



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN QUIMICA

Desarrollos analíticos basados en técnicas en
flujo, extracción en fase sólida y técnicas
espectroscópicas para el análisis de alimentos

Farm. Natalia González

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2022

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 1 de julio del 2015 y el 20 de mayo del 2022, bajo la dirección de Dra. Carolina C. Acebal, Profesora Adjunta Dedicación Exclusiva de Química Analítica.

Farm. Natalia González

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

Dra. Carolina C. Acebal



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el.../.../....., mereciendo la calificación de (.....).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todos los que me acompañaron a lo largo de esta Tesis, y agradezco particularmente a:

- ✓ Mi directora, la Dra. Carolina C. Acebal, por todo lo que me ha enseñado estos años, por la confianza y libertad depositada en mí.
- ✓ A la Dra. Beatriz Fernández Band y Dra. Adriana G Lista, y a todos los integrantes del grupo FIA de química analítica. Gracias por los largos días compartidos en el laboratorio de charlas, risas y de intercambio de ideas.
- ✓ A Vero, Dani y Mariela las mejores compañeras de oficina, y amigas.
- ✓ A todos mis compañeros de docencia, en especial a la cátedra de Bromatología, por su excelente predisposición para el trabajo en equipo y por su aporte hacia mi formación.
- ✓ A mis padres por el apoyo incondicional y por querer siempre mi felicidad. Por haberme enseñado que ningún tropezón en esta vida es caída, y que todo se puede lograr si realmente se desea con el corazón.
- ✓ A mi hermano Joaquín por su amor y sus palabras que siempre son del corazón. A mi cuñada, y mi amada sobrina Almendra.
- ✓ A todas mis amigas y familia, que son lo más en este mundo. Gracias por ser uno de los mayores tesoros que me dio la vida. En especial a mí querida Gabiota.
- ✓ Y por último, al amor de mi vida, mi hijo Bruno. Sos mi corazón, gracias por hacerme cada día la mamá más feliz de este mundo.

Índice General

1. Introducción general	1
1.1 Análisis de alimentos.....	2
1.2. La importancia de la Química Analítica en el análisis de alimentos.....	6
1.2.1 Proceso de medida químico	9
1.2.1.1 Matrices alimenticias: Preparación y tratamiento de la muestra.....	10
1.2.1.2 Técnicas espectroscópicas	12
1.4 Automatización en química analítica	13
1.4.1 Técnicas en flujo en Química Analítica.....	18
1.4.1.1 Análisis por Inyección en Flujo.	19
1.4.1.2 Análisis por Inyección Secuencial.....	22
1.4.1.3 Análisis Flow-Batch.....	25
2. Desarrollo de métodos automáticos de extracción en fase sólida para la determinación de contaminantes	30
2.1 Introducción	30
2.1.1 Extracción en fase sólida	31
2.1.1.1 Adsorbentes poliméricos de baja selectividad.....	36
2.1.1.2 Polímeros de impresión molecular	37
2.1.2 Absorción molecular: reacción de Griess.....	38
2.2 Determinación de clenbuterol en muestras de lactoreemplazantes.....	40
2.2.1 Problemática	40
2.2.2 Objetivos	41
2.2.3 Parte experimental.....	42
2.2.3.1. Reactivos y soluciones.....	42
2.2.3.2 Instrumentos, aparatos y software.	43
2.2.3.3 Reacción de derivatización y sistema automatizado de análisis Flow-Batch.....	45
2.2.3.4 Análisis de muestras.....	51
2.2.4 Resultados y discusión	53
2.2.4.1 Optimización de las variables del sistema MISPE-FBA.....	53
2.2.4.2 Optimización del volumen de muestra y caudal.....	56

2.2.4.3 Optimización de las variables de la reacción de diazotación.....	57
2.2.4.4 Parámetros analíticos.....	62
2.2.4.5 Análisis de muestras.....	63
2.2.5 Conclusiones parciales	67
2.3 Determinación de aminas aromáticas primarias provenientes de envases	69
2.3.1 Problemática	69
2.3.2 Objetivos	73
2.3.3 Parte experimental.....	74
2.3.3.1 Reactivos y soluciones.....	74
2.3.3.2 Instrumentación y software	75
2.3.3.3 Descripción del sistema SIA y procedimiento	76
2.3.3.4 Diseño experimental	78
2.3.3.5 Estudio de migración envase-alimento.....	82
2.3.4 Resultados y discusión	86
2.3.4.1 Experimentos preliminares	86
2.3.4.2 Optimización de las variables significativas mediante diseño de experimentos	89
2.3.4.3 Optimización del volumen de muestra	93
2.3.4.4 Parámetros analíticos del método propuesto	94
2.3.4.5 Selectividad	96
2.3.4.6 Estudio de migración y determinación de los analitos	96
2.3.5 Conclusiones parciales	101
3. Estrategias analíticas con detección fluorescente basadas en la interacción entre la glibenclamida y la cafeína.	102
3.1 Introducción	103
3.1.1 Técnicas separativas: cromatografía líquida	103
3.1.2 Espectroscopia de fluorescencia molecular	107
3.1.2.1 Efecto de filtro interno	108
3.2 Determinación de Glibenclamida en bebidas energizantes.....	113
3.2.1 Problemática	113
3.2.2 Objetivos	116
3.2.3 Parte experimental.....	116
3.2.3.1 Reactivos y soluciones empleadas	116

3.2.3.2 Instrumentos, aparatos y software	117
3.2.3.3 Procedimiento FIA-C para la determinación de GLB.....	118
3.2.3.4 Análisis de muestras.....	119
3.2.4 Resultados y discusión	121
3.2.4.1 Experimentos preliminares	121
3.2.4.2 Optimización de los parámetros del sistema FIA-C.....	126
3.2.4.3 Parámetros analíticos y características cromatográficas	128
3.2.4.4 Análisis de muestras reales	130
3.2.5 Conclusiones parciales	139
3.3 Determinación de cafeína en muestras de té, café y energizantes mediante el efecto de filtro interno	141
3.3.1 Problemática.	141
3.3.2 Objetivos	143
3.3.3 Parte experimental.....	144
3.3.3.1 Reactivos y preparación de soluciones	144
3.3.3.2 Instrumentación y software	145
3.3.3.3 Procedimiento	146
3.3.3.4 Preparación de las muestras	147
3.3.3.5 Método de referencia	148
3.3.4 Resultados y discusión	149
3.3.4.1 Efecto de la presencia de CF en la señal de fluorescencia de la GLB	149
3.3.4.2 Optimización de los parámetros experimentales	154
3.3.4.3 Parámetros analíticos.....	159
3.3.4.4 Determinación de CF en muestras de alimentos	161
3.3.5 Conclusiones parciales	172
4. Conclusión general.....	175
APÉNDICE I-PRODUCTIVIDAD DE LA TESIS	177

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN		Pág
Figura 1.1.	Composición de un alimento y posibles modificaciones	3
Figura 1.2.	Marco regulatorio de alimentos en Argentina	5
Figura 1.3.	Principales áreas en las cuales interviene la Química Analítica en el análisis los alimentos	7
Figura 1.4.	Proceso de medida químico	9
Figura 1.5.	Diferentes técnicas de tratamiento de muestras aplicadas al análisis de alimentos.	11
Figura 1.6.	Analizadores de flujo no segmentado y segmentado	17
Figura 1.7.	Clasificación de las Técnicas de Análisis en Flujo.	18
Figura 1.8.	Componentes básicos del sistema FIA	20
Figura 1.9.	Sistema SIA simple.	24
Figura 1.10.	Componentes básicos del sistema de análisis Flow-Bach.	28
CAPÍTULO 2		
Figura 2.1.	Principales etapas del procedimiento de SPE	33
Figura 2.2.	Clasificación de adsorbentes	35
Figura 2.3.	Reacción de Griess	39
Figura 2.4.	Foto, esquema y dimensiones de la CMD diseñada y construida en nuestro laboratorio.	44
Figura 2.5.	Esquema de la reacción de diazotación de CLB	46
Figura 2.6.	Sistema MISPE-FBA para extracción, preconcentración y determinación espectrofotométrica de CLB.	47
Figura 2.7.	Minicolumna empacada con MIP de CLB comercial	48
Figura 2.8.	Esquema de la preparación de la muestra de lactoreemplazante	52

Figura 2.9.	Comparación de la señal de absorbancia obtenida para el método propuesto MISPE-FBA y el procedimiento llevado a cabo incluyendo los pasos recomendados por el fabricante	54
Figura 2.10.	Optimización de la concentración de los reactivos de la reacción de diazotación de CLB.	59
Figura 2.11.	Comparación de los resultados obtenidos para la muestra 1 con y sin precipitación de proteínas.	65
Figura 2.12.	Espectros de absorción de las muestras de lactoreemplazantes con y sin el agregado de CLB	66
Figura 2.13.	Sistema alimento/envase/entorno. Migración envase/alimento	69
Figura 2.14.	Formación de los adhesivos a base de PU, a partir de los diisocianatos más comunes	71
Figura 2.15.	Formación de AAPs a partir de los monómeros de Diisocianato en contacto con agua	72
Figura 2.16.	Sistema SIA propuesto para la extracción y derivatización de 2,4-DAT y 4,4'-MDA	77
Figura 2.17.	Diseño central compuesto	80
Figura 2.18.	Espectros de absorción molecular (entre 500 nm y 670 nm) para los productos de la extracción y derivatización de 2,4-DAT empleando diferentes adsorbentes	88
Figura 2.19.	Optimización del orden de adición de reactivos para el 2,4-DAT y el 4,4'-MDA	89
Figura 2.20.	Diagrama de Pareto de los efectos obtenidos con el DPB para 2,4-DAT y 4,4'-MDA	91
Figura 2.21.	Diagrama de Pareto obtenido a partir del DCC	93
Figura 2.22.	Porcentaje de recuperación del volumen de muestra con el que se puede cargar la columna de SPE	94
CAPÍTULO 3		
Figura 3.1.	Ventajas del uso de columnas monolíticas en cromatografía líquida	106

Figura 3.2.	Superposición del espectro de absorción del absorbente con el espectro de excitación (A) o de emisión (B) del fluoróforo, o con ambos (C)	110
Figura 3.3.	Sistema FIA-C para la determinación de GLB	119
Figura 3.4.	Espectros de excitación y emisión de una solución de GLB de 16,0 mg L ⁻¹ , preparada en ACN/ácido acético 25:75 (v/v)	123
Figura 3.5.	Efecto del agregado de CF en la intensidad de fluorescencia de GLB. A: λ_{ex} =234 nm, B: λ_{ex} =298 nm	125
Figura 3.6.	Optimización de la fase móvil utilizando diferentes porcentajes de ACN/ácido acético pH 3,2, empleando una solución de GLB de 5 mg L ⁻¹ .	127
Figura 3.7.	Cromatogramas obtenidos para muestras de bebidas energizantes	132
Figura 3.8.	Comparación entre las soluciones estándar de GLB de 2,00 mg L ⁻¹ y 7,00 mg L ⁻¹ , y la muestra B	136
Figura 3.9.	Bebida energizante B, sin mezclar y mezclada con alcohol (champagne y vodka), adulterada con comprimidos de GLB comerciales.	139
Figura 3.10.	Sistema en flujo utilizado para realizar la extracción de CF de muestras de té, café y energizante	149
Figura 3.11.	Espectros de excitación (λ_{ex} 234 y 298 nm) y emisión (λ_{em} 350 nm) de GLB (16,0 mg L ⁻¹), y espectro de absorción de CF (30 mg L ⁻¹)	152
Figura 3.12.	Decaimiento de fluorescencia en función del tiempo de GLB (16 mg L ⁻¹) en presencia y ausencia de CF (hasta una concentración de 127,6 mg L ⁻¹)	152
Figura 3.13.	Espectros de absorción y de emisión de GLB en ausencia y presencia de CF	153
Figura 3.14.	Estudio de la concentración óptima de GLB a una concentración constante de CF (30 mg L ⁻¹).	155
Figura 3.15.	Espectros de emisión de fluorescencia de GLB (16,0 mg L ⁻¹) a diferentes valores de pH (λ_{ex} = 234 nm; λ_{em} = 350 nm)	156
Figura 3.16.	Gráfico de log I ₀ /I vs la concentración de CF a diferentes valores de pH, para una concentración de GLB de 16 mg L ⁻¹	158
Figura 3.17.	Gráfico del log I ₀ /I vs la concentración de CF a diferentes valores de temperatura, para una concentración de GLB de 16 mg L ⁻¹	159

Figura 3.18.	Espectros de fluorescencia de GLB (16 mg L^{-1}) con concentraciones crecientes de CF a una λ_{ex} 234 nm (pH 3,2, 25°C)	160
Figura 3.19	Espectros de fluorescencia de las muestras de café, té y bebidas energizantes después de haber realizado la dilución adecuada ($\lambda_{\text{ex}}=234 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=350 \text{ nm}$)	162
Figura 3.20.	Comparación de los espectros de emisión de fluorescencia de muestras de café, té y bebidas energizantes con la adición de GLB (16 mg L^{-1}) y las correspondientes soluciones estándares de GLB-CF	165
Figura 3.21.	Región elíptica de confianza conjunta (EJCR) calculada para un límite de confianza del 95 %	168
Figura 3.22.	Comparación de las pendientes para una muestra de café (A), de té (B) y de bebida energizante (C)	169
Figura 3.23.	Espectros de emisión de fluorescencia (A) y espectros de absorción (B) de GLB en ausencia y presencia de diferentes especies potencialmente interferentes, a las concentraciones presentes en las muestras ($\lambda_{\text{ex}}= 234 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=350 \text{ nm}$)	171

ÍNDICE DE TABLAS

CAPÍTULO 1		Pág.
Tabla 1.1.	Clasificación de las técnicas ópticas de análisis	12
CAPÍTULO 2		
Tabla 2.1.	Intervalos de tiempo de conmutación para el sistema MISPE-FBA	48
Tabla 2.2.	Comparación entre el protocolo original para el empleo de los MIPs comerciales según referencia 73, y el optimizado para el método MISPE-FBA propuesto	55
Tabla 2.3.	Intervalos de concentración estudiados y valores óptimos para llevar a cabo la determinación de CLB	60
Tabla 2.4.	Parámetros analíticos obtenidos para el método propuesto	63
Tabla 2.5.	Estudio de recuperación para las muestras de lactoreemplazante	66
Tabla 2.6.	Procedimiento analítico del sistema SIA para la determinación de 2,4-DAT y 4,4'-MDA	78
Tabla 2.7.	Valores de las variables experimentales estudiadas en dos niveles diferentes	79
Tabla 2.8.	Variables reales y valores codificados para la optimización de las variables significativas usando el DCC	81
Tabla 2.9.	Composición de los envases utilizados	83
Tabla 2.10.	Soluciones simuladoras de alimentos empleadas en este trabajo	85
Tabla 2.11.	Condiciones de temperatura y tiempo de los ensayos de migración según R.D. 1752/98 y 97/48/CE	85
Tabla 2.12.	Variables óptimas obtenidas con el DPB	92
Tabla 2.13.	Valores óptimos para las variables optimizadas con el DCC	93
Tabla 2.14.	Parámetros analíticos calculados para el método propuesto	95
Tabla 2.15. A.	Estudio de migración y determinación de 4,4'-MDA y 2,4-DAT en la solución simuladora A (Condiciones de migración: 72h, 20 °C)	97

Tabla 2.15 B.	Determinación de la migración de la mezcla de los compuestos 4,4'-MDA y 2,4 - DAT en la solución simuladora B (Condiciones de migración: 72h, 40 °C; n=3)	99
---------------	---	----

CAPÍTULO 3

Tabla 3.1.	Diferentes soportes sólidos de columnas empleadas en cromatografía líquida	104
Tabla 3.2.	Parámetros cromatográficos y analíticos evaluados	129
Tabla 3.3.	Composición correspondiente a 250,0 mL de las muestras de bebidas energizantes analizadas	131
Tabla 3.4.	Determinación de GLB en muestras de bebidas energizantes, sin mezclar y mezcladas con alcohol, adulteradas con soluciones estándar	134
Tabla 3.5.	Determinación de GLB en muestras de bebidas energizantes adulteradas con comprimidos comerciales de GLB	138
Tabla 3.6.	Rendimientos cuánticos de fluorescencia relativos, tomando como referencia el valor determinado a pH 3,2	157
Tabla 3.7.	Parámetros analíticos obtenidos para el método propuesto	161
Tabla 3.8.	Concentración de CF en las diferentes muestras analizadas por el método propuesto	164
Tabla 3.9.	Comparación de los resultados obtenidos por el método propuesto y el método de referencia	166

ABREVIATURAS

AAPs	Aminas Aromáticas Primarias
ACN	Acetonitrilo
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ANOVA	Análisis de varianza (siglas en inglés de Analysis of variance)
AOAC	Asociación de Analistas Oficiales Químicos
BP	Bomba pistón
CAA	Código Alimentario Argentino
CF	Cafeína
CLB	Clorhidrato de Clenbuterol
CM	Columna cromatográfica monolítica
CMD	Cámara de mezclado y detección
D	Detector
2,4-DAT	2,4-diaminotolueno
DCC	Diseño Central Compuesto
DPB	Diseño Plackett-Burman

EFI	Efecto de filtro interno
FAO/WHO	Food and Agricultural/ World Health Organization
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FBA	Análisis Flow-Batch (siglas en inglés de Flow-Batch Analysis)
FDA	Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (siglas en inglés de Food and Drug Administration)
FIA	Análisis de Inyección en flujo (siglas en inglés de Flow Injection Analysis)
FIA-C	Análisis de Inyección en flujo acoplo a una columna cromatográfica monolítica corta
GdC	Guarda-columna
GLB	Glibenclamida
HC	Bobina de retención (siglas en inglés de holding coil, HC)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IF	Intensidad de fluorescencia
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LLE	Extracción líquido-líquido (siglas en inglés de Liquid Liquid Extraction)
LOD	Límite de detección

LOQ	Límite de cuantificación
4,4'-MDA	4,4'-metilendianilina
MERCOSUR	Mercado Común del Sur
MeOH	Metanol
MIPs	Polímeros de Impresión Molecular (siglas en inglés de Molecular Imprinted Polymers)
MISPE	Procedimiento de extracción en fase sólida con impresión molecular
MSV	Válvula de selección multiposición
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NED	N-(1-naftil) etilendiamina
OMS	Organización Mundial de la Salud
ox-MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados
PMQ	Proceso de medida químico
PTFE	Politetrafluoroetileno
PU	Poliuretano
RC	Bobina de reacción (siglas en inglés de reaction coil, RC)
RSD	Desviación estándar relativa

SIA	Análisis de Inyección Secuencial (siglas en inglés de Sequential Injection Analysis)
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SPE	Extracción en fase sólida (siglas en inglés de Solid Phase Extraction)
SV	Válvula solenoide
VM	Válvula multiposición

RESUMEN

El análisis de alimentos requiere el desarrollo e implementación de diversos procedimientos que permitan evaluar no solo sus características y propiedades, sino también su inocuidad. Por otro lado, el avance de la sociedad ha traído consigo nuevos desafíos relacionados con la aparición de nuevos alimentos, manipulación fraudulenta de los mismos y legislación cada vez más rigurosa. En este sentido, la Química Analítica es considerada una de las herramientas fundamentales para llevar a cabo el análisis de los alimentos, capaz de desarrollar nuevos y mejores métodos de análisis, simples, versátiles, sensibles, fáciles de operar y de bajo costo.

La primera etapa de esta tesis consta de dos trabajos en los cuales se desarrollaron dos métodos automáticos de análisis para llevar a cabo la determinación de contaminantes (clorhidrato de clenbuterol, 2,4-diaminotolueno y 4,4'-metilendianilina) mediante absorción molecular UV-Vis, previa extracción y preconcentración de los mismos. En ambos casos, se recurrió a una reacción de derivatización en la cual se produce la formación de azocompuestos, para incrementar la selectividad y sensibilidad de los métodos propuestos. Ambos métodos fueron aplicados a muestras de alimentos con resultados satisfactorios.

En la segunda etapa de la Tesis se plantearon dos estrategias analíticas con detección fluorescente basadas en la interacción entre la glibenclamida, un fármaco hipoglucemiante, y la cafeína. Se advirtió una disminución en la intensidad de fluorescencia de la glibenclamida en presencia de altas concentraciones de cafeína Por

ello, en el primer trabajo de esta etapa, se desarrolló un método analítico automático, con separación cromatográfica, para la determinación de glibenclamida en bebidas energizantes, teniendo en cuenta que la presencia de la misma en estas bebidas tiene fines delictivos. En el segundo trabajo, se desarrolló un sensor químico para la cuantificación de cafeína en bebidas de té, café y energizantes, basado en el efecto de filtro interno que el analito tiene sobre la glibenclamida (fluorofóro). Los resultados obtenidos por este método mostraron una estrecha concordancia con los obtenidos mediante el método de referencia.

Los métodos analíticos desarrollados durante esta Tesis Doctoral constituyen una interesante alternativa para la cuantificación de compuestos de interés en matrices alimenticias, presentando como ventaja principal la simplificación, y miniaturización de los procedimientos propuestos.

ABSTRACT

Food analysis requires the development and implementation of various procedures that contribute to evaluate not only its characteristics and properties, but also its safety. On the other hand, the progress of society has brought with it new challenges related to the appearance of new foods, their fraudulent manipulation and increasingly rigorous legislation. In this sense, Analytical Chemistry is considered one of the fundamental tools to perform food analysis, capable of developing new and better analysis methods that are simple, versatile, sensitive, easy to operate and low cost.

The first stage of this thesis consists of two works in which two automatic analysis methods were developed to perform the determination of contaminants (clenbuterol hydrochloride, 2,4-diaminotoluene and 4,4'-methylenedianiline) by UV-Vis molecular absorption, prior to their extraction and preconcentration. In both cases, a derivatization reaction was used, in which the formation of azo compounds occurs, to increase the selectivity and sensitivity of the proposed methods. Both methods were applied to food samples with satisfactory results.

In the second stage of the Thesis, two analytical strategies with fluorescent detection based on the interaction between glibenclamide, a hypoglycemic drug, and caffeine were proposed. A decrease in the fluorescence intensity of glibenclamide was observed in the presence of high concentrations of caffeine. Therefore, in the first work of this stage, an automatic analytical method was developed, with chromatographic separation, for the determination of glibenclamide in energy drinks. The presence of glibenclamide in these

drinks has criminal purposes. In the second work, a chemical sensor was developed for the quantification of caffeine in tea, coffee and energy drinks, based on the internal filter effect that the analyte has on glibenclamide (fluorophore). The results obtained by this method showed a close agreement with those obtained by the reference method.

The analytical methods developed during this Doctoral Thesis constitute an interesting alternative for the quantification of the compounds of interest in food matrices, presenting as main advantage the simplification and miniaturization of the proposed procedures.

CAPÍTULO 1:

Introducción

1. Introducción general

1.1 Análisis de alimentos

Según la Real Academia Española podemos definir a los alimentos como “cada una de las sustancias que un ser vivo toma o recibe para su nutrición”¹. Así mismo, podemos citar la definición de alimento según dos organismos con una amplia incumbencia en el campo de la legislación alimentaria, como la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y Organización Mundial de la Salud (OMS), a nivel mundial, y el Código Alimentario Argentino (CAA), a nivel nacional.

Según la FAO/OMS se entiende por alimento a “producto natural o elaborado susceptible de ser ingerido y digerido, cuyas características lo hacen apto y agradable al consumo, constituido por una mezcla de nutrientes que cumplen unas determinadas funciones en el organismo”². Así mismo el CAA, lo define, como “toda sustancia o mezcla de sustancias naturales o elaboradas que, ingeridas por el hombre aporten a su organismo los materiales y la energía necesarios para el desarrollo de sus procesos biológicos. La designación "alimento" incluye además las sustancias o mezclas de sustancias que se ingieren por hábito, costumbres, o como coadyuvantes, tengan o no valor nutritivo”³.

Los alimentos están conformados por una gran variedad de compuestos, que frecuentemente se clasifican en macronutrientes y micronutrientes. Los macronutrientes

¹ REAL ACADEMIA ESPAÑOLA: Diccionario de la lengua española, 23.ª ed., [versión 23.5 en línea]. <<https://dle.rae.es>> [11/03/2022]

² <https://www.fao.org/3/am401s/am401s07.pdf>. Último acceso: 16/05/2022

³ Artículo 6, Capítulo I, Disposiciones generales, Código Alimentario Argentino, <https://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>

son aquellos compuestos que el organismo necesita en cantidades más elevadas (proteínas, hidratos de carbono y lípidos), y los micronutrientes son los requeridos por el organismo en cantidades más pequeñas (vitaminas, minerales) (Figura 1.1.). Además, durante el procesamiento del alimento, se le pueden agregar aditivos que modifiquen algunas de sus características físicas, químicas o biológicas para mejorarlo, preservarlo o estabilizarlo³. Asimismo, los alimentos pueden sufrir modificaciones como alteraciones, adulteraciones, falsificaciones e incluso, contaminación. La identificación de estas modificaciones como la cuantificación de los compuestos que las originan es de gran interés debido al impacto que esto puede tener en la salud de los consumidores^{4,5}.

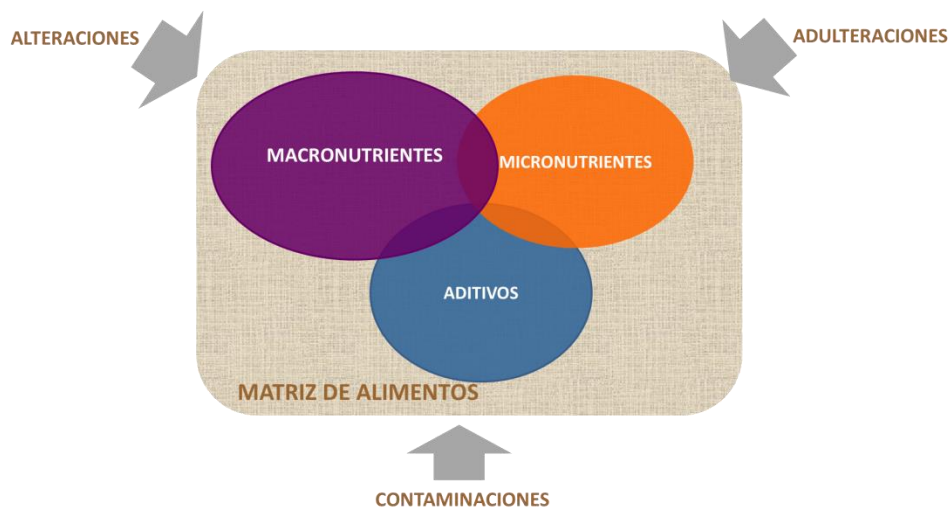


Figura 1.1. Composición de un alimento y posibles modificaciones

⁴ H.-D. Belitz, W. Grosch, P. Schieberle, Food Chemistry, 4th revised and extended ed, Springer, ISBN 978-3-540-69933-0 e-ISBN 978-3-540-69934-7, doi10.1007/978-3-540-69934-7

⁵ <https://www.fao.org/3/y4705s/y4705s.pdf>. Ultimo acceso: 16/05/2022

La ciencia de los alimentos estudia los problemas químicos, físicos, y biológicos de los alimentos. La misma es considerada una rama de las ciencias biológicas, y una ciencia interdisciplinaria que incluye, entre otras, a la microbiología, la química, la biología y la ingeniería⁶. Los alimentos son considerados compuestos dinámicos, por lo cual la ciencia de los alimentos debe abocarse a evaluar de manera constante la calidad de los mismos. La química de los alimentos trata de la composición y propiedades de los alimentos y de los cambios físicos que sufren durante su manipulación, procesado y almacenamiento⁷.

Los métodos de análisis de los alimentos se aplican a la preparación de las muestras, al análisis subjetivo (aspecto de los alimentos, olor, gusto, entre otros) y al análisis objetivo (métodos químicos, físicos y microbiológicos) de los principales componentes de los alimentos y componentes diversos⁸.

Los diferentes gobiernos y diversas instituciones internacionales acompañan a la química de los alimentos, estableciendo diversas regulaciones y controles. En este sentido, la Comisión del Codex Alimentarius, creada por la FAO/OMS en el año 1963, se encarga de crear y armonizar diversas normas, directrices y recomendaciones para proteger al consumidor y garantizar la comercialización equitativa de alimentos. Estas normas se compilan en el “Codex Alimentarius”⁹

⁶ S. Badui Dergal. (2012). La ciencia de los alimentos en la práctica, 4° Edición (No. 664 B138c), Pearson. ISBN: 978-607-32-0843-7.

⁷ S. Damodaran, K. L. Parkin, O. R. Fennema. (2008). Fennema Química de los alimentos, 3° Edición, ACRIBIA S.A. ISBN 978-84-200-1142-4.

⁸ H. Zumbado Fernández. (2021). Análisis instrumental de los alimentos. Editorial Universitaria. <https://elibro.net/es/lc/unsbiblio/titulos/172377>

⁹ <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/home/es/>. Ultimo acceso 18/05/2022

En la República Argentina, la legislación vigente se encuentra compilada en el CAA, que tiene en cuenta las normas establecidas por el Mercado Común del Sur (MERCOSUR), que a su vez contempla lo sugerido por el Codex Alimentarius^{10,11}. En la Figura 1.2. se resume el marco regulatorio que rige en Argentina para la obtención de alimentos seguros y una comercialización equitativa.

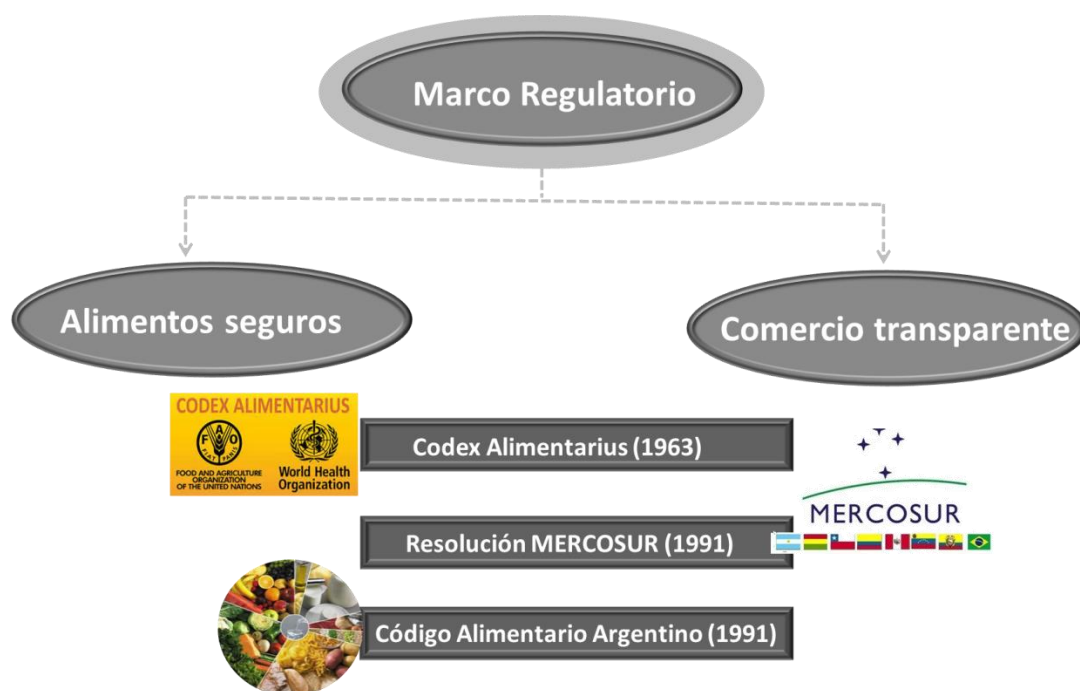


Figura 1.2. Marco regulatorio de alimentos en Argentina.

¹⁰ Código Alimentario Argentino. Último acceso 16/05/ 2022. <http://www.argentina.gob.ar/anmat/codigoalimentario>

¹¹ Códex Alimentarius. Normas Internacionales de los Alimentos. Última acceso 16/05/ 2022. <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/es/>

1.2. La importancia de la Química Analítica en el análisis de alimentos

Debido a la complejidad y diversidad en la composición de los alimentos, el análisis de los mismos está basado en el desarrollo e implementación de diversos procedimientos que permiten evaluar las características de los alimentos y sus componentes. Esta información es de vital importancia no solo para comprender las propiedades de los alimentos, sino también para la producción de alimentos que sean seguros, nutritivos y deseables para el consumidor¹².

En este sentido, la Química Analítica se considera una de las herramientas fundamentales para llevar a cabo el análisis químico de los alimentos, capaz de determinar diferentes compuestos, alcanzar concentraciones a nivel de trazas y proporcionar resultados confiables¹³.

¹² S. Suzanne Nielsen. (2017). Food Analysis, 5ª Edición, Springer. ISBN 978-3-319-45776-5

¹³ B. R. Bhattarai, B. P. Regmi, A. Gupta, B. Aryala, B. Adhikari, M. Paudel, N. Parajuli ,Importance of advanced analytical techniques and methods for food quality control and pollution analysis for more sustainable future in the least developed countries. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 27, 100692, 2022. doi.org/10.1016/j.scp.2022.100692

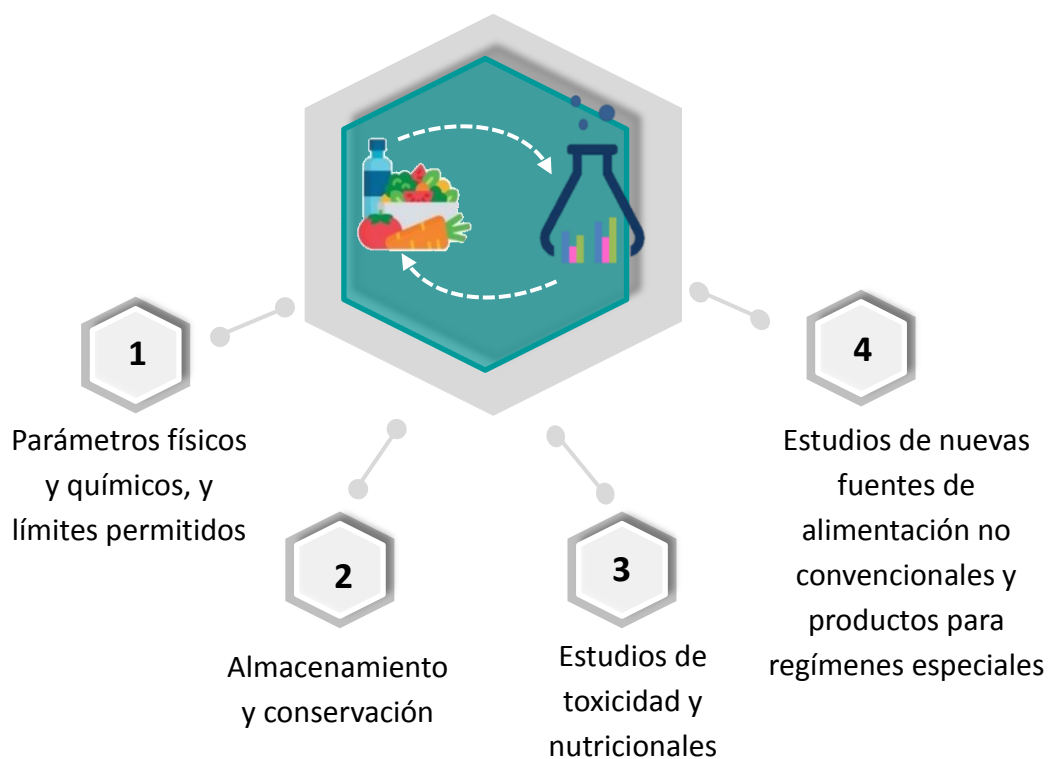


Figura 1.3. Principales áreas en las cuales interviene la Química Analítica en el análisis los alimentos

En la Figura 1.3 podemos observar las principales áreas de aplicación de la Química Analítica en el análisis de alimentos ⁸.

Como ya mencionamos, ningún alimento es comercializado y es consumido sin un riguroso análisis. El control de calidad en los alimentos se lleva a cabo en la materia prima utilizada para la elaboración del producto, durante el proceso de elaboración y en el producto final. Tanto los ensayos físicos y químicos que se realizan a los alimentos como los límites permitidos de determinados componentes, se encuentran establecidos en los documentos oficiales.

Con respecto al almacenamiento y conservación, se debe tener en cuenta que los alimentos envasados pueden sufrir diversos cambios a lo largo del tiempo debido, por ejemplo, a los cambios de temperatura a los que son sometidos. Estos cambios pueden afectar su composición química y dar lugar a la aparición de compuestos no deseados, e incluso perjudiciales para la salud del consumidor. Por otro lado, la aparición de nuevos envases también debe evaluarse¹⁴.

Asimismo, la Química Analítica interviene en la identificación y cuantificación de los componentes de un alimento, brindando información confiable para la evaluación de la calidad nutricional y de la inocuidad del alimento, es decir, de la ausencia de sustancias que puedan resultar tóxicas^{8,15}.

Por último, los consumidores están en constante búsqueda de nuevas fuentes de alimentos o nuevas formulaciones, lo que implica el desarrollo de nuevos métodos analíticos para su control de calidad¹⁶.

Por estas razones, debido al papel preponderante de la Química Analítica en el análisis de alimentos, la elección adecuada de la técnica analítica a emplear es de vital importancia.

¹⁴ M.S. Alamri, A. A. A. Qasem, A.A. Mohamed, S. Hussein, M.A. Ibraheem, G.Shamlan, H.A. Alqah, A.S. Qasha, Food Packaging's Materials: A Food Safety Perspective. Saudi Journal of Biological Sciences, 28, 4490-4499, 2021. doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.04.047

¹⁵ G. Haarklou Mathisen, J. Alexander, C. Kruse Fæste, T. Husøy, H. Katrine Knutsen, R. Ørnsrud, I_L Steffensen, A ranking method of chemical substances in foods for prioritisation of monitoring, based on health risk and knowledge gaps. Food Research International, 137,109499, 2020. doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109499

¹⁶ L. R. B. Mariutti, K. S. Rebelo, A. Bisconsin-Junior, J.S. de Moraes, M. Magnani, I. R. Maldonade, C. B. B. Cazarin, The use of alternative food sources to improve health and guarantee access and food intake. Food Research International, 149, 110709, 2021. doi:10.1016/j.foodres.2021.110709

La misma será seleccionada según el tipo de analito a determinar y las características del mismo, la matriz y sus características, y la razón para llevar a cabo el análisis ¹².

1.2.1 Proceso de medida químico

El desarrollo de métodos analíticos incluye las etapas de muestreo, tratamiento de la muestra, aislamiento de los compuestos de interés, identificación de los mismos, cuantificación y manejo de datos. Como mencionamos anteriormente, la elección del método analítico a utilizar en el análisis de alimentos es clave ya que debe conducir a obtener resultados de calidad. Para ello, es indispensable optimizar todos los pasos del procedimiento analítico, desde la preparación de muestra hasta la obtención del resultado final.

El proceso de medida químico (PMQ) comienza en el momento en el cual se obtiene la muestra y finaliza con la obtención de los resultados y su interpretación (Figura 1.4)¹⁷.

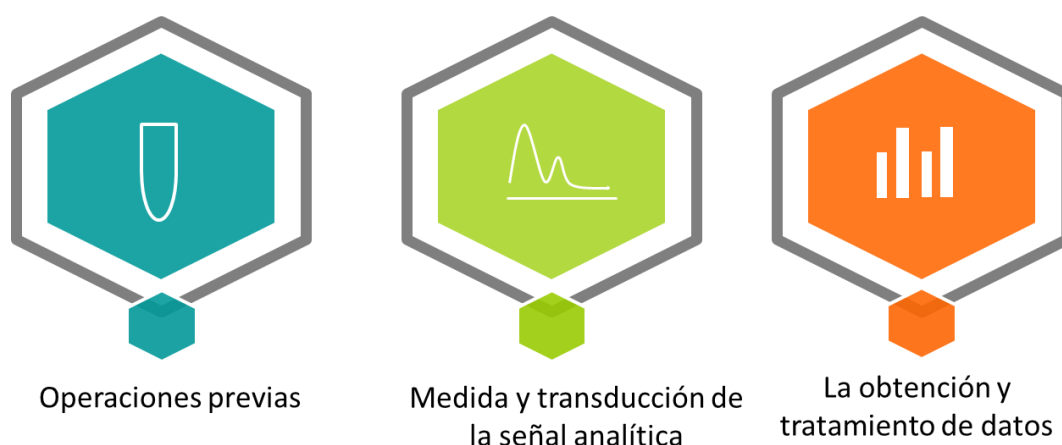


Figura 1.4. Proceso de medida químico

¹⁷ M. Valcarcel (2000). Automatización y miniaturización en química analítica. Springer Science & Business Media. ISBN 840700510X, 9788407005101

La primer etapa de este proceso está integrada por *operaciones preliminares* como la toma de muestra, preparación de la misma, tratamientos (homogeneización, disolución, disgregación), aplicación de técnicas separativas y extracción, desarrollo de reacciones químicas, etc.

El segundo paso del PMQ requiere el uso de un *método analítico de determinación*. La señal analítica obtenida puede ser relacionada con la presencia (análisis cualitativo), cantidad (análisis cuantitativo), o estructura (análisis estructural) de uno o varios analitos en una muestra determinada.

Los resultados obtenidos son procesados tanto matemática como estadísticamente para la obtención de resultados analíticos de calidad, siendo esta la última etapa en el PMQ.

1.2.1.1 Matrices alimenticias: Preparación y tratamiento de la muestra

El desarrollo de métodos analíticos adecuados para el análisis de los diversos componentes de los alimentos se ve afectado por la matriz del alimento, ya que suele ser la matriz alimentaria la que presenta el mayor desafío para el analista. Por esta razón, las operaciones previas son un paso crucial, ya que en esta etapa se llevan a cabo todas aquellas operaciones necesarias para convertir la muestra en una forma adecuada para el análisis correspondiente.

El objetivo principal de esta etapa es reducir o eliminar las interferencias de la matriz, y de esta manera mejorar la selectividad, la sensibilidad, y la exactitud del análisis^{18,19}.

¹⁸ M. J. Lichon, Sample Preparation for Food Analysis, General. Encyclopedia of Analytical Chemistry, 2006 doi:10.1002/9780470027318.a1026

Generalmente, esta etapa consta de múltiples procedimientos y la aplicación de diversas técnicas. La Figura 1.5. muestra una clasificación de las diferentes técnicas de preparación y tratamiento de muestras utilizadas en el análisis de alimentos²⁰.



Figura 1.5. Diferentes técnicas de tratamiento de muestras aplicadas al análisis de alimentos. Adaptado de referencia²⁰.

Particularmente, en esta tesis se emplea la técnica de extracción en fase sólida (SPE) para el desarrollo de métodos de tratamiento de muestras destinados a la determinación de contaminantes en alimentos.

¹⁹ M. Starowicz, Sample Preparation. Reference Module in Chemistry. Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2018. doi:10.1016/b978-0-12-409547-2.14559-7

²⁰ <https://www.chromatographyonline.com/view/advances-sample-preparation-food-analysis>. Último acceso: 16/05/2022

1.2.1.2 Técnicas espectroscópicas

En la actualidad, la mayoría de las determinaciones se llevan a cabo mediante la aplicación de técnicas instrumentales de análisis. Entre ellas, las técnicas ópticas se basan en el estudio de la interacción de la radiación electromagnética con el analito. Se pueden clasificar en espectroscópicas, con la obtención del espectro correspondiente, y no espectroscópicas²¹. Las técnicas espectroscópicas se pueden clasificar, a su vez, en técnicas de absorción de la radiación y técnicas de emisión de la radiación. En la Tabla 1.1. podemos observar esta clasificación.

Tabla 1.1. Clasificación de las técnicas ópticas de análisis

Técnicas Espectroscópicas	Absorción	Absorción molecular UV-visible, Absorción infrarrojo Absorción atómica, Rayos X
	Emisión	Fluorescencia molecular y atómica Fosforescencia Quimioluminiscencia Emisión atómica de llama e ICP

²¹ R. Bermejo Moreno, A. Moreno Ramírez. (2014). Análisis instrumental, Síntesis. ISBN: 978-84-907703-3-7

Técnicas no espectroscópicas	Dispersión	Turbidimetría, nefelometría.
	Refracción	Refractometría, interferometría.
	Difracción	Rayos X, electrones.
	Rotación óptica	Polarimetría, dicroísmo circular.

En esta tesis se utilizan técnicas espectroscópicas, consideradas de rutina, como absorción molecular UV-Vis y fluorescencia molecular, para la determinación de los diversos analitos en estudio.

1.4 Automatización en química analítica

El fin extrínseco de la Química Analítica se centra en resolver problemas económicos, sociales, o científico-tecnológicos, lo que implica satisfacer los requerimientos de la información química¹⁷. Por otro lado, la finalidad intrínseca de la Química Analítica se basa en obtener resultados de calidad en las mediciones que se realizan, asegurando con esto un alto nivel de veracidad (trazabilidad) en los resultados obtenidos para el nivel de incertidumbre deseado^{17,22}. Es primordial reconocer que tanto los objetivos intrínsecos como los extrínsecos de la Química Analítica están íntimamente relacionados, lo que se traduce en la obtención de información (bio) química de calidad.

²² A. Freddy, M. Adriaens, The metamorphosis of analytical chemistry. Analytical and bioanalytical chemistry, 412, 3525–3537, 2019. doi 10.1007/s00216-019-02313-z

Además, se pretende de la química analítica el desarrollo de métodos que cumplan con las siguientes características:

- ✓ Ser rápidos, permitiendo el análisis de un elevado número de muestras.
- ✓ Reducida participación humana, lo que disminuye la posibilidad de errores
- ✓ Empleo de pequeños volúmenes tanto de muestras como de reactivos
- ✓ Ser simples y fácilmente operables.
- ✓ Ser económicos y robustos.
- ✓ Permitir el control del proceso (industrial, biológico, etc.) in-situ.

Las características antes mencionadas pueden ser cumplimentadas por medio de la automatización de los métodos analíticos. La automatización en Química Analítica se ha desarrollado como una forma de facilitar las operaciones unitarias necesarias para la determinación cuali y cuantitativa de los analitos, y aumentar la velocidad y fiabilidad de los análisis²³. La automatización junto con el desarrollo de la informática, han marcado un punto de inflexión en el avance de la Química Analítica en las últimas décadas.

Según la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), la automatización se define como "el uso de dispositivos mecánicos e instrumentales para reemplazar, refinar, extender o complementar el esfuerzo humano y las facultades en el desempeño de un

²³ M. Urbano Cuadrado, M.D. Luque de Castro, M.A. Gómez-Nieto, Object-oriented techniques for design and development of standard software solutions in automation and data management in analytical chemistry. Trends in Analytical Chemistry, , 25, 66–76, 2006. doi:10.1016/j.trac.2005.05.006.

proceso dado, en el que, por fin, se controla una operación importante, sin intervención humana, por sistema de retroalimentación”²⁴.

Según sea el grado de sustitución de la participación humana, se puede diferenciar entre sistemas automáticos y sistemas automatizados. Los sistemas automáticos son utilizados para realizar operaciones específicas en un determinado momento del proceso sin intervención humana, pero no tienen incorporado un sistema de retroalimentación²⁵. Por otro lado, los procesos automatizados controlan y regulan la totalidad de un proceso sin intervención humana. Esto se logra mediante el empleo de dispositivos mecánicos y electrónicos regulados por sensores que están ubicados en todo el sistema, los que proporcionan información de retroalimentación²³.

La automatización está íntimamente relacionada con el PMQ²⁶. En cuanto a la relación de las operaciones previas y la automatización, el reemplazo de la participación humana en esta etapa constituye un gran desafío debido a la complejidad y gran diversidad de operaciones. La automatización de la segunda etapa del PMQ es más sencilla de implementar debido al alto grado de automatización que alcanzan los instrumentos disponibles en el mercado. Finalmente, la tercera etapa del PMQ es en la que se logra el mayor grado de automatización, según lo permita el método desarrollado.

