



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Desarrollo de nuevos métodos analíticos para la extracción,
preconcentración y determinación de contaminantes emergentes en
muestras ambientales

Lic. Maite V. Aguinaga Martínez

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2023

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 octubre del 2018 y el 9 de junio del 2023, bajo la dirección de la Dra. Carolina C. Acebal y la Dra. Claudia E. Domini.

.....
Lic. Maite V. Aguinaga Martínez



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

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

Agradecimientos

A mi directora Carito, por acompañarme, enseñarme y haber sido mi guía permanente todos estos años, y por ser la responsable de mi amor por la química analítica.

A mi directora Calita, por su compañía, sus consejos y por su enorme apoyo y ayuda constante para poder hacer realidad esta tesis.

A mi papá y mi mamá, por su apoyo y amor incondicional, por tener siempre las palabras justas que me impulsan hacia adelante.

A mi hermano Tin, por estar siempre, por festejar cada uno de mis logros y acompañarme cuando las cosas no salen tan bien.

A mis amigas Ari, Cin y Luchi por bancarme y aconsejarme siempre, por cada una de las cervezas compartidas.

A los amigos que me dejó la Universidad, Fede, Mati, Pacho, Cyn, Lukitas, Cachi y Emi, por todos los momentos compartidos.

A mis compañeros de laboratorio, por hacer que el trabajo sea mucho más ameno y divertido, por cada mate, viernes de tortas y cenas compartidas.

A las instituciones que hicieron posible este trabajo: la Universidad Nacional del Sur por brindarme el ámbito académico para la realización de la tesis y a CONICET por otorgarme la beca para poder realizarla.

Y por ultimo, a cada persona que me acompañó a lo largo de esta tesis y que de una forma u otra la hicieron posible.

Muchísimas gracias a todos.

RESUMEN

Los contaminantes emergentes (CECs, por sus siglas en inglés) son sustancias, productos y materiales químicos que se esparcen en el ambiente y se detectan, con frecuencia, en suelos y aguas superficiales, subterráneas y potables. Debido a la alta y continua producción de estas sustancias y su consumo masivo, es inevitable su continua introducción al ambiente, principalmente a través de efluentes industriales y plantas de tratamiento de aguas residuales. Si bien la presencia de estos CECs no es reciente, sí lo es la preocupación por las posibles consecuencias de los mismos en seres vivos. Por ello, es de suma importancia la determinación de estos contaminantes en matrices ambientales.

Esta Tesis se centró en el desarrollo de nuevos métodos analíticos para la extracción y preconcentración de CECs en muestras ambientales. En el primer trabajo, se desarrolló un método de microextracción coacertiva para la determinación fluorescente de glibenclamida. El segundo trabajo consistió en la utilización de técnicas en flujo y de extracción en fase sólida miniaturizada para la extracción y preconcentración de progestinas con su posterior separación y detección por HPLC-UV. En el tercer y cuarto trabajo se desarrollaron films de agarosa y nanopartículas a base de carbono para la extracción en fase sólida de antiinflamatorios no esteroideos y progestágenos, con su posterior separación y detección por HPLC-UV.

Los métodos analíticos desarrollados durante esta Tesis Doctoral se enfocaron no sólo en lograr límites de detección apropiados para los analitos seleccionados, sino que proponen alternativas amigables con el ambiente a través de la miniaturización, automatización, uso de reactivos renovables y generación de menor cantidad de residuos tóxicos.

ABSTRACT

Emerging contaminants (ECs) are substances, products, and chemical materials that are spread in the environment and are frequently detected in soils, surface waters, groundwater, and drinking water. Due to their high and continuous production as well as their widespread use, these substances are inevitably introduced into the environment, primarily through industrial effluents and wastewater treatment plants. While the ECs' presence is not recent, the concern for their potential consequences on living organisms is relatively recent. Therefore, the determination of these contaminants in environmental matrices is of importance.

This thesis focused on the development of new analytical methods for the extraction and preconcentration of ECs in environmental samples. The first study involved the development of a novel coacervative microextraction method for the fluorescent determination of glibenclamide. The second research is based on flow and miniaturized solid-phase extraction techniques for the extraction and preconcentration of progestins, followed by their separation and detection using HPLC-UV. In the third and fourth studies, agarose films and carbon-based nanoparticles sorbents were developed for the solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs and progestogens, with subsequent separation and detection by HPLC-UV.

The analytical methods developed during this thesis were focused not only on achieving appropriate detection limits for the selected analytes, but also on proposing environmentally friendly alternatives through miniaturization, automation, use of renewable reagents, and generation of less toxic waste.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1: Introducción.....	1
1.1 Contaminantes emergentes.....	2
1.2 Determinación de CECs en muestras ambientales.....	5
1.2.1 Extracción líquido-líquido.....	8
1.2.2 Extracción líquido-sólido (extracción en fase sólida).....	11
Capítulo 2: Objetivo general.....	18
Capítulo 3: Microextracción coacervativa con solidificación de gotas flotantes de surfactante para la determinación de glibenclamida.....	20
3.1 Objetivo.....	21
3.2 Introducción.....	22
3.3 Materiales y métodos.....	27
3.3.1 Reactivos, soluciones e instrumentación.....	27
3.3.2 Procedimiento CAME-SFD.....	28
3.3.3 Muestreo y preparación de muestras.....	29
3.3.4 Diseño experimental.....	31
3.4 Resultados y discusión.....	32
3.4.1 Experimentos preliminares.....	32
3.4.1.2 Selección del solvente de extracción.....	32
3.4.1.3 Concentración de HCl.....	34
3.4.1.4 Selección del co-solvente.....	34
3.4.1.5 Adición de sal.....	35
3.4.1.1 Prueba de estabilidad térmica.....	36
3.4.2 Diseño experimental.....	37
3.4.3 Parámetros analíticos del método propuesto.....	39
3.4.4 Aplicación del método a muestras de agua superficial.....	40
3.5 Conclusión.....	44

Capítulo 4: Extracción en fase sólida empleando nanopartículas a base de carbono.....	45
4.1 Introducción.....	46
4.1.1 Extracción SPE con nanopartículas a base de carbono.....	46
4.1.2 Empleo de biopolímeros en técnicas de extracción en fase solida	48
4.1.3 Automatización en química analítica.....	50
4.2 Objetivos.....	54
4.3 Empleo de nanotubos de carbono oxidados como adsorbente para la extracción en fase sólida de progesterinas de muestras de agua.....	55
4.3.1 Introducción.....	55
4.3.2 Materiales y métodos.....	57
4.3.2.1 Preparación de soluciones e instrumentación.....	57
4.3.2.2 Preparación de ox-MWCNTs.....	59
4.3.2.3 Procedimiento de SPE.....	59
4.3.2.4 Muestreo y preparación de muestras.....	60
4.3.3 Resultados y discusión.....	61
4.3.3.1 Caracterización de ox-MWCNT mediante espectrometría de absorción IR.....	61
4.3.3.2 Elección del adsorbente.....	62
4.3.3.3 Estudio de las variables de extracción.....	64
4.3.3.4 Parámetros analíticos.....	67
4.3.3.5 Aplicación a muestras ambientales	71
4.3.4 Conclusión.....	73
4.4 Preparación de un film de nanotubos de carbono y agarosa para la extracción y preconcentración de antiinflamatorios no esteroideos	75
4.4.1 Introducción.....	75
4.4.2 Materiales y métodos.....	78
4.4.2.1 Reactivos e instrumentación.....	78
4.4.2.2 Preparación del film de MWCNTs-agarosa.....	79
4.4.2.3 Procedimiento de SPE.....	80
4.4.2.3 Muestreo y preparación de muestras.....	81

