/desorción de los analitos <sup>39,40</sup> y si el tipo de material lo permite (como los monolitos de sílice) también puede contener *microporos* <sup>41</sup>. Estos monolitos son sintetizados *in situ*, generalmente a través de una reacción de una sola etapa, y sus propiedades, tales como porosidad, área superficial y funcionalidad (tipo de monómero funcional y agente entrecruzante), pueden ser diseñadas *a priori*, según las condiciones de polimerización seleccionadas. La adecuada elección de los monómeros funcionales permite ampliar sus aplicaciones a analitos de diferente polaridad. Otra ventaja importante que ofrecen estos monolitos es la

eliminación de las fritas de retención que necesitan las partículas de sílice en los extremos de la columna, que pueden ser causa de oclusiones o generación de burbujas, además de las posibles obstrucciones cuando se inyectan muestras reales de origen biológico o clínico. Al no requerir de un proceso de empaquetamiento de partículas, la fabricación de estos cartuchos es más sencilla. Normalmente, los cartuchos de SPE tradicional se adquieren comercialmente, a diferencia de los cartuchos para *m*-SPE que se pueden fabricar fácilmente en el laboratorio (“home-made”) de una manera más económica. En este trabajo de Tesis denominaremos a la metodología de extracción en fase sólida monolítica “*m*-SPE”.

### 2.5.2. Polímeros monolíticos orgánicos

Los polímeros monolíticos orgánicos están constituidos por polímeros basados en carbono. Las primeras aproximaciones a estos materiales fueron realizadas por Kubín y *col.* hacia fines de los años '60, sintetizando geles de metacrilatos <sup>42</sup>. Posteriormente, Hjertén trabajó con polímeros obtenidos a partir de acrilatos en presencia de una sal, los cuales fueron insertados en columnas de acero inoxidable <sup>43,44</sup>. Svec y Fréchet publicaron un trabajo en 1994 sobre monolitos de metacrilatos utilizando la técnica de síntesis más empleada hasta la actualidad <sup>45</sup>.

El primer polímero monolítico poroso utilizado en SPE fue el poli(estireno-*co*-divinilbenceno), PS-DVB. Estos monolitos presentan áreas superficiales mayores a  $400 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , lo cual garantiza una gran superficie de interacción con los analitos. Además, se fabrican con un alto contenido de solvente formador de poros (porogénico), el cual se elimina por evaporación o lavado, generando una cantidad de poros suficientemente grande suficiente como para permitir la permeabilidad de líquidos. Se han reportado estudios de la extracción de compuestos fenólicos, pesticidas organofosforados y compuestos organoclorados <sup>46</sup>, donde se muestra que los sorbentes de PS-DVB permiten obtener mejores valores de recuperación que los cartuchos de C18 sobre sílice, utilizado en la mayoría de los procedimientos estandarizados <sup>39</sup>. Dichos polímeros son adecuados para la extracción de compuestos no polares debido a su alta hidrofobicidad. Para mejorar los alcances de estos sorbentes a analitos más polares se ha propuesto la modificación de estos polímeros con una gran variedad de funcionalidades <sup>47</sup>. Otra estrategia implementada con el mismo propósito consistió en utilizar mezclas de polimerización incluyendo monómeros polares de metacrilato <sup>37</sup>.

### 2.5.2.1. Síntesis de polímeros monolíticos orgánicos

La mezcla de polimerización de los monolitos consiste en una combinación de monómeros, entre los que se encuentra un monómero funcional (seleccionado según la naturaleza de los analitos a extraer), un agente entrecruzante o cross-linker, una mezcla porogénica de disolventes y un iniciador radicalario <sup>48</sup>. La mezcla se polimeriza en la mayoría de los casos por calentamiento en un baño de agua u horno, por la acción de iniciadores químicos, térmicos o mediante radiación (UV, rayos  $\gamma$ , etc.). Después de la polimerización se eliminan los restos de solvente porogénico y de monómero sin reaccionar desde el polímero formado mediante lavado con solvente orgánico <sup>49</sup>.

Cuando los monolitos se preparan dentro de capilares de entre 10-25 mm, la polimerización se logra rápidamente en un solo paso, sin embargo, cuando se utilizan moldes de mayor tamaño la preparación se dificulta debido a la disipación del calor durante la polimerización <sup>39</sup>. Es decir, la porosidad obtenida o naturaleza de los poros depende, además de los factores mencionados anteriormente, del tipo y dimensiones del molde.

La característica principal de estos materiales es su estructura porosa. El mecanismo clásico de formación de poros que ocurre durante la polimerización depende del solvente usado para la creación de esos poros. En presencia de un solvente precipitante (no solvatante), en el cual se encuentran presentes el monómero, el entrecruzante y el iniciador térmico (en este caso), el proceso es el siguiente:

- El iniciador radicalario se descompone a una temperatura determinada generando radicales libres que comienzan la polimerización en la solución;
- Los polímeros formados precipitan debido al entrecruzamiento y a la pobre solvatación del solvente;
- Debido a que los monómeros son mejores solventes para el polímero que el solvente porogénico, los núcleos insolubles formados se hinchan con los monómeros del líquido circundante. La polimerización continúa tanto en la solución como en los núcleos formados, sin embargo, es mayor en este último debido a la gran concentración local de monómeros;
- Los núcleos captan moléculas poliméricas formadas, aumentando de esta forma su tamaño;
- Los núcleos de mayor tamaño se asocian con núcleos vecinos en “clusters” o racimos, mediante cadenas poliméricas que se entrecruzan;
- En los siguientes pasos el tamaño de los clusters es lo suficientemente grande como para permitir el contacto con otros y formar una estructura interconectada en el sistema de polimerización;

- La estructura interconectada se refuerza tanto por entrecruzamiento entre los glóbulos como por la captura de cadenas poliméricas de la solución, dando lugar finalmente al polímero poroso <sup>50</sup>.

La fracción de espacio vacío constituye los “*macroporos*”. El volumen total de estos en el polímero final es cercano a la fracción de volumen del solvente porogénico en la mezcla de polimerización inicial, debido a que el solvente queda atrapado en el entrecruzamiento del polímero y posteriormente se elimina por lavado.

Las variables que afectan el tamaño y distribución de tamaño de los poros son: la temperatura, la composición del solvente porogénico y el contenido de entrecruzante. Algunas de los efectos se detallan a continuación <sup>51</sup>:

- Temperatura: Este factor afecta fundamentalmente a la distribución del tamaño de poro. A bajas temperaturas, la velocidad de reacción es lenta y permite la transferencia de una parte sustancial de monómeros desde la solución hacia los núcleos ya formados en la etapa de nucleación. En este caso la polimerización sobre los núcleos es cinéticamente más favorable que en la solución circundante. Al aumentar la temperatura, ocurre el efecto inverso, y estos nuevos núcleos formados son capturados por otros núcleos formando “racimos” de mayor tamaño con menos textura individualizada, teniendo por lo tanto menor área superficial.
- Entrecruzante: El cambio en la relación monómero-entrecruzante permite la formación de distintas estructuras porosas y además produce materiales con distinta composición química. Cuanto mayor es la cantidad de entrecruzante, mayor es el entrecruzamiento del polímero, menor el tamaño de los glóbulos, por lo tanto, menor el área superficial final.
- Solvente porogénico: El uso de solventes débiles, menos solvantes del polímero, es decir, de polaridad muy distinta a la del polímero, permiten una separación de fases más temprana mediante precipitación, obteniéndose poros más grandes.

### 2.5.3. Caracterización de materiales porosos

Muchas de las aplicaciones de los materiales porosos, como en catálisis, cromatografía o técnicas de extracción, recaen en su capacidad de poseer gran cantidad de sitios activos, es decir grandes áreas superficiales. Para obtener polímeros con grandes áreas superficiales es necesaria la existencia de una gran cantidad de poros pequeños. La mayor contribución al área superficial proviene de los *microporos*, que son, aquellos poros con tamaños menores a 2 nm, y en segundo lugar de los *mesoporos*, los cuales tienen tamaños entre 2 a 50 nm. Los *macroporos*, de mayor tamaño, no

contribuyen significativamente al área superficial total <sup>39</sup>, pero son los que permiten el flujo convectivo de la fase móvil. Los monolitos de sílice poseen altas áreas superficiales, de alrededor de 400 m<sup>2</sup> gr<sup>-1</sup>, dado que tiene una amplia red de meso y microporos, mientras que los basados en polímeros orgánicos poseen áreas superficiales mucho menores, de alrededor de 60 m<sup>2</sup> gr<sup>-1</sup>, dado que no contienen microporos. Sin embargo, la fabricación de monolitos de sílice es mucho más compleja debido a que el proceso de *sol-gel* es más difícil de controlar y menos reproducible <sup>52</sup>.

Existen numerosos métodos y herramientas analíticas que proporcionan información sobre la morfología de los materiales monolíticos. Estos métodos incluyen técnicas como la microscopía electrónica de barrido (SEM, por sus siglas en inglés), la porosimetría de intrusión de mercurio (MIP, por sus siglas en inglés) y la adsorción/desorción de nitrógeno evaluada mediante la ecuación de Brunauer-Emmet-Teller (BET).

### 2.5.3.1. Microscopía de barrido electrónico

La microscopía de barrido electrónico (Scanning Electron Microscopy, SEM) es una técnica no destructiva que permite el estudio de la superficie de materiales sólidos. En esta técnica un haz de electrones, de entre 10 a 40 kV, se focaliza sobre la muestra a analizar y se realiza un barrido sobre ella. Los haces de electrones secundarios y retrodispersados por el material se analizan con un sistema de detección adecuado que amplifica esta señal y produce una imagen visual detallada de la superficie. Estos electrones emitidos brindan información de la topografía y morfología de la superficie del material, pero no brindan información interna del mismo <sup>53</sup>.

La técnica SEM permite obtener una gran resolución espacial del orden de entre 1,5 y 3 nm, para lo cual se requiere que los materiales sean conductores, y en caso de que no lo sean (como es el caso de los polímeros monolíticos), deben ser sometidos a un recubrimiento con un material conductor para poder ser analizados, tal como el oro <sup>54</sup>.

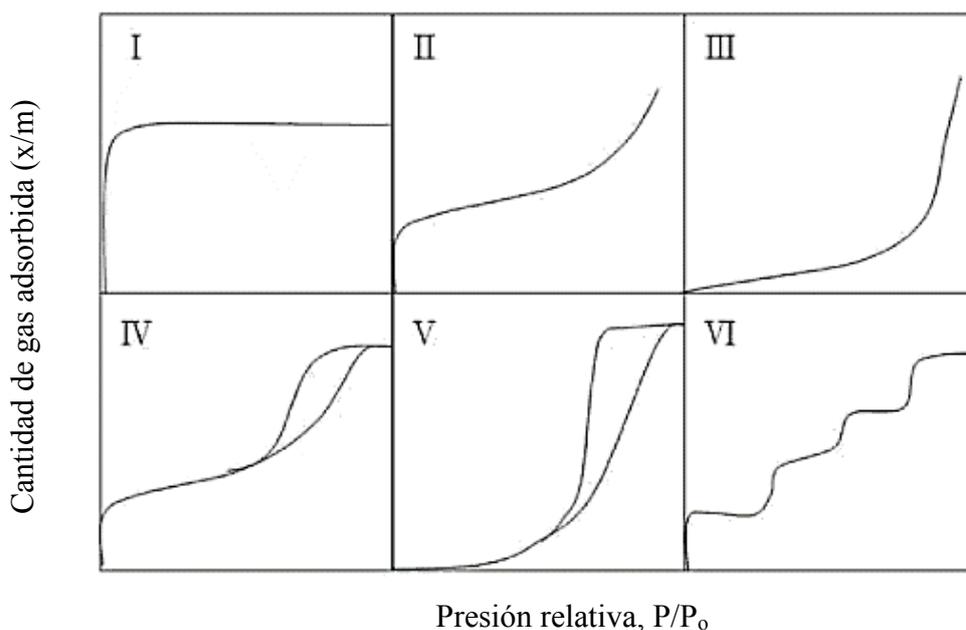
### 2.5.3.2. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno

La adsorción-desorción de nitrógeno, es otra técnica muy utilizada para caracterizar materiales porosos, la cual permite, mediante modelos matemáticos, determinar el área superficial específica del mismo (utilizando, por ejemplo, el método BET <sup>55</sup>),  $S_g$ ; el volumen total de poros (por ejemplo con el método BJH, Barrett, Joyner, and Halenda <sup>55</sup>),  $V_p$ ; y la distribución de diámetros de poros, comprendidos entre 0,3 y 300 nm, mediante la adsorción de multicapas de nitrógeno a la temperatura

del nitrógeno líquido (77K). El comportamiento de sorción de los macroporos es distinto al de los mesoporos y microporos, por lo que mediante el análisis de estas isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno es posible la determinación de la estructura de poros del material.

En esta técnica, la muestra se lleva a temperatura constante por medio de un baño externo y se realiza un desgasificado. A continuación, se introducen, en etapas sucesivas, pequeñas cantidades de nitrógeno líquido (adsorbato) en el interior de la cámara que contiene la muestra. Las moléculas de gas que alcanzan la superficie de la muestra se adsorben y tienden a formar una delgada capa que cubre por completo la superficie adsorbente, formándose una monocapa de moléculas adsorbidas. La adición continua de moléculas de gas una vez que se ha formado la monocapa lleva a la formación gradual de capas múltiples o multicapas. Las isotermas de adsorción-desorción se realizan en función de la presión relativa, es decir, la relación entre la presión aplicada,  $P$ , y la presión de saturación,  $P_0$ . Las isotermas de adsorción comienzan a baja presión donde se van llenando los poros más grandes, y a medida que se va llegando a la presión de saturación se van llenando todos los poros. El volumen total de poro es determinado por la cantidad de nitrógeno adsorbido cercano a la presión de saturación. La desorción ocurre cuando la presión de  $N_2$  decrece, comenzando a la presión de saturación. La curva de desorción, generalmente, no es igual que la curva de adsorción (por un efecto de histéresis). A partir de parámetros obtenidos de estas curvas se puede obtener la superficie específica del material y se puede conocer qué tipo de poros (micro, meso) tiene <sup>56</sup>.

En la Figura 5 se pueden ver los tipos de isotermas según la clasificación de IUPAC. Las isotermas tipo I corresponden a materiales que presentan microporos, las de tipo II, III y VI a no porosos, y las de tipo IV a materiales con mesoporos, y las de tipo V a materiales con meso y microporos <sup>57,58</sup>.



**Figura 5.** Clasificación de isotermas de adsorción de la IUPAC.

## 2.6. Bibliografía

1. Valcárcel, M., Cárdenas, S. & Lucena, R. *Analytical Microextraction Techniques*. (Bentham Science Publishers, 2017).
2. Valcárcel Cases, M. V & Rodríguez, M. S. *Teoría y práctica de la extracción líquido-líquido*. (Alhambra, 1984).
3. Reta, M., Waymas, O. & Silber, J. J. Partition of polyhydroxy compounds of biological and pharmacological significance between AOT reverse microemulsions and aqueous salt solutions. *J. Phys. Org. Chem.* **19**, 219–227 (2006).
4. Romero, L., Grisales, J. O. & Reta, M. Comparison between phase-transfer and cloud-point methodologies for the micellar extraction of biogenic amines. *Talanta* **81**, 1431–1437 (2010).
5. Padró, J. M., Pellegrino Vidal, R. B., Echevarria, R. N., Califano, A. N. & Reta, M. R. Development of an ionic-liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of antichagasic drugs in human breast milk: Optimization by central composite design. *J. Sep. Sci.* **38**, 1591–1600
6. Spietelun, A., Marcinkowski, Ł., De La Guardia, M. & Namieśnik, J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta* **119**, 34–45 (2014).
7. Anastas, P. T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **29**, 167–175 (1999).
8. Lubomirsky, E., Padró, J. M. & Reta, M. R. Development of a dispersive liquid-liquid microextraction technique for the analysis of aryloxyphenoxy-propionate herbicides in soy-based foods. *Microchem. J.* **129**, 63–70 (2016).
9. Canales, R., Guíñez, M., Bazán, C., Reta, M. & Cerutti, S. Determining heterocyclic aromatic amines in aqueous samples : A novel dispersive liquid-liquid micro-extraction method based on solidification of floating organic drop and ultrasound assisted back extraction followed by. *Talanta* **174**, 548–555 (2017).
10. Kokosa, J. M., Przyjazny, A. & Jeannot, M. *Solvent Microextraction: Theory and Practice*. (Wiley, 2009).

11. Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M., Aghaee, E., Ahmadi, F., Berijani, S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* **1116**, 1–9 (2006).
12. Moldoveanu, S. C. & David, V. *Modern Sample Preparation for Chromatography*. (Elsevier Science, 2014).
13. Zgoła-Grzeškowiak, A. & Grzeškowiak, T. Dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **30**, 1382–1399 (2011).
14. Guo, L. & Lee, H. K. Low-density solvent-based solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction for the fast determination of trace levels of sixteen priority polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* **1218**, 5040–5046 (2011).
15. Hashemi, P., Beyranvand, S., Mansur, R. S. & Ghiasvand, A. R. Development of a simple device for dispersive liquid–liquid microextraction with lighter than water organic solvents: Isolation and enrichment of glycyrrhizic acid from licorice. *Anal. Chim. Acta* **655**, 60–65 (2009).
16. Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M., Hernández-Borges, J. & Rodríguez-Delgado, M. Á. Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *TrAC Trends Anal. Chem.* **29**, 728–751 (2010).
17. Baghdadi, M. & Shemirani, F. In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: A novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions. *Anal. Chim. Acta* **634**, 186–191 (2009).
18. Mesa, L. B. A., Padro, 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.* **141**, 1694–1701 (2013).
19. Huddleston, J. G. J. G., Willauer, H. D., Swatoski, R. P., Visser, A. E. & Rogers, R. D. R. D. Room temperature ionic liquids as novel media for ‘ clean ’ liquid – liquid extraction. *Chem. Commun.* **0**, 1765–1766 (1998).
20. Marsh, K. N., Boxall, J. A. & Lichtenthaler, R. Room temperature ionic liquids and their mixtures - A review. *Fluid Phase Equilib.* **219**, 93–98 (2004).

21. H. Davis, Jr., J. Task-Specific Ionic Liquids. *Chem. Lett.* **33**, 1072–1077 (2004).
22. Kim, B. K., Lee, E. J., Kang, Y. & Lee, J. J. Application of ionic liquids for metal dissolution and extraction. *J. Ind. Eng. Chem.* **61**, 388–397 (2018).
23. Tokuda, H., Hayamizu, K., Ishii, K., Bin, A. & Susan, H. Physicochemical Properties and Structures of Room Temperature Ionic Liquids . 1 . Variation of Anionic Species. *J. Phys. Chem. B* **108**, 16593–16600 (2004).
24. Wasserscheid, P. & Welton, T. *Ionic Liquids in Synthesis*. (Wiley, 2008).
25. Weingärtner, H. Understanding ionic liquids at the molecular level: Facts, problems, and controversies. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 654–670 (2008).
26. Mihkel, K. *Analytical Applications Of Ionic Liquids*. (World Scientific Publishing Company, 2016).
27. Kong Moreno, M. Los líquidos iónicos a temperatura ambiente ( RTILs ): Propiedades , aplicaciones y perspectivas futuras . *Rev. Quim.* **23**, 31–38 (2009).
28. Li, J., Cai, Y., Shi, Y., Mou, S. & Jiang, G. Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta* **74**, 498–504 (2008).
29. Dai, S., Ju, Y. H. & Barnes, C. E. Solvent extraction of strontium nitrate by a crown ether. *J. Chem. Soc.Dalt. Trans* **8**, 1201 (1999).
30. Padró, J. M., Marsón, M. E., Mastrantonio, G. E., 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* **107**, 95–102 (2013).
31. Liu, J. F., Jiang, G. Bin & Jönsson, J. Å. Application of ionic liquids in analytical chemistry. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **24**, 20–27 (2005).
32. Zhou, Q.-X. & Gao, Y.-Y. Combination of ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction and high performance liquid chromatography for the determination of triazine herbicides in water samples. *Chinese Chem. Lett.* **25**, 8–11 (2014).
33. Fraser, K. J. & MacFarlane, D. R. Phosphonium-based ionic liquids: An overview. *Aust. J. Chem.* **62**, 309–321 (2009).

34. Padró, J. M., Pellegrino Vidal, R. B. & Reta, M. Partition coefficients of organic compounds between water and imidazolium-, pyridinium-, and phosphonium-based ionic liquids. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 8021–8031 (2014).
35. Thurman, E. M. & Mills, M. S. *Solid Phase Extraction. Principles and Practice*. (Wiley, 1998).
36. Dean, J. R. *Extraction Techniques in Analytical Science*. (Wiley, 2009).
37. Svec, F. & Tennikova, T. B. Historical Review. in *Monolithic Materials* **67**, 1–15 (Elsevier, 2003).
38. Sun, X., Wang, M., Peng, J., Yang, L., Wang, X., Wang, F., Zhang, X., Wu, Q., Chen, R., Chen, J. Dummy molecularly imprinted solid phase extraction of climbazole from environmental water samples. *Talanta* **196**, 47–53 (2019).
39. Svec, F., Tennikova, T. B. & Deyl, Z. *Monolithic Materials: Preparation, Properties and Applications*. (Elsevier Science, 2003).
40. Svec, F. & Huber, C. Monolithic materials: promises, challenges, achievements. *Anal. Chem.* **78**, 2100–2107 (2006).
41. Ishizuka, N., Minakuchi, H., Nakanishi, K., Soga, N. & Tanaka, N. Designing monolithic double-pore silica for high-speed liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **797**, 133–137 (1998).
42. Kubin, M., Spacek, P. & Chromeczek, R. Gel permeation chromatography on porous poly(ethylene glycol methacrylate). *Coll. Czechosl. Chem. Commun.* **32**, 3881–3887 (1967).
43. Hjertén, S., Liao, J. L. & Zhang, R. High-performance liquid chromatography on continuous polymer beds. *J. Chromatogr. A* **473**, 273–275 (1989).
44. Hjertén, S., Nakazato, K., Mohammad, J. & Eaker, D. Reversed-phase chromatography of proteins and peptides on compressed continuous beds. *Chromatographia* **37**, 287–294 (1993).
45. Svec, F. & Fréchet, J. M. J. Pore-size-specific modification of porous materials. *Adv. Mater.* **6**, 242–244 (1994).
46. Pihlström, T. & Österdahl, B. G. Analysis of pesticide residues in fruit and vegetables after

- cleanup with solid-phase extraction using ENV+ (polystyrene-divinylbenzene) cartridges. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2549–2552 (1999).
47. Masqué, N., Galià, M., Marcé, R. M. & Borrull, F. New chemically modified polymeric resin for solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from water. *J. Chromatogr. A* **803**, 147–155 (1998).
48. Liao, J. L., Chen, N., Ericson, C. & Hjertén, S. Preparation of Continuous Beds Derivatized with One-Step Alkyl and Sulfonate Groups for Capillary Electrochromatography. *Anal. Chem.* **68**, 3468–3472 (1996).
49. Peters, E. C., Svec, F. & Fréchet, J. M. J. Rigid Macroporous Polymer Monoliths. *Adv. Mater.* **11**, 1169–1181 (1999).
50. Svec, F. & Fre, J. M. J. Molded Rigid Monolithic Porous Polymers : An Inexpensive , Efficient , and Versatile Alternative to Beads for the Design of Materials for Numerous Applications. *Ind. Eng. Chem. Res.* **38**, 34–48 (1999).
51. Pereira, F. P. *Miniaturization in Sample Preparation*. (De Gruyter, 2014).
52. Corradini, D. *Handbook of HPLC*. (CRC Press, 2016).
53. Sharma, S. K. *Handbook of Materials Characterization*. (Springer, 2018).
54. Sibilía, J. P. *A Guide to Materials Characterization and Chemical Analysis*. (Wiley, 1996).
55. Lowell, S., Shields, J. E., Thomas, M. A. & Thommes, M. *Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*. (Springer Netherlands, 2006).
56. Mulder, M. & Mulder, J. *Basic Principles of Membrane Technology*. (Springer, 1996).
57. Park, S. J. & Seo, M. K. *Interface Science and Composites*. (Elsevier Science, 2011).
58. Fraissard, J. P., Conner, C. W. & Division, N. A. T. O. S. A. *Physical Adsorption: Experiment, Theory, and Applications*. (Kluwer Academic Publishers, 1997).

# **CAPÍTULO 3**

**CARACTERÍSTICAS DE PERFORMANCE DE UN  
MÉTODO ANALÍTICO: VALIDACIÓN Y CIFRAS DE  
MÉRITO**

### 3.1. Validación

La validación de un método analítico establece, por medio de estudios de laboratorio sistemáticos, que el método sirve para el fin propuesto, es decir, que sus características son capaces de producir resultados en línea con las necesidades del problema analítico <sup>1</sup>. Con este fin es necesario determinar ciertos parámetros que lo caractericen y permitan su comparación con otros métodos. Estos parámetros se denominan “cifras de mérito”. Dentro de las cifras de mérito se encuentran <sup>2,3</sup>:

- Selectividad y especificidad
- Sensibilidad de calibración
- Sensibilidad analítica
- Límite de detección
- Límite de cuantificación
- Precisión y exactitud

Existen distintos grados de validación que el laboratorio puede realizar de acuerdo a las necesidades del problema a resolver. Dentro de estos se encuentra la **validación interna**, el método más clásico utilizado para validación de métodos. Este tipo de validación se realiza para identificar y asegurar la calidad de la información analítica brindada, donde todas las etapas del proceso de validación se realizan en un único laboratorio. Es necesaria cuando un laboratorio ha desarrollado un nuevo método o cuando es necesario extender la aplicación de un método establecido hacia muestras distintas o de distintos rangos de concentración <sup>4</sup>. Otro tipo de validación es la **validación inter-laboratorio o externa**. En este caso los resultados obtenidos por un mismo método se confrontan entre varios laboratorios o mediante un organismo externo. Se realiza en aquellos casos en los que existe un interés compartido entre las partes involucradas, o bien cuando se ha desarrollado un método nuevo de interés general y alguna institución profesional u organismo regulador lo va a dar a conocer bajo la forma de una **norma**, es decir, un documento donde el procedimiento está suficientemente detallado de modo que cualquier operador lo pueda ejecutar sin necesidad de información adicional <sup>5</sup>.

Sin embargo, el primer paso de la validación de un método analítico es la calibración del mismo, y finalmente, la determinación de las cifras de mérito.

#### 3.1.1. Calibración

Según la IUPAC, la calibración en química analítica se define como la operación que determina la función entre cantidades medibles (intensidad de señales, representada como la variable  $y$ ), y cantidades que caracterizan a los analitos (tipo o cantidad del analito, representada como la variable

$x$ )<sup>6</sup>. Este proceso incluye la selección del *modelo* que las relaciona y la estimación de los *parámetros* del modelo, así como también la determinación de sus errores, y su validación. La IUPAC distingue dos tipos de calibraciones: una para la identificación de especies y análisis cualitativo, y otra para análisis cuantitativo. Este segundo tipo tiene como propósito obtener una función que permita calcular cantidades de los analitos como función de señales instrumentales<sup>6</sup>.

La calibración analítica es siempre una calibración indirecta, ya que no es posible medir directamente la cantidad de una sustancia en un sistema. En caso que esto último sea posible (por ejemplo, en una electrogravimetría o coulombimetría), el procedimiento de calibración no es necesario.

### 3.1.2. Calibración por regresión lineal

Para poder realizar una calibración analítica es necesario realizar una serie de experimentos en donde se tomen datos de señales, específicas para los analitos de interés, en función de su concentración para poder establecer su relación. En sistemas complejos, a la hora de establecer esta relación, surgen inconvenientes que dependen tanto del analito, de la muestra y del procedimiento de pretratamiento. Debido a estos inconvenientes la calibración puede tener ciertas variantes que se desarrollarán más adelante.

Las funciones de calibración, por lo general, pueden ajustarse a una función lineal entre la señal obtenida por un instrumento,  $y_i$ , y alguna medida de la cantidad del analito en la muestra (por ejemplo, su concentración),  $x_i$ <sup>7</sup>. En el caso de que la relación entre la respuesta y la concentración no sea lineal, se deben usar otros tipos de ajustes, para esto es necesario que previamente se realice la gráfica de calibración.

Para una serie de datos observados de una variable independiente  $y_i$  y una variable dependiente  $x_i$ , la ecuación que representa el modelo lineal es:

$$y_i = A + B \cdot x_i + e_{yi} \quad (\text{Ec.4})$$

donde el término de error,  $e_{yi}$ , describe la diferencia con los valores predichos,  $\hat{y}_i$ , y los observados,  $y_i$ , para cada  $x_i$ .

$$\hat{y}_i = a + b \cdot x_i \quad (\text{Ec.5})$$

Los parámetros  $a$  y  $b$  son la intersección con el eje  $y$  y la pendiente de la recta de calibración, respectivamente. Estos términos, denominados “parámetros de la regresión” se estiman a partir del método de cuadrados mínimos, que tiene como objetivo minimizar la suma de cuadrados de los

errores. Además de los valores individuales de los coeficientes  $a$  y  $b$ , es necesario estimar el error asociado a cada uno de ellos,  $s_a$  y  $s_b$ , respectivamente, además de otros parámetros que se emplearán en el modelo tales como  $\bar{y}$ , la media de todos los valores de señal medidos ( $y_{ij}$ ),  $\bar{x}$  la media de todas las concentraciones utilizadas para la calibración ( $x_i$ ),  $\hat{y}_{ij}$  las estimaciones de los valores de respuesta utilizando los parámetros de la regresión para cada  $x_i$ , y  $N$  el número total de pares de datos ( $x_i; y_i$ )<sup>8</sup>. Todos estos parámetros se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Parámetros de regresión lineal y sus estimaciones

Parámetro	Estimación
$a$	$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum_i y_i \sum_i x_i^2 - \sum_i x_i \sum_i x_i y_i}{ni \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2}$
$b$	$b = \frac{Q_{xy}}{Q_{xx}} = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$
$s_a$	$s_a = s_{y/x} \sqrt{\left(\frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}\right)}$
$s_b$	$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{Q_{xx}}}$
$s_{y/x}^2$	$s_{y/x}^2 = \frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}$

Para la aplicación de este método de estimación es necesario verificar anteriormente que se cumplan dos condiciones: que los errores en la variable independiente, generalmente la concentración, deben ser menores que los de la variable respuesta (señal obtenida), es decir, que se preparen las soluciones con el menor error posible, de manera de que se cumpla la suposición de que esa variable “no tiene error”; y, además que las varianzas sean homogéneas en el intervalo de  $x$  (homocedasticidad). Luego de establecer la relación entre las variables es necesario determinar, mediante una prueba estadística, por ejemplo, mediante un test F, que el modelo lineal propuesto es el que ajusta el conjunto de datos. Este análisis puede hacerse mediante el uso de un Análisis de Varianza, ANOVA, que utiliza sumas de cuadrados (Tabla 4)<sup>8</sup>.

**Tabla 4.** ANOVA de un modelo de regresión simple con réplicas en cada nivel de concentración.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrados medios	F
Regresión	$SS_{REG} = \sum_i ni (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	1	$MS_{REG}$	$\frac{MS_{REG}}{MS_e}$
LOF	$SS_{LOF} = \sum_i ni (\bar{y}_i - \hat{y}_i)^2$	$m - 2$	$MS_{LOF}$	$\frac{MS_{LOF}}{MS_e}$
Error Puro	$SS_e = \sum_i (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$N - m$	$MS_e$	
Total	$SS_T = \sum_i \sum_j (y_{ij} - \bar{y})^2$	$N - 1$		

Donde  $m$  es el número de niveles de concentración del analito utilizados para la curva de calibración.