²⁴ H.M. Kingston, M.L. Kinston, Nomenclature in laboratory robotics and automation. *Pure and Applied Chemistry*, 66, 609–630, 1994. doi.org/10.1351/pac199466030609

²⁵ G.D. Christian, P.K. Dasgupta, K.A. Schug. (2014). *Analytical chemistry*, 7° Edición, Wiley. ISBN: 978-0-470-88757-8

²⁶ M. Almeida Bezerra, V. Azevedo Lemos, D. Menezes de Oliveira, C. Galvão Novaes, J. Alves Barreto, J. Pereira Santos Alves, U. Mozart Ferreira da Mata Cerqueira, Q. Oliveira dos Santos, S. Alves Araújo, Automation of continuous flow analysis systems – a review. *Microchemical Journal*, 155, 104731, 2020. doi.org/10.1016/j.microc.2020.104731

Para alcanzar la automatización del PMQ es necesario el uso de un analizador, que se puede definir como “una suma de elementos modulares o no, de los cuales al menos uno debe ser un instrumento que opera con distintos grados de automatización y que ha sido diseñado para obtener información cualitativa o cuantitativa de un analito o más de uno, en una o varias muestras”¹⁷. Los analizadores se pueden clasificar en discontinuos, continuos y robotizados, según la forma en que las muestras son transportadas y manipuladas en el sistema¹⁷.

En el desarrollo de esta tesis se hizo uso de analizadores continuos que se basan en la introducción de la muestra, usualmente líquida, en un canal de forma secuencial, por aspiración o inyección, utilizando para ello una corriente de líquido o en algunos casos gas; pudiendo confluir o no, con un canal portador de reactivos, solución reguladora, etc ²⁷. La muestra inyectada es dirigida a través de una corriente hacia el detector, que generalmente está provisto de una celda de flujo. La muestra en el detector genera una señal analítica transitoria que es registrada, y su altura o área es utilizada para calcular la concentración del analito²⁷.

Los analizadores continuos son muy versátiles, ya que consisten en una serie de elementos o módulos conectados en línea unos con otros. Se diferencian dos clases de analizadores continuos (Figura 1.6.):

- ✓ Analizadores de flujo segmentado. La muestra es aspirada, introduciéndose burbujas de aire que segmentan el flujo y cumplen funciones fundamentales como impedir la dispersión o dilución de la zona de muestra, evitar la

²⁷ V. Cerda, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerda. (2014). Flow Analysis A Practical Guide, 1st Edition, Hardcover ISBN: 9780444595966, eBook, ISBN: 9780444626066

contaminación entre muestras, y favorecer la mezcla muestra-reactivos para lograr el equilibrio físico y químico antes de que la muestra alcance el detector. Las burbujas de aire deben eliminarse antes de llegar al detector.

- ✓ Analizadores de flujo no segmentado. Estos analizadores no poseen burbujas de aire en el sistema, y son considerados como los más simples, versátiles y de menor costo. La muestra es inyectada o insertada en la corriente de flujo en forma secuencial, y la dispersión del bolo de muestra se controla a través de la optimización de las variables geométricas e hidrodinámicas del sistema. A diferencia de los analizadores de flujo segmentado, la detección se lleva a cabo cuando todavía no se ha alcanzado el equilibrio físico y químico.

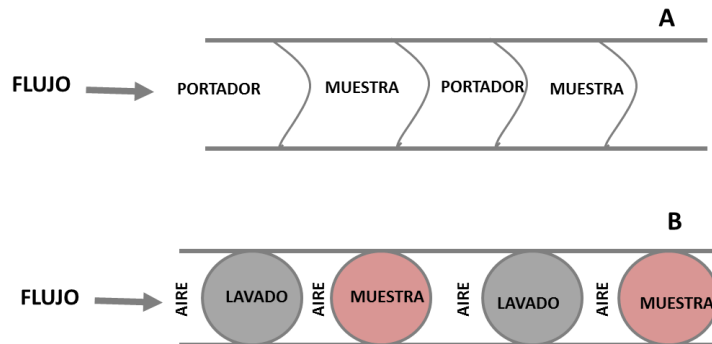


Figura 1.6. Analizadores de flujo no segmentado (A) y segmentado (B).

A partir del concepto de analizadores de flujo segmentado y no segmentado, se han desarrollado diferentes técnicas en flujo, que han sido implementadas para lograr la automatización parcial o total del PMQ.

1.4.1 Técnicas en flujo en Química Analítica

Las técnicas de análisis en flujo son un grupo de técnicas analíticas que desempeñan un papel importante en la automatización, simplificación y miniaturización de las diferentes etapas del PMQ. Entre sus ventajas se encuentran:

- ✓ Análisis de un mayor número de muestras en menor tiempo, siendo esto de real importancia en laboratorios de rutina,
- ✓ Empleo de pequeños volúmenes de reactivos y muestra, lo que reduce significativamente los residuos generados,
- ✓ Mayor reproducibilidad de los resultados obtenidos

En la Figura 1.7. se muestra una posible clasificación de las diversas técnicas de análisis en flujo, basada en la forma en la que las soluciones fluyen a través del sistema ²⁸.



Figura 1.7. Clasificación de las Técnicas de Análisis en Flujo. SFA: Análisis en flujo segmentado; FIA: Análisis por Inyección en Flujo; MSFIA: Análisis por Inyección en Flujo

²⁸ B. Horstkotte, M. Miró, P. Solich, Where are modern flow techniques heading to?. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410, 6361-6370, 2018. doi.org/10.1007/s00216-018-1285-2.

Multijeringa; Análisis en Flujo basado en microbombas; SIA: Análisis por Inyección Secuencial; MFA: Análisis en Flujo multiconmutado; FBA: Análisis Flow-Batch

En el desarrollo de los trabajos de esta tesis se emplearon las técnicas FIA, SIA y FBA.

1.4.1.1 Análisis por Inyección en Flujo.

El FIA fue desarrollado por J. Ruzicka y E. Hansen en el año 1975²⁹. Desde entonces, este tipo de sistemas ha tenido una amplia aceptación en el ambiente científico, avalada por el alto número de métodos analíticos publicados basados en sistemas FIA, e incluso la disponibilidad de sistemas FIA comerciales³⁰.

El FIA se basa en la inyección de un determinado volumen de muestra en una canal que contiene una corriente portadora que fluye en forma continua (carrier). La muestra inyectada forma una especie de bolo o zona de muestra que es transportada hacia el detector, el cual se encarga de registrar de manera continua la señal³¹. Asimismo, en el camino de la muestra al detector, se pueden incorporar diversos reactivos, ya sea en el canal de la corriente portadora o en canales auxiliares conectados al mismo. Por último, una vez que se realiza la detección, la muestra y los reactivos son enviados al desecho.

Los componentes principales de un sistema FIA son (Figura 1.8.):

²⁹ J. Růžička, E.H. Hansen, Flow injection analyses: Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Analytica Chimica Acta*, 78, 145-157, 1975. doi.org/10.1016/S0003-2670(01)84761-9

³⁰ <https://www.flowinjection.com/hardware/instruments/fia-analyzers>. Último acceso: 16/05/2022

³¹ E. A. G. Zagatto, C.C. Oliveira, A. Townshend, P. J. Worsfold, Flow Analysis with Spectrophotometric and Luminometric Detection || Chapter 5: Flow Analysers, 147–203, 2012 doi.org/10.1016/B978-0-12-385924-2.00005-7.

- *Dispositivo propulsor de fluidos.* Generalmente se emplean bombas peristálticas, cuya función es la producción de un flujo constante de una o varias soluciones que ingresan y circulan por el sistema.
- *Dispositivos de inyección de muestra.* Se emplean válvulas rotatorias de seis o más vías. Permite la inserción de un volumen de muestra reproducible, sin la detención del flujo.
- *Reactores y líneas de flujo.* Constituidos por tubos de Tygon® y de politetrafluoroetileno (PTFE) de diferentes diámetros, longitudes y materiales.
- *Celdas de flujo.* Se colocan en el portacelda del instrumento para llevar a cabo la medida sin interrumpir el flujo, salvo que así se requiera.
- *Otros.* Columnas de separación, preconcentración, dispositivos de calentamiento o agitación.

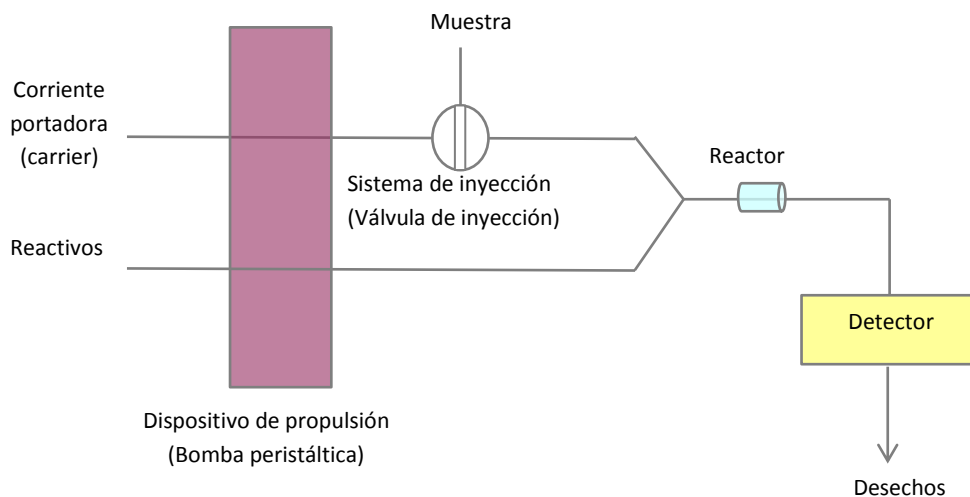


Figura 1.8. Componentes básicos de un sistema FIA.

Entre los aspectos fundamentales de un sistema FIA podemos destacar³²:

- a. *Los sistemas FIA utilizan un pequeño volumen de muestra (5 a 500 μ L).*
- b. *El sistema FIA se considera un sistema analítico cerrado.* Esto evita la pérdida del analito y se mejora notablemente la seguridad del operador. Los inconvenientes relacionados con el uso de reactivos peligrosos y/o volátiles también se minimizan^{28,31}.
- c. *La dispersión/dilución forma parte del FIA.* Durante su recorrido en el sistema, la muestra se somete a un proceso de dispersión, que puede ser controlado mediante el control de las características hidrodinámicas del mismo. El flujo dentro del tubo es de tipo laminar, contribuyendo a la dilución de la muestra mecanismos de convección y difusión¹⁷. Por otro lado, también se produce dilución en los sitios donde se agregan corrientes confluentes, siendo el control de estos sitios un parámetro clave para el diseño del sistema³³.
- d. *El tiempo que tarda la muestra en recorrer el sistema es relativamente corto.* Esto ocasiona que algunos de los procesos involucrados no se completen, y no se alcance el equilibrio físico y químico. Sin embargo, se logra un análisis rápido y reproducible.

³² M., Robert A. (2006). Encyclopedia of Analytical Chemistry (Applications, Theory and Instrumentation) || J. H. Aldstadt III, D. C. Olson, D. K. Wolcott, G. D. Marshall, S. W. Stieg, Flow and Sequential Injection Analysis Techniques in Process Analysis. , 1-24, 2016. doi:10.1002/9780470027318.a2104

³³ M. P. Cañizares Macías, Análisis por inyección en flujo: herramienta clave para la automatización analítica. Revista de la Sociedad Química de México, 46,167-174, 2002.

Entre las desventajas de los sistemas FIA se puede mencionar el empleo de tubos flexibles de Tygon® para introducir los fluidos al sistema. Estos tubos suelen sufrir un aplastamiento que genera cambios en los caudales y deterioro por uso de reactivos agresivos, lo que ocasiona que los mismos deban cambiarse con frecuencia. Otra desventaja de los sistemas FIA es que los fluidos son continuamente propulsados en el sistema, lo que genera un gasto de reactivos y muestra innecesario y una generación de desechos relativamente alta. Por último, se puede mencionar que el sistema FIA debe diseñarse para cada actividad específica propuesta.

Estas desventajas incentivaron la búsqueda de una solución más robusta que reemplace el uso de las bombas peristálticas y por lo tanto, de los tubos de bomba, y que dé lugar a un sistema más versátil con el que poder realizar experimentos diversos sin la necesidad de implementar grandes cambios.

1.4.1.2 Análisis por Inyección Secuencial

En el año 1990, J. Ruzicka y G. Marshall desarrollaron un sistema que ofrece las ventajas ya conocidas para los sistemas FIA, pero que corrige las desventajas mencionadas en la sección anterior, como la posibilidad de realizar diferentes experimentos sin la necesidad de diseñar un nuevo sistema y la reducción del consumo de reactivos³⁴. Al igual que en FIA, el flujo es continuo no segmentado y se sigue una dispersión controlada, bajo un régimen de flujo laminar. Sin embargo, el modo de funcionamiento es diferente y se basa

³⁴ J. Ruzicka, G. D. Marshall, Sequential injection : a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*, 237 , 329 -343, 1990.

en el concepto de flujo programable³⁵. Los componentes del sistema están gobernados por un software mediante el cual se puede operar la bomba para aspirar o dispensar soluciones, seleccionar el volumen de muestra y reactivos necesarios y ajustar su caudal. Asimismo, es posible la adquisición y procesamiento de datos en línea²⁸.

En la Figura 1.9. se observa un diagrama de un sistema SIA básico. Está formado por un dispositivo de propulsión, constituido por una bomba de pistón; una válvula de selección multiposición (MSV), con varios puntos de entrada (puertos) para seleccionar diferentes reactivos y funciona en sincronización con la bomba; y un detector. Además, un sistema SIA posee dos tipos de reactores: un reactor de retención (holding coil, HC) y un reactor de reacción (reaction coil, RC). El HC se inserta entre la bomba pistón y la MSV, y su función consiste en no permitir que los reactivos y muestras, que son aspirados desde la MSV, lleguen a la bomba. El RC se emplea para lograr la mezcla de los reactivos y la muestra, antes que ésta alcance el detector. El sistema está interconectado mediante tubos de PTFE.

³⁵ A. M.Pimenta, M. C. B. S.M. Montenegro, A.N. Araújo, J. Martíne Calatayud, Application of sequential injection analysis to pharmaceutical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 16-34, 2006. doi.org/10.1016/j.jpba.2005.10.006

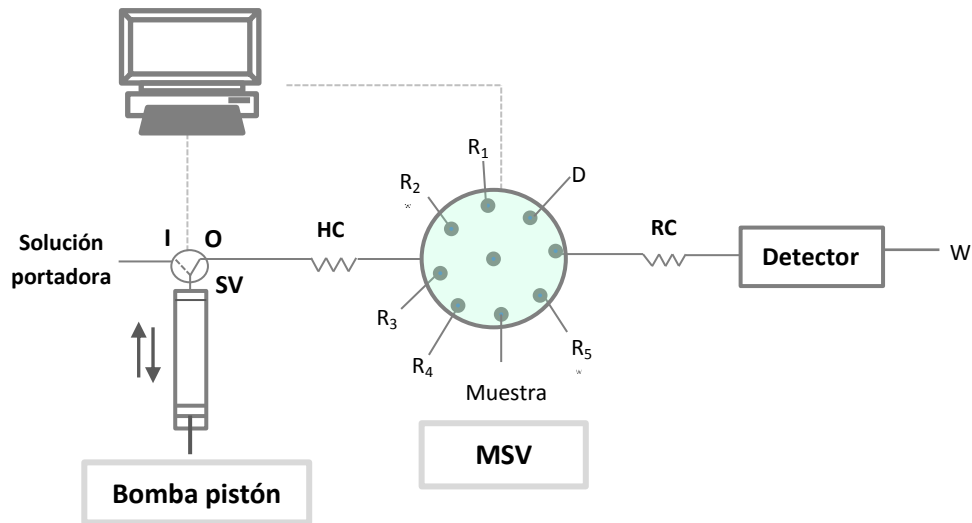


Figura 1.9. Sistema SIA simple. SV: válvula solenoide; I: ingreso de la solución portadora; O: comunicación bomba-sistema; R_x : reactivos; HC: holding coil; RC: reaction coil; D: desecho

Un ciclo analítico completo para un sistema simple como el de la Figura 1.9. está compuesto por pocos pasos. Sin embargo, dependiendo del tipo de operaciones que sea necesario llevar a cabo, el número de pasos en un ciclo puede incrementarse notablemente. El tiempo requerido para llevar a cabo un análisis es la suma del período de reacción, el período de medición y el tiempo de aspiración de las diferentes soluciones. Por ello, la frecuencia de muestreo de los sistemas SIA es más baja que la de los sistemas FIA para el mismo tipo de determinaciones.

Por otro lado, el uso de bombas pistón en lugar de bombas peristálticas proporciona una mayor robustez al sistema y se genera la posibilidad de cambiar el sentido del flujo de una manera más sencilla³⁶.

La inserción de la muestra y los reactivos en segmentos bien definidos, genera una zona de muestra-reactivo reproducible. Por lo tanto, los productos de reacción se forman en áreas bien definidas, generando también resultados analíticos muy reproducibles³⁷.

Como mencionamos anteriormente, una gran ventaja de los sistemas SIA es que se pueden adaptar fácilmente a diferentes situaciones analíticas, sin la necesidad de una reconfiguración física. Dado que estos sistemas solo funcionan cuando se requiere llevar a cabo una medición, ni la solución portadora ni la muestra circulan continuamente como en un sistema FIA. Por ello, se logra disminuir el consumo de muestra y reactivos y, por lo tanto, reducir los desechos.

1.4.1.3 Análisis Flow-Batch

La técnica de FBA fue desarrollada en el año 1999 por Honorato y colaboradores³⁸. Los sistemas FBA combinan las ventajas de los sistemas en flujo continuo con las ventajas inherentes a los métodos en batch, considerándose de esta manera sistemas híbridos. Desde el punto de vista conceptual, una de las principales diferencias del FBA, comparado

³⁶ J. Ruzicka, E. H. Hansen Peer Reviewed: Flow Injection Analysis: From Beaker to Microfluidics. *Analytical Chemistry*, 72, 212–217, 2000. doi:10.1021/ac002756m

³⁷ R. Pérez-Olmos, J.C. Soto, N. Zárate, A.N. Araújo, J.L.F.C. Lima, M.L.M.F.S. Saraiva, Application of sequential injection analysis (SIA) to food analysis. *Analytical, Nutritional and Clinical Methods, Food Chemistry*, 90, 471–490, 2005. doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.04.046

³⁸ R. S. Honorato, M. C. U. Araújo, R. A. C. Lima, E. A. G. Zagatto, R. A. S. Lapa, José L. F. Costa Lima, A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. , 396, 91–97, 1999. doi:10.1016/s0003-2670(99)00366-9

con sistemas FIA y SIA, consiste en la sustitución de los volúmenes de inserción por tiempos de inserción. La muestra y los reactivos son introducidos en una cámara de mezclado, de forma perfectamente sincronizada mediante el uso de válvulas solenoides, controladas por computadora³⁹. Por esta razón, en FBA se alcanzan los equilibrios físico y químico sin dispersión o dilución de la muestra, lo que aumenta la sensibilidad. La medida de la señal analítica puede realizarse en flujo o en la propia cámara⁴⁰.

Los componentes comunes a todos los sistemas FBA se observan en la Figura 1.10. y se describen a continuación³⁹:

- *Sistema de propulsión.* La mayoría de los sistemas FBA utilizan bombas peristálticas, pero también es posible el uso de microbombas. La función es la misma que para los sistemas FIA.
- *Cámara de mezclado/reacción.* Es el componente principal de los sistemas FBA ya que allí confluyen las alícuotas de muestra, reactivos, soluciones de calibración, soluciones amortiguadoras, etc. y posteriormente, se llevan a cabo los procesos físicos y químicos. Las cámaras están confeccionadas generalmente de Teflón® y presenta dos o más vías de entrada y una vía de salida. El volumen interno de la cámara de mezclado se adecua a cada método a desarrollar. Las soluciones obtenidas en la cámara de mezclado generalmente se envían al

³⁹ P. H. Goncalves Dias Diniz, L. Farias de Almeida, D. Peter Harding, M. C. U. Araujo, Flow-batch analysis. Trends in Analytical Chemistry, 35,39-49, 2012. doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.009

⁴⁰ R. S. Honorato, M C. U. Araújo, R. A. C. Lima, E. A. G. Zagatto, R. A. S. Lapa; J. L. F. Costa Lima, A flow-batch titrator exploiting a one-dimensional optimisation algorithm for end point search. Analytica Chimica Acta , 396, 91–97, 1999. doi:10.1016/s0003-2670(99)00366-9

detector. Sin embargo, es posible la adaptación de la cámara como celda de detección, agregándole a la misma ventanas de cuarzo.

- *Sistema de conmutación múltiple.* Formado por válvulas solenoides de tres vías, que posibilitan la inserción de volúmenes perfectamente conocidos de líquido (reactivos y muestra) a la cámara de mezclado. Se emplea, además, otra válvula solenoide para vaciar la cámara de mezclado, y dirigir el producto de la reacción hacia el detector o hacia el desecho. Cuando las soluciones no son dirigidas hacia la cámara, recirculan desde sus respectivos contenedores a través de la bomba peristáltica y de regreso a sus recipientes.
- *Interfase de control de válvulas solenoides y bomba peristáltica.* Un accionador eléctrico es el encargado de la apertura y cierre de las válvulas solenoides. El circuito electrónico del accionador envía un pulso eléctrico de 12 V a las válvulas cuando recibe más de 3,8 V provenientes del puerto paralelo de la computadora, a través de una interfase de control. Este potencial resulta suficiente para generar la apertura de la válvula. Cuando el pulso cae, la válvula se cierra. La bomba peristáltica también puede ser controlada de esta manera.
- *Software o programa de PC.* La bomba peristáltica, la interfase de control y, en algunos casos, el detector son manipulados por un software que puede ser escrito con el uso de diferentes entornos de desarrollo como LabView® o

Delphi®. Esto le proporciona una gran versatilidad al sistema FBA permitiendo la realización de las determinaciones de manera completamente automática⁴¹.

- *Sistema de detección.* Se encarga de registrar la señal analítica.

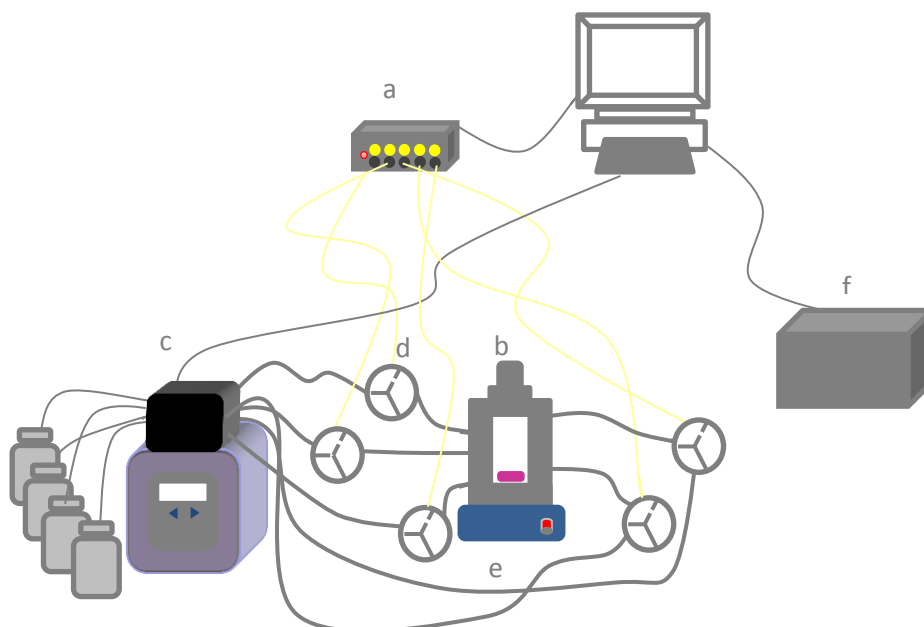


Figura 1.10. Componentes básicos del sistema de Análisis Flow-Bach. a. Accionador, b. cámara de mezclado, c. bomba peristáltica, d. válvulas solenoides, e. agitador magnético, f. detector

Los sistemas FBA han sido utilizados en múltiples aplicaciones, como titulaciones, métodos de screening, gradientes de concentración, digestión de muestras, microextracción líquido-líquido, entre otros^{39,42}.

⁴¹ M. Trojanowicz, K. Kołacińska, Recent advances in flow injection analysis. *Analyst*, 141, 2085,2016. doi: 10.1039/c5an02522b.

⁴² M. Alexovič, B. Horstkotte, I. Šrámková, P. Solich, J. Sabo, Automation of dispersive liquid-liquid microextraction and related techniques. Approaches based on flow, batch, flow batch and in-syringe modes, *Trends in Analytical Chemistry* 86, 39-55, 2016. doi: 10.1016/j.trac.2016.10.003

CAPÍTULO 2:

**DESARROLLO DE MÉTODOS AUTOMÁTICOS
DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA
DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES**

2. DESARROLLO DE MÉTODOS AUTOMÁTICOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES

2.1 Introducción

El desarrollo de métodos analíticos para determinar compuestos en muestras de alimentos incluyen técnicas de preparación y tratamiento de muestra acopladas a técnicas de determinación. Como se mencionó en la sección 1.1, las matrices de alimentos son consideradas complejas no solo porque contienen gran cantidad de sustancias, sino también porque pueden contener compuestos análogos o metabolitos con estructura química similar a la del compuesto de interés, lo que puede alterar la calidad del resultado analítico⁴³. Además, muchos de los compuestos estudiados en dichas matrices se encuentran en niveles de concentración de $\mu\text{g L}^{-1}$ y ng L^{-1} , por lo que es necesario implementar durante la preparación de la muestra, técnicas de extracción y preconcentración de los compuestos de interés¹².

Este capítulo de tesis consta de dos trabajos en los que se desarrollaron métodos automáticos de análisis para determinar la presencia de contaminantes en matrices de alimentos. Para ello, se empleó como técnica de extracción y preconcentración la SPE, y se llevó a cabo la derivatización de los mismos mediante el uso de la reacción de Griess, para su posterior determinación por absorción molecular UV-Vis.

A continuación, se describen brevemente los fundamentos de las técnicas empleadas.

⁴³ P. Luo, I. Morrison, A. Dudkiwick, K. Tiede, E. Boyes, P. O'toole, S. Park, A. B. Boxall, Visualization and characterization of engineered nanoparticles in complex environmental and food matrices using atmospheric scanning electron microscopy. *Journal of Microscopy*, 250, 32–41, 2013. doi: 10.1111/jmi.12014

2.1.1 Extracción en fase sólida

Entre las técnicas de extracción y preconcentración más empleadas en el análisis de alimentos se encuentran la extracción líquido-líquido (LLE, sus siglas en inglés) y la extracción en fase sólida (SPE, sus siglas en inglés)⁴⁴. Los métodos analíticos clásicos basados en LLE presentan diversos inconvenientes, tales como el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos tóxicos, uso de material volumétrico específico, tiempos de extracción largos, trabajo intensivo, baja eficiencia de extracción y dificultad para automatizar⁴⁵. Actualmente, los métodos basados en LLE están miniaturizados y son más susceptibles a ser automatizados⁴⁶. Sin embargo, los laboratorios que analizan un gran número de muestras aún pueden usar volúmenes sustanciales de solventes orgánicos. Para superar algunos de estos inconvenientes, surgen los métodos analíticos basados en SPE. La SPE es una técnica de tratamiento de muestra que se basa en la partición selectiva o distribución de uno o más compuestos entre dos fases. La primer fase es un sólido adsorbente; la segunda fase suele ser un líquido, pero también puede ser una emulsión, un gas o un fluido supercrítico⁴⁷. El objetivo principal de la SPE es extraer los compuestos de interés o los interferentes presentes en una muestra. Así, los analitos pueden ser retenidos por el sólido, o bien permanecer en la otra fase siendo, en este caso,

⁴⁴ M. Faraji, Y. Yamini, M. Gholami, Recent Advances and Trends in Applications of Solid-Phase Extraction Techniques in Food and Environmental Analysis. *Chromatographia* 82, 1207–1249, 2019. doi.org/10.1007/s10337-019-03726-9

⁴⁵ R.E. Clement, C. Hao, Liquid–Liquid Extraction: Basic Principles and Automation. Elsevier, 51–63, 2012. doi:10.1016/b978-0-12-381373-2.00063-6

⁴⁶ J. Soares da Silva Burato, D. A. Vargas Medina, A. L. de Toffoli, E. Vasconcelos Soares Maciel, F. Mauro Lanças, F. (2020). Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. *Journal of Separation Science*, 43, 202-225, 2019. doi.org/10.1002/jssc.201900776

⁴⁷ R. E. Majors, Solid-Phase Extraction. *Handbook of sample preparation*, 53-79, 2010.

los compuestos interferentes los que serían retenidos en la fase sólida, y por lo tanto, removidos de la matriz de la muestra. En el primer caso, los analitos pueden ser recuperados empleando un disolvente adecuado para su elución⁴⁸.

El proceso de SPE se basa en cinco etapas básicas, que se muestran en la Figura 2.1.⁴⁹

1. Etapa de Acondicionamiento. Esta etapa se basa en la activación del adsorbente empleando un volumen adecuado de solvente o mezcla de solventes

2. Etapa de lavado del adsorbente. Esta etapa se realiza para equilibrar el adsorbente y eliminar los restos de solvente orgánico de la etapa anterior, y puede llevarse a cabo con aire o con agua.

3. Etapa de Carga de Muestra. Se hace pasar la muestra a través del adsorbente. Es importante controlar el caudal de la muestra para maximizar la eficacia de extracción. Es conveniente analizar la fracción no retenida, para controlar si los analitos de interés fueron retenidos por el adsorbente.

4. Etapa de Lavado. En esta etapa se eliminan restos de muestra o interferentes adsorbidos débilmente. Se pueden emplear soluciones acuosas o simplemente agua. También se puede utilizar una solución con un pequeño porcentaje de solvente orgánico cuidando de no eluir el analito.

⁴⁸ J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de La Guardia, J. Namieśnik, Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media. Trends in Analytical Chemistry, 77, 23-43, 2016. doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010

⁴⁹ A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). Trends in Analytical Chemistry, 80, 641-654, 2016. doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015

5. Etapa de Elución. Se selecciona un solvente adecuado para lograr la elución cuantitativa del analito o grupo de analitos.

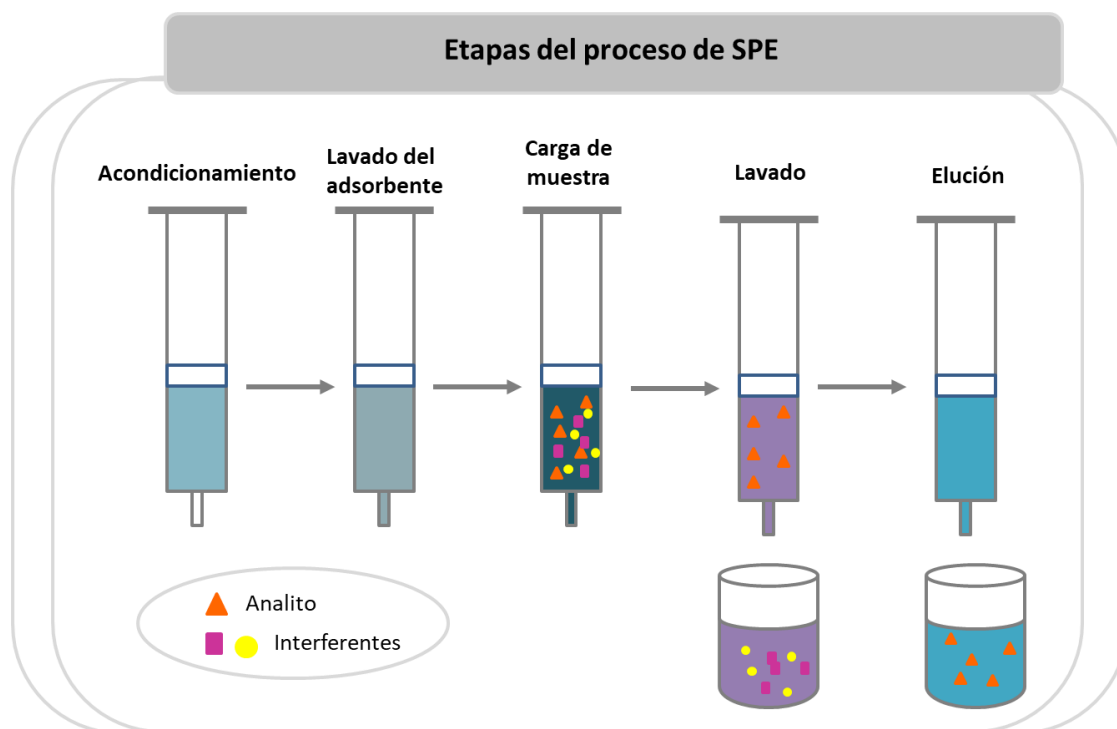


Figura 2.1. Principales etapas del procedimiento de SPE

A lo largo del tiempo, la SPE se ha convertido en la técnica de extracción y preconcentración más utilizada y exitosa para extraer compuestos de muestras líquidas de manera efectiva. Las principales ventajas del procedimiento SPE son⁵⁰:

- ✓ Procedimiento de extracción sencillo, y relativamente rápidos.
- ✓ Gran capacidad para la automatización.

⁵⁰ J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska, M. de La Guardia, J. Namieśnik, Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 19-38, 2015. doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.026

- ✓ Menor uso de solvente orgánico, comparado con LLE convencional, generando así menor costo, menor contaminación ambiental y una disminución del riesgo para la salud del analista.
- ✓ Disponibilidad de diversos materiales adsorbentes, con diferentes propiedades y tipos de interacción con los compuestos de interés.
- ✓ Regeneración del adsorbente para usos posteriores.

La selección del adsorbente es un factor muy importante, que dependerá del analito y de sus grupos funcionales, del tipo de muestra y de cómo interacciona esta con el adsorbente. En general, cuanto mayor sea el área superficial específica del adsorbente, mayor será su capacidad de adsorción⁵¹.

La interacción adsorbente-analito puede responder a diferentes mecanismos entre los que cabe destacar la adsorción, partición, intercambio iónico, exclusión molecular, afinidad o una combinación de ellos⁵².

Existen diferentes formas de clasificar los diversos adsorbentes. Una posible clasificación propuesta por Poole⁵³, es la división de los adsorbentes para SPE en tres grupos: óxidos inorgánicos, adsorbentes de baja selectividad, y adsorbentes selectivos o específicos (Figura 2.2).

⁵¹ C. F. Poole. (2019). Solid-Phase Extraction, Elsevier 2016, 1° Edition, Preview. ISBN: 9780128169063

⁵² SUPELCO: Guide to Solid Phase Extraction. Bulletin 910. Sigma-Adrich.

⁵³ C.F. Poole, New trends in solid-phase extraction. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 22, 362-373,2003.



Figura 2.2. Clasificación de adsorbentes según referencia ⁵³.

El uso de los adsorbentes inorgánicos es limitado. Dentro de los adsorbentes de baja selectividad, los más empleados son los adsorbentes de base de sílice modificados con C18, C8 o NH₂. No obstante, presentan como desventaja la inestabilidad a pH extremos y la actividad de los grupos silanoles residuales⁵⁴. Los adsorbentes de base de carbono suelen presentar una retención alta, e incluso irreversible, de algunos compuestos orgánicos. Los adsorbentes basados en polímeros han superado varias de las desventajas de los adsorbentes anteriores y, por ende, también son muy empleados en diversas

⁵⁴ I. Sowa, M. Wójciak-Kosior, P. Drączkowski, W. Szwerc, A. Pawlikowski, R. Kocjan, J. Tylus, Evaluation of pH and thermal stability of sorbent based on silica modified with polyaniline using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and Raman spectroscopy. *Microchemical Journal*, 118, 88-94, 2015. doi 10.1016/j.microc.2014.08.009

aplicaciones⁵⁵. Los adsorbentes de baja selectividad están orientados fundamentalmente al análisis multianalito.

Por ello, se han desarrollado nuevos adsorbentes para mejorar no solo la capacidad de adsorción, sino también la selectividad o la especificidad hacia los compuestos de interés⁵⁶. Los adsorbentes selectivos se basan en el intercambio iónico, bioafinidad, reconocimiento molecular o en el acceso restringido de macromoléculas.

Aunque los adsorbentes selectivos han sido aplicados en la extracción de diversos compuestos en muestras de alimentos, la mayoría de los métodos encontrados en la bibliografía emplean adsorbentes de baja selectividad⁴⁴.

A continuación se describen brevemente los adsorbentes empleados en el desarrollo de esta tesis.

2.1.1.1 Adsorbentes poliméricos de baja selectividad

Los adsorbentes de base polimérica son generalmente co-polímeros de estireno y divinilbenceno altamente reticulados para mejorar sus propiedades para SPE. Presentan una gran área superficial (entre 700 y 1200 m²/g) y alta porosidad, lo que da como resultado una mayor retención⁵³. A diferencia de los adsorbentes de sílice modificada, se pueden emplear en todo el intervalo de pH. La estructura hidrofóbica de dichos polímeros interactúa con los compuestos de interés a través de fuerzas de Van der Waals e interacciones π - π con los anillos aromáticos. Estos polímeros pueden ser modificados con

⁵⁵ N. Fontanals, R.M. Marcé, F. Borrull, Materials for solid-phase extraction of organic compounds. Separations, 6, 56,2019. doi.org/10.3390/separations6040056

⁵⁶ E. V. S. Maciel, A. L. de Toffoli, E. S. Neto, C. E. D. Nazario, F.M. Lancas, New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. TrAc Trends in Analytical Chemistry, 119, 115633, 2019.

grupos funcionales polares para aumentar la retención. También, se encuentran disponibles comercialmente materiales poliméricos modificados con co-polimeros polares, como Oasis® HLB (Waters), para incrementar la hidrofiliidad del material. Particularmente, en esta tesis se empleó el adsorbente Amberlite® XAD16N, que es un polímero esférico muy poroso basado en un co-polímeros de estireno y divinilbenceno, con grupos funcionales no ionizables. Presenta un área superficial de 800 m²/g, con un tamaño de partícula de 20-60 mesh y tamaño de poro de 200 Å.

2.1.1.2 Polímeros de impresión molecular

Los polímeros de impresión molecular (MIPs) son polímeros sintéticos altamente selectivos, capaces de retener los analitos de interés a través de interacciones específicas basadas en los sistemas de reconocimiento biológicos “antígeno-anticuerpo”⁵⁷. La selectividad de los MIPs se logra durante la síntesis, cuando los monómeros funcionales y los agentes reticulantes se polimerizan en presencia del compuesto de interés (plantilla). Una vez que se completa la polimerización, el compuesto “plantilla” se elimina y, de esa manera, el MIP es capaz de interactuar con el analito o con compuestos de estructura análoga a través de la forma, tamaño y funcionalidad de los sitios de unión generados⁵⁸. Así mismo, el uso de MIPs permite mejorar la sensibilidad de los métodos analíticos al disminuir las posibles interferencias de la matriz de muestra.

⁵⁷ Y. Cui, L., Ding, J. & Ding, Recent advances of magnetic molecularly imprinted materials: from materials design to complex sample pretreatment. Trends in Analytical Chemistry, 116514, 2022. doi: 10.1016/j.trac.2021.116514

⁵⁸ A. Speltini, A. Scalabrini, F. Maraschi, M. Sturini, A. Profumo, Newest applications of molecularly imprinted polymers for extraction of contaminants from environmental and food matrices: A review. Analytica Chimica Acta, 974, 1-26, 2017. doi: 10.1016/j.aca.2017.04.042

2.1.2 Absorción molecular: reacción de Griess

La absorción molecular es una técnica ampliamente utilizada para la cuantificación de una gran diversidad de compuestos orgánicos, inorgánicos y biológicos, debido a su elevada versatilidad. Sin embargo, la estructura química de muchos compuestos no permite su determinación por esta técnica, ya sea por contar con una muy baja absorptividad molar o requerir una derivatización previa, como es el caso de la mayoría de los compuestos inorgánicos. La derivatización química consiste en modificar la estructura de un compuesto por medio de una reacción química, y por lo tanto hacer posible su determinación mejorando, por ejemplo, la selectividad o la sensibilidad⁵⁹.

La reacción de Griess se desarrolló para la determinación de nitritos en diferentes matrices⁶⁰. En este método, los nitritos reaccionan con sulfanilamida y N-(1-naftil) etilendiamina, en medio ácido, para dar lugar a la formación de un azocompuesto que es determinado colorimétricamente⁶¹ (Figura 2.3).

⁵⁹ F. R. P. Rocha, E. A. G. Zagatto, Chemical Derivatization in Flow Analysis. *Molecules*, 27, 1563, 2022. doi.org/10.3390/molecules27051563

⁶⁰ C-Y. Hou, L-M. Fu, W-J. Ju, P-Y. Wu, Microfluidic colorimetric system for nitrite detection in foods. *Chemical Engineering Journal*, 398, 125573, 2020. doi.org/10.1016/j.cej.2020.125573.

⁶¹ M. Piston, A. Mollo, M. Knochen, A Simple Automated Method for the Determination of Nitrate and Nitrite in Infant Formula and Milk Powder Using Sequential Injection Analysis. *Journal of Automated Methods and Management in Chemistry*, 148183, 7, 2011. doi:10.1155/2011/148183

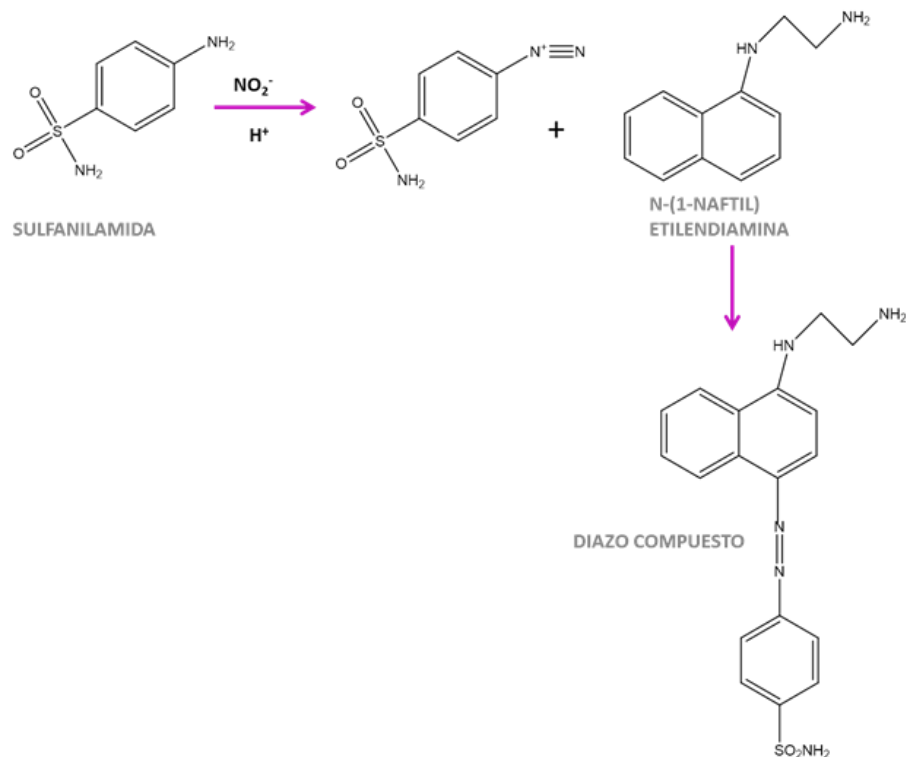


Figura 2.3. Reacción de Griess

La reacción de Griess es ampliamente utilizada en la industria alimenticia, por ejemplo, para la determinación de iones nitrito en productos cárnicos⁶².

Sin embargo, Nortwitz y Kellher propusieron emplear la anilina en lugar de la sulfanilamida y, de esta manera, determinar su concentración⁶³. A partir de allí, esta reacción también ha sido empleada para la diazotización y determinación de compuestos que contienen un grupo amino primario en su estructura⁶⁴.

⁶² AOAC 973.31-1996(1997) Official Methods of Analysis Nitrites in cured meat. Colorimetric met. Colorimetric method, 93.

⁶³ G. Norwitz, P. Kellher, Spectrophotometric determination of aniline by the diazotization-coupling method with N-(1-Naphthyl)ethylenediamine as the coupling agent. Analytical Chemistry, 53, 1238–1240, 1981.

⁶⁴ Y. Liu, C. Zeng, C. Wang, L. & Zhang, Continuous diazotization of aromatic amines with high acid and sodium nitrite concentrations in microreactors. Journal of Flow Chemistry, 8, 139-146, 2018. doi:10.1007/s41981-018-0018-1

2.2 DETERMINACIÓN DE CLENBUTEROL EN MUESTRAS DE LACTOREEMPLAZANTES

2.2.1 Problemática

La demanda actual de carne de res como fuente de proteínas, sobre todo en nuestro país, es significativamente alta. Por ello, se requiere aumentar la producción de carne en el menor tiempo posible. Una forma de incrementar la cantidad y la eficiencia de la producción de carne es la administración de fármacos agonistas β 2-adrenérgicos al ganado vacuno, principalmente a los terneros, mediante la alimentación. Los agonistas β 2-adrenergicos, en dosis alta, poseen acción anabólica no esteroidea, ya que aumentan la masa muscular y reducen la grasa corporal⁶⁵. Sin embargo, tienen efectos secundarios severos, producidos por las altas dosis, como arritmias, palpitaciones, isquemia miocárdica, aumento de la glucosa en sangre y un ligero riesgo de daño renal.

Dentro de los ingredientes farmacéuticos activos con acción agonista β 2 se encuentra el Clorhidrato de Clenbuterol (CLB)⁶⁶. Este fármaco es utilizado ilegalmente como promotor del crecimiento en el ganado para aumentar la producción de carne, ya que su empleo no está aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA, según sus siglas en inglés)⁶⁷.

⁶⁵ B. Velasco-Bejarano, A. Gomez-Tagle, M. O. Noguez-Cordova, M. L. Zambrano-Zaragoza, A. Miranda-Molina, J. Bautista, L. Rodríguez, R. Velasco-Carrillo, Determination of clenbuterol at trace levels in raw gelatin powder and jellies using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Food Chemistry* 370, 131261, 2022. doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131261

⁶⁶ A. C. Hackney. (2018). Chapter 6 -Beta-2 Agonists. *Doping, Performance Enhancing Drugs, and Hormones in Sport Mechanisms of Action and Methods of Detection*, 1ª Edición. ISBN: 9780128134436

⁶⁷ A. A. Al-Majed, N. Y. Khalil, I. Khbrani, H. A. Abdel-Aziz, Clenbuterol Hydrochloride. *Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology*. College of Pharmacy, King Saud University, Riyadh, Saudi Arabia, 91–123, 2017. doi:10.1016/bs.podrm.2017.02.002

La alimentación de los terneros hasta los 6 meses de edad está conformada principalmente de leche, por lo que se agregan altas dosis de CLB a los lactoreemplazantes (leche en polvo) durante su reconstitución, inmediatamente antes de alimentar a los animales⁶⁸.

Se han propuesto varios métodos analíticos para la determinación de CLB, aplicados principalmente a muestras biológicas y utilizando técnicas de separación^{69,70,71}.

2.2.2 Objetivos

En este trabajo se plantea la determinación de CLB en muestras de lactoreemplazantes, empleando la técnica de SPE y derivatización post-elución mediante la aplicación de la reacción de Griess. Se emplea como adsorbente un MIP comercial, lo que le otorga mayor selectividad al método propuesto. Para lograr una mayor simplificación del procedimiento, se propone su automatización mediante el uso de la técnica FBA.