4.4.3 Resultados y discusión.....	82
4.4.3.1 Optimización del procedimiento de preparación de films de MWCNTs-agarosa.....	82
4.4.3.2 Caracterización de los films de agarosa-MWCNTs.....	85
4.4.3.3 Optimización del procedimiento de extracción.....	86
4.4.3.4 Reutilización del film de MWCNTs-agarosa.....	93
4.4.3.5 Parámetros analíticos.....	94
4.4.3.6 Aplicación a muestras de aguas naturales.....	95
4.4.4 Conclusión.....	102
4.5 Preparación de un film magnético de grafeno y agarosa para la extracción y preconcentración de progestinas.....	103
4.5.1 Introducción.....	103
4.5.2 Materiales y métodos.....	104
4.5.2.1 Preparación de soluciones e instrumentación.....	104
4.5.2.2 Procedimiento de preparación del G funcionalizado con las NPMs.....	105
4.5.2.3 Procedimiento de preparación del film.....	106
4.5.2.4 Procedimiento SPE.....	107
4.5.2.5 Muestreo y preparación de muestras.....	107
4.5.3 Resultados y discusión.....	108
4.5.3.1 Optimización de preparación del film.....	108
4.5.3.2 Caracterización del film.....	110
4.5.3.3 Optimización de las variables de extracción.....	110
4.5.3.4 Parámetros analíticos.....	115
4.5.3.5 Aplicación a muestras de aguas naturales.....	116
4.5.4 Conclusión.....	118
Capítulo 5: Conclusiones generales.....	120
<i>Apéndice 1: Productividad.....</i>	<i>122</i>

<i>Artículos publicados</i>	123
<i>Capítulos de libros</i>	123
<i>Trabajos presentados a congresos</i>	124

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1: Introducción

Figura 1.1 Clasificación de contaminantes emergentes.....	3
Figura 1.2 Esquematación de la introducción CECs de uso masivo en el ambiente.....	4
Figura 1.3 Esquema del proceso de extracción líquido-líquido.....	9
Figura 1.4 Clasificación de las técnicas de microextracción líquido-líquido (LPME).....	10
Figura 1.5 Esquema del proceso de extracción sólido-líquido.....	13
Figura 1.6 Clasificación de técnicas de basadas en extracción con adsorbente.....	15
Figura 1.7 Clasificación de adsorbentes utilizados en SPE.....	16

Capítulo 3: Microextracción coacervativa con solidificación de gotas flotantes de surfactante para la determinación de glibenclamida

Figura 3.1 Estructura química de la GLB.....	22
Figura 3.2 Esquema de las formas micelares.....	25
Figura 3.3 Esquema del procedimiento de CAME-SFD de la GLB.....	29
Figura 3.4 CAE (CAME) de GLB antes de su solidificación.....	29
Figura 3.5 Puntos de muestreo en el partido de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires.	30
Figura 3.6 Punto de muestreo en la ciudad de Carmen de Patagones, Provincia de Buenos Aires.....	31
Figura 3.7 Diferentes tensioactivos probados utilizados para realizar la extracción coacervativa de GLB.....	33
Figura 3.8 Señales de fluorescencia obtenida para la extracción coacervativa de GLB sin la adición y luego de la adición de un co-solvente.....	35
Fig 3.9 Señal de fluorescencia obtenida después de 23 minutos de extracción sin y con adición de NaCl.....	36
Fig 3.10 Espectros de una solución estándar de GLB antes y después de calentar en un baño de agua a 100°C durante 23 min.....	37
Fig 3.11 Diagrama de Pareto obtenido a partir del diseño Plackett-Burman.....	38

Capítulo 4: Extracción en fase sólida empleando nanopartículas a base de carbono

Fig 4.1 Biopolímeros que se obtienen a partir de distintas fuentes naturales.....	49
Fig 4.2 Finalidad y objetivos de la química analítica.....	51
Fig 4.3 Componentes básicos de un sistema FIA.....	53

Fig 4.4 Estructura química de la progesterona y las progestinas en estudio. (a) PRO; (b) LV; (c) MPG; y (d) NET.....	56
Fig 4.5 Sistema FIA propuesto.....	60
Fig 4.6 Espectros FTIR de (A) MWCNTs sin procesar y (B) ox-MWCNTs. Los comprimidos se prepararon mezclando 1,20 mg de cada tipo de CNTs con 200 mg de KBr.....	62
Fig 4.7 Interacciones entre los analitos y los ox-MWCNTs.....	64
Fig 4.8 Optimización del caudal (0,73- 1,71 mL min ⁻¹ con 10,0 mL de soluciones estándar de 1,0 mg L ⁻¹) para (a) LV, (b) NET y (c) MPG.....	65
Fig 4.9 Optimización del volumen de eluyente (0,7-1,5 mL) con 10,0 mL de soluciones estándar de 1,0 mg L ⁻¹) para (a) LV, (b) NET y (c) MPG.....	66
Fig 4.10 Optimización del volumen de muestra (10,0-150,0 mL, 0,01 mg de cada analito) para (a) LV, (b) NET y (c) MPG.....	67
Fig 4.11 Cromatogramas de la solución estándar y muestras de agua enriquecidas.....	73
Fig 4.12 Estructura química de los AINEs en estudio (a) Ketorolac (b) Piroxicam (c) Ketoprofeno.....	75
Fig 4.13 Esquema del procedimiento de preparación del film.....	80
Fig 4.14 Imágenes del film de agarosa-MWCNTs antes (a) y luego (b) de su secado.....	80
Fig 4.15 Puntos de muestreo en la ciudad de Bahía Blanca y Cabildo.....	82
Fig 4.16 Caracterización del film de MWCNTs-agarosa mediante SEM.....	85
Fig 4.17 Comparación entre los espectros de la extracción de KET utilizando un film compuesto únicamente por agarosa y un film de MWCNTs-agarosa.....	86
Fig 4.18 Optimización del pH en la recuperación de AINEs.....	88
Fig 4.19 Comparación entre los espectros obtenidos para la extracción de KET utilizando un film de MWCNTs-agarosa acondicionado con MeOH y un film acondicionado con IPA.....	89
Fig 4.20 Optimización del tiempo de extracción en la recuperación de AINEs.....	90
Fig 4.21 Optimización del volumen de eluyente en la recuperación de AINEs.....	91
Fig 4.22 Optimización del tiempo de elución en la recuperación de AINEs.....	92
Fig 4.23 Optimización del volumen de muestra en la recuperación de AINEs.....	93
Fig 4.24 Cromatogramas de la solución estándar y muestras de agua enriquecida medidas a $\lambda = 310$ nm para KEC, $\lambda = 326$ nm para PIR y $\lambda = 254$ nm para KEN.	97
Fig 4.25 Esquematación de una MSPE convencional.....	103
Fig 4.26 Esquematación del procedimiento de preparación del film de agarosa-G-NPMs.....	106

Fig 4.27 Esquematación del procedimiento de extracción.....	107
Fig 4.28 Puntos de muestreo ubicados en la ciudad de Bahía Blanca (1), Cabildo (2) y Tres Arroyos (3).....	108
Fig 4.29 Optimización del tiempo de secado del film.....	109
Fig 4.30 Caracterización del film de G-NPMs-agarosa mediante SEM. Microfotografías del film de G-NPMs-agarosa después de 8 horas (a), 15 horas (b) y 24 horas (c) de secado.....	110
Fig 4.31 Optimización del valor de pH de la muestra para los compuestos en estudio.....	112
Fig 4.32 Gráfico de la optimización del tiempo de extracción para los analitos.....	113
Fig 4.33 Optimización del tiempo de elución empleando ultrasonido.....	114
Fig 4.34 Optimización del volumen de muestra empleado en la extracción de los compuestos en estudio.....	115
Fig 4.35 Cromatogramas obtenidos para el blanco de reacción, una solución estándar de la mezcla de los analitos y las muestras de agua enriquecidas.....	118

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 3: Microextracción coacervativa con solidificación de gotas flotantes de surfactante para la determinación de glibenclamida

Tabla 3.1. Niveles de las variables de extracción probadas en el diseño de Plackett-Burman.....	32
Tabla 3.2. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de GLB.....	39
Tabla 3.3. Determinación de GLB en muestras de agua superficial.....	41
Tabla 3.4. Comparación de diferentes métodos de LPME de GLB en muestra ambientales.....	43