La prueba F para la falta de ajuste, LOF (por sus siglas en inglés), consiste en comparar  $F_{exp} = \frac{MS_{LOF}}{MS_e}$  con el valor de la distribución F para  $(m-2)$  y  $(N-m)$  grados de libertad. Si esta relación es significativa ( $MS_{LOF}$  significativamente mayor que  $MS_e$ ) al nivel de probabilidad elegido, se concluye que el modelo propuesto es inadecuado, y que existe falta de ajuste lineal. El valor  $MS_{LOF}$  corresponde a la variación entre los valores de las observaciones obtenidas y la estimación dada por la curva de calibración ajustada.

### 3.1.3. Cifras de mérito

#### 3.1.3.1. Selectividad y especificidad

La selectividad de un método se refiere a la extensión en que un método puede determinar un analito particular en una muestra compleja sin la interferencia de otros componentes. Un método es *específico* cuando es selectivo para un analito o un grupo de analitos <sup>1</sup>.

#### 3.1.3.2. Sensibilidad de calibración y sensibilidad analítica

La sensibilidad de calibración,  $SEN$ , es la pendiente de la recta de calibrado <sup>2</sup>:

$$SEN = b \quad (\text{Ec. 6})$$

Este parámetro indica la variación de respuesta producida por unidad de concentración del analito, por lo que sus unidades son señal x concentración<sup>-1</sup>. Lo ideal es que este parámetro alcance el mayor valor posible, de manera de obtener un cambio apreciable o máximo en la señal para una pequeña variación en la concentración.

En el caso de que quisiéramos *comparar dos métodos analíticos* que se basen en distintos tipos de respuesta, lo más adecuado es utilizar la sensibilidad analítica en lugar de la sensibilidad de calibrado, que se define como la relación entre la sensibilidad y el ruido instrumental:

$$\gamma = \frac{SEN}{s_y} \quad (\text{Ec. 7})$$

Donde  $s_y$  es la medida del ruido en la respuesta y puede determinarse a partir de los desvíos de las réplicas de medidas,  $r$ , respecto de sus valores medios:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^r (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{N-m}} \quad (\text{Ec. 8})$$

Es decir, que un método analítico podría tener una buena sensibilidad, pero si el ruido instrumental es grande, podría conducir a mayores errores que otro método con menor sensibilidad de calibrado, pero mucho menor nivel de ruido, resultando en que la performance global del método no sea buena.

### 3.1.3.3. Límites de detección y cuantificación

Si los límites de detección, LOD (limit of detection), y cuantificación, LOQ (limit of quantification), se desean medir para la metodología analítica completa, es decir, además de la etapa de detección instrumental final, que incluyan las etapas de muestreo, preconcentración, separación analítica, purificación y efectos de matriz, entonces, todos estos factores deben ser tenidos en cuenta para la determinación de los valores de LOD y LOQ <sup>9</sup>.

LOD

El LOD corresponde a la mínima concentración del analito que puede ser detectada de manera confiable. Existen varias formas de obtener este parámetro. Para aquellos métodos que sean realizados bajo el control de una agencia de regulación, lo mejor es calcular dichos valores de acuerdo a cómo lo establezca dicha agencia. Si el método no se encuentra bajo uso regulatorio, la decisión sobre la forma de calcularlos queda a criterio del laboratorio que lo realice <sup>10</sup>.

- Una forma común de determinar este parámetro es utilizando la *relación señal/ruido* (S/N), donde la concentración del LOD queda determinada por la concentración del analito que genera una señal tres veces superior al nivel del ruido (S/N=3) <sup>10</sup>. Para poder hacer su determinación es necesario que se realicen varias inyecciones al nivel de concentración del LOD. En métodos cromatográficos, dado que el nivel de ruido de la señal del blanco es muy bajo, los valores de LOD obtenidos son muy bajos.
- Otra forma es utilizando la *desviación estándar de la respuesta y la pendiente*, donde:

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{b} \quad (\text{Ec. 9})$$

Donde  $\sigma$  es la desviación estándar para una curva de calibración y  $b$  es su pendiente. Es recomendable estimar  $\sigma$  con la desviación de la ordenada, ya que los límites deberían estimarse con el error a esas concentraciones, y no con el error de las concentraciones de toda la curva <sup>10</sup>. Los LODs determinados de esta manera suelen ser algo superiores a los del procedimiento anterior, dado que incluyen el “ruido” de los valores de la respuesta de los estándares.

- La definición de la IUPAC <sup>9</sup> para el LOD está dada por:

$$LOD = 2 \cdot t_{(0,05; N-2)} \cdot s_0 \quad (\text{Ec. 10})$$

Siendo  $t_{(0,05; N-2)}$  el valor del estadístico t de manera de que exista una probabilidad del 5% de aceptar que el analito está presente cuando en realidad está ausente (error tipo I o falso positivo con  $\alpha = 0,05$ ) y también una probabilidad del 5% de admitir que el analito está ausente cuando en realidad está presente (error de tipo II o falso negativo con  $\beta = 0,05$ ), con N-2 grados de libertad. El valor de  $2 \cdot t_{(0,05; N-2)}$  es cercano a 3,3, por lo que usualmente el  $LOD = 3,3 s_0$ . El parámetro  $s_0$  se estima considerando este parámetro muy cercano al desvío estándar en la concentración de una muestra blanco, de acuerdo a la Ecuación 11:

$$s_0 = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{3} + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{Q_{xx}}} \quad (\text{Ec. 11})$$

Esta ecuación se deriva de la Ecuación 12 correspondiente al desvío estándar,  $s(x_{inc})$ , de una concentración predicha (incógnita) a partir de la curva de calibrado, suponiendo que se analiza una muestra por triplicado ( $n=3$ ).

$$s_{inc} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{N} + \frac{(x_{inc}-\bar{x})^2}{Q_{xx}}} \quad (\text{Ec. 12})$$

Los valores de LOD determinados de acuerdo a la IUPAC son bastante más grandes que para los procedimientos anteriores, dada su rigurosidad al incluir errores del tipo I y II.

### LOQ

El LOQ es la mínima concentración del analito que puede ser cuantificable de manera confiable. Así, similar a las definiciones anteriores para el LOD, las de LOQ quedan convertidas en las siguientes:

- De acuerdo a la aproximación de la *relación señal/ruido* se acepta el valor de  $S/N = 10$ <sup>10</sup>.
- En relación al procedimiento de *desviación estándar de la respuesta y la pendiente*<sup>10</sup>:

$$LOQ = \frac{10 \cdot \sigma}{b} \quad (\text{Ec. 13})$$

- Y según la definición de la IUPAC:

$$LOQ = 10s_0 \quad (\text{Ec. 14})$$

Se considera que el desvío estándar relativo (Relative Standard Deviation, RSD) para una concentración igual al LOQ será del 10%, nivel que se toma como el valor máximo de RSD aceptable para poder cuantificar<sup>9</sup>.

Al igual que con el LOD, los LOQs generalmente arrojan valores más altos para los procedimientos IUPAC que cuando se aplica el segundo procedimiento, y estos valores más altos que para el primer procedimiento.

### 3.1.3.4. Linealidad y rango lineal

Se considera que el rango lineal (RL) comprende desde el LOQ hasta el máximo valor en donde la curva se considera lineal. Esto es, para poder determinar el RL es necesario determinar hasta qué valor de concentración máximo del analito la curva de calibrado supera la prueba de hipótesis para la linealidad, es decir, un valor tal que  $F_{exp} = \frac{MS_{LOF}}{MS_e}$  debe ser menor que el valor de la distribución F para un valor de N y  $\alpha$  determinados <sup>2</sup>.

### 3.1.3.5. Precisión, repetibilidad y exactitud

La *precisión* de un método es la medida de qué tan cercanos son los resultados de ensayos independientes y usualmente suele expresarse como la desviación estándar,  $s$ , a ese nivel de concentración. Este parámetro es generalmente dependiente de la concentración y, por lo tanto, debe determinarse su dependencia, generalmente a tres niveles de concentración diferentes dentro del RL. La desviación estándar también puede expresarse en forma relativa a partir de la desviación estándar relativa (RSD), RSD% o el coeficiente de variación (CV).

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad (\text{Ec. 15})$$

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 16})$$

Donde  $\bar{x}$  es el valor medio del nivel de concentración.

La *repetibilidad* es la precisión obtenida por medidas realizadas bajo condiciones exactamente repetidas: mismo operador, mismo método, mismo material, mismo laboratorio, en un periodo de tiempo corto. La *reproducibilidad* es la precisión para condiciones reproducibles: distinto operador, distinto laboratorio, distinto equipamiento, en un periodo de tiempo largo <sup>1</sup>.

La *exactitud* se define como el grado de concordancia entre un resultado, o la media de n resultados, y el valor verdadero (o aceptado como verdadero) para el analito determinado en una muestra. Una forma de expresarla es a partir de la *exactitud relativa porcentual* definida según la Ecuación 17:

$$\delta = \frac{cd - cs}{cs} 100 \quad (\text{Ec. 17})$$

### 3.1.3.6. Factor de recuperación y factor de enriquecimiento

Otras cifras de mérito importantes que pueden agregarse a las anteriormente mencionadas, que se utilizan en metodologías que incluyen pretratamiento de muestras, en especial, preconcentración, corresponden al factor de recuperación, R%, y al factor de enriquecimiento, FE. Estos parámetros son esenciales para evaluar la eficiencia de un proceso de extracción y la capacidad del mismo de incrementar la señal analítica <sup>11</sup>.

La R% se define como el porcentaje de analito recuperado durante la extracción, dada por la Ecuación 18, donde  $n_{Af}$ , es la cantidad de analito A en la fase extractante, y  $n_{Ai}$ , es la cantidad del analito A en la muestra inicial.

$$R\% = \frac{n_{Af}}{n_{Ai}} 100 \quad (\text{Ec. 18})$$

Este factor indica qué cantidad del analito presente en la muestra original se obtiene en el extracto obtenido luego de un proceso de extracción.

Durante un proceso de extracción, el volumen de fase extractante es generalmente más pequeño que el volumen de la muestra inicial ( $V_f < V_i$ ), de manera de que el analito sea *preconcentrado o enriquecido* mediante la extracción. El nivel de enriquecimiento del analito en la fase extractante se representa con FE, el cual queda expresado como:

$$FE = \frac{C_{Af}}{C_{Ai}} \quad (\text{Ec. 19})$$

Siendo  $C_{Af}$  y  $C_{Ai}$ , la concentración del analito A en el extracto final y la concentración en la solución inicial, respectivamente. El FE también puede expresarse en función de R% (Ecuación 20). Este parámetro es un indicador importante cuando se desarrollan técnicas para la determinación de compuestos en concentraciones muy bajas, del orden de trazas, donde el objetivo es obtener valores de FE lo más grandes posibles.

$$FE = \frac{V_i}{V_f} \cdot \frac{R\%}{100} \quad (\text{Ec. 20})$$

De esta ecuación se puede observar que para obtener altos valores de FE se deberían procesar volúmenes lo más grande posibles de muestra, ser extraídos con un mínimo volumen de la fase extractante y la recuperación ser lo más alta posible (el analito debe ser muy afin a la fase extractante).

### 3.1.4. Metodologías para la calibración analítica

Para obtener la función matemática para la calibración y teniendo en cuenta inconvenientes provocados por la matriz de la muestra o pretratamientos requeridos en el método, se pueden aplicar diferentes tipos de metodologías de calibración. Existen varias técnicas de calibración siendo de las más utilizadas la “calibración externa”, la “calibración por sobreagregado o adición de estándar”, y la “calibración con estándar interno”.

La *calibración externa* consiste en la preparación de soluciones estándares de concentraciones determinadas a partir de un estándar de referencia (*externo* a la muestra) de pureza conocida, es decir, los estándares y la muestra se preparan de manera separada <sup>12</sup>. Este estándar de calibración que se utiliza debe ser el mismo analito que se quiere determinar en la muestra problema. Debido a que la calibración externa asume que la respuesta del analito representa con exactitud la concentración del analito en la muestra original, es el tipo de calibración más usado para métodos donde la manipulación de la muestra es mínima o donde no hay efectos de matriz.

El método de *adición de estándar o sobreagregado* se utiliza cuando los componentes de la matriz pueden afectar de alguna manera la respuesta del analito, exaltando o deprimiendo la señal, es decir, cuando existe un *efecto de matriz*. Muchas veces no se dispone de la matriz o de sus componentes como para “simularla”, y hasta incluso puede que no sea posible obtener una parte de la muestra en ausencia del analito a determinar <sup>13</sup>, es decir, cuando el analito es endógeno a la matriz. El método consiste en preparar soluciones de calibrado sobre la misma muestra, de tal manera de tener en todos los matraces la misma cantidad de matriz (y la máxima posible para no diluirla) para que los posibles efectos sobre la señal sean los mismos en toda la recta de calibración. A continuación, se adicionan distintos volúmenes de una solución de referencia, conteniendo la misma molécula o ion a determinar, a todos los matraces excepto uno, el blanco. En este caso la curva de calibración contendrá como eje *x* a la concentración de analito sobreagregada y como eje *y*, la señal obtenida. A diferencia del método anterior donde la concentración de la muestra ( $x_{inc}$ ) se determina a partir de los datos obtenidos para la muestra y utilizando los datos de la curva de calibrado ( $x_{inc} = \frac{\overline{y}_{muestra} - a}{b}$ ), en este otro caso  $x_{inc}$ , usualmente se calcula como el valor del eje *x* obtenido por extrapolación de la curva de calibrado para  $y = 0$ . La principal desventaja de este método es que cada muestra debe tener su curva de calibrado, y que al ser un método por extrapolación y no interpolación como el método anterior, tiene menor precisión. Para evitar extrapolar, es aconsejable trabajar con los valores de la pendiente y ordenada al origen para obtener mejor precisión. En la práctica esta pérdida de precisión no suele ser muy significativa.

El método de *estándar interno* consiste en utilizar un analito exógeno a la matriz, el estándar interno (EI), utilizado como calibrante, que se agrega a la muestra en una misma cantidad en todos los matraces, a distintos niveles de concentración del analito. Este método se utiliza generalmente cuando se necesitan etapas de preparación de muestra donde puede producirse la pérdida de una porción del analito, aunque puede emplearse para corregir errores determinados, como inexactitudes en la inyección de una muestra al sistema cromatográfico, errores en la calibración del equipamiento, etc.<sup>10</sup> Si se emplea con la finalidad mencionada en primer lugar, se asume que el estándar interno utilizado sufre los mismos procesos de pérdida que el analito, por ejemplo, al filtrar, extraer desde un solvente inmiscible, etc. En este método la curva de calibrado se grafica con la relación de señales obtenidas para el analito y el EI ( $S_{analito}/S_{EI}$ ), en función de la cantidad de analito agregado como en los otros dos métodos. De esta manera, se asume que, al hacer el cociente de señales, los efectos de pérdida del analito y el EI se cancelan. Finalmente, el cálculo de la concentración del analito en la muestra se realiza de la misma forma que en el método de calibración externa, con la diferencia de que a la muestra se le adiciona el EI en idéntica cantidad en que se agrega a los niveles de la curva de calibrado, y el dato con el que se entra en la curva de calibrado es la relación de la *señal analito en la muestra/señal del EI*.

En todo caso, la validez de cualquiera de los métodos de cuantificación descritos se deberá validar empleando estándares de referencia, si estos existen para la matriz en estudio, o empleando patrones preparados en el laboratorio.

### 3.1.5. Efecto de matriz

El efecto de matriz es el cambio que experimenta la señal analítica del analito como consecuencia de la influencia que ejercen los componentes de la muestra<sup>14</sup>. Este efecto se ve traducido en un cambio en la pendiente de la curva de calibración, por lo que, una forma de evaluar si existe un efecto significativo en la señal por parte de la matriz es mediante la comparación de las pendientes en una curva de *calibración externa* contra una de *calibración por sobreagregado*. Si existe una diferencia estadísticamente significativa entre estas dos pendientes, podemos decir que existe tal efecto, por lo que concluimos que para poder obtener un resultado más confiable de la determinación de la concentración del analito es necesario hacerlo sobre la matriz de la muestra o en una matriz simulada (en caso de que esté disponible).

Esta comparación estadística se realiza mediante un test-*t*, mediante la ecuación 21.

$$t = \frac{b_{11} - b_{21}}{\sqrt{s_{b_{11}}^2 + s_{b_{12}}^2}} \quad (\text{Ec. 21})$$

Donde  $s_{b1}^2$  y  $s_{b2}^2$  son las desviaciones estándar de las dos pendientes que se quieren comparar. Si estas varianzas residuales ( $\sigma^2_1$  y  $\sigma^2_2$ , estimadas por  $s^2_{e1}$  y  $s^2_{e2}$ , respectivamente) que se utilizan para calcular las respectivas varianzas de las pendientes (ecuaciones 21 y 22) son homogéneas (lo cual puede comprobarse mediante un test- $F$ ), entonces la varianza combinada se calcula como la ecuación 24, siendo  $n_1$  y  $n_2$  el número de datos de cada regresión, respectivamente.

$$s_{b11}^2 = \frac{s_{e1}^2}{\sum_{i=1}^{n_1} (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} \quad (\text{Ec.22})$$

$$s_{b12}^2 = \frac{s_{e2}^2}{\sum_{i=1}^{n_2} (x_{i2} - \bar{x}_2)^2} \quad (\text{Ec.23})$$

$$s_{ep}^2 = \frac{(n_1-1)s_{e1}^2 + (n_2-1)s_{e2}^2}{n_1 + n_2 - 4} \quad (\text{Ec.24})$$

Esta varianza combinada se utiliza para calcular el estadístico  $t$  (ecuación 25), el cual se compara con el valor de tabla para  $n_1+n_2-4$  grados de libertad.

$$t = \frac{b_{11} - b_{21}}{\sqrt{s_{ep}^2 \left( \frac{1}{\sum_{i=1}^{n_1} (x_{i1} - \bar{x}_1)^2} + \frac{1}{\sum_{i=1}^{n_2} (x_{i2} - \bar{x}_2)^2} \right)}} \quad (\text{Ec.25})$$

En caso de que las varianzas no sean homogéneas, se puede utilizar una aproximación similar al test de Cochran para la comparación de medias con varianzas distintas. Es decir, si  $\sigma^2_1 \neq \sigma^2_2$ , los valores teóricos  $t_1$  y  $t_2$ , con grados de libertad dados por  $n_1-2$  y  $n_2-2$ , respectivamente, se pueden obtener de tablas- $t$ , y calcular el siguiente estadístico  $t'$ , dado por la ecuación 26, donde el valor de  $t$  se obtiene de la ecuación 21 <sup>5</sup>.

$$t' = \frac{t_1 s_{b11}^2 + t_2 s_{b12}^2}{s_{b11}^2 + s_{b12}^2} \quad (\text{Ec.26})$$

### 3.2. Optimización de un método analítico

En la etapa de optimización de un método analítico, el objetivo es encontrar las condiciones experimentales óptimas de cierto número de variables que afectan al procedimiento analítico <sup>15</sup>. El método clásico de optimización es clasificado como un método secuencial, y es también conocido como “*método de un-factor-por-vez*” (“*step-by-step*” o “*one-variable-at-a-time, OVAT*”). En esta estrategia se varía un factor experimental a la vez, se encuentra su valor óptimo y se procede a optimizar las demás variables en etapas, manteniendo el valor optimizado en la etapa anterior <sup>16</sup>. Esta estrategia posee un costo que puede ser elevado si el número de variables es grande, debido al gran número de experimentos que son necesarios; no proporciona información acerca de las posibles interacciones entre los factores de estudio; sólo se examina una pequeña porción del espacio experimental; el óptimo global puede no ser encontrado; y las condiciones óptimas encontradas dependen de las condiciones de partida <sup>15</sup>. Sin embargo, esta técnica permite obtener un mejor entendimiento de los principios y la teoría involucrados en el comportamiento de alguna variable en particular <sup>16</sup>.

La optimización mediante “*diseño experimental*” se presenta como alternativa a la optimización clásica (OVAT), en la que los inconvenientes de variar un factor cada vez pueden eliminarse <sup>17</sup>.

El diseño estadístico de experimentos (DE) evita estos inconvenientes al proporcionar el marco matemático para cambiar todos los factores simultáneamente y obtener la información buscada con un número reducido de experimentos, es decir, con la máxima eficiencia. El DE conduce a una planificación con menos experimentos que el método de optimización paso a paso y permite obtener la condición óptima global de las variables y las posibles interacciones entre ellas <sup>18</sup>.

Para poder realizar la planificación experimental es necesario considerar las siguientes etapas <sup>15</sup>:

- Identificar los *factores* y *niveles*: Es muy importante poder identificar todos los factores que pueden tener influencia en el proceso que se está estudiando, ya que aquellas variables que no se tengan en cuenta pueden producir variaciones en las respuestas estudiadas que dificulten el análisis de los datos. Además, es necesario determinar el rango en el que serán evaluados los factores.
- Selección de la variable *respuesta*: Al seleccionar una respuesta el experimentador debe estar seguro que ese parámetro brindará información útil acerca del proceso de estudio. Muchas veces es necesario la optimización de más de una respuesta a la vez.
- Elección del *diseño experimental*: Para elegir un diseño de experimentos es necesario tener en cuenta el número de factores que se quieran analizar y el número de experimentos que se puedan analizar (dependiendo del tamaño muestral).

- Experimentación: Este paso consiste en la realización de los experimentos en las condiciones determinadas por el diseño. Los experimentos deben realizarse en orden aleatorio.
- Análisis de datos, conclusiones y toma de decisiones: Una vez recolectados los datos de los experimentos es necesario analizarlos mediante métodos estadísticos. Existen muchos softwares que permiten el análisis de los datos. A partir de las conclusiones obtenidas es necesario determinar las condiciones óptimas de los factores de manera de poder optimizar las respuestas que se quieren estudiar.

Cuando el número de variables a optimizar es grande (más de 3) es necesario realizar previamente diseños de cribado o *screening*, de manera de poder determinar cuáles de ellos son significativamente influyentes sobre la respuesta que se quieren optimizar. Generalmente, se utilizan diseños en pocos niveles con múltiples factores, entre los que se encuentran los Diseño factoriales (totales y fraccionarios) y los Diseños de Placket-Burman. Una vez determinados los factores significativos se procede a optimizarlos mediante diseño de pocos factores, pero de varios niveles, con el propósito de alcanzar un valor óptimo medido por una función de la/las respuestas a optimizar. Estos son **diseños de superficies de respuesta**, entre los que se encuentran el Diseño Central Compuesto (DCC), el diseño de Box-Behnken y el diseño de Doehlert <sup>15</sup>.

### 3.2.1. Diseño Central Compuesto

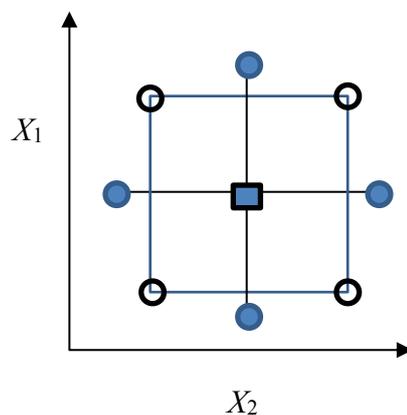
Un diseño central compuesto (DCC) es un diseño de experimental que permite el análisis simultáneo de distintas variables en varios niveles. En este tipo de diseño sólo pueden analizarse factores cuantitativos o relaciones de mezcla, ya que las respuestas seleccionadas para su optimización se modelan como función de los factores <sup>15</sup>. El DCC consta de:

- Puntos factoriales (*pf*): ( $2^k$  experimentos), donde  $k$  es el número de factores, los cuales forman parte de un diseño factorial de dos niveles y tienen factores en niveles  $-1$  o  $+1$ .
- Puntos axiales o también llamados puntos estrella (*pe*): ( $2k$  experimentos), que son aquellos que se encuentran a una distancia  $\pm\alpha$  del punto central, donde  $\alpha$  queda definido por el experimentador según se detalla más adelante.
- Puntos centrales (*pc*), que son aquellos que tienen todos los factores en nivel  $0$ . Generalmente se hacen réplicas de este punto para obtener la estimación del error. <sup>19</sup>

El número total de experiencias es  $E=2^k+2k+pc$ . De acuerdo a lo previamente dicho se puede ver que cada factor se encuentra en cinco niveles posibles:  $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$  y cuando  $\alpha$  toma el valor de la raíz cuarta de  $f$  (siendo  $f$  el número de puntos factoriales), se dice que el diseño es *rotatable*. El valor de  $\alpha$  determina la ubicación de los puntos estrella y generalmente varía de un valor 1 a un valor  $k$  siendo el operador el que fija este valor de acuerdo a la región de interés y las condiciones de operabilidad del dominio experimental. La “rotabilidad” de un diseño es una propiedad del mismo que implica que el error en la predicción de la respuesta por parte del modelo ajustado es constante a una distancia dada desde el centro del diseño. Esta propiedad se puede comprobar obteniendo una gráfica de contornos perfectamente circulares cuando se representa el error estándar del diseño en función de las coordenadas experimentales <sup>20</sup>.

En la Figura 6 puede verse un esquema representativo del DCC para dos factores,  $x_1$  y  $x_2$ , que consta de un diseño factorial  $2^2$ , un diseño estrella, y un punto central <sup>19</sup>.

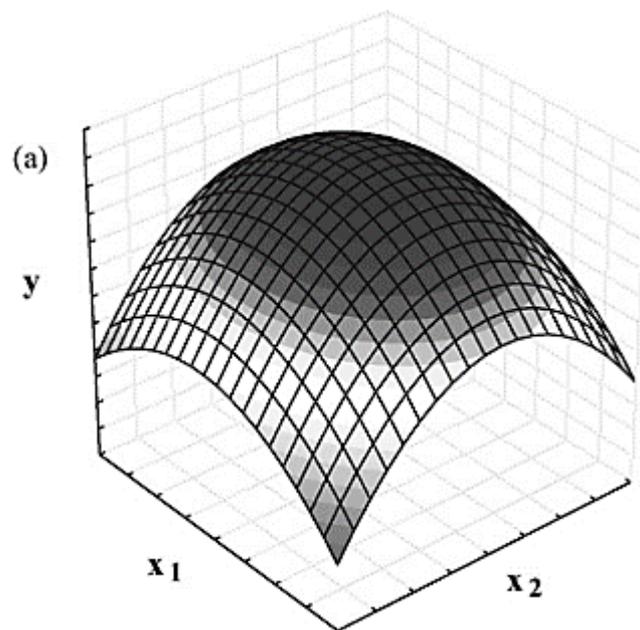
Una vez que se tiene los resultados de un diseño de superficie de respuesta, como es el caso del DCC, se puede construir un modelo polinómico que describa la relación entre una respuesta y los factores considerados como significativos. Generalmente se construye un modelo polinómico de segundo orden. Posteriormente el modelo puede interpretarse gráficamente, mediante gráficos de contornos en 2D o gráficos de superficies de respuesta en 3D; y estadísticamente, mediante, por ejemplo, un ANOVA <sup>15</sup>.



**Figura 6.** DCC de dos factores,  $x_1$  y  $x_2$ . (●) diseño factorial  $2^2$ , diseño tipo “estrella” (○) y un punto central. (■) diseño compuesto.

Las superficies de respuesta son superficies  $n$ -dimensionales en un espacio  $(n+1)$ -dimensional. Por ejemplo, en un diseño en el que se analizan dos variables simultáneamente se puede obtener un gráfico en 3 dimensiones, ya que se gráfica la respuesta en función de los factores (Figura 7). En caso de que

se traten de 3 o más variables, el gráfico sólo representará a dos de ellas, manteniendo las demás en un valor constante <sup>19</sup>.



**Figura 7.** Superficie de respuesta generada por un modelo cuadrático de optimización de dos variables en la que existe un máximo de respuesta.

### 3.2.2. Función conveniencia u objetivo.

Es relativamente sencillo determinar las condiciones óptimas de una sólo respuesta, mediante el uso de la derivada igualada a cero de la función matemática obtenida que describe la superficie de respuesta en función de los factores (en caso de que se trate de un máximo o un mínimo de la respuesta). Sin embargo, es posible que exista la necesidad de optimizar varias respuestas simultáneamente. El nivel de dificultad de encontrar el óptimo para todas las respuestas aumenta cuando las regiones óptimas para cada respuesta se encuentran alejadas entre ellas y no se intersectan <sup>19</sup>.

Una aproximación utilizada para la optimización de múltiples respuestas es la técnica popularizada por Derringer y Suich (1980) <sup>21</sup>, la cual hace uso de la función “*deseabilidad*”. La aproximación general se basa en convertir cada respuesta  $y_i$  en una función deseabilidad  $d_i$  que varía en el rango  $0 \leq d_i \leq 1$ , en el cual si la respuesta se encuentra en su valor objetivo (máximo, mínimo o un valor determinado),  $d_i = 1$ , y si se encuentra fuera de la zona aceptable,  $d_i = 0$ . En una segunda etapa se

eligen los valores de las variables del diseño de manera de que se optimice la *función global deseabilidad*,  $D$ , compuesta por las deseabilidades individuales de  $m$  respuestas (ecuación 27):

$$D = (d_1 d_2 \dots d_m)^{1/m} \quad (\text{Ec. 27})$$

El software Design-Expert utiliza métodos de búsqueda directos para maximizar la función  $D$ . Esta herramienta permite determinar los rangos más deseables para las variables y determinar cuál de ellas se quiere maximizar, minimizar o mantenerse dentro de un rango.

### 3.3. Bibliografía

1. Eurachem. Guide to Quality in Analytical Chemistry - An Aid to Accreditation. *Eurachem* **17**, 1–40 (2002).
2. Goicoechea, H. C. & Olivieri, A. C. *La Calibración en Química Analítica*. (Universidad Nacional del Litoral, 2007).
3. Valcarcel, M. *Principles of Analytical Chemistry: A Textbook*. (Springer Berlin Heidelberg, 2012).
4. Quevauviller, P. *Quality Assurance for Water Analysis*. (Wiley, 2002).
5. Massart, L. & Vandeginste, B. *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Parte I*. (Elsevier, 1997).
6. Danzer, K. & Currie, L. A. International Union of Pure Commission on General Aspects of Analytical Chemistry, Guideline for calibration in analytical chemistry- Part 1 . Fundamentals and single component calibration. **70**, 993–1014 (1998).
7. Danzer, K. & Currie, L. A. GUIDELINES FOR CALIBRATION IN ANALYTICAL CHEMISTRY Part 1 . Fundamentals and single component. *Pure Appl. Chem* **70**, 993–1014 (1998).
8. Deming, S. N., Michotte, Y., Massart, D. L., Kaufman, L. & Vandeginste, B. G. M. *Chemometrics: A Textbook*. (Elsevier Science, 1988).
9. Currie, L. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and

- quantification capabilities. *Pure Appl. Chem* **391**, 105–126 (1995).
10. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. (Wiley, 2011).
  11. Pedersen-Bjergaard, S., Gammelgaard, B. & Halvorsen, T. G. *Introduction to Pharmaceutical Analytical Chemistry 2e*. (Wiley, 2019).
  12. Cuadros-Rodríguez, L., Bagur-González, M. G., Sánchez-Viñas, M., González-Casado, A. & Gómez-Sáez, A. M. Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences. *J. Chromatogr. A* **1158**, 33–46 (2007).
  13. Miller, J. & Miller, J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. (Prentice Hall, 2002).
  14. Harris, D. C., Navarro, V. B. & Murcia, Á. B. *Análisis químico cuantitativo*. (Reverté, 2007).
  15. Dejaegher, B. & Vander Heyden, Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56**, 141–158 (2011).
  16. Swartz, M. E. & Krull, I. S. *Analytical Method Development and Validation*. (Taylor & Francis, 1997).
  17. Leardi, R. Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **652**, 161–172 (2009).
  18. Hibbert, D. B. Experimental design in chromatography : A tutorial review. *J. Chromatogr. B* **910**, 2–13 (2012).
  19. Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S. & Escaleira, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965–977 (2008).
  20. Box, G. E. P., Hunter, W. G. & Hunter, J. S. *Statistics for experimenters: an introduction to design, data analysis, and model building*. (Wiley, 1978).
  21. Myers, R., Montgomery, D. & Anderson-Cook, C. *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. (Wiley, 2011).