⁶⁸ R. Stella, D. Bovo, E. Mastrorilli, E. Manuali, M. Pezzolato, E. Bozzetta, F. Lega, R. Angeletti, G. Biancotto, A novel tool to screen for treatments with clenbuterol in bovine: Identification of two hepatic markers by metabolomics investigation. *Food Chemistry* 353,129366, 2021. doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129366

⁶⁹ M. K. Parr, G. Opfermann, W. Schänzer, Analytical methods for the detection of clenbuterol. *Bioanalysis* , 1, 437–450, 2009. doi:10.4155/bio.09.29

⁷⁰ R. Widiastuti , Y. Anastasia, Clenbuterol residue in beef meat collected from several cities In Java Island, Indonesia. *JITV* 23, 89-94, 2018. doi.org/10.14334/jitv.v23i2.1621

⁷¹ Y. Bao, F. Yang, X. R. Yang, Capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence for the facile separation and determination of salbutamol and clenbuterol in urine. *Electroanalysis*, 24, 1597–603, 2012. doi.org/10.1002/elan.201200098

2.2.3 Parte experimental

2.2.3.1. Reactivos y soluciones

Los reactivos empleados fueron de calidad analítica y las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura ($> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

- Los solventes utilizados para el procedimiento de SPE empleando un MIP (MISPE) fueron: metanol, MeOH (99,8%, grado HPLC, Merck, Alemania) y acetonitrilo, ACN ($\geq 99\%$, Merck, Alemania).
- Soluciones de CLB (Sigma-Aldrich, Alemania). Se preparó una solución patrón de 200 mg L^{-1} , pesando la cantidad adecuada de CLB y diluyendo en MeOH. Esta solución se guardó a 4°C en botella color caramelo. A partir de esta solución patrón, se preparó diariamente una solución de trabajo de concentración 30 mg L^{-1} en MeOH. Esta se usó para la preparación de las soluciones testigo ($0,075\text{-}0,500 \text{ mg L}^{-1}$), tomando el volumen adecuado y diluyendo con una solución de acetato de amonio, AcNH_4 (Anedra, Argentina) de concentración $0,025 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 6,7).
- Solución de ácido tricloroacético, TCA (Merck, Alemania) al 1,0% (p/v) en MeOH.
- Solución de ácido trifluoroacético, TFA (Merck, Alemania) al 1,0% (p/v) en MeOH.
- Solución de dodecilsulfato de sodio, SDS (Anedra, Argentina) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$.
- Solución de nitrito de sodio, NaNO_2 (Merck, Alemania) $0,025 \text{ mol L}^{-1}$, preparada en 50% (v/v) de agua/MeOH.
- Solución de N-(1-naftil) etilendiamina, NED (Carlo Erba, Argentina) de concentración $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, preparada en 50% (v/v) de agua/MeOH.

- Solución acuosa de ácido clorhídrico, HCl (37%, Merck, Alemania) 4,6 mol L⁻¹.
- Sulfato de amonio, (NH₄)₂SO₄ (Anedra, Argentina).
- Cartuchos utilizados para el procedimiento MISPE, SupelMIP® SPE-Clenbuterol (lecho wt. 25 mg, volumen 10 mL), adquiridos en Sigma Aldrich (53201-U SUPELCO).
- Soporte de guarda-columna Chromolith® 5-4,6 mm (Merck, Alemania).

2.2.3.2 Instrumentos, aparatos y software.

- *Cámara de mezclado y detección (CMD)*. La misma fue diseñada en nuestro laboratorio y se muestra en la Figura 2.4. Está conformada por un bloque de PTFE, cuyo volumen interno es de 1,2 mL. Posee, además, cuatro entradas laterales y una salida para el vaciado en la parte inferior.

Para lograr la detección, la CMD cuenta con dos ventanas de vidrio óptico de 10 mm de diámetro, colocados de manera opuesta. Así mismo, para conseguir una mezcla eficiente de las soluciones, se diseñó un sistema de agitación a partir de una varilla de PTFE acoplada a un ventilador de un microprocesador (Intel®, DC 12V, 28 G). El sistema de agitación se colocó en la parte superior de la CMD.
- *Bomba peristáltica Gilson® Minipuls 3*. Utilizadas para propulsar las soluciones al sistema FBA.
- *Bomba peristáltica Ismatec mini-S 420* (Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Alemania). La misma actúa como bomba auxiliar para el vaciado de la CMD.
- *Válvulas solenoides de tres vías* (NResearch®).

- *Tubos de bomba de Tygon® MHL* de 1,14 mm d.i. (para solventes orgánicos) y de Tygon® estándar de 1,14 mm d.i. (para soluciones acuosas). Las conexiones en el sistema se llevaron a cabo con tubos de PTFE (0,5 mm d.i.).
- *Espectrofotómetro Agilent 8453*. Utilizado para realizar las medidas espectrofotométricas (longitud de onda 500 nm; tiempo de integración de 0,5 segundos; intervalos de 1 nm).
- *Programa de automatización del sistema FBA*. Desarrollado en LabVIEW® 5.1 (National Instruments), para controlar las bombas peristálticas, las válvulas solenoides y el dispositivo agitador que conforman el sistema FBA, a través de un accionador electrónico de siete salidas conectado a un microcomputador Pentium® 4.
- *Centrífuga (Rolco 2036, Argentina)*. Utilizada para el tratamiento de la muestra.

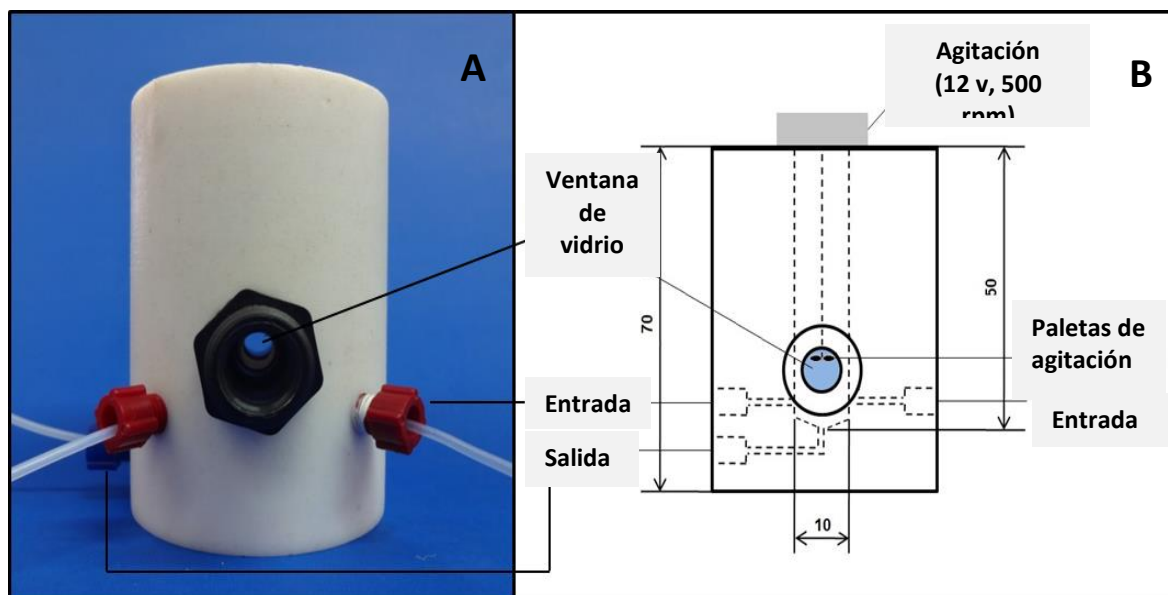
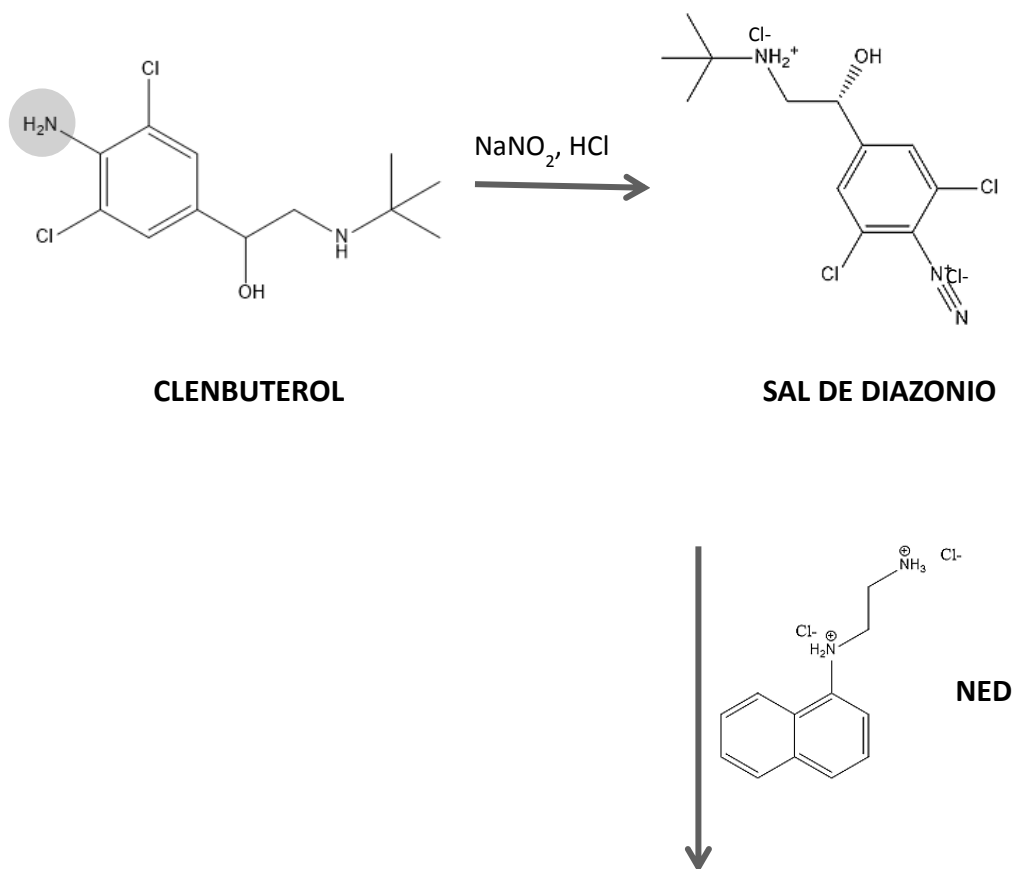
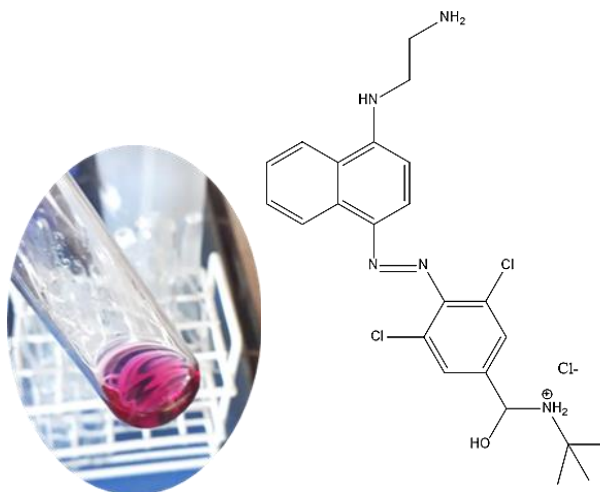


Figura 2.4. Foto, esquema y dimensiones de la CMD diseñada y construida en nuestro laboratorio. A: vista lateral de la CMD; B: Diagrama esquemático de la vista lateral. (Las dimensiones se expresan en mm).

2.2.3.3 Reacción de derivatización y sistema automatizado de análisis Flow-Batch.

En este trabajo, se propuso la determinación de CLB mediante una reacción de diazotación para obtener un compuesto coloreado que absorbe en el UV-Vis. El grupo amino aromático del CLB reacciona con los iones nitrito en medio ácido para dar lugar a la formación de un catión diazonio. Esta sal reacciona, posteriormente, con NED formando un azocompuesto, cuya absorbancia máxima se mide a 500 nm. En la Figura 2.5. se muestra el esquema de la reacción correspondiente.





AZO COMPUESTO

Figura 2.5. Esquema de la reacción de diazotación de CLB

Para llevar a cabo la extracción, preconcentración y derivatización del CLB de forma automática se diseñó un sistema FBA, el cual se muestra en la Figura 2.6. Está conformado por la CMD, siete válvulas solenoides (V1 a V7), una bomba peristáltica (BP1) y una bomba peristáltica auxiliar (BP2).

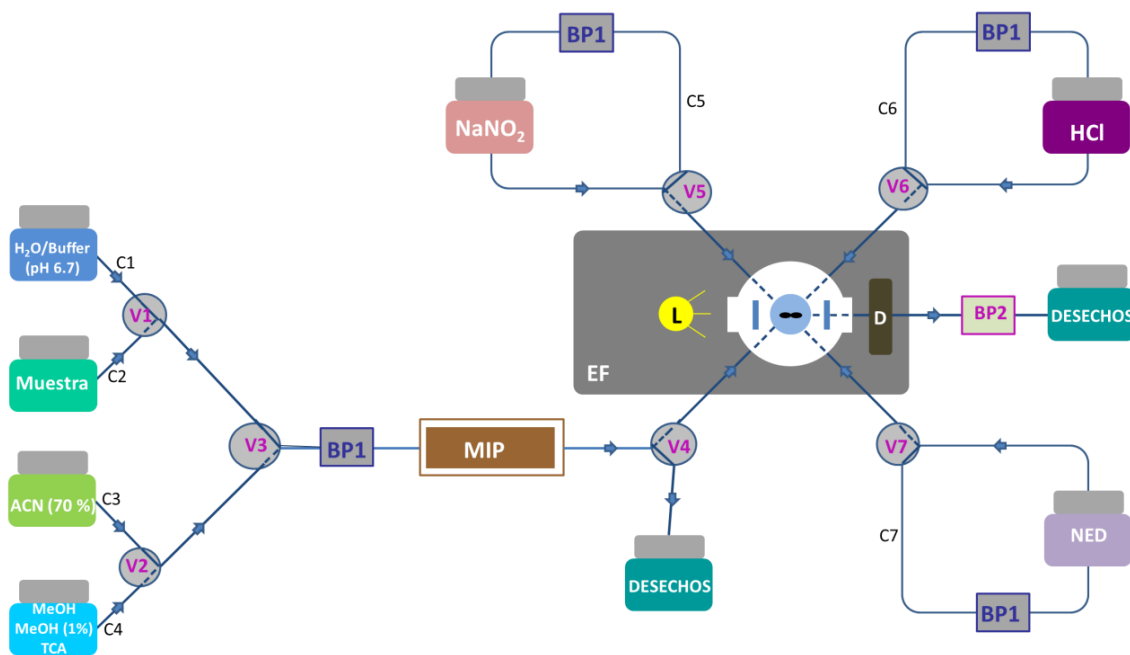


Figura 2.6. Sistema MISPE-FBA para extracción, preconcentración y determinación espectrofotométrica de CLB. V1-V7: válvulas solenoides (la línea continua representa la posición APAGADO y la línea punteada representa la posición ABIERTO); C1-C7: canales de flujo; BP1: bomba peristáltica; BP2: bomba peristáltica auxiliar; MIP: columna de MIP; EF: espectrofotómetro; L: fuente de radiación; D: detector.

La CMD se colocó en lugar del portaceldas en el espectrofotómetro UV-Vis. Por otro lado, se confeccionó una minicolumna (MIP) empleando un cartucho de un MIP para CLB comercial, el cual fue modificado cortándolo a nivel de las fritas para luego introducirlo en un soporte de guarda-columna (Figura 2.7).

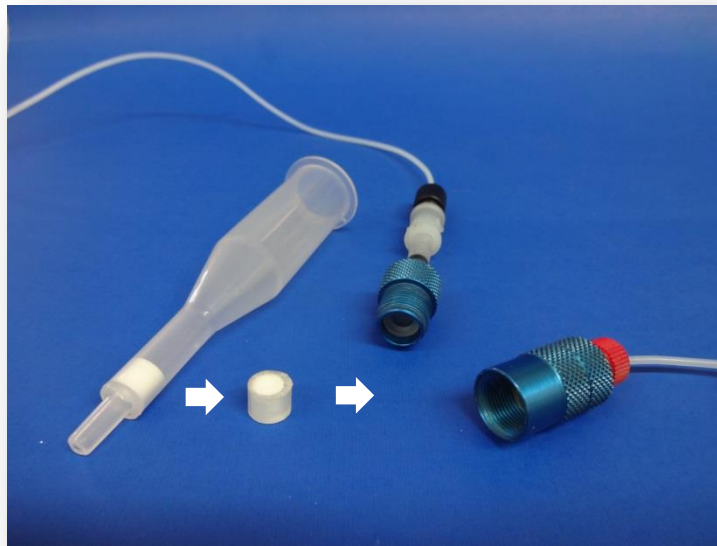


Figura 2.7. Minicolumna empacada con MIP de CLB comercial.

Para una explicación más simple del procedimiento llevado a cabo en el sistema FBA, se lo divide en dos secciones: una primera sección que corresponde a la extracción y preconcentración; y una segunda sección, para la reacción de diazotación y detección. Estas secciones se describen a continuación. Los tiempos de activación de las válvulas y encendido de las bombas peristálticas y el sistema de agitación, pueden observarse en la Tabla 2.1. .

Tabla 2.1. Intervalos de tiempo de conmutación para el sistema MISPE-FBA

INTERVALOS DE TIEMPO DE CONMUTACIÓN (s)											
	V_1	V_2	V_3	V_4	V_5	V_6	V_7	BP1	BP2	AM	
MeOH	A	80	80	A	A	A	A	80	A	A	

EXTRACI3N Y PRECONCENTRA CI3N	Agua	A	A	A	A	A	A	A	80	A	A
	Tamp3n (pH 6,7)	A	A	A	A	A	A	A	80	A	A
	Muestra	400	A	A	A	A	A	A	400	A	A
	ACN (70 %)	A	A	160	A	A	A	A	160	A	A
	TCA 1% en MeOH	A	40	40	40	A	A	A	40	A	A
	NaNO ₂ (1,5 x 10 ⁻³ mol L ⁻¹)	A	A	A	A	10	A	A	10	A	10
	HCl (4,6 mol L ⁻¹)	A	A	A	A	A	24	A	24	A	24
DETERMINACI3N	NED (6,5 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹)	A	A	A	A	A	A	20	20	A	20
	Detecci3n	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
	Vaciado de la CMD	A	A	A	A	A	A	A	A	35	A
	Limpieza de la CMD (TCA 1% en MeOH)	A	A	A	120	A	A	A	120	A	120

A: apagado, AM: agitador magn3tico

Procedimiento de extracci3n y preconcentraci3n

Esta parte del sistema consta de cuatro v3lvulas solenoides (V1 a V4), y cuatro canales (C1, agua o AcNH₄ pH 6,7; C2, soluciones testigo o muestra; C3, una soluci3n de ACN 70%; C4, MeOH o TCA 1% (p/v) en MeOH).

En primer lugar, se llev3 a cabo el acondicionamiento del MIP con 1,0 mL de MeOH (C4). Para ello, se activaron V2 y V3, y la BP1 durante 80 s. Luego se efectu3 un paso de lavado con 1,0 mL de agua (C1), manteniendo V1 y V3 apagadas y activando BP1 durante 80 s. Dado que estos pasos se realizaron al comienzo de la jornada laboral, las soluciones en C1

y C4 se cambiaron manualmente por la solución de AcNH_4 y TCA 1% en MeOH, respectivamente, cuando las válvulas correspondientes y la BP1 estaban apagadas. Posteriormente, se equilibró el adsorbente con 1,0 mL de la solución tampón de AcNH_4 de pH 6,7 (C1). Para ello, se dejó apagada la V1 y la V3 y se activó la BP1 durante 80 s. A continuación, se activó la V1 durante 400 s para pasar por la minicolumna 5,0 mL de solución testigo/muestra (C2). Luego, se llevó a cabo una etapa de lavado, para eliminar restos de muestra y algunos interferentes que puedan quedar débilmente adsorbidos al MIP. Por ello, se pasó 2,0 mL de una solución de ACN al 70% (v / v) (C3), activando la V3 y la BP1 durante 160 s. Finalmente, se llevó a cabo la elución mediante la activación de V2, V3, V4 y BP1 durante 40 s. De esta manera, se pasó 0,5 mL de TCA al 1% (v/ v) en MeOH (C4) por la minicolumna, desorbiendo el CLB del MIP y dirigiendo el mismo hacia la CMD.

Reacción de diazotación y detección

Cuando los 0,5 mL de eluato, proveniente de la etapa de extracción, alcanzaron la CMD, se mezclaron con los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de derivatización.

En esta sección del sistema se utilizan tres canales (C5, NaNO_2 $1,5 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} ; C6, HCl 4,6 mol L^{-1} ; C7, NED $6,5 \times 10^{-4}$ mol L^{-1}) y tres válvulas solenoides (V5 a V7) que controlan la dirección del flujo. Cuando las válvulas están apagadas, la solución es reciclada al contenedor correspondiente, y cuando la válvula se activa, la solución es propulsada a la CMD. Los caudales de todas las soluciones se ajustaron a $0,75 \text{ mL min}^{-1}$. Para llevar a cabo la reacción de diazotación, se activó la V5 y la BP1 durante 10 s para dirigir 125 μL de la solución de NaNO_2 hacia la CMD. Simultáneamente, se activó el sistema de agitación.

Posteriormente, V6 y V7 se activaron secuencialmente para agregar 300 μL y 250 μL de las soluciones de HCl y de NED en la CMD, respectivamente. El producto final obtenido de la reacción de diazotación se midió directamente en la CMD a $\lambda=500$ nm. Luego, se encendió la BP2 para vaciar la CMD.

El último paso consiste en la limpieza de la CMD. Para ello, se activó la V2, V3, V4 y la BP1 durante 120 s, y se llenó la cámara con 2,0 mL de TCA al 1% (v/v) en MeOH. Para lograr una mejor limpieza, se activó simultáneamente el sistema de agitación. Finalmente, la CMD se vació encendiendo la BP2.

2.2.3.4 Análisis de muestras

Las muestras de lactoreemplazantes fueron adquiridas en veterinarias de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. Las mismas fueron preparadas según las indicaciones del fabricante, para lo cual 8,00 g del producto se disolvieron en 60,0 mL de agua a una temperatura aproximada 50-55°C. Luego, se le agregó agua fría hasta un volumen final de 100,0 mL. Para lograr la precipitación de las proteínas de la leche, se agregaron 20,0 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a la muestra, y se dejó en reposo durante 5 min. Luego se centrifugó durante 20 minutos a 448 G, se retiró el sobrenadante y se filtró antes de realizar el análisis con papel de filtro Whatman™ (ancho de poro de 8 μm). (Figura 2.8)

La muestra tratada se diluyó a la mitad con la solución de AcNH_4 de pH 6,7 antes de su introducción en el sistema FBA.

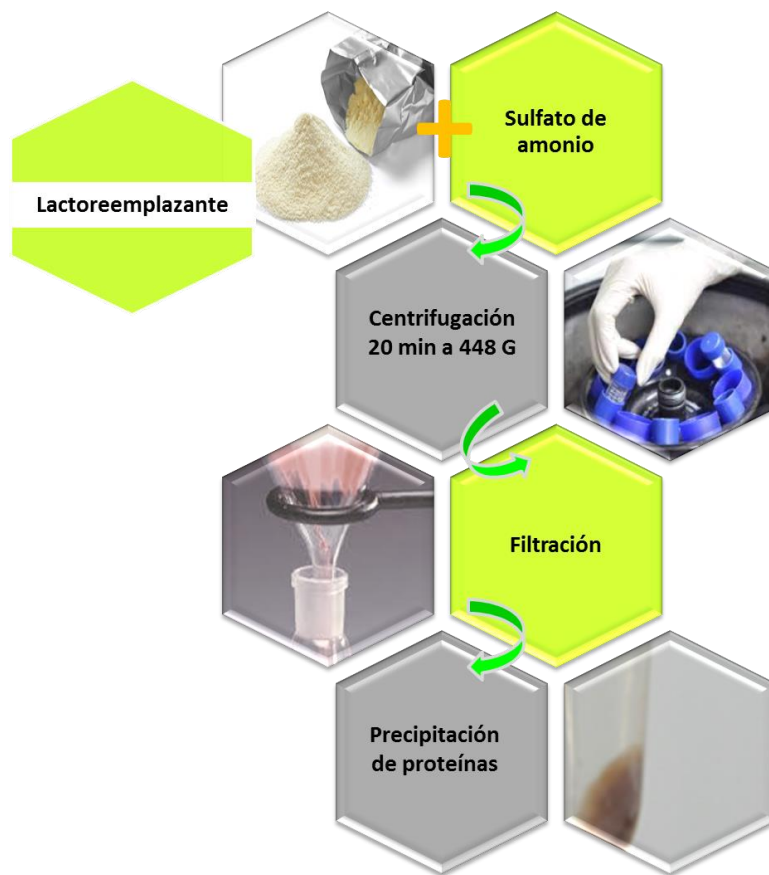


Figura 2.8. Esquema de la preparación de la muestra de lactoreemplazante

Para evaluar la veracidad de método propuesto, se realizó un estudio de recuperación. Para ello, las muestras no tratadas fueron enriquecidas con el analito a dos niveles de concentración dentro del intervalo de calibración (0,200 y 0,350 mg L⁻¹). Los valores de recuperación se calcularon de acuerdo con la definición de AOAC⁷². Los análisis de las muestras se realizaron por triplicado.

⁷² AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures, Arlington, VA, USA, 1998

2.2.4 Resultados y discusión

2.2.4.1 Optimización de las variables del sistema MISPE-FBA

En primer lugar, se estudiaron y optimizaron las diferentes etapas necesarias para llevar a cabo el procedimiento MISPE, teniendo como referencia el procedimiento recomendado para muestras de orina⁷³. En este procedimiento, una vez llevado a cabo el acondicionamiento del MIP, se carga la muestra. A continuación, las sales y los componentes de la matriz que son solubles en agua se lavan haciendo pasar a través del cartucho 1,0 mL de agua. Luego, se realiza vacío durante 2 minutos para semi-secar el polímero y seguidamente, se pasa 1,0 mL de una solución de ácido acético al 2% en ACN para eliminar los compuestos ácidos unidos por interacciones tanto iónicas como hidrofóbicas. Posteriormente, 1,0 mL de una solución de AcNH_4 0,5 mol L⁻¹, de pH 5,0, se utiliza para eliminar interferentes básicos. Finalmente, se usa 1,0 mL una solución de ACN al 70% en agua para romper los enlaces hidrofóbicos y de hidrógeno.

Debido a que el tipo de muestra a analizar es de diferente composición química, y teniendo en cuenta que la reacción de diazotación posterior a la extracción aumenta notablemente la selectividad de la determinación, se evaluó la necesidad de llevar a cabo todos los pasos propuestos por el fabricante. Particularmente, las modificaciones del protocolo original involucraron los pasos de lavado posteriores a la carga de la muestra y anteriores a la elución.

⁷³ C. Widstrand, Extraction of the Beta-Agonist Clenbuterol from Urine Using Clenbuterol SupelMIP. The reporter Europe-A Technical Newsletter for Analytical and Chromatography 25, 6-8, 2007.

Para ello, se utilizaron las muestras propuestas, a las que se les adicionó $0,350 \text{ mg L}^{-1}$ de CLB y se las proceso como se describe en la sección 2.2.3.4. Los resultados obtenidos se compararon con los obtenidos al realizar el procedimiento propuesto (Figura 2.9.)

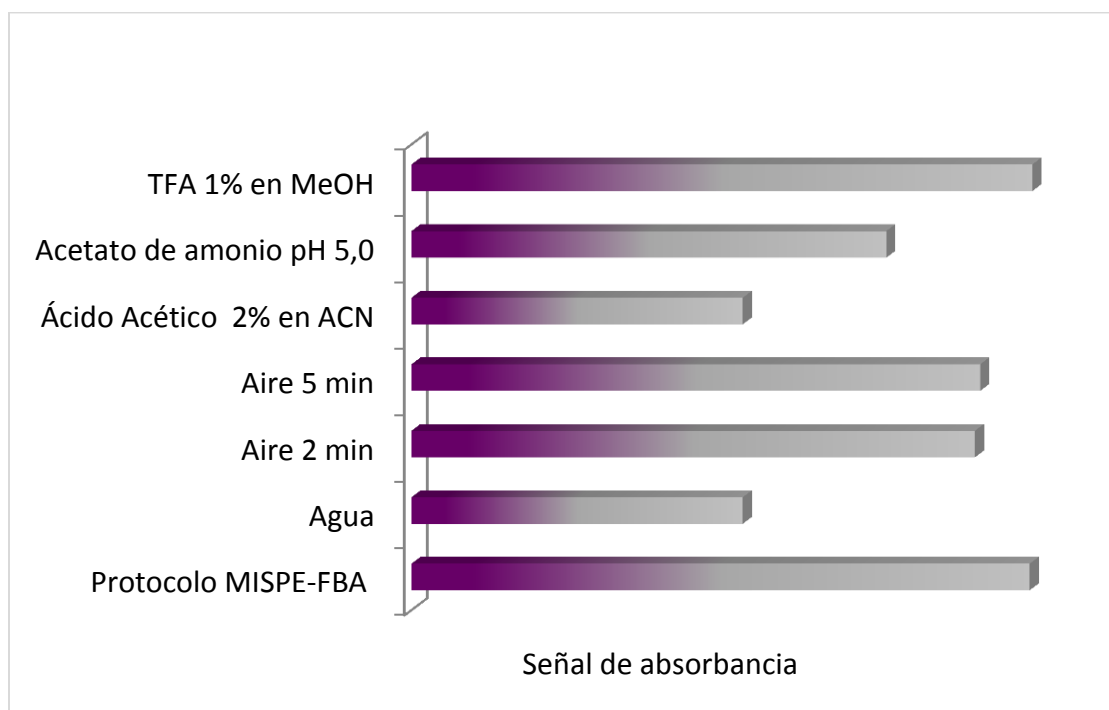


Figura 2.9. Comparación de la señal de absorbancia obtenida para el método propuesto MISPE-FBA y el procedimiento llevado a cabo incluyendo los pasos recomendados por el fabricante

Como se puede observar en la figura, la mayor señal de absorbancia fue obtenida con el protocolo MISPE-FBA, que propone llevar a cabo un solo paso de lavado posterior a la carga de la muestra empleando 2,0 mL de una solución de ACN al 70% en agua. Cuando la columna se lavó con 1,0 mL de agua o con 1,0 mL de ACN en ácido acético al 2%, la señal disminuyó significativamente. Por otro lado, la etapa de semi-secado del MIP del

protocolo original fue reemplazada por una corriente de aire que fluyó a través de la columna durante 2 y 5 minutos. En ningún caso, se observó una diferencia considerable en las señales. Por último, la etapa de lavado que involucra la solución de AcNH_4 también mostró una pequeña disminución en la señal.

El volumen de la solución de ACN al 70% en agua se optimizó entre 1,0 y 4,0 mL, obteniéndose porcentajes de recuperación de más del 90% con 2,0 mL.

Para la elución de CLB se probaron y compararon dos soluciones, una de TFA al 1% (v/v) y otra de TCA al 1% (v/v), ambas preparadas en MeOH. Se obtuvieron resultados similares para ambos ácidos orgánicos. Se seleccionó la solución de TCA debido a la menor toxicidad.

En la Tabla 2.2. se observa una comparación realizada entre el protocolo original para la utilización del MIP, y el optimizado para las muestras de lactoreemplazantes. El procedimiento fue llevado a cabo empleando un caudal de $0,75 \text{ mL min}^{-1}$.

Tabla 2.2. Comparación entre el protocolo original para el empleo de los MIPs comerciales según referencia ⁷³, y el optimizado para el método MISPE-FBA propuesto.

PROCEDIMIENTO CONVENCIONAL SPE-MIP PARA MUESTRAS DE ORINA		PROCEDIMIENTO SPE-MIP PARA MUESTRAS DE LACTOREEMPLAZANTES	
Volumen (mL)		Volumen (mL)	
MeOH	1,0	MeOH	1,0

H ₂ O	1,0	H ₂ O	1,0
AcNH ₄ 0,025 mol L ⁻¹ pH 6,7	1,0	AcNH ₄ 0,025 mol L ⁻¹ pH 6,7	1,0
MUESTRA	5,0	MUESTRA	5,0
H ₂ O	1,0	H ₂ O	N/C ^a
VACIO	2 min	VACIO	N/C ^a
Ácido acético 2% en ACN	1,0	Ácido acético 2% en ACN	N/C ^a
AcNH ₄ 0,5mM pH 5,0	1,0	AcNH ₄ 0,5mM pH 5,0	N/C ^a
ACN 70% en H ₂ O	1,0	ACN 70% en H ₂ O	2,0
TFA 1 % en MeOH	2,0	TCA 1 % en MeOH	0,5

^a N/C= no corresponde

2.2.4.2 Optimización del volumen de muestra y caudal.

Para la optimización del volumen de carga de la muestra, se tuvo en cuenta la respuesta analítica y el tiempo de análisis. Para llevar a cabo este estudio, se cargaron volúmenes entre 1,50 a 20,0 mL de una solución estándar CLB de 0,500 mg L⁻¹ en la columna MIP, siguiendo el procedimiento propuesto en la sección anterior. Como resultado, se observó un aumento de la señal de la absorbancia de forma lineal con el volumen de la muestra. Así mismo, el tiempo de análisis también fue significativamente mayor a medida que se incrementó el volumen de la muestra. Teniendo en cuenta una relación favorable entre el

tiempo de análisis y la sensibilidad del método, se seleccionó un volumen de 5,0 mL para determinaciones posteriores. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que es posible cargar mayores volúmenes de muestra para incrementar el factor de enriquecimiento si fuese necesario.

Por otro lado, se realizó el estudio de la influencia del caudal de carga de la muestra en la señal analítica, estando el intervalo estudiado entre 0,50-1,00 mL min⁻¹. Se eligió un caudal de 0,75 mL min⁻¹ como el máximo caudal posible debido a inconvenientes de sobrepresión generados en la parte de preconcentración del sistema.

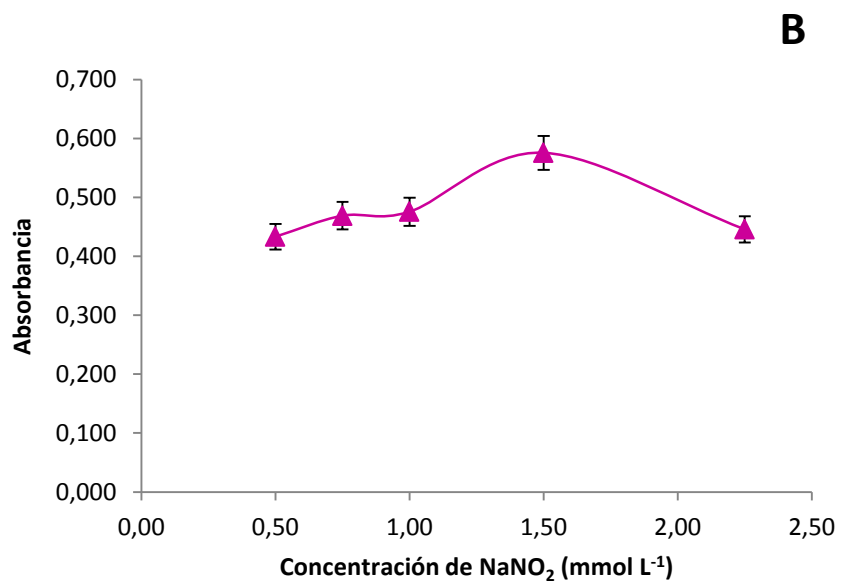
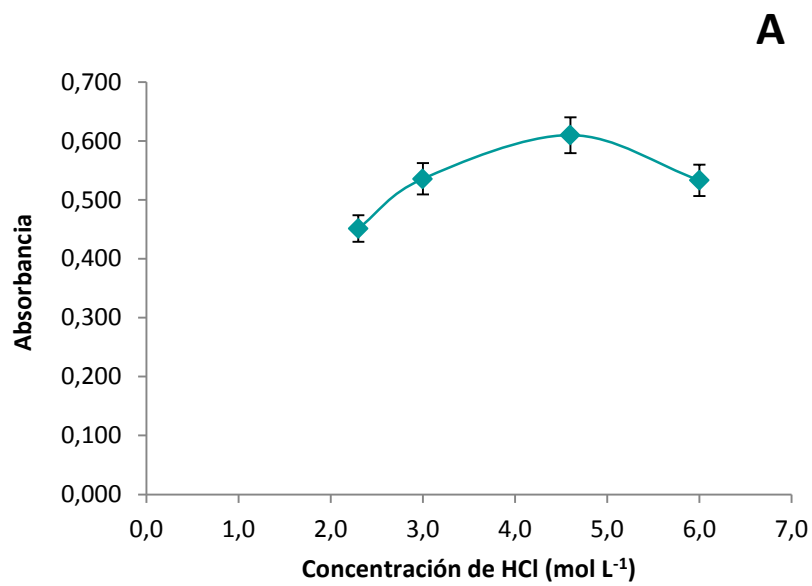
2.2.4.3 Optimización de las variables de la reacción de diazotación.

Se realizó la optimización de las condiciones experimentales para la reacción de diazotación, y se eligieron los valores óptimos teniendo en cuenta la mayor señal de absorbancia y la repetibilidad de las mediciones.

Optimización de la concentración y volumen de los reactivos

Se realizaron diferentes pruebas preliminares para evaluar la concentración y los volúmenes de cada reactivo de manera individual. Para ello, se tuvo en cuenta la menor dilución posible del eluato y el volumen total mínimo requerido para realizar la medida de la señal en la CMD (1,275 mL). Cabe mencionar que se obtuvieron señales del blanco bajas y constantes a la longitud de onda de trabajo.

La Figura 2.10 muestra los resultados obtenidos de cada reactivo utilizado en la reacción de diazotación.



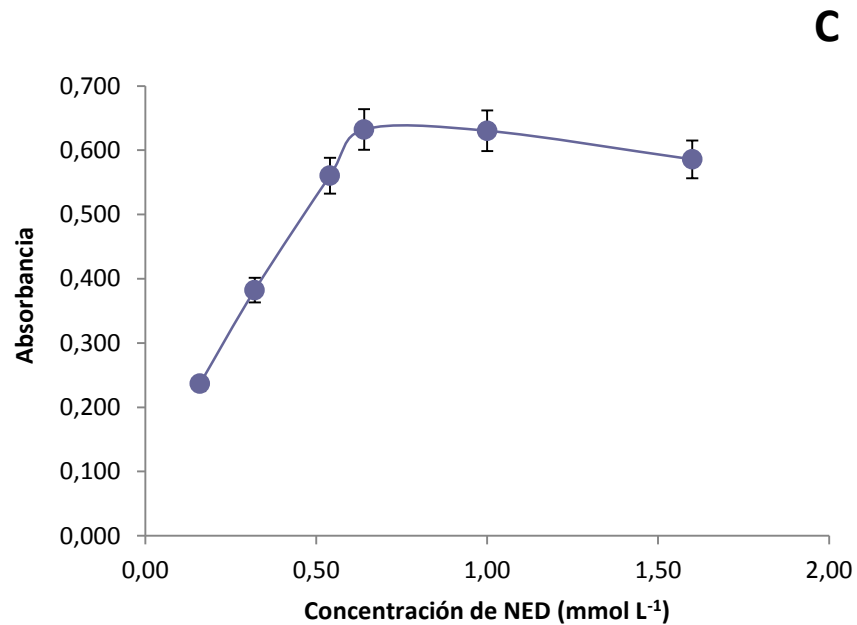


Figura 2.10. Optimización de la concentración de los reactivos de la reacción de diazotación de CLB. A: concentración de HCl para un volumen de 300 μL ; B: concentración de NaNO_2 para un volumen de 125 μL ; C: concentración de NED para un volumen de 250 μL .

En la Tabla 2.3. se resumen los intervalos de concentración estudiados y sus correspondientes valores óptimos.

Tabla 2.3. Intervalos de concentración estudiados y valores óptimos para llevar a cabo la determinación de CLB

Reactivos	Volumen (μL)	Intervalo de concentración	Valor óptimo
HCl (mol L^{-1})	300	2,3-6,0	4,6
NaNO ₂ (mmol L^{-1})	125	0,75-2,25	1,50
NED (mmol L^{-1})	250	0,32-1,60	0,65

Por otro lado, se estudió el orden de agregado de los reactivos de la reacción de diazotación en la CMD. Para ello, se propusieron cuatro posibles combinaciones manteniendo la adición de NED al final de la secuencia:

A: CLB-HCl-NaNO₂-NED;

B: NaNO₂-CLB-HCl-NED;

C: NaNO₂+HCl-CLB-NED;

D: CLB-NaNO₂-HCl-NED

No se observó una variación significativa de la señal espectrofotométrica entre estas secuencias. Debido a esto, para seguir el mismo orden de adición para todos los experimentos, la reacción se realizó utilizando la secuencia A.

Adición de Tensioactivo

Según lo reportado en la bibliografía^{74,75}, la adición de tensioactivos en la reacción de diazotación puede incrementar la señal al aumentar la velocidad de la reacción.

Para comprobar esto, se adicionaron 100 μL de una solución de SDS de concentración $8,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ después de la adición de la solución CLB. Se realizó un ajuste en la concentración de los reactivos para mantener la relación entre las concentraciones y el volumen final requerido. Como resultado de este ensayo, no se obtuvo un aumento significativo en la velocidad de reacción, por lo cual se concluyó que su uso no aportaría ventaja alguna.

Temperatura y tiempo de reacción

Las reacciones de diazotación dependen del tiempo y de la temperatura. Por esta razón, se procedió al estudio de ambos parámetros.

Para determinar la temperatura a la cual la reacción se produce más eficazmente, se probaron temperaturas en el intervalo entre 20°C (temperatura ambiente) y 40°C . Para ello, se procedió a trabajar “en batch”, midiendo la absorción luego de colocar la mezcla entre los reactivos y el analito, en un baño de agua termostatzado de 0 a 7 minutos. Se observó que las temperaturas superiores a 37°C inhibían el desarrollo del color, lo que

⁷⁴ Spectrophotometric Determination of Sulphamethazine by the Diazotisation-Coupling Method with m-Aminophenol as the Coupling Agent-Application to Pharamaceutical. Rafidain Journal of ScienceChemistry, Special Issue, 3, 7-14, 2005

⁷⁵ G. Ramis Ramos, J. Esteve Romero, M. García Alvarez-Coque, Colorimetric determination of arylamines and sulphonamides by diazotization and coupling in a micellar solution, Analytica Chimica Acta 223, 327–337, 1989.

está de acuerdo con lo encontrado en la bibliografía⁷⁶. Se observó un pequeño aumento de la señal a temperaturas entre 20 °C y 35 °C en función del tiempo. Sin embargo, no representó un aumento significativo en la sensibilidad, por lo que se decidió a realizar los ensayos a temperatura ambiente.

Luego, se procedió al estudio de la reacción de diazotación en función del tiempo. Luego del agregado de la totalidad de los reactivos, se realizó un seguimiento de la reacción durante 15 minutos a la temperatura de reacción ya optimizada. Se observó un incremento de la señal de absorbancia durante los primeros 4 minutos, luego de los cuales la señal permaneció constante. Por ende, se seleccionó el tiempo de 4 minutos para realizar las mediciones.

2.2.4.4 Parámetros analíticos

El método MISPE-FBA fue evaluados en términos de linealidad, límite de detección (LOD), precisión, y veracidad. En primer lugar, se construyó la curva de calibración siguiendo el procedimiento previamente propuesto. La Tabla 2.4 resume los parámetros analíticos calculados para el método propuesto.

⁷⁶ D. Fernandes, A. Gomes, M.M. de Fontes, G.B. da Costa, V. de Almeida, M. Ugolino de Araújo, R. Galvão, G. Vêras, UV-Vis spectrometric detection of biodiesel/diesel blend adulterations with soybean oil, J. Braz. Chem. Soc. 25,169–175, 2014. doi.org/10.5935/0103-5053.20130259

Tabla 2.4. Parámetros analíticos obtenidos para el método propuesto

PARAMETROS ANALITICOS	
INTERVALO LINEAL (mg L ⁻¹)	0,075-0,500
PENDIENTE	0,637 ± 0,029
ORDENADA AL ORIGEN	0,025 ± 0,008
R ²	0,998
LOD (mg L ⁻¹)	0,021
REPETIBILIDAD (RSD%) ^a	1,1
PRECISION INTERMEDIA (RSD%) ^b	3,0
FRECUENCIA DE MUESTREO (h ⁻¹)	3,4

^a n = 8. ^b Medir por triplicado durante 3 días; LOD calculado como $3s / A$, donde, s: desviación estándar. A: pendiente de la curva de calibración.

La frecuencia de muestreo se calculó teniendo en cuenta todo el proceso analítico, desde la extracción en el MIP hasta el lavado de la CMD. El valor obtenido fue comparable con la determinación llevada a cabo por LC-MS⁷⁷. La evaluación de la veracidad se discute en la sección siguiente.

2.2.4.5 Análisis de muestras

Se aplicó el método MISPE-FBA a dos muestras de lactoreemplazantes comerciales (1 y 2). Las muestras poseen en su composición nutricional proteínas (21-25%), grasas (calculadas

⁷⁷ O. Peñuela-Pinto, S. Armenta, F. Esteve-Turrillas, M. de la Guardia, Selective determination of clenbuterol residues in urine by molecular imprinted polymer—ion mobility spectrometry, *Microchemical Journal*, 134, 62–67, 2017. doi:10.1016/j.microc.2017.05.008

como extracto de éter, 10-15%), lactosa (39-43%) y pequeñas cantidades de minerales y vitaminas. La muestra 2 posee, además, dos antibióticos utilizados en medicina veterinaria, oxitetraciclina y sulfato de neomicina, en cantidades no informadas en el rótulo del producto.

Para llevar a cabo la optimización del pre-tratamiento de las muestras, ambas fueron preparadas teniendo en cuenta las indicaciones del fabricante y enriquecidas con el analito, para obtener una concentración final de $0,350 \text{ mg L}^{-1}$. Cabe destacar que no fueron hallados residuos de CLB en las muestras seleccionadas por encima del LOD del método. Una vez preparadas, las muestras fueron centrifugadas y filtradas, se tomó el sobrenadante y se procedió a realizar las medidas según el método propuesto. Se obtuvieron porcentajes de recuperación por debajo de los esperados (valores entre 70 y 76%), atribuyendo estos resultados a la presencia de proteínas en la muestra. Por esta razón, se decidió realizar la precipitación de las proteínas. En esta instancia, se consideraron los métodos más utilizados y ampliamente conocidos para precipitar o desnaturalizar proteínas ⁷. Se eligió la utilización de sal porque se consideró que era el método más compatible con el método propuesto. Se probaron dos sales, NH_4SO_4 y AcNH_4 . En 10,0 mL de muestra de lactoreemplazante se agregaron diferentes cantidades de las sales (2,0-6,0 g) y se mezclaron hasta lograr la disolución completa de la sal. Luego, la muestra se dejó reposar durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó durante 20 minutos y el sobrenadante se retiró y se filtró antes de realizar el análisis. Los porcentajes de recuperación más altos se obtuvieron utilizando 4,0 g de NH_4SO_4 . En la Figura 2.11. se muestra una comparación de los resultados obtenidos con y sin precipitación.

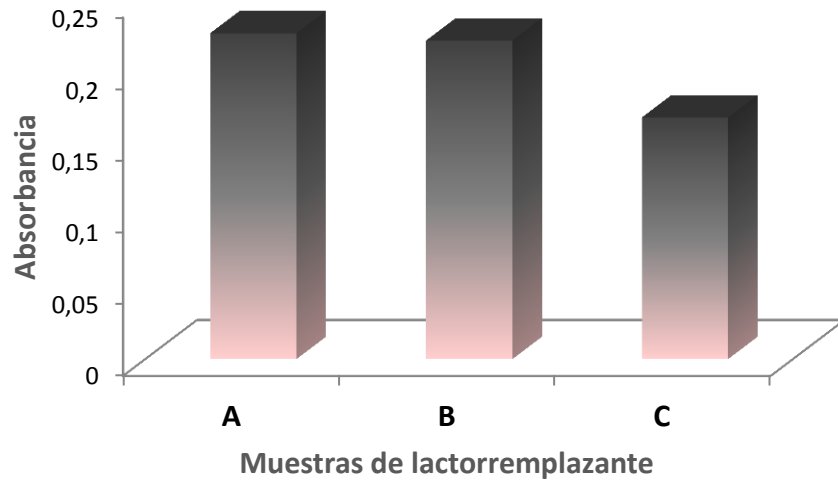


Figura 2.11. Comparación de los resultados obtenidos para la muestra 1 con y sin precipitación de proteínas. A: solución estándar de CLB $0,35 \text{ mg L}^{-1}$; B: muestra con agregado de $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ de CLB después de la precipitación de proteínas; C: muestra con agregado de $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ de CLB sin precipitación de proteínas.