Capítulo 4: Extracción en fase sólida empleando nanopartículas a base de carbono

Tabla 4.1. Parámetros analíticos del método propuesto para la determinación de progestinas.....	69
Table 4.2. Comparación de métodos de SPE para la determinación de progestinas.....	70
Tabla 4.3. Recuperaciones de las progestinas determinadas en muestras de aguas naturales.....	72
Tabla 4.4. Comparación de diferentes procedimientos y formatos para adsorbentes basados en agarosa.....	84
Tabla 4.5. Parámetros analíticos del método propuesto para la determinación de los AINEs.....	94
Tabla 4.6. Estudio de recuperación para la extracción y determinación de los AINEs en muestras de aguas naturales.....	95
Tabla 4.7. Comparación de SPE y métodos basados en SPE para la determinación de AINEs.....	99
Tabla 4.8 Parámetros analíticos del método propuesto para la determinación de progestágenos.....	116
Tabla 4.9 Estudio de recuperación para los analitos en muestras de aguas naturales.....	117

ABREVIATURAS

[BMIm][BF ₄]	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio
[C ₆ MIM][PF ₆]	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio
ACN	Acetonitrilo
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
AOAC	Asociación de Analistas Oficiales Químicos
BP	Bomba peristáltica
C18	Octadecil silano
CAE	Extracción coacertiva
CAME	Microextracción coacervativa
CAME-SFD	Microextracción coacertiva con gota flotante de extractante solidificada
CE	Columna de extracción
CECs	Contaminantes emergentes
CG	Cromatografía gaseosa
CMC	Concentración micelar crítica
CNTs	Nanotubos de carbon
CPE	Extracción de punto nube
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DESS	Disolventes eutécticos profundos
DI-SPME	Microextracción en fase sólida por inmersión directa
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
d-SPE	Extracción en fase sólida dispersiva
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
FBA	Análisis Flow-Batch
FIA	Análisis por Inyección en Flujo
G	Grafeno
GLB	Glibenclamida
G-NPMs	Grafeno funcionalizado con nanopartículas magnéticas

GO	Óxido de grafeno
HEs	Hormonas esteroideas
HF-LPME	Microextracción líquido-líquido en fibra hueca
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HS-SPME	Microextracción en fase sólida de espacio de cabeza
ILs	Líquidos iónicos
IPA	Isopropanol
KEN	Ketoprofeno
KET	Ketorolac
LC	Cromatografía líquida
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPME	Microextracción líquido-líquido
LV	Levonorgestrel
MCFIA	Análisis en flujo multiconmutado
MeOH	Metanol
MOFs	Nanoestructuras metal-orgánicas
MPG	Medroxiprogesterona
MS	Espectrometría de masas
MSPE	Extracción en fase sólida magnética
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
NADES	Disolventes eutécticos profundos naturales
NET	Noretisterona
NPs	Nanopartículas
ox-MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados
PIR	Piroxicam
PRO	Progesterona

PTFE	Politetrafluoroetileno
RSD	Desviación estándar relative
SBSE	Extracción por adsorción con barra agitadora
SDME	Microextracción en gota
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
SFOD	Microextracción en gota orgánica solidificada
SIA	Análisis por Inyección Secuencial
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple
UHPLC	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento
VI	Válvula de inyección
VS	Válvula de selección

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminantes emergentes

Los contaminantes emergentes (CECs, por sus siglas en inglés) son sustancias, productos y materiales químicos que se esparcen en el ambiente y se detectan con frecuencia en suelos y aguas superficiales, subterráneas y potables¹. El término "contaminante emergente" se utiliza para describir sustancias potencialmente tóxicas, la mayoría no reguladas actualmente, pero que deben ser monitoreadas y divulgadas públicamente si se detectan en el suministro de agua o en aguas residuales. Si bien su presencia en el ambiente no es reciente, sí lo es la preocupación por las posibles consecuencias de los mismos, ya que pueden representar un riesgo para la salud humana. Sin embargo, los datos sobre su presencia y destino en el ambiente, y sus efectos en los organismos es desconocido². Por esta razón, aún no se han establecido límites de exposición seguros o estándares regulados para su presencia en el agua³. Estos contaminantes incluyen productos farmacéuticos y de cuidado personal, productos industriales y domésticos, algunos pesticidas, contaminantes orgánicos persistentes, y agentes biológicos, entre otros (Figura 1.1).

¹ Anastas N. Overview of Chemicals of Emerging Concern. To be Presented at PCWWA November meeting, Halifax, MA, November 18, 2015

² N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, M. Fourmentin, A. R. L. Ribeiro, C. Noutsopoulos, F. Mapelli, E. Fenyvesi, M. Gurgel Adeodato Vieira, L. A. Picos-Corrales, J. C. Moreno-Piraján, Removal of emerging contaminants from wastewater using advanced treatments. A review. *Environ. Chem. Lett.*, 20(2), 1333-1375, 2022. <https://dx.doi.org/10.1007/s10311-021-01379-5>

³ N. Morin-Crini, E. Lichtfouse, G. Liu, V. Balaram, A. R. Lado Ribeiro, Worldwide cases of water pollution by emerging contaminants: a review. *Environ. Chem. Lett.*, 20, 2311-2338, 2022. [10.1007/s10311-022-01447-4](https://doi.org/10.1007/s10311-022-01447-4)



Fig 1.1 Clasificación de los contaminantes emergentes según referencia 2

Debido a la alta e incesante producción de estas sustancias y su consumo masivo, es inevitable su continua introducción al ambiente, principalmente a través del vertido directo procedente de efluentes domésticos e industriales y vertidos agrícolas, y también a través de plantas de tratamiento de aguas residuales⁴. Estas últimas son de particular interés ya que continuamente descargan CECs al ambiente. Los CECs se detectan con frecuencia tanto en efluentes crudos como en aquellos tratados en plantas de tratamientos de aguas residuales en concentraciones que van desde ng L^{-1} hasta ug L^{-1}

⁴ R. Naidu, V. Arias Espana, Y. Liu, J. Jit, Emerging contaminants in the environment: Risk-based analysis for better management. Chemosphere 154,350-357, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.03.068>

⁵. Los procesos de tratamiento secundarios convencionales realizados en las plantas (lodos activados y filtros percoladores) representan los procesos más utilizados y estudiados. Sin embargo, estos procesos no eliminan los CECs, lo que da como resultado su descarga en las aguas superficiales receptoras, incluidos ríos, lagos y aguas costeras⁶ (Figura 1.2).



Fig 1.2 Esquematización de la introducción CECs de uso masivo en el ambiente.

Particularmente, los compuestos farmacéuticos activos son considerados CECs o microcontaminantes, debido a los posibles impactos negativos que pueden tener en los ecosistemas y la salud humana. En este grupo de contaminantes se incluyen diversas clases terapéuticas, como antibióticos, hormonas esteroideas (HEs), analgésicos, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), antidiabéticos, así como también varios metabolitos y productos resultantes de su transformación⁷. Como se mencionó anteriormente, en la mayoría de los casos, estos contaminantes no están regulados pero pueden ser candidatos a regulación futura dependiendo de las investigaciones que se hagan sobre los potenciales efectos adversos en la salud y de los datos de monitoreo con respecto a su incidencia.

⁵ N. H. Tran, M. Reinhard, K. Y. H. Gin, Occurrence and fate of emerging contaminants in municipal wastewater treatment plants from different geographical regions-a review. *Water res.*, 133, 182-207, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.029>

⁶ B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water res.*, 72, 3-27, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.08.053>.

⁷ M. Valdez-Carrillo, L. Abrell, J. Ramírez-Hernández, Pharmaceuticals as emerging contaminants in the aquatic environment of Latin America: a review. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 27, 44863–44891, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10842-9>

En la actualidad, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha difundido fichas técnicas que contienen resúmenes breves sobre ciertos contaminantes. Cada ficha técnica proporciona información concisa sobre el contaminante, incluyendo sus propiedades físicas y químicas, sus efectos en el ambiente y la salud, las directrices federales y estatales existentes y los métodos de detección y tratamiento. Estas fichas técnicas han sido diseñadas para ser utilizadas al abordar problemas de contaminación específicos y se actualizan de manera anual⁸. Algunos CECs están regulados por la EPA e incluidos en la lista de candidatos a contaminantes (CCL-4) e incluyen herbicidas, como cletodim, bensulida y diurón, pesticidas como hidróxido de trifenilestaño, estrógenos como 17alfa-estradiol y Etinilestradiol, y hormonas sintéticas como la noretisterona, entre otros⁹.