# CÁPITULO 4

## DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA CON LÍQUIDOS IÓNICOS DE FOSFONIO.

Aplicación a la determinación de hidrocarburos  
aromáticos policíclicos en muestras de agua del Río de  
La Plata.

#### 4.1. Objetivos específicos

- Desarrollar un método de microextracción líquido-líquido dispersiva empleando líquidos iónicos de fosfonio (MELLD-IL) para la determinación de 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en muestras de agua.
- Desarrollar una metodología de separación cromatográfica para la determinación de los 16 HAPs mediante HPLC en fase inversa con detección DAD-fluorescencia.
- Optimizar las variables más importantes de la extracción MELLD a partir de una optimización por etapas.
- Validar internamente el método de extracción y análisis mediante la determinación de las cifras de mérito más importante del mismo.
- Determinar las concentraciones de los HAPs, correspondiente a la fracción soluble, en muestras de agua del Río de La Plata.

#### 4.2. Metodología propuesta

##### 4.2.1. Reactivos

Estándares de HAPs: se empleó el kit de reactivos sólidos Accustandard conteniendo los 16 HAPs prioritarios de la US-EPA (naftaleno (Nap), acenaftileno (Acp), acenafteno (Ace), fluoreno (Flu), fenantreno (Phe), antraceno (Ant), fluoranteno (Flt), pireno (Pyr), criseno (Cry), benzo[*a*]antraceno (B[*a*]A), benzo[*b*]fluoranteno (B[*b*]F), benzo[*k*]fluoranteno (B[*k*]F), benzo[*a*]pireno (B[*a*]P), indeno[*1,2,3-cd*]pireno (InP), dibenzo[*a,h*]antraceno (DBA), y benzo[*g,h,i*]perileno (BPe))

Se emplearon líquidos iónicos con base en el catión fosfonio y diferentes aniones: cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio ( $[(C_6)_3C_{14}P][Cl]$ ), bromuro de trihexil(tetradecil)fosfonio ( $[(C_6)_3C_{14}P][Br]$ ) y dicianamida de trihexil(tetradecil)fosfonio ( $[(C_6)_3C_{14}P][N(CN)_2]$ ) provistos por Cytec Industries (New Jersey, USA). Los nombres comerciales de cada uno son: CYPHOS®IL 101, CYPHOS®IL 102 y CYPHOS®IL 105, respectivamente.

Los reactivos empleados fueron de grado analítico o mejor: cloruro de potasio, cloruro de sodio, fosfato de sodio dibásico anhidro, y bicarbonato de sodio (Anedra, Industria Argentina), fosfato de potasio (Matheson, Coleman & Bell, Norwood, Ohio, USA), acetona y sulfato de sodio anhidro (Merck, Industria Argentina), hidróxido de potasio Analar (Poole, Inglaterra), diclorometano, acetonitrilo y metanol grado HPLC (J. T. Baker, Estado de México, México). Las soluciones fueron preparadas en agua MilliQ® (Milli-Q system, Millipore).

#### 4.2.2. Equipamiento

Los análisis cromatográficos fueron llevados a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies (Mulgrave, Australia) serie 1100 equipado con una bomba binaria, un desgasificador de vacío, y un compartimiento termostatazador para columna conteniendo una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 4,6 mm d.i, 5  $\mu$ m d.p.) conectado a una columna guarda. Se utilizó un detector DAD, para el análisis cualitativo, y uno de fluorescencia (FLD) para el análisis cuantitativo. Para el método MELLD se utilizaron tubos de vidrio de cuello angosto, fabricados en el laboratorio de vitroplastia de la FCE-UNLP. Los tubos son de 9,5 cm x 12 mm de diámetro interno con un cuello de 6 mm de diámetro interno. El volumen total de muestra colocada en los tubos fue de 5,00 mL, y los volúmenes de la fase de RTIL colectada, medidos con una microjeringa, fueron entre 20 y 25  $\mu$ L ( $\pm 1 \mu$ L). Se utilizaron microjeringas de 50 y 100  $\mu$ L provistas por Agilent Technologies (Mulgrave, Australia) y Hamilton (Reno, USA) respectivamente. También se utilizó un baño de ultrasonido modelo 8890 (Cole Parmer, Estados Unidos) en el proceso de extracción para favorecer la dispersión, y para la separación de las fases se utilizó una centrífuga LUGUIMAC LC-20.

En la etapa de purificación de los RTILs se utilizó un agitador mecánico vortex Genie 2 (Scientific Industries, Estados Unidos).

#### 4.2.3. Condiciones cromatográficas

La identidad de los picos fue confirmada por comparación de los tiempos de retención de cada pico cromatográfico con el de los estándares puros preparados a partir de los estándares de Accustandard, y mediante los espectros DAD de la librería espectral (cuando las concentraciones de las muestras lo permitieron) creada a partir de los espectros de los mismos estándares.

Dada gran variabilidad en las hidrofobicidades de los analitos a separar, se utilizó un gradiente optimizado que consistió de: 70-100 % de acetonitrilo en 43 min, a un flujo de 0,7 mL min<sup>-1</sup>. La fase móvil orgánica se filtró con filtros de nylon de 0,45  $\mu$ m y la acuosa con filtro de nitrato de celulosa, también de 0,45  $\mu$ m. Para la determinación cuantitativa de los analitos se empleó un detector de fluorescencia, para lo cual se seleccionó como longitud de onda de excitación óptima 260 nm, considerando los espectros UV-vis de cada uno de ellos. Las longitudes de onda de emisión óptimas para los 16 HAPs se detallan en la Tabla 5. Acp fue cuantificado mediante DAD a 230 nm, debido a que no presenta fluorescencia. A esta longitud de onda no existía interferencia por parte de los líquidos iónicos utilizados.

El volumen inyectado del extracto obtenido en el líquido iónico fue de 10  $\mu$ L en todos los ensayos.

**Tabla 5.** Longitudes de onda de fluorescencia empleados en la detección de los distintos HAPs

<b>Analitos</b>	<b><math>\lambda</math> (nm)</b>
Nap, Ace, Flu y Phe	340
Ant, Pyr, Cry, BaA y DBA	400
BbF, BkF, BaP y BPe	420
Flt y InP	500

#### 4.2.4. Purificación de los RTILs

En la metodología MELLD se emplearon como solventes de extracción RTILs con densidades menores que la del agua, de manera que se pudiera obtener la fase extractante (RTIL) en la parte superior y así facilitar su recolección. Antes de ser utilizados se empleó un procedimiento de purificación de literatura <sup>1</sup> que consistió en lavados con solución alcalina. Para esto se disolvió cada uno de los RTILs en un volumen de diclorometano en una relación 1:4 en tubos cónicos de polipropileno de 14 mL. La solución resultante se lavó con 1,00 mL de una solución de KOH  $1.10^{-4}$  M, se agitó en un agitador mecánico vortex durante 10 min y finalmente se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm. La fase acuosa fue descartada utilizando una pipeta Pasteur. Este proceso se realizó por quintuplicado y posteriormente se repitió el procedimiento, pero utilizando esta vez 1,00 mL de agua MilliQ, de manera de eliminar los restos de solución alcalina (también por quintuplicado). Finalmente se procedió a la determinación de la ausencia de anión de la sal de RTIL en la fase acuosa de lavado por reacción con  $\text{AgNO}_3$  0,05 M. Una vez terminados los lavados se procedió al secado de la fase orgánica conteniendo el RTIL puro a partir del uso de aproximadamente 1 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (anhidro), se agitó en vórtex por 15 min y se filtró con papel de filtro Whatman® 40. La fase orgánica filtrada se evaporó mediante burbujeo con  $\text{N}_2$  y posteriormente se secó durante 48 h en estufa a 40°C.

#### 4.2.5. Preparación de solución stock y estándares en agua

Se prepararon soluciones “stock” de los 16 HAPs seleccionados disolviendo los compuestos en acetonitrilo (con concentraciones variables y conocidas entre 300 y 800  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A partir de ellos se preparó una solución estándar de 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Todas las soluciones se guardaron en frascos color caramelo y se conservaron en freezer a -20 °C hasta su uso. Su estabilidad fue controlada antes de su utilización comparando las áreas de los picos cromatográficos con las áreas de la solución inicial.

#### 4.2.6. Aplicación de la metodología MELLD a muestras de agua del Río de La Plata.

Las muestras de agua de río fueron recolectadas en botellas de vidrio color caramelo previamente lavadas con metanol. Las mismas fueron tomadas desde el “canal Este” y el “canal Oeste”, que rodean la destilería YPF de la localidad de Ensenada, los cuales desembocan en el Río de La Plata. Las muestras fueron mantenidas a 4 °C en la heladera y se filtraron utilizando filtros de nylon de 0,45 µm, antes de ser utilizadas.

Las concentraciones de los diferentes HAPs en las muestras de agua, correspondiente a la fracción soluble, se determinaron empleando el método de la “*adición de estándar o sobreagregado*”, para eliminar posibles efectos de matriz. Para esto se prepararon soluciones de diferentes niveles de concentración dentro del rango lineal para cada PAH, aditivando con volúmenes conocidos de las soluciones estándar las muestras a analizar.

### 4.3. Resultados y discusiones

#### 4.3.1. Optimización de los parámetros de extracción

Para la optimización de la metodología MELLD se empleó el procedimiento de “una variable a la vez” (*step-by-step*) desarrollada en el Capítulo 3 (Sección 3.2). Para esto se seleccionaron 5 de los 16 HAPs como analitos de prueba, de hidrofobicidad diferente, representativos de todo el conjunto: Naftaleno, Antraceno, Pireno, Criseno, y Benzo[*k*]Fluoranteno. Las concentraciones utilizadas para estos ensayos fueron: 43 µg L<sup>-1</sup>; 41 µg L<sup>-1</sup>; 57 µg L<sup>-1</sup>; 53 µg L<sup>-1</sup> y 38 µg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Para todos los experimentos realizados se utilizó un volumen constante de solución estándar de 5,00 mL. La performance del método fue analizada a partir de la “relación de áreas”,  $A_r$ , de los picos cromatográficos, expresado como la relación entre el área correspondiente a los analitos en la fase extractante  $A_{RTIL}$  (proporcional a  $C_{RTIL}$ , la concentración en la fase de líquido iónico), dividido por el área de los analitos en la fase acuosa inicial antes del proceso de extracción,  $A_{ac}$  (proporcional a  $C_{ac}$ , concentración en la fase acuosa). Por lo tanto,  $A_r$  corresponde al factor de enriquecimiento, FE ( $=C_{RTIL}/C_{ac}$ ), en esa condición experimental de extracción, como se detalla en el Capítulo 3 (Sección 3.1.3.6). Las condiciones *óptimas* seleccionadas serán aquellas que permitan maximizar  $A_r$ , y por lo tanto FE, para todos los analitos.

Se seleccionaron como parámetros significativos de la performance del método a aquellos que usualmente lo son en este tipo de metodología de extracción: tipo y volumen de RTIL, tipo y volumen

de solvente dispersante, tipo de sal utilizada (efecto salino) y los tiempos de extracción y centrifugación.

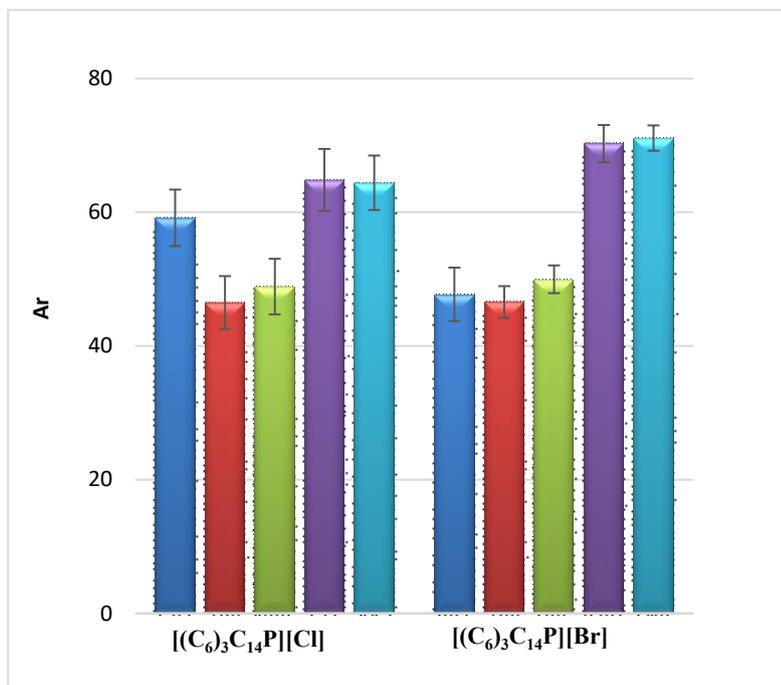
Una vez seleccionado el solvente dispersante, se establecieron como condiciones iniciales de la optimización: 40  $\mu\text{L}$  de RTIL y 80  $\mu\text{L}$  de metanol, como solvente dispersante. Para el estudio del efecto salino se empleó NaCl al 3% p/V como condición inicial. Los tiempos de extracción y centrifugación fueron de 10 y 20 min, respectivamente. Los parámetros fueron optimizados de a uno, es decir que en cada etapa de optimización los resultados sólo dependen de este factor, por lo que su valor va cambiando al *valor óptimo* en el transcurso de la optimización, como se detalla a continuación. Cada condición se ensayó por triplicado.

### 4.3.2. Elección del RTIL

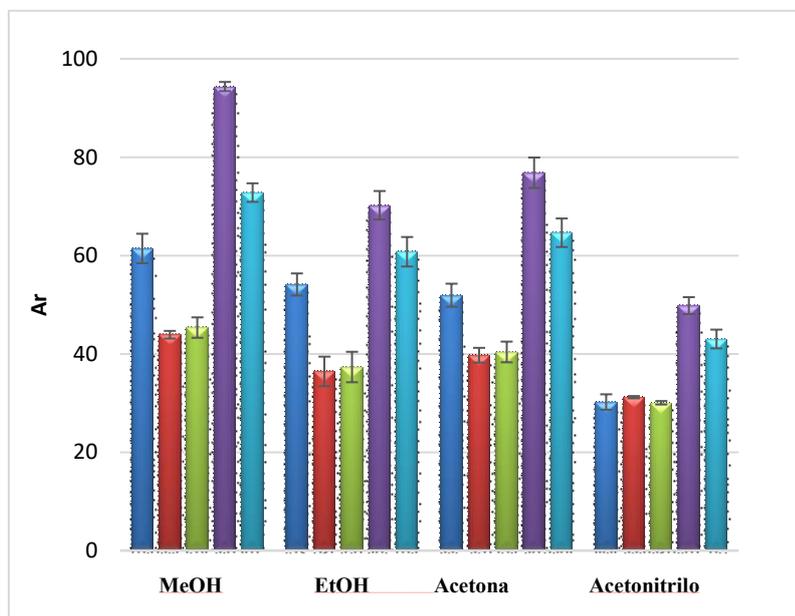
Se emplearon los 3 RTILs de fosfonio disponibles en el laboratorio,  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Cl}]$ ,  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$  y  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{N}(\text{CN})_2]$ , y todos fueron purificados. Los cromatogramas obtenidos cuando se utilizó el  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{N}(\text{CN})_2]$  no fueron aceptables, ya que se observó la aparición de picos extraños y coleo en los picos de los analitos, por lo que tuvo que ser descartado. En la Figura 8 se presentan los resultados de las  $A_r$  como indicadores de los FE, obtenidas para los otros dos RTILs utilizados. Se puede observar que las eficiencias de extracción para  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Cl}]$  y  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$  son similares. Sin embargo, las eficiencias obtenidas para los dos HAPs más hidrofóbicos, Cry y B[k]F, son mayores cuando se emplea  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$ . Es por esto que se seleccionó este RTIL para los siguientes ensayos.

### 4.3.3. Elección del solvente dispersante

Como se explicitó en el Capítulo 2, los solventes dispersantes que se utilizan en esta técnica deben ser solubles, tanto con el líquido iónico como en la matriz acuosa. A partir de esta condición se seleccionaron al metanol, etanol, acetona y acetonitrilo como solventes dispersantes. Para ello se prepararon distintas soluciones conteniendo 40  $\mu\text{L}$  de  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$  en 80  $\mu\text{L}$  del solvente dispersante correspondiente. Se inyectó la mezcla en la muestra acuosa tal como se explicó en la Sección 2.4.1. Como se puede observar en la Figura 9, el solvente dispersante que permitió mejores resultados en la extracción, para todos los analitos, fue el metanol, por lo que se lo seleccionó para los experimentos posteriores.



**Figura 8.** Efecto del tipo de IL sobre la eficiencia de extracción, Ar. (■) Nap, (■) Ant, (■) Pyr, (■) Cry, (■) B[k]F.

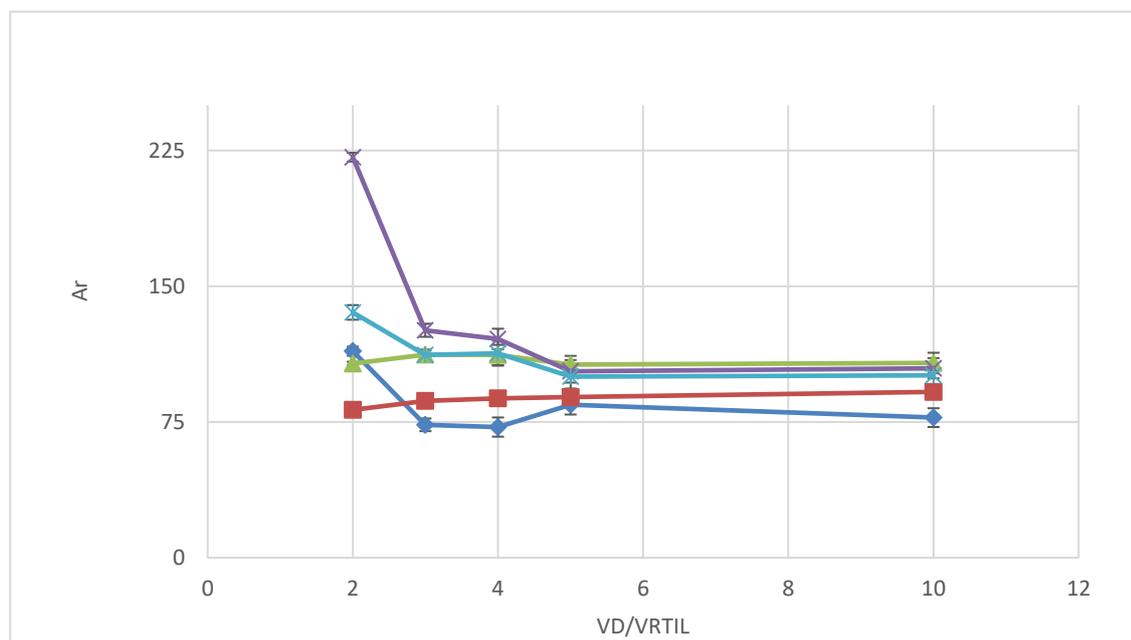


**Figura 9.** Efecto del tipo de solvente dispersante. (■) Nap, (■) Ant, (■)Pyr, (■) Cry, (■) B[k]F.

#### 4.3.4. Efecto del volumen de solvente dispersante

Uno de los parámetros más importantes a optimizar es el volumen de solvente dispersante, dado que este solvente quedará solubilizado en la fase acuosa luego de la extracción y el volumen que se emplee puede afectar (aumentar o disminuir) la solubilidad del IL en la fase acuosa. Esto puede determinar el volumen de LI que se recupera finalmente.

Se ensayaron diferentes relaciones de volumen de solvente dispersante *vs.* volumen de LI, manteniendo este último en un valor constante (40  $\mu\text{L}$ ). Los valores utilizados fueron: 2, 3, 4, 5 y 10.

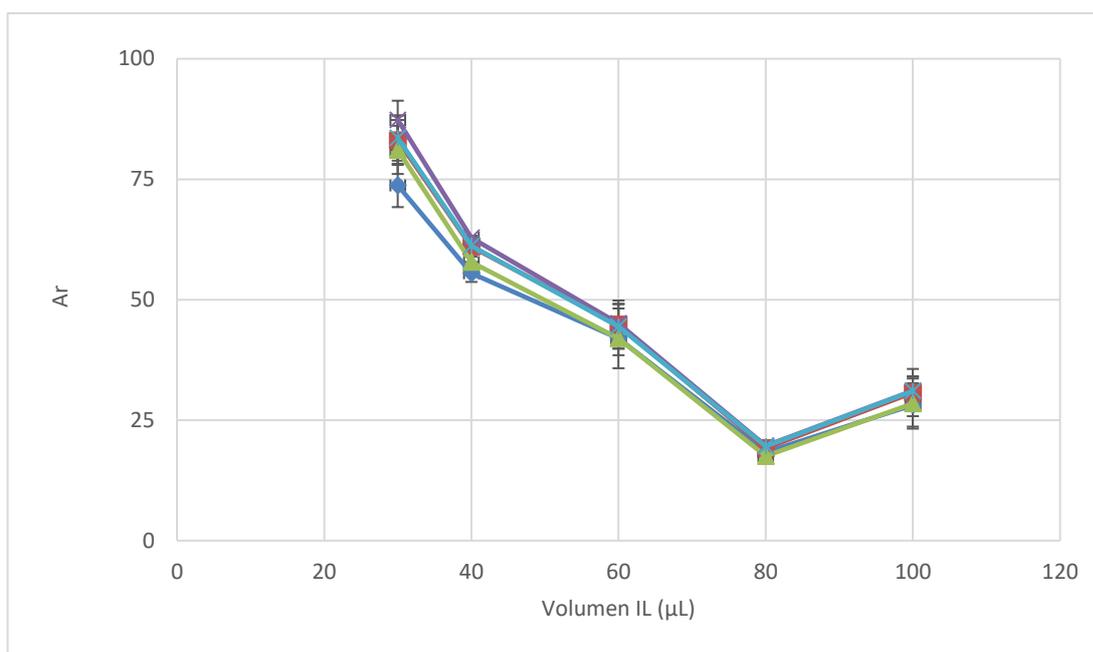


**Figura 10.** Efecto del volumen de solvente dispersante. (♦) Nap, (■) Ant, (▲)Pyr, (×) Cry, (\*) B[k]F.

Los resultados obtenidos (Figura 10) muestran que cuando la relación entre el volumen de solvente dispersante,  $V_D$ , y el RTIL,  $V_{RTIL}$ , fue igual a 2, los factores de enriquecimientos (expresados como Ar) fueron los más altos (o, en algunos casos se mantuvieron constantes). Por lo tanto, el valor de Ar seleccionado fue de 2, por lo que el volumen de metanol a utilizar en los siguientes ensayos será de 80  $\mu\text{L}$ .

#### 4.3.5. Efecto del volumen del solvente extractante (RTIL)

Para evaluar el efecto del volumen de RTIL se prepararon soluciones conteniendo distintos volúmenes de  $[(C_6)_3C_{14}P][Br]$  y dos veces el volumen de solvente dispersante óptimo, es decir, metanol. Los volúmenes utilizados fueron: 30, 40, 60, 80 y 100  $\mu L$ . La Figura 11 permite concluir que el máximo rendimiento de extracción se obtiene cuando el volumen de RTIL fue de 30  $\mu L$ , lo cual podía esperarse dado la mayor dilución de los analitos a volúmenes mayores.



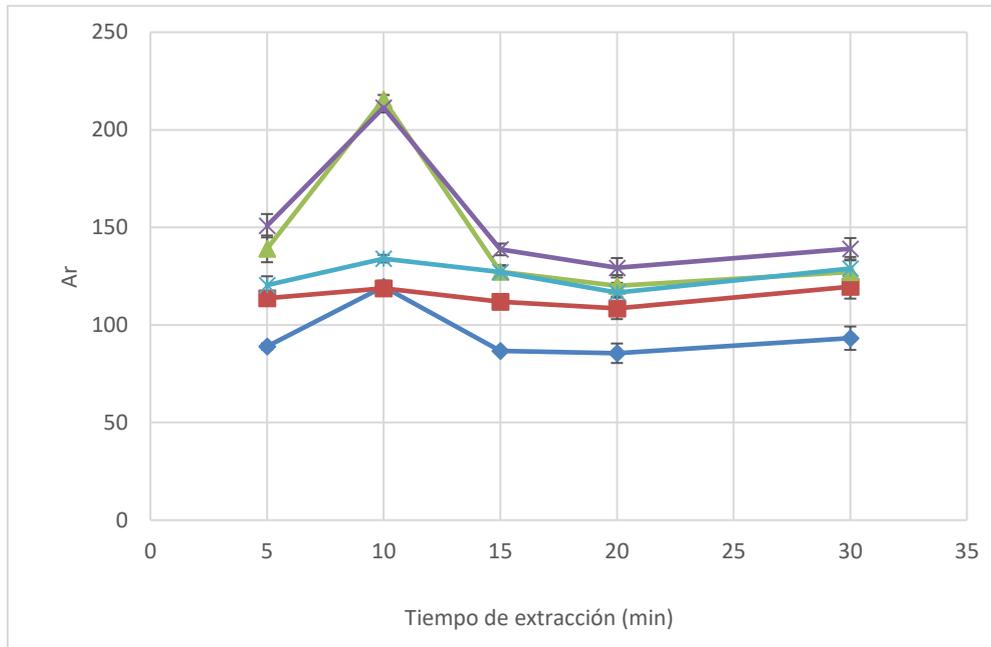
**Figura 11.** Efecto del volumen de LI. (♦) Nap, (■) Ant, (▲)Pyr, (×) Cry, (\*) B[k]F.

#### 4.3.6. Tiempo de extracción y centrifugación

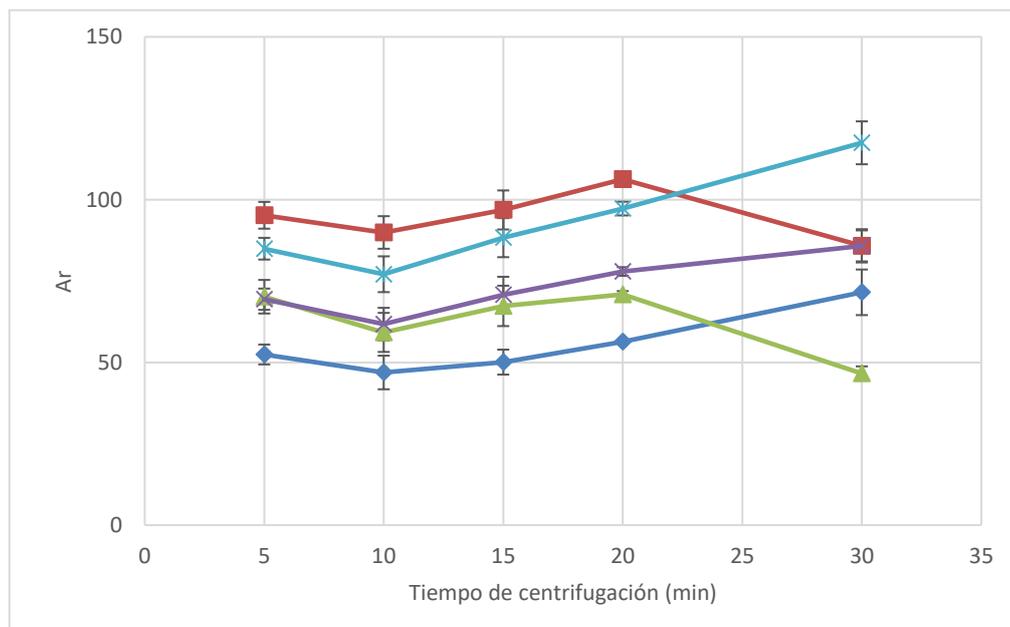
Se consideró como *tiempo de extracción* al tiempo desde la inyección de la mezcla RTIL-solvente extractante en la muestra a analizar, hasta que comienza la centrifugación. El tiempo se varió desde 5 hasta 30 min. En la Figura 12 se observa que la eficiencia de extracción crece hasta los 10 min y luego decrece y se mantiene constante. Es por esto que se seleccionó como tiempo de extracción 10 min.

El proceso de centrifugación permite que las fases de LI y la solución acuosa se separen. El *tiempo de centrifugación* se definió como el tiempo en que el tubo, conteniendo la muestra, se mantiene dentro de la centrífuga. Los valores de tiempo que se ensayaron fueron: 5, 10, 15, 20 y 30 min. La

velocidad de centrifugación se mantuvo constante en 4000 rpm, el valor máximo del instrumento. Los valores más altos de  $A_r$  para algunos analitos se obtuvieron para un tiempo de 20 min, mientras que para otros fue de 30 min (Figura 13). Debido a que el aumento no es significativo, se eligió 20 min como el tiempo óptimo de centrifugación.



**Figura 12.** Efecto del tiempo de extracción. (◆) Nap, (■) Ant, (▲)Pyr, (×) Cry, (\*) B[k]F.



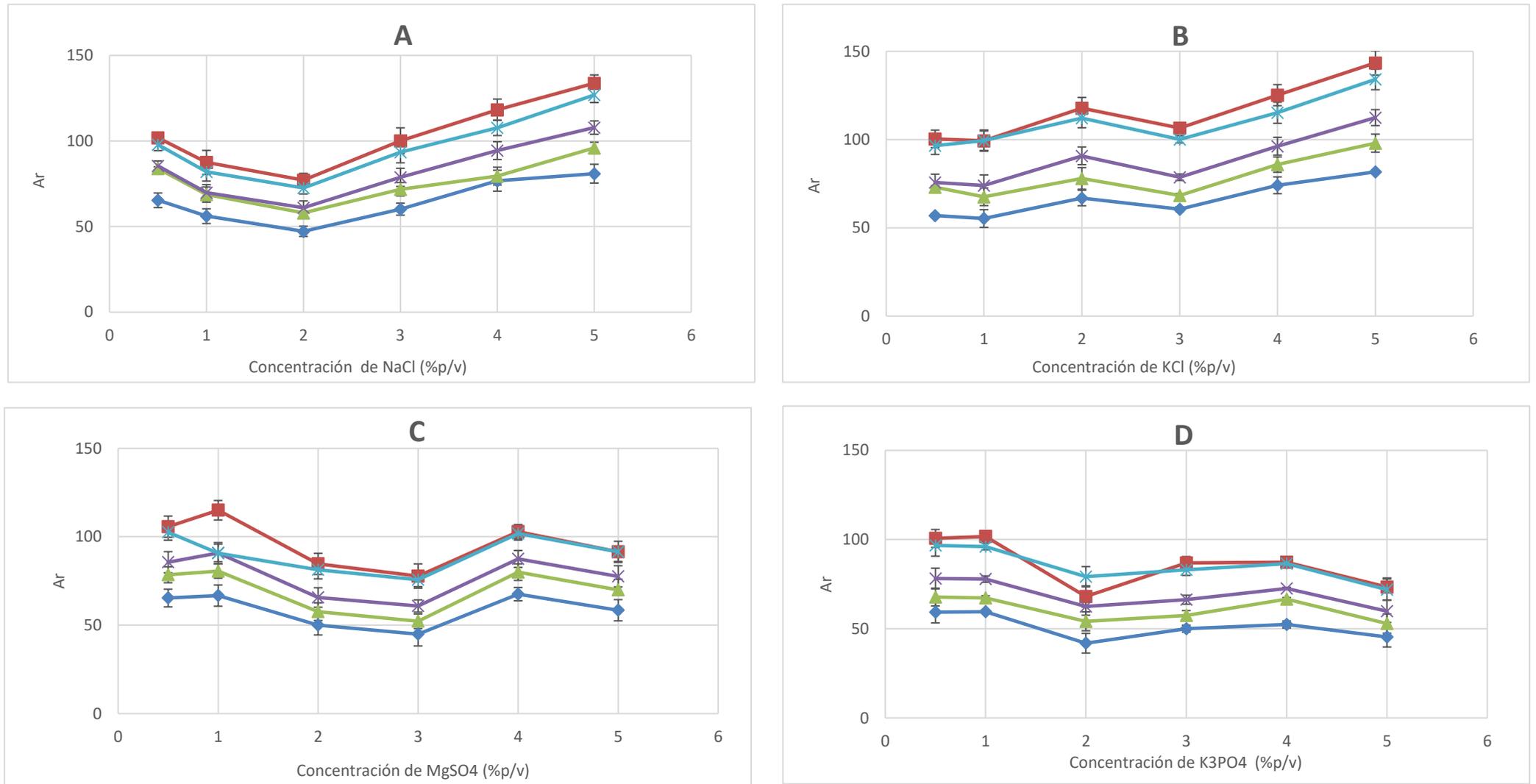
**Figura 13.** Efecto del tiempo de centrifugación. (◆) Nap, (■) Ant, (▲)Pyr, (×) Cry, (\*) B[k]F.