Además, se optimizaron la velocidad (entre 112 a 448 G) y el tiempo de centrifugación (10 a 30 min). Los valores de recuperación más altos se obtuvieron centrifugando las muestras a 448 G durante 20 minutos.

Para evaluar la veracidad del método propuesto, se llevó a cabo un estudio de recuperación. Para ello, ambas muestras fueron enriquecidas con el analito a dos niveles de concentración dentro del intervalo de calibración, $0,200$ y $0,350 \text{ mg L}^{-1}$, una vez preparadas y antes de comenzar el pre-tratamiento.

Como se muestra en la Tabla 2.5., los porcentajes de recuperación obtenidos variaron entre $94,0$ a $100,0\%$ para ambas muestras.

Tabla 2.5. Estudio de recuperación para las muestras de lactoreemplazante.

MUESTRA	CLB ADICIONADO (mg L ⁻¹)	CLB RECUPERADO (mg L ⁻¹)	R (%)
1	0,200	0,200 ± 0,010	100,0
	0,350	0,329 ± 0,008	94,0
2	0,200	0,195 ± 0,003	97,5
	0,350	0,339 ± 0,022	96,8

La Figura 2.12. muestra los espectros de la solución estándar de CLB de 0,350 mg L⁻¹, los espectros de las muestras no enriquecidas y las muestras enriquecidas en el nivel de concentración de 0,350 mg L⁻¹.

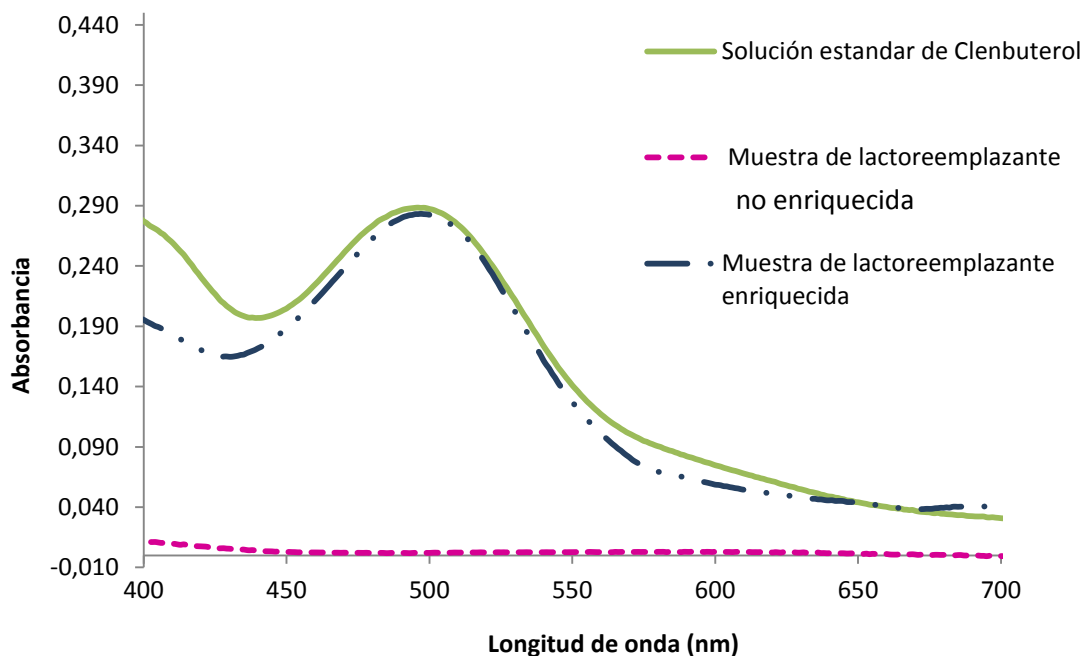


Figura 2.12. Espectros de absorción de las muestras de lactoreemplazantes con y sin el agregado de CLB.

Los resultados obtenidos con el método MISPE-FBA propuesto fueron satisfactorios, demostrando la capacidad y la versatilidad del método para ser aplicables a muestras complejas incluso en presencia de otros ingredientes farmacéuticos activos, como los antibióticos, en su formulación (muestra 2).

Es importante resaltar que las dosis comunes de CLB que se administran a los terneros para generar crecimiento oscilan entre 10 y 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ por día^{78,79}. Considerando que el consumo de lactoreemplazante por ternero oscila entre 4,0-6,0 litros y teniendo en cuenta que el peso de los terneros aumenta de 30 a 160 kg desde el nacimiento hasta el destete, las concentraciones de CLB que se agregan a la preparación varían entre 0,075 y 0,270 mg L^{-1} . Como conclusión, podemos decir que el método propuesto es adecuado para determinar CLB en muestras de lactoreemplazantes, ya que las concentraciones que se administran se encuentran dentro del intervalo de calibración.

2.2.5 Conclusiones parciales

Se desarrolló un sistema automático FBA para la determinación de CLB empleando como adsorbente un MIP comercial. Para la determinación, se propuso realizar una derivatización utilizando para ello la reacción de Griess. De esta manera se logró la

⁷⁸ P. Williams, I. Pagliani, G. Innes, K. Pennie, C. Harris, P. Garthwait, Effects of a P-agonist (clenbuterol) on growth, carcass composition, protein and energy metabolism of veal calves. *British Journal of Nutrition*, 57, 417–428, 1987.

⁷⁹ V. Schindler, I. Feola, Comparación del peso desde el nacimiento hasta el destete de terneros de biotipos Braford y cuarterones en la región del NEA, Argentina. *Zootecnia Tropical*, 30, 327–333, 2012.

extracción, preconcentración y cuantificación del analito en muestras complejas con una mayor selectividad y sensibilidad, obteniendo parámetros analíticos satisfactorios.

Cabe destacar que se amplió la aplicación del MIP comercial, ya que este está destinado a la determinación de CLB en muestras de orina. Además, con el método MISPE-FBA propuesto se logró la reducción de los pasos sugeridos por el fabricante del MIP, lo que disminuyó el tiempo de análisis y condujo a una disminución tanto de los residuos generados como del volumen de disolventes utilizados.

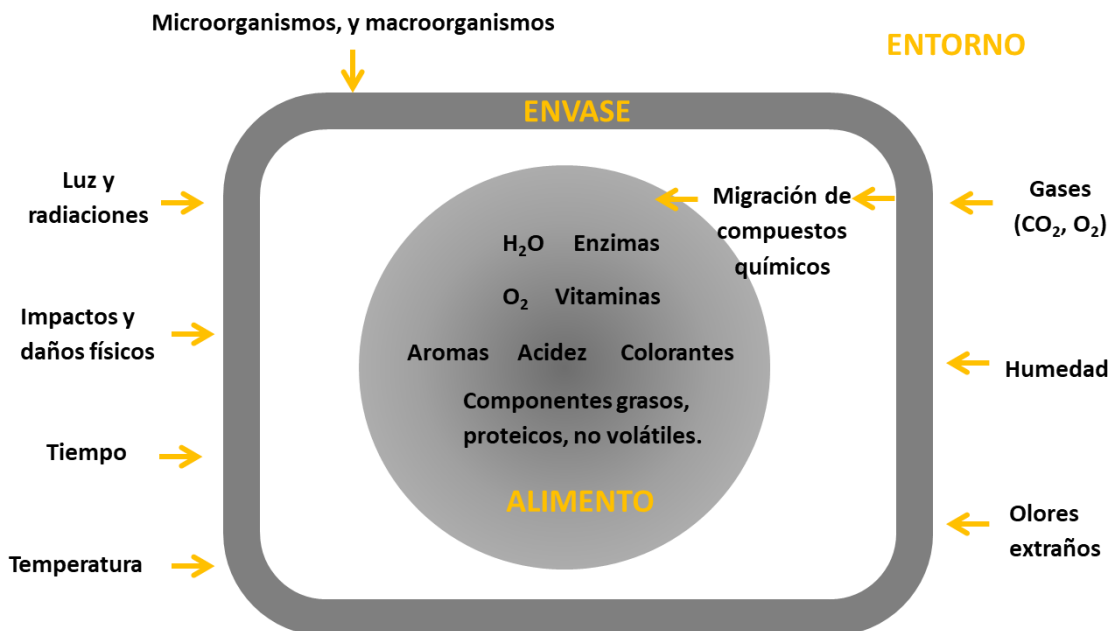
El nuevo método se aplicó con éxito a la determinación de CLB en muestras de lactoreemplazantes.

2.3 Determinación de aminas aromáticas primarias provenientes de envases

2.3.1 Problemática

Uno de los objetivos primordiales de la industria agroalimenticia es el desarrollo de envases para la conservación y almacenamiento de los alimentos de modo de alargar su vida útil y protegerlos de agentes externos⁸⁰.

En cualquier tipo de envase, existe una interacción alimento/envase/entorno que condiciona la conservación del producto envasado (Figura 2.13.). De las posibles interacciones, la migración de residuos y aditivos del material del envase hacia el alimento alcanza una particular relevancia, por su impacto en la calidad y seguridad de los alimentos envasados⁸¹.



⁸⁰ L. Piergiovanni, S.Limbo. (2016). Food packaging materials. Basel, Switzerland: Springer. ISBN: 978-3-319-24730-4

⁸¹ R. Catalá, R. Gavara. (2002). Migración de componentes y residuos de envases en contacto con alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Cytel. ISBN: 8492094249.

Figura 2.13. Sistema alimento/envase/entorno. Migración envase/alimento.

Actualmente, se dispone de una gran diversidad de envases de alimentos, de los cuales se destacan los envases multicapa. Los mismos están formados por varias capas ultrafinas de materiales plásticos (polietileno, polipropileno) y no plásticos (papel, cartón, aluminio, entre otros), unidas mediante el uso de adhesivos cuya formulación se realiza con sistemas de poliuretano (PU) aromático⁸². Los adhesivos a base de PU son preparados a partir de monómeros de diisocianatos y polioles (Figura 2.14.)⁸³. Las propiedades de estos adhesivos dependen de los monómeros base y sus proporciones, así como de los diferentes procesos de síntesis. Incluso, la mezcla de diisocianatos es lo más común, pudiéndose encontrar más de un diisocianato formando parte del adhesivo⁸⁴.

Cuando el adhesivo no se cura apropiadamente o los componentes se mezclan incorrectamente, los monómeros de diisocianato pueden migrar a través de las capas del envase e hidrolizarse en contacto con agua, dando lugar a la formación de aminas aromáticas primarias (AAPs)⁸⁵. Los tratamientos térmicos, como la pasteurización y la esterilización, también son una ruta potencial para producir AAPs. Entre los diisocianatos más comunes se encuentran el 2,4-diisocianato de tolueno y el 4,4'-diisocianato de difenil

⁸² Y. Sanchis, V. Yusà, C.Coscollà, Analytical strategies for organic food packaging contaminants. *Journal of Chromatography A*, 1490, 22-46, 2017. doi:10.1016/j.chroma.2017.01.076

⁸³ X. Ma, H. Sui, X. Sun, M. M. Ali, A. A. Debrah, Z. Du, A risk classification strategy for migrants of food contact material combined with three (Q) SAR tools in silico. *Journal of Hazardous Materials*, 419, 126422, 2021. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126422

⁸⁴ M. Aznar, P., Vera, E. Canellas, C. Nerín, P. Mercea, A. Störmer, Composition of the adhesives used in food packaging multilayer materials and migration studies from packaging to food. *Journal of Materials Chemistry*, 21, 4358-4370, 2011.

⁸⁵ M. Campanella, G. Ghaani, F. Quetti, S. Farris, On the origin of Primary aromatic amines in food packaging materials. *Trends Food Science Technology* 46, 137–143, 2015. doi.org/10.1016/j.tifs.2015.09.002

metilo⁸⁶. Estos diisocianatos dan lugar a la formación de 2,4-diaminotolueno (2,4-DAT) y 4,4'-metilendianilina (4,4'-MDA), respectivamente (Figura 2.15), ambas consideradas compuestos potencialmente cancerígenos^{85,87}.

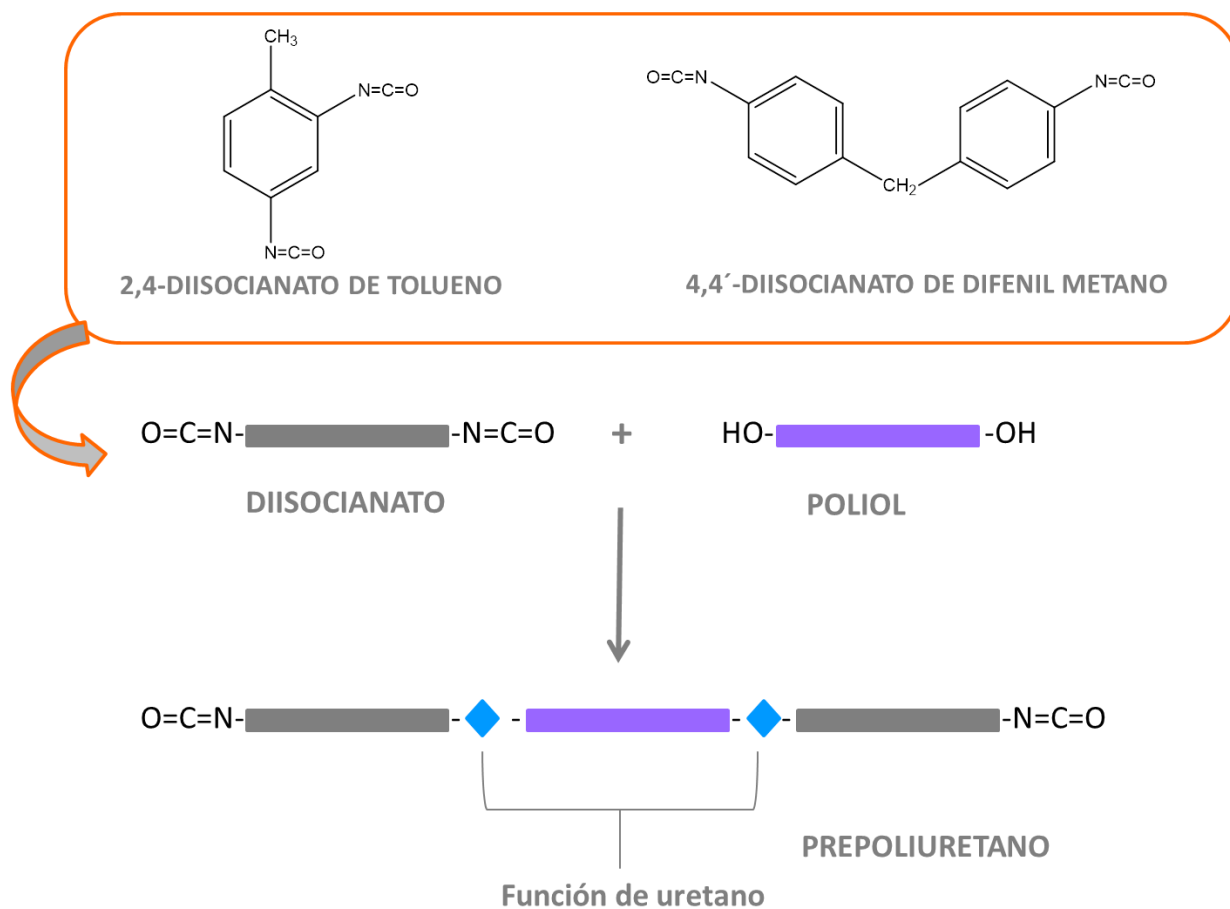


Figura 2.14. Formación de los adhesivos a base de PU, a partir de los diisocianatos más comunes

⁸⁶ M. M. Rahman, M. M. Rabbani, J. K. Saha. (2019). Functional Polymers. Polymers and Polymeric Composites. Springer, Cham. ISBN 978-3-319-92067-2

⁸⁷ G. Masoud, Migration of Primary Aromatic Amines From Food Packaging Materials. Reference Module in Food Science, 2018. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.22482-7

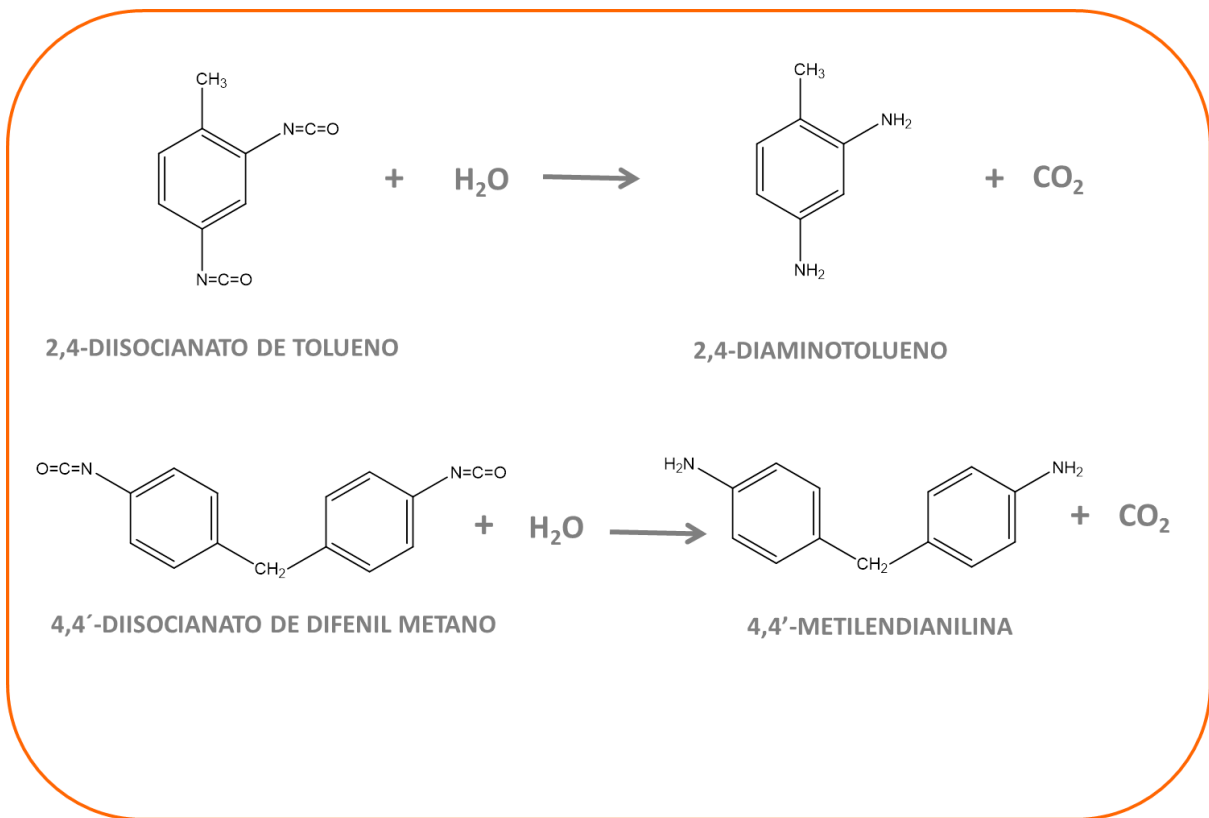


Figura 2.15. Formación de AAPs a partir de los monómeros de diisocianato en contacto con agua

El reglamento N° 10/2011 de la Comisión Reguladora de la Unión Europea (UE) sobre materiales plásticos destinados a estar en contacto con alimentos, establece que el límite de la suma de las AAPs que se pueden encontrar en simuladores de alimentos es de 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ⁸⁸. Por otro lado, el reglamento N° 2020/1245, establece un límite individual inferior para las AAPs potencialmente cancerígenas de 2 $\mu\text{g kg}^{-1}$ ⁸⁹.

⁸⁸ European Commission, Commission Regulation (EU) No. 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Off. J. Eur. Union L 12 (2011)

⁸⁹ Commission Regulation (EU) 2020/1245 of 2 September 2020 amending and correcting Regulation (EU) No 10/2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food, Off. J. Eur. Union L 288/1

Sin embargo, ni el CAA ni el MERCOSUR, establecen límites para las AAPs en envases plásticos, dejando por lo tanto sin una clara legislación a nuestro país⁹⁰.

La determinación de AAPs provenientes de envases se lleva a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas (MS)⁹¹. Sin embargo, el método más popular para la cuantificación de AAPs es el método espectrofotométrico, desarrollado por el Instituto Federal Alemán para la Protección de la Salud de los Consumidores y Medicina Veterinaria, que se basa en la derivatización de anilina con N-(1-naftil) etilendiamina⁹². Para mejorar la sensibilidad del método, se lleva a cabo la derivatización y luego la extracción del azocompuesto formado en una columna de C18, lo que demanda mucho tiempo.

Por lo tanto, debido a la necesidad de controlar la presencia de AAPs provenientes de los envases que están en contacto con los alimentos, se propone un método simple y de bajo costo para la determinación individual y total de AAPs en simuladores de alimentos.

2.3.2 Objetivos

El objetivo de este trabajo es realizar la extracción, preconcentración y derivatización *in-situ* de dos AAPs, 2,4-DAT y 4,4'-MDA, para su determinación individual y conjunta en envases plásticos multicapa destinados a estar en contacto con alimentos. Así, la

⁹⁰ Grupo Mercado Común MERCOSUL/GMC/RES. N° 15/10. Reglamento técnico Mercosur sobre colorantes en envases y equipamientos plásticos a entrar en contacto con alimentos (Derogación de la Res. GMC n° 28/93), 2010, Buenos Aires.

⁹¹ M. J. Martínez-Bueno, M.J. Gómez Ramos, A. Bauer, A.R. Fernández-Alba, An overview of non-targeted screening strategies based on high resolution accurate mass spectrometry for the identification of migrants coming from plastic food packaging materials. *Trends in Analytical Chemistry*, 110, 191-203, 2019. doi.org/10.1016/j.trac.2018.10.035.

⁹² B. Brauer, T. Funke, Determining primary aromatic-amines in migratory solutions. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 87, 280-281, 1991.

derivatización se lleva a cabo empleando la reacción de Griess directamente en el adsorbente, donde previamente los analitos fueron extraídos. Para lograr una mayor simplificación y miniaturización del procedimiento, se propone su automatización mediante el uso de la técnica SIA.

2.3.3 Parte experimental

2.3.3.1 Reactivos y soluciones

Los reactivos utilizados fueron de grado analítico y todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura.

- El MeOH ($\geq 99\%$, grado HPLC) y el ácido acético glacial ($\geq 99\%$) se adquirieron de Merck (Alemania).
- Las soluciones patrón (200 mg L^{-1}) de 4,4'-MDA (Sigma-Aldrich, Alemania) y 2,4-DAT (Sigma-Aldrich, Alemania) se prepararon en MeOH y se almacenaron a 4°C en frascos de vidrio color caramelo.
- Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante una dilución adecuada de las soluciones patrón con agua. Para realizar el acondicionamiento de la columna, se utilizó acetona (Dorwil, Argentina) e isopropanol (Dorwil, Argentina).
- Para la reacción de diazotación se preparó semanalmente una solución de NaNO_2 de 200 mg L^{-1} en MeOH al 50% (v/v). Se preparó una solución de N-(1-naftil) etilendiamina, NED (Carlo Erba, Argentina) de 1000 mg L^{-1} en MeOH. Las soluciones de HCl (37% , Merck, Alemania) se prepararon diluyendo el volumen

apropiado de ácido concentrado con agua. Todas las soluciones se almacenaron en frascos de vidrio color caramelo a 4°C.

- Para llevar a cabo el estudio de selectividad se utilizaron soluciones de diferentes AAPs, las cuales se prepararon a una concentración de 200 mg L⁻¹ en MeOH y se almacenaron a 4°C. Las aminas seleccionadas fueron aspartamo (Sigma Aldrich, Alemania), dopamina (Sigma-Aldrich, Alemania), clenbuterol (Sigma Aldrich, Alemania), sulfametoxazol (Droguería Salvatori, Argentina), acrilamida, L-lisina (Sigma Aldrich, Alemania) y metionina (Droguería Salvatori, Argentina).
- La columna SPE (5,0 cm de largo x 4 mm de diámetro interno) se empacó con 0,3042 g de un adsorbente polimérico (Amberlite XAD-16, Sigma-Aldrich, Alemania). También se probaron como posibles adsorbentes otros materiales como una resina de intercambio catiónico (Dowex 50W X8, Sigma Aldrich, Alemania), un polímero hidrofílico-lipofílico (OASIS® HLB, Waters, Estados Unidos), nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, Bayer®, Alemania) y nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados (ox-MWCNTs).

2.3.3.2 Instrumentación y software

- Bomba pistón bidireccional (BP) con jeringa de vidrio de 5,0 mL (Cavro® XCalibur Pump, Tecan, Suiza).
- Válvula multiposición de diez puertos (VM) (Cheminert, Valco Instruments, Co., Estados Unidos).
- Tubos de PTFE de 0,8 mm de d.i.

- Espectrofotómetro Agilent 8453. La detección se llevó a cabo a 570 nm (tiempo de integración de 0,5 segundos e intervalos de 1 nm).
- Celda de flujo de 25 μ L y 10 mm de paso óptico (Hellma, Alemania)
- Software FloZF 5.2 (Global FIA Zone Fluidics, Estados Unidos) para el control de dispositivos.
- El diseño de la matriz de experimentos y el análisis estadístico se realizaron utilizando un software STATGRAPHICS versión 5.1.

2.3.3.3 Descripción del sistema SIA y procedimiento

El sistema SIA propuesto se muestra en la Figura 2.16. El mismo consistió en una bomba pistón (BP) conectada al puerto central de una válvula multiposición (VM) mediante un reactor de retención, “holding coil” (HC, 2300 μ L). En los puertos periféricos de la VM se colocaron los diferentes reactivos a emplear (puertos del 1 al 10). Uno de los puertos se destinó al desecho (puerto 1). La columna SPE se colocó entre el puerto 9 de la VM y la celda de flujo, posicionada en el portaceldas del espectrofotómetro. El sistema se controló por computadora a través del software FloZF.

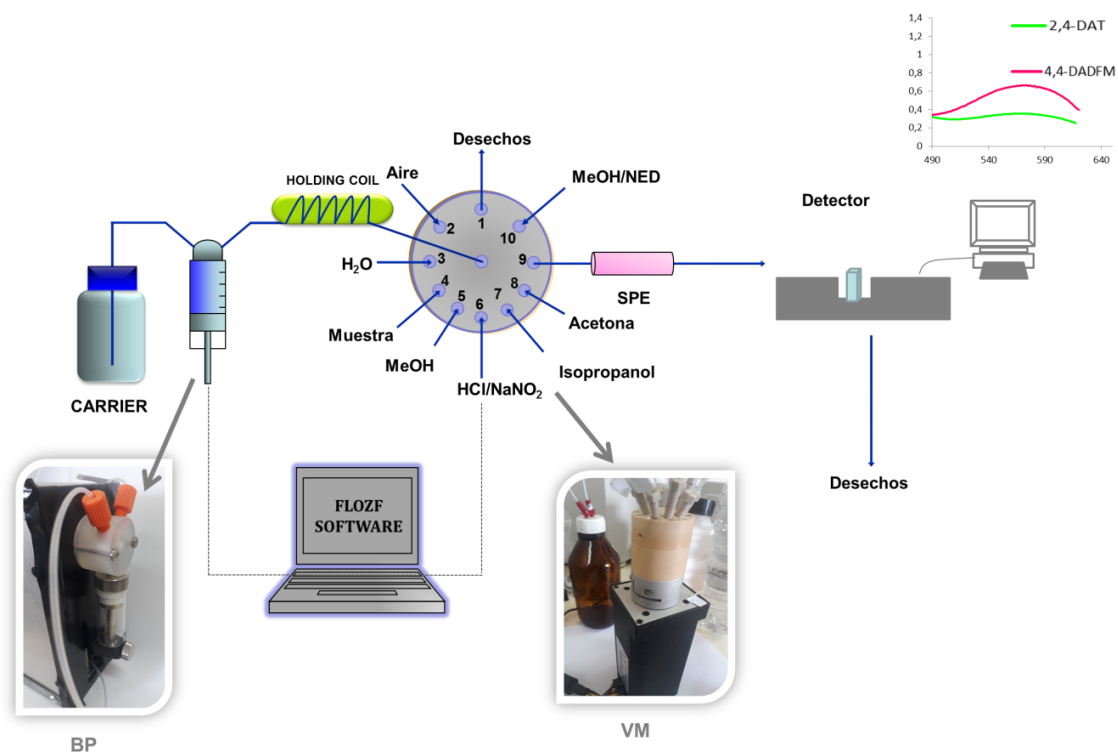


Figura 2.16. Sistema SIA propuesto para la extracción y derivatización de 2,4-DAT y 4,4'-MDA

El procedimiento de extracción y preconcentración para el método SIA propuesto, incluido el acondicionamiento del adsorbente, la carga de la muestra, la derivatización y la elución, se resume en la Tabla 2.6. En primer lugar, el adsorbente se activó, según recomendación del fabricante, con 4,00 mL de acetona (puerto 8) seguido de 4,00 mL de isopropanol (puerto 7), ambos a un caudal de $3,00 \text{ mL min}^{-1}$. Antes de comenzar las mediciones, la columna SPE se acondicionó con 1,50 mL de MeOH (puerto 5) seguido de 2,00 mL de agua (puerto 3), ambos a un caudal de $2,40 \text{ mL min}^{-1}$. Luego, se cargó la muestra (puerto 4) a un caudal de $1,40 \text{ mL min}^{-1}$, seguida de 5,68 mL de la solución de NaNO_2/HCl (puerto 6) al

mismo caudal. A continuación, se lavó el adsorbente con agua a un caudal de 3,00 mL min⁻¹. Para finalizar, se impulsó 1,00 mL de la solución metanólica de NED (puerto 10) a través de la columna, tanto para completar el proceso de derivatización como para eluir el producto azoico. El compuesto coloreado se dirigió a la celda de flujo y se midió la absorbancia a 570 nm. Todos los experimentos se repitieron por triplicado.

Tabla 2.6. Procedimiento analítico del sistema SIA para la determinación de 2,4-DAT y 4,4'-MDA

		Volumen (mL)	Caudal (mL min ⁻¹)
Llenado de canales			3,00
Activación de la columna	Acetona	4,00	3,00
	Isopropanol	4,00	3,00
Acondicionamiento	MeOH	1,50	2,40
	Agua	2,00	2,40
Extracción y derivatización	Muestra	5,00	1,38
	NaNO ₂ /HCl	5,68	1,38
	Aire		2,40
	NED en MeOH	1,00	1,50

2.3.3.4 Diseño experimental

Se construyó un diseño Plackett-Burman (DPB) para identificar las variables significativas involucradas que pueden llegar a afectar la extracción, preconcentración y derivatización

de 2,4-DAT y 4,4'-MDA ⁹³. Se realizó un conjunto de 12 experimentos con un total de 11 variables, de las cuales ocho son variables reales y tres variables ficticias o imaginarias (“*dummies*”). Las variables ficticias se utilizaron para establecer el error experimental en la interpretación estadística⁹⁴. Para reducir el efecto de variables no controladas, los experimentos se realizaron aleatoriamente. En la Tabla 2.7 se muestran las variables a optimizar con los valores experimentales. Para la realización de los experimentos se cargó en la columna 5000 µL de solución estándar de concentración 1 mg L⁻¹ de 2,4 -DAT y 4,4'-MDA, y los resultados obtenidos permitieron calcular el efecto de cada variable en la extracción.

Tabla 2.7. Valores de las variables experimentales estudiadas en dos niveles diferentes

Símbolo	Variables	Unidades	Niveles	
			-1	1
A	concentración de HCl	mol L ⁻¹	2,3	6
B	concentración de NaNO ₂	mol L ⁻¹	7,7 x 10 ⁻⁴	2,25 x 10 ⁻³
C	volumen de HCl+NaNO ₂	mL	5	25
D	concentración de NED	mol L ⁻¹	3,2 x 10 ⁻⁴	1,6 x 10 ⁻³
E	volumen de NED	mL	0,75	1,5
F	caudal de HCl+NaNO ₂	mL min ⁻¹	1,32	4,98
G	caudal de muestra	mL min ⁻¹	1,32	4,38
H	caudal de eluyente	mL min ⁻¹	1,32	4,38

⁹³ R. H. Myers, D. C. Montgomery, C. M. Anderson-Cook. (2016). Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, 4th Edition. Wiley. ISBN: 978-1-118-91601-8

⁹⁴ J. Zhou, X-H. Chen, S-D. Pan, J-L. Wang, Y-B. Zheng, J-J. Xu, M-C. Jin, Contamination status of bisphenol A and its analogues (bisphenol S, F and B) in foodstuffs and the implications for dietary exposure on adult residents in Zhejiang Province. Food Chemistry, 294, 160–170, 2019. doi:10.1016/j.foodchem.2019.05.022

Para optimizar las variables significativas obtenidas en el DPB, se empleó un diseño central compuesto (DCC), dejando fijas las variables no significativas. El DCC se constituyó por un diseño factorial de dos niveles y dos puntos centrales con puntos estrella adicionales o puntos axiales ($\alpha = \pm 1,68$) (Figura 2.17.).

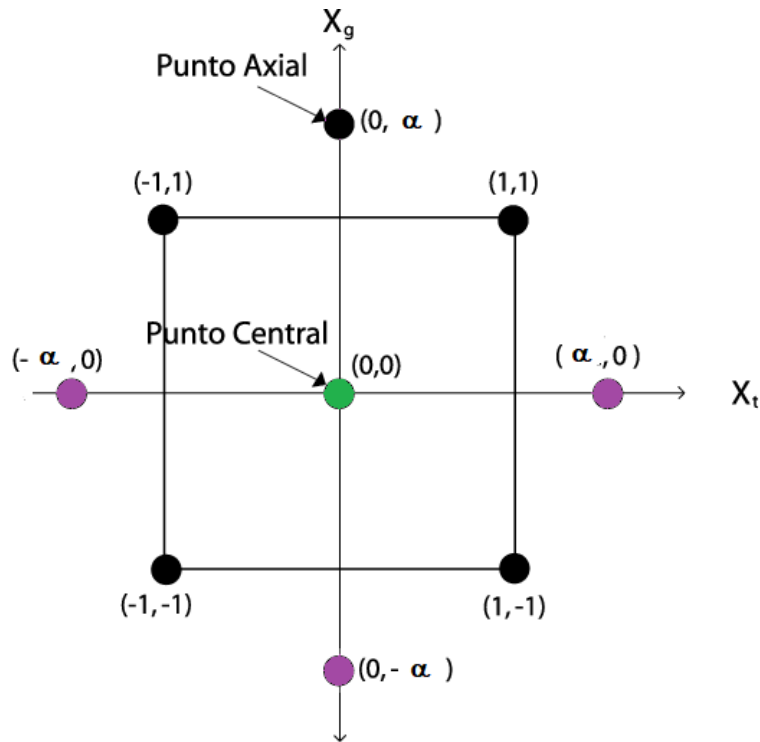


Figura 2.17. Diseño central compuesto.

En la Tabla 2.8. se muestran el punto central, el nivel superior, el nivel inferior y los puntos estrellas de las tres variables experimentales consideradas, así como la matriz de experimentos realizados. Los puntos centrales proporcionan información sobre la existencia, y si existe curvatura, los puntos estrella permiten estimar los términos cuadráticos. Los diferentes experimentos se llevaron a cabo en un orden aleatorio

proporcionado por el software para tener en cuenta las variables no controlables que pudieran ocasionar algún tipo de tendencia en la respuesta.

Tabla 2.8. Variables reales y valores codificados para la optimización de las variables significativas usando el DCC

Exp.	Concentración de HCl		Concentración de NaNO ₂		Volumen de NaNO ₂ en HCl	
	Valor real	Valor codificado	Valor real	Valor codificado	Valor real	Valor codificado
1	2,6	-1	0,0006	1	5	1
2	2,6	-1	0,0005	-1	5	1
3	4,5	1	0,0006	1	5	1
4	2,6	-1	0,0006	1	3	-1
5	3,55	0	0,00064	1,68179	4	0
6	3,55	0	0,00055	0	4	0
7	3,55	0	0,00055	0	2,32	-1,68179
8	4,5	1	0,0006	1	3	-1
9	5,15	1,68179	0,00055	0	4	0
10	3,2	0	0,00046	-1,68179	4	0
11	4,5	1	0,0005	-1	3	-1
12	1,95	-1,68179	0,00055	0	4	0
13	2,6	-1	0,0005	-1	3	-1

14	3,55	0	0,00055	0	5,68	1,68179
15	4,5	1	0,0005	-1	5	1
16	3,55	0	0,00055	0	4	0

2.3.3.5 Estudio de migración envase-alimento

En general, la determinación directa de sustancias liberadas en los productos alimentarios no es posible debido a la complejidad de las matrices. La migración de aminas aromáticas se estudia mediante la aplicación de un método sustituto utilizando una solución simuladora de alimentos, la cual debe imitar lo mejor posible las categorías de alimentos cuyos envases se desean estudiar^{95,96}.

Por otro lado, los experimentos de migración requieren el ajuste de ciertas condiciones (área de contacto superficial, tiempo y temperatura) que reflejen en lo posible la aplicación práctica del material multicapa a estudiar. Lo más común es emplear una especie de bolsa con una superficie de contacto de 2,0 dm², que contenga 100 mL de la solución simuladora⁹⁷.

Las condiciones de contacto envase/alimento pueden variar considerablemente durante el transporte, el almacenamiento y la estancia en los lugares de distribución. También se

⁹⁵ R-J. Luo, Q-B. Lin, L. Zhu, J-W. Yan, Z. Li, Detection of primary aromatic amines content in food packaging ink and migration from printed plastic bags. *Food Packaging and Shelf Life*, 32, 100820, 2022. doi.org/10.1016/j.fpsl.2022.100820

⁹⁶ M. Â. Favaro Perez, M. Padula, D. Moitinho, C. B. Grespan Bottoli, Primary aromatic amines in kitchenware: Determination by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1602, 217–227, 2019. doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.019

⁹⁷ W. Kolado, M. Balcerzak, The examination of migration of primary aromatic amines from laminated plastic food packaging materials into food simulants by spectrophotometric method. *Acta Alimentaria*, 38, 45–54, 2019. doi:10.1556/aalim.2008.0020

pueden producir variaciones durante los distintos tratamientos a los que son sometidos los materiales durante el procesamiento del alimento (llenado en caliente, pasteurización, esterilización, irradiación), y posteriormente, por la manipulación que hace el consumidor (calentamiento a baño maría, en hornos convencionales y microondas)^{98,99}. Por esta razón, la temperatura y el tiempo se deben corresponder con las condiciones extremas a las que puede estar sometido ese envase.

Para este trabajo, se emplearon dos tipos de envases multicapa: bolsas de plástico, tipo sachet, y envases de cartón Tetra-Brik®. Los materiales que se utilizan para la elaboración de los laminados se muestran en la Tabla 2.9. Cada una de las capas está unida a la otra mediante un adhesivo a base de PU.

Tabla 2.9. Composición de los envases utilizados

Envases multicapa	Composicion ¹
Sachets (de tres capas)	PET
	PVDC
	LDPE
Tetra-brik® (de seis capas)	Capa externa de LDPE
	Carton

⁹⁸ D. I. Onwude, G. Chen, N. Eke-emezie, A. Kabutey, A. Y. Khaled, B. Sturm, Recent Advances in Reducing Food Losses in the Supply Chain of Fresh Agricultural Produce. Processes, 8, 1431, 2020. doi:10.3390/pr8111431

⁹⁹ V. A. Pereira, I. N. de Arruda Queiroz, R. Stefani, Active chitosan/PVA films with anthocyanins from Brassica oleraceae (Red Cabbage) as Time-Temperature Indicators for application in intelligent food packaging. Food Hydrocolloids, 43, 180–188, 2015. doi:10.1016/j.foodhyd.2014.05.014

	LDPE
	Aluminio
	Capa interna de LDPE

¹PET: tereftalato de polietileno; PVDC: revestimiento de cloruro de polivinilideno; LDPE: polietileno de baja densidad.

Para realizar las pruebas de migración, se confeccionaron las bolsas cortando los envases en cuadrados de 100 x 100 mm y se termosellaron por tres de sus lados. Luego, las bolsas se llenaron con 100,0 mL de solución simuladora y se cerraron mediante termosellado. De esta manera, se pusieron en contacto 2,0 dm² del laminado con los simuladores de alimentos.

Teniendo en cuenta los alimentos que se pueden envasar en los materiales seleccionados, se emplearon dos simuladores alimentarios. La Tabla 2.10. indica la composición de las soluciones simuladoras que se emplearon en este trabajo y el tipo de alimento que representa cada simulador ¹⁰⁰.

¹⁰⁰ Directiva 97/48/CE de la Comisión de 29 de julio de 1997 por la que se modifica por segunda vez la Directiva 82/711/CEE del Consejo que establece las normas de base necesarias para la verificación de la migración de los componentes de los materiales y objetos de materia plástica destinados a entrar en contacto con productos alimenticios, Diario Oficial de las Comunidades Europeas N° L 222/ 10

Tabla 2.10. Soluciones simuladoras de alimentos empleadas en este trabajo¹⁰⁰

	Composición de la solución simuladora (Directiva 97/48/CE)	Tipo de alimento en contacto con el envase	Ejemplo
Simulador A	Agua destilada	Alimentos acuosos con un pH superior a 4,5	Leche, yogur
Simulador B	Ácido acético (3% m/v en solución acuosa)	Alimentos acuosos cuyo pH sea inferior o igual a 4,5	Jugo de frutas

Una vez preparadas las bolsas, las mismas fueron colocadas en una estufa de laboratorio y mantenidas en las condiciones indicadas en la Tabla 2.11.

Tabla 2.11. Condiciones de temperatura y tiempo de los ensayos de migración según R.D. 1752/98 y 97/48/CE⁸¹.

Condiciones de tiempo (t) y temperatura (T) de las pruebas de migración	
Condiciones de ensayo en las peores condiciones de uso esperadas según las normas 1752/98 y 97/48/CE	Condiciones de la prueba en este trabajo
Duración del contacto	Duración del examen
t > 24h	72 h
Temperatura de contacto	T de prueba
5°C < T ≤ 20°C	20°C
20°C < T ≤ 40°C	40°C

Para realizar el estudio de recuperación, los simuladores se enriquecieron con 2,4-DAT o 4,4'-MDA, o con una mezcla de ambos analitos al comienzo del proceso analítico. Cabe aclarar que, como los azocompuestos formados absorben a la misma longitud de onda, es posible la determinación conjunta de ambos analitos.

Para este ensayo, se seleccionaron cuatro niveles de concentración dentro del intervalo de calibración y se siguió el mismo protocolo de preparación. Los valores de recuperación se calcularon de acuerdo con la definición de la AOAC ⁷². El análisis de las muestras se realizó por triplicado.

2.3.4 Resultados y discusión

2.3.4.1 Experimentos preliminares

Se realizaron diferentes experimentos preliminares con el fin de establecer las variables que permitían realizar la extracción y la reacción de diazotación de forma simultánea. Para ello, se prepararon soluciones de 1 mg L⁻¹ de ambos analitos, y se realizó el procedimiento que se describe en la Sección 2.3.3.3, de forma individual. Las concentraciones de las soluciones de los reactivos utilizados en esta sección fueron las que se habían optimizado previamente para el trabajo de CLB: 4,6 mol L⁻¹, 1,5 mmol L⁻¹ y 0,65 mmol L⁻¹ de HCl, NaNO₂ y NED, respectivamente. Se utilizó la señal analítica máxima como criterio para seleccionar los parámetros óptimos.

En primer lugar se realizó la selección del adsorbente. Se probaron varios adsorbentes capaces de extraer ambos analitos. Para ello, se empaquetaron diferentes columnas SPE con una resina de intercambio catiónico, una resina polimérica, un polímero hidrofílico-

lipofílico, MWCNTs y ox-MWCNTs, y se acoplaron al sistema SIA para realizar la extracción y derivatización.

Cada columna fue acondicionada según indicación del fabricante. Luego, se pasó a través de la columna 5000 μL de una solución de $1,00 \text{ mg L}^{-1}$ de cada uno de los analitos, y a continuación 5680 μL de la solución de $\text{HCl} + \text{NaNO}_2$. Finalmente, se eluyó con 1,0 mL de solución metanólica de NED y se leyó la señal de absorbancia a 570 nm. Este procedimiento se realizó por triplicado, para cada columna empacada.

No se observó señal de absorbancia con la columna empacada con la resina de intercambio catiónico. Las señales observadas para las columnas empacadas con MWCNTs, ox-MWCNTs y OASIS HLB[®] fueron menores que la señal observada para la columna de Amberlite XAD-16. Por lo tanto, se seleccionó este adsorbente para llevar a cabo la extracción, preconcentración y diazotización de los analitos. La Figura 2.18 muestra como ejemplo, los espectros de absorción molecular de 2,4-DAT obtenidos para cada adsorbente.

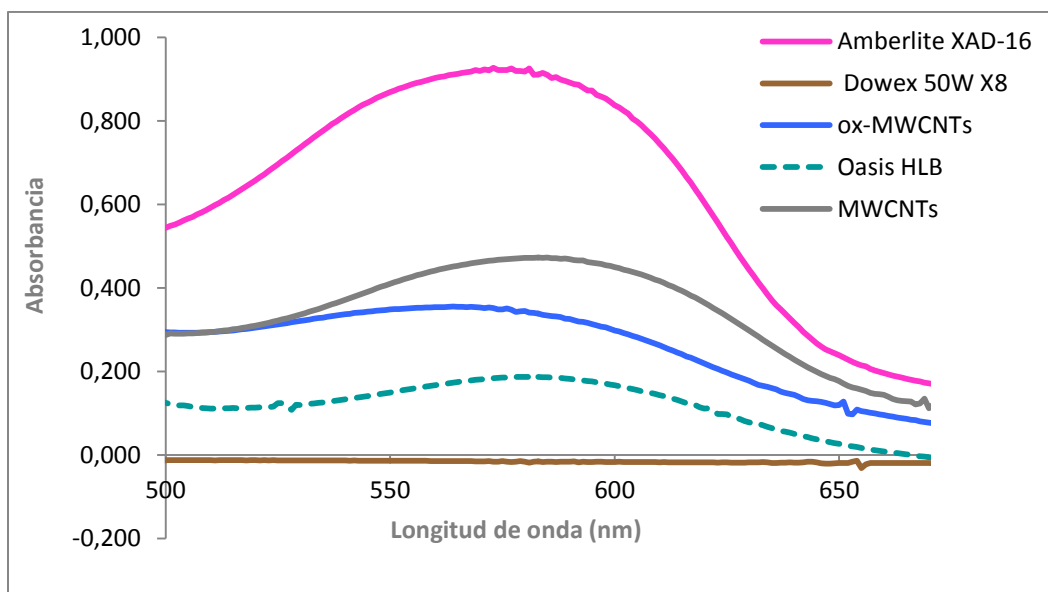


Figura 2.18. Espectros de absorción molecular (entre 500 nm y 670 nm) para los productos de la extracción y derivatización de 2,4-DAT empleando diferentes adsorbentes

Una vez seleccionado el adsorbente, se probaron dos posibles disolventes orgánicos para la elución, ACN y MeOH. Para disminuir los pasos del procedimiento, se probó además, llevar a cabo el agregado de NED y el paso de elución al mismo tiempo. Para ello, ambos disolventes fueron empleados para la elución, con y sin la adición de NED. Los ensayos se realizaron por triplicado. La mayor señal se obtuvo cuando se realizó la elución empleando MeOH con la adición de NED.

El orden de carga de los reactivos para llevar a cabo la reacción de diazotación también fue estudiado. Teniendo en cuenta que el adsorbente es un polímero, en primer lugar se cargó la muestra para todas las secuencias. Además, como se usó la solución metanólica de NED como eluyente, se colocó al final de las secuencias. Por lo tanto, se ensayaron tres combinaciones diferentes:

- A. Muestra/HCl/NaNO₂/NED en MeOH;
- B. Muestra/NaNO₂/HCl/NED en MeOH; y
- C. Muestra/HCl + NaNO₂/NED en MeOH

En la secuencia C, se probó cargar una mezcla de las soluciones de HCl y NaNO₂, en lugar de las soluciones por separado. En la Figura 2.19., se observa la señal analítica obtenida para cada secuencia. La mayor señal se obtuvo cuando se llevó a cabo la secuencia C para ambos analitos.