Es crucial que los organismos reguladores de cada país evalúen el posible impacto de estos contaminantes en la vida acuática y que cuenten con una estrategia clara para determinar los niveles de protección necesarios para mantener la salud de los organismos acuáticos¹⁰.

En Argentina, la regulación de los contaminantes en el agua está a cargo del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible. En cuanto a los CECs, y particularmente los productos farmacéuticos y de cuidado personal, actualmente no hay una regulación específica que aborde los niveles permitidos de estos compuestos en el país.

1.2 Determinación de CECs en muestras ambientales

Según la bibliografía, los métodos analíticos más empleados en el análisis de CECs son aquellos que involucran la espectrometría de masas (MS), una técnica instrumental de alta sensibilidad y eficiencia

⁸ <https://www.epa.gov/fedfac/emerging-contaminants-and-federal-facility-contaminants-concern#tab-3>

⁹ <https://www.epa.gov/ccl/ccl-4-chemical-contaminants>

¹⁰ <https://www.epa.gov/wqc/contaminants-emerging-concern-including-pharmaceuticals-and-personal-care-products>

comúnmente empleada en la determinación de sustancias a niveles traza^{11 12 13}. Estos métodos presentan límites de detección más bajos que otros basados en técnicas de espectrometría óptica. No obstante, en el análisis de CECs suelen utilizarse combinaciones de distintas técnicas instrumentales, tanto separativas como no separativas, y diferentes combinaciones de instrumentos y detectores para obtener resultados de calidad analítica. Por ejemplo, se ha empleado la cromatografía de gases (CG) acoplado a MS¹⁴, la cromatografía líquida (LC) como la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC) acoplada a MS^{15 16 17}, y la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a MS^{18 19} y a absorción molecular UV²⁰. Particularmente, para la determinación de productos farmacéuticos y de cuidado personal en muestras ambientales, la EPA propone el Método 1694 que se basa en el

¹¹ H. Chang, S. Wu, J. Hu, M. Asami, S. Kunikane, Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1195, 44-51, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.055>

¹² M. J. López de Alda, D. Barceló, Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by liquid chromatography–diode array detection–mass spectrometry *J. Chromatogr. A*, 892, 391–406, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)00068-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00068-6)

¹³ Á. Tolgyesi, Z. Verebey, V. K. Sharma, L. Kovacsics, J. Fekete, Simultaneous determination of corticosteroids, androgens, and progesterone in river water by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Chemosphere*, 78, 972–979, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.12.025>

¹⁴ M. S. Díaz-Cruz, M. J. López de Alda, R. López, D. Barceló, Determination of estrogens and progestogens by mass spectrometric techniques (GC/MS, LC/MS and LC/MS/MS), *J. Mass Spectrom.*, 38, 917–923, 2003. <https://doi.org/10.1002/jms.529>

¹⁵ H. Chang, S. Wu, J. Hu, M. Asami, S. Kunikane, Trace analysis of androgens and progestogens in environmental waters by ultra-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1195, 44-51, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.04.055>.

¹⁶ S. Liu, G. Ying, S. Liu, H. Lai, Z. Chen, C. Pan, J. Zhao, J. Chen, Analysis of 21 progestagens in various matrices by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) with diverse sample pretreatment" *Anal. Bioanal. Chem.*, 406, 7299-7311, 2014. doi:10.1007/s00216-014-8146-4

¹⁷ Jian N, Qian L, Wang C, Li R, Xu Q, Li J. Novel nanofibers mat as an efficient, fast and reusable adsorbent for solid phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water. *J. Hazard. Mater.*, 363, 81–89, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.052>

¹⁸ S.S. Caldas, C. Rombaldi, J.L. de Oliveira Arias, L.C. Marube, E.G. Primel, Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid–liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta*, 146, 676-688, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.047>

¹⁹ M. García Valverde, M.J. Martínez Bueno, M.M. Gómez-Ramos, A. Aguilera, M.D. Gil García, A.R. Fernández-Alba, Determination study of contaminants of emerging concern at trace levels in agricultural soil. A pilot study, *Science of The Tot. Environ.*, 782, 146759, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146759>.

²⁰ Y. Hu, M. Zhang, C. Tong, J. Wu, W. Liu, *J. Sep. Sci.* 2013, 36, 3321–3329; He XQ, Cui YY, Lin XH, Yang CX. Fabrication of polyethyleneimine modified magnetic microporous organic network nanosphere for efficient enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from wastewater samples prior to HPLC-UV analysis. *Talanta*, 233, 122471, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122471>

empleo HPLC-MS utilizando dilución de isótopos y patrones internos. Este método ha sido desarrollado para su uso con matrices acuosas, sólidas y biosólidas²¹.

En general, en la mayoría de los métodos analíticos encontrados en bibliografía es necesario implementar, previo al análisis instrumental, etapas de tratamiento de la muestra que permitan tanto la limpieza o “clean-up” de la muestra como el aislamiento (extracción) del analito de la matriz²². El pretratamiento de la muestra, sobre todo en el análisis de muestras complejas, juega un papel preponderante en la obtención de resultados analíticos de calidad. A lo largo de los años, se han desarrollado varias técnicas de extracción que pueden ser aplicadas al tratamiento de diferentes muestras con distinto grado de complejidad. Por ejemplo, para muestras de suelo, se han desarrollado métodos basados en extracción asistida por microondas²³, extracción líquida presurizada²⁴, extracción asistida por ultrasonidos²⁵ y extracción con fluidos supercríticos^{19 22 26}. Con frecuencia, todos estos métodos requieren un paso adicional de limpieza para purificar el extracto. En el caso de muestras de lodos, a menudo se trata la muestra por medio de una digestión anaeróbica seguida de centrifugación, previo a la extracción de los contaminantes de interés²⁶. Además, en los últimos años, se ha utilizado un procedimiento de extracción conocido como QuEChERS (del inglés, quick, easy, effective, rugged and safe) para extraer compuestos orgánicos del suelo, el cual se basa en una extracción con acetonitrilo acidificado agregando electrolitos (“efecto *salting-out*”), seguida de una extracción en

²¹ https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-10/documents/method_1694_2007.pdf

²² B. Huidobro-López, I. López-Heras, C. Alonso-Alonso, V. Martínez-Hernández, L. Nozal, I. de Bustamante, Analytical method to monitor contaminants of emerging concern in water and soil samples from a non-conventional wastewater treatment system, *J. Chromatogr. A*, 1671, 463006, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463006>.

²³ M. Varga, J. Dobor, A. Helenkár, L. Jurecska, J. Yao, G. Záray, Investigation of acidic pharmaceuticals in river water and sediment by microwave-assisted extraction and gas chromatography–mass spectrometry, *Microchem. J.*, 95, 353-358, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2010.02.010>.

²⁴ V. Andreu, Y. Picó, Pressurized liquid extraction of organic contaminants in environmental and food samples, *Trends Anal. Chem.*, 118, 709-721, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.038>.

²⁵ R. Aznar, C. Sánchez-Brunete, B. Albero, Occurrence and analysis of selected pharmaceutical compounds in soil from Spanish agricultural fields. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 21, 4772–4782, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2438-7>

²⁶ M. Gorga, E. Martínez, A. Ginebreda, E. Eljarrat, D. Barceló, Determination of PBDEs, HBB, PBEB, DBDPE, HBCD, TBBPA and related compounds in sewage sludge from Catalonia (Spain), *Sci. Tot. Environ.*, 444, 51-59, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.066>.

fase sólida dispersiva (d-SPE) para la remoción de interferentes²⁷. En el caso de muestras de agua, éstas son a menudo pretratadas para remover sólidos en suspensión previo a la extracción de los analitos de interés²². Las técnicas de extracción más utilizadas se pueden clasificar en extracción con solventes (líquido-líquido) y en extracción con adsorbentes (líquido-sólido), de acuerdo a las fases involucradas en el proceso de extracción^{28 29 30}.