#### 4.3.7. Efecto salino

Es muy frecuente en extracciones líquido-líquido el empleo de sales en la fase acuosa para aumentar la eficiencia de extracción, como consecuencia del conocido “efecto salino” (salting-out), donde el analito es “expulsado” hacia la fase orgánica como consecuencia de que las moléculas de agua pasan a comprometerse en la solvatación de los iones de la sal. Sin embargo, también puede existir un fenómeno menos conocido, como es el “salting-in”, el cual se observa, por ejemplo, en el caso de la solubilidad de proteínas en agua <sup>2,3</sup>. Este es un efecto inverso al salting-out donde el aumento de sales en la fase acuosa produce una mayor solubilidad de analitos, por lo general del tipo polar, en esa fase. En el caso de las proteínas ocurre por atracción de los grupos cargados con los iones de las sales en solución <sup>2</sup>. Este efecto podría ocurrir en este caso debido a que el solvente extractante es un líquido iónico, y el agregado de sal podría provocar que se establezcan atracciones coulombicas entre iones de carga opuesta del RTIL y la sal y, así, aumentar la disolución del LI en la fase acuosa, y, por lo tanto, aumentar la solubilidad de los analitos en esta fase, provocando finalmente una disminución en la eficiencia de extracción.

Para estudiar el efecto del agregado de sales, se seleccionaron dos sales con iones monovalentes, una con iones divalentes y una con anión trivalente: NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub> y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, en concentraciones entre 0,5 y 5 % p/V. La condición donde no se utilizaba el agregado de sal tuvo que eliminarse debido a que no se producía la dispersión. Este hecho podría sustentar la hipótesis de que se produzca un fenómeno salting-in del líquido iónico en el agua debido al agregado de sales. La dispersión se produciría a causa de las atracciones de los iones de la sal con los grupos cargados del RTIL, y los iones a su vez interactúan con el agua permitiendo la dispersión del líquido iónico <sup>2</sup>.

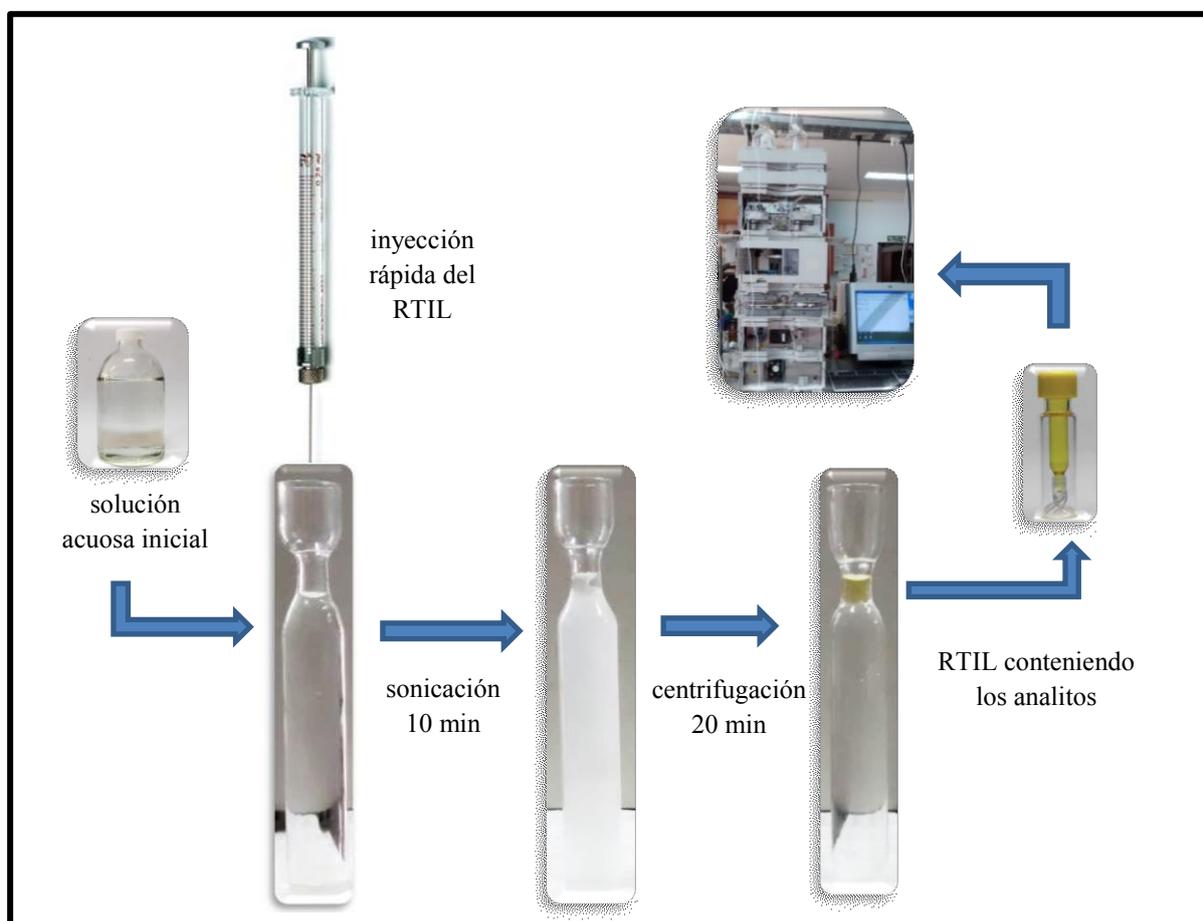
De la Figura 14-A y 14-B se observa que los valores de  $A_r$  disminuyen levemente (cuando se utiliza NaCl) o se mantienen inicialmente constantes (cuando se utiliza KCl) pero luego aumentan. Estos aumentos se deben al fenómeno de “salting-out” mencionado anteriormente. Sin embargo, de la Figura 14-C y 14-D, para MgSO<sub>4</sub> y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> se observa que los valores de  $A_r$  decrecen con el aumento en la concentración de sal. El efecto es mayor para K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> que para MgSO<sub>4</sub>. Por lo antedicho, la disminución en la eficiencia de extracción puede deberse al fenómeno de “salting-in” mencionado anteriormente, donde ocurriría una atracción coulombica de los respectivos iones de la sal con los iones del RTIL. El efecto es más marcado para los aniones polivalentes PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> que para SO<sub>4</sub><sup>-</sup>. Dentro de los cationes, el efecto es mayor para el catión con mayor concentración de carga (de menor carga/radio), Na<sup>+</sup>. En resumen, las extracciones más eficientes se lograron con KCl y los valores óptimos se obtuvieron para 5 %p/V.



**Figura 14.** Efecto de la concentración de NaCl, KCl, MgSO<sub>4</sub> y K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en el rendimiento de extracción de los HAPs de prueba. (◆) Nap, (■) Ant, (▲) Pyr, (×) Cry, (\*) B[k]F.

#### 4.4. Descripción del procedimiento MELLD optimizado

De acuerdo a los resultados obtenidos previamente, la metodología de extracción óptima consistió en inyectar rápidamente, utilizando una jeringa, 90  $\mu\text{L}$  de una mezcla que contenía 33 %V/V de  $[(\text{C}_6)_3\text{C}_{14}\text{P}][\text{Br}]$  en metanol (relación 1:2), en un tubo que contenía 5,00 mL de una solución acuosa conteniendo los analitos y KCl 5% p/V. Inmediatamente después de la inyección se produce una dispersión turbia y luego de 10 min de sonicado se procedió a realizar la centrifugación durante 20 min a 4000 rpm. El procedimiento se repitió 5 veces. El volumen de LI extraído fue de 23,6  $\mu\text{L}$  ( $\pm 0,2$   $\mu\text{L}$ ) en promedio (Figura 15). Finalmente se tomaron 10  $\mu\text{L}$  de esta fase y se inyectaron directamente en la columna cromatográfica.



**Figura 15.** Esquema del procedimiento de MELLD

#### 4.5. Parámetros de performance de la metodología analítica

A fin de realizar una validación interna de la metodología analítica desarrollada, se consideraron las siguientes cifras de mérito: límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), rango lineal (RL), factor de enriquecimiento (FE), recuperación porcentual (R%), exactitud relativa ( $\delta$ ) y reproducibilidad intradía (RSD).

Los LOD se calcularon mediante la relación ( $S/N=3$ ) (Sección 3.1.3.3). Los resultados se ubican en el rango de 0,02-0,49  $\mu.L^{-1}$ . Mientras que para Acp, dado que no presenta fluorescencia, fue de 0,56  $\mu.L^{-1}$ . Por otra parte, los LOQ se evaluaron según el método de la relación señal-ruido, como  $S/N=10$ . Los valores se encuentran en el rango de 0,08-1,85  $\mu.L^{-1}$ . En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos.

Los FE, R%, y RSD% y  $\delta$  para cada PAH fueron determinados a partir de sobreagregados de los analitos (por quintuplicado) en 3 niveles de concentración no utilizados en las rectas de calibración: 0,025, 0,040 y 0,060  $mg L^{-1}$ . Los cálculos se realizaron a partir de las ecuaciones 28 y 29 derivadas de las ecuaciones 18-20 (Sección 3.1.3.6), y de la ecuación 17 (Sección 3.1.3.5). Los resultados obtenidos para estos parámetros se detallan en la Tabla 7.

$$FE = \frac{A_{IL}}{A_{ac}} \quad (\text{Ec. 28})$$

$$R\% = FE \cdot \frac{V_{IL}}{V_{ac}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 29})$$

Siendo  $A_{IL}$  y  $A_{ac}$  las áreas cromatográficas de los analitos en la fase de LI y la fase acuosa respectivamente, con las condiciones de extracción optimizadas;  $V_{IL}$  y  $V_{ac}$  los respectivos volúmenes de la fase de LI y la fase acuosa.

Se observan en Tabla 7 altos factores de recuperación, FE, que oscilan entre 109 y 228, y muy buenas recuperaciones, R%, ubicadas en el rango entre 60 y 108%. Las precisiones calculadas como RSD% fueron muy aceptables, entre 3,4 y 11,9%, de la misma manera que los valores de exactitud relativa,  $\delta$ , comprendidos entre 0,4 y 9,9%, dependiendo del analito y del nivel de concentración estudiado. Los valores moderados de recuperación pueden deberse a la presencia de acetonitrilo en las soluciones estándares. Este solvente orgánico fue necesario para solubilizar a los patrones de los HAPs en la matriz acuosa, de manera de obtener niveles de detectabilidad aceptables. Sin embargo, el empleo de volúmenes altos de acetonitrilo en la muestra acuosa resultó en un volumen de fase de RTIL más pequeña a lo esperado, debido a que parte del líquido iónico se puede solubilizar en la fase acuosa.

**Tabla 6.** Límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ) y concentraciones de los HAPs encontrados en las muestras de agua del “canal Este” y “canal Oeste” de la destilería YPF de la localidad de Berisso (todas las concentraciones se expresan en  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

Analito	LOD <sup>1</sup>	LOQ <sup>1</sup>	Concentration encontrada	
			“canal este”	“canal oeste”
<b>Nap</b>	0,28	0,95	1,6±1,1	NC
<b>Acp</b>	0,56	1,85	NC	NC
<b>Flu</b>	0,06	0,20	<LOQ	1,2 ± 1,8
<b>Ace</b>	0,05	0,17	9,7 ± 3,1	NC
<b>Phe</b>	0,24	0,82	<LOQ	NC
<b>Ant</b>	0,04	0,12	1,6 ± 1,8	3,0 ± 2,3
<b>Flt</b>	0,25	0,85	<LOQ	<LOQ
<b>Pyr</b>	0,05	0,18	0,48 ± 0,8	0,4 ± 1,9
<b>Cry</b>	0,06	0,19	0,6 ± 1,1	2,0 ± 1,2
<b>B[a]A</b>	0,03	0,08	3,0 ± 1,5	3,2 ± 2,1
<b>B[b]F</b>	0,08	0,25	<LOQ	2,6 ± 1,4
<b>B[k]F</b>	0,03	0,09	1,6 ± 1,2	2,3 ± 1,5
<b>B[a]P</b>	0,02	0,08	NC	NC
<b>DBA</b>	0,23	0,77	NC	NC
<b>InP</b>	0,49	1,65	NC	NC
<b>Bpe</b>	0,12	0,39	NC	NC

NC: detectable no cuantificable; <LOQ: debajo del LOQ. <sup>1</sup>: obtenido mediante S/N.

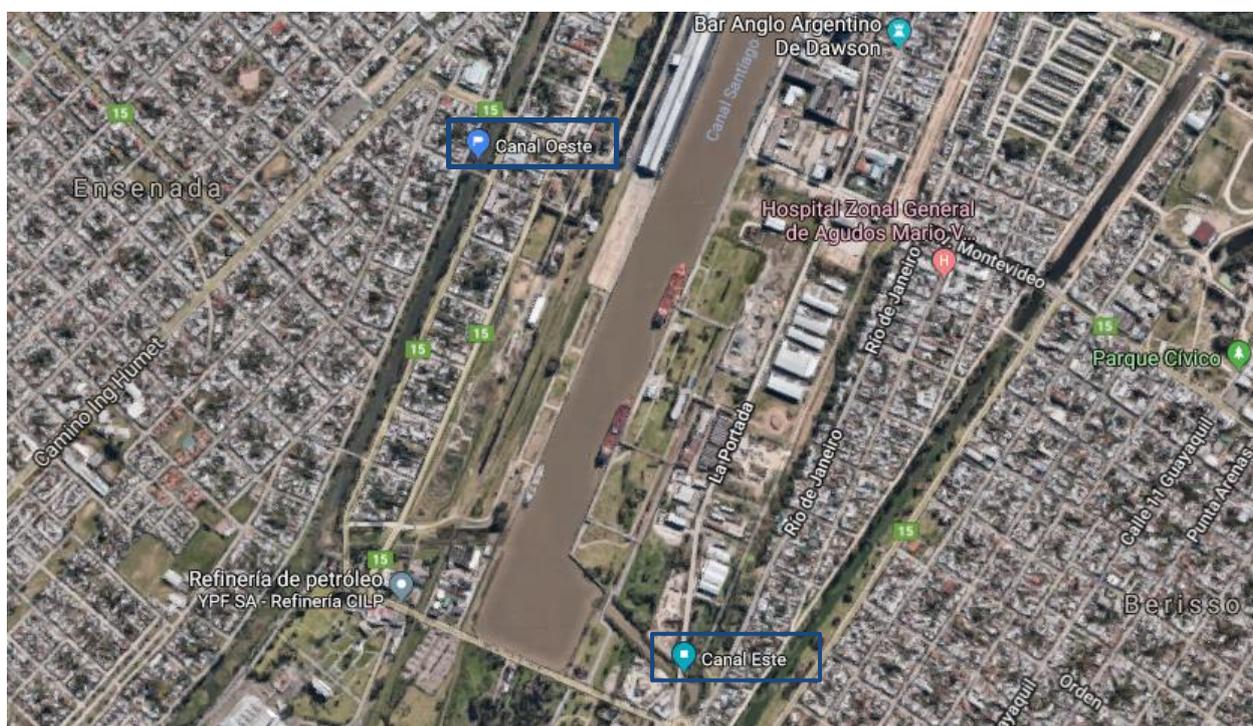
**Tabla 7.** Factor de enriquecimiento, FE; factor de recuperación, R%, reproducibilidad, RSD% y exactitud relativa,  $\delta$ , para la técnica IL-DLLME.

Analito	Cantidad sobreagregada (mg L <sup>-1</sup> )											
	0.025				0.040				0.060			
	FE	R%	RSD%	$\delta$	FE	R%	RSD%	$\delta$	FE	R%	RSD%	$\delta$
<b>Nap</b>	128	64	6,2	1,1	109	62	4,6	4,7	116	63	6,2	6,8
<b>Acp</b>	137	65	3,4	8,6	130	61	10,2	4,7	125	62	8,8	4,3
<b>Flu</b>	126	60	5,5	6,7	139	66	7,0	8,9	126	64	11,9	1,9
<b>Ace</b>	187	88	8,2	2,6	156	74	6,7	8,4	119	71	10,2	8,1
<b>Phe</b>	130	81	4,1	2,2	188	89	6,6	9,8	153	72	10,8	9,4
<b>Ant</b>	133	63	6,2	4,5	145	68	7,3	8,0	138	65	11,4	7,2
<b>Flt</b>	109	61	5,6	3,3	120	64	6,9	6,3	118	65	10,5	6,3
<b>Pyr</b>	137	65	5,6	2,9	145	68	7,3	6,2	138	65	10,9	3,5
<b>Cry</b>	124	62	10,0	6,4	123	62	7,4	6,6	134	65	7,6	9,4
<b>B[a]A</b>	152	76	9,5	5,5	164	82	8,1	9,9	134	67	7,6	5,2
<b>B[b]F</b>	139	66	7,3	8,2	154	73	6,7	9,9	138	65	11,2	7,4
<b>B[k]F</b>	144	68	8,3	4,9	138	65	7,9	8,2	143	67	11,5	4,8
<b>B[a]P</b>	146	69	7,7	5,6	155	73	7,5	7,9	140	66	11,9	4,8
<b>DBA</b>	221	105	7,5	9,8	192	91	5,5	4,6	196	92	10,1	3,4
<b>InP</b>	228	108	8,1	2,6	226	107	7,2	5,7	187	95	11,2	0,6
<b>Bpe</b>	148	70	7,6	0,4	137	64	6,9	7,7	150	99	11,5	0,8

#### 4.6. Performance de la metodología analítica aplicada a muestras reales

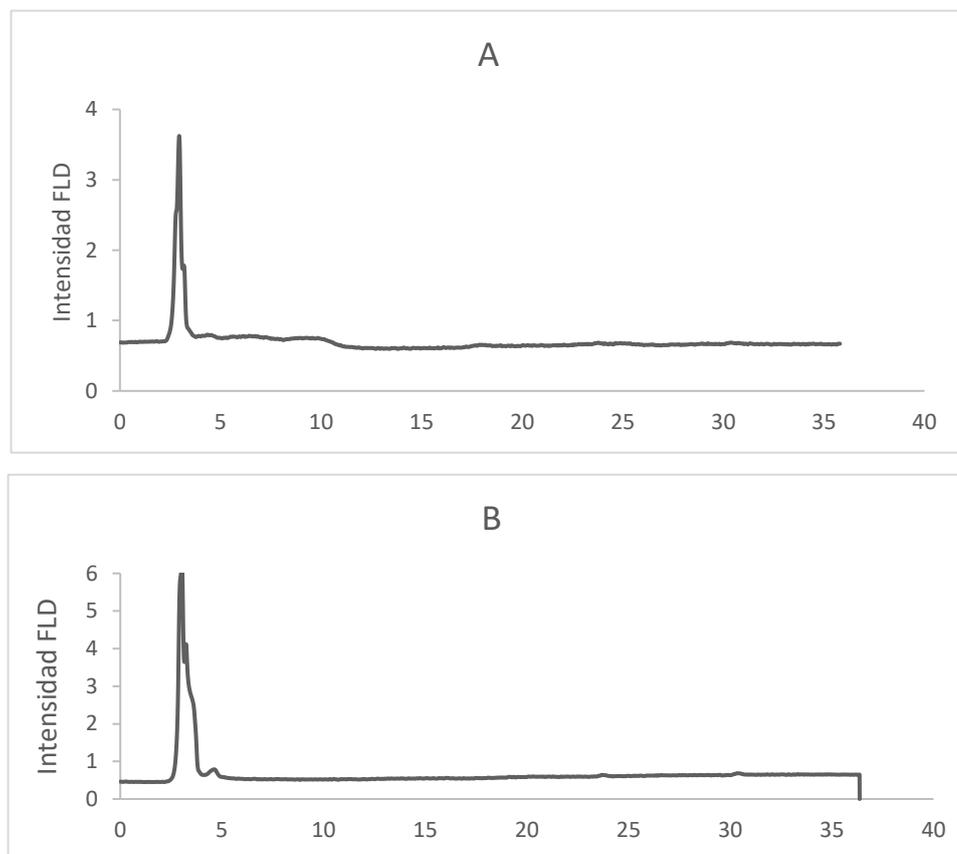
Las muestras de agua de río utilizadas para aplicar el procedimiento MELLD optimizado fueron recolectadas de los canales Este (coordenadas: -34.874571, -57.895644) y Oeste (coordenadas: -34.864305, -57.900609) del Río de La Plata, adyacentes a la refinería de YPF (Figura 16), y fueron posteriormente tratadas y almacenadas como se mencionó en la Sección 4.2.6.

Para validar la performance del método se empleó el método de la “adición de estándar” para evitar las posibles interferencias provenientes de las matrices de las muestras. Las extracciones se llevaron a cabo en las condiciones optimizadas del método RTIL-MELLD mencionadas en la Sección 4.4. Para esto las muestras tuvieron que ser adecuadas según estas condiciones óptimas del método. Dado que la solución acuosa final debe ser 5% p/V en KCl (según los resultados de la Sección 4.3.7), se prepararon dos soluciones conteniendo 6,03 %p/V de KCl con ambas muestras de agua de río (Canal Este y Canal Oeste). Las soluciones para ser empleadas por el método de sobreagregado fueron preparadas de la siguiente forma: 4,145 mL de la solución acuosa de agua de río conteniendo KCl, y distintos volúmenes de ACN (entre 705 y 855  $\mu\text{L}$ , ya que la solución estándar fue preparada con el mismo solvente), de manera de mantener un valor constante de 17,1 %V/V de ACN, se colocaron en tubos de cuello angosto de 5,00 mL y fueron sobreagregados con distintos volúmenes (entre 0 y 150  $\mu\text{L}$ ) de solución estándar de 5 ppm conteniendo los 16 HAPs, cada una preparada por triplicado. Las concentraciones finales de los estándares de los HAPs oscilaron entre 0,00 y 0,15  $\text{mg L}^{-1}$ .



**Figura 16.** Fotografía satelital que muestra en azul los dos puntos de recolección de las muestras.

Un volumen constante de la gota de RTIL colectada del cuello de los tubos de vidrio se inyectó directamente en la columna de RPLC.



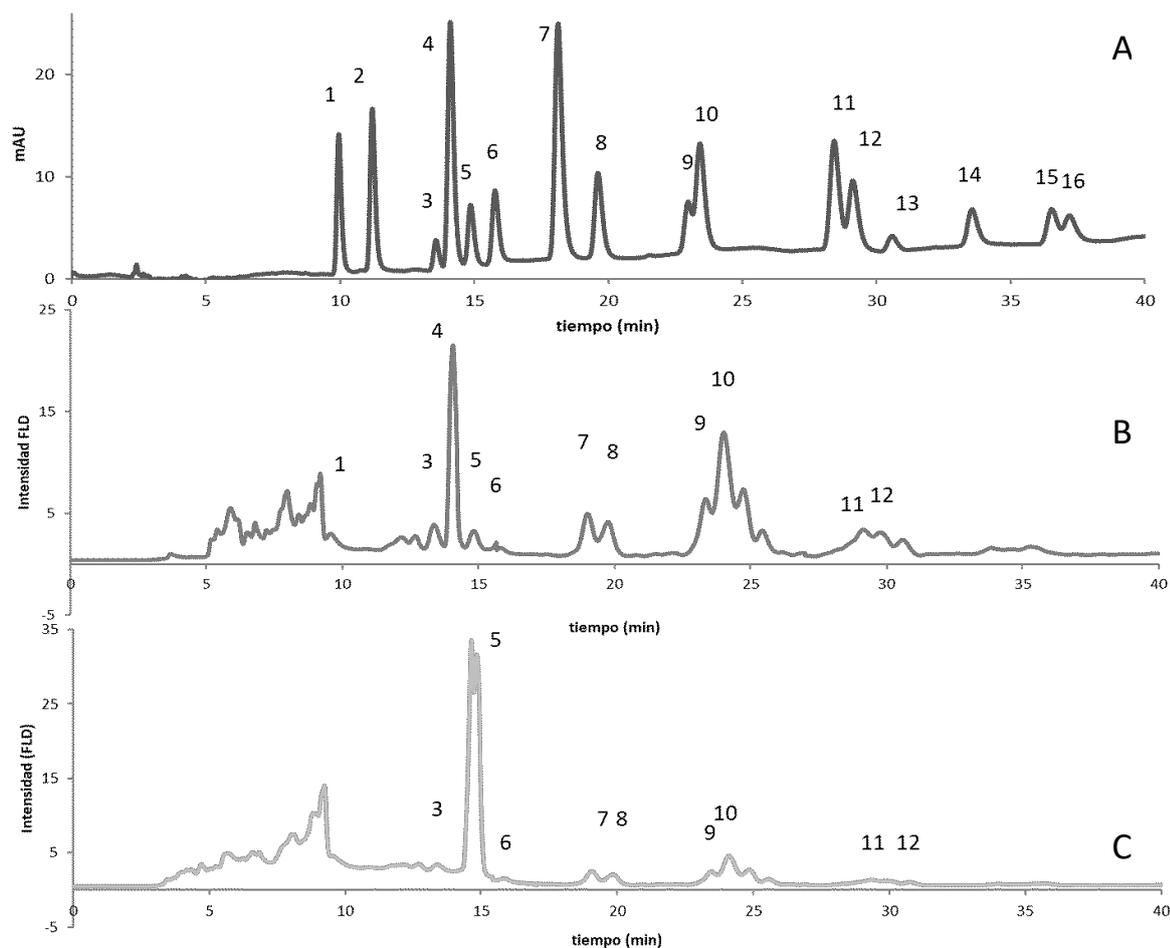
**Figura 17. A)** Cromatograma de la muestra del canal “Este” a 400 nm (emisión de fluorescencia). **B)** Cromatograma de la muestra del canal “Oeste” a 400 nm (emisión de fluorescencia).

La Figura 17 muestra los cromatogramas obtenidos para las muestras de ambos canales sin preconcentración donde no se observa presencia de picos cromatográficos. En la Figura 18 se muestran los cromatogramas de las muestras preconcentradas sin sobreagregar, donde ahora se puede observar la aparición de picos (además, se muestra un cromatograma de los estándares de los 16 HAPs, con fines comparativos). La identificación se completó mediante la comparación de los espectros de fluorescencia y en algunos de los casos, donde las concentraciones los permitieron, también se realizó la comparación de los espectros DAD, de los diferentes picos cromatográficos. De la Tabla 6 se puede observar que 11 de los 16 HAPs pudieron ser detectados en el Canal Este, y 8 en el Canal Oeste, aunque algunos de ellos se encontraron por debajo del LOQ, por lo que no pudieron ser cuantificados. En este caso los límites se calcularon según el método de señal-ruido. Por otra parte, ninguno de los dos HAPs considerados como los más cancerígenos/mutágenicos, Acp y B[a]P, fueron detectados. La concentración de cada analito en la muestra fue calculada como  $C_x = a/b$ , siendo **a** la

ordenada al origen de la recta de calibración y **b** la pendiente de la recta de calibración (ver Sección 3.1.4).

Para determinar la linealidad de las rectas de calibración para cada analito se empleó un ANOVA, según se detalla en la Sección 3.1.2., mediante el cual se compararon los  $F_{exp}$  con el  $F_{crit}$  para 95 % de confianza y con N-2 grados de libertad para la falta de ajuste (LOF). Las rectas de calibración y sus parámetros se muestran en las Tablas 8 y 9.

También se evaluó el rango lineal para algunos de los analitos, RL, que comprende desde el LOQ hasta el límite superior de cuantificación, determinado por el ensayo de LOF. Para aquellos analitos para los cuales no se encontró el límite superior, sólo se informa el rango de calibración o rango de trabajo (Tablas 8 y 9).



**Figura 18.** A) Cromatograma de los estándares de los 16 HAPs a 254nm. B) Cromatograma de la muestra del canal “este” a 400 nm (emisión de fluorescencia). C) Cromatograma de la muestra del canal “oeste” a 400 nm (emisión de fluorescencia). 1: Nap, 2: Acp, 3: Flu, 4: Ace, 5: Phe, 6: Ant, 7: Flt, 8: Pyr, 9: Cry, 10: B[a]A, 11: B[b]F, 12: B[k]F, 13: B[a]P, 14: InP, 15: DBA, 16: BPe.

**Tabla 8.** Rectas de calibración para los 16 HAPs en el “Canal Este” y parámetros de las regresiones

Analito	Pendiente $\times 10^4$	Ordenada $\times 10^2$	$R^2$	$S_{y/x}^a$	$m^b$	Rango de calibración ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Nap	1,79±0,03	0,3 ± 0,2	0,9937	73,87	8	0,00-0,15
Acp	1,06±0,02	0,3 ± 0,2	0,9903	52,77	8	0,00-0,15
Flu	1,06±0,02	-0,4 ± 1,3	0,9920	456,71	8	0,00-0,15
Ace	4,25±0,09	4,1 ± 0,6	0,9915	202,88	8	0,00-0,15
Phe	2,75±0,05	-0,4 ± 0,3	0,9906	126,98	9	0,00-0,15
Ant	1,66±0,02	3 ± 1	0,9938	476,19	8	0,00-0,10 <sup>c</sup>
Flt	2,48±0,03	0,2 ± 0,2	0,9948	65,10	8	0,00-0,10 <sup>c</sup>
Pyr	1,12±0,01	0,5 ± 0,8	0,9963	326,51	9	0,00-0,15
Cry	8,3±0,2	0,5 ± 0,8	0,9921	254,75	7	0,00-0,10 <sup>c</sup>
B[a]A	2,45±0,05	7 ± 2	0,9904	561,80	7	0,00-0,07 <sup>c</sup>
B[b]F	1,29±0,02	-2 ± 1	0,9955	424,95	7	0,00-0,15
B[k]F	2,59±0,05	4 ± 2	0,9909	655,88	7	0,00-0,07 <sup>c</sup>
B[a]P	2,94±0,05	(3 ± 2) $\times 10^2$	0,9934	626,79	7	0,00-0,07 <sup>c</sup>
DBA	3,76±0,05	(2 ± 3) $\times 10$	0,9951	95,93	8	0,00-0,10 <sup>c</sup>
InP	1,76±0,02	(-1 ± 1) $\times 10$	0,9978	39,42	9	0,00-0,15
Bpe	7,62±0,08	(7 ± 5) $\times 10$	0,9964	216,50	9	0,00-0,15

<sup>a</sup> desviación estándar de la regresión; <sup>b</sup> niveles de concentración; <sup>c</sup> Rango lineal.