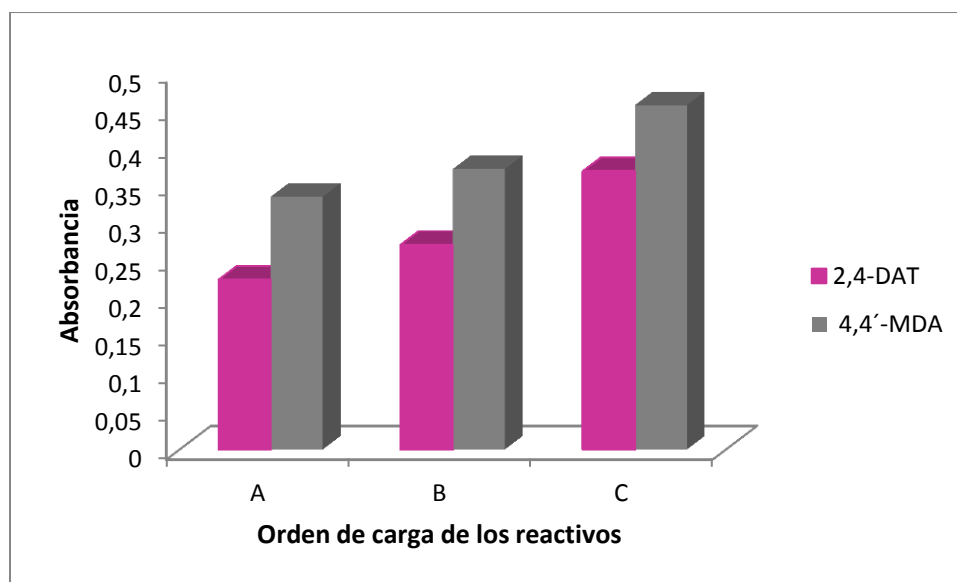


Figura 2.19. Optimización del orden de adición de reactivos para el 2,4-DAT y el 4,4'-MDA

2.3.4.2 Optimización de las variables significativas mediante diseño de experimentos

El objetivo de un estudio de cribado o *screening* es analizar un elevado número de variables con el mínimo número de experimentos para determinar qué factores son

significativos. En este caso, podrían aplicarse diseños factoriales fraccionados saturados. El DPB es un caso particular en el que sólo se pueden estimar los efectos principales asumiendo que las interacciones entre variables pueden ser ignoradas. Las variables pueden ser cualitativas o cuantitativas. Este diseño se realiza a dos niveles, uno alto (+1) y otro bajo (-1), siendo el número de variables a estudiar $k = N - 1$ variables, con N experimentos¹⁰¹. Como se mencionó en la sección 2.3.3.4, se empleó un diseño de 12 experimentos ($k=12-1$), siendo las variables reales a optimizar 8, por lo que se completa el diseño con 3 variables ficticias.

Se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) para evaluar los datos y los efectos estadísticamente significativos fueron determinados usando el test “t de Student” con el 95% de probabilidad¹⁰¹. Los resultados se muestran en el diagrama de Pareto de la Figura 2.20. La longitud de la barra es proporcional al valor absoluto del efecto estimado. Los efectos que superan la línea vertical de referencia pueden ser considerados significativos con un 95% de probabilidad. Por otro lado, el valor positivo o negativo de los efectos indica si la variable respuesta aumenta o disminuye, respectivamente, cuando se pasa del nivel inferior al superior de una variable en concreto.

¹⁰¹ D. C. Montgomery. (1991). Diseño y análisis de experimentos; Grupo Editorial Iberoamérica S.A. ISBN 968-18-6156-6

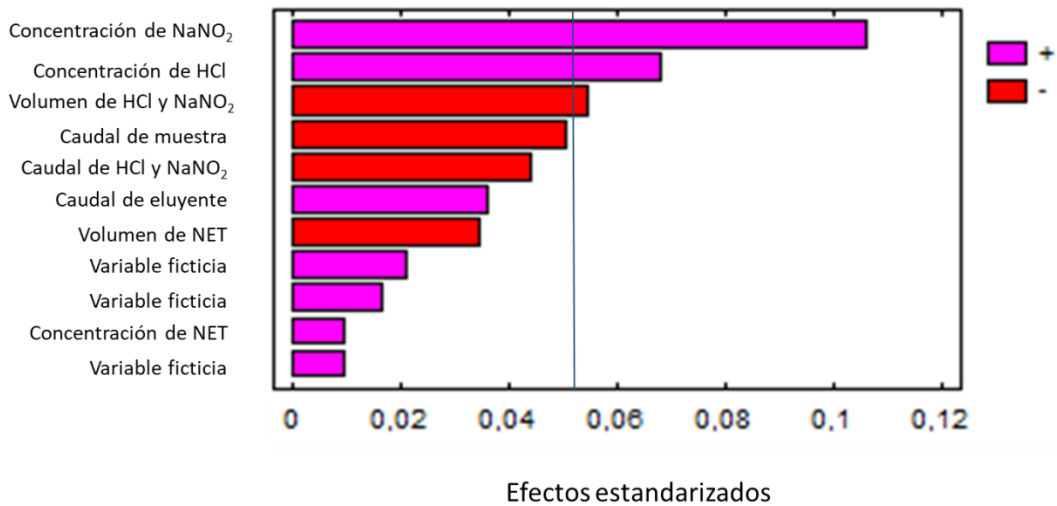


Figura 2.20. Diagrama de Pareto de los efectos obtenidos con el DPB para 2,4-DAT y 4,4'-MDA.

De acuerdo con la Figura 2.20., las variables que mostraron un efecto significativo fueron la concentración de NaNO₂, la concentración de HCl, y el volumen de la solución de NaNO₂ en HCl. Esta última fue la menos significativa con valor negativo. Este efecto nos indica que a valores bajos de esta variable tenemos mayor señal de respuesta. Lo opuesto ocurre con las otras variables significativas.

Las variables significativas fueron optimizadas mediante un DCC, dejando fijas las variables no significativas. Los valores óptimos para las variables no significativas fueron seleccionados a través del DPB (Tabla 2.12).

Tabla 2.12. Variables óptimas obtenidas con el DPB.

Variables a optimizar	Factor	Valor optimo
Concentración de NED (mol L ⁻¹)	D	1,6 x 10 ⁻³
Volumen de NED (mL)	E	1,0
Caudal HCl+NaNO ₂ (mL min ⁻¹)	F	1,38
Caudal de muestra (mL min ⁻¹)	G	1,38
Caudal de eluyente (mL min ⁻¹)	H	1,50

El DCC se utiliza para evaluar los efectos principales, las interacciones y los efectos cuadráticos de las variables consideradas. El modelo propuesto fue una superficie de respuesta que se ajusta a un polinomio de segundo grado con la siguiente forma:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2$$

donde x_1 , x_2 , x_3 son las variables independientes (concentración de NaNO₂, concentración de HCl, volumen de NaNO₂ en HCl), β_0 es una constante, desde β_1 a β_{33} son los coeficientes de regresión e Y es la función respuesta.

Se llevaron a cabo los experimentos indicados en la Tabla 2.8. de la sección 2.3.3.4 y se obtuvo la señal de absorbancia correspondiente como variable respuesta. El diagrama de Pareto estandarizado, mostrado en la Figura 2.21., es una representación gráfica del análisis de varianza donde se observan los factores más influyentes, en su respectivo orden. Los efectos de color rojo (-) son inversamente proporcionales a la variable de respuesta (extracción), mientras que los de color fucsia (+) son efectos directamente proporcionales a la variable de respuesta. En este caso, como las variables no sobrepasan la línea vertical, del diagrama, serán consideradas no significativas para la extracción.

En la Tabla 2.13. se muestran el valor óptimo obtenido por el DCC para cada variable.

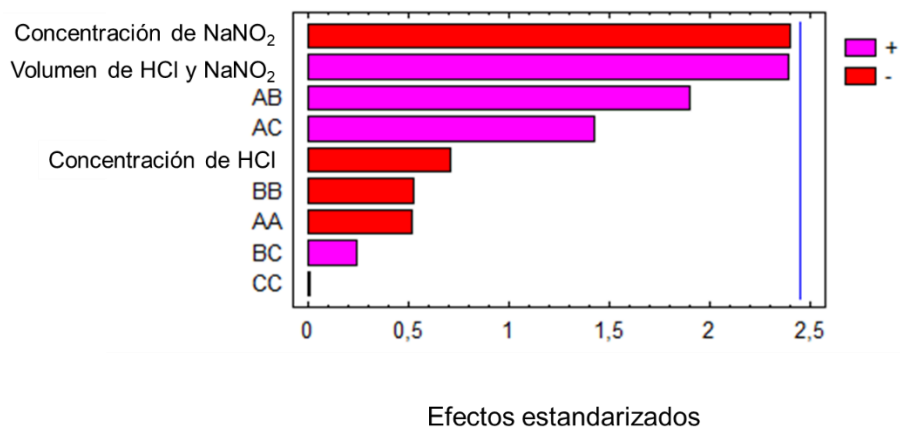


Figura 2.21. Diagrama de Pareto obtenido a partir del DCC

Tabla 2.13. Valores óptimos para las variables optimizadas con el DCC

Variable a optimizar	Factor	Valor óptimo
Concentración de HCl (mol L ⁻¹)	A	1,95
Concentración de NaNO ₂ (mol L ⁻¹)	B	4,6x10 ⁻⁴
Volumen de HCl+ NaNO ₂ (mL)	C	5,68

2.3.4.3 Optimización del volumen de muestra

El volumen de muestra que es posible cargar en la columna SPE determina el factor de preconcentración logrado y, por lo tanto, influye en el límite de detección del método desarrollado. Para optimizar este parámetro, se utilizaron las condiciones óptimas obtenidas en el apartado anterior empleando una concentración de 20 µg L⁻¹ para ambos analitos. El volumen se estudió tanto para los analitos de forma individual como para la

mezcla de ambos. El volumen de muestra se estudió en el intervalo de 50,0 a 500,0 mL. Los datos experimentales se muestran en la Figura 2.22.

No se observaron variaciones significativas en los valores de los porcentajes de recuperación hasta un volumen de 500,0 mL. Sin embargo, la carga de 500,0 mL de muestra en la columna incrementa notablemente el tiempo de análisis. Por esta razón, se eligió trabajar con 250,0 mL de muestra, tomando un compromiso entre el factor de preconcentración obtenido y el tiempo de análisis requerido.

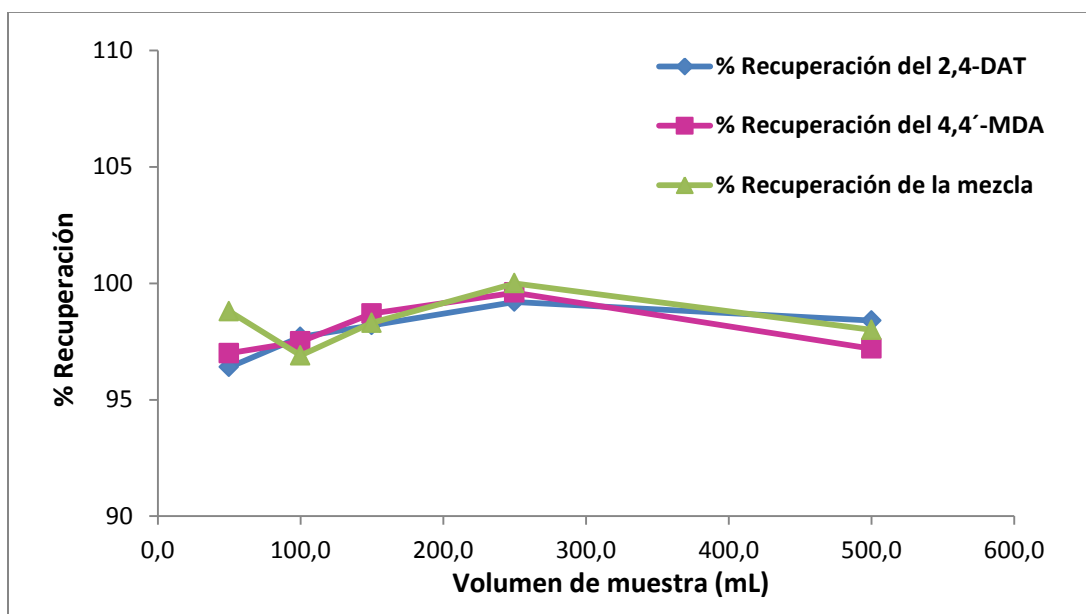


Figura 2.22. Porcentaje de Recuperación del volumen de muestra con el que se puede cargar la columna de SPE.

2.3.4.4 Parámetros analíticos del método propuesto

El método propuesto fue evaluado en términos de linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), y repetibilidad y precisión intermedia, calculado como

%RSD. En la Tabla 2.14 se muestran los valores obtenidos de cada parámetro para 2,4-DAT y 4,4'-MDA de forma individual y para la mezcla de ambos.

Tabla 2.14. Parámetros analíticos calculados para el método propuesto

	4,4'-MDA	2,4-DAT	4,4'-MDA +2,4-DAT ^a
Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	1,50-40,00	1,50-40,00	1,50-40,00
Ecuación de regresión ^b	$y = (0,0241 \pm 0,0019)x - (0,0262 \pm 0,0031)$	$y = (0,0173 \pm 0,0071)x + (0,0224 \pm 0,0052)$	$y = (0,0161 \pm 0,0015)x + (0,0087 \pm 0,0017)$
R^2	0,985	0,991	0,984
LOD ^c ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,13	0,19	0,20
LOQ ^d ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0,51	0,63	0,68
Repetibilidad ^e (%)	1,0	1,1	1,1
Reproducibilidad ^f (%)	3,0	3,0	3,0
Intervalo lineal ^g ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	4,50-120,0	4,50-120,0	4,50-120,0

^a Realizado con la misma concentración de ambos analitos; ^b Siete puntos con 3 repeticiones cada uno; ^c Calculado a partir de la función de calibración; ^d $\text{LOQ} = 10S_b/b$; siendo S_b la desviación estándar del blanco y b la pendiente de la curva de calibrado; ^e Concentración de 2,4-DAT y 4,4'-MDA de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, $n=10$; ^f Concentración de 2,4-DAT y 4,4'-MDA de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ en 3 días consecutivos por triplicado; ^g Calculado para $6 \text{ dm}^2 \text{ kg}^{-1}$ de muestra (según Directiva 97/48/CE). Las densidades de las dos soluciones simuladoras se consideraron 1 kg L^{-1}

El tiempo de análisis teniendo en cuenta las condiciones ya optimizadas fue de $3,1 \text{ h}^{-1}$ para el procedimiento completo.

2.3.4.5 Selectividad

Una de las desventajas asociadas a la derivatización de AAPs para la formación del azocompuesto correspondiente es la falta de selectividad. Por esta razón, se evaluó este parámetro aplicando el método propuesto a diferentes AAPs que se encontraban disponibles en nuestro laboratorio. Los compuestos seleccionados fueron aspartamo, dopamina, CLB, sulfametoxazol y acrilamida.

No se observó señal para el aspartamo, la dopamina y la acrilamida en las condiciones de trabajo. Por otro lado, se obtuvo una señal medible para el CLB, con un máximo a $\lambda=500$ nm, y para el sulfametoxazol, con un máximo a $\lambda=540$ nm. Si bien la reacción esta propuesta para AAPs, se probaron dos aminoácidos como la lisina y la metionina. Estos compuestos no mostraron ninguna señal con el método propuesto.

De esta manera, se pudo demostrar que no todas las AAPs pueden generar el azocompuesto correspondiente en las condiciones de trabajo propuestas, lo que le otorga al método propuesto cierta selectividad.

2.3.4.6 Estudio de migración y determinación de los analitos

Para llevar a cabo el estudio de migración de 4,4'-MDA y 2,4-DAT, se confeccionaron las bolsas con los materiales y las soluciones simuladoras seleccionadas, y se sometieron a las diferentes condiciones de temperatura, tal como se detalló en la Sección 2.3.3.5. Luego, se aplicó el método de extracción y derivatización propuesto y se llevó a cabo la determinación de los analitos. Es importante aclarar que, debido a que es posible cargar en la columna un volumen de muestra mayor al contenido en cada bolsa preparada, se

confeccionó un número mayor de bolsas y luego del ensayo de migración, se mezclaron las soluciones para el posterior análisis. Como los analitos no fueron detectados para ninguna de las condiciones estudiadas, se procedió a fortificar las muestras con cuatro niveles de concentración de los analitos individuales: 2,50, 5,00, 15,0 y 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para la mezcla, se consideraron los niveles de concentración de forma total: 2,00, 5,00, 15,0 y 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Luego, se realizaron los estudios de migración correspondientes. Los resultados obtenidos para ambas soluciones simuladoras se observan en la Tabla 2.15. A y B.

Tabla 2.15. A. Estudio de migración y determinación de 4,4'-MDA y 2,4-DAT en la solución simuladora A (Condiciones de migración: 72h, 20 °C; n=3)

Analito	Muestra	Agregado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado		R (%)
			Concentración de AAPs en la solución simuladora ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Nivel de migración de AAPs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*	
4,4'-MDA	Sachet	-	No detectable	No detectable	-
		2,50	2,44 \pm 0,00 ₂	7,32 \pm 0,01	97,6
		5,00	4,95 \pm 0,00 ₁	14,86 \pm 0,00 ₄	99,0
		15,00	14,88 \pm 0,00 ₂	44,63 \pm 0,01	99,2
		20,00	20,00 \pm 0,01	60,01 \pm 0,00 ₃	100,0
4,4'-MDA	Tetra-brik®	-	No detectable	No detectable	-
		2,50	2,51 \pm 0,00 ₄	7,53 \pm 0,01	100,4
		5,00	5,01 \pm 0,00 ₄	15,02 \pm 0,01	100,1
		15,00	15,02 \pm 0,00 ₅	45,05 \pm 0,02	100,1
		20,00	20,17 \pm 0,00 ₄	60,51 \pm 0,01	100,8
2,4-DAT	Sachet	-	No detectable	No detectable	-

		2,50	2,53 ± 0,00 ₂	7,56 ± 0,01	100,8
		5,00	4,82 ± 0,00 ₇	14,47 ± 0,02	96,4
		15,00	15,03 ± 0,00 ₂	45,10 ± 0,00 ₆	100,2
		20,00	20,12 ± 0,00 ₁	60,36 ± 0,00 ₄	100,6
2,4-DAT	Tetra-brik®	-	No detectable	No detectable	-
		2,50	2,40 ± 0,00 ₄	7,20 ± 0,01	95,9
		5,00	4,82 ± 0,01	14,47 ± 0,03	96,5
		15,00	14,84 ± 0,00 ₂	44,53 ± 0,01	98,9
		20,00	20,06 ± 0,00 ₄	60,18 ± 0,01	100,3
4,4'- MDA+2,4- DAT	Sachet	-	No detectable	No detectable	-
		2,00	2,02 ± 0,00 ₄	6,06 ± 0,01	100,9
		5,00	4,89 ± 0,01	14,68 ± 0,03	97,9
		15,00	14,78 ± 0,01	44,34 ± 0,03	98,5
		20,00	19,98 ± 0,01	59,94 ± 0,00 ₃	99,9
4,4'- MDA+2,4- DAT	Tetra-brik®	-	No detectable	No detectable	-
		2,00	2,01 ± 0,00 ₂	6,039 ± 0,0073	100,6
		5,00	5,01 ± 0,00 ₁	15,042 ± 0,0032	100,3
		15,00	14,83 ± 0,00 ₃	44,496 ± 0,0102	98,9
		20,00	19,96 ± 0,00 ₂	59,886 ± 0,0070	99,8

*Expresado según referencia¹⁰² en 6 dm², 1 kg

¹⁰² European Community, EC (2002): Commission Directive 2002/72/EC of 6 August 2002 relating to plastic materials and articles intended to come into contact with foodstuffs: O. J., L220, 18–58

Tabla 2.15 B. Determinación de la migración de la mezcla de los compuestos 4,4'-MDA y 2,4 - DAT en la solución simuladora B (Condiciones de migración: 72h, 40 °C; n=3)

Analito	Muestra	Agregado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Encontrado		R (%)
			Concentración en la solución simuladora ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Nivel de migración de AAPs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)*	
4,4'-MDA	Sachet	-	No detectable	No detectable	-
		2,50	$2,51 \pm 0,01$	$7,54 \pm 0,03$	100,4
		5,00	$4,98 \pm 0,01$	$14,90 \pm 0,03$	99,5
		15,00	$14,80 \pm 0,00_7$	$44,30 \pm 0,02$	98,4
		20,00	$20,06 \pm 0,01$	$60,20 \pm 0,00_3$	100,3
4,4'-MDA	Tetra- brik®	-	No detectable	No detectable	-
		2,50	$2,46 \pm 0,01$	$7,38 \pm 0,03$	98,4
		5,00	$5,23 \pm 0,00_8$	$15,68 \pm 0,02$	104,6
		15,00	$14,66 \pm 0,01$	$43,99 \pm 0,03$	97,8
		20,00	$19,58 \pm 0,00_2$	$58,75 \pm 0,01$	97,9
2,4-DAT	Sachet	-	No detectable	No detectable	-
		2,50	$2,44 \pm 0,00_2$	$7,33 \pm 0,00_7$	97,6
		5,00	$4,82 \pm 0,01$	$14,47 \pm 0,02$	96,5
		15,00	$14,59 \pm 0,00_1$	$43,78 \pm 0,00_4$	97,3
		20,00	$19,68 \pm 0,01$	$59,03 \pm 0,04$	98,4
2,4-DAT	Tetra- brik®	-	No detectable	No detectable	-
		2,50	$2,44 \pm 0,00_9$	$7,32 \pm 0,03$	97,6
		5,00	$4,64 \pm 0,01$	$13,90 \pm 0,04$	92,8
		15,00	$15,03 \pm 0,00_1$	$45,11 \pm 0,01$	100,2
		20,00	$19,89 \pm 0,00_8$	$59,67 \pm 0,0249$	99,4
4,4'-MDA+2,4-DAT	Sachet	-	No detectable	No detectable	-
		2,00	$2,01 \pm 0,00_3$	$6,36 \pm 0,01$	100,6
		5,00	$4,81 \pm 0,00_8$	$14,44 \pm 0,03$	96,3

		15,00	14,98 ± 0,00 ₁	44,94 ± 0,01	99,9
		20,00	20,12 ± 0,00 ₃	60,36 ± 0,01	100,7
4,4'-MDA+2,4-DAT	Sachet	-	No detectable	No detectable	-
		5,00	4,92 ± 0,00 ₃	14,75 ± 0,01	98,3
		15,00	15,01 ± 0,00 ₃	45,04 ± 0,01	100,1
		20,00	20,32 ± 0,00 ₄	60,95 ± 0,01	101,6
4,4'-MDA+2,4-DAT	Tetra-brik®	-	No detectable	No detectable	-
		2,00	1,98 ± 0,00 ₄	5,94 ± 0,01	99,0
		5,00	4,95 ± 0,00 ₁	14,85 ± 0,01	99,0
		15,00	14,68 ± 0,00 ₂	44,04 ± 0,00 ₆	97,9
		20,00	19,97 ± 0,00 ₂	59,90 ± 0,00 ₃	99,8

*Expresado según referencia ¹⁰²en 6 dm², 1 kg

Como se mencionó anteriormente, el límite de la suma de AAPs debe ser inferior a 10 µg kg⁻¹ y el límite individual de estas aminas debe ser de 2 µg kg⁻¹. Con el método propuesto, es posible la determinación de la suma total de AAPs provenientes de los envases de alimento, pero no es posible determinar de forma individual cada amina. Sin embargo, el método es simple, emplea instrumentación accesible y fácil de operar, con un muy bajo costo de mantenimiento. Por esta razón, se podría emplear como método de screening para el control de los envases que se utilizan para alimentos.

2.3.5 Conclusiones parciales

Se desarrolló un método SIA simple con detección UV-Vis para la determinación de dos AAPs, 2,4-DAT y 4,4'-MDA, y la mezcla de ambas, provenientes de envases de alimentos. El método propuesto permite llevar a cabo la extracción y preconcentración de los analitos junto con la reacción de derivatización de forma automática, simplificando significativamente el procedimiento analítico y disminuyendo errores.

El método se aplicó a dos soluciones simuladoras de alimento, obteniendo porcentajes de recuperación satisfactorios tanto para los analitos individuales como para la mezcla de ambos.

Teniendo en cuenta los valores límites establecidos por la legislación europea, el método propuesto permite la determinación de AAPs totales, pero no la determinación de forma individual. Sin embargo, es posible cargar en la columna un volumen mayor de muestra, lo que implicaría una disminución de los límites de cuantificación obtenidos, en detrimento del tiempo de análisis.

CAPÍTULO 3:

Estrategias analíticas con detección fluorescente basadas en la interacción entre la glibenclamida y la cafeína.

3. Estrategias analíticas con detección fluorescente basadas en la interacción entre la glibenclamida y la cafeína.

3.1 Introducción

Este capítulo de tesis consta de dos trabajos en los que se desarrollaron métodos analíticos basados en la interacción que tiene la cafeína (CF) sobre la señal fluorescente de la glibenclamida (GLB). En el primer trabajo, se propuso un sistema FIA simple, acoplado a una columna cromatográfica monolítica, para llevar a cabo la separación de la GLB de la matriz de la muestra. En el segundo trabajo, se empleó el efecto de filtro interno (EFI) como herramienta analítica para la determinación de la concentración de CF en bebidas que la contienen.

A continuación, se describen brevemente los fundamentos de las técnicas empleadas.

3.1.1 Técnicas separativas: cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla ¹⁰³. En la cromatografía líquida en columna, un disolvente, conocido como fase móvil, pasa a través de una columna empacada con un sólido inerte finamente dividido. La mezcla de compuestos a separar es transportada por la fase móvil a través de la columna. La superficie del sólido o las moléculas unidas químicamente a su superficie constituyen la fase estacionaria, que interactúa con las moléculas del analito. Según sea la afinidad de los

¹⁰³ R. E. Majors, Column Technology for Modern High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, 2018. doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14217-9

analitos por la fase estacionaria en relación con su afinidad con la fase móvil, serán más o menos retenidos¹⁰⁴.

Existen diferentes modos de separación en cromatografía líquida de reparto¹². Sin embargo, la mayoría de las separaciones en cromatografía líquida se llevan a cabo en fase reversa. En este modo, se emplea una fase estacionaria no polar con una fase móvil polar, para lograr la separación de mezclas de analitos no polares o moderadamente polares. Los analitos se eluyen en orden de polaridad decreciente ¹².

Generalmente, la fase estacionaria, está constituida por partículas de materiales rígidos o semirrígidos, y pueden clasificarse en: totalmente porosas, core-shell y barra monolítica. En la Tabla 3.1. se clasifican los diferentes soportes sólidos y se describen brevemente las características de cada uno.

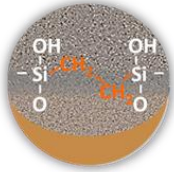
Tabla 3.1. Diferentes soportes sólidos de columnas empleadas en cromatografía líquida.

Adaptado de referencia¹⁰⁵

SOPORTE SÓLIDO	DESCRIPCIÓN
<p data-bbox="300 1367 716 1398">TOTALMENTE POROSAS: SÍLICA</p> <p data-bbox="415 1446 600 1478">TRADICIONAL</p> 	<p data-bbox="820 1367 1390 1556">Formada por partículas porosas de sílice, modificado con diferentes grupos funcionales.</p> <p data-bbox="820 1602 1390 1709">Mayor área superficial con una excelente resistencia mecánica</p>

¹⁰⁴ M.K. Vitha. (2016).Chromatography: Principles and Instrumentation. Wiley. ISBN 9781119270904

¹⁰⁵ <https://www.phenomenex.com/kinetex/coreshelltechnology?culture=es-es>. Ultimo acceso: 18/05/2022

<p>TOTALMENTE POROSAS: ORGANO-SÍLICA</p> 	<p>Se insertan grupos orgánicos entre las capas de la partícula de sílice, siendo así más resistente a las disoluciones de pH extremo.</p>
<p>CORE-SHELL</p> 	<p>Son partículas compuestas de capas. La primera denominada núcleo (core), que está totalmente recubierta por otra (shell). La transferencia de masa es muy rápida en comparación con las partículas totalmente porosas.</p>
<p>BARRA MONOLÍTICA DE SÍLICE</p> 	<p>Están compuestas por macroporos y mesoporos, generando presiones muy bajas a altas velocidades lineales de fase móvil o al trabajar con muestras o fases móviles con mayor viscosidad.</p>

En esta tesis se hizo uso de una columna cromatográfica monolítica. Según su composición, las columnas monolíticas se pueden clasificar en orgánicas, formadas por

polímeros sintéticos, e inorgánicas, formadas por polímeros de sílice¹⁰⁶. Ambas, presentan una estructura de poro bimodal formada por macroporos y mesoporos. Esta estructura ocupa completamente el volumen de la columna sin que haya ningún espacio interparticular^{107,108}. Los macroporos (1–2 μm) se encargan de reducir la contrapresión de la columna, permitiendo el empleo de caudales significativamente más rápidos. Los mesoporos (13–15 nm) forman una fina estructura porosa, lo que crea una superficie activa muy grande para lograr separaciones de alta resolución¹⁰³.

Los beneficios de las columnas monolíticas se observan en la Figura 3.1^{107,109,110}.

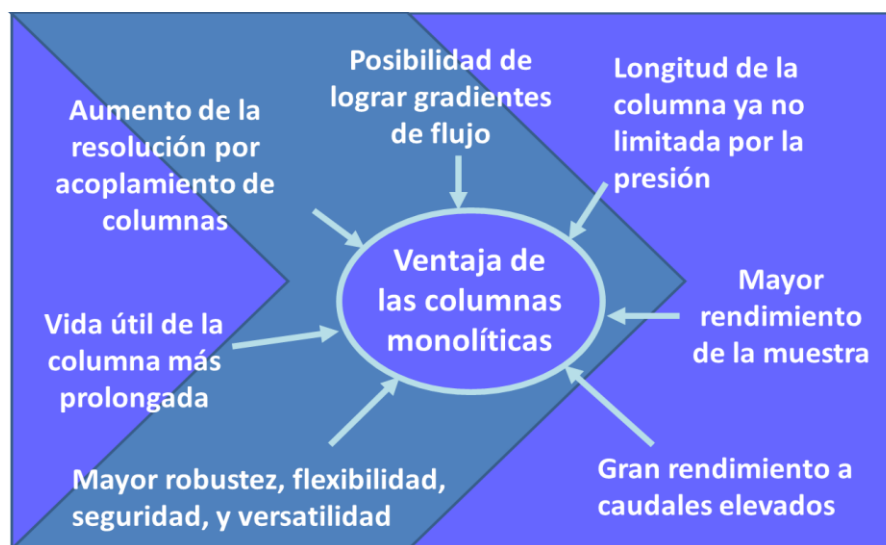


Figura 3.1. Ventajas del uso de columnas monolíticas en cromatografía líquida.

¹⁰⁶ F. Svec, Y. Lv, Advances and recent trends in the field of monolithic columns for chromatography. *Analytical chemistry*, 87, 250-273, 2015. doi.org/10.1021/ac504059c

¹⁰⁷ P. Jandera, Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis—A review. *Journal of Chromatography A*, 1313, 37–53, 2013. doi:10.1016/j.chroma.2013.08.010

¹⁰⁸ K. K. Unger, R. Skudas, M. M. Schulte, Particle packed columns and monolithic columns in high-performance liquid chromatography-comparison and critical appraisal. *Journal of Chromatography A*, 1184, 393–415, 2008. doi:10.1016/j.chroma.2007.11.118

¹⁰⁹ H. T. Khoo, C. H. Leow, Advancements in the preparation and application of monolithic silica columns for efficient separation in liquid chromatography. *Talanta*, 224, 121777, 2021.

doi:10.1016/j.talanta.2020.121777

¹¹⁰ H. Sklenářová, P. Chocholouš, P. Koblová, High-resolution monolithic columns—a new tool for effective and quick separation. *Anal Bioanal Chem* 405, 2255–2263, 2013. doi.org/10.1007/s00216-012-6561-y

El uso de columnas monolíticas en sistemas de análisis en flujo fue propuesto por Šatínský y colaboradores, al incorporar una columna monolítica corta a un sistema SIA ¹¹¹. Esto condujo al desarrollo de métodos cromatográficos que no requieren el uso de presiones elevadas para llevar a cabo la separación, superando así una de las limitaciones asignadas a las técnicas en flujo: el análisis multicomponente. El uso de estos sistemas presenta como ventaja la miniaturización, simplicidad, bajo consumo de muestras y reactivos, y bajo costo, asociado a una mayor selectividad, en algunos casos comparable con HPLC^{112,113}.

3.1.2 Espectroscopia de fluorescencia molecular

La fluorescencia es un proceso de emisión en el cual las moléculas son excitadas por la absorción de radiación electromagnética de determinada longitud de onda. Las especies excitadas se relajan al estado fundamental, liberando su exceso de energía en forma de fotones. Esta emisión de radiación se produce a una longitud de onda más larga (menos energética) que la que provocó la excitación debido a los procesos no radiantes que ocurren previamente (relajación vibracional, conversión interna). Esto se conoce como

¹¹¹ D. Šatínský, P. Solich, P. Chocholouš, R. Karlíček, Monolithic columns—a new concept of separation in the sequential injection technique. *Analytica Chimica Acta*, 499, 205–214, 2003. doi:10.1016/s0003-2670(03)00625-1

¹¹² H. M. González-San Miguel, M. Fernández, J. M. Estela, V. Cerdà, Contribution of multi-commuted flow analysis combined with monolithic columns to low-pressure, high-performance chromatography. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 336–346, 2009. doi:10.1016/j.trac.2008.11.014

¹¹³ P. Chocholouš, D. Šatínský, P. Solich, New generation of sequential injection chromatography: great enhancement of capabilities of separation using flow analysis. *Talanta*, 204, 272-277, 2019. doi:10.1016/j.talanta.2019.05.108

desplazamiento de Stokes¹¹⁴. Entre las características más atractivas de los métodos desarrollados empleando fluorescencia molecular se encuentra su elevada sensibilidad y su amplio intervalo dinámico, con límites de detección menores e intervalos lineales mayores a los calculados para espectroscopia de absorción molecular¹¹⁵. No obstante, existe un número limitado de especies que presentan fluorescencia, por lo que esta técnica se aplica mucho menos que la técnica de absorción molecular.

3.1.2.1 Efecto de filtro interno

Se entiende por sensor químico a un dispositivo capaz de traducir la información química proveniente de una muestra y proporcionar información analítica útil en tiempo real sobre una muestra a ensayar¹¹⁶.

En el campo de los sensores químicos se han desarrollado diferentes enfoques de detección óptica para la determinación de diferentes compuestos de interés ambiental y biológico¹¹⁷. De los diversos y variados tipos de sensores ópticos basados en técnicas como la absorción o la luminiscencia, los basados en fluorescencia son los más atractivos debido a su aplicación práctica y sensibilidad intrínseca¹¹⁸. Generalmente, un sensor fluorescente o quimiosensor fluorescente se construye a partir de moléculas que son fluorescentes. Sin embargo, cualquier fenómeno que resulte en un cambio de intensidad

¹¹⁴ K. G. Fleming, Fluorescence Theory. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry, 647–653, 2017. doi:10.1016/b978-0-12-803224-4.00357-5

¹¹⁵ D. A. Skoog, F. J. Holler, S. R. Crouch. (2015). Principios de Análisis Instrumental. 6° Edición, Cengage Learning. SBN-10:607-481-390-6

¹¹⁶ Advances in Chemical Sensors.(2011). Wen Wang. ISBN 978-953-307-792-5

¹¹⁷ F. Esposito, Chemical sensors based on long period fiber gratings: A review, Results in Optics ,5, 100196, 2021. doi.org/10.1016/j.rio.2021.100196

¹¹⁸ D. Wu, A. C. Sedgwick, T. Gunnlaugsson, E. U. Akkaya, J. Yoon, T. D. James, Fluorescent chemosensors: the past, present and future, Chemical Society Reviewe,46, 7105, 2017.

de la fluorescencia, la longitud de onda de excitación o emisión, anisotropía o vida útil puede usarse para la detección ¹¹⁹ .

El efecto de filtro interno (EFI) ocurre cuando un compuesto, el absorbente, absorbe radiación en las longitudes de onda de excitación y/o emisión de otro compuesto, el fluoróforo ¹²⁰ . Para que esto ocurra, las bandas de absorción del absorbente deben poseer una región de solapamiento con la banda de excitación o emisión del fluoróforo, o con ambos, como se ilustra en la Figura 3.2. ^{121,122} .

¹¹⁹ Q. Yanga, J. Li, X. Wang, H. Peng, H. Xiong, L. Chen, Strategies of molecular imprinting-based fluorescence sensors for chemical and biological analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 112, 54-71, 2018. doi:10.1016/j.bios.2018.04.028

¹²⁰ S. Kumar Panigrahi, A. Kumar Mishra, Inner Filter Effect in Fluorescence Spectroscopy: As a Problem and as a Solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 41, 100318, 2019. doi:10.1016/j.jphotochemrev.2019

¹²¹ S. Chen, Y-L. Yu, J-H. Wang, . Inner filter effect-based fluorescent sensing systems: A review. *Analytica Chimica Acta*, 999, 13–26, 2018. doi:10.1016/j.aca.2017.10.026

¹²² Joseph R. Lakowicz. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer, Boston, MA. ISBN 978-0-387-46312-4

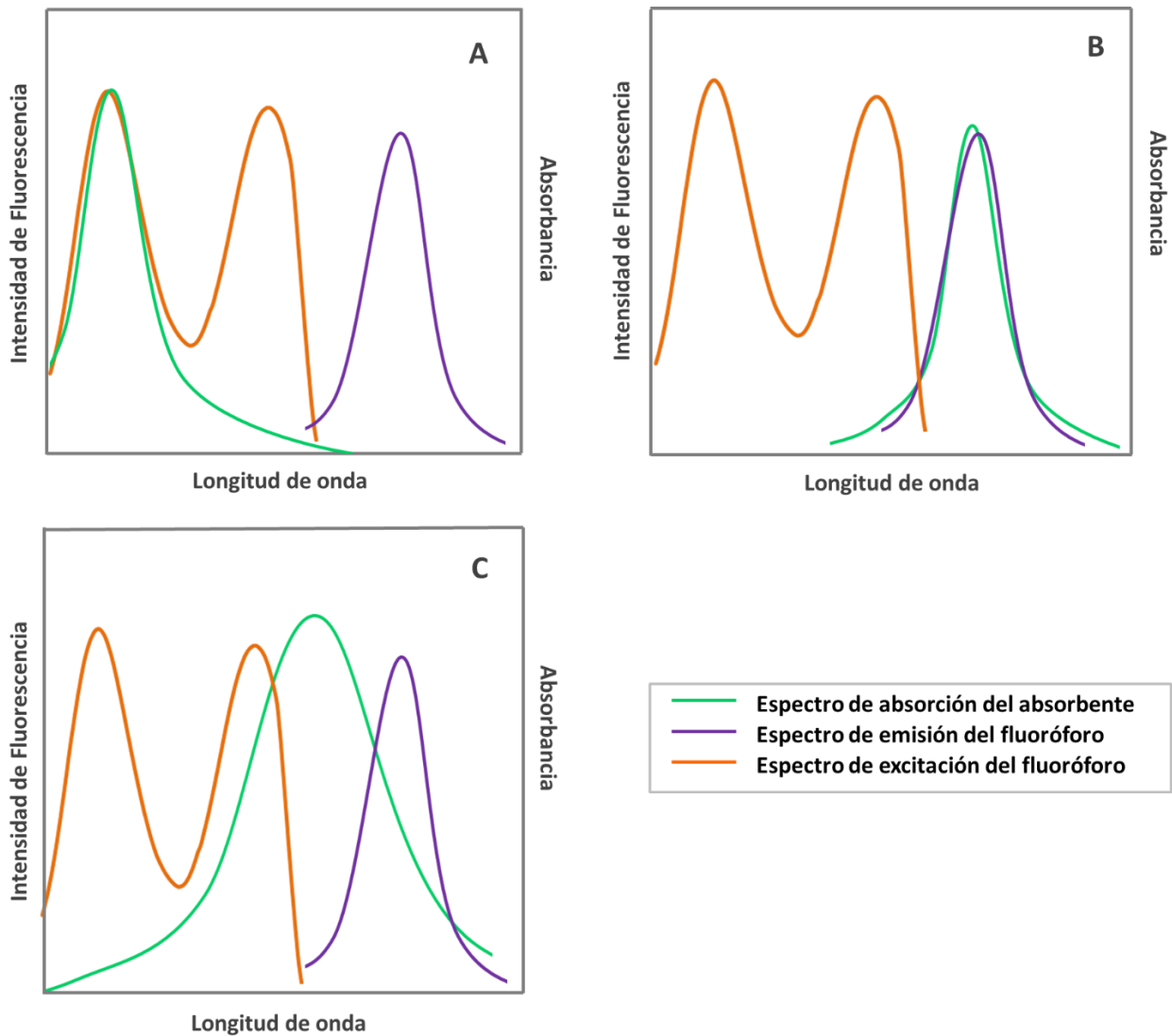


Figura 3.2. Superposición del espectro de absorción del absorbente con el espectro de excitación (A) o de emisión (B) del fluoróforo, o con ambos (C). Adaptado de referencia 121

De esta manera, la absorción de la radiación de excitación y/o emisión por la matriz de una muestra reduce la intensidad de fluorescencia y da como resultado una relación no lineal entre la intensidad de fluorescencia observada y la concentración del fluoróforo ¹²¹.

Durante mucho tiempo, el EFI fue considerado como una fuente de error en el análisis fluorométrico y se propusieron diferentes enfoques para reestablecer la relación lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración del fluoróforo¹²⁰. Sin embargo, recientemente, varios estudios han demostrado la aplicación del EFI para la cuantificación de diversos analitos ya que los cambios en la absorbancia del absorbente se traducen en cambios exponenciales en la fluorescencia del fluoróforo¹²⁰. Por ello, el empleo de este fenómeno permite obtener una mayor sensibilidad y un límite de detección más bajo que la realización de la determinación a partir de la medida de señal de absorbancia.

El EFI puede ser primario o secundario, según sea absorbida la radiación de excitación o de emisión del fluoróforo. El EFI primario se refiere a la absorción de radiación de excitación por uno o varios cromóforos presentes en la solución o en la matriz de la muestra, mientras que el EFI secundario se relaciona con la absorción de radiación de emisión por estos mismos cromóforos¹²².

En general, existen tres estrategias para el diseño de sistemas de detección de fluorescencia basados en EFI: de extinción de fluorescencia o “turn-off”, de aumento de fluorescencia o “turn-on”, y radiométricos¹²⁰. Si bien el modo “turn-on” es más selectivo, el modo “turn-off” es el más empleado debido a la mayor disponibilidad de sistemas químicos que lo ocasionan. En los sistemas de detección basados el modo “turn-off”, al aumentar la concentración del analito, aumenta la absorción del absorbente y da como resultado una disminución de la fluorescencia del fluoróforo. En estos sistemas, el mismo analito puede absorber la fluorescencia del fluoróforo y, por lo tanto, ser detectado directamente¹²¹.

Para comprobar que la disminución de la señal de fluorescencia se debe al EFI, es necesario verificar si existe superposición entre los espectros de excitación/emisión del fluoróforo con el espectro de absorción del absorbente o analito. Además, el tiempo de vida del estado excitado del fluoróforo no debe cambiar tanto en ausencia como en presencia del absorbente/analito. Por otro lado, el espectro de absorción UV-Vis del fluoróforo no debe ser afectado por la presencia del absorbente. Finalmente, el espectro de emisión del fluoróforo no debe sufrir modificación cuando la excitación se produce a una longitud de onda en la que no hay absorción del absorbente/analito ¹²⁰.

3.2 DETERMINACIÓN DE GLIBENCLAMIDA EN BEBIDAS ENERGIZANTES

3.2.1 Problemática

El consumo encubierto de drogas incapacitantes, administradas a través del consumo de bebidas para cometer un delito (abuso sexual, robo), no es un fenómeno reciente^{123,124,125}. Estos hechos son muy frecuentes, y afectan especialmente a adolescentes y jóvenes, principalmente a mujeres¹²⁶. La mayoría de las víctimas de estos delitos admiten haber consumido alcohol en bares, locales bailables o en fiestas privadas previo a la agresión sexual y manifiestan amnesia total o parcial sobre lo ocurrido¹²⁷.

Entre los fármacos y drogas de abuso más comúnmente empleados en acciones ilícitas se encuentran el ácido gamma-hidroxibutírico, los benzodiazepinas, atropina, escopolamina, cannabis, cocaína e incluso los estimulantes de tipo anfetamínico¹²⁸. Los hipoglucemiantes también han sido reportados entre las drogas que se usan para

¹²³ S. S. Rossi, S. Vecchio, S. Odoardi, L. Anzillotti, M. Chiarotti, G. Serpelloni, C. Locatelli, Analytical protocol for the screening of psychotropic / incapacitating drugs in alleged drug-facilitated crimes. *Forensic Chemistry*, 100168, 2019. doi:10.1016/j.forc.2019.100168

¹²⁴ K. B. Carey, S. E. Durney, R. L. Shepardson, M. P. Carey, Incapacitated and Forcible Rape of College Women: Prevalence Across the First Year. *Journal of Adolescent Health*, 56, 678–680, 2015. doi:10.1016/j.jadohealth.2015.02.018

¹²⁵ L. J. Anderson, A. Flynn, J. L. Pilgrim, A global epidemiological perspective on the toxicology of drug facilitated sexual assault: A systematic review. *Journal of Forensic and Legal Medicine* 47, 46-54, 2017

¹²⁶ P. Prego-Meleiro, G. Montalvo, Ó. Quintela-Jorge, C. García-Ruiz, An ecological working framework as a new model for understanding and preventing the victimization of women by drug-facilitated sexual assault, *Forensic Science International*, 315, 110438, 2020. doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110438

¹²⁷ C. García Caballero, Ó. Quintela Jorge, A. Cruz Landeira, Alleged drug-facilitated sexual assault in a Spanish population sample, *Forensic Chemistry* 4, 61–66, 2017.

¹²⁸ S. Strano Rossia, S. Vecchiob, S. Odoardia, L. Anzillottia, M. Chiarottia, G. Serpellonid, C. Locatelli Analytical protocol for the screening of psychotropic / incapacitating drugs in alleged drug-facilitated crimes. *Forensic Chemistry*, 14, 100168, 2019. doi:10.1016/j.forc.2019.100168).

incapacitar a las víctimas^{129,130,131}. La glibenclamida (GLB), o también conocida como gliburida, es una sulfonilurea indicada como hipoglucemiante para el tratamiento de la diabetes mellitus no insulino-dependiente, que estimula las células beta del páncreas y hace que aumente la liberación de la insulina preformada. La GLB se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y posee una vida media de 10 horas, con un pico de respuesta con secreción de insulina a las 2 o 3 horas después de la administración oral¹³². La ingesta accidental o intencional de GLB en personas sanas ocasiona un uso excesivo de la glucosa del organismo, que genera hipoglucemia sostenida por sulfonilureas. Además, se debe evitar el consumo de alcohol al consumir esta medicación ya que puede producirse una baja severa de los niveles de azúcar en la sangre¹³³. Los casos de toxicidad causada por agentes hipoglucemiantes son difícil de comprobar porque no hay información o infraestructura adecuada para confirmarlos, o el número de exposiciones reales se subestiman. Particularmente, la GLB es uno de los fármacos hipoglucemiantes más potentes por lo que se requieren dosis mucho más bajas para obtener el mismo efecto¹³⁴.