1.2.1 Extracción líquido-líquido

La extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés) es una técnica que se basa en la solubilidad relativa de los solutos entre dos fases líquidas inmiscibles y se emplea ampliamente para la preparación de muestras³¹. Por lo general, una fase es un medio acuoso y la otra un solvente orgánico, siendo esta última la fase extractiva o aceptora (Figura 1.3). El analito debe tener una alta solubilidad en la fase extractiva, y al utilizar un bajo volumen de solvente se logra la preconcentración del mismo³².

Seleccionar adecuadamente los solventes es fundamental para garantizar la eficacia y selectividad del proceso de extracción. Al elegir el solvente, es importante tener en cuenta su inmiscibilidad con la fase en la que se encuentra la muestra y la polaridad del compuesto a extraer. En el caso de utilizar

²⁷ B. Benedetti, M. Majone, C. Cavaliere, C. M. Montone, F. Fatone, N. Frison, A. Laganà, A. L. Capriotti, Determination of multi-class emerging contaminants in sludge and recovery materials from waste water treatment plants: Development of a modified QuEChERS method coupled to LC-MS/MS, *Microchem. J.*, 155, 104732, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104732>.

²⁸ Y. Liang, J. Liu, Q. Zhong, D. Yu, J. Yao, T. Huang, M. Zhu, T. Zhou, A fully automatic cross used solid-phase extraction online coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for the trace analysis of multi-class pharmaceuticals in water samples, *J. of Pharmaceut. Biomed.*, 174, 330-339, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.004>.

²⁹ S. S. Liu, W. D. You, C. E. Chen, X. Y. Wang, B. Yang, G. G. Ying, Occurrence, fate and ecological risks of 90 typical emerging contaminants in full-scale textile wastewater treatment plants from a large industrial park in Guangxi, Southwest China, *J. Hazard. Mat.*, 449, 131048, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131048>.

³⁰ C. Toledo-Neira, A. Álvarez-Lueje, Ionic liquids for improving the extraction of NSAIDs in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction by high performance liquid chromatography-diode array-fluorescence detection, *Talanta*, 134, 619-626, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.067>.

³¹ C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, M. E. Torres-Padrón, J. J. Santana-Rodríguez, Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants, *Trends Anal. Chem.*, 30, 731-748, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.01.011>.

³² Y. Yamini, M. Rezazadeh, S. Seidi, Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations, *Trends Anal. Chem.*, 112, 264-272, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.06.010>.

una fase acuosa y un solvente orgánico, los compuestos más hidrofílicos tenderán a permanecer en la fase acuosa, mientras que los más hidrofóbicos se distribuirán preferentemente en el solvente orgánico³³.

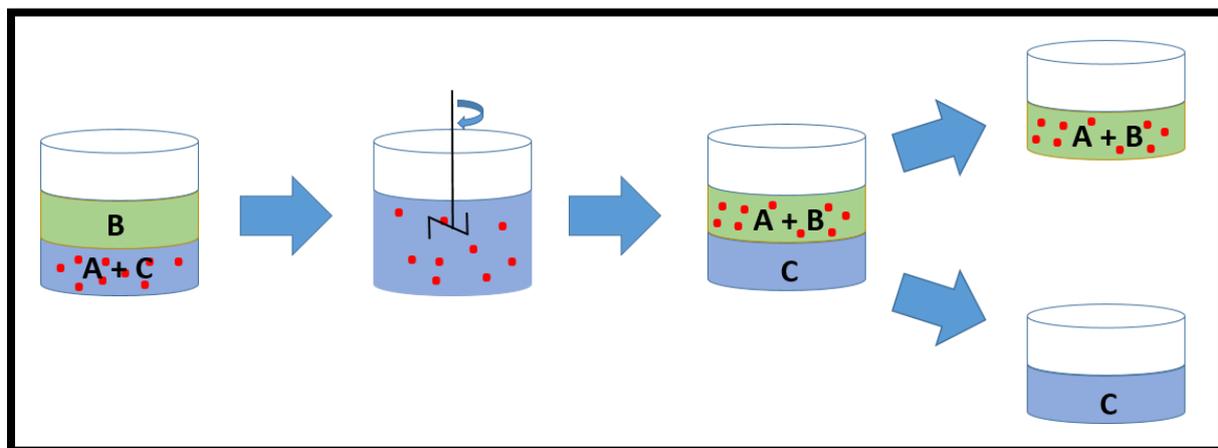


Fig 1.3 Esquema del proceso de extracción líquido-líquido. A: compuestos de interés; B: fase orgánica; C: fase acuosa.

La LLE se utiliza como una técnica de tratamiento previo a la separación de analitos orgánicos e inorgánicos de muestras acuosas, pero presenta algunas desventajas relacionadas con el gran volumen de solventes tóxicos utilizados, y el gran volumen de muestra procesado. Esto conlleva a una gran generación de residuos, lo que no es amigable con el ambiente. Es por este motivo que surgió una alternativa miniaturizada de esta técnica de extracción denominada microextracción líquido-líquido (LPME por sus siglas en inglés), en la cual se utilizan volúmenes de muestra y de solventes orgánicos más pequeños³⁴. Las técnicas que forman parte de la LPME se pueden clasificar según se muestra en la Figura 1.4 y se explican a continuación:

³³ Z. Berk (2018). Capítulo 11. Food process engineering and technology.

³⁴ F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Miniaturized preconcentration methods based on liquid-liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 64, 1-15, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2008.10.042>.

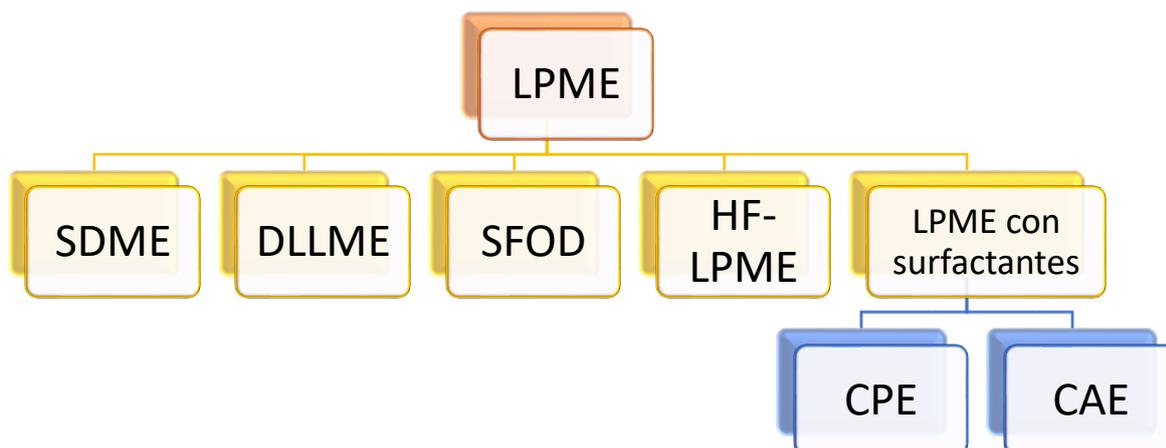


Fig 1.4 Clasificación de las técnicas de microextracción líquido-líquido (LPME) según referencia 32. SDME: microextracción en gota; DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva; SFOD: microextracción en gota orgánica solidificada; HF-LPME: microextracción líquido-líquido en fibra hueca; CPE: extracción de punto nube; CAE: extracción coacertiva

Microextracción en gota (SDME, por sus siglas en inglés, *single drop microextraction*): se basa en el reparto de analitos entre la muestra y la gota del solvente de extracción que cuelga de la punta de una jeringa. La fase de extracción puede entrar en contacto directo con la solución de la muestra o, en caso de analitos volátiles, estar expuesta al espacio libre sobre ella³².

Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, por sus siglas en inglés, *dispersive liquid-liquid microextraction*): se basa en la formación de pequeñas gotas de un solvente de extracción que se inyecta rápidamente en la muestra formando una solución turbia. El solvente extractante se mezcla previamente con un solvente dispersor que es miscible en las fases acuosa y orgánica, y mejora notablemente su dispersión³².