**Tabla 9.** Rectas de calibración para los 16 HAPs en el “Canal Oeste” y parámetros de las regresiones

<b>Analito</b>	<b>Pendiente x 10<sup>4</sup></b>	<b>Ordenada x10<sup>2</sup></b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>S<sub>y/x</sub><sup>a</sup></b>	<b>m<sup>b</sup></b>	<b>Rango de calibración (mg L<sup>-1</sup>)</b>
Nap	1,9±0,3	-0,1 ± 0,1	0,9930	82,91	9	0,00-0,15
Acp	0,93±0,02	-0,1 ± 0,1	0,9927	44,91	8	0,00-0,15
Flu	8,9±0,1	1 ± 1	0,9928	398,80	9	0,00-0,15
Ace	3,57±0,05	0,1 ± 0,4	0,9930	158,03	9	0,00-0,15
Phe	2,59±0,05	2,1 ± 0,3	0,9908	134,61	9	0,00-0,15
Ant	13,4±0,3	4 ± 1	0,9903	479,75	8	0,00-0,10 <sup>c</sup>
Flt	2,75±0,05	-0,2 ± 0,4	0,9902	143,88	9	0,00-0,15
Pyr	8,8±0,2	0,4 ± 1,0	0,9913	401,12	9	0,00-0,15
Cry	7,5±0,2	1,5 ± 0,7	0,9902	255,11	8	0,00-0,10 <sup>c</sup>
B[a]A	17,9±0,3	6 ± 2	0,9909	581,43	8	0,00-0,10 <sup>c</sup>
B[b]F	8,6±0,1	2,3 ± 0,8	0,9936	325,86	9	0,00-0,15
B[k]F	17,0±0,3	4 ± 1	0,9916	533,47	8	0,00-0,10 <sup>c</sup>
B[a]P	19,4±0,4	5 ± 2	0,9905	640,07	8	0,00-0,10 <sup>c</sup>
DBA	1,76±0,03	0,6 ± 0,2	0,9900	83,87	9	0,00-0,15
InP	0,96±0,01	0,03 ± 0,08	0,9940	32,70	9	0,00-0,15
Bpe	4,03±0,06	0,5 ± 0,4	0,9943	144,99	9	0,00-0,15

<sup>a</sup> desviación estándar de la regresión; <sup>b</sup> niveles de concentración; <sup>c</sup> Rango lineal.

#### 4.7. Comparación del método propuesto con estudios similares de la literatura

La metodología analítica desarrollada se comparó con otros métodos de literatura que incluyen MELLD para la determinación de HAPs en muestras de agua mediante HPLC.

Fatemi *et al.* <sup>4</sup>, utilizaron un método de “microextracción líquido-líquido asistido por alcohol” (AA-DLLME, por sus siglas en inglés) para determinar 6 HAPs en muestras de agua. Los solventes de extracción utilizados fueron alcoholes menos densos que el agua. Los factores de enriquecimiento, FE, obtenidos para los HAPs fueron entre 310-325, con límites de detección, LODs, entre 0,002 y 0,8  $\mu\text{g L}^{-1}$ . La reproducibilidad intra- e interdía, RSD%, estuvo en el rango de 1,7-7,0 y 5,6-7,3, respectivamente. Fernández *et al.* <sup>5</sup> determinaron 15 HAPs en muestras de agua de canilla, lluvia, y de río superficiales mediante una metodología automatizada DLLME-FLD-HPLC empleando un sistema de multijeringa FIA. Como solvente de extracción se utilizó tricloroetileno. Los FE se encontraron en el rango de 86-95 con LODs entre 0,02-0,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Los RSD intra- e inter-día fueron 1,6-4,7 y 2,1-5,3, respectivamente.

En los dos trabajos previos se utilizaron solventes orgánicos en lugar de solventes “verdes” como lo son los RTILs. Cela *et al.* <sup>6</sup> así como también Zhou y Gao <sup>7</sup> utilizaron un RTIL de imidazolio más denso que el agua (hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio) para un método de MELLD. En el primer trabajo mencionado, la muestra que contiene el RTIL se enfría en un baño de hielo después de que se genera la dispersión, lo que lleva varios minutos. Cada PAH se excitó y detectó a distintas longitudes de onda, lo que permitió incrementar la sensibilidad. En el trabajo de Zhou y Gao <sup>7</sup>, se desarrolló un método MELLD a temperatura controlada, en el cual la muestra que contiene el RTIL fue calentada hasta 90 °C y luego enfriada en un baño de hielo (con un tiempo de extracción total de 30 min). Por otro lado, Yao y Anderson <sup>8</sup> utilizaron la formación in-situ del líquido iónico (“in situ IL-DLLME”) 1-butil-3-metilimidazolio bis[(trifluorometil)sulfonil]imida. La sal de imidazolio se superenfrió previamente a la reacción de metátesis con la sal de bis[(trifluorometil)sulfonil]imida. Aunque la cantidad de líquido iónico utilizado en cada experimento fue pequeña, es necesario remarcar que los RTIL de imidazolio utilizados en los trabajos anteriores son muchos más costosos que los de fosfonio utilizados en la presente Tesis.

Con respecto a los LODs, los valores reportados por Cela *et al.* <sup>6</sup>, empleando detección de fluorescencia, Zhou y Gao <sup>7</sup> y Yao y Anderson <sup>8</sup>, ambos empleando detección UV, fueron 0,03-2  $\text{ng L}^{-1}$ , 0,0005-0,88  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 0,02-0,3  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, en comparación con 0,02-0,49  $\mu\text{g L}^{-1}$  obtenidos en la presente Tesis. LODs similares se obtienen en el caso en que la fase de RTIL es calentada y luego enfriada en un baño de hielo después del método MELLD <sup>7</sup> o si el RTIL se obtiene utilizando un proceso de formación in-situ <sup>8</sup>. Por otro lado, se obtienen mucho menores LODs

enfriando la fase de RTIL combinada con detección de fluorescencia <sup>6</sup>. Sin embargo, la adición de etapas de calentamiento o enfriamiento al método clásico DLLME incrementa el tiempo total de análisis. En este trabajo de Tesis no se agregaron etapas extras de calentamiento o enfriamiento. Desafortunadamente, aunque se utilizó la detección de fluorescencia, los límites que se obtuvieron fueron mayores que los determinados en mediante la técnica DLLME empleada por Cela *et al.* <sup>6</sup>. La principal razón para este resultado puede atribuirse principalmente al tipo de RTIL utilizado (catión imidazolio versus fosfonio). Por lo tanto, aunque se pueden establecer fuertes interacciones dispersivas entre los HAPs y las largas cadenas alquílicas de los RTIL de fosfonio, las interacciones  $\pi$ - $\pi$  entre los RTIL de imidazolio y los HAPs podrían incrementar aún más los rendimientos de extracción, obteniendo de esa forma, menores LODs.

En resumen, se puede concluir que las cifras de mérito obtenidas en el presente capítulo (factores de enriquecimiento, límites de detección y cuantificación, y reproducibilidad), mediante el método MELLD desarrollado empleando un líquido iónico de fosfonio, son similares a aquellos obtenidos con otros procedimientos reportados en la literatura que emplean solventes orgánicos tóxicos, líquidos iónicos de mayor toxicidad o más costosos como los de imidazolio. La única excepción reportada en la literatura, son los mucho menores límites de detección obtenidos con hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, junto con una etapa adicional de enfriamiento. Sin embargo, este tipo de líquido iónico es más denso que el agua, lo que dificulta su recolección y complica el análisis.

#### 4.8. Conclusiones parciales

Se desarrolló una metodología de microextracción dispersiva líquido-líquido (MELLD), empleando un líquido iónico a temperatura ambiente (RTIL) derivado del catión fosfonio,  $[(C_6)_3C_{14}P][Br]$ , para la determinación de los 16 HAPs prioritarios de la US-EPA, correspondiente a la fracción soluble, en muestras de agua del Río de La Plata. El método de extracción fue optimizado en etapas (OVAT). Se empleó como técnica determinativa HPLC con detección de fluorescencia y UV-DAD. Para la cuantificación, se empleó el método de la *adición de estándar o sobreagregado* para evitar interferencias de la matriz en las correspondientes señales. Por primera vez un líquido iónico de estas características fue utilizado como extractante en un método de extracción dispersiva líquido-líquido. El método emplea un volumen muy pequeño de este solvente, por lo que es una técnica económica y eco-compatible. Además, el hecho de tratarse de un solvente menos denso que el agua facilita su recolección en comparación con otros RTILs típicamente utilizados en este tipo de metodologías. Se obtuvieron muy altos factores de enriquecimiento (FE) y altas recuperaciones (R%). Como consecuencia, también se obtuvieron valores de LODs y LOQs en el rango de  $\mu g L^{-1}$ . Además, la

metodología presenta muy buena reproducibilidad y exactitud. Dada la calidad de las cifras de mérito obtenidas, se pudieron detectar y cuantificar con alta confiabilidad varios hidrocarburos aromáticos policíclicos en las dos muestras de agua analizadas, provenientes de dos canales aledaños a una refinería de petróleo, que se conectan al Río de La Plata.

#### 4.9. Bibliografía

1. Padró, J. M., Pellegrino Vidal, R. B. & Reta, M. Partition coefficients of organic compounds between water and imidazolium-, pyridinium-, and phosphonium-based ionic liquids. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**, 8021–8031 (2014).
2. Vaclavik, V. A. & Christian, E. W. *Essentials of Food Science*. (Springer New York, 2007).
3. Feilden, A. *Update on Undertaking Extractable and Leachable Testing*. (Smithers Information Limited, 2011).
4. Fatemi, M. H., Hadjmohammadi, M. R., Shakeri, P. & Biparva, P. Extraction optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons by alcoholic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and their determination by HPLC. *J. Sep. Sci.* **35**, 86–92 (2012).
5. Fernandez, M., Clavijo, S., Forteza, R. & Cerdà, V. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using lab on valve dispersive liquidliquid microextraction coupled to High performance chromatography. *Talanta* **138**, 190–195 (2015).
6. 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. Chromatogr. A* **1216**, 6356–64 (2009).
7. Zhou, Q. & Gao, Y. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography. *Anal. Methods* **6**, 2553–2559 (2014).
8. Yao, C. & Anderson, J. L. Dispersive liquid-liquid microextraction using an in situ metathesis reaction to form an ionic liquid extraction phase for the preconcentration of aromatic compounds from water. *Anal. Bioanal. Chem.* **395**, 1491–1502 (2009).

# **CÁPITULO 5**

**DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE  
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA MONOLÍTICA  
(m-SPE).**

**Aplicación a la determinación de antiinflamatorios no  
esteroideos en muestras de agua.**

### 5.1. Objetivos específicos

- a. Desarrollar un método de extracción en fase sólida empleando por primera vez un polímero monolítico orgánico (*m*-SPE) como fase extractante para la determinación, mediante HPLC de fase inversa con detección UV-DAD, de 7 antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) en muestras de agua.
- b. Caracterizar morfológicamente el polímero monolítico sintetizado mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) e isoterms de adsorción-desorción de nitrógeno (BET).
- c. Optimizar las variables de extracción más importantes del método analítico mediante un diseño central compuesto (DCC) y superficies de respuesta (SR).
- d. Validar internamente el método analítico desarrollado mediante la determinación de las cifras de mérito más importantes.
- e. Emplear el método optimizado a la determinación de AINEs, correspondiente a la fracción soluble, en muestras de agua de arroyo de zonas aledañas a la ciudad de La Plata.

### 5.2. Metodología propuesta

#### 5.2.1. Reactivos

Los estándares sólidos de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) de suprofen, indoprofen, naproxeno, fenbufeno, fenoprofen, flurbiprofen, e ibuprofen, se obtuvieron de Accustandard (New Haven, USA).

Los reactivos utilizados para la síntesis de los polímeros monolíticos fueron: metacrilato de 2-hidroxietilo, HEMA (98%), dimetacrilato de etilenglicol, EDMA (99%), 1-dodecanol (99%) y peróxido de laurilo, LPO (97%), los cuales fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Darmstadt, Alemania). El ciclohexanol (98%) fue obtenido de Carlo Erba (Cornaredo, Italia).

Los reactivos son de grado analítico o mejor: ácido fosfórico (85% p/p, Merck, Darmstadt, Alemania), ácido fórmico (85% p/p) y ácido acético glacial (Anedra, Argentina), hidróxido de potasio (Analar, Poole, Inglaterra), hidróxido de amonio (29% p/p), isopropanol y etanol anhidro (Carlo Erba, Cornaredo, Italia), tetrahidrofurano, acetonitrilo y metanol grado HPLC (J. T. Baker, Estado de México, México). Las soluciones fueron preparadas en agua MilliQ<sup>®</sup> (Milli-Q system, Millipore).

### 5.2.2. Equipamiento y materiales

Para la polimerización de los monolitos se utilizó un horno de vacío Fisher Scientific. Para la síntesis *in-situ* de los polímeros monolíticos se emplearon jeringas Darling (Bu Kwang Medical Inc., Korea) de polipropileno de 2,5 mL. La preparación de las mezclas de polimerización se realizó utilizando un baño de ultrasonido modelo 8890 (Cole Parmer, Estados Unidos) y micropipetas Eppendorf (Hamburgo, Alemania). Para el procedimiento de extracción *m*-SPE se utilizó una cámara de vacío Phenomenex de 12 posiciones.

Todos los análisis cromatográficos fueron llevados a cabo utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies (Alemania) serie 1100 equipado con una bomba binaria, un desgasificador, y un compartimiento termostatazador para columna, conteniendo una columna Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 mm x 4,6 mm d.i., y 5  $\mu$ m d.p.) y un detector DAD. Los eluatos de los cartuchos de extracción fueron filtrados con membranas de nylon de 0,45  $\mu$ m.

### 5.2.3. Condiciones cromatográficas

Se empleó un gradiente de elución 50-100% de metanol/buffer fórmico (pH=3,0; 25mM) en 22,5 min, a un flujo de 0,9 mL min<sup>-1</sup>. La detección de los analitos se realizó empleando un detector DAD. Las longitudes de onda seleccionadas fueron: 280 nm para suprofenos, indoprofenos y fenbufenos; 220 nm para naproxeno, fenoprofenos e ibuprofenos; y 254 nm para el flurbiprofeno. La identidad de los picos fue confirmada mediante los tiempos de retención de los estándares puros de los 7 AINEs estudiados y a partir de la comparación de los espectros UV de una librería de espectros creada utilizando dichos patrones.

### 5.2.4. Preparación de soluciones stock y estándares en agua

Se prepararon soluciones stock de, aproximadamente 0,600 mg mL<sup>-1</sup> dependiendo del analito, mediante pesada directa y dilución en metanol. Posteriormente, se preparó a partir de estas soluciones una solución standard conteniendo los 7 AINEs en concentración de 0,1 mg mL<sup>-1</sup>. Estas soluciones se conservaron en frascos color caramelo a 4°C hasta su utilización. Su estabilidad fue controlada al momento de su utilización comparando las áreas de los picos cromatográficos con las áreas de la solución inicial.

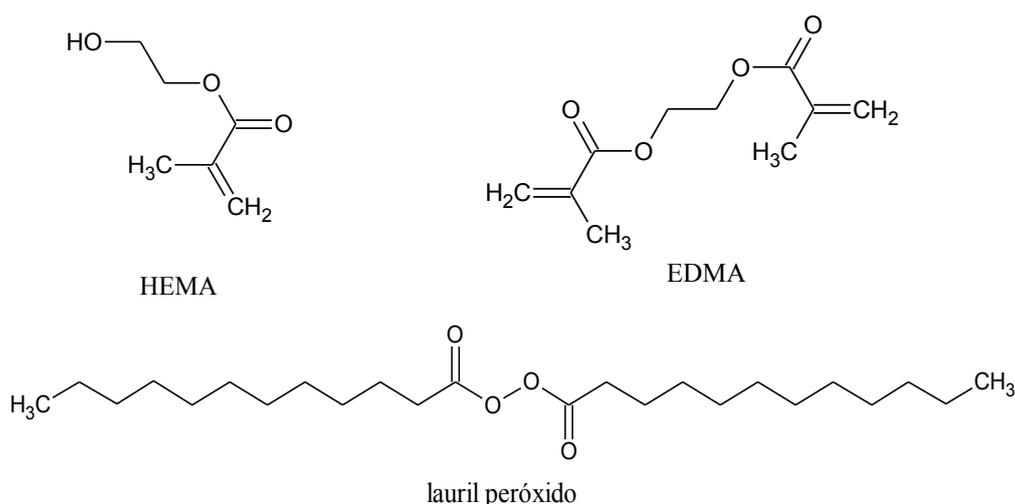
### 5.2.5. Muestreo y preparación de las muestras

Para el presente estudio, las muestras de agua fueron recolectadas en botellas de vidrio color ámbar con tapa a rosca desde dos arroyos ubicados en zonas aledañas a la ciudad de La Plata (se detalla más adelante la ubicación). Se almacenaron en heladera a 4 °C y se filtraron empleando filtros de celulosa de 0,45 µm previo a su uso.

### 5.2.6. Mezcla de polimerización

La mezcla de polimerización para la fabricación de las fases monolíticas poliméricas se seleccionó considerando la polaridad de los analitos a retener, por lo que como monómero funcional polar se eligió al metacrilato de 1-hidroxietilo (HEMA), como entrecruzante al metacrilato de etilenglicol (EDMA), como agente formador de poros (solvente porogénico) se utilizó una mezcla de 1-dodecanol y ciclohexanol, y como iniciador radicalario al lauril peróxido (LPO). Las estructuras los monómeros y el iniciador se muestran en la Figura 19.

Teniendo en cuenta metodologías de preparación de literatura<sup>1,2</sup> se prepararon mezclas con una composición fija de 40 %p/p de la mezcla de monómeros (24%p/p de HEMA, y 16 %p/p de EDMA), 60 %p/p de mezcla porogénica (40 %p/p de 1-dodecanol y 20 %p/p de ciclohexanol) y 0,3%p/p de LPO (con respecto a los monómeros) . Después de su preparación, la mezcla se sonicó durante 10 min y luego se burbujeó con N<sub>2</sub> durante otros 5 min, de manera de eliminar el O<sub>2</sub> disuelto.

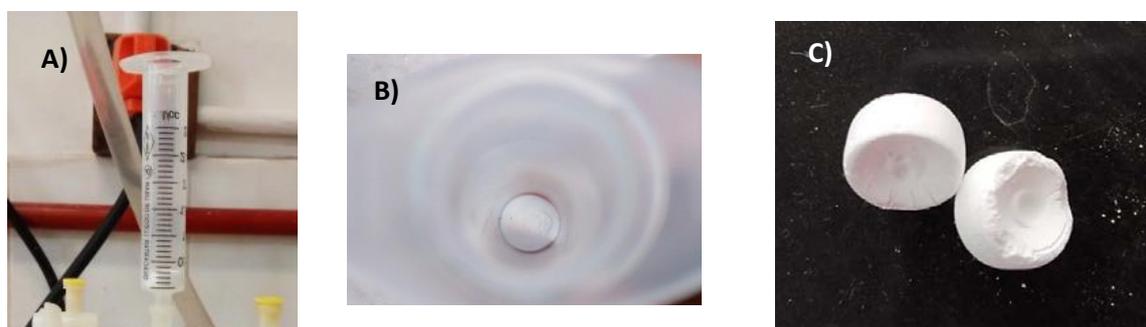


**Figura 19.** Estructuras de los componentes utilizados para preparar las mezclas de polimerización.

### 5.2.7. Síntesis de los polímeros monolíticos

Los polímeros monolíticos de poli(HEMA-*co*-EDMA) se sintetizaron dentro de jeringas de polipropileno de 2,5 mL. El volumen de mezcla de polimerización utilizado fue de 350  $\mu$ L, medido con micropipeta Eppendorf. Se decidió elegir este pequeño volumen para obtener un monolito de bajo espesor que permita el pasaje de volúmenes relativamente grandes de las muestras acuosas en el menor tiempo posible. Después de colocar la mezcla de polimerización en la jeringa, se tapó el orificio inferior con un tapón de parafina (Parafilm). La polimerización se llevó a cabo por iniciación térmica dentro de un horno a 70 °C durante 24 h. Los monolitos de poli(HEMA-*co*-EDMA) formados se lavaron con metanol y agua utilizando la cámara de vacío para extracción en fase sólida, de manera de eliminar de los poros todo el solvente porogénico y restos de monómero que no reaccionaron. También se probó lavar los polímeros mediante un método más exhaustivo (pero más tedioso), como fue la extracción mediante Soxhlet. Sin embargo, no se encontraron diferencias en cuanto a la eficiencia de extracción entre ambos métodos, por lo que se decidió emplear la cámara de vacío en la técnica de lavado.

En la Figura 20 se pueden ver fotografías del cartucho de extracción y los monolitos formados.



**Figura 20.** A) jeringa SPE de polipropileno conteniendo el monolítico polimérico de poli(HEMA-*co*-EDMA); B) vista superior de la jeringa. C) fase sólida monolítica extraída del cartucho.

## 5.3. Resultados y discusiones

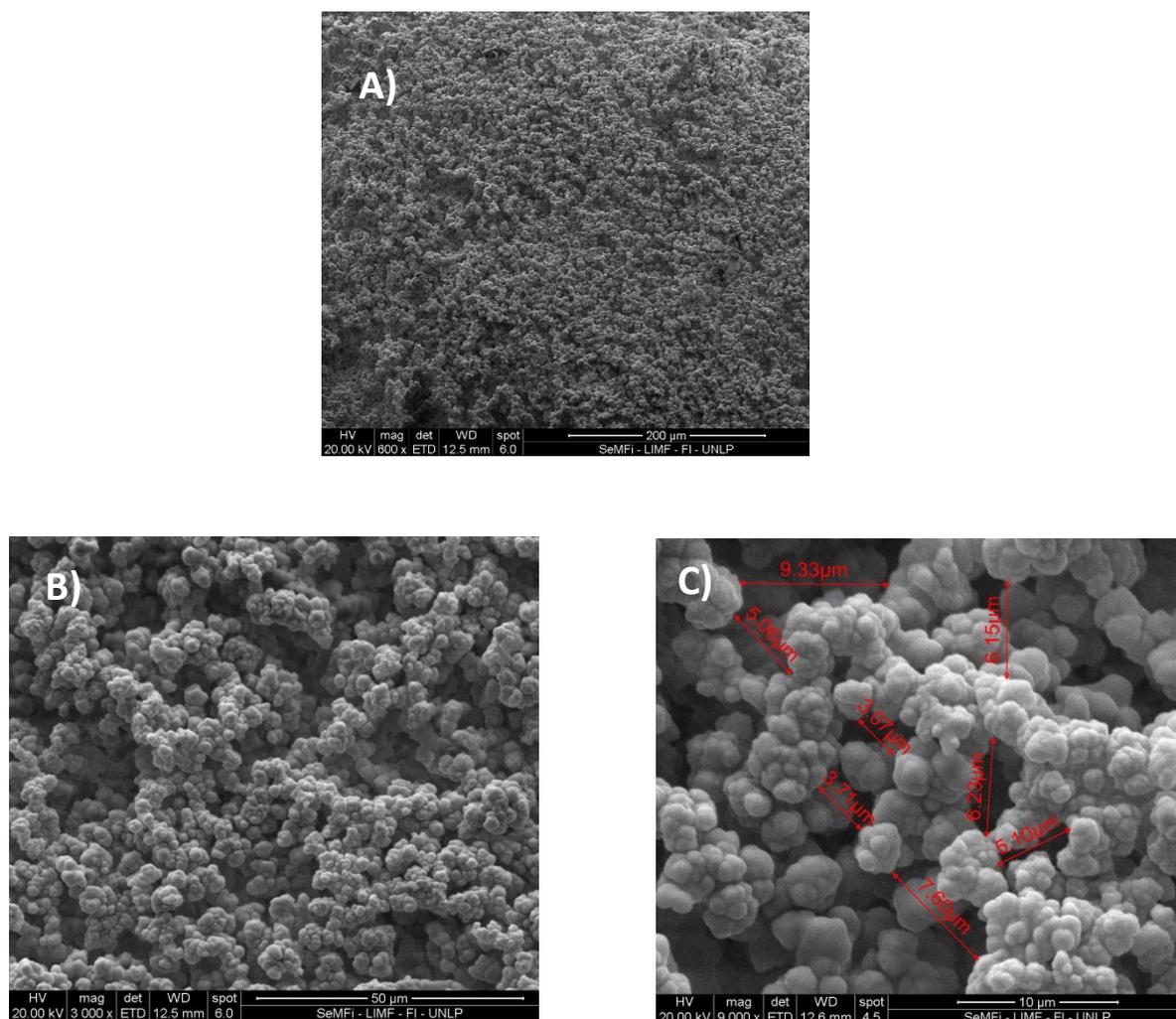
### 5.3.1. Caracterización de los polímeros orgánicos

Para la caracterización física de los monolitos obtenidos (morfología, área superficial, volumen y tamaño de poro) los mismos se extrajeron directamente desde las jeringas donde se sintetizaron, ya

que el monolito en estas condiciones no queda adherido a las paredes de las mismas, dado que su volumen se contrae (Figura 20 C). Esta característica del monolito no afectó el procedimiento de extracción debido a que cuando el polímero se solvata (por agregado de solvente o agua) se hincha ocupando todo el diámetro de la jeringa, e impidiendo que la muestra líquida agregada fluya por las paredes del lecho. Esto se comprueba, dado que dicha muestra no fluye por gravedad a través del lecho monolítico, salvo que se aplique vacío.

### 5.3.1.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis de la morfología de los polímeros se realizó mediante SEM, para verificar la correcta formación del polímero poroso. El monolito formado se seccionó en dos partes, para realizar los análisis sobre la sección transversal de ambas secciones, y en distintas zonas de las mismas. Dado que se trata de un polímero no conductor, para la técnica fue necesario cubrir una parte de la superficie con una fina capa de oro. Los análisis se realizaron con aumentos de 400, 600, 3000, 6000 y 9000X. En la Figura 21 se puede ver una fotografía de una de esas zonas de la superficie monolítica, la cual poseía las mismas características que las otras zonas observadas. Se puede ver la estructura porosa con la típica formación de “clusters” o racimos de agregados que se forman en este tipo de polímeros, con diferentes tamaños de poros, los *macroporos* de aproximadamente entre 3 y 10  $\mu\text{m}$ , y *mesoporos* que corresponden, en el caso de monolitos poliméricos orgánicos, a poros de tamaño menor a 1  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio<sup>3</sup>. Estos polímeros no forman *microporos*, como se verá en la sección siguiente, los que sí aparecen en el caso de polímeros monolíticos de sílice, con tamaños aproximados a 1 o 2 nm. El tamaño de los macroporos se puede observar directamente desde la micrografía SEM, mientras que el de los meso y microporos sólo se puede determinar mediante porosimetría de intrusión de mercurio (MIP) y BET<sup>2</sup>. Los *macroporos* permiten el flujo convectivo de la muestra líquida y le otorgan al material una permeabilidad adecuada para el pasaje de muestras en cortos tiempos de análisis, tal como ocurre con el empleo de estos polímeros como fases estacionarias en HPLC. Por otra parte, los *mesoporos*, que son los que contribuyen de manera predominante al área superficial total, permiten rápidos equilibrios de adsorción-desorción de la muestra, es decir, son los responsables de la retención. En este capítulo de Tesis, se pretenden los mismos objetivos que en HPLC, es decir, suficiente permeabilidad del lecho para la rápida elución de las muestras y alta área superficial para una eficiente retención de los analitos, pero en este caso, empleados como “fase estacionaria” o relleno en cartuchos de extracción para SPE. Dado que la fase a emplear será utilizada por primera vez en SPE, a la metodología se la denominó “*m-SPE*”.



**Figura 21.** Imágenes de microscopía SEM con diferentes grados de aumento: **A)** 600X, **B)** 3000X, **C)** 9000X, del polímero monolítico sintetizado en jeringa.

### 5.3.1.2. Isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno (BET).

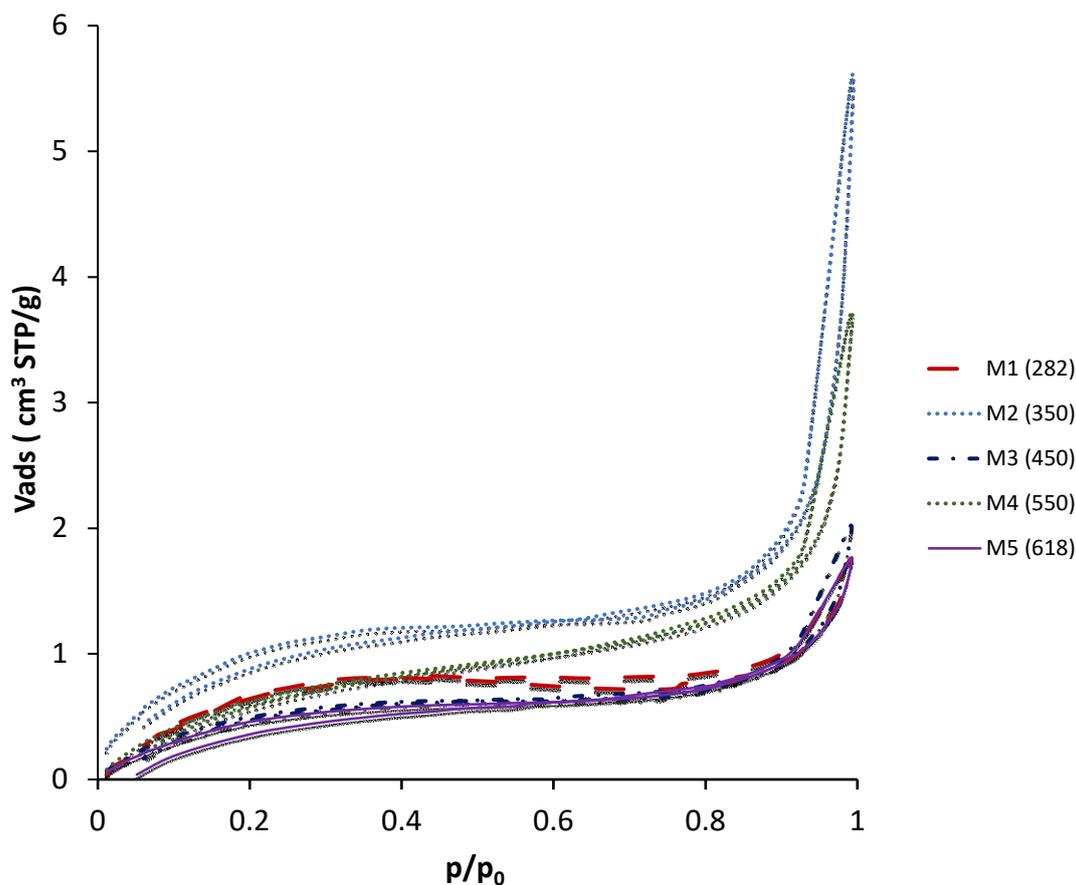
La caracterización morfológica a partir de la técnica de adsorción-desorción de nitrógeno también se realizó sobre los monolitos sintetizados dentro de jeringas. En este caso, se evaluaron las características morfológicas de 5 cartuchos preparados utilizando distintas cantidades de mezcla polimérica: 282, 350, 450, 550 y 618  $\mu\text{L}$ . Estos volúmenes fueron seleccionados por el diseño de experimentos, DCC, que se realizó la etapa de optimización de las variables experimentales de la técnica *m*-SPE como se verá más adelante. Mayores cantidades de mezcla de polimerización obviamente permitirían obtener mayor cantidad de fase sólida dentro del cartucho, lo cual se traduciría en factores de enriquecimiento, FE, más altos. Sin embargo, volúmenes mayores a 700  $\mu\text{L}$

mostraron problemas de homogeneidad en la polimerización obtenida, y si el volumen es demasiado grande la mezcla no polimeriza, salvo que se adecuen factores tales como volumen de solvente porogénico, temperatura de polimerización, o el cambio del tipo de monómeros o del iniciador radicalario. El cambio de estas variables sobre la eficiencia de polimerización no fue estudiado en la presente Tesis.