¹²⁹ J. B. Mowry, D. A. Spyker, D. E. Brooks, A. Zimmerman, J. L. Schauben, Informe anual 2015 del Sistema Nacional de Datos de Envenenamiento (NPDS) de la Asociación Americana de Centros de Control de Envenenamiento: 33er Informe Anual, *Clinical Toxicology*, 54,924–1109, 2016

¹³⁰ M. Villain, C. Tournoud, F. Flesch, V. Cirimele, P. Kintz, Hair to document exposure to glibenclamide, *Journal of Chromatography B*, 842, 111-115, 2016. doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.04.025

¹³¹ D. S. M. Ribeiro, J. A. V. Prior, C. J. M. Taveira, J. M.A.F.S. Mendes, J. L. M. Santos, Automatic miniaturized fluorometric flow system for chemical and toxicological control of glibenclamide. *Talanta*, 84, 1329-1335, 2011. doi.org/10.1016/j.talanta.2011.02.044

¹³² L.F. Pallardo Sánchez, Sulfonilureas in the treatment of type 2 diabetes. *Endocrinología y Nutrición*, 55, 17-25, 2008. doi.org/10.1016/S1575-0922(08)76259-4

¹³³ ANMAT, Disposición 5904-12 http://www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/octubre_2012/Dispo_5904-12.pdf. Ultimo acceso: 16/05/2022

¹³⁴ M. Villain, C. Tournoud, F. Flesch, V. Cirimele, P. Kintz, Hair to document exposure to glibenclamide. *Journal of Chromatography B*, 842, 111-115, 2006. doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.04.025

Para comprobar el delito, se realizan análisis de sangre u orina, en algunos casos 48 a 72 horas más tarde de ocurrido el hecho, lo que dificulta la detección. Se ha demostrado que la determinación de fármacos y drogas de abuso, y sus metabolitos, en segmentos de cabello empleando cromatografía líquida o gaseosa con detección por espectroscopia de masas, es el método más sensible y adecuado para la realización de estos análisis, incluso luego de varios días o meses de la ocurrencia del acto delictivo¹³⁵. Sin embargo, estos métodos presentan algunas desventajas tales como el tratamiento que requiere una matriz compleja como lo es el cabello, el uso de instrumentación costosa, largos tiempos de análisis y personal experto¹³⁶.

Por lo tanto, se requiere el desarrollo de métodos simples, rápidos, confiables y de bajo costo para realizar el análisis de la presencia de fármacos y drogas de abuso directamente en las bebidas consumidas por las víctimas para prevenir el delito y poder actuar de inmediato, brindando un diagnóstico rápido de la situación. Incluso, en algunos países, se han desarrollado kits para determinar de manera inmediata ciertas sustancias en las bebidas^{137,138}.

¹³⁵ D. Cappelle, M. De Doncker, C. Gys, K. Krysiak, S. De Keukeleire, W. Maho, H. Neels, A straightforward, validated liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry method for the simultaneous detection of nine drugs of abuse and their metabolites in hair and nails. *Analytica Chimica Acta*, 960, 101–109, 2017. doi:10.1016/j.aca.2017.01.022

¹³⁶ P. Xiang, M. Shen, O. H. Drummer, Review: Drug concentrations in hair and their relevance in drug facilitated crimes. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, 36, 126-135 2015.

¹³⁷ C. M. Beynon, H. R. Sumnall, J. McVeigh, J.C. Cole, M.A. Bellis, The ability of two commercially available quick test kits to detect drug-facilitated sexual assault drugs in beverages, *Addiction* 101, 1413–1420, 2006.

¹³⁸ S. U. Son, S. Jang, B. Kang, J. Kim, J. Lim, S. Seo, E.-K. Lim, E.-K. Colorimetric paper sensor for visual detection of date-rape drug γ -hydroxybutyric acid (GHB). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 347, 130598, 2021. doi:10.1016/j.snb.2021.130598

3.2.2 Objetivos

Desarrollar un sistema cromatográfico simple y rápido para el control toxicológico de GLB, un medicamento hipoglucemiante oral, agregado intencionalmente a diferentes bebidas para cometer ilícitos. Para ello, se propone el empleo de un sistema FIA al que se le acopla una columna cromatográfica monolítica corta (sistema FIA-C) para lograr la separación del analito de la matriz de muestra. Se emplea detección fluorescente para aumentar la sensibilidad y selectividad del método propuesto.

3.2.3 Parte experimental

3.2.3.1 Reactivos y soluciones empleadas

Las soluciones se prepararon utilizando agua ultrapura ($> 18 \text{ M}\Omega\cdot\text{cm}$) y los reactivos empleados fueron de grado analítico.

- Para la preparación de la fase móvil y de la muestra se utilizó ACN ($\geq 99\%$, grado HPLC, Merck, Alemania) y ácido acético glacial ($\geq 99\%$, Merck, Alemania).
- La solución patrón de GLB ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Alemania) de 200 mg L^{-1} se preparó en ACN y se colocó en un frasco color caramelo a 4°C . Las soluciones de trabajo ($0,50\text{-}10,00 \text{ mg L}^{-1}$) se prepararon diariamente diluyendo el volumen apropiado de la solución patrón con una solución de ácido acético pH 3,2/ACN, 70:30 (v/v).
- La solución patrón de CF de 200 mg L^{-1} (ReagentPlus[®], Sigma-Aldrich, Alemania) se preparó en ACN y se conservó en frasco color caramelo a 4°C . Esta solución se

diluyó diariamente para la preparación de las soluciones de concentración adecuada que fueron utilizadas para evaluar el efecto de la CF en las señales de fluorescencia de la GLB.

3.2.3.2 Instrumentos, aparatos y software

- Bomba peristáltica (Gilson® Minipuls 3), usada como sistema de propulsión de los fluidos en el sistema FIA-C.
- Tubos de bomba de Tygon® MHL de 1,14 mm de d.i., adecuados para disolventes orgánicos. Para las diferentes conexiones del sistema se emplearon tubos de PTFE (0.8 mm d.i., Omnifit , Inglaterra).
- Válvula de inyección de cuatro vías (Rheodyne 5041, Alemania), empleada para la inyección de la muestra.
- Espectrofluorímetro Jasco FP 6500, para realizar las mediciones de fluorescencia (ancho de banda de excitación y emisión, 10 nm; voltaje PMT, 470 V; adquisición de datos cada 0,2 s).
- Celda de flujo (Hellma 17 6,752 –QS), 25 µL de volumen interno y 1,0 cm de camino óptico.
- Columna monolítica de sílice RP-18 (Chromolith® Flash, 25×4,6 mm, Merck, Alemania) y guarda-columna del mismo material (Chromolith®, 10×4,6 mm, Merck, Alemania)
- Medidor de pH (Isemeter, modelo 710A).

3.2.3.3 Procedimiento FIA-C para la determinación de GLB

En la Figura 3.3. se puede ver un esquema del sistema FIA-C propuesto. Está conformado por una válvula de inyección (VI), una columna cromatográfica monolítica (CM), una bomba peristáltica (BP) y una celda de flujo, colocada en el portacelda del espectrofluorímetro (D). Entre la VI y el D del sistema FIA-C se colocó la CM con el guarda-columna (GdC) correspondiente. Para minimizar la dispersión dentro del sistema, la longitud de la conexión entre la VI y la CM, y entre CM y el D, se disminuyeron tanto como fue posible (25 y 75 mm, respectivamente). En primer lugar, se llevó a cabo la estabilización y acondicionamiento de la CM, y para ello se empleó una solución de ACN/ácido acético, 50:50 (v/v) como solución portadora y fase móvil. La fase móvil fue impulsada por la BP a través de la CM durante 30 segundos. Una vez transcurrido este tiempo, se inyectaron 50 μL de solución de trabajo o de muestra, que fueron arrastrados por la fase móvil hacia la CM donde se llevó a cabo la separación de la GLB del resto de los componentes de la muestra. Finalmente, el eluido de la columna alcanzó la celda de flujo, donde se obtuvo el cromatograma (señal de intensidad de fluorescencia (IF) vs tiempo) correspondiente. Las medidas de IF se realizaron a una longitud de onda de excitación de 234 nm y una longitud de onda de emisión de 352 nm. El caudal utilizado durante la totalidad de las determinaciones fue de $1,03 \text{ mL min}^{-1}$.

Para la cuantificación del analito, se consideró la altura del pico en lugar del área del pico ya que el software del instrumento (Spectrum Manager, FP-6500/6600) no permite el cálculo del área con precisión.

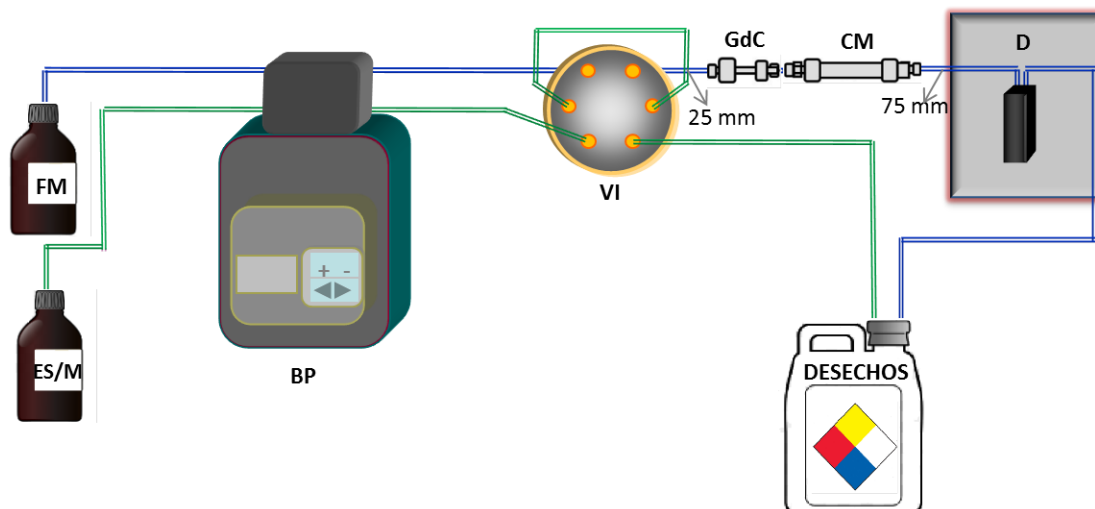


Figura 3.3. Sistema FIA-C para la determinación de GLB. CM: columna monolítica; GdC: guardacolumna; FM: fase móvil; ES / M: solución estándar / muestra; BP: bomba peristáltica; VI: válvula de inyección; D: detector

3.2.3.4 Análisis de muestras

Actualmente, las bebidas energizantes se encuentran entre las más consumidas por adolescentes y jóvenes, ya sean solas o combinadas con alcohol. Por esta razón, fueron elegidas como muestras para llevar a cabo este trabajo.

Las muestras de bebidas energizantes y de alcohol (champagne y vodka) fueron adquiridas en diferentes supermercados y vinerías de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina.

Las muestras de bebidas energizantes fueron analizadas inmediatamente después de abrir las latas, ya sea puras o en una mezcla con alcohol en una proporción de 50:50 (v/v). Se realizaron las mediciones de los valores de pH de las muestras, encontrándose los mismos en el intervalo entre 3,2 y 3,7. Por esta razón, no fue necesario el ajuste de pH de las

muestras para su análisis. Se llevó a cabo la desgasificación de las muestras empleando un baño de ultrasonido durante 10 minutos.

Las muestras fueron adulteradas de dos maneras: agregando un volumen adecuado de la solución patrón de GLB y empleando comprimidos comerciales de GLB. Para esto último, se consideró, como mínimo, el agregado de un comprimido de GLB de 5,0 mg a 250,0 mL de la muestra (una lata o un vaso). Para llevar a cabo el análisis, se realizó una dilución 1:10 de la muestra, por lo que la concentración de GLB en la solución final fue de 2,00 mg L⁻¹. Teniendo en cuenta esto, se pesaron 10 comprimidos de GLB (aproximadamente 301,8 mg por comprimido) y se homogeneizaron empleando un mortero. Se pesó la cantidad de comprimido que contenía aproximadamente 0,02000 mg del ingrediente farmacéutico activo y se disolvió con ACN. Se trasvaso cuantitativamente a un matraz de 10,00 mL (cuidando de no sobrepasar el 30 % de ACN total), se agregó 1,00 mL de la muestra y la mezcla se llevó a un volumen de 10,00 mL con ácido acético pH 3,2. De esta manera, los excipientes provenientes del comprimido de GLB se diluyeron junto con la muestra, pudiendo ser analizados como posibles interferentes. Se procedió, por último, a filtrar la solución adulterada de la muestra con un filtro de 0,45 µm y se inyectó en el sistema FIA-C.

Para el estudio de recuperación, las muestras se enriquecieron con GLB a dos niveles de concentración elegidos dentro del intervalo de calibración: 2,00 y 7,00 mg L⁻¹. Una vez agregado el volumen correspondiente, se siguió el mismo protocolo de preparación indicado en la sección anterior. El nivel de concentración de 2,00 mg L⁻¹ se seleccionó considerando que esa concentración corresponde, luego de la dilución correspondiente, a

la adición de un comprimido de GLB en 250,0 mL de muestra, una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en una persona sana. El nivel de 7,00 mg L⁻¹ fue seleccionado al azar. Los porcentajes de recuperación se calcularon de acuerdo con la definición de AOAC⁷². Los análisis fueron realizados por triplicado.

3.2.4 Resultados y discusión

3.2.4.1 Experimentos preliminares

Como hemos mencionado anteriormente, la GLB es ingerida por las víctimas de forma engañosa, a través de diferentes bebidas. Particularmente, se decidió trabajar con bebidas energizantes que poseen una matriz considerada compleja por la gran cantidad de componentes que la conforman. Por esta razón, se propuso llevar a cabo la separación de la GLB del resto de los componentes de la muestra, para su posterior cuantificación.

Con este objetivo, se realizó una búsqueda bibliográfica para conocer las condiciones cromatográficas en las cuales se produce la separación de la GLB de diferentes analitos

139,140,141.

¹³⁹ http://www.anmat.gov.ar/fna/consulta_publica/GLIBENCLAMIDA_comprimidos.pdf

¹⁴⁰ P. K. Porwala, G. S. Talele, Development of validated HPLC-UV method for simultaneous determination of Metformin, Amlodipine, Glibenclamide and Atorvastatin in human plasma and application to protein binding studies, Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University, 55, 129-139, 2017. doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.10.002

¹⁴¹ S. Seccia, S. Albrizio, P. Fidente, D. Montesano, Development and validation of a solid-phase extraction method coupled to high-performance liquid chromatography with ultraviolet-diode array detection for the determination of sulfonyleurea herbicide residues in bovine milk samples. , 1218, 1253–1259, 2011. doi:10.1016/j.chroma.2011.01.006

Por otro lado, debido a que la GLB es un compuesto fluorescente¹⁴², se decidió emplear esta técnica espectroscópica para aprovechar las ventajas que presenta con respecto a absorción molecular.

Entonces, teniendo en cuenta la información encontrada en bibliografía y la posibilidad de realizar las medidas por fluorescencia molecular, se llevó a cabo un estudio preliminar para observar el comportamiento de la GLB en diferentes solventes que podrían ser empleados como fase móvil. Para ello, se realizaron los espectros de excitación y emisión del analito en MeOH y ACN, empleando una solución de GLB de 2,00 mg L⁻¹. Se observó que las mayores intensidades de fluorescencia se presentaron cuando se disolvió la GLB en ACN. Como sabemos, el pH de la fase móvil es un parámetro importante ya que el mismo puede afectar el grado de ionización de los compuestos a separar y, por lo tanto, su relativa hidrofobicidad. Por esta razón, se prepararon soluciones de GLB en una mezcla 25:75 (v/v) de ACN/agua, ACN/solución de ácido acético y ACN/solución de ácido fosfórico, estas dos últimas de un valor de pH de 3,2 (dos unidades por debajo del pK_a). Se llevaron a cabo los espectros correspondientes, observándose que la intensidad de la señal de la solución de GLB preparada en la mezcla con ácido fosfórico fue más baja que la intensidad de fluorescencia de las soluciones preparadas en ácido acético y en agua, que presentaron una señal similar.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos y la hidrofobicidad de la fase estacionaria a emplear, se seleccionó para los posteriores estudios una composición de fase móvil

¹⁴² R. da Silva Fernandes, F. Saadna Lopes da Costa, P. Valderrama, P. Henrique Março, K. Michell Gomes de Lima, Non-destructive detection of adulterated tablets of glibenclamide using NIR and solid-phase fluorescence spectroscopy and chemometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 66, 85–90, 2012. doi:10.1016/j.jpba.2012.03.004

ACN/solución de ácido acético pH 3,2 en una proporción 25:75 (v/v). En la Figura 3.4. se puede observar el espectro de excitación de GLB en el solvente elegido, el cual presenta dos máximos a 234 nm y 298 nm, y el espectro de emisión, con un máximo a 352 nm.

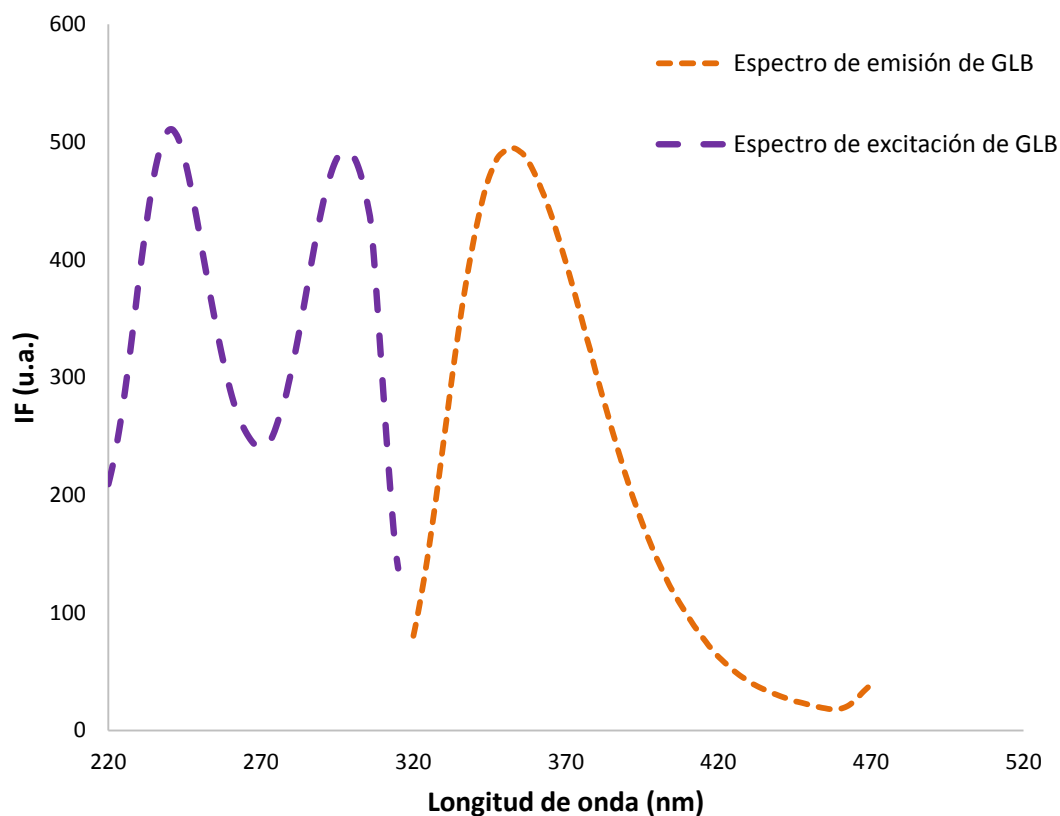


Figura 3.4. Espectros de excitación y emisión de una solución de GLB de $16,0 \text{ mg L}^{-1}$, preparada en ACN/ácido acético 25:75 (v/v).

Como se mencionó anteriormente, el objetivo de este trabajo es la determinación de GLB que puede ser agregada intencionalmente a bebidas energizantes. La CF es el componente mayoritario de las bebidas energizantes. Si bien la CF no se reporta como un compuesto

fluorescente ^{143,144}, se decidió estudiar si presentaba emisión de fluorescencia en las condiciones de trabajo propuestas.

Para ello, se preparó una solución de CF de 32,0 mg L⁻¹ en una solución de ACN/ácido acético 25:75 (v/v). Esta concentración es equivalente a su posible concentración en las muestras reales, teniendo en cuenta una dilución de la muestra 1:10. Se realizaron los espectros de excitación y emisión de fluorescencia correspondientes. Como se puede apreciar en la Figura 3.5., no se observaron señales significativas de fluorescencia para la CF en las condiciones de trabajo.

Luego, se llevó a cabo la mezcla de ambos compuestos para evaluar alguna posible interacción en las concentraciones antes mencionadas y se realizaron los espectros de emisión correspondientes, excitando a 234 nm y a 298 nm. Se observó que la presencia de CF disminuía la señal de fluorescencia de la GLB, con respecto a la solución de GLB pura. Si bien este efecto fue observado para ambas longitudes de onda de excitación, se observó más marcadamente cuando se excitó a 234 nm. En la Figura 3.5. A y B se comparan los espectros de emisión de GLB en presencia de CF a ambas longitudes de onda de excitación. Para determinar si existía una dependencia entre la disminución de la señal de la GLB y la concentración de CF añadida, se efectuaron mezclas de GLB y CF manteniendo constante la concentración de GLB (2,00 mg L⁻¹) y aumentando la de CF. En la Figura 3.5. A se puede observar que, al aumentar la concentración de CF disminuye la intensidad de fluorescencia de la GLB. Es decir, dependiendo de la concentración de CF que se agrega a

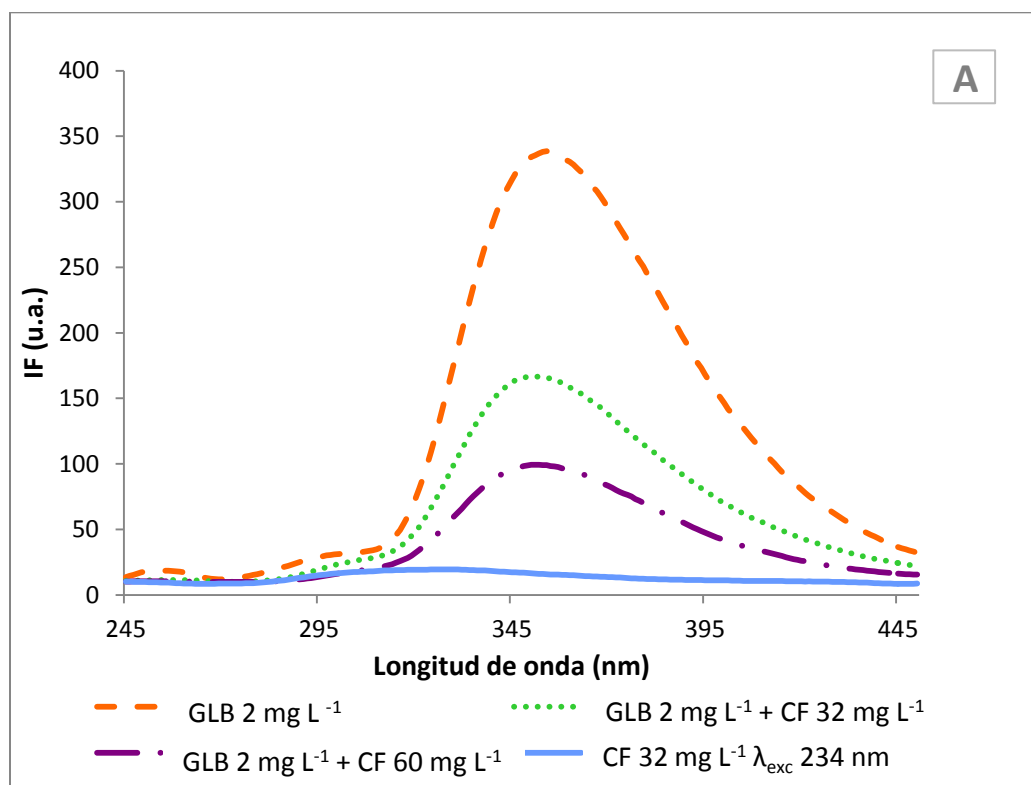
¹⁴³ H. Sereshti, S. Samadi, A rapid and simple determination of caffeine in teas, coffees and eight beverages, *Food Chemistry*. 158, 8–13, 2014.

¹⁴⁴ A. Lipkea, M. Makarska-Bialokoza, A. Sierakowskab, B. Jasiewicz, Non-covalent interactions between thio-caffeine derivatives and water-soluble porphyrin in ethanol-water environment. *Spectrochimica acta A* 192, 304–311, 2018 doi: 10.1016/j.saa.2017.11.038

la solución de GLB, su señal se modifica, siendo esta menor si la concentración de CF es mayor.

Por lo tanto, se comprobó que en las muestras que presentan ambos compuestos, la determinación de la concentración de GLB mediante fluorescencia molecular no se podría realizar directamente, sino que es necesario llevar a cabo un paso de extracción o una separación previo a la detección.

En el siguiente trabajo, en la sección 3.3.4.1, se describe con más profundidad la razón por la cual se observa este efecto. En este trabajo, se plantea la separación cromatográfica de GLB y CF, como una estrategia para lograr la cuantificación de la GLB en muestras con alto contenido de CF.



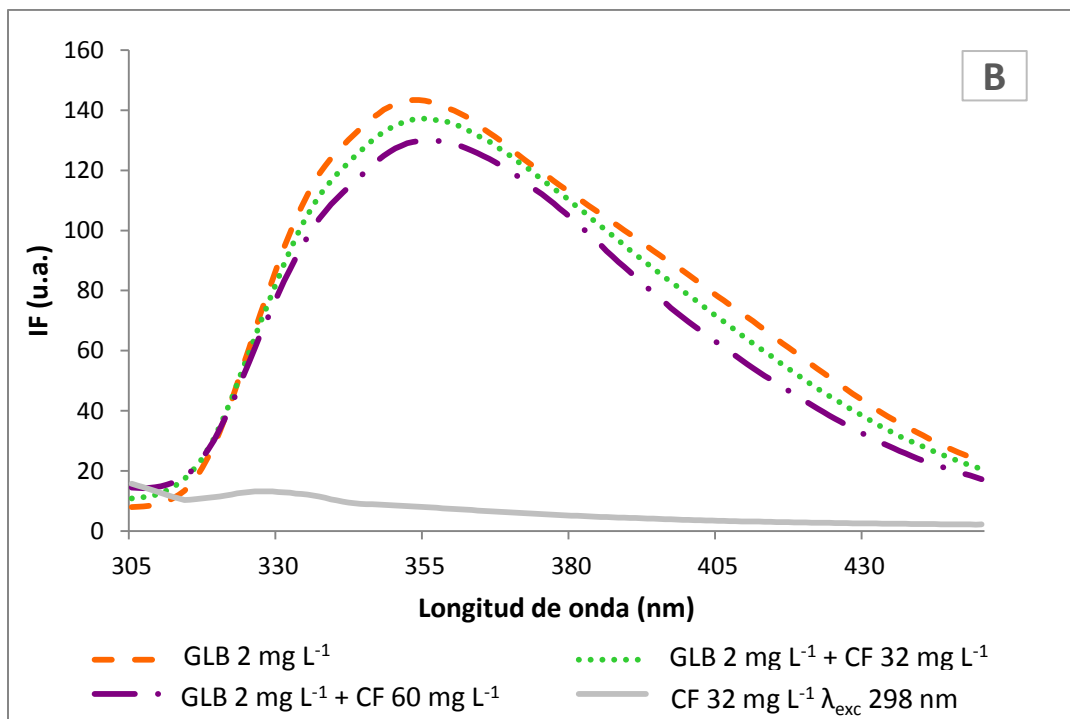


Figura 3.5. Efecto del agregado de CF en la intensidad de fluorescencia de GLB. A: λ_{exc} =234 nm, B: λ_{exc} =298 nm

3.2.4.2 Optimización de los parámetros del sistema FIA-C

Se optimizaron los parámetros del sistema FIA-C, tomando como criterio alcanzar la mayor señal posible, con una eficiente separación del analito de los posibles interferentes de las muestras a ensayar.

En primer lugar, se hizo un ajuste de los parámetros instrumentales, obteniendo señales satisfactorias cuando el ancho de banda de ambos monocromadores se ajustó a 10 nm y el voltaje del detector a 470 V (sensibilidad mínima).

Luego, se llevó a cabo la optimización del pH de la solución de ácido acético empleado en la fase móvil, en un intervalo entre 3,0 y 4,5. Se observó un ligero aumento de la

intensidad de fluorescencia cuando el pH disminuyó, obteniéndose la mayor señal a pH 3,2.

Debido a que el porcentaje inicial de solvente orgánico (25%) en la fase móvil fue seleccionado al azar, y que tan bajo porcentaje implica mayor tiempo de análisis, se decidió evaluar un aumento del porcentaje de ACN, para lo cual se probaron valores entre 45% y 60%. En la Figura 3.6 se puede observar que el mejor pico (teniendo en cuenta una separación conveniente del frente del disolvente y el valor del factor de asimetría del pico) se obtuvo con un 50% de ACN.

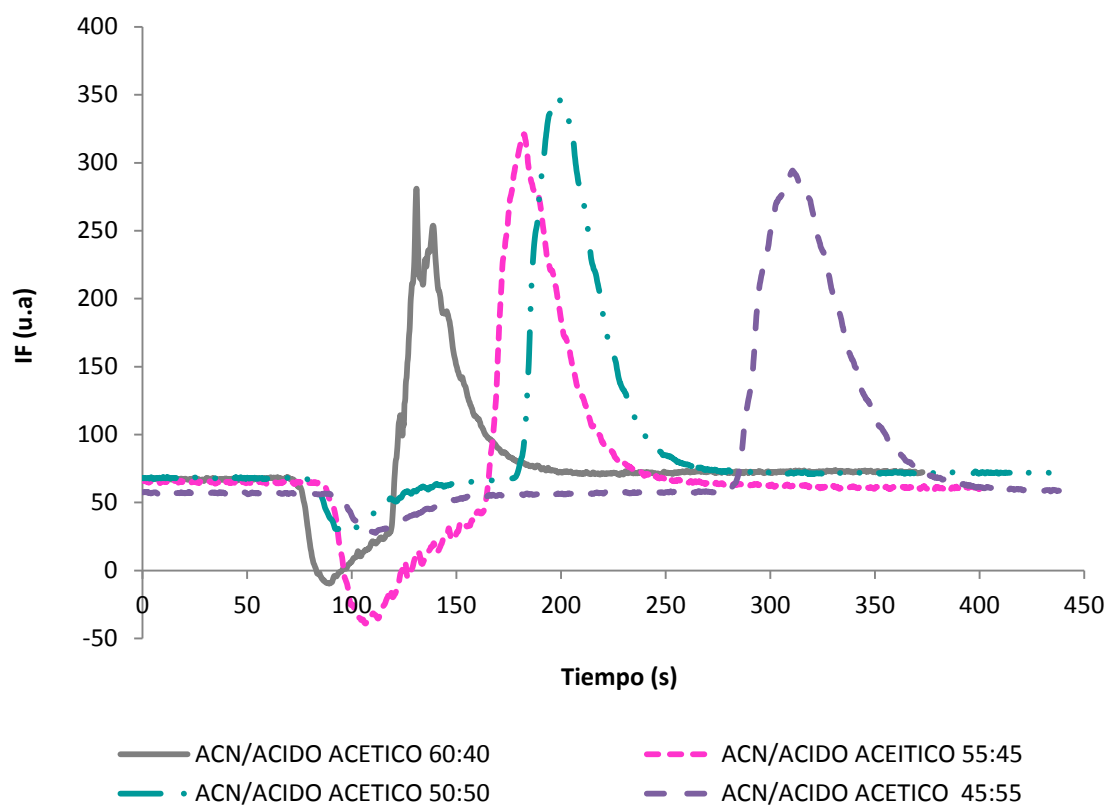


Figura 3.6. Optimización de la fase móvil utilizando diferentes porcentajes de ACN/ácido acético pH 3,2, empleando una solución de GLB de 5 mg L^{-1}

Se evaluó el caudal al cual llevar a cabo la determinación ya que influye de forma directa en el tiempo de retención. Se estudió en el intervalo entre $0,40 \text{ mL min}^{-1}$ y $1,03 \text{ mL min}^{-1}$. Los caudales por debajo de $1,03 \text{ mL min}^{-1}$ derivaron en parámetros cromatográficos no adecuados (tiempos de retención largos, factores de asimetría $\gg 1$). Los caudales mayores de $1,03 \text{ mL min}^{-1}$ dieron lugar a problemas de fugas en el sistema FIA-C por sobrepresión en la columna cromatográfica. Por ello, se seleccionó para los posteriores estudios un caudal de $1,03 \text{ mL min}^{-1}$.

Considerando los valores óptimos obtenidos para la fase móvil y el caudal, se probaron tres volúmenes de inyección diferentes, en función de los bucles ("loops") disponibles en nuestro laboratorio: $10,0 \mu\text{L}$, $50,0 \mu\text{L}$ y $100,0 \mu\text{L}$. Se observó un aumento en la sensibilidad cuando se cambió el bucle de $10,0 \mu\text{L}$ a $50,0 \mu\text{L}$. Por el contrario, la columna se sobrecargó cuando se inyectaron $100,0 \mu\text{L}$. Teniendo en cuenta el compromiso entre la sensibilidad y la sobrecarga de la columna, se seleccionó como volumen de inyección óptimo $50,0 \mu\text{L}$.

3.2.4.3 Parámetros analíticos y características cromatográficas

Para calcular los parámetros analíticos del método propuesto, se tuvieron en cuenta las condiciones ya optimizadas: fase móvil ACN/ácido acético pH 3,2 50:50 (v/v), caudal $1,03 \text{ mL min}^{-1}$ y volumen de inyección de $50,0 \mu\text{L}$.

Debido a que la determinación cromatográfica de GLB se planteó como una estrategia para separar el analito de la matriz de la muestra, se calcularon algunos parámetros

cromatográficos¹⁴⁵. Por otro lado, los parámetros analíticos se evaluaron en términos de linealidad, límite de detección (LOD), tiempo de análisis, repetibilidad y precisión intermedia, estos últimos calculados como %RSD.

En la Tabla 3.2 se resumen los valores obtenidos. Como se puede observar, tanto los parámetros cromatográficos como analíticos fueron satisfactorios. Los valores de %RSD calculados demostraron una alta repetibilidad y precisión intermedia para el método FIA-C propuesto.

El tiempo de análisis requerido, teniendo en cuenta las condiciones ya optimizadas, fue de 12 h⁻¹ para el procedimiento completo. Es decir, fueron necesarios 5 minutos por muestra: 3,5 minutos para la elución completa de GLB de la columna y la restauración de la línea base, y 1,5 minutos para la estabilización de la columna y la carga de una nueva muestra en el sistema.

Tabla 3.2. Parámetros cromatográficos y analíticos evaluados

Parámetro	Valor obtenido
Tiempo de retención (s)	120
Repetibilidad del t_R (RSD%) ¹	0,25
Factor de asimetría	1,2
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	0,50–10,00
Pendiente (mg L ⁻¹)	61,1 ± 0,7

¹⁴⁵ US FDA, Reviewer Guidance Validation of Chromatographic Methods, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 1994

Ordenada al origen	80,9 ± 4,1
R ²	0,997
LOD (mg L ⁻¹) ²	0,10
Repetibilidad (RSD%) ³	0,58
Precisión intermedia (RSD%) ⁴	1,68
Frecuencia de muestreo (h ⁻¹)	12

¹ Calculado a partir del tiempo de retención, n=9, 5,00 mg L⁻¹; ² Calculado a partir de la recta de calibración; ³ Calculado con una solución de GLB de 5,00 mg L⁻¹, n=9; ⁴ Calculado con una solución de GLB de 5,00 mg L⁻¹, por triplicado, en 3 días consecutivos.

3.2.4.4 Análisis de muestras reales

El CAA clasifica a las bebidas energizantes como suplementos dietarios, y contienen, además de CF, taurina, pueden contener o no glucuronolactona e inositol, acompañados de hidratos de carbono, vitaminas o minerales y otros ingredientes autorizados¹⁴⁶. Asimismo, pueden o no contener gas, y poseen azúcar o edulcorantes como endulzantes. Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto, se seleccionaron cinco bebidas energizantes de diferente composición, las cuales se muestran en la Tabla 3.3. Además de los componentes declarados en la información nutricional de estas bebidas, todas las muestras contenían conservantes, colorantes, saborizantes, reguladores de la acidez y antioxidantes permitidos.

¹⁴⁶ Código Alimentario Argentino, Capítulo XVII, Alimentos de régimen o dietéticos, Artículo 1388

Tabla 3.3. Composición correspondiente a 250,0 mL de las muestras de bebidas energizantes analizadas.

	Muestra A ¹	Muestra B ²	Muestra C	Muestra D ³	Muestra E ⁴
Carbohidratos (g)	28	28	27	28	-
Sodio (mg)	30	185	105	249	105
Cafeína (mg)	80	80	80	78	80
Taurina	100 mg	100 mg	1 g	500 mg	1 g
Vitamina B2 (riboflavina)	-	-	-	0,34 mg	-
Vitamina B3 (niacina)	-	-	16,0 mg	4,0 mg	16,0 mg
Vitamina B5 (pantotenato de calcio)	3,3 mg	3,3 mg	5,0 mg	2,0 mg	5,0 mg
Vitamina B6 (piridoxina)	1,25 mg	1,25 mg	1,30 mg	0,40 mg	1,30 mg
Vitamina B8 (biotina)	0,3 mg	0,3 mg	-	-	-
vitamina B12	-	-	1,0 µg	1,2 µg	1,0 µg
Vitamina Bh (inositol)	-	-	-	-	50 mg

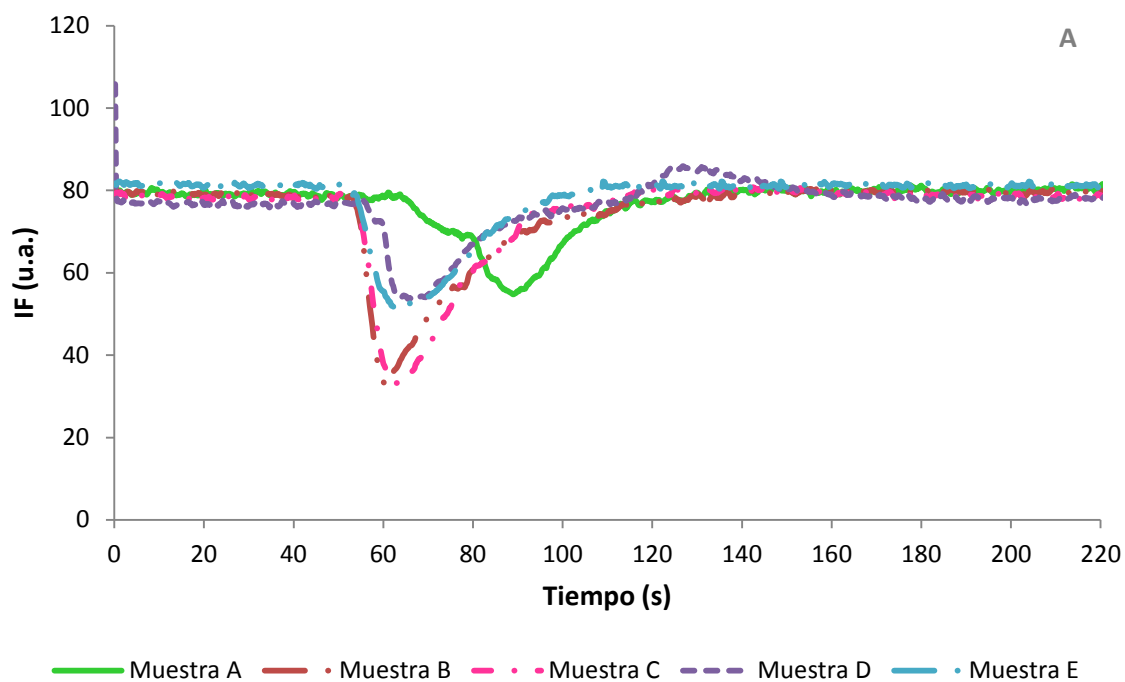
^{1,2} Las muestras A y B son marcas comerciales distintas y difieren en los aditivos utilizados;

³La muestra D contiene además extracto de Guaraná; ⁴ La muestra E no contiene azúcar

La GLB podría agregarse directamente en la bebida energizante (matriz acuosa) o en una mezcla de bebida energizante y alcohol. Por esta razón, de las cinco muestras se

seleccionaron al azar tres (B, C y D), que fueron mezcladas en una proporción de 50:50 (v/v) con dos bebidas alcohólicas diferentes, comúnmente utilizadas para este propósito: champagne y vodka.

Las muestras se inyectaron en el sistema FIA-C para su análisis. Como se puede observar en las Figuras 3.7. A. y B., no eluyen otros compuestos en el tiempo de retención de la GLB, por lo cual se asume que ninguno de los componentes mencionados anteriormente interfiere en la determinación.



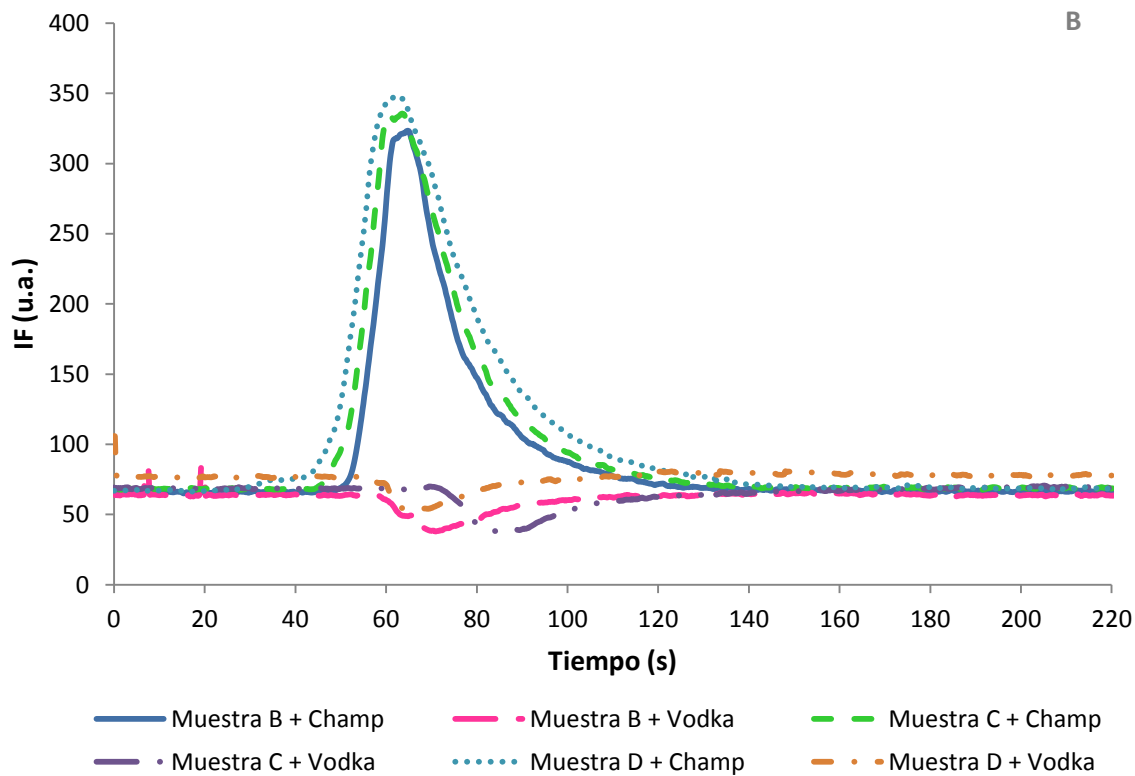


Figura 3.7. Cromatogramas obtenidos para muestras de bebidas energizantes. A. Sin adición de GLB; B. Muestras B, C y D mezcladas con alcohol (champagne y vodka) sin adición de GLB.

Así mismo, el efecto de la matriz se evaluó comparando la pendiente de la curva de calibración obtenida a partir de las soluciones estándar, y la pendiente de una curva de calibración llevada a cabo con las muestras enriquecidas, a los mismos niveles de concentración, mediante el uso de una prueba t-Student ($\alpha = 0,05$)¹⁴⁷. No se hallaron diferencias significativas entre las pendientes de las líneas de regresión estudiadas para el nivel de probabilidad elegido ($p > 0, 1$), lo que significa que no hay presente efecto matriz.

¹⁴⁷ D. L. Massart. (1997). Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, 5° Ediction, Elsevier Science, 20.

Para el estudio de recuperación, se añadió una solución estándar de GLB a todas las muestras analizadas, en dos niveles de concentración, dentro del intervalo de calibración: 2,00 y 7,00 mg L⁻¹. Las muestras se trataron como se describió en la sección 3.2.3.4 y se introdujeron en el sistema FIA-C para su análisis. Los resultados del estudio de recuperación para las muestras analizadas se resumen en la Tabla 3.4, dando valores de recuperación entre 90,4 y 103,7%.

Tabla 3.4. Determinación de GLB en muestras de bebidas energizantes, sin mezclar y mezcladas con alcohol, adulteradas con soluciones estándar.

Muestra ^a	Agregado (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg L ⁻¹)	Recuperación (%)
A	2,00	1,96 ± 0,02	98,0
	7,00	7,26 ± 0,08	103,7
B	2,00	1,99 ± 0,02	99,5
	7,00	7,11 ± 0,03	101,6
C	2,00	2,04 ± 0,01	102,0
	7,00	7,01 ± 0,05	100,1
D ^b	2,00	1,92 ± 0,04	96,0
	7,00	6,33 ± 0,03	90,4
E ^c	2,00	1,88 ± 0,01	94,5
	7,00	6,41 ± 0,07	91,6
B + champagne ^d	2,00	2,04 ± 0,01	102,0

	7,00	6,93 ± 0,05	99,0
C + champagne ^d	2,00	2,06 ± 0,02	103,2
	7,00	7,14 ± 0,04	102,1
D + champagne ^d	2,00	2,05 ± 0,02	102,5
	7,00	6,95 ± 0,02	99,3
B + vodka ^d	2,00	2,02 ± 0,01	101,0
	7,00	6,90 ± 0,05	98,6
C + vodka ^d	2,00	1,98 ± 0,03	99,0
	7,00	6,91 ± 0,02	98,7
D + vodka ^d	2,00	1,97 ± 0,05	98,5
	7,00	6,99 ± 0,03	99,8

Las muestras se analizaron por triplicado. ^a A, B, C, D y E corresponden a muestras de bebidas energizantes de diferente marca o composición. ^b La muestra D contiene extracto de guaraná. ^c La muestra E no contiene azúcar. ^d Muestras mezcladas con alcohol en una proporción de 50:50 (v/v).

En la Figura 3.8 se muestran los cromatogramas correspondientes a las soluciones estándar de GLB de 2,00 mg L⁻¹ y 7,00 mg L⁻¹, y a la muestra B no enriquecida y enriquecida con ambas soluciones estándar. La Figura 3.8A corresponde a los cromatogramas de la muestra B sin mezclar con alcohol, y la Figura 3.8B corresponde a los cromatogramas de la muestra B mezclada con alcohol.