Microextracción en gota orgánica solidificada (SFOD por sus siglas en inglés, *solidified floating organic drop microextraction*): Esta técnica surgió para facilitar la recolección de la fase orgánica luego de la extracción. Como fase de extracción se usa un solvente con una densidad menor que la del agua y un punto de fusión cercano a la temperatura ambiente, que se puede solidificar fácilmente a través de

un baño de hielo. Luego, el solvente solidificado se transfiere a un vial, se disuelve en un solvente adecuado y se inyecta en el instrumento de análisis³².

Microextracción líquido-líquido en fibra hueca (HF-SME por sus siglas en inglés, *hollow-fiber solvent microextraction*): se basa en la extracción de los analitos en estudio presentes en una muestra acuosa a un extractante orgánico inmiscible en agua que se encuentra inmovilizado en los poros de una fibra hueca³⁴.

Microextracción líquido-líquido con surfactantes: Uno de los objetivos de la LPME es la utilización de disolventes con menor toxicidad como extractantes. El uso de estos disolventes no solo contribuye al desarrollo de métodos más amigables con el ambiente, sino también a mejorar la eficiencia de la extracción. Una alternativa a los solventes orgánicos convencionales son los surfactantes. Las técnicas que emplean fases ricas en surfactantes como solvente de extracción se pueden clasificar en:

- *Extracción de punto nube* (CPE por sus siglas en inglés, *cloud point extraction*): se basa en la coacervación que se produce cuando se calienta una solución acuosa que contiene un tensioactivo no iónico en una concentración superior a su concentración micelar crítica (CMC) y a una temperatura superior a su punto de enturbiamiento. Durante este proceso, se produce una separación de fases en la solución, lo que permite la extracción del analito³⁵.
- *Extracción coacertiva* (CAE por sus siglas en inglés, *coacertive extraction*): utiliza tensioactivos aniónicos o catiónicos como extractantes, de manera similar al proceso CPE. Sin embargo, a diferencia de la CPE, donde la separación se logra mediante cambios de temperatura, en la CAE la coacervación se produce además debido a la salinización o a otros factores como la adición de solventes orgánicos o cambios en el pH³⁵.

1.2.2 Extracción líquido-sólido (extracción en fase sólida)

³⁵ I. Pacheco-Fernández, R. González-Martín, F. A. e Silva, M. G. Freire, V. Pino, Insights into coacervative and dispersive liquid-phase microextraction strategies with hydrophilic media – A review, *Anal. Chim. Acta*, 1143, 225-249, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.08.022>.

De las técnicas basadas en la extracción empleando un sólido o adsorbente, la primera en ser desarrollada y más empleada es la extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés, *solid phase extraction*). La SPE es una técnica que se utiliza tanto para la limpieza de las muestras como para la extracción y preconcentración de sustancias contaminantes que se encuentran a niveles traza en muestras ambientales, clínicas, biológicas y alimentarias³⁶.

El término “extracción en fase sólida” se debe a que el material adsorbente que entra en contacto con la muestra es un sólido o un sólido enlazado covalentemente a un líquido inmiscible, que es normalmente empacado en pequeños tubos o cartuchos. En general, los analitos son retenidos en el sólido, y finalmente eluidos con una determinada cantidad de disolvente que se elige de acuerdo a la afinidad del analito por el eluyente empleado. Esta técnica consta de 4 etapas principales (Figura 1.5)³⁶:

1. *Etapas de acondicionamiento.* Esta etapa se basa en la activación del adsorbente empleando un volumen adecuado de solvente con el objetivo de mejorar la interacción analito-adsorbente y de esta manera, aumentar el área superficial efectiva. Además, en esta etapa se eliminan los compuestos que puedan estar previamente adsorbidos en el sólido y por lo tanto, se reducen las interferencias.
2. *Etapas de adición de la muestra.* Se hace pasar la muestra a través del adsorbente, controlando el caudal y el volumen de la misma para maximizar la eficacia de extracción.
3. *Etapas de lavado.* En esta etapa se eliminan restos de muestra o interferentes débilmente adsorbidos. Se pueden emplear soluciones acuosas, como soluciones amortiguadoras, o solo agua.
4. *Etapas de elución.* Se selecciona un solvente adecuado para lograr la elución del analito o grupo de analitos, interrumpiendo las interacciones entre éstos y el adsorbente.

³⁶ A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 641-654, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.015>

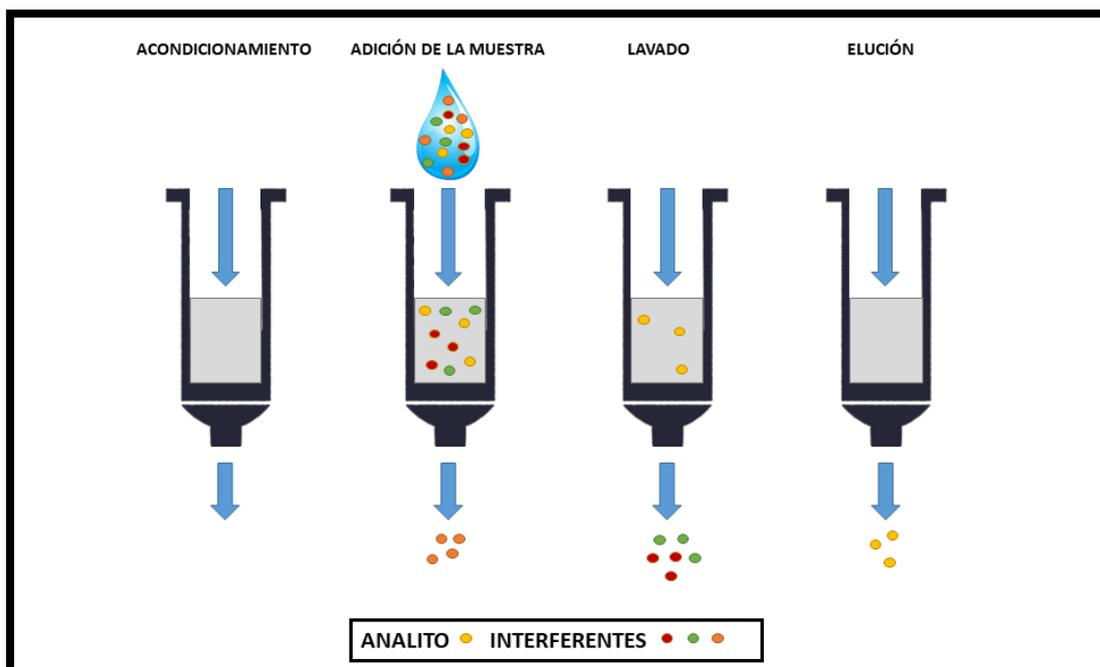


Fig 1.5 Esquema del proceso de extracción sólido-líquido. Adaptado de referencia 36

Esta técnica es muy usada, ya que evita o minimiza los inconvenientes asociados a la LLE, tales como el elevado consumo de solvente, la separación incompleta de fases e interferencias de matriz. Además, presenta ventajas como la reducción de la cantidad de muestra y del tiempo de procesamiento, menor consumo de solvente y menor cantidad de residuos generados, sumado a la posibilidad de automatización del proceso^{37 38}.

La SPE involucra la optimización de ciertos parámetros que afectan la extracción y que incluyen el tipo de adsorbente, su acondicionamiento, tipo de eluyente, volumen de eluyente y volumen de muestra. En relación a los volúmenes de muestra que se utilizan en la SPE, se puede decir que los mismos varían de acuerdo a la concentración del analito en la muestra, el tipo de matriz a ser analizada y la modalidad de extracción³⁹. La composición de la matriz de la muestra y el volumen de la misma pueden afectar fuertemente las recuperaciones y la sensibilidad del método. Por ejemplo, usar bajos volúmenes de

³⁷ J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepeńska, M. de la Guardia, J. Namieśnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, Trends Anal. Chem., 77, 23-43, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.10.010>.