En la Figura 22 se muestran las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las diferentes muestras estudiadas. Se observa que las formas de las isotermas son similares entre sí, lo que permite concluir que en todos los casos se lograron sintetizar monolitos morfológicamente reproducibles. Como se esperaba, no se observa la formación de microporos, los cuales, en caso de aparecer, se detectarían a bajos valores de presión relativa de gas,  $P/P_0$ , mediante una curva de pendiente inicial muy pronunciada. Las isotermas obtenidas son del “Tipo IV” (ver Sección 2.5.3.2), características de materiales sólidos de baja porosidad relativa, con presencia predominante de *mesoporos* en el rango de 2-50 nm y ausencia de microporos<sup>4</sup>. Estas isotermas alcanzan un “plateau” cuando se llenan los mesoporos de nitrógeno en la etapa de adsorción, o cuando comienzan a vaciarse en la etapa de desorción. La capacidad del mesoporo está dada por la cantidad adsorbida de nitrógeno en la zona de la meseta, y mediante esta técnica el volumen de nitrógeno adsorbido permite determinar el área superficial,  $S_g$ , y el volumen de los mesoporos,  $V_p$ , a través de un modelo matemático apropiado (Sección 2.5.3.2).

En la Tabla 10 se detallan las características morfológicas de los monolitos analizados, fabricados con distinto volumen de mezcla polimérica. El área superficial,  $S_g$ , se determinó mediante el método BET (Brauner, Emmett, Teller) y el tamaño de poro mediante el método BJH (Barret, Joyner y Halenda). Los valores de  $S_g$  obtenidos corresponden a monolitos poliméricos orgánicos típicos<sup>5</sup>, los cuales no superan las pocas decenas de  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ . El área superficial promedio fue de  $3,2 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$ . Esta área superficial se podría aumentar disminuyendo el volumen de solvente porogénico utilizado, obteniéndose mayor cantidad de mesoporos y menor cantidad de macroporos, pero la permeabilidad del lecho disminuiría y el pasaje de las muestras acuosas se tornaría demasiado tedioso. Se observa en la Tabla 10 que, mientras los poros formados permanecen con un tamaño promedio ( $V_p$ ) que oscila alrededor de  $3,6 \mu\text{L} \text{gr}^{-1}$  de muestra, el área superficial,  $S_g$ , disminuye a medida que aumenta el volumen de mezcla de polimerización. La explicación para este resultado podría atribuirse a cambios en el grado de polimerización (% de conversión). Haciendo una analogía con el estudio del efecto en la distribución de poros en función de la temperatura de monolitos de metacrilato realizado por J.M.J Fréchet *et al.*<sup>3</sup> se puede realizar la siguiente interpretación: a mayores volúmenes de mezcla, la transferencia de calor durante el proceso de polimerización es menos eficiente, con la consecuente disminución en la cantidad de radicales del iniciador (LPO) generada. Esto disminuye el número de

núcleos de polimerización formados, lo cual produce racimos o “clusters” de polímero más grandes y, por lo tanto, poros más grandes, disminuyendo así el área superficial del monolito formado. Cabe destacar que el tamaño de poro mostrado en Tabla 10 corresponde a un promedio de la distribución total de los diferentes tamaños obtenidos para cada monolito, pero claramente se observa que a partir de 350  $\mu\text{L}$  de mezcla de polimerización utilizada, el tamaño de poros aumenta.



**Figura 22.** Isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno para los diferentes monolitos poliméricos estudiados. (se grafica el volumen de gas adsorbido por unidad de masa de monolito vs. la presión relativa del gas,  $p/p_0$ , con  $p$  = presión del gas en equilibrio y  $p_0$  = presión de saturación). M1 a M5 son las distintas muestras analizadas. Entre paréntesis se indican los volúmenes en  $\mu\text{L}$  de cada mezcla polimerizada.

**Tabla 10.** Propiedades morfológicas obtenidas mediante la técnica de adsorción-desorción de nitrógeno para los monolitos fabricados a partir de distintos volúmenes de mezcla de polimerización.

volumen de mezcla [ $\mu\text{L}$ ]	$S_g$ [ $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ ] <sup>a</sup>	$V_p$ [ $\text{mL g}^{-1}$ ] <sup>b</sup>	tamaño de poro [ $\text{nm}$ ] <sup>c</sup>
282	4.49	0.00167	2.27
350	4.07	0.00730	7.35
450	2.34	0.00237	4.81
550	2.98	0.00487	6.76
618	2.29	0.00206	4.41

<sup>a</sup>  $S_g$  (área específica calculada con BET);

<sup>b</sup>  $V_p$  (volumen de poro acumulativo de adsorción por el método BJH)

<sup>c</sup> (tamaño de poro calculado como  $4V/A$  por el método de BET)

Estos resultados fueron tenidos en cuenta en la etapa de optimización, ya que la cantidad de polímero en el cartucho que se seleccione debe contener la mayor área superficial posible para poder retener eficientemente los analitos, pero con el mayor volumen de poro para que se pueda eluir la mayor cantidad de muestra en el menor tiempo posible. Para los ensayos siguientes se seleccionó un volumen de mezcla de compromiso, el cual fue de 350  $\mu\text{L}$ . Sin embargo, este volumen no es el que resultará óptimo para los estudios de recuperación de todos los analitos, de acuerdo al diseño estadístico de experimentos que se realiza más adelante.

### 5.3.2. Estudio de reproducibilidad entre cartuchos de extracción

Los monolitos de poli(HEMA-*co*-EDMA) sintetizados se utilizaron para la extracción de 7 AINEs desde muestras acuosas: Suprofeno (Supro), Indoprofeno (Indo), Naproxeno (Napro), Fenbufeno (Fenbu), Fenoprofeno (Feno), Flurbiprofeno (Flurbi), e Ibuprofeno (Ibu). Como etapas previas a la validación del método, se realizaron estudios de reproducibilidad entre jeringas preparadas con 350  $\mu\text{L}$  de la mezcla de polimerización y se optimizaron los parámetros de extracción. Para ello, se prepararon soluciones de los diferentes AINEs ( $200 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en buffer de fosfórico/fosfato de  $\text{pH}=2,15$  (0,016M). Para todos los ensayos se utilizó un volumen constante de 25,00 mL de solución acuosa. Las etapas iniciales de los ensayos de extracción fueron las siguientes:

- acondicionamiento del cartucho con 3,00 mL de metanol.
- siembra de la muestra: 25,00 mL a 0,35 mL min<sup>-1</sup>
- lavado con 0,5 mL de agua MilliQ
- elución con 1,00 mL de metanol.

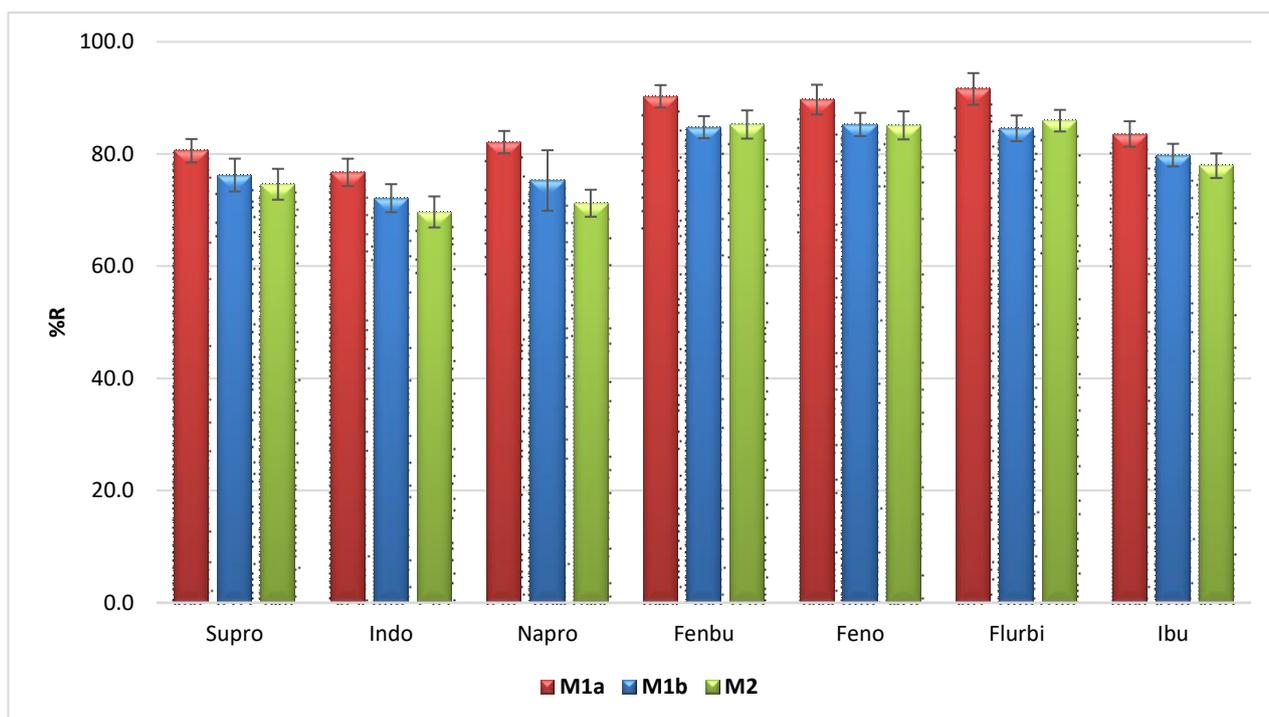
Algunas de estas condiciones fueron modificadas posteriormente de acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de optimización.

Para el análisis de reproducibilidad entre cartuchos se seleccionaron 3 cartuchos y se llenaron con una mezcla preparada con el mismo porcentaje nominal de monómero/porógeno mencionado en la Sección 5.2.6. Dos de dichos cartuchos se llenaron con una mezcla preparada el mismo día (M<sub>1a</sub>, M<sub>1b</sub>), y la segunda, M<sub>2</sub>, con una mezcla preparada en diferente día, lo cual resultó con una composición levemente diferente, dada la pesada de muy pequeñas cantidades de monómero.

En la Figura 23 se observa el gráfico correspondiente a la recuperación porcentual, R%, para cada analito en cada una de las tres fases sólidas evaluadas (M<sub>1a</sub>, M<sub>1b</sub> y M<sub>2</sub>), calculado como el promedio de tres extracciones para cada una. La R% se calculó a partir de la ecuación 18 (Sección 3.1.3.6), donde la cantidad de analito en las fases extractante (n<sub>Af</sub>) e inicial (n<sub>Ai</sub>) corresponden en este caso, a las áreas cromatográficas obtenidas a partir de inyecciones idénticas del solvente de elución (metanol) y de la fase acuosa inicial, A<sub>org</sub> y A<sub>sc ac</sub>, respectivamente (ecuación 30).

$$R\% = \frac{A_{org}}{A_{sc ac}} \cdot 100 \quad (\text{Ec. 30})$$

Se obtuvieron valores promedio de R% entre 73 y 87%, dependiendo del analito. Las *repetibilidades* para cada cartucho reflejadas en las barras de error (3 extracciones diferentes) tuvieron valores entre 2 y 7%, mientras que las *reproducibilidades* (SD%) entre las distintas fases monolíticas ensayadas (Tabla 11) oscilaron entre el 4 y 7%. Para comprobar estadísticamente estos resultados se realizó un “test de comparación de medias” mediante un ANOVA, y se comprobó que *no existen diferencias significativas entre las fases sólidas monolíticas*, con un  $\alpha=0,05$ . Con estos resultados se puede concluir que tanto las recuperaciones obtenidas, como la repetibilidad y la reproducibilidad entre jeringas son muy aceptables y que estas nuevas fases son robustas y pueden emplearse para extracción en fase sólida para extraer eficientemente AINEs desde muestras acuosas.



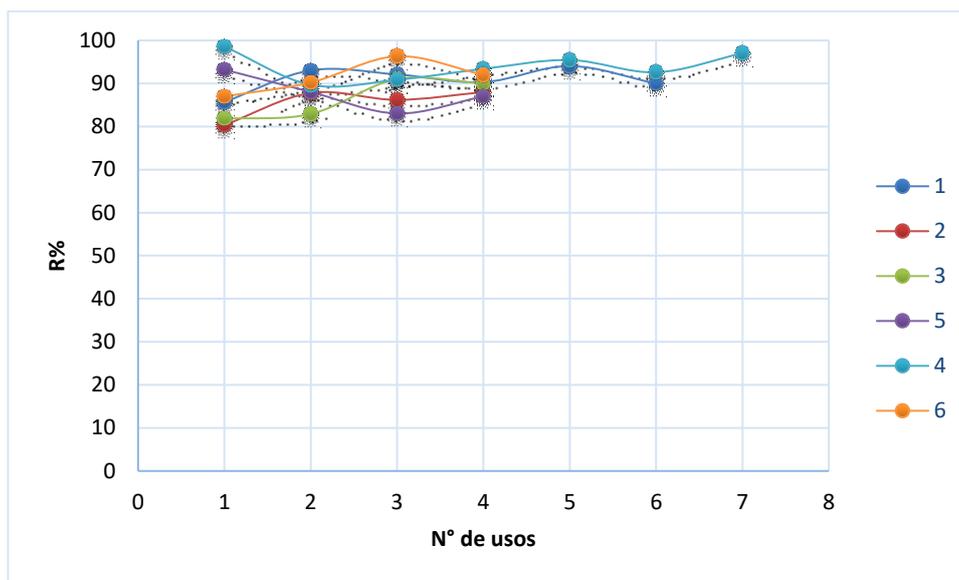
**Figura 23.** Recuperaciones (R%), repetibilidad (entre mezclas de igual composición nominal: M<sub>1a</sub>, M<sub>1b</sub> y M<sub>2</sub>) y reproducibilidad (SD% indicada en las barras de error) para los distintos AINEs estudiados.

**Tabla 11.** Reproducibilidad (SD%) de la recuperación promedio (R%) entre cartuchos preparados independientemente.

R promedio%	SD %
77	5
73	7
76	6
87	7
87	6
87	4
80	7

Los cartuchos SPE con fases estacionarias comerciales generalmente se utilizan una sola vez, sobre todo con muestras muy complejas, dado que usos posteriores disminuyen la recuperación y/o producen la elución de interferentes ocluidos en el lecho o en los “frits” de retención. Por lo tanto, se ensayó en muestras de agua pura la posibilidad de reutilización de estas nuevas fases sólidas. Para ello el método *m*-SPE optimizado se aplicó entre 4-7 veces por cartucho, en las mismas condiciones experimentales cada vez. Se observa en la Figura 24 que la recuperación de 6 cartuchos estudiados se

mantiene aproximadamente constante (considerando las SD%) con la reutilización de al menos 4 veces (o 6 veces) dependiendo del cartucho. En este caso se grafica la R% de uno de los 7 AINEs utilizados para el estudio (Fenbu), sin embargo, el comportamiento es muy similar para todos ellos. Por esto podemos concluir que los cartuchos se podrían emplear al menos 6 veces, con muestras “limpias”.



**Figura 24.** Recuperaciones obtenidas para Fenbu en 6 cartuchos de *m*-SPE distintos, utilizados entre 4 y 7 veces por cartucho.

### 5.3.3. Selección del solvente de elución

Como solventes de elución se ensayaron: metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), tetrahidrofurano (THF), etanol (EtOH) y buffer de amonio/amoniaco de pH=8 (0,1 M). A este último valor de pH los analitos están ionizados y, por lo tanto, podrían en principio, eluir de la fase estacionaria. Para cada solvente el ensayo se realizó por *triplicado*, y para cada una de las réplicas se utilizaron cartuchos *distintos*. Se empleó 1,00 mL de solvente de elución. Un volumen menor podría aumentar el factor de enriquecimiento, FE, pero este fue el mínimo volumen que se pudo medir con precisión en matraz. Tampoco fue necesario utilizar un volumen mayor, ya que al aumentarlo no aumentaba considerablemente la recuperación y si disminuía el FE. Es por esto que no se consideró al volumen del eluyente en la etapa de optimización DCC de la Sección siguiente (5.3.4). En Tabla 12 se muestran las recuperaciones promedio obtenidas para cada solvente. Los valores oscilaron entre 55,4 y 97,5 %,

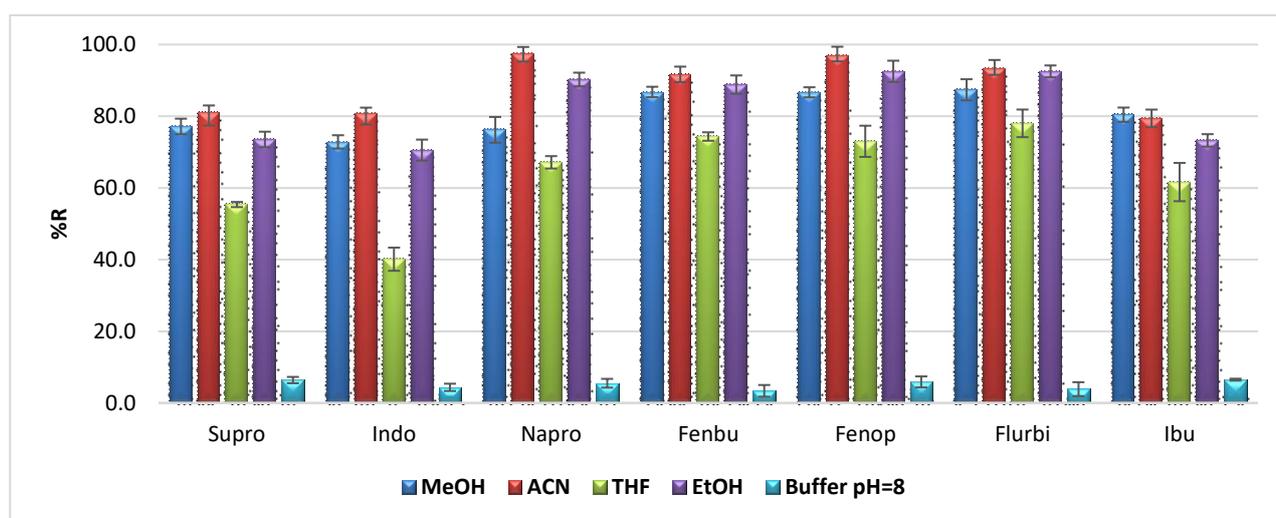
excepto para el buffer sin solvente orgánico, para el cual las recuperaciones fueron muy bajas, lo que permite concluir que, aunque los analitos están ionizados a este pH, las interacciones dispersivas y dipolares con la fase monolítica son fuertes, impidiendo una eficiente elución. Los valores de R% más altos se obtuvieron para ACN como solvente de elución, para la mayoría de los analitos, por lo que este solvente fue el que se utilizó en los posteriores ensayos.

**Tabla 12.** Valores de %R para diferentes solventes de elución utilizados\*.

Solvente	Supro	Indo	Napro	Fenbu	Feno	Flurbi	Ibu
ACN	81,1 <sup>a</sup>	80,8 <sup>a</sup>	97,5 <sup>a</sup>	91,6 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>	93,3 <sup>a</sup>	80,4 <sup>a</sup>
MeOH	77,1 <sup>a,b</sup>	72,8 <sup>a,b</sup>	90,3 <sup>b</sup>	88,8 <sup>a</sup>	92,5 <sup>a,b</sup>	92,5 <sup>a</sup>	79,5 <sup>a</sup>
EtOH	73,5 <sup>b</sup>	70,5 <sup>b</sup>	76,2 <sup>c</sup>	86,8 <sup>a</sup>	86,7 <sup>b</sup>	87,4 <sup>a</sup>	73,3 <sup>a</sup>
THF	55,4 <sup>c</sup>	40,1 <sup>c</sup>	67,1 <sup>d</sup>	74,4 <sup>b</sup>	73 <sup>c</sup>	78 <sup>b</sup>	61,6 <sup>b</sup>
Buffer pH=8	6,4 <sup>d</sup>	4,4 <sup>d</sup>	5,5 <sup>e</sup>	3,4 <sup>c</sup>	5,9 <sup>d</sup>	3,9 <sup>c</sup>	6,5 <sup>c</sup>

\*Idénticos superíndices indican si los valores pueden considerarse estadísticamente iguales entre sí. Distintos superíndices significan que los valores difieren estadísticamente.

En la Figura 25 se muestran gráficamente los resultados de Tabla 12 para cada solvente y las SD% se muestran en las respectivas barras de error. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante un ANAVA con un  $\alpha=0,05$ , y la comparación de las medias se realizó mediante el test LSD de Fisher, también con un  $\alpha=0,05$ . Para todos los solventes de elución se obtuvieron muy buenas reproducibilidades, con valores de SD%, que oscilan entre 1 y 7%, aunque para el THF oscilaron entre 1 y 11%.



**Figura 25.** Valores de %R de los diferentes NAIDs para los diferentes solventes de elución utilizados.

### 5.3.4. Diseño central compuesto

La optimización de las variables experimentales que se consideraron más importantes para el proceso de extracción de los analitos en los cartuchos con fases monolíticas poliméricas, se realizó mediante un diseño central compuesto (DCC). Los factores que se decidieron optimizar mediante este diseño experimental fueron los habituales en extracciones del tipo SPE: 1) *cantidad de fase sólida*, en este caso, reflejada a través del volumen de mezcla de polimerización utilizado en la síntesis, “*V mezcla*”, dado que este factor impactará en la recuperación, R% y tiempo de análisis; 2) *pH* de la solución acuosa que contiene a los analitos, ya que se trata de analitos ionizables; y 3) *flujo de carga de la muestra*, *F*, porque si el flujo es muy alto, la interacción de los analitos con el polímero puede no ser la adecuada, mientras que si es muy bajo el procedimiento se torna tedioso.

Para la optimización de estas variables se construyó un DCC completo, con seis puntos centrales, y un  $\alpha$  de 1,68 (calculado como la raíz cuadrada de los puntos factoriales, de manera de tener un diseño rotatable, ver sección 3.2.1), lo que resulta en un diseño de 20 experimentos en total. Los rangos utilizados para cada variable experimental estudiados se muestran en la Tabla 13.

Las respuestas seleccionadas para optimizar en el diseño fueron las recuperaciones de los analitos, R%.

**Tabla 13.** Niveles y factores elegidos en el DCC.

Factor	$-\alpha$	$-1$	$0$	$+1$	$+\alpha$
V mezcla ( $\mu\text{L}$ )	282	350	450	550	618
pH	2,15	2,70	3,50	4,30	4,85
F ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,33	0,50	0,75	1,00	1,17

Una vez construido el diseño se rellenaron los cartuchos utilizando los distintos volúmenes de mezcla polimérica resultando en cartuchos con distinta cantidad de sorbente (Figura 26).



**Figura 26.** Fotografía de las jeringas m-SPE con distintas cantidades de polímero monolítico.

### 5.3.4.1. Experimentos y respuestas

La Tabla 14 muestra las combinaciones obtenidas con las 3 variables experimentales, las cuales originaron 20 ensayos en total (señalados en la tabla como N° de ensayo). En la tabla también se muestran las respuestas para cada una de esas condiciones experimentales, siendo dichas respuestas las recuperaciones (R%) obtenidas para todos los analitos en cada ensayo (R% supro; R% indo; R% napro; R% fenbu; R% feno; R% flurbi; y R% ibu). Estos ensayos fueron realizados en un orden aleatorio determinado por el programa Design Expert.

Los resultados obtenidos mediante el DCC se utilizaron para obtener ecuaciones que representen la relación entre las observaciones obtenidas y las variables utilizadas en el diseño. Para esto se construyeron modelos polinómicos. El orden de estas funciones depende de qué modelo represente mejor a las respuestas (primer o segundo orden para este tipo de diseños). Para la determinación de estos modelos también se utilizó el software Design Expert. En estos modelos, los coeficientes se calcularon por regresión múltiple a partir de la estrategia de eliminación por retroceso, la cual consiste en construir inicialmente un modelo completo y evaluar posteriormente a partir de un ANOVA cada uno de los términos obtenidos en la ecuación. Cada uno de estos términos se van eliminando de a uno, en caso de que no resulten significativos, con un  $\alpha=0,01$ , obteniendo finalmente ecuaciones que mejor representen a las respuestas en función de las variables significativas. Las expresiones semiempíricas obtenidas de R% vs. las variables experimentales para los siete AINEs estudiados se muestran en las Ecuaciones 31-37.

$$\begin{aligned}
 R\%_{Supro} = & -55,35 + 0,43 \cdot V_{mezcla} + 33,38 \cdot pH - 47,57 \cdot F - 7,15 \cdot 10^{-4} \cdot V_{mezcla}^2 \\
 & - 11,78 \cdot pH^2 - 20,22 \cdot F^2 + 0,060 \cdot V_{mezcla} \cdot pH + 0,090 \cdot V_{mezcla} \cdot F + 13,89 \cdot pH \cdot F
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 31}$$

$$\begin{aligned}
 R\%_{Indo} = & -55,24 + 0,42 \cdot V_{mezcla} + 35,90 \cdot pH - 62,47 \cdot F - 6,94 \cdot 10^{-4} \cdot V_{mezcla}^2 \\
 & - 11,36 \cdot pH^2 + 0,057 \cdot V_{mezcla} \cdot pH + 0,087 \cdot V_{mezcla} \cdot F + 10,07 \cdot pH \cdot F
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 32}$$

$$\begin{aligned}
 R\%_{Napro} = & -127,09 + 0,69.V_{mezcla} + 44,97.pH - 30,87.F - 9,24.10^{-4}.V_{mezcla}^2 \\
 & -12,26.pH^2 + 0,051.V_{mezcla}.pH + 12,82.pH.F
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 33}$$

$$\begin{aligned}
 R\%_{Fenbu} = & 49,72 + 0,18.V_{mezcla} + 2,19.pH - 3,88.10^{-4}.V_{mezcla}^2 - 4,82.pH^2
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 34}$$

$$\begin{aligned}
 R\%_{Feno} = & -32,30 + 0,43.V_{mezcla} + 22,84.pH - 36,87.F - 6,64.10^{-4}.V_{mezcla}^2 - 9,21.pH^2 \\
 & + 0,055.V_{mezcla}.pH + 13,45.pH.F
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 35}$$

$$\begin{aligned}
 R\%_{Flurbi} = & 66,82 + 0,12.V_{mezcla} - 2,92.pH + 4,56.F - 3,46.10^{-4}.V_{mezcla}^2 - 5,87.pH^2 + \\
 & -28,87.F^2 + 0,063.V_{mezcla}.pH + 13,17.pH.F
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 36}$$

$$\begin{aligned}
 R\%_{Ibu} = & -178,69 + 0,64.V_{mezcla} + 49,14.pH - 96,77.F - 6,64.10^{-4}.V_{mezcla}^2 - 8,48.pH^2 - \\
 & 62,83.F^2
 \end{aligned}
 \tag{Ec. 37}$$

Tabla 14. Ensayos y respuestas (R%) obtenidos para el DCC

Ensayo	V <sub>mezcla</sub> ( $\mu\text{L}$ )	pH	F (mL min <sup>-1</sup> )	R% <sub>osupro</sub>	R% <sub>oindo</sub>	R% <sub>onapro</sub>	R% <sub>ofenbu</sub>	R% <sub>ofeno</sub>	R% <sub>oflurbi</sub>	R% <sub>oibu</sub>
1	450	3,50	0,75	78,0	77,2	93,1	89,7	90,1	87,6	84,1
2	450	4,85	0,75	40,8	40,5	61,9	79,8	65,4	70,8	52,6
3	550	4,30	0,50	60,7	60,4	73,1	81,0	72,5	77,6	61,9
4	450	3,50	0,75	80,9	80,5	100,0	90,9	93,8	88,7	86,1
5	450	3,50	0,75	82,3	79,2	95,6	93,4	89,8	85,3	80,2
6	350	4,30	0,50	41,2	42,9	59,8	61,7	58,0	60,1	46,7
7	550	2,70	0,50	72,2	68,8	82,4	83,2	78,7	80,2	71,9
8	450	2,15	0,75	76,7	72,7	87,0	93,0	84,5	86,8	81,8
9	450	3,50	0,75	80,0	75,6	92,9	95,5	88,2	89,2	83,1
10	350	4,30	1,00	49,4	49,9	69,9	73,9	69,4	69,9	52,6
11	550	2,70	1,00	78,2	76,6	87,2	89,7	83,0	84,4	76,5
12	450	3,50	0,75	82,4	78,6	92,5	97,0	91,6	90,5	78,9
13	618	3,50	0,75	70,3	67,8	77,6	86,0	77,0	81,1	71,2
14	450	3,50	0,33	72,7	70,8	92,4	88,7	86,4	82,6	72,2
15	350	2,70	1,00	69,1	68,6	85,3	82,2	82,4	82,0	68,9
16	450	3,50	0,75	80,5	78,8	102,5	92,6	93,5	88,8	75,2
17	282	3,50	0,75	49,4	47,3	63,5	82,3	68,7	78,2	56,3
18	350	2,70	0,50	73,8	72,1	84,5	90,2	83,7	87,1	71,8
19	550	4,30	1,00	76,1	73,7	89,2	92,3	85,7	88,0	65,6
20	450	3,50	1,17	80,4	80,9	101,9	89,6	90,7	86,1	70,6

De las ecuaciones anteriores se observa que para todos los analitos el modelo que mejor explica el comportamiento de la  $R\%$  en función de las variables analizadas, es el cuadrático. Los tres términos lineales,  $V_{mezcla}$ ,  $pH$  y  $F$ , son significativos para todas las respuestas, excepto para el fenbufeno que no tiene como término significativo al flujo de carga de la muestra,  $F$ . Es decir, que para todos los analitos influyen significativamente las 3 variables estudiadas. El comportamiento de la  $R\%$  es similar para casi todos los analitos, lo cual es razonable dado que poseen características químicas similares. Como se trata de compuestos con un grupo *carboxilo*, se encuentra una *fuerte dependencia positiva con el pH*, es decir que a medida que aumenta el pH, aumenta el porcentaje de analito ionizado, y por lo tanto, la retención en el lecho monolítico disminuye (aquí asumimos que predominan las interacciones dispersivas analito-sorbente, dadas las características químicas del lecho monolítico) con la consecuente disminución del  $R\%$ . Por otro lado, la dependencia con el flujo de carga de la muestra,  $F$ , es *grande y negativo*, lo que implica que a mayores velocidades de carga disminuyen los valores de  $R\%$ , comportamiento típico en extracciones de SPE. Esto se debe a que cuanto más rápido fluye la muestra por el cartucho de extracción, menor es el tiempo de contacto de los analitos con el sorbente. La dependencia con el  $V_{mezcla}$  es mucho menor pero igualmente positiva, a mayor cantidad de fase sólida, mayor  $R\%$ . Con respecto a los términos cuadráticos, para casi todas las respuestas son significativos los tres términos, excepto para el indoprofeno, naproxeno y fenbufeno, para los cuales sus valores de  $R\%$  no dependen del  $F^2$ . Sin embargo, el coeficiente  $V_{mezcla}^2$  tiene una magnitud relativa mucho menor a los demás coeficientes.

Las superficies de respuestas, SR, construidas con estos modelos pueden ser exploradas para determinar las condiciones óptimas de extracción. Debido a que en los gráficos de SR se representa la respuesta analizada,  $R\%$ , en función de dos variables a la vez, para algunos de los analitos para los cuales más de dos variables son significativas, se muestra más de una gráfica de SR (Figura 27). Sin embargo, como el problema se compone de más de una respuesta a optimizar, es necesario realizar una optimización simultánea de las respuestas de todos los analitos en función de las variables:  $V_{mezcla}$ ,  $pH$  y  $F$ , de manera que se maximicen las recuperaciones, o al menos se mantengan dentro de rangos deseados (en este caso, con la condición de que sean máximos).