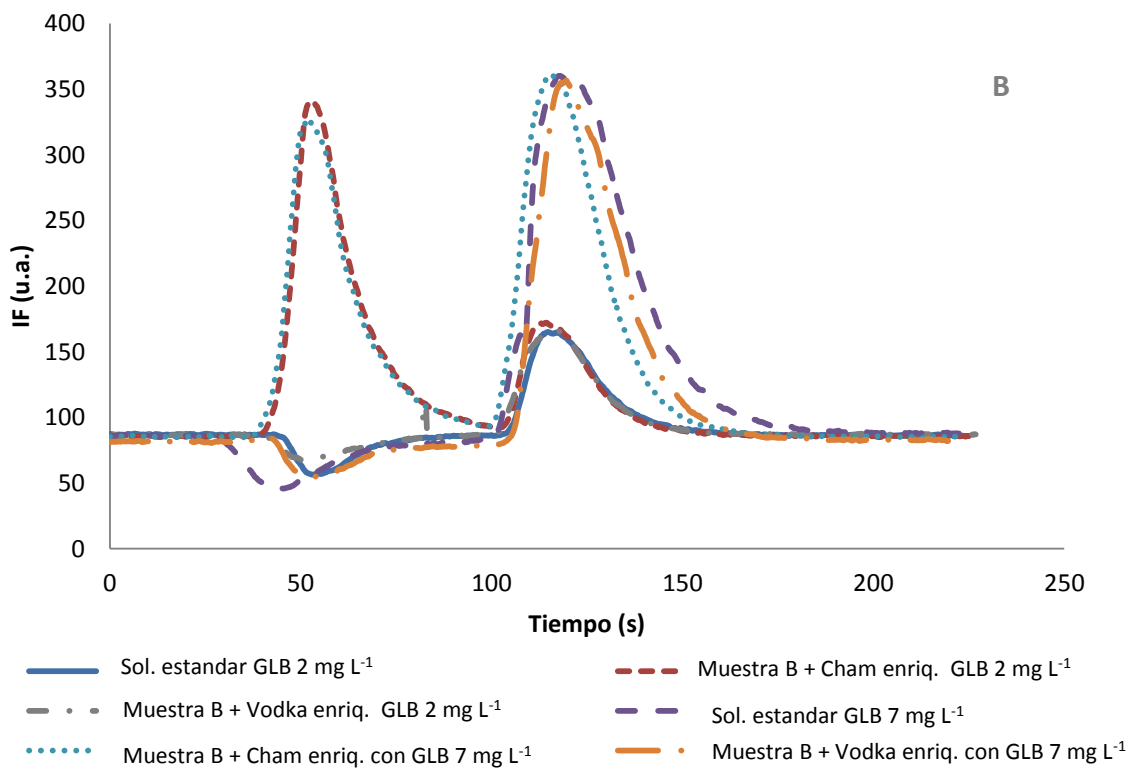
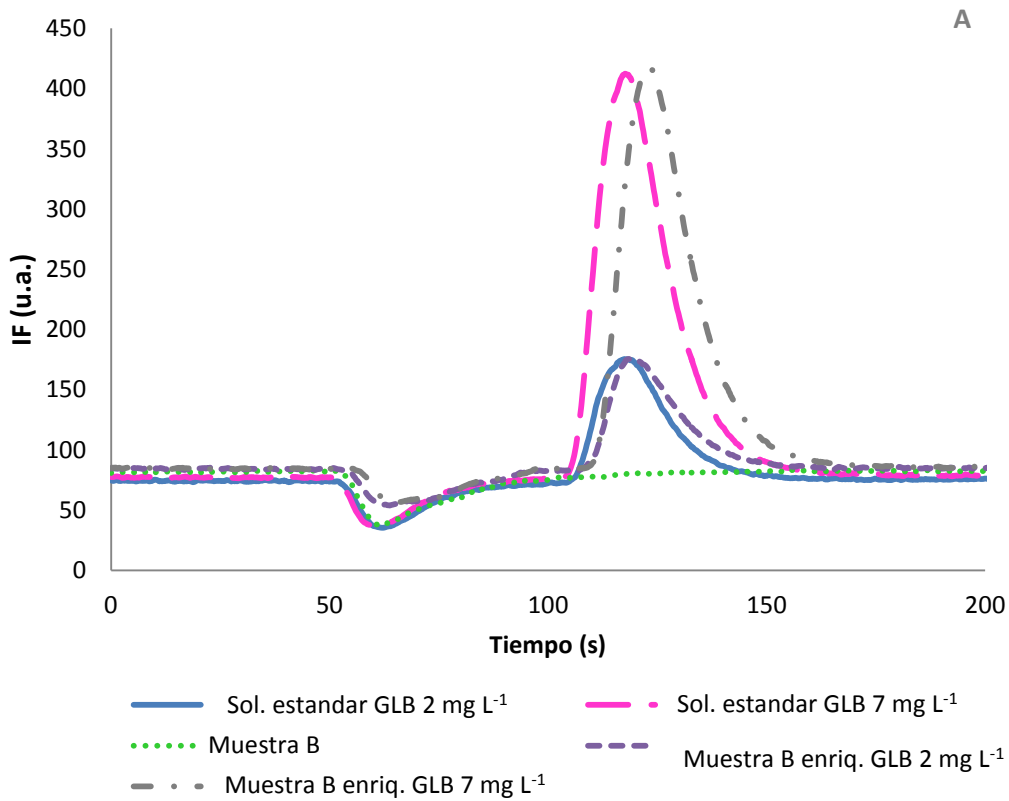


Figura 3.8. Comparación entre las soluciones estándar de GLB de $2,00 \text{ mg L}^{-1}$ y $7,00 \text{ mg L}^{-1}$, y la muestra B. A. No enriquecida y enriquecida con ambas concentraciones de GLB; B. Mezclada con champagne y vodka en una proporción de 50:50 (v/v), no enriquecida y enriquecida con GLB.

Además, para demostrar la aplicabilidad del método propuesto a una situación real, se adulteraron las muestras con comprimidos comerciales de GLB. De esta manera, también se tuvo en cuenta en el análisis la matriz del fármaco. Se seleccionaron 3 muestras al azar y se siguió el procedimiento descrito en la sección 3.3.3.2. Los porcentajes de recuperación obtenidos estuvieron entre 96,5 y 104,5% (Tabla 3.5). La Figura 3.9 muestra el cromatograma FIA-C para la muestra B, sin mezclar y mezclada con alcohol, con la adición de un comprimido de GLB.

Tabla 3.5. Determinación de GLB en muestras de bebidas energizantes adulteradas con comprimidos comerciales de GLB

Muestra ^a	GLB en el comprimido (mg L ⁻¹) ^c	GLB encontrado (mg L ⁻¹)	Recuperación (%)
B	2,00	1,93 ± 0,01	96,5
C	2,00	1,96 ± 0,07	98,0
D	2,00	1,98 ± 0,06	99,2
B + champagne^b	2,00	1,96 ± 0,02	98,0
C + champagne^b	2,00	1,97 ± 0,03	98,5
D + champagne^b	2,00	2,09 ± 0,01	104,5
B + vodka^b	2,00	1,99 ± 0,01	99,5
C + vodka^b	2,00	2,08 ± 0,02	104,0
D + vodka^b	2,00	2,02 ± 0,01	101,0

Las muestras se analizaron por triplicado; ^a B, C y D corresponden a muestras de bebidas energizantes de diferente composición, elegidas al azar. ^b Las muestras se mezclaron con champagne y vodka en una proporción 50:50 (v/v); ^c Concentración calculada mediante la adición de un comprimido de GLB en 250 mL de muestra, teniendo en cuenta la dilución correspondiente.

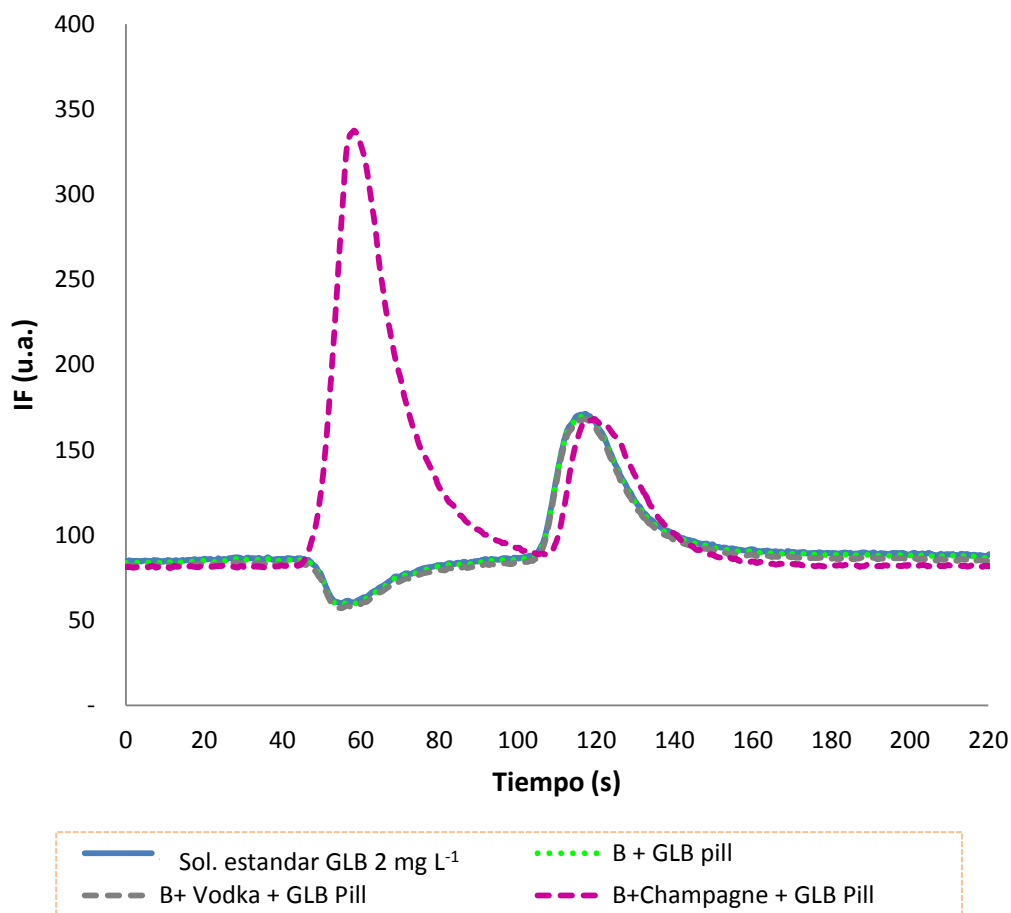


Figura 3.9. Bebida energizante B, sin mezclar y mezclada con alcohol (champagne y vodka), adulterada con comprimidos de GLB comerciales.

3.2.5 Conclusiones parciales

Se desarrolló un método automático basado en el acoplamiento de una columna cromatográfica a un sistema FIA, para la determinación de GLB agregada ilegalmente a bebidas energizantes, sin mezclar y mezcladas con alcohol. Se comprobó que la CF, uno de los componentes que se encuentran en mayor concentración en las bebidas energizantes, interfiere en la señal de fluorescencia de GLB. Por esta razón, la separación de la GLB de los componentes de la matriz de muestra es fundamental. Si bien, otros autores han

determinado GLB por fluorescencia, la relación entre el alto contenido de CF y la disminución de la señal fluorescente no fue informada previamente¹⁴⁸.

El método de separación propuesto es rápido, robusto y no requiere tratamiento previo de la muestra. Además, utiliza una instrumentación fácil de operar y de bajo costo, comparado con un cromatógrafo líquido. Por otro lado, debido a las características inherentes a los sistemas en flujo, se logró una disminución importante del consumo de reactivos y solventes orgánicos, una muy buena reproducibilidad y un excelente tiempo de análisis.

Las muestras de bebidas energizantes se analizaron sin mezclar y mezclando con bebidas alcohólicas, y se las adulteró con soluciones estándar de GLB y con comprimidos comerciales, obteniendo resultados satisfactorios en ambos casos, por lo que se demostró la eficacia del método desarrollado en una situación real.

¹⁴⁸ D. S. M. Ribeiro, J.A.V. Prior, C.J.M. Taveira, J.M.A.F.S. Mendes, J.L.M. Santos, Automatic miniaturized fluorometric flow system for chemical and toxicological control of glibenclamide. *Talanta* 84, 1329–1335, 2011.

3.3 Determinación de cafeína en muestras de té, café y energizantes mediante el efecto de filtro interno

3.3.1 Problemática.

La CF, uno de los compuestos psicoactivos más consumido en el mundo, se puede encontrar en más de 60 especies de plantas¹⁴⁹. Si bien fue aislada en 1820¹⁵⁰, la estructura correcta de esta metilxantina fue resuelta en la última década del siglo XIX, y está íntimamente relacionada con otras xantinas trimetiladas, como la teobromina y la teofilina. La CF ha sido parte de diversas culturas durante mucho tiempo, ya que se encuentra formando parte de diversas fuentes alimenticias como bebidas de café, té, mate y cacao, y actualmente como ingrediente en la producción de refrescos y bebidas energizantes¹⁵¹.

La concentración de CF encontrada en esas bebidas varía según la especie de la planta (el tipo de grano de café, cacao u hoja de té), la ubicación geográfica, el clima, las prácticas culturales, el tamaño de la porción consumida, y el modo de preparación. Por ejemplo, la cantidad de CF presente en una taza de 200 mL de té es de aproximadamente 46 mg y de café, aproximadamente 134 mg¹⁵².

¹⁴⁹G. Korekar, A. Kumar, C. Ugale, Occurrence, fate, persistence and remediation of caffeine: a review Environmental Science and Pollution Research, 27, 34715–34733, 2020.doi.org/10.1007/s11356-019-06998-8

¹⁵⁰J. B. Calixto, The role of natural products in modern drug discovery. Anais Da Academia Brasileira de Ciências, 91, 2019. [doi:10.1590/0001-3765201920190105](https://doi.org/10.1590/0001-3765201920190105)

¹⁵¹M. F. Bessada Sílvia, R. C. Alves, M. Oliveira, P.P. Beatriz, Caffeine-based food supplements and beverages: Trends of consumption for performance purposes and safety concerns. Food Research International, 109, 310–319, 2018. [doi:10.1016/j.foodres.2018.04.050](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.050)

¹⁵²J. Kotsopoulos, A. H. Eliassen, S. A. Missmer, S. E. Hankinson, S. S. Tworoger, Relationship between caffeine intake and plasma sex hormone concentrations in premenopausal and postmenopausal women. American Cancer Society, 115, 2765–2774, 2009. <https://doi.org/10.1002/cncr.24328>

La CF es utilizada como un estimulante del sistema nervioso central considerándose una droga blanda. Neurológicamente, su acción produce una estimulación psicomotora que contribuye a aumentar el estado de alerta, la atención, la concentración, el razonamiento y la memoria, y mejora el rendimiento deportivo¹⁵³. Cuando se produce una sobredosis de CF (niveles de ingesta superiores a 400 mg por día), los sistemas neurológico, cardiovascular y renal se ven afectados produciendo síntomas como nerviosismo, ansiedad, excitación e irritabilidad entre otros¹⁵⁴.

En la bibliografía, se han reportado diversos métodos analíticos para lograr la cuantificación de la CF en bebidas que la contienen. Generalmente, se debe realizar la extracción o separación de CF de la matriz de muestra para reducir las posibles interferencias y así aumentar la sensibilidad del método^{155,156,157}.

El incremento o la disminución de la señal de fluorescencia de ciertos compuestos también han sido utilizados para determinar la concentración de CF en diferentes muestras. Alesso y colaboradores reportaron un procedimiento usando albúmina de suero bovino como fluoróforo para la determinación de CF en un sistema de análisis en flujo¹⁵⁸.

¹⁵³ E. Colin-Benoit, R. Friolet, M. Rusca, D. Teta, N. Gobin, Intoxication sévère à la caféine traitée par hémodialyse et hémofiltration. *Néphrologie & Thérapeutique*, 13, 183–187, 2017. doi:10.1016/j.nephro.2016.10.005

¹⁵⁴ C. Willson, . The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. *Toxicology Reports*, 5, 1140-1152, 2018 doi:10.1016/j.toxrep.2018.11.002

¹⁵⁵ M. Russo, P. Dugo, F. Chiara, L. Dugo, M. Zoccali, L. Mondello, L. Gara, Use of an Online Extraction Technique Coupled to Liquid Chromatography for Determination of Caffeine in Coffee, Tea, and Cocoa. *Food Analytical Methods*, 11, 2637–2644, 2018.

¹⁵⁶ L. Mihalčíková, W. Boonjob, H. Sklenářová, Automated Sequential Injection Method for Determination of Caffeine in Coffee Drinks. *Food Analytical Methods*, 11, 111–118, 2017 .doi:10.1007/s12161-017-0982-3

¹⁵⁷ A. Yiğit, N. Alpar, Y. Yardim, M. Çelebi, Z. Şentürk, A Graphene-Based Electrochemical Sensor for the Individual, Selective and Simultaneous Determination of Total Chlorogenic Acids, Vanillin and Caffeine in Food and Beverage Samples. *Electroanalysis*, 30, 1-11, 2018. doi:10.1002/elan.201800229

¹⁵⁸ M. Alesso, L. P. Fernández, Caffeine determination by flow injection analysis employing Bovine Serum Albumin as a fluorophore. *Microchemical Journal*, 127, 165–169, 2016. doi:10.1016/j.microc.2016.03.004

La cuantificación del analito se realizó en muestras de bebidas energizantes y suplementos dietéticos. En este caso, la validación del método se evaluó utilizando el método de adición estándar, para evitar las interferencias de matriz. Por otro lado, se propuso la determinación de CF en muestras de té a partir de la formación de un complejo entre el monómero de naranja de acridina y la CF¹⁵⁹. Aquí, la precipitación de los polifenoles del té se realizó usando polivinilpirrolidona para eliminar la interferencia con la matriz de la muestra. El efecto de la concentración de CF sobre la intensidad de fluorescencia del ácido acetilsalicílico (aspirina) también fue propuesto para determinar CF en bebidas, pero este método solo es aplicable a bebidas sin color o con un color claro¹⁶⁰.

En este trabajo se propone la determinación de CF en bebidas tales como café, té y bebidas energizantes basada en el efecto que tiene la presencia de diferentes concentraciones de CF en la intensidad de fluorescencia de la GLB. En primer lugar, se estudió este efecto y luego se aplicó para cuantificar el analito en muestras complejas, sin tratamiento previo.

3.3.2 Objetivos

Estudiar la relación entre la presencia de CF y la intensidad de fluorescencia de la GLB, y emplear este efecto para la determinación de la concentración de CF en muestras de bebidas con un alto contenido de la misma, como te, café y bebidas energizantes.

¹⁵⁹ A. K. Ghosh, C. Ghosh, A. Gupta, A Simple Approach To Detect Caffeine in Tea Beverages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 3814–3820, 2013. doi:10.1021/jf400293u

¹⁶⁰ J. Smith, K. Loxley, P. Sheridan, T. M. Hamilton. Analysis of Caffeine in Beverages Using Aspirin as a Fluorescent Chemosensor. *Journal of Chemical Education*, 93, 1776-1780, 2016. doi.org/10.1021/acs.jchemed.6b00303

3.3.3 Parte experimental

3.3.3.1 Reactivos y preparación de soluciones

Se emplearon reactivos de grado analítico y las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura. El ACN ($\geq 99\%$, grado HPLC) y el ácido acético ($\geq 99\%$) fueron adquiridos en Merck (Alemania).

- *Soluciones de CF (ReagentPlus[®], Sigma-Aldrich):* La solución patrón de 500 mg L⁻¹ se preparó en ACN y se almacenó en una botella oscura a 4 °C. Las soluciones de trabajo de 1,00-100,0 mg L⁻¹, fueron preparadas adicionando el volumen adecuado de la solución patrón y diluidas con una solución de ácido acético pH 3,2/ACN 70:30 v/v.
- *Soluciones de GLB ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Alemania):* Se preparó una solución patrón de 200 mg L⁻¹ en ACN y se almacenó de igual manera que la solución patrón de CF. Para optimizar la concentración adecuada de GLB, se prepararon soluciones de la misma entre 1,00-30,0 mg L⁻¹, diluyendo el volumen apropiado de la solución patrón con una solución de ácido acético pH 3,2/ACN 70:30 v/v.
- *Solución reguladora pH 7,0:* se disolvieron 2,72 g de fosfato monopotásico (KH₂PO₄, Solución A) y 1,42 g de fosfato disódico (Na₂HPO₄, Solución B), por separado, en 1000 mL de agua. Luego, se mezclaron 13,96 mL de la Solución A y 24,04 mL de la Solución B.

- Para preparar la solución de pH 10,0, se empleó una solución de NaOH de concentración $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. La solución de pH 3,2 fue preparada con una solución de ácido acético de concentración $1,6 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.
- Adsorbente de base sílice funcionalizado con octadecilo (C18) Polygoprep (tamaño de poro 60Å, tamaño de partícula-80 μm) se obtuvo de Macherey-Nagel (Alemania).

3.3.3.2 Instrumentación y software

- *Mediciones de fluorescencia.* Se utilizó para las mediciones una celda de cuarzo (Hellma) con un volumen interno de 1000 μL y un camino óptico de 1,0 cm, la cual se colocó en un espectrofluorómetro Jasco FP 6500 (ancho de banda de excitación y emisión 5 nm, voltaje PMT 470 V, respuesta 0,2 s).
- *Mediciones de vida media de fluorescencia* Se realizaron utilizando un fluorómetro de conteo de fotones individuales correlacionado con el tiempo de Edinburgh Instruments (TC-SPC 900). La GLB se excitó a 234 nm usando una lámpara de hidrógeno Thyatron. El perfil de disminución de la emisión de GLB se recogió a 350 nm y se ajustó a una función de disminución monoexponencial. Los criterios utilizados para juzgar la bondad del ajuste fueron χ^2 y los residuos ponderados (Ri).
- *Extracción en fase sólida (SPE) utilizada para la validación.* Se diseñó un sistema en flujo continuo simple. Para propulsar los fluidos, se utilizó una bomba peristáltica Gilson® Minipuls3. En todos los canales se utilizaron tubos

de Tygon® MHLL de 1,14 mm d.i. (Ismatec, Alemania), adecuados para disolventes orgánicos. Las conexiones del sistema en flujo fueron hechas con tubos de PTFE de 0,8 mm de d.i. (Omnifit, Inglaterra).

- *Análisis cromatográfico.* El mismo se llevó a cabo en un sistema HPLC Waters 600 equipado con un detector de arreglo lineal de diodos. La columna cromatográfica utilizada fue una columna monolítica basada en sílice RP-18 (Chromolith® Flash, 25×4,6 mm, Merck, Alemania) protegida con un guarda columna del mismo material (Chromolith®, 10×4,6 mm, Merck, Alemania). La fase móvil fue una solución de acetato de sodio anhidro $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹/ tetrahidrofurano (95:5 v/v). La temperatura de la columna se ajustó a 25°C y el caudal fue de 1,0 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue de 10 µL y la CF se detectó a 280 nm.
- *Medidas de pH:* El pH se determinó con un medidor de pH (Isemeter modelo 710A).
- Baño de agua termostático con recirculación (Julabo U36A), utilizado para mantener constante la temperatura de las medidas.

3.3.3.3 Procedimiento

Para realizar las mediciones de fluorescencia, en un matraz de 10,00 mL se agregaron 800 µL de la solución patrón de 200,0 mg L⁻¹ de GLB (correspondientes a una concentración final de 16,0 mg L⁻¹) y adecuados volúmenes de la solución patrón de CF (0,02-2,00 mL),

correspondiente a concentraciones entre 1,00 y 100,0 mg L⁻¹. El volumen se completó con 7,00 mL de ácido acético pH 3,2 y la cantidad adecuada de ACN necesaria para alcanzar un porcentaje final del 30%. Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron entre 280 nm y 450 nm, ajustando la longitud de onda de excitación a 234 nm. La temperatura se mantuvo constante a 25°C.

3.3.3.4 Preparación de las muestras

Las muestras de café, té y bebidas energizantes se adquirieron de diferentes comercios de la ciudad de Bahía Blanca, Argentina. Las muestras de café (5,0 g de café en saquitos) y de té (2,0 g de té en saquitos) se prepararon de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para ello, los saquitos de té y de café se colocaron en vasos de precipitado y se añadió 200,0 mL de agua caliente a una temperatura aproximada de 70 °C. La solución resultante se agitó y los saquitos se dejaron sumergidos durante 5 minutos. Luego, se tomaron 40,0 mL de esta solución y se diluyeron con agua hasta 100,0 mL. Posteriormente, se filtraron 10,00 mL de la muestra diluida con un filtro de jeringa de 0,45 µm.

Las muestras de las bebidas energizantes se analizaron inmediatamente después de la apertura de las latas, realizando previamente la desgasificación por sonicación durante 10 minutos en un baño ultrasónico. Luego, se tomaron 10,00 mL de cada muestra, se colocaron en un matraz volumétrico de 100,0 mL y se llevaron a volumen con agua. Por último, se filtraron 10,00 mL con un filtro de 0,45 µm.

Para la realización del análisis, se transfirieron a un matraz volumétrico de 10,00 mL, 500 µL de las soluciones de café y té, y 1000 µL de bebida energizante. Se agregaron 800 µL de

la solución patrón de GLB, y el volumen se completó con una solución de ácido acético pH 3,2 y ACN para lograr un porcentaje final de 70 y 30%, respectivamente.

Todas las muestras se analizaron por triplicado y se filtraron antes de las mediciones de fluorescencia con un filtro de 0,45 μm .

3.3.3.5 Método de referencia

Para comprobar la veracidad del método propuesto, se llevó a cabo la determinación de CF en las muestras seleccionadas mediante una adaptación del método sugerido por Pearson¹⁶¹.

En primer lugar, se realizó la extracción de la CF de las muestras por un procedimiento de SPE usando una mini-columna de vidrio (32 mm x 4 mm d.i.) empacada con 100 mg de adsorbente C18. Se usó algodón como fritas, y se colocó a ambos lados de la columna para evitar pérdidas del adsorbente. En la Figura 3.10 se muestra el sistema en flujo para llevar a cabo el procedimiento. Antes de comenzar, se activó el adsorbente con 5,0 mL de metanol y luego la columna fue equilibrada con 2,0 mL de agua. Para la extracción del analito, se introdujeron 10,00 mL de la solución estándar o muestra. Una vez que la solución estándar o muestra pasó a través de la columna de extracción, se lavó con agua para eliminar los residuos de muestra que pudieron haber quedado en la columna. El analito se eluyó con 5,0 mL de la fase móvil, se recolectó en un matraz de 10,00 mL y el volumen se completó con fase móvil. Esta solución se inyectó en el sistema de HPLC, previamente filtrada, para su análisis. El blanco de extracción se realizó de manera similar.

¹⁶¹ S. K. Ronald, S. Ronald, E. Harold, Pearson's Composition and Analysis of Foods, New York, Longman, 1991.

La curva de calibración se construyó en el intervalo entre 1,00 y 100,0 mg L⁻¹, diluyendo el volumen apropiado de la solución patrón de CF con la fase móvil.

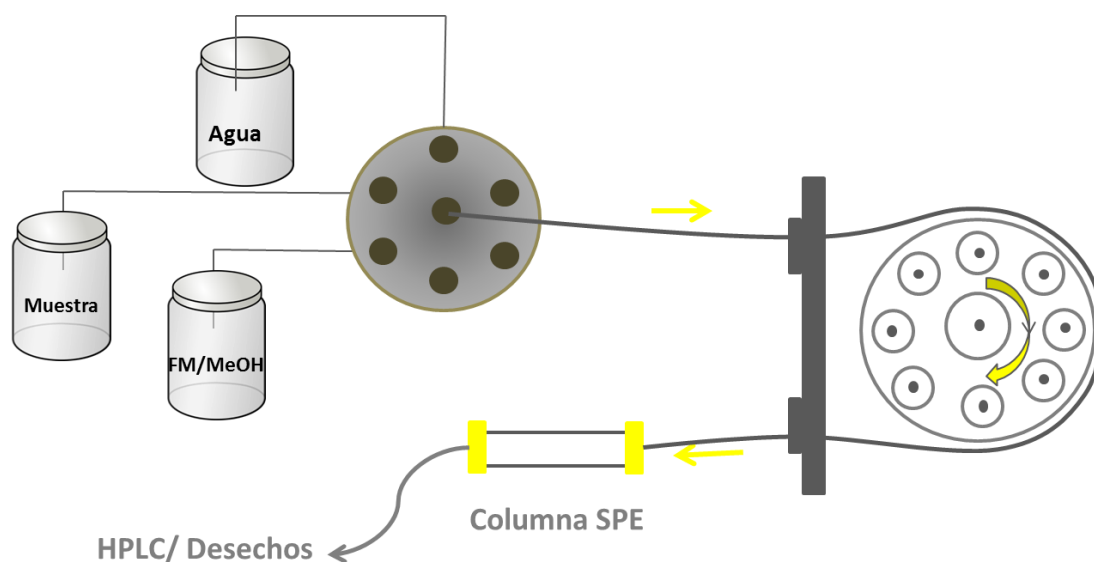


Figura 3.10. Sistema en flujo utilizado para realizar la extracción de CF de muestras de té, café y energizante.

3.3.4 Resultados y discusión

3.3.4.1 Efecto de la presencia de CF con la señal de fluorescencia de la GLB

En el trabajo anterior, se observó que la presencia de CF disminuía la intensidad de fluorescencia de GLB, y que esa disminución dependía de la concentración de CF. Por ello, se decidió evaluar de forma exhaustiva esta interacción. En primer lugar, se estudiaron las características espectroscópicas de GLB y CF. La Figura 3.11 muestra los espectros de absorción de CF y los espectros de excitación y emisión de fluorescencia de GLB en las

mismas condiciones experimentales. Como se mencionó en el trabajo anterior, la GLB presenta dos máximos de excitación, a 234 nm y 298 nm, con emisión a 350 nm . Como se puede observar, los espectros de excitación de GLB y de absorción de CF se superponen entre 220 y 300 nm lo que permite suponer que la disminución de la intensidad de la señal fluorescente de la GLB, el fluoróforo, se debe a un efecto de filtro interno (EFI) producido por la CF, el absorbente. Para elegir la longitud de onda de excitación para este trabajo, se tuvo en cuenta que la señal de la GLB exhibió una respuesta sensible a la adición de CF cuando la excitación se realizó a 234 nm, observando una disminución de la señal de más del 70% cuando se agregó una concentración de CF de 70 mg L^{-1} . Además, a esta longitud de onda se produce un corrimiento de Stokes (118 nm) entre los espectros de excitación y emisión de la GLB, reduciendo la posibilidad de reabsorción de la luz emitida. Por lo tanto, se eligió 234 nm como la longitud de onda de excitación para realizar los experimentos.

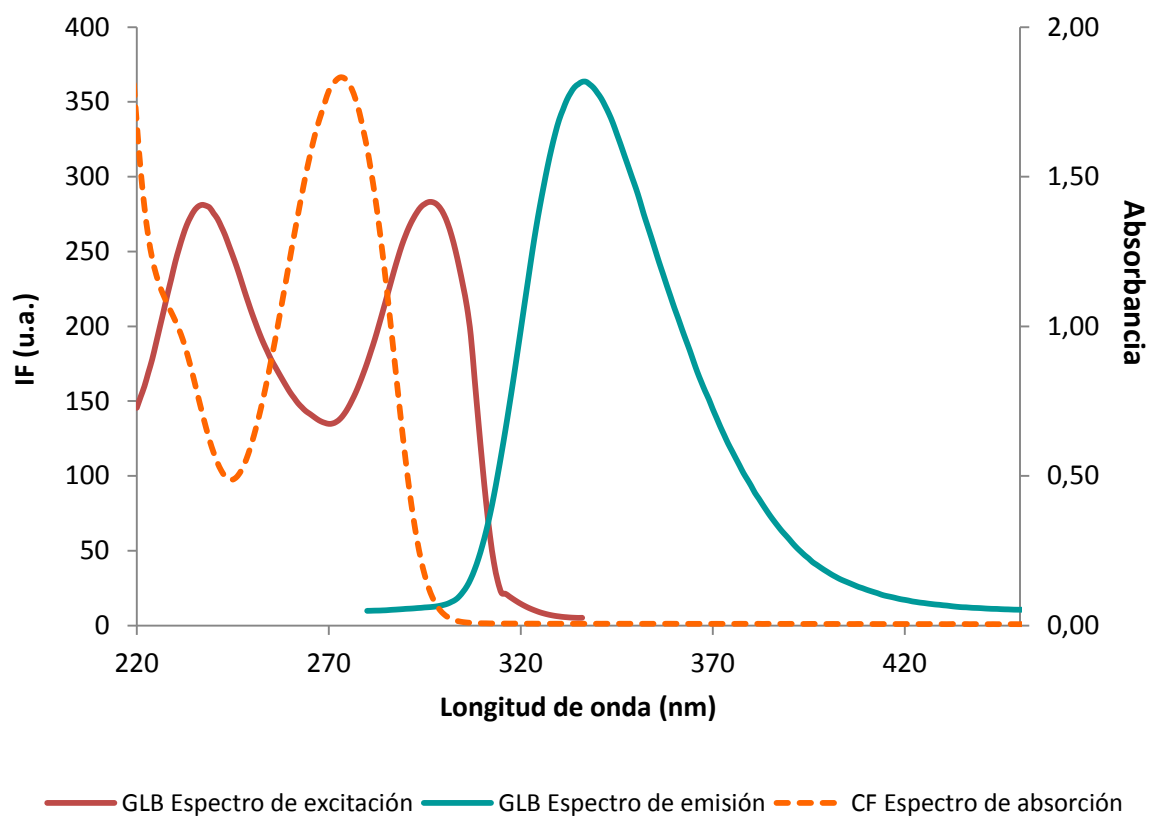


Figura 3.11. Espectros de excitación (λ_{ex} 234 y 298 nm) y emisión (λ_{em} 350 nm) de GLB ($16,0 \text{ mg L}^{-1}$), y espectro de absorción de CF (30 mg L^{-1}).

Una de las condiciones necesarias para definir la posibilidad de un EFI y descartar la posibilidad de una extinción dinámica de la fluorescencia, es que el estado excitado del fluoróforo no debe ser desactivado por el absorbente. Esto fue evaluado a través de la medición del tiempo de vida de la GLB en presencia de CF. El valor del tiempo de vida de fluorescencia de GLB obtenido fue de 0,29 ns y no se observó ningún cambio de este valor hasta una concentración de CF de $127,6 \text{ mg L}^{-1}$, lo que indica que no hay una desactivación significativa del estado singlete excitado de GLB por la CF (Figura 3.12).

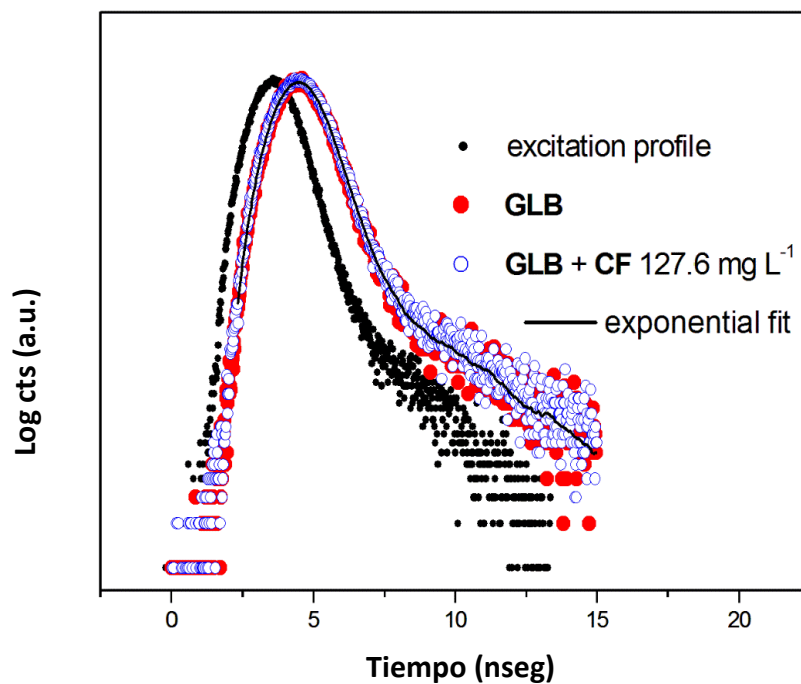


Figura 3.12. Decaimiento de fluorescencia en función del tiempo de GLB (16 mg L^{-1}) en presencia y ausencia de CF (hasta una concentración de $127,6 \text{ mg L}^{-1}$).

Por otro lado, para descartar la posibilidad de una extinción estática, se obtuvieron los espectros de emisión de GLB en ausencia y en presencia de CF a 310 nm . Es importante tener en cuenta que a esa longitud de onda solo la GLB absorbe radiación (Figura 3.13 A), y el espectro de emisión de GLB es independiente de la concentración de CF (Figura 3.13 B).

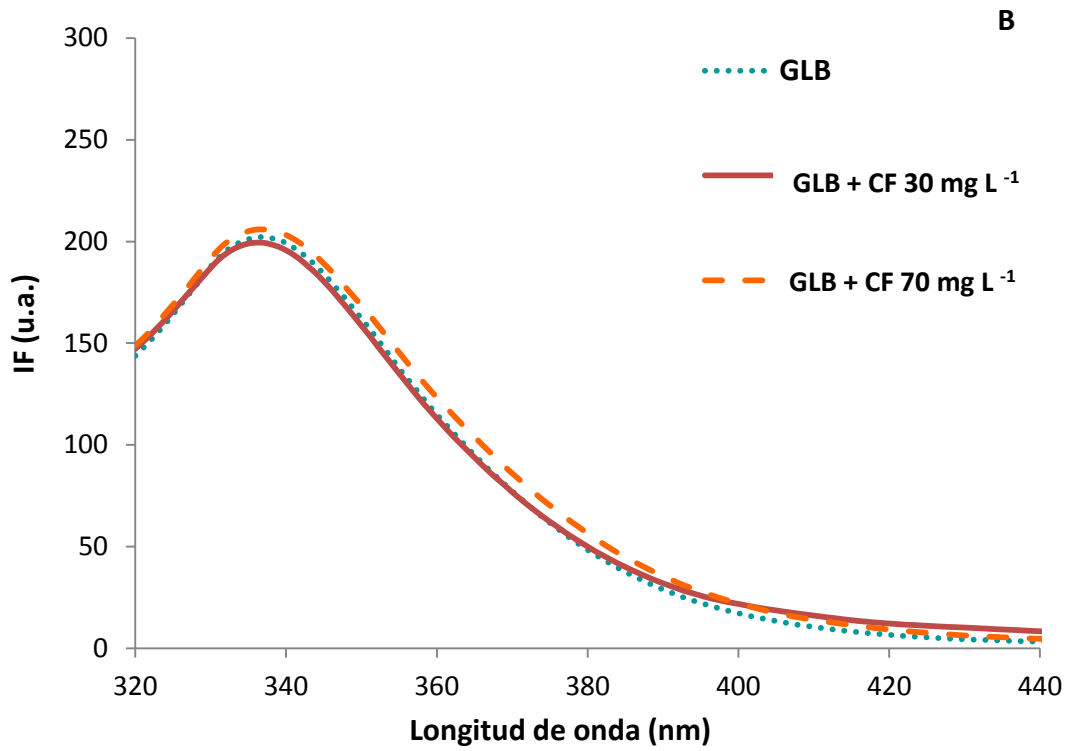
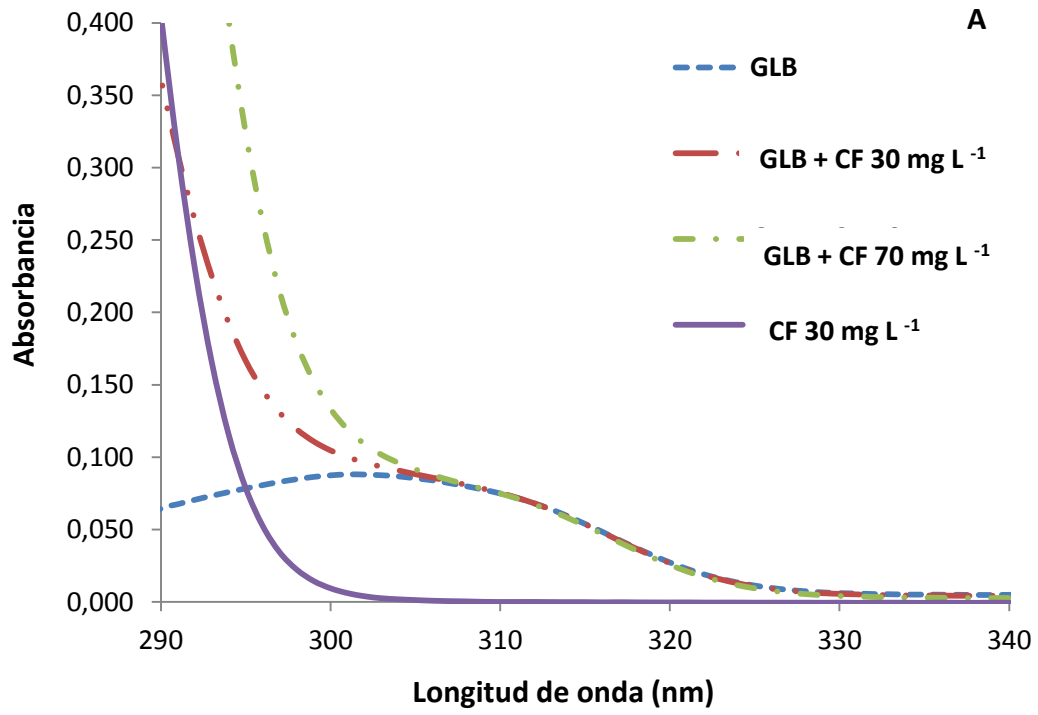


Figura 3.13. Espectros de absorción y de emisión de GLB en ausencia y presencia de CF. (A) Espectros de absorción de GLB (16 mg L^{-1}), en ausencia y en presencia de CF (30 y 70 mg L^{-1}), y espectro de absorción de CF (30 mg L^{-1}), registrados entre 290 y 340 nm . (B) Espectros de emisión de GLB (16 mg L^{-1}) en ausencia y en presencia de CF (30 y 70 mg L^{-1}) a $\lambda_{\text{ex}} = 310 \text{ nm}$.

Por lo tanto, de los experimentos anteriores, se puede descartar una desactivación del estado singlete excitado de la GLB debido a extinción dinámica o estática, y se puede concluir que la disminución de la intensidad de fluorescencia de GLB, cuando se excita a 234 nm , se debe a la absorción de la radiación de excitación por parte del absorbente.

3.3.4.2 Optimización de los parámetros experimentales

En primer lugar, se optimizó la concentración del fluoróforo para lograr la máxima sensibilidad del método propuesto. Para ello, se prepararon soluciones de concentración creciente de GLB (I_0 , $1,0$ - $30,0 \text{ mg L}^{-1}$), y se realizaron las medidas de intensidad de fluorescencia a 350 nm ($\lambda_{\text{ex}} 234 \text{ nm}$), en ausencia y en presencia de una concentración constante de CF (I , $30,0 \text{ mg L}^{-1}$). Se calculó la relación I_0/I y se graficó frente a la concentración de GLB. Como resultado se observó que la señal máxima se corresponde a una concentración de GLB de $16,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 3.14). A concentraciones más altas, se observó una disminución en la intensidad de fluorescencia de GLB.

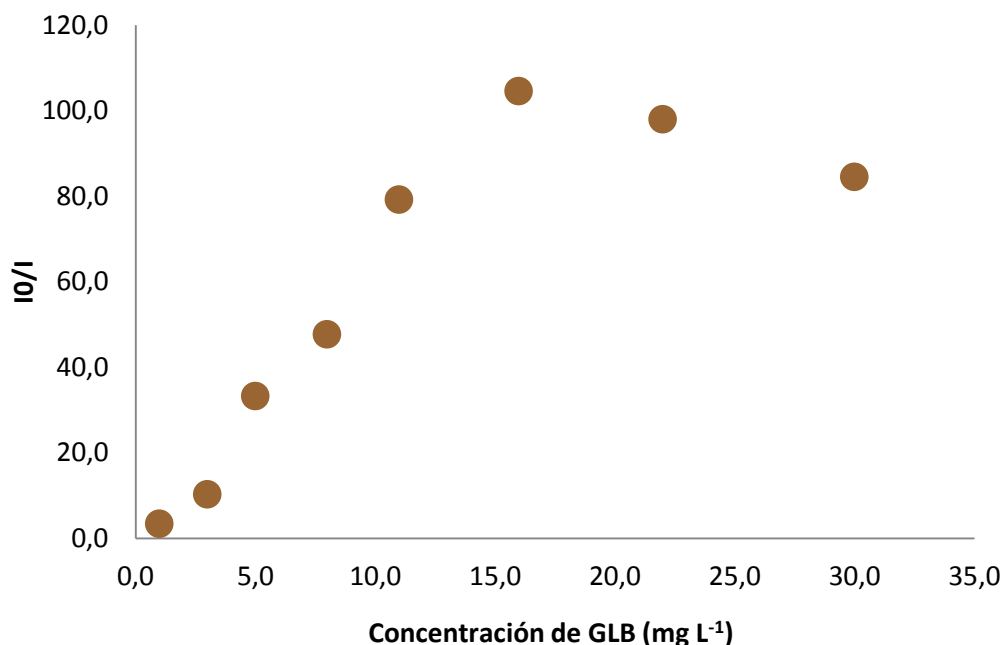


Figura 3.14. Estudio de la concentración óptima de GLB a una concentración constante de CF (30 mg L⁻¹).

También se realizaron estudios del valor de pH y temperatura debido a que estos parámetros pueden modificar las propiedades fluorescentes del fluoróforo.

Para evaluar el efecto del valor de pH sobre la intensidad de fluorescencia de la GLB, se tuvo en cuenta que este compuesto se comporta como un ácido débil con un valor de pK_a de 5,3^{162,163}. Por lo tanto, se procedió al estudio del comportamiento del fluoróforo a

¹⁶² M. Remko, Theoretical study of molecular structure, pK_a, lipophilicity, solubility, absorption, and polar surface area of some hypoglycemic agents. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 897, 73–82, 2009. doi:10.1016/j.theochem.2008.11.02

¹⁶³ S. B. Murdande, M. J. Pikal, R. M. Shanker, R. H. Bogner, Solubility Advantage of Amorphous Pharmaceuticals: II. Application of Quantitative Thermodynamic Relationships for Prediction of Solubility Enhancement in Structurally Diverse Insoluble Pharmaceuticals. , 27, 2704–2714, 2010. doi:10.1007/s11095-010-0269-5

valores de pH por encima y por debajo del valor de pK_a , utilizando una solución de GLB de $16,0 \text{ mg L}^{-1}$ y ajustando los valores de pH a 3,2, 7,0 y 10,0 con una solución de ácido acético, una solución reguladora $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ y una solución de NaOH, respectivamente. Se registraron los espectros de emisión correspondientes (Figura 3.15) y se calculó el rendimiento cuántico relativo de fluorescencia de GLB a partir del área de cada espectro Tabla 3.6. Tanto el valor de rendimiento cuántico como la relación entre los valores de rendimiento cuántico e intensidades de fluorescencia fueron mayores a pH 3,2.

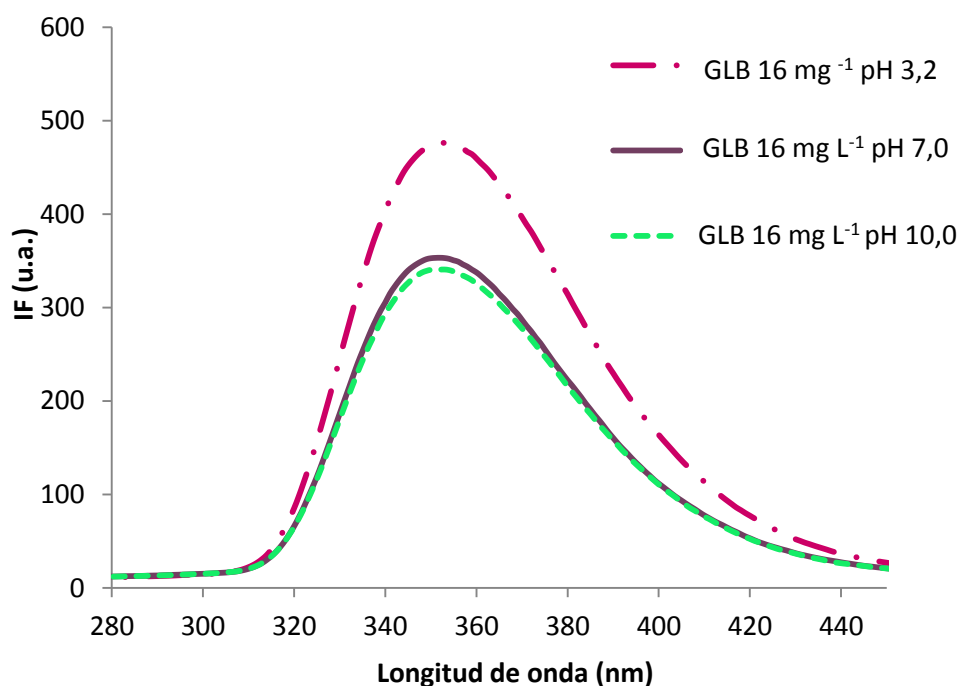


Figura 3.15. Espectros de emisión de fluorescencia de GLB ($16,0 \text{ mg L}^{-1}$) a diferentes valores de pH ($\lambda_{\text{ex}} = 234 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$).