³⁸ A. Juan, Y. Picó, G. Font, Revista de Toxicología, vol. 20, núm. 3 (2003) 166-175

³⁹ S. Mitra, J. A. Caruso, S. R. Crouch, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. Editorial: John Wiley & Sons, 2016.

muestra hace más rápido su tratamiento, pero pueden llevar a factores de preconcentración más bajos. Por el contrario, el aumento del volumen de muestra, puede incrementar el factor de preconcentración, pero también el tiempo de análisis.

A partir de la introducción de la SPE como técnica de extracción, se han desarrollado diferentes técnicas asociadas basadas en el empleo de un adsorbente y con principios similares. Entonces, las principales técnicas basadas en la extracción con adsorbente, se pueden clasificar en (Figura 1.6):

Microextracción en fase sólida (SPME por sus siglas en inglés, *solid phase microextraction*): los analitos se extraen y se preconcentran directamente en el revestimiento exterior de una fibra de sílice fundida. Existen dos variantes de SPME que se pueden utilizar para extraer analitos: el espacio de cabeza (HS-SPME por sus siglas en inglés, *headspace solid-phase microextraction*), donde la fibra se expone a la fase gaseosa libre por encima de la muestra, e inmersión directa (DI-SPME), donde la fibra se sumerge directamente en la solución de muestra⁴⁰.

Extracción por adsorción con barra agitadora (SBSE por sus siglas en inglés, *stir bar sorptive extraction*): una barra de agitación recubierta con un material adsorbente se introduce en el vial junto con la solución de muestra acuosa. La extracción de los analitos en estudio se lleva a cabo bajo una agitación vigorosa. Luego, la barra de agitación es removida y los analitos adsorbidos son eluidos por medio de un disolvente orgánico o térmicamente⁴⁰.

Extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE por sus siglas en inglés, *dispersive solid phase extraction*): Se basa en agregar el adsorbente seleccionado directamente en la solución acuosa de la muestra seguido de una dispersión. Esta técnica tiene como ventaja el gran contacto entre el adsorbente y los analitos en estudio. Una vez finalizado el proceso de extracción, el adsorbente con los analitos adsorbidos se separa de la muestra mediante un proceso mecánico, como centrifugación o filtración⁴⁰.

⁴⁰ N. Manousi, G. A. Zachariadis, Recent Advances in the Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Environmental Samples. *Molecules*, 25(9), 2182, 2020.—. doi:10.3390/molecules25092182

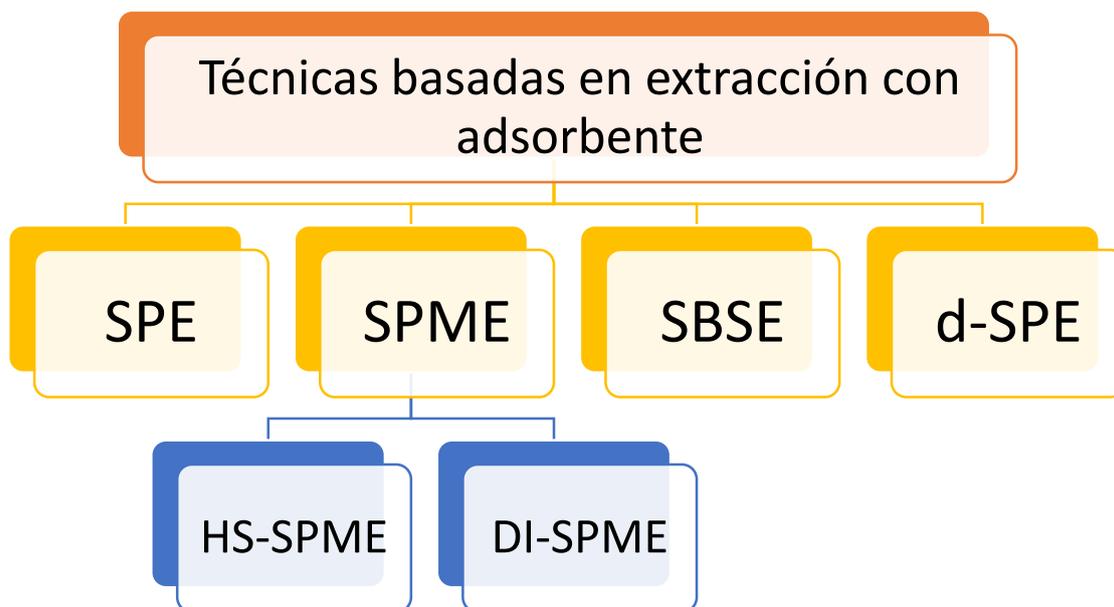


Fig 1.6 Clasificación de técnicas de basadas en extracción con adsorbente según referencia 40. SPE: extracción en fase sólida; SPME: microextracción en fase sólida; HS-SPME: microextracción en fase sólida de espacio de cabeza; DI-SPME: microextracción en fase sólida por inmersión directa; SBSE: extracción por adsorción con barra agitadora; d-SPE: extracción en fase sólida dispersiva

Los adsorbentes más comúnmente utilizados para la extracción en fase sólida se pueden clasificar en óxidos inorgánicos, adsorbentes de baja especificidad y adsorbentes de alta especificidad ⁴¹ (Figura 1.7).

⁴¹ C. F. Poole, 1 - Core concepts and milestones in the development of solid-phase extraction, Editor(s): Colin F. Poole, In Handbooks in Separation Science, Solid-Phase Extraction, Elsevier, 2020, 1-36, ISBN 9780128169063, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816906-3.00001-7>.

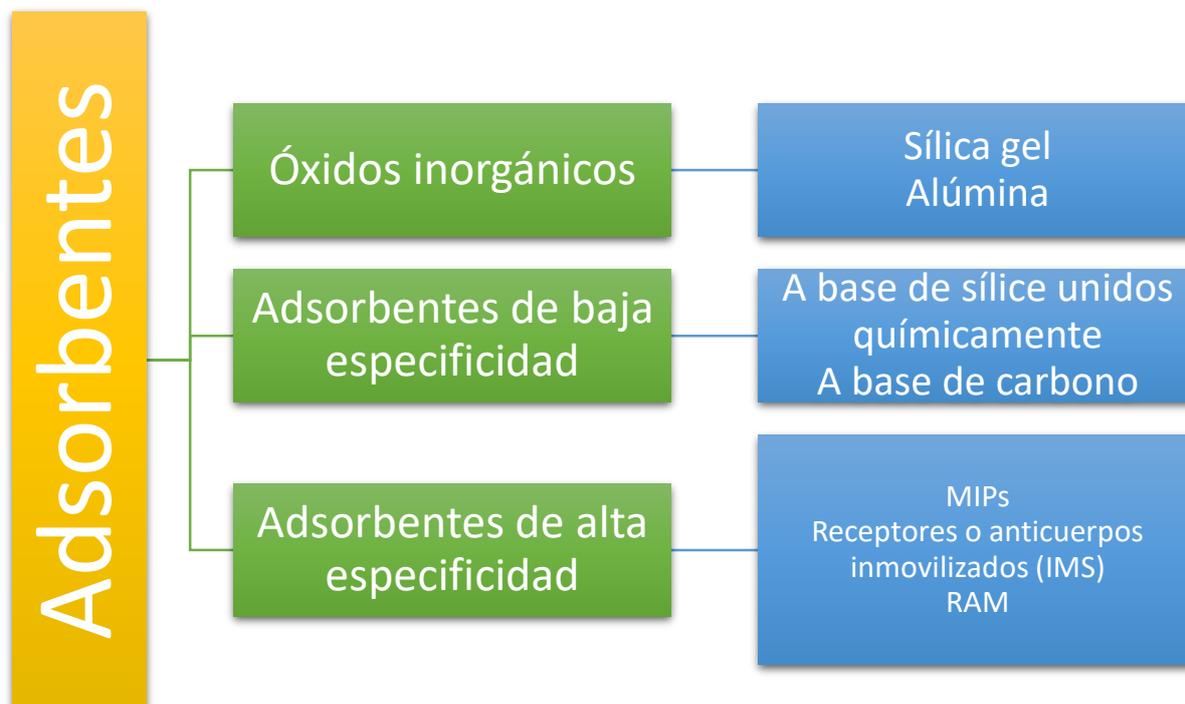


Fig 1.7 Clasificación de adsorbentes utilizados en SPE según referencia 41.