La aproximación utilizada en este caso para la optimización de múltiples respuestas es la popularizada por Derringer y Suich (1990) <sup>6</sup>, la cual hace uso de la función “*deseabilidad*”, como se explica en la Sección 3.2.2. Para optimizar la *función global deseabilidad*,  $D$ , compuesta por las deseabilidades individuales de  $m$  respuestas (ecuación 27, sección 3.2.2),

$$D = (d_1 d_2 \dots d_m)^{1/m} \quad (\text{Ec. 27})$$

se utiliza el software Design-Expert, el cual hace uso de métodos de búsqueda directos para maximizar esta función. Para esto se utilizó como criterio que las respuestas fueran maximizadas con la misma prioridad, y además que los factores a optimizar se encontraran dentro de los rangos seleccionados para realizar el DCC. Mediante el software mencionado, se calcularon varios valores de D, seleccionando el valor 0,951 como una condición de valor máximo (siendo un valor de 1 el valor más deseable). Así, los valores óptimos para las variables fueron los siguientes:

$$V_{mezcla} = 465 \mu\text{L}; pH = 3,15; F = 0,85 \text{ mL min}^{-1}.$$

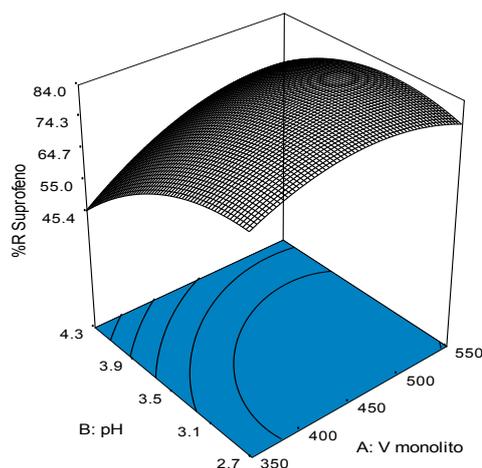
**Figura 27.** Superficies de respuesta (SR), obtenidas mediante el software Design-Expert para los diferentes analitos estudiados.

### Supro

DESIGN-EXPERT Plot

%R Suprofeno  
X = A: V monolito  
Y = B: pH

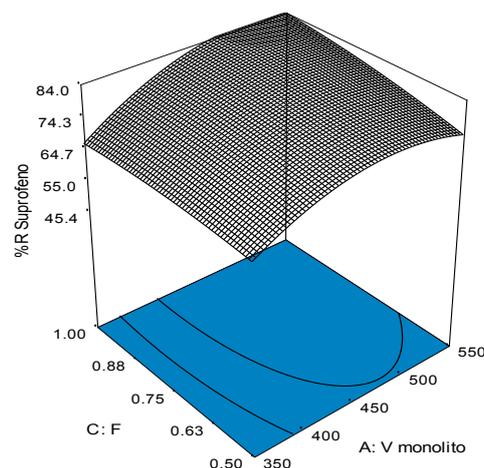
Actual Factor  
C: F = 0.75



DESIGN-EXPERT Plot

%R Suprofeno  
X = A: V monolito  
Y = C: F

Actual Factor  
B: pH = 3.5

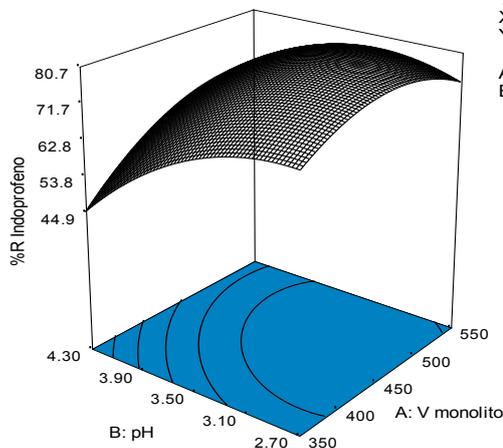


### Indo

DESIGN-EXPERT Plot

%R Indoprofeno  
X = A: V monolito  
Y = B: pH

Actual Factor  
C: F = 0.75



DESIGN-EXPERT Plot

%R Indoprofeno  
X = A: V monolito  
Y = C: F

Actual Factor  
B: pH = 3.50

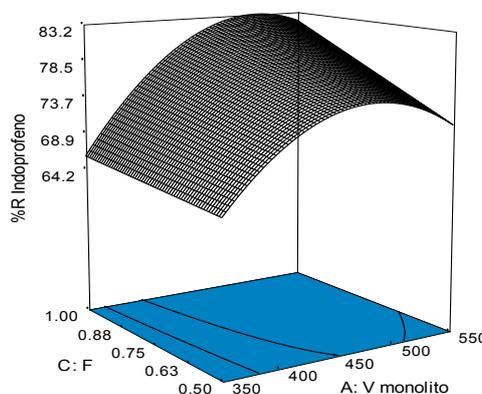


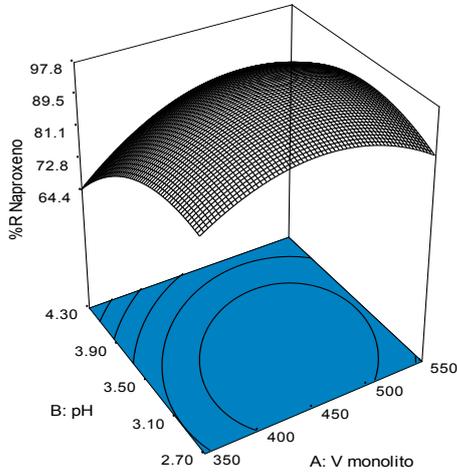
Figura 27: (continuación)

**Napro**

DESIGN-EXPERT Plot

%R Naproxeno  
X = A: V monolito  
Y = B: pH

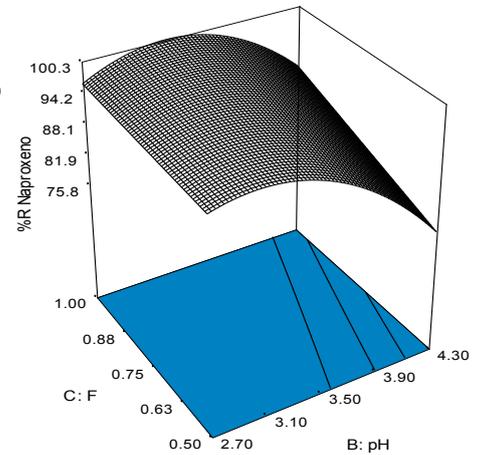
Actual Factor  
C: F = 0.75



DESIGN-EXPERT Plot

%R Naproxeno  
X = B: pH  
Y = C: F

Actual Factor  
A: V monolito = 450

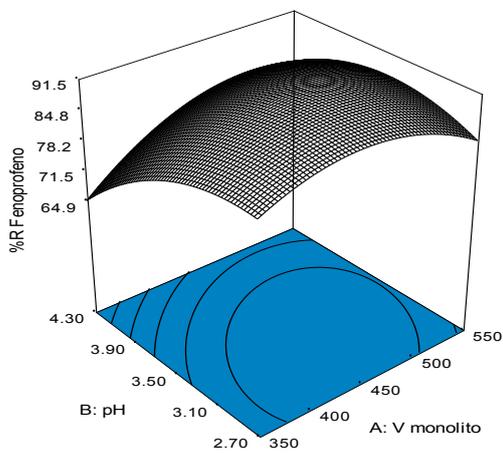


**Feno**

DESIGN-EXPERT Plot

%R Fenoprofeno  
X = A: V monolito  
Y = B: pH

Actual Factor  
C: F = 0.75



DESIGN-EXPERT Plot

%R Fenoprofeno  
X = B: pH  
Y = C: F

Actual Factor  
A: V monolito = 450

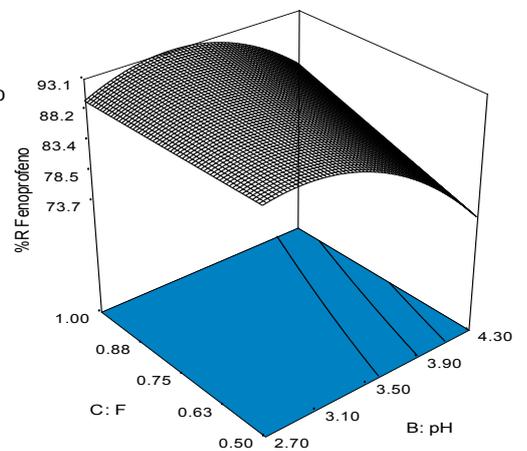


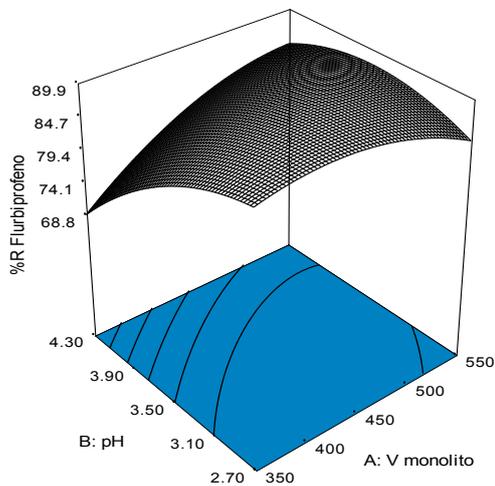
Figura 27: (continuación)

**Flurbi**

DESIGN-EXPERT Plot

%R Flurbiprofeno  
X = A: V monolito  
Y = B: pH

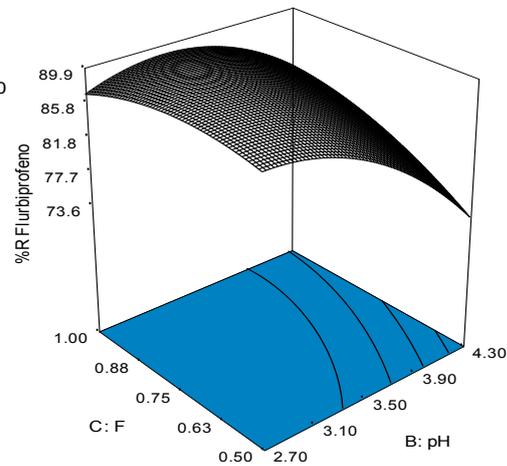
Actual Factor  
C: F = 0.75



DESIGN-EXPERT Plot

%R Flurbiprofeno  
X = B: pH  
Y = C: F

Actual Factor  
A: V monolito = 450

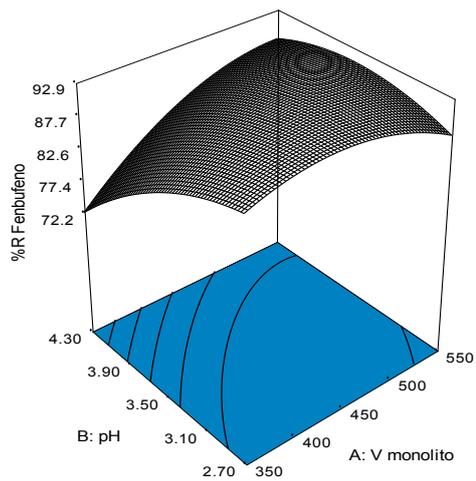


**Fenbu**

DESIGN-EXPERT Plot

%R Fenbufeno  
X = A: V monolito  
Y = B: pH

Actual Factor  
C: F = 0.75

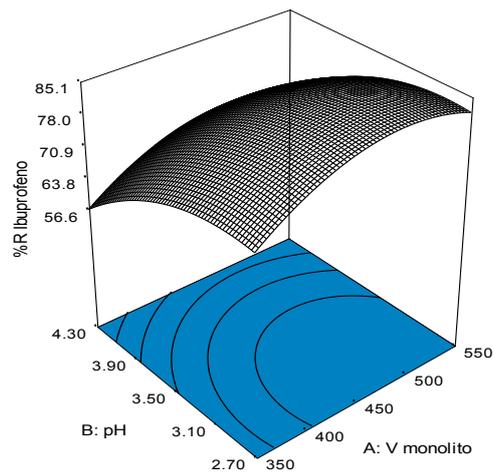


**Ibu**

DESIGN-EXPERT Plot

%R Ibuprofeno  
X = A: V monolito  
Y = B: pH

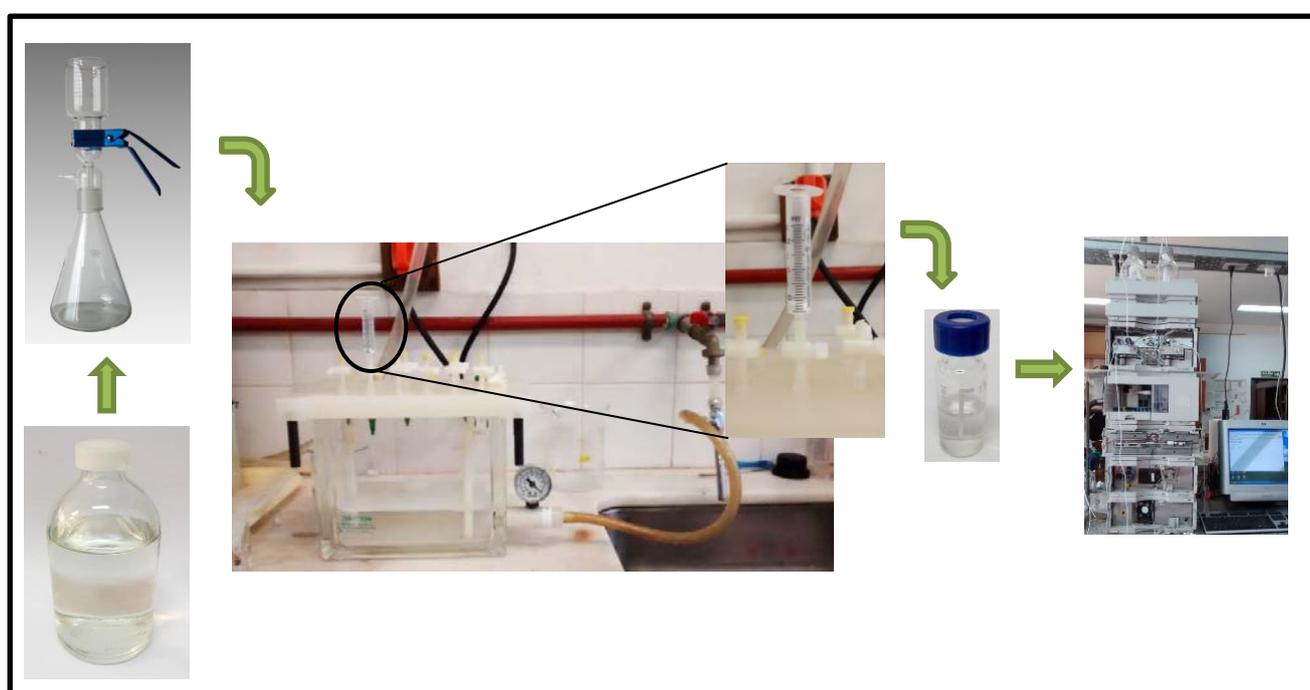
Actual Factor  
C: F = 0.75



#### 5.4. Procedimiento de extracción optimizado

En la Figura 28 se puede ver un esquema del proceso de extracción *m*-SPE para los compuestos estudiados. El procedimiento en las condiciones óptimas determinadas previamente mediante DCC y SR se compone de los siguientes pasos:

- Acondicionamiento del cartucho ( $V_{mezcla\ de\ monolito} = 465\ \mu\text{L}$ ): **3,00 mL de metanol.**
- Flujo de la muestra en buffer de pH=3,15: **F = 0,85 mL min<sup>-1</sup>**
- Lavado: **0,5 mL de agua MilliQ**
- Elución: **1,00 mL de ACN.**



**Figura 28.** Esquema del procedimiento de extracción *m*-SPE desarrollado.

#### 5.5. Performance analítica de la metodología *m*-SPE

A fin de validar parcialmente la metodología analítica desarrollada, se consideraron las siguientes cifras de mérito: límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), rango lineal (RL), factor de enriquecimiento (FE), recuperación porcentual (R%), exactitud ( $\delta$ ) y reproducibilidad intra-día (RSD). Para determinar la linealidad de las rectas de calibración se aplicó un ANOVA en donde se compararon los  $F_{exp}$  con el  $F_{crit}$  para 95 % de confianza y con N-2 grados de libertad para la falta de ajuste (LOF), según corresponda para cada analito. El cálculo se realizó según se detalla en la sección

3.1.2. En la Tabla 15 se muestran las rectas de calibración realizadas con los estándares diluidos en agua pura, las cuales se realizaron teniendo en cuenta *todas las etapas del método analítico*, incluidos la extracción y la determinación cromatográfica.

Los LODs y LOQs, que se muestran en Tabla 16, se calcularon mediante tres métodos diferentes, como se explicó en la Sección 3.1.3.3., los que se encontraron en el rango de  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Estos valores se consideran muy aceptables si se comparan con trabajos de la literatura que también incluyen etapas de preconcentración, pero realizados a través de técnicas instrumentales más sofisticadas a la empleada en este trabajo de Tesis, tales como HPLC-MS/MS <sup>7-9</sup> donde el nivel de detección alcanzado para diferentes analitos también fue del orden de los  $\mu\text{g L}^{-1}$ , o detección on-column en electroforesis capilar (CE), donde la dispersión del pico cromatográfico es mucho menor y con la que se llegó a LODs del orden de las  $\mu\text{g L}^{-1}$  o  $\text{ng L}^{-1}$  <sup>10</sup>.

**Tabla 15.** Rectas de calibración en agua incluyendo la técnica *m*-SPE para los 7 AINEs estudiados.

Analito	Pendiente $\times 10^3$	Ordenada $\times 10$	$R^2$	$S_{y/x}$	m	RL <sup>a</sup> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Supro	1,93 $\pm$ 0,03	-2 $\pm$ 2	0,9950	23,87	6	4-500
Indo	2,06 $\pm$ 0,04	-2 $\pm$ 2	0,9943	27,19	6	4-500
Napro	6,06 $\pm$ 0,09	-6 $\pm$ 5	0,9962	65,61	6	3-500
Fenbu	4,06 $\pm$ 0,02	-2 $\pm$ 1	0,9996	14,83	6	4-500
Feno	2,64 $\pm$ 0,03	-3 $\pm$ 2	0,9973	23,98	5	9-500
Flurbi	3,16 $\pm$ 0,03	-2 $\pm$ 2	0,9981	24,20	6	5-500
Ibu	1,76 $\pm$ 0,01	-0,7 $\pm$ 0,4	0,9987	9,29	5	6-422

<sup>a</sup> Rango lineal

Las recuperaciones, R%, los factores de enriquecimiento, FE, la reproducibilidad (expresada como RSD%), y la exactitud relativa,  $\delta$ , se determinaron a 3 niveles de concentración por triplicado, y se muestran en la Tabla 17. Para calcular el FE se utilizó la ecuación 20 (ver Sección 3.1.3.6). Se obtuvieron valores entre 42 y 53 según el analito. Si bien estos valores se consideran aceptables, son menores a los esperados para una técnica SPE. Una forma de aumentar los FE podría ser emplear mayor cantidad de fase sólida en los cartuchos, para poder procesar mayor cantidad de muestra. Sin

embargo, la estrategia de aumentar la cantidad de fase monolítica trae inconvenientes en el proceso de polimerización, llegando a obtener polimerización incompleta si la cantidad de mezcla utilizada es muy grande, como se dijo anteriormente.

Por otro lado, se obtuvieron muy altos valores de R%, que oscilaron entre 84 y 107%, con óptimas reproducibilidades (2 a 10%), dependiendo del nivel de concentración y del analito en cuestión. Los valores de exactitud relativa,  $\delta$ , se ubicaron entre -0,1 y 6,7 para los niveles de 80 y 200  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y entre -4,4 y -15,9 para el nivel más alto de concentración (300  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).

**Tabla 16.** LODs y LOQs de la técnica *m*-SPE para los 7 AINEs en agua destilada.

Analito	Método 1		Método 2		Método 3	
	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
Supro	1,2	3,9	13,9	42,1	35,1	82,8
Indo	1,2	4,0	14,9	45,1	37,8	88,6
Napro	1,0	3,2	12,2	36,9	30,8	72,6
Fenbu	1,2	3,7	4,1	12,5	10,4	24,5
Feno	2,6	8,7	12,4	37,7	27,7	64,2
Flurbi	1,6	5,4	14,1	42,7	14,1	42,7
Ibu	2,1	6,0	6,7	20,2	16,3	37,8

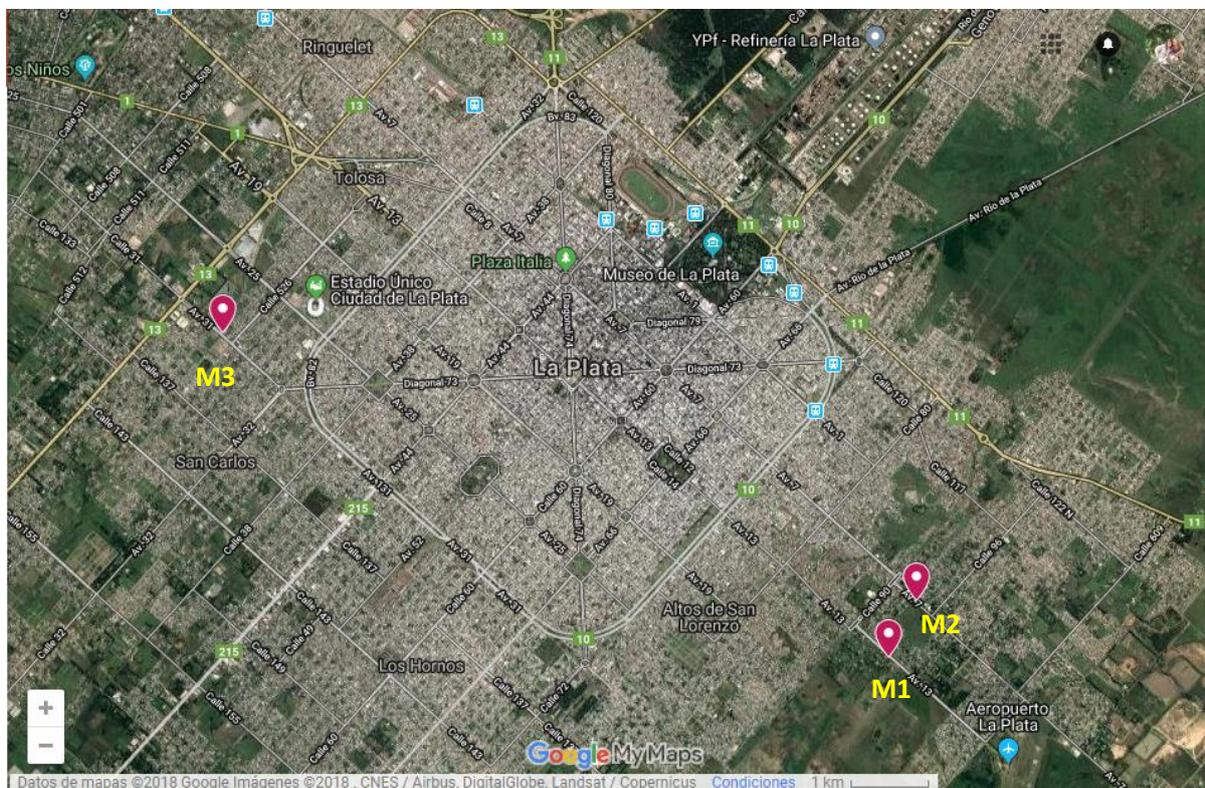
**Método 1:** Relación Señal/Ruido, S/R. **Método 2:** 3,3 SD/b (SD: desviación estándar de la respuesta; b: pendiente de la recta de calibración). **Método 3:** método IUPAC<sup>11,12</sup>.

**Tabla 17.** Factor de enriquecimiento, FE, Recuperación, %R, y Reproducibilidad, %RSD de la técnica *m*-SPE para los diferentes AINEs en agua destilada.

Analito	Concentración ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )											
	80				200				300			
	EF	%R	%RSD	$\delta$	EF	%R	%RSD	$\delta$	EF	%R	%RSD	$\delta$
Supro	52	104	3	3,9	48	96	5	-3,8	44	88	4	-12,0
Indo	50	100	2	-0,1	46	92	6	-8,0	42	84	4	-15,9
Napro	52	103	2	3,3	48	95	5	-4,5	44	88	3	-12,0
Fenbu	52	103	6	3,2	51	101	3	1,2	47	94	4	-6,2
Feno	52	105	5	4,6	49	97	4	2,6	44	89	3	-11,4
Flurbi	51	102	4	1,5	49	97	4	-2,7	45	90	4	-10,1
Ibu	53	107	10	6,7	51	102	4	1,5	48	96	5	-4,4

## 5.6. Análisis de AINEs en muestras de agua. Efecto de matriz y determinación de su concentración.

Para el análisis de las muestras de agua, se tomaron muestras de dos arroyos de zonas aledañas a la ciudad de La Plata. Los puntos de toma de muestra se visualizan por los marcadores de localización de color rosado en la Figura 29. Dos de las tres muestras analizadas fueron tomadas desde dos puntos distintos del mismo arroyo, ubicados al sudeste de la ciudad, una de ellas en Altos de San Lorenzo (-34.953149, -57.911304), denominada **M1**, y la otra en Villa Elvira (-34.946727, -57.907525), **M2**. La tercera de ellas, **M3**, fue tomada del arroyo “El Gato” (-34.916864, -58.001550), al noroeste de la ciudad.



**Figura 29.** Fotografía satelital de la ciudad de La Plata y alrededores. En color rosado se señalan los puntos de toma de muestras.

### 5.6.1. Efecto de matriz

Se estudió el efecto de matriz, EM, para las muestras las tres muestras, M1, M2 y M3, según el método detallado en la Sección 3.1.5, el cual incluye la comparación de las pendientes en agua y en la matriz de cada una de las muestras de acuerdo a las ecuaciones 21-26. Para todas las muestras analizadas se

encontró que las pendientes de las rectas de calibración con y sin matriz difieren significativamente en casi todos los casos ( $t_{\text{calculado}} > t_{\text{tabla}}$ ), como se muestra en Tablas 18-20. Por lo tanto, se concluye que *existe efecto de matriz* en las tres muestras para la mayoría de los analitos. Es por esto que se decidió emplear el método del “sobregregado o adición de estándar” para la cuantificación de los diferentes AINEs encontrados en las muestras de agua.

**Tabla 18.** Efecto de matriz al emplear la metodología m-SPE a la muestra **M1**.

<b>Analito</b>	<b>a<sub>agua</sub></b>	<b>a<sub>muestra</sub></b>	<b>t<sub>calculado</sub></b>	<b>t<sub>tabla</sub></b>	<b>EM</b>
Supro	1932,2	1768,1	3,823	2,160	Si
Indo	2058,0	1815,4	4,470	2,173	Si
Napro	6055,8	7267,8	-8,471	2,182	Si
Fenbu	4057,7	3995,5	0,736	2,056	No
Feno	2664,4	2572,7	1,329	2,207	No
Flurbi	3163,6	3120,9	0,379	2,056	No
Ibu	1755,1	1708,1	0,939	2,069	No

a: pendiente.

**Tabla 19.** Efecto de matriz al emplear la metodología m-SPE a la muestra **M2**.

<b>Analito</b>	<b>a<sub>agua</sub></b>	<b>a<sub>muestra</sub></b>	<b>t<sub>calculado</sub></b>	<b>t<sub>tabla</sub></b>	<b>EM</b>
Supro	1932,2	1578,9	7,679	2,169	Si
Indo	2058,0	1601,0	8,076	2,177	Si
Napro	6055,8	6575,7	-4,174	2,167	Si
Fenbu	4057,7	3544,6	6,820	2,056	Si
Feno	2664,4	2232,5	8,865	2,186	Si
Flurbi	3163,6	2705,5	4,545	2,056	Si
Ibu	1755,1	1543,3	4,465	2,069	Si

a: pendiente de la recta de calibración.

**Tabla 20.** Efecto de matriz al emplear la metodología m-SPE a la muestra **M3**.

<b>Analito</b>	<b>a<sub>agua</sub></b>	<b>a<sub>muestra</sub></b>	<b>t<sub>calculado</sub></b>	<b>t<sub>tabla</sub></b>	<b>EM</b>
Supro	1932,2	1728,4	3,501	2,191	Si
Indo	2058,0	1898,2	2,259	2,195	Si
Napro	6055,8	7414,4	-5,701	2,211	Si
Fenbu	4057,7	3831,2	2,894	2,056	Si
Feno	2664,4	2548,0	1,499	2,211	No
Flurbi	3163,6	2951,3	2,052	2,056	No
Ibu	1755,1	1561,1	3,687	2,069	Si

a: pendiente.

### 5.6.2. Análisis cuali/cuantitativo de AINEs en las muestras de agua estudiadas.

Se realizaron rectas de calibración para cada una de las tres muestras, con 4 niveles de concentración (incluyendo el nivel cero de sobreagregado), por triplicado en cada nivel. El volumen de muestra utilizado en todos los casos fue de 50,00 mL. Las 3 rectas de calibración se realizaron en el rango de 42,2-160  $\mu\text{g L}^{-1}$  de concentración aditivada, dependiendo del analito. En las Tablas 21-23 se muestran los parámetros de las rectas de calibración. Para determinar la linealidad de las rectas de calibración se aplicó un ANOVA en donde se compararon los  $F_{exp}$  con el  $F_{crit}$  para 95 % de confianza y con N-2 grados de libertad para la falta de ajuste (LOF), según corresponda para cada analito. El cálculo se realizó según se detalla en la Sección 3.1.2. Se puede observar en las Tablas mencionadas que todas las rectas fueron lineales en el intervalo de concentraciones mencionado, para todos los analitos.

En la Figura 30 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante HPLC-DAD para las 3 muestras sin preconcentrar. En las Figura 31 y 32 se muestran las correspondientes señales luego de emplear el método m-SPE optimizado, incluyendo además un cromatograma de los 7 estándares en agua pura, a los fines de comparar los tiempos de retención.

**Tabla 21.** Recta de calibración por sobreagregado en la muestra **M1** utilizando la técnica *m*-SPE para los 7 AINEs.

<b>Analito</b>	<b>Pendiente (x10<sup>3</sup>)</b>	<b>Ordenada (x10)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>S<sub>y/x</sub></b>	<b>m</b>	<b>RM<sup>a</sup> (µg L<sup>-1</sup>)</b>
Supro	1,77±0,03	0,0±0,6	0,9978	5,36	4	50,0-160
Indo	1,82±0,04	2±8	0,9957	7,79	4	50,0-160
Napro	7,3±0,1	1±3	0,9978	28,89	4	65,0-500
Fenbu	4,00±0,09	-0,6±2	0,9946	19,21	4	50,0-160
Feno	2,57±0,06	-0,4±1	0,9951	11,78	4	50,0-160
Flurbi	3,12±0,09	-0,6±2	0,9917	18,57	4	50,0-160
Ibu	1,71±0,04	0,6±0,7	0,9950	6,64	4	42,2-135

<sup>a</sup> Rango de medida.

**Tabla 22.** Recta de calibración por sobreagregado en la muestra **M2**.

<b>Analito</b>	<b>Pendiente (x10<sup>3</sup>)</b>	<b>Ordenada (x10)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>S<sub>y/x</sub></b>	<b>m</b>	<b>RM<sup>a</sup> (µg L<sup>-1</sup>)</b>
Supro	1,58±0,07	-0,3±0,7	0,9962	6,34	4	50,0-160
Indo	1,60±0,09	-0,3±0,9	0,9957	7,79	4	50,0-160
Napro	6,6±0,2	-1±2	0,9984	21,92	4	65,0-208
Fenbu	3,5±0,2	-1±2	0,9959	14,82	4	50,0-160
Feno	2,23±0,07	-0,2±7	0,9982	6,15	4	50,0-160
Flurbi	2,7±0,1	0±1	0,9971	9,46	4	50,0-160
Ibu	1,54±0,07	1,2±0,5	0,9961	5,33	4	42,2-135

<sup>a</sup> Rango de medidas.