Tabla 3.6. Rendimientos cuánticos de fluorescencia relativos, tomando como referencia el valor determinado a pH 3,2.

$\Phi_F^{pH\ 3.2} / \Phi_F^{pH\ 3.2}$	$\Phi_F^{pH\ 7.0} / \Phi_F^{pH\ 3.2}$	$\Phi_F^{pH\ 10.0} / \Phi_F^{pH\ 3.2}$
1,00 ± 0,05	0,72 ± 0,05	0,69 ± 0,05

Como el valor de pK_a de la CF es de 14,0¹⁶⁴ y no cambia durante el intervalo de pH estudiado, se puede concluir que la relación entre la intensidad de fluorescencia de GLB (I_0) y las soluciones de GLB-CF (I) es mayor a pH 3,2. En la Figura 3.16 se representa el $\log I_0/I$ frente a la concentración de CF a pH 3,2 y 10,0. Se puede observar que, a medida que aumenta la concentración de CF, aumenta la relación I_0/I por lo que se confirma la dependencia de la intensidad de fluorescencia con el pH.

¹⁶⁴ G. A. Spiller, Caffeine, CRC Press, Boca Raton, Florida, United States of América, 1997

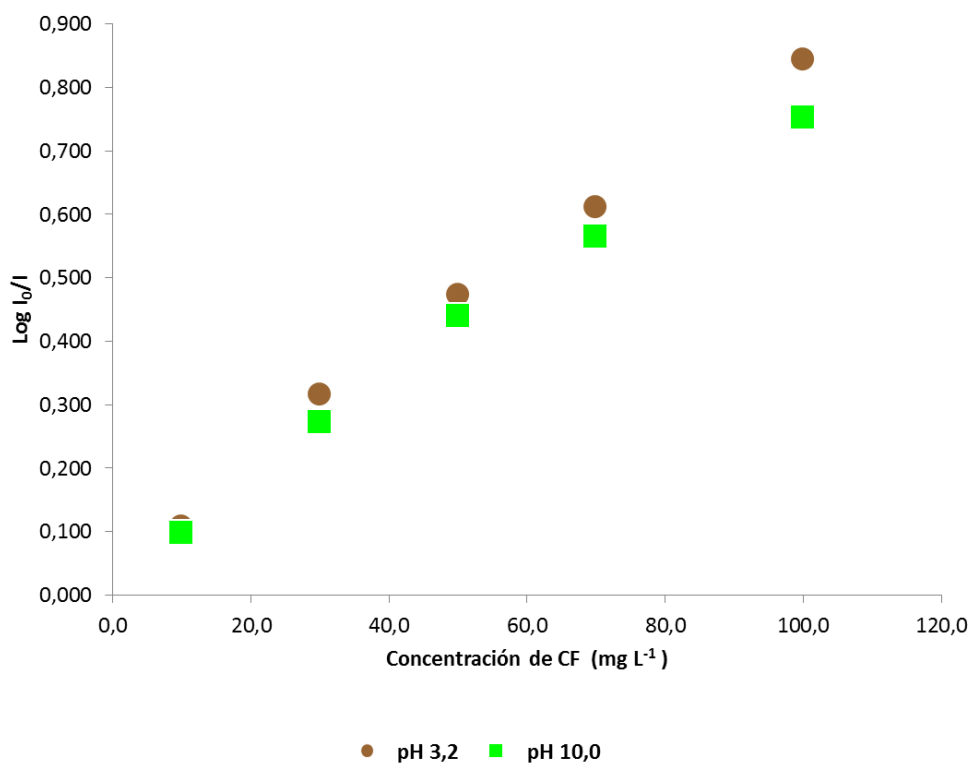


Figura 3.16. Gráfico de $\log I_0 / I$ vs la concentración de CF a diferentes valores de pH, para una concentración de GLB de $16,0 \text{ mg L}^{-1}$

Para evaluar el efecto de la temperatura, se conectó el portacelda del espectrofluorimetro a un baño de agua termostático con recirculación. Para asegurar que el valor de temperatura de la solución fuera el requerido, se colocó un termómetro en la celda. El $\log I_0 / I$ se evaluó a 25°C , 33°C y 40°C , y los resultados se muestran en la Figura 3.17. Como se puede observar, la relación I_0 / I disminuyó a medida que la temperatura aumentó de 25°C a 40°C como consecuencia de una disminución de la intensidad de fluorescencia de GLB. Por ello, debido a que la mayor sensibilidad se obtuvo a 25°C , esta temperatura fue la seleccionada para realizar los ensayos.

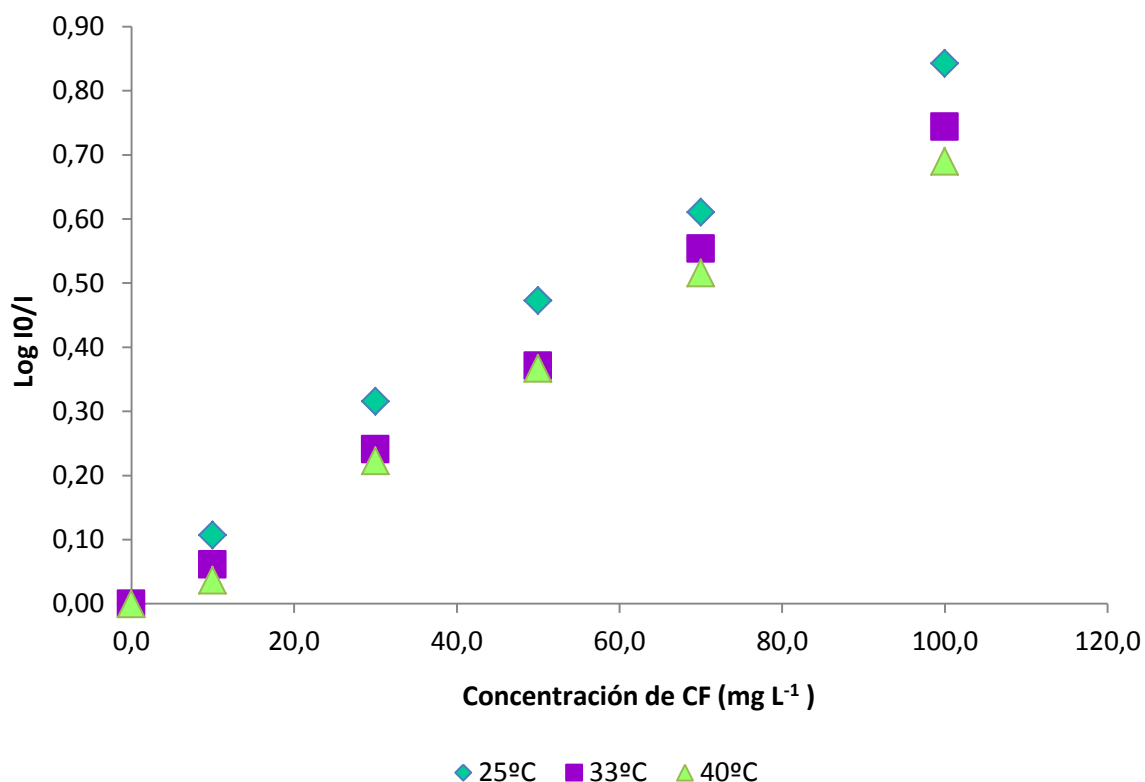


Figura 3.17. Gráfico del $\log I_0 / I$ vs la concentración de CF a diferentes valores de temperatura, para una concentración de GLB de $16,0 \text{ mg L}^{-1}$

3.3.4.3 Parámetros analíticos

Una vez optimizadas las variables experimentales que afectan a la señal de fluorescencia, se evaluaron los parámetros analíticos del método propuesto en términos de linealidad, límite de detección (LOD), y precisión intermedia y repetibilidad como % RSD.

Se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de CF a las cuales se les agregó una concentración fija de GLB y se realizaron los espectros de fluorescencia correspondientes a 25°C ($\lambda_{\text{ex}}=234 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=350 \text{ nm}$). Como se observa en la Figura 3.18. a medida que se produce un aumento en la concentración de CF, la intensidad de

fluorescencia de GLB disminuye debido a una menor disponibilidad de la radiación para la excitación del fluoróforo.

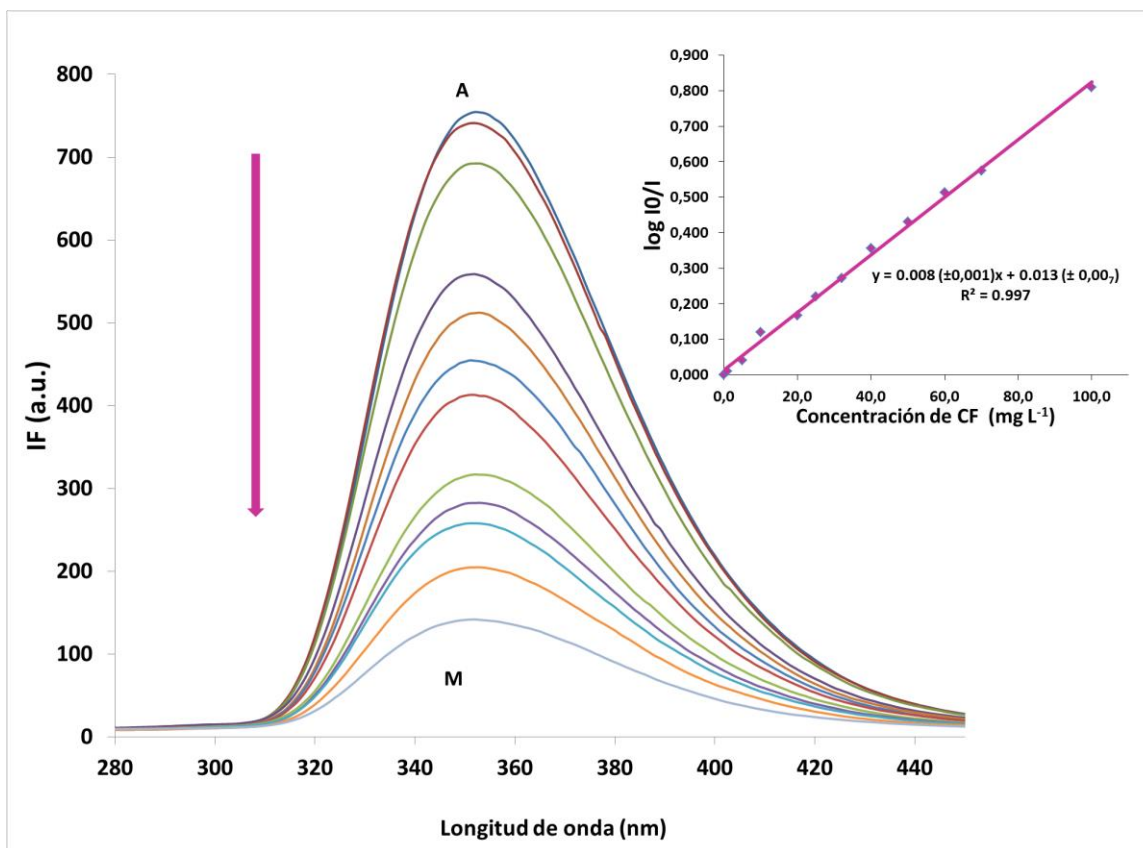


Figura 3.18. Espectros de fluorescencia de GLB (16 mg L^{-1}) con concentraciones crecientes de CF a una λ_{exc} 234 nm (pH 3,2, 25°C). Concentraciones de CF de A a M en mg L^{-1} : 0; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 32,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0 y 100,0. La figura incluye la curva de calibrado ($\log I_0/I$) vs Concentración de CF

La Tabla 3.7 resume los parámetros analíticos obtenidos para el método propuesto.

Tabla 3.7 Parámetros analíticos obtenidos para el método propuesto.

PARÁMETROS ANALÍTICOS	VALOR OBTENIDO
Intervalo lineal (mg L ⁻¹)	1,00-100,0
Pendiente (mg L ⁻¹)	0,008 ± 0,001
Ordenada al origen	0,013 ± 0,0007
R ²	0,996
LOD (mg L ⁻¹) ^a	0,10
Repetibilidad (RSD %) ^b	0,75
Precisión intermedia (RSD %) ^c	1,24

^aLOD calculado como $3s/A$, donde, s : desviación estándar, A : pendiente de la curva de calibración;

^{b,c} Calculados utilizando una solución con una concentración de GLB de 16,0 mg L⁻¹ y de CF de 32,0 mg L⁻¹; ^bn =10; ^cn=3 medida durante 3 días consecutivos.

3.3.4.4 Determinación de CF en muestras de alimentos

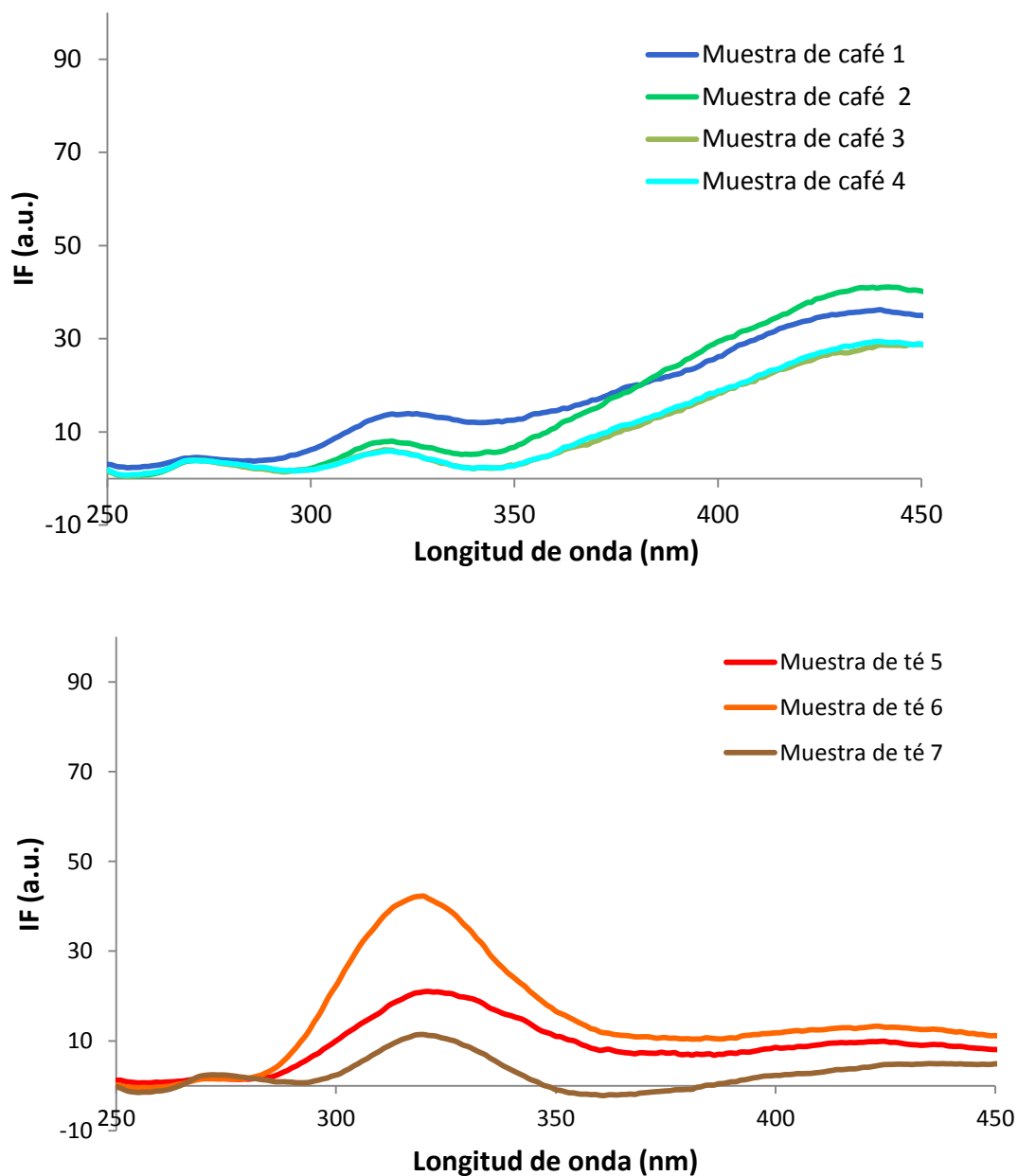
Las muestras seleccionadas analizadas mediante el método propuesto fueron muestras de té, café y bebidas energéticas. Según lo establecido en el CAA la concentración mínima de CF en muestras de café debe ser del 0,9% p/p¹⁶⁵ y en las muestras de té debe ser superior al 1,6% p/p¹⁶⁶. Por otro lado, el Capítulo XVII establece que la cantidad máxima de CF en las bebidas energizantes debe ser de 32 mg en 100 mL¹⁶⁷.

¹⁶⁵ Código Alimentario Argentino, La Rocca, Buenos Aires, 2012, Capítulo XV, art. 1163. Última acceso 16/05/2022.

¹⁶⁶ Código Alimentario Argentino, La Rocca, Buenos Aires, 2012, Capítulo XV, art. 1185. Última acceso 16/05/2022.

¹⁶⁷ Código Alimentario Argentino, La Rocca, Buenos Aires, 2012, Capítulo XVII, art. 1388. Último acceso 16/05/2022.

Para realizar las mediciones, las muestras de café y té se diluyeron 20 veces y las muestras de bebidas energizantes 10 veces. Luego, se realizaron los espectros de fluorescencia correspondientes, no observándose señal de fluorescencia a la longitud de onda de emisión seleccionada (Figuras 3.19).



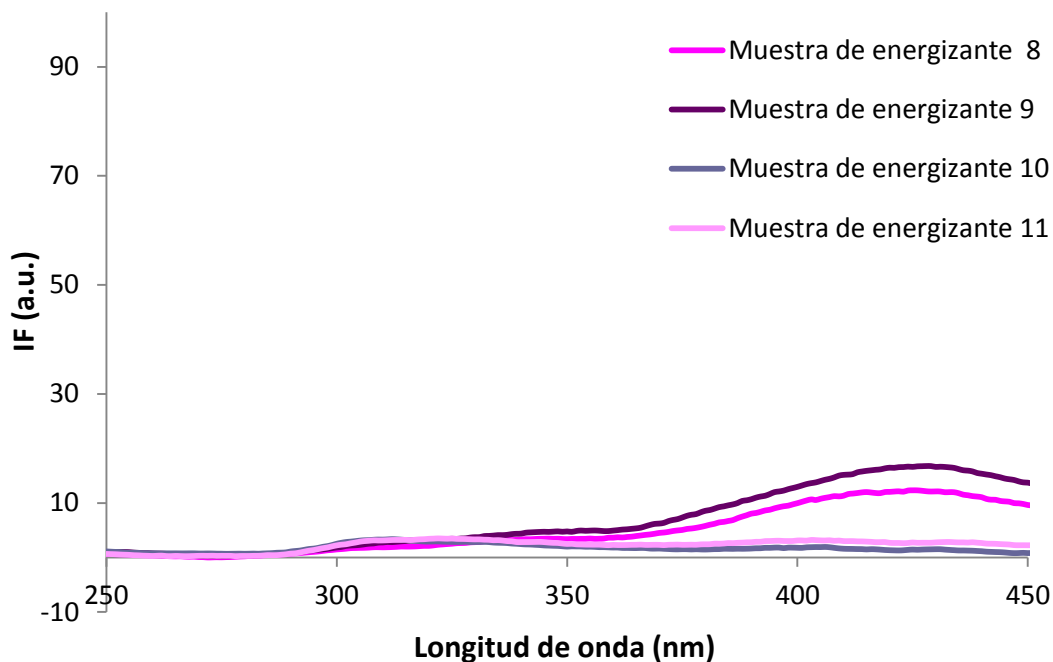


Figura 3.19 Espectros de fluorescencia de las muestras de café, té y bebidas energizantes después de haber realizado la dilución adecuada ($\lambda_{ex}=234$ nm; $\lambda_{em}=350$ nm).

La Tabla 3.8 muestra los resultados obtenidos por el método propuesto, expresados en las unidades recomendadas por el CAA. Se observó que, tanto para las muestras de té como de café, la concentración de CF era más alta que el valor mínimo aceptado por la legislación, considerando que estas muestras eran adecuadas para la comercialización. Para las muestras de bebidas energéticas, se obtuvieron valores de concentración de CF de acuerdo con el máximo permitido por el CAA.

Tabla 3.8. Concentración de CF en las diferentes muestras analizadas por el método propuesto

	MUESTRAS ^a	CONCENTRACION DE CF
CAFÉ	1	2,48± 0,02 ^b
	2	3,45± 0,03 ^b
	3	2,63± 0,06 ^b
	4	3,02± 0,02 ^b
TÉ	5	3,93± 0,18 ^b
	6	5,01± 0,23 ^b
	7	8,38± 0,13 ^b
BEBIDA ENERGIZANTE	8	78,1± 0,6 ^c
	9	96,3± 0,3 ^c
	10	82,0±0,6 ^d
	11	80,0± 0,7 ^c

^a Concentración expresada según la etiqueta del producto; ^b g de cafeína en 100 g de muestra; ^c mg de cafeína en 250 mL de bebida energética; ^d mg de cafeína en 310 mL de bebida energizante.

La Figura 3.20 muestra la comparación de los espectros de emisión de fluorescencia de una muestra de café, té y bebidas energizantes con la adición de GLB, y las soluciones estándar de CF-GLB de las concentraciones correspondientes. Como se puede observar,

no se encontraron diferencias significativas entre los espectros de las muestras y los de las soluciones estándar.

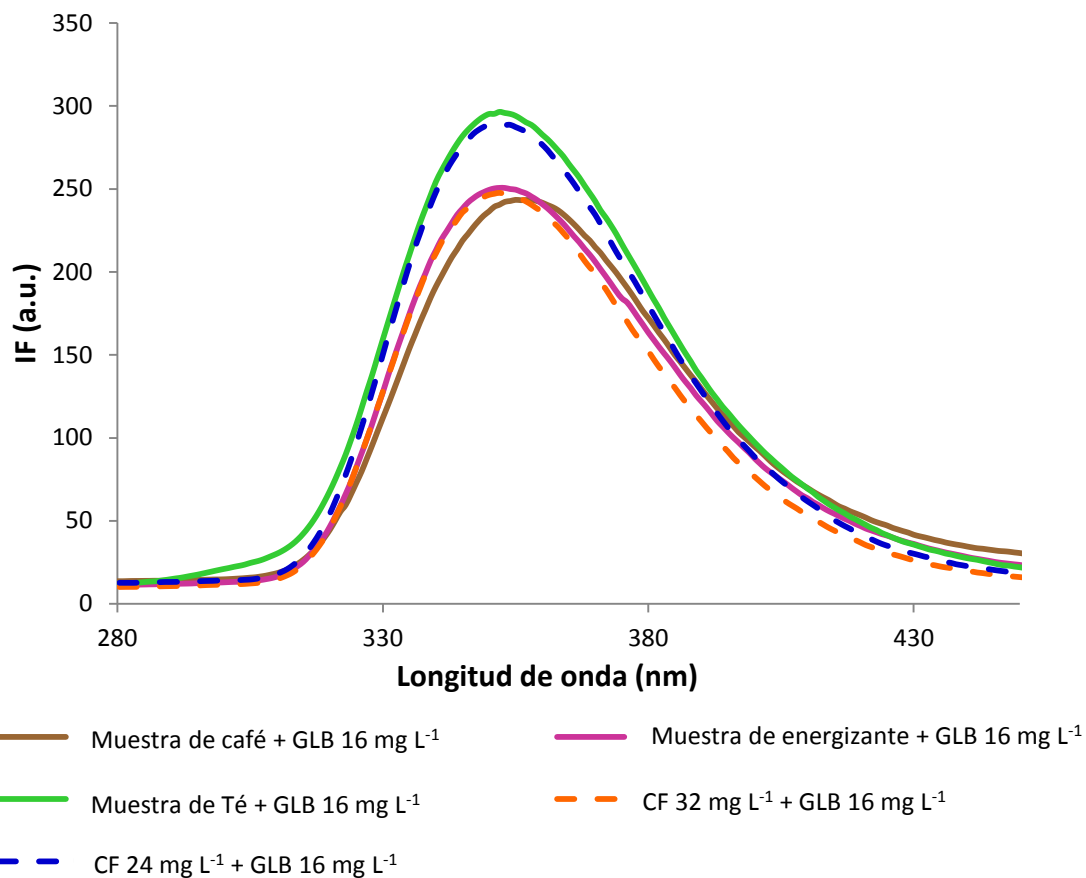


Figura 3.20. Comparación de los espectros de emisión de fluorescencia de muestras de café, té y bebidas energizantes con la adición de GLB (16 mg L⁻¹) y las correspondientes soluciones estándares de GLB-CF.

Para comprobar la veracidad del método propuesto, las muestras fueron analizadas por el método de referencia siendo los resultados de este comparados con los obtenidos por el método propuesto (Tabla 3.9). Para ello, como las muestras contenían diferentes cantidades de CF, se realizó una comparación de las medias de las diferencias entre datos

emparejados. El valor de t calculado para las muestras de café y bebidas energizantes fue de 1,22 y 1,46 respectivamente, comparándose con un valor de t crítico de 3,18 ($\alpha = 0,05$; $n-1=3$). Para las muestras de té, el valor calculado fue 1,57, y se comparó con un valor de t crítico de 4,30 ($\alpha = 0,05$, $n-1=2$). Se puede concluir que no hubo diferencias significativas entre los dos métodos para las muestras analizadas, para este nivel de confianza.

Tabla 3.9 Comparación de los resultados obtenidos por el método propuesto y el método de referencia

	Muestras	Concentración de CF ^a		Diferencia entre medias	Parámetros Estadístico
		Método Propuesto	Método de referencia		
Café	1	2,48± 0,02 ^b	2,46± 0,04 ^b	0,02	$x_d = 0,14$ $s = 0,23$ $t_c = 1,22$
	2	3,45± 0,03 ^b	2,97± 0,03 ^b	0,48	
	3	2,63± 0,06 ^b	2,56± 0,02 ^b	0,07	
	4	3,02± 0,02 ^b	3,04± 0,01 ^b	-0,02	
Té	5	3,93± 0,18 ^b	3,81± 0,02 ^b	0,12	$x_d = 0,10$ $s = 0,11$ $t_c = 1,57$
	6	5,01± 0,23 ^b	4,81± 0,02 ^b	0,20	
	7	8,38± 0,13 ^b	8,40± 0,15 ^b	-0,02	
Bebida energizante	8	78,1± 0,6 ^c	77,7± 0,9 ^c	0,39	$x_d = 1,37$ $s = 1,87$ $t_c = 1,46$
	9	96,3± 0,3 ^c	96,7± 0,8 ^c	-0,36	
	10	82,0± 0,6 ^d	78,0± 0,9 ^d	3,93	
	11	80,0± 0,7 ^c	78,4± 0,5 ^c	1,55	

x_d : promedio de las diferencias; s : desviación estándar de las diferencias; t_c : t calculado para ($n-1$) grados de libertad; ^a Concentración expresada según la etiqueta del producto: ^b g de cafeína en 100

g de muestra; ^c mg de cafeína en 250 mL de bebida energética; ^d mg de cafeína en 310 mL de bebida energética.

Además, se compararon, mediante un análisis de regresión lineal, los valores de concentración de CF obtenidos con los valores obtenidos por el método de referencia para los tres tipos de muestras. La pendiente y la ordenada al origen estimadas se compararon con sus valores ideales de 1 y 0 empleando la prueba estadística de la región elíptica de confianza conjunta (EJCR). Como se observa en la Figura 3.21., la elipse contiene los valores ideales (1,0), por lo que se considera que el método propuesto no tiene errores en las concentraciones predichas.

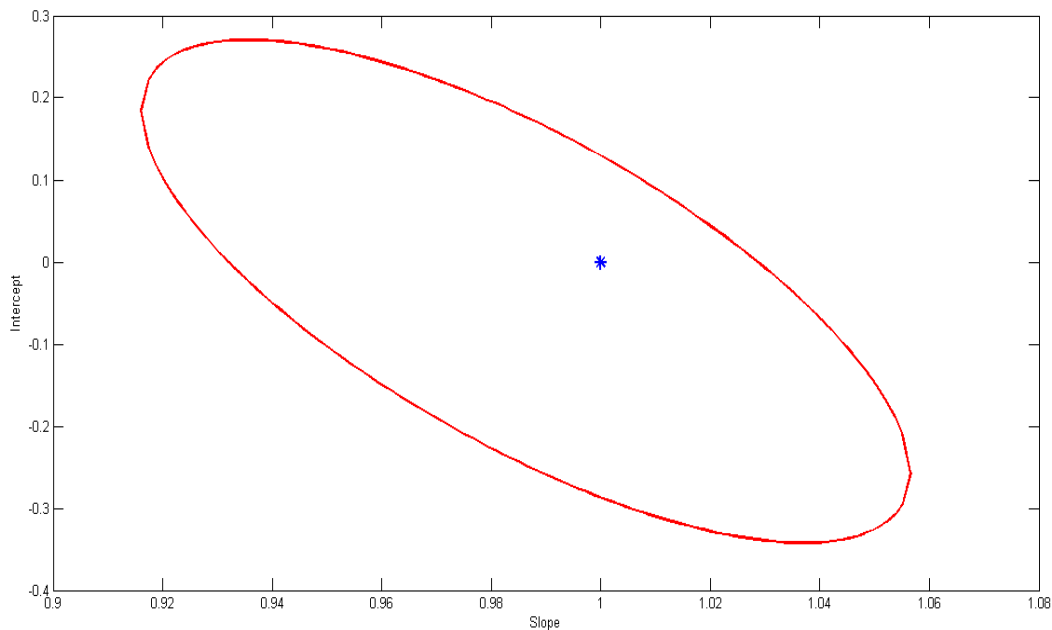
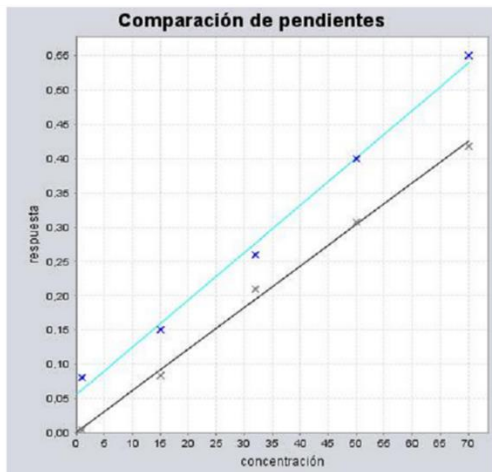


Figura 3.21. Región elíptica de confianza conjunta (EJCR) calculada para un límite de confianza del 95 %. El asterisco marca el punto ideal (pendiente=1, intersección=0).

Por otro lado, el efecto matriz fue evaluado comparando la pendiente de la curva de calibración realizada con soluciones testigo y las pendientes de las curvas realizadas empleando tres muestras representativas de las diferentes matrices seleccionadas al azar, enriquecidas a los mismos niveles de concentración¹⁶⁸. Los valores de t calculados para las muestras de café, té y energizante fueron 2,33, 0,40 y 2,24, respectivamente, correspondiendo a ellos un valor de t crítico de 2,44 ($\alpha = 0,05$). Se concluyó que no había una diferencia significativa entre las pendientes, en el nivel de probabilidad elegido ($\alpha = 0,05$), lo que significa que el efecto de matriz no influye en la señal de fluorescencia. Los resultados se presentan en la Figura 3.22 A, B y C.

¹⁶⁸ D. L. Massart, B. G. M. Vandeginste, L. M. C. Buydens, S. De Jong, P. J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Elsevier Science, 1997.



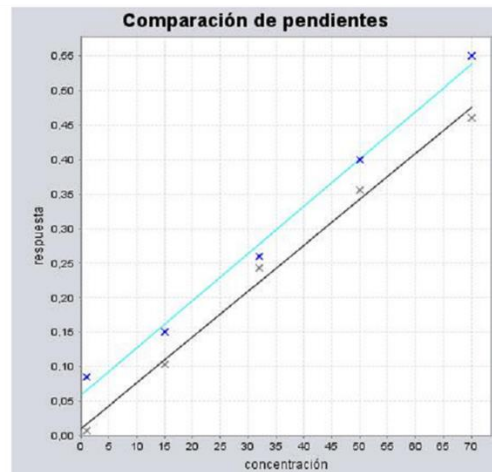
A

Inputs

α variance	0.05
α slope	0.05

Results

	Line 1	Line 2
Regression equation	$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x$	$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x$
Slope	0.007	0.006
Intercept	0.056	0.001
Slope std. dev.	0	0
Intercept std. dev.	0.012	0.008
Residual std. dev.	0.016	0.011
Correlation coefficient	0.997	0.998
Determination coefficient	0.995	0.997
Quality coefficient	5.638	5.467



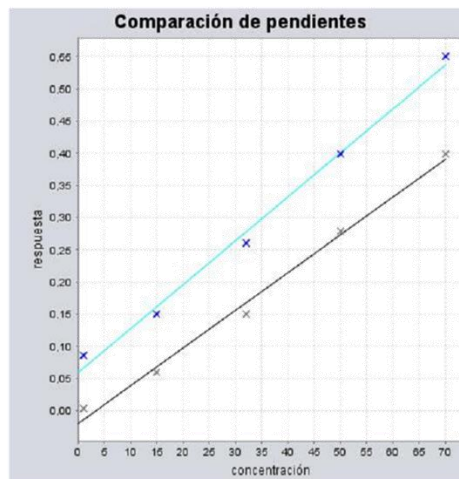
B

Inputs

α variance	0.05
α slope	0.05

Results

	Line 1	Line 2
Regression equation	$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x$	$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x$
Slope	0.007	0.007
Intercept	0.059	0.01
Slope std. dev.	0	0
Intercept std. dev.	0.014	0.014
Residual std. dev.	0.018	0.018
Correlation coefficient	0.997	0.996
Determination coefficient	0.993	0.993
Quality coefficient	6.239	7.64



C

Inputs

α variance	0.05
α slope	0.05

Results

	Line 1	Line 2
Regression equation	$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x$	$\hat{y} = b_0 + b_1 \cdot x$
Slope	0.007	0.006
Intercept	0.059	-0.019
Slope std. dev.	0	0
Intercept std. dev.	0.014	0.012
Residual std. dev.	0.018	0.016
Correlation coefficient	0.997	0.996
Determination coefficient	0.993	0.993
Quality coefficient	6.239	8.938

Figura 3.22. Comparación de las pendientes para una muestra de café (A), de té (B) y de bebida energizante (C).

Por otro lado, para confirmar que la disminución de la señal de fluorescencia de la GLB se debe solo a la concentración de CF presente en la muestra, se probó la interacción potencial de los componentes con mayor concentración en las muestras analizadas. Para ello, se registraron los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de ácido gálico (té), sacarosa (café y bebidas energizantes), jarabe de maíz con alto contenido de fructosa (JMAF) y taurina (bebidas energizantes). Para ello, se tuvo en cuenta la concentración a la que se encuentran en las bebidas y las diluciones que se realizaron para cada muestra utilizando el método propuesto.

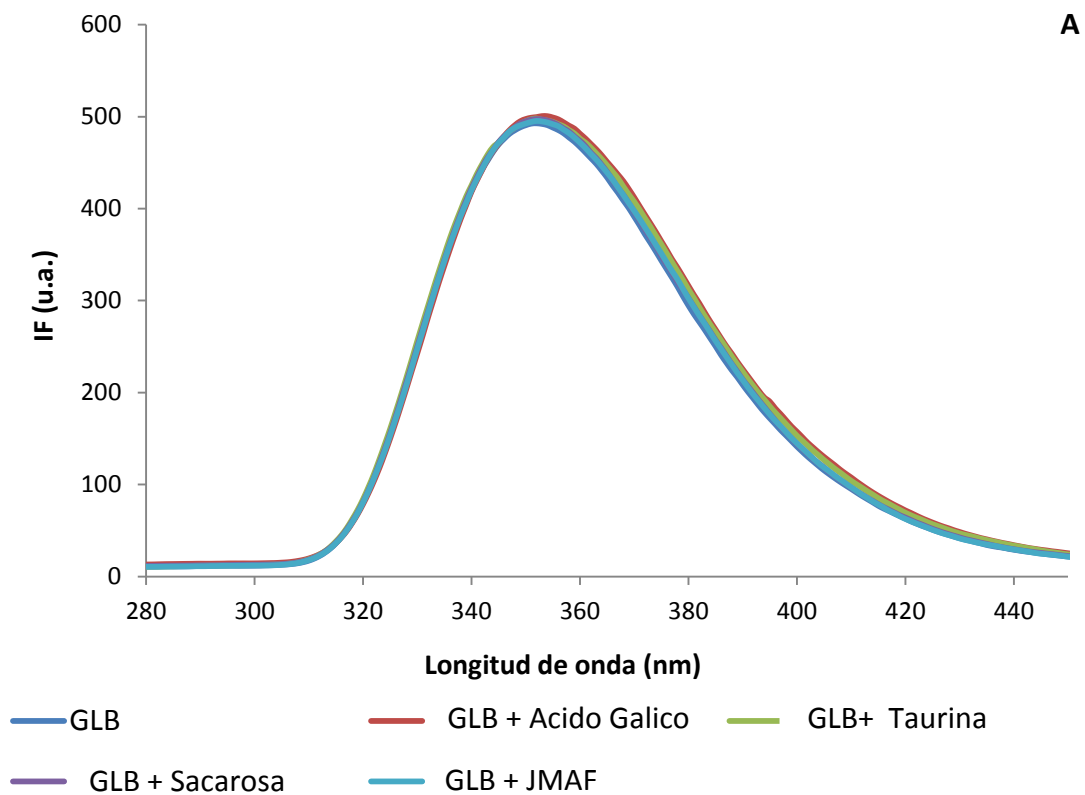
En el caso de las bebidas energizantes, y teniendo en cuenta la información declarada en el rótulo, la sacarosa se encuentra en una concentración de 27-28 g por 250 mL, y la concentración de taurina varia, según la marca, entre 100 mg y 1000 mg por 250 mL. Solo una muestra de bebida energizante contiene JMAF en una concentración de 28 g por 250 mL de bebida. Por lo tanto, los experimentos se realizaron teniendo en cuenta la concentración más alta. Por otro lado, el contenido de sacarosa declarado en la etiqueta del café es de 7 g por 100 g de café.

En el caso del té, el estudio se realizó con ácido gálico que se consideró como el compuesto representativo de los polifenoles totales y la concentración probada se obtuvo de la bibliografía¹⁶⁹.

Los espectros de fluorescencia se registraron en presencia de GLB a la longitud de onda de trabajo. No se observaron interacciones entre estos posibles interferentes y la señal de

¹⁶⁹ P. Goncalves Dias Diniz, M. Pistonesi, M. Alvarez, B. Fernández Band, M. Ugolino de Araújo, Simplified tea classification based on a reduced chemical composition profile via successive projections algorithm linear discriminant analysis (SPA-LDA). *Journal of Food Composition and Analysis*, 39, 103–110, 2015. doi:10.1016/j.jfca.2014.11.012

fluorescencia de GLB (Figura 3.23 B). Así mismo, se observa que los espectros de absorción presentan valores de absorbancia inferiores a 0,010 en la longitud de onda seleccionada, con la excepción de JMAF que presentó un valor de 0,060.



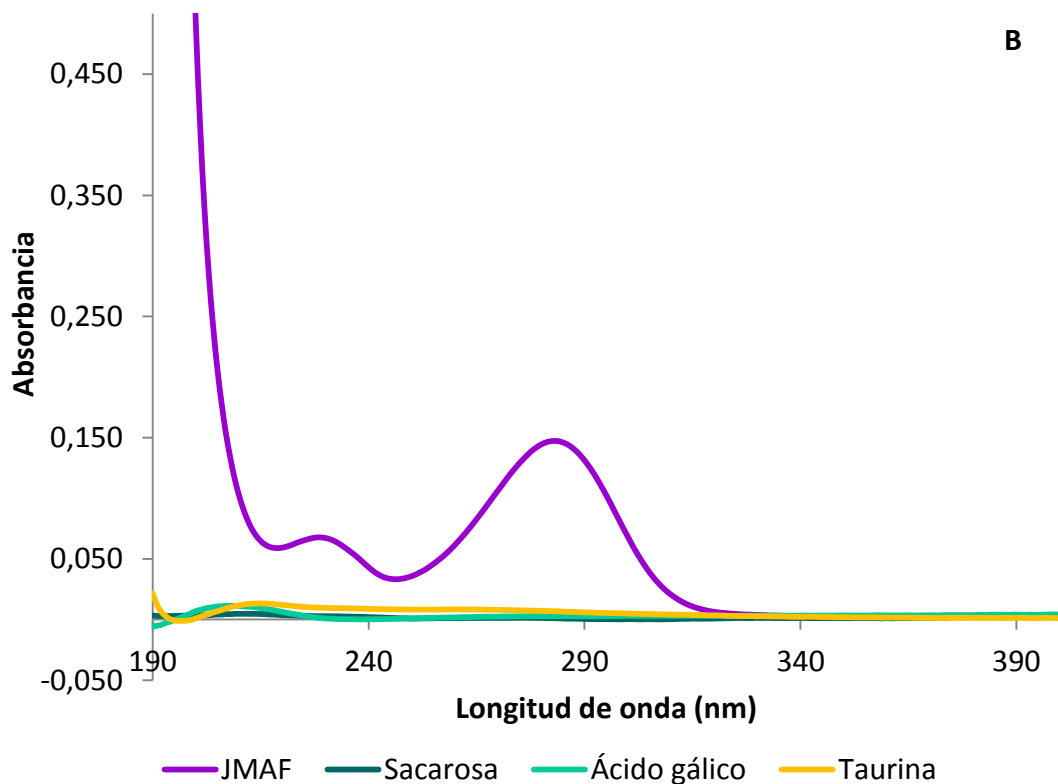


Figura 3.23. Espectros de emisión de fluorescencia (A) y espectros de absorción (B) de GLB en ausencia y presencia de diferentes especies potencialmente interferentes, a las concentraciones presentes en las muestras ($\lambda_{\text{ex}} = 234 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 350 \text{ nm}$).

3.3.5 Conclusiones parciales

En esta parte de la tesis se desarrolló un método simple para la determinación de CF en diferentes bebidas, basado en el efecto de filtro interno del analito sobre la intensidad de fluorescencia de la GLB. El método propuesto es una alternativa robusta para la determinación del contenido de CF en estas muestras y podría utilizarse para realizar un análisis de rutina rápido.

Se comprobó que el fluoróforo utilizado (GLB) no se vio afectado por la matriz de las muestras, presentando una veracidad y selectividad satisfactorias en comparación con métodos similares encontrados en la bibliografía.

Además, el método propuesto requiere un tratamiento mínimo de las muestras (preparación de las infusiones y filtración de las muestras) antes de realizar las mediciones. Este hecho hace que el método sea realmente rápido y muy económico ya que solo se requiere un fluorómetro para realizar las medidas.

CAPÍTULO 4:

Conclusión general.

4. CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales de este trabajo de investigación son las siguientes:

- ✓ En esta tesis se desarrollaron métodos automáticos para la determinación de contaminantes en matrices de alimentos, que presentaron las ventajas inherentes a este tipo de métodos como la simplificación y la miniaturización del procedimiento analítico.
- ✓ Se desarrollaron métodos de extracción y preconcentración de los contaminantes en estudio mediante la aplicación de la técnica de extracción en fase sólida.
- ✓ Se utilizó un polímero de impresión molecular comercial que se emplea normalmente para la extracción del analito de muestras de orina, y se propuso un procedimiento para adaptarlo a la determinación del analito en una matriz alimenticia.
- ✓ Se empleó un adsorbente polimérico no selectivo para la determinación individual y conjunta de dos contaminantes, llevando a cabo a cabo la extracción, preconcentración y derivatización en el mismo adsorbente, simplificando notablemente el procedimiento analítico.
- ✓ Se utilizaron técnicas de detección consideradas de rutina como lo son la absorción molecular UV-Vis y la fluorescencia molecular. El uso de este tipo de técnicas no solo disminuye los costos de análisis, sino que no requiere de un analista experimentado para su empleo, por lo que facilita significativamente la transferencia a cualquier laboratorio de control de calidad.

- ✓ Se logró minimizar el uso de reactivos con la consiguiente generación de residuos, lo que se traduce en un beneficio para el ambiente.

APÉNDICE I-PRODUCTIVIDAD DE LA TESIS

TRABAJOS PUBLICADOS

- ✓ Flow-batch analysis of clenbuterol based on analyte extraction on molecularly imprinted polymers coupled to an in-system chromogenic reaction. Application to human urine and milk substitute samples; Natalia González, Marcos Grünhut, Ivana Šrámková, Adriana Lista, Burkhard Horstkotte, Petr Solich, Hana Sklenářová, Carolina Acebal; Talanta 178 (2018) 934-942.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.10.040>

- ✓ Novel strategy for fluorescence determination of glibenclamide in samples with high concentration of caffeine based on a low-pressure flow injection chromatography system; Natalia González, Sara Lantmann Corral, Adriana Lista, Carolina Acebal; Microchemical Journal 142 (2018) 288-296.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.07.005>

- ✓ An inner filter effect based sensing system for the determination of caffeine in beverage samples; Natalia González, Sara P. Lantmann Corral, Graciela Zanini, Hernán Montejano, Carolina C. Acebal; Analyst 145 (2020) 2279–2285.
<https://doi.org/10.1039/C9AN02483B>

PRESENTACIONES A CONGRESOS

- ✓ 20th International Conference on Flow Injection Analysis and Related Techniques (20th ICFIA); Palma de Mallorca, España, 2 al 7 de octubre de 2016; “Flow-batch analysis method for the determination of trace levels of clenbuterol in urine samples using MIPs and Griess reaction”, N. González, I. Šrámková, C. Acebal, B. Horstkotte, M. Grünhut, A. Lista, H. Sklenářová, B. Fernández Band, P. Solich.

- ✓ Sistema de análisis en flujo para la extracción y cuantificación de clenbuterol en muestras de lactoreemplazantes utilizados para la producción pecuaria. N. González, I. Srámková, C. Acebal, B. Horstkotte, A. Lista, H. Sklenářova, B. Fernández Band. XXXI Congreso Argentino de Química, 25 al 28 de Octubre de 2016 (Ciudad de Buenos Aires – Argentina), The Journal of The Argentine Chemical Society Vol. 103 (1-2) January – December 2016, ISSN: 1852 -1207. Anales de la Asociación Química Argentina AAQAE 095 – 196.

- ✓ IX Congreso Argentino de Química Analítica; Río Cuarto, Córdoba; 7 al 10 de Noviembre de 2017; Sistema de cromatografía de inyección en flujo para la determinacion de Glibenclamida en muestras de bebidas energizantes; N. González, S. Lantmann, A. Lista, C. Acebal. ISBN: 978-987-688-238-5.

- ✓ Nuevo método analítico para la determinación de cafeína en matrices de alimentos basado en la extinción de fluorescencia del fármaco hipoglucemiante glibenclamida. N. González, S. Lantmann, C. Acebal. XXXII Congreso Argentino de Química, 12 al 15 de marzo de 2019 (Ciudad de Buenos Aires – Argentina).

- ✓ X Congreso Argentina de Química Analítica; Santa Rosa, La Pampa; 17 al 20 de septiembre de 2019; “Extracción y derivatización simultánea de metoclopramida empleando un sistema automatizado”; N. González, F. Rodríguez, C. Acebal. p 194.

- ✓ XI Congreso Argentina de Química Analítica; Corrientes; 30 de noviembre al 3 de diciembre de 2021; “Empleo de un sistema de inyección secuencial para la determinación de aminas aromáticas primarias presentes en envases de alimentos”; N. González, M. Aguinaga Martínez, C. Domini, C. Acebal. (Modalidad Virtual)