**Tabla 23.** Curvas de calibración por sobreagregado en la muestra **M3**.

Analito	Pendiente (x10 <sup>3</sup> )	Ordenada (x10)	R <sup>2</sup>	S <sub>y/x</sub>	m	RM <sup>a</sup> (µg L <sup>-1</sup> )
Supro	1,7±0,01	0±1	0,9926	9,69	4	50,0-160
Indo	1,9±0,1	-1±1	0,9904	12,15	4	50,0-160
Napro	7,4±0,5	-2±6	0,9913	58,53	4	65,0-208
Fenbu	3,8±0,2	-1±2	0,9957	16,33	4	50,0-160
Feno	2,5±0,2	-1±1	0,9930	13,86	4	50,0-160
Flurbi	3,0±0,1	-1±1	0,9961	11,99	4	50,0-160
Ibu	1,6±0,1	0,7±0,8	0,9918	7,80	4	42,2-135

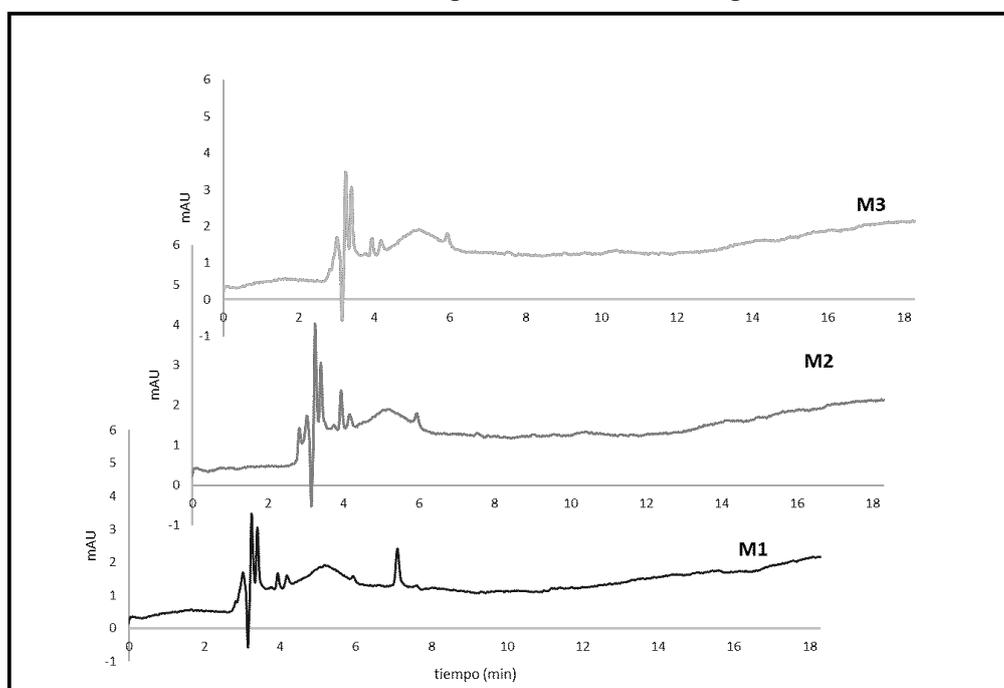
<sup>a</sup>: Rango de medidas

**Tabla 24.** Concentración encontrada (C) en las muestras estudiadas ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), factor de enriquecimiento, FE, recuperación, R%, y reproducibilidad, RSD%, (al nivel  $140 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

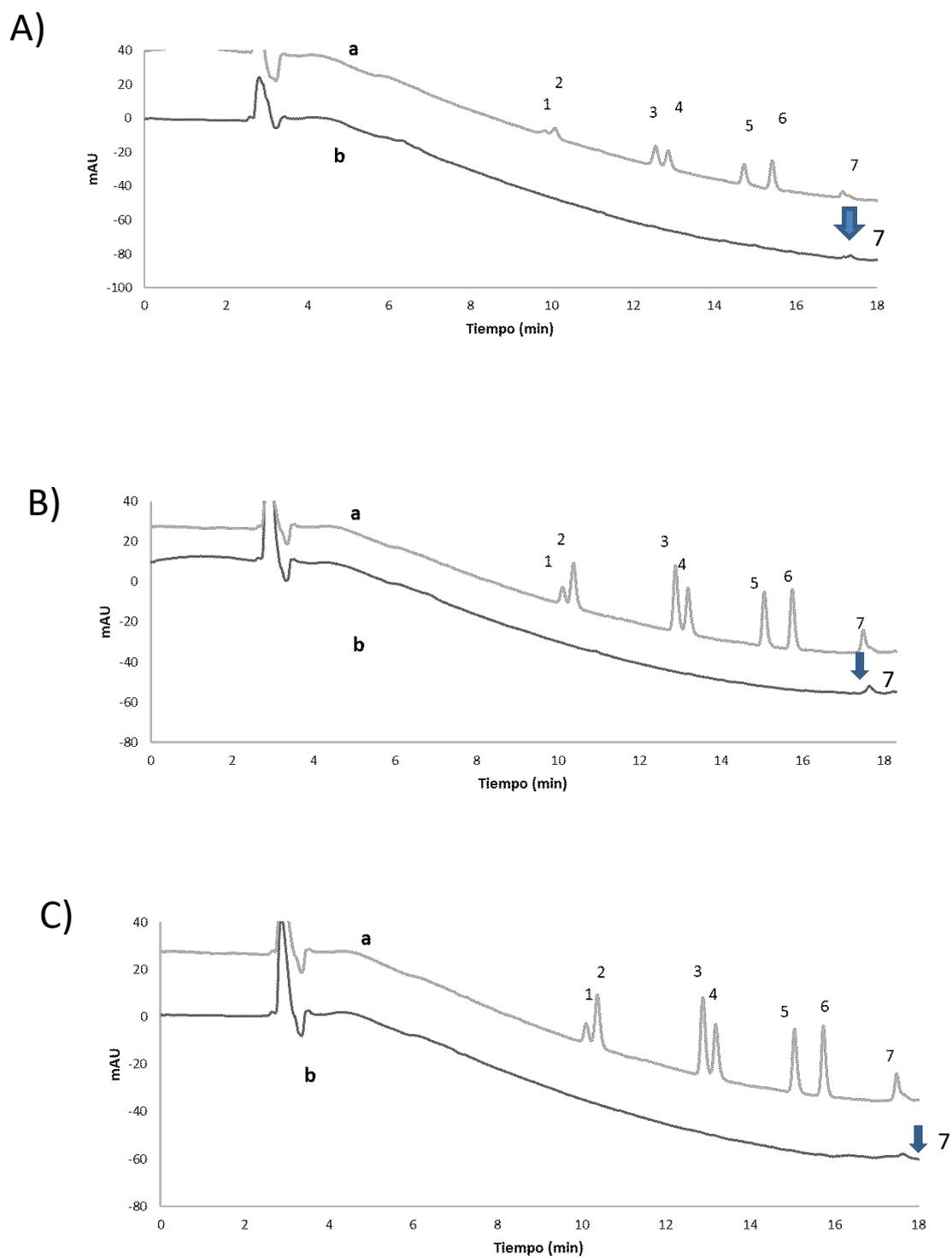
Muestras	M1					M2					M3				
	C	EF	%R	%RSD	$\delta$	C	EF	%R	%RSD	$\delta$	C	EF	%R	%RSD	$\delta$
Supro	-	50	99	3	-0,6	-	51	103	3	3,0	-	48	96	4	-3,5
Indo	(1,0 $\pm$ 7,1) <sup>d</sup>	54	107	7	7,5	(1,6 $\pm$ 8,8) <sup>d</sup>	53	105	6	5,0	-	47	95	5	-5,5
Napro	(1,5 $\pm$ 6,6) <sup>d</sup>	50	101	1	0,9	-	52	104	3	4,2	-	49	97	3	-2,9
Fenbu	-	49	98	2	-2,5	-	52	104	3	4,2	-	52	104	5	4,0
Feno	-	50	100	1	-0,2	-	51	103	5	2,8	-	50	101	4	0,8
Flurbi	-	48	96	2	-4,4	-	52	105	5	4,8	-	52	104	5	4,1
Ibu	(3,5 $\pm$ 6,5) <sup>d</sup>	48	96	1	-4,0	7,5 $\pm$ 5,8	47	94	1	-5,9	(4,7 $\pm$ 8,3) <sup>d</sup>	48	96	4	-4,2

d: detectable, no cuantificable (el número entre paréntesis es una estimación de la concentración)

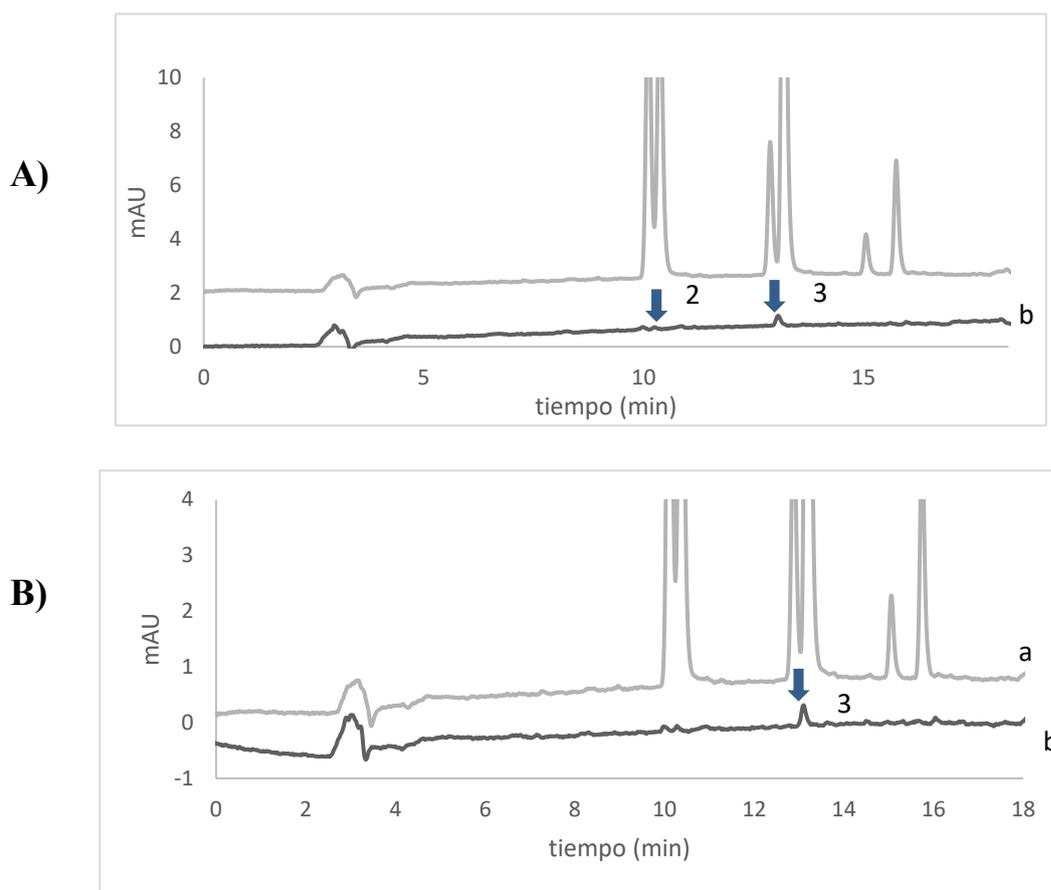
De acuerdo al método del sobregregado, la concentración de cada analito en la muestra se calcula como  $C_x = a/b$ , siendo **a** la ordenada al origen de la recta de calibración y **b** la pendiente de la recta de calibración (ver Sección 3.1.4). En la Tabla 24 se puede observar que sólo en la muestra **M2**, la concentración de ibuprofeno se encuentra por encima del LOQ, por lo que pudo cuantificarse. Sin embargo, en las muestras **M1** y **M3** sólo pudo detectarse, pero no cuantificarse. Se consideró el método de la relación señal/ruido tanto para el LOD como para el LOQ, dado que los otros dos métodos, más exigentes, no hubieran permitido determinar la concentración ni su presencia en la muestra. En la muestra **M2** además pudo identificarse un pico compatible con el indoprofeno. Por otra parte, en la muestra **M1** proveniente del arroyo de los Altos de San Lorenzo pudo identificarse un pico compatible con indoprofeno y naproxeno. Las identificaciones se realizaron únicamente mediante comparación con los tiempos de retención de los estándares, ya que no pudieron registrarse los espectros DAD de cada pico, debido a que la concentración fue demasiado baja. Sin embargo, dado que los cromatogramas no presentaron demasiados picos (Figuras 31 y 32), las coincidencias de los tiempos de retención de las muestras con los estándares puros podrían permitir asignar la identidad con un grado de certeza bastante alto. Marino *et al.*<sup>13</sup> encontraron ibuprofeno en muestras del arroyo El Gato (además de otros AINEs no estudiados en esta Tesis) en concentraciones promedios de 2,59  $\mu\text{g L}^{-1}$ , aunque en algunos lugares fueron más altas (9,66  $\text{ng L}^{-1}$ ). Sin embargo, a diferencia del presente trabajo, las muestras fueron tomadas en el punto de descarga al Río de La Plata, por lo que las diferencias en los resultados encontrados podrían deberse a los puntos de toma de muestra.



**Figura 30.** Cromatograma correspondiente a las 3 muestras estudiadas: M1, M2 y M3, sin preconcentración ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ).



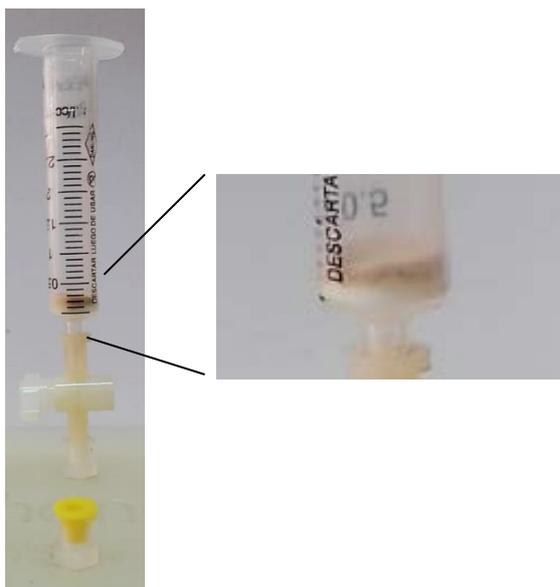
**Figura 31.** Cromatogramas correspondientes a las 3 muestras analizadas ( $\lambda = 210$  nm). **a)** estándares en agua: **1:** Supro. **2:** Indo. **3:** Napro. **4:** Fenbu. **5:** Feno. **6:** Flurbi. **7:** Ibu.; **b)** Muestra **A:** M3; **B:** M2; **C:** M1



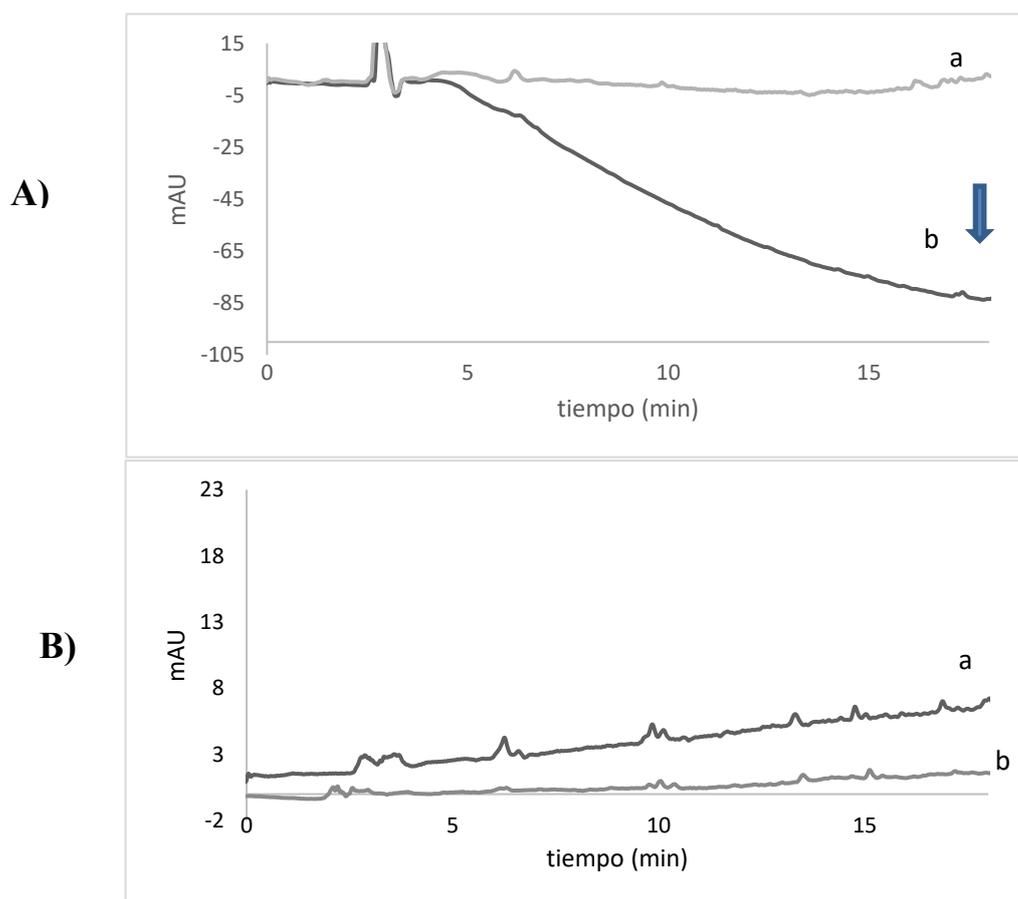
**Figura 32.** Cromatogramas correspondientes a las 3 muestras analizadas ( $\lambda = 280$  nm). **a)** estándares en agua: **2:** Indo. **3:** Napro.; **b)** Muestra **A:** M1; **B:** M2.

Además, empleando las muestras de agua, se determinaron el factor de enriquecimiento (FE), recuperación porcentual (R%), y reproducibilidad intradía de la recuperación (RSD%) en un nivel intermedio de la curva, el cual se realizó por triplicado. Los resultados se detallan en la Tabla 24. Se obtuvieron valores de FE entre 47 y 54, excelentes recuperaciones comprendidas entre 94 y 107%, con un RSD% entre 1 y 7%, y muy buenas exactitudes,  $\delta$ , las que oscilaron entre 0,2 y 7,5%, dependiendo del analito y de la muestra. Todos estos valores son similares a los obtenidos con las curvas de calibración en agua destilada, es decir que, si bien existen efectos de matriz, los mismos no son tan significativos.

Dada la baja concentración de los analitos se procesó, para la muestra M3, cantidades mayores a las empleadas hasta ahora (200 ml vs 50 ml) para aumentar los factores de enriquecimiento, aunque con el costo del mayor tiempo de análisis y la oclusión de la muestra en el cartucho al finalizar la elución (Figura 33). Los cromatogramas obtenidos (Figura 34), fueron muy similares a los originales, no pudiendo lograrse observar los espectros DAD de los diferentes picos.



**Figura 33.** Fotografía del cartucho utilizado para pre-concentrar 200 mL de la muestra M3



**Figura 33.** **A)** Cromatogramas de la muestra **M3** cuando se procesaron: **a)** 200 mL; **b)** 50 mL. ( $\lambda=210$  nm) (La flecha azul señala al supuesto pico del ibu). **B)** Cromatogramas de la muestra **M3** cuando se procesaron: **a)** 200 mL; **b)** 50 mL. ( $\lambda=254$  nm).

El hecho de que los cromatogramas sean muy similares en cuanto a cantidad/tiempo de retención/área de los picos, indicaría también que el análisis de las muestras originales (realizado tres días después a la toma de la muestra y guardada inmediatamente en la heladera), fue representativo, dado que el análisis de la misma muestra 2 meses después no produjo cambios en las concentraciones de los diferentes compuestos por posible descomposición y/o acción de bacterias.

## 5.7. Conclusiones

Se desarrolló una metodología de *extracción en fase sólida monolítica* empleando por primera vez como fase sólida extractante un polímero monolítico orgánico de poli(HEMA-co-EDMA) para retener y preconcentrar 7 antiinflamatorios no esteroideos en muestras de agua. Empleando un diseño factorial, se seleccionó la cantidad de lecho monolítico más apropiado para maximizar las recuperaciones de todos los analitos. El área superficial de cada cartucho fue moderada, pero suficiente para poder retener eficientemente a los analitos estudiados y a la vez, poder eluir un volumen considerable de muestra en poco tiempo. La metodología *m*-SPE optimizada permitió obtener altas recuperaciones, bajos límites de detección y cuantificación, y altas reproducibilidades intra e inter-cartucho. Si bien se detectaron picos cromatográficos con tiempos de retención idénticos a varios de los analitos estudiados en las tres muestras de agua de arroyo analizadas, las concentraciones estuvieron por debajo de los límites de detección de la metodología desarrollada para la mayoría de ellos, y para algunos pocos (ibuprofeno, naproxeno e indoprofeno) por debajo del límite de cuantificación. El ibuprofeno fue el único que pudo cuantificarse en una de las muestras, encontrándose en concentraciones del orden de las  $\mu\text{g L}^{-1}$ . En el caso de la muestra del arroyo El Gato, se logró detectar un pico correspondiente al tiempo de retención del ibuprofeno. Sin embargo, no se logró detectar el espectro DAD del pico cromatográfico, aun empleando mucho mayor cantidad de muestra. Las diferencias en los resultados encontrados respecto de los reportados en literatura, podrían deberse fundamentalmente a los puntos de colección de las muestras, que en este caso se encontraron en puntos intermedios del lecho del arroyo y no en el punto de descarga al Río de La Plata

Es importante destacar que, a diferencia de los cartuchos SPE particulados comerciales, la fabricación de estas nuevas fases sólidas es de fácil preparación, no requieren fritas de retención que pueden ocluirse o contaminarse, la elección del monómero del lecho monolítico se realiza de acuerdo a la polaridad/hidrofobicidad del compuesto a extraer. Además, dado que existe una numerosa variedad de monómeros, la polaridad de las fases se puede variar casi continuamente. Otra diferencia con los cartuchos comerciales que normalmente se emplean una sola vez, es que estos cartuchos monolíticos

permiten un uso repetido (entre 4 y 6 veces) sin alterar las recuperaciones, al menos en muestras “limpias”.

### 5.8. Bibliografía

1. Lämmerhofer, M., Svec, F., Fréchet, J. M. J. & Lindner, W. Capillary electrochromatography in anion-exchange and normal-phase mode using monolithic stationary phases. *J. Chromatogr. A* **925**, 265–277 (2001).
2. Echevarría, R., Keunchkarian, S. & Reta, M. Desarrollo de Columnas Capilares Monolíticas Quirales para Técnicas Separativas Miniaturizadas. Aplicación a la Enantioseparación de Compuestos de Interés Biológico. (Universidad Nacional de La Plata, 2018).
3. Viklund, C., Svec, F., Fréchet, J. M. J. & Knut, I. Monolithic , “ Molded ”, Porous Materials with High Flow Characteristics for Separations , Catalysis , or Solid-Phase Chemistry : Control of Porous Properties during Polymerization. *Chem. Mater.* **8**, 744–750 (1996).
4. Fraissard, J. P., Conner, C. W. & Division, N. A. T. O. S. A. *Physical Adsorption: Experiment, Theory, and Applications*. (Kluwer Academic Publishers, 1997).
5. Fresco-Cala, B., Cárdenas, S. & Herrero-Martínez, J. M. Preparation of porous methacrylate monoliths with oxidized single-walled carbon nanohorns for the extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs from urine samples. *Microchim. Acta* **184**, 1863–1871 (2017).
6. Derringer, G. & Suich, R. Simultaneous Optimization of Several Response Variables. *J. Qual. Technol.* **12**, 214–219 (1980).
7. Canales, R., Guíñez, M., Bazán, C., Reta, M. & Cerutti, S. Determining heterocyclic aromatic amines in aqueous samples : A novel dispersive liquid-liquid micro-extraction method based on solidification of floating organic drop and ultrasound assisted back extraction followed by UPLC-MS/MS. *Talanta* **174**, 548–555 (2017).
8. Canales, R. *et al.* Determination of heterocyclic aromatic amines in airborne particulate matter (PM2.5 and PM10) from different emission sources by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchem. J.* **139**, 34–41 (2018).
9. Hunzicker, G., Hein, G., Hernández, S. & Altamirano, J. Cloud point extraction for analysis of antiretrovirals in human plasma by UFLC-ESI-MS/MS. *Anal. Chem. Res.* **6**, 1–8 (2015).
10. Cattalini, J. P., Mouriño, V. S. & Lucangioli, S. E. Development and validation of a novel sensitive UV-direct capillary electrophoresis method for quantification of alendronate in release studies from biomaterials. *Electrophoresis* **39**, 616–619 (2018).
11. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. (Wiley, 2011).
12. Currie, L. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl. Chem* **391**, 105–126 (1995).
13. Elorriaga, Y., Marino, D. J., Carriquiriborde, P. & Ronco, A. E. Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina. *Int. J. Environ. Heal.* **6**, 330 (2013).

# CONCLUSIONES GENERALES

- Se desarrolló un método de extracción dispersiva líquido-líquido utilizando un líquido iónico de fosfonio menos denso que el agua para la extracción de 16 hidrocarburos aromáticos policíclicos desde muestras de agua. Los compuestos extraídos se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a detectores de fluorescencia y arreglo de diodos.
- Se optimizaron los parámetros experimentales más importantes de la metodología mediante un procedimiento “etapa por etapa”. Las variables optimizadas fueron el tipo y volumen de líquido iónico, tipo y volumen de solvente dispersante, tipo y concentración de sal en la fase acuosa, y tiempo de extracción y centrifugación.
- Para el método se ensayaron 3 líquidos iónicos de fosfonio como solvente extractante, obteniéndose factores de enriquecimiento más altos cuando se empleó bromuro de trihexil(tetradecil)fosfonio. La metodología optimizada requirió apenas unos pocos microlitros de solvente extractante, el cual es menos denso que el agua, lo que facilitó la separación de las fases. Esto hace que el método sea más práctico que otras metodologías de extracción dispersiva reportadas en la literatura.
- El método se validó internamente determinándose las cifras de mérito más importantes. Se obtuvieron límites de detección entre 0,02 y 0,56  $\mu\text{g L}^{-1}$ , y límites de cuantificación entre 0,08 y 1,85  $\mu\text{g L}^{-1}$  comparables con otras metodologías reportadas en la literatura. Se obtuvieron excelentes factores de enriquecimiento (109 a 228), buenos factores de recuperación (60 a 108%), muy buena reproducibilidad (3,4 a 11,9 %) y exactitud (0,4 a 9,9%). Estos resultados combinados con la sencillez, rapidez y bajo costo de la metodología analítica desarrollada la convierte en una alternativa viable y conveniente a los métodos reportados en la literatura para el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de agua.
- Se analizaron dos muestras de agua de río proveniente de dos canales de zonas aledañas a la destilería de YPF (Berisso), donde 11 de los 16 HAPs estudiados pudieron ser detectados en el Canal Este, y 8 en el Canal Oeste, aunque algunos de ellos se encontraron por debajo del LOQ, por lo que no pudieron ser cuantificados.

- Por otra parte, se desarrolló una metodología de extracción en fase sólida utilizando un polímero monolítico orgánico para la extracción de 7 antiinflamatorios no esteroideos desde muestras de agua. Los compuestos extraídos se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a un detector de arreglo de diodos.
- Las fases sólidas monolíticas fueron caracterizadas mediante microscopía electrónica de barrido e isothermas de adsorción-desorción de nitrógeno. Los resultados obtenidos demostraron que el polímero sintetizado presentaba la formación de “clusters”, típico de este tipo de polímeros. Además, se determinó el área superficial de varias muestras con un valor promedio de  $3,2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , mediante el ajuste matemático de BET.
- Se determinó que los cartuchos podían reutilizarse hasta 4 veces (algunos de ellos hasta 6) al menos para muestras relativamente “limpias”, en comparación con los cartuchos comerciales generalmente se utilizan una sola vez.
- Se optimizó el solvente de elución utilizado, obteniendo los mejores factores de enriquecimiento para el acetonitrilo. El resto de los parámetros experimentales considerados influyentes sobre la performance del método se optimizaron mediante el uso de un diseño experimental factorial (diseño central compuesto). Se optimizaron la cantidad de fase sólida utilizada para la extracción, el pH de las muestras y el flujo de carga de las mismas. Se obtuvieron las correspondientes superficies de respuesta, y se determinaron los valores óptimos de todos los parámetros estudiados mediante la función deseabilidad, donde se decidió maximizar las recuperaciones de los 7 analitos estudiados.
- La metodología se validó internamente determinándose las cifras de mérito más importantes en curvas de calibración en agua destilada. Se obtuvieron límites de detección entre 1,0 y 2,6  $\mu\text{g L}^{-1}$ , calculado como 3 veces la relación señal-ruido, y límites de cuantificación entre 3,2 y 8,7  $\mu\text{g L}^{-1}$  comparables con otras metodologías reportadas en la literatura, incluso con técnicas más sofisticadas. Se obtuvieron moderados factores de enriquecimiento, entre 42 y 53, y muy altos valores de recuperación, entre 84 y 107%. Se obtuvieron reproducibilidades entre 2 y 10 %, y la exactitud entre 0,1 y 6,7 %.
- Se determinó el efecto de matriz sobre 3 muestras de agua de arroyo de zonas aledañas a la ciudad de La Plata, mediante la comparación de las pendientes de las curvas de calibración. Para todas ellas se encontró que existe efecto de matriz para casi todos los analitos estudiados.
- En una de ellas pudo cuantificarse al ibuprofeno (tomada de Villa Elvira), obteniéndose una concentración de  $7,5 \mu\text{g L}^{-1}$ . En las otras dos muestras pudieron detectarse naproxeno e indoprofeno, mediante la comparación de los tiempos de retención, dado que el área de los picos no permitía la comparación de espectros UV con los correspondientes estándares.

## CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

### I) Publicaciones en revistas científicas

#### a) Trabajo publicado relacionado con la tesis

- ✓ “Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method using a lighter-than-water ionic liquid for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water”.

**Medina, G.S.**, Reta, M., J. Sep. Sci. 2016, 39, 4209-4218.

DOI: 10.1002/jssc.201600758

#### b) Otros:

- ✓ “Ammonia oxidation over d-band metal catalysts: Modeling complex behavior”

Matías Rafti, Alberto G. Albesa, Carlina Lancioni, **Giselle Medina** and José Luis Vicente. Transworld Research Network; 37/661 (2); Fort P.O.; Trivandrum-695 023 Kerala, India

Recent. Res. Devel. Chem. Physics, 6 (2012): 111-134

ISBN: 978-81-7895-561-2

### II) Publicaciones a reuniones científicas nacionales

#### a) Trabajo publicado relacionado con la tesis

- ✓ 2017- IX Congreso Argentino de Química Analítica, Río Cuarto  
“Determinación de antiinflamatorios no esteroideos en muestras de agua mediante extracción con disco monolítico rotante” (con referato). Medina, G.; Acquaviva, A.; Reta, M.
- ✓ 2015- VIII Congreso Argentino de Química Analítica, La Plata.  
“Determinación de PAHs en aguas del Río de La Plata mediante microextracción dispersiva empleando un líquido iónico de fosfonio” (con referato). Medina, G.; Reta, M.

#### b) Otros

- ✓ 2014- V Congreso Internacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CICYTAC 2014), Córdoba.

“Determinación de oxalato en infusiones de yerba mate: implicancia en pacientes con litiasis renal oxalocálcica “(con referato). Amaro, M.M.; Cagliardi, A.G.; **Medina, G.S.**; Romano, R.M.

- ✓ 2012- 97° Encuentro Nacional de la Asociación Física Argentina (AFA), Carlos Paz.  
“Análisis para la reducción del número de variables en un modelo de la reacción  $\text{NH}_3 + \text{O}_2\text{-Pt}(533)$ ” (con referato). Alberto G. Albesa, C. Lancioni, **G. Medina**, Matías Rafti y José L. Vicente