Óxidos inorgánicos: Los óxidos inorgánicos se caracterizan por tener una superficie con alta densidad de grupos funcionales activos. Estos grupos funcionales desempeñan un papel fundamental en la adsorción de analitos mediante interacciones de tipo polar, intercambio iónico e interacciones ácido-base. El adsorbente más importante de este tipo para la extracción en fase sólida es la sílice y en menor medida alúmina, titanio, zirconio, florisil y tierra de diatomeas.

Adsorbentes de baja especificidad: Se caracterizan por una retención regida por diferentes interacciones tales como interacciones hidrofóbicas, de puente hidrogeno, π - π , intermoleculares polares débiles, entre otras. Dentro de este grupo se incluyen adsorbentes a base de sílice unidos químicamente, polímeros porosos y recubrimientos de polímeros, y diversas formas de carbono, como grafeno y nanotubos de carbono.

Adsorbentes de alta especificidad: Se utilizan diferentes tipos de adsorbentes en la extracción en fase sólida para lograr una mayor selectividad y mejorar la eficacia del proceso. Entre estos adsorbentes se incluyen los basados en intercambio iónico, bioafinidad, reconocimiento molecular y materiales de acceso restringido (RAM), los cuales complementan los adsorbentes de alta especificidad mencionados anteriormente.

En el análisis de muestras acuosas, los más empleados son los adsorbentes de baja especificidad. En este grupo, y dentro de los adsorbentes comerciales, es frecuente el uso de octadecil silano (C18) y polímeros de balance hidrofílico-lipofílico (HLB)^{42 22}. Particularmente, en la determinación de fármacos en muestras ambientales se han empleado adsorbentes poliméricos como el Oasis[®] HLB⁴³ y el Oasis[®] MCX (*mixed-mode cation exchange*)⁴⁴. El Oasis[®] HLB es versátil y eficiente en la extracción de compuestos con diferentes polaridades y tiene una excelente capacidad de retención de analitos en medio ácido. Sin embargo, es poco selectivo, provee bajas recuperaciones y un mayor efecto matriz. Por su parte, el MCX, sintetizado a partir del copolímero HLB, tiene una mayor cantidad de grupos sulfónicos que lo hace un buen intercambiador de cationes. Además, puede ser usado para el intercambio iónico en fase reversa y así adsorber compuestos polares, no polares, neutros y catiónicos simultáneamente. Tiene un espectro de retención más amplio, más reproducible y más estable que todos los compuestos mixtos a base de sílice. También se ha empleado con éxito en la extracción de productos farmacéuticos en matrices acuosas⁴⁴

⁴² V. Iancu, G. Radu, R. Scutariu, A new analytical method for the determination of beta-blockers and one metabolite in the influents and effluents of three urban wastewater treatment plants, *Anal. Methods*, 11, 4668-4680, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9AY01597C>.

⁴³ A. Andrade-Eiroa, M. Canle, V. Leroy-Cancellieri, V. Cerdà, Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *Trends Anal. Chem.*, 80, 655-667, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>

⁴⁴ N. A. Al-Odainia, M. P. Zakariaa, M. I. Yaziza, S. Surifb, Multi-residue analytical method for human pharmaceuticals and synthetic hormones in river water and sewage effluents by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1217, 6791-6806, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.08.033>

CAPÍTULO 2

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta tesis doctoral fue desarrollar nuevos métodos analíticos de extracción y preconcentración de contaminantes emergentes de muestras ambientales, con el fin de lograr una mayor simplicidad y rapidez en la obtención de información de calidad. A su vez, se intentó minimizar o eliminar el uso y/o la producción de residuos peligrosos o contaminantes para el ambiente, en concordancia con los principios de la química analítica ecológica.

CAPÍTULO 3

MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO COACERTIVA PARA LA DETERMINACIÓN DE GLIBENCLAMIDA

3.1 OBJETIVO

Desarrollar un nuevo método analítico, amigable con el ambiente, para extraer y preconcentrar glibenclamida en muestras de agua utilizando la técnica de extracción coacertiva con solidificación de gota de extractante flotante.

3.2 INTRODUCCIÓN

La glibenclamida (GLB) (Figura 3.1) es un fármaco que pertenece al grupo de las sulfonilureas. Es un antidiabético oral de segunda generación utilizado como tratamiento inicial para la diabetes tipo II en pacientes que no pueden controlar la hiperglucemia.

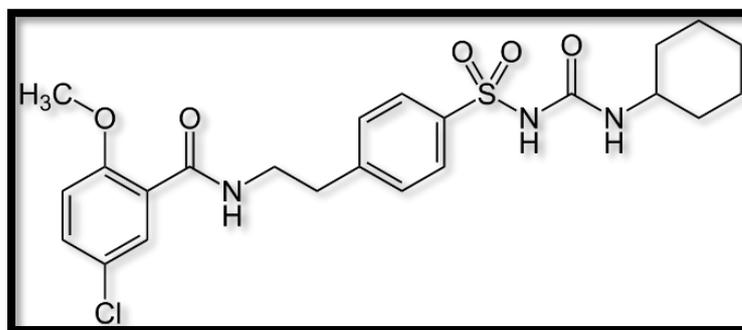


Fig 3.1 Estructura química de la GLB

La GLB puede clasificarse como un contaminante emergente⁴⁵ y ha sido categorizada como un compuesto moderadamente degradable⁴⁶. Algunos estudios han demostrado que la GLB es capaz de inducir estrés oxidativo en mamíferos⁴⁷ y en algunas especies acuáticas⁴⁸. Por lo tanto, su cuantificación en diferentes matrices ambientales es de gran interés. La propiedad que tiene un compuesto orgánico de ser hidrofílico o hidrofóbico se puede inferir mediante el coeficiente de partición octanol/agua (K_{ow}), el cual indica su capacidad para distribuirse entre el agua y una fase

⁴⁵ Anastas N. Overview of Chemicals of Emerging Concern. To be Presented at PCWWA November meeting, Halifax, MA, November 18, 2015.

⁴⁶ M. Markiewicz, C. Jungnickel, S. Stolte, A. Białk-Bielinska, J. Kumirska, W. Mroziak, Ultimate biodegradability and ecotoxicity of orally administered antidiabetic drugs, *Journal of Hazardous Materials* 333, 154–161, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.030>

⁴⁷ N.K. Nazaroglu, A. Sepici-Dincel, N. Altan, The effects of sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in the brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rat *J. Diabet. Complicat.*, 23, 209-213, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2007.09.001>

⁴⁸ E. Martínez-Viveros, H. HarizIslas-Flores, O. Dublán-García, M. Galar-Martínez, N. SanJuan-Reyes, S. García-Medina, M. D. Hernández-Navarro, L. Gómez-Oliván, Environmentally relevant concentrations of glibenclamide induce oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio*), *Chemosphere* Volume 197, 105-116, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.020>

orgánica⁴⁹. La capacidad de un compuesto para adsorberse en materiales hidrófobos puede considerarse alta, media o baja si el valor del logaritmo de K_{ow} es mayor a 4, está entre 2,5 y 4, o es menor a 2,5, respectivamente⁵⁰. Debido a que el log K_{ow} de la GLB es 3,78, su solubilidad en agua puede ser considerada media⁴⁹.

Dado que la GLB puede encontrarse a niveles traza en muestras ambientales, la etapa de preparación de la muestra es esencial para garantizar una alta calidad de los resultados analíticos. Por esta razón, se han desarrollado varios métodos de extracción para la determinación de GLB, principalmente aquellos que involucran la SPE, utilizando polímeros HLB (Oasis® HLB) o C18 como adsorbentes^{49 51 52} ^{53 54}, y LPME^{55 56}. En las técnicas de LPME, el octanol se ha utilizado como solvente orgánico para la microextracción de GLB de aguas naturales asistida por vortex⁵⁶ y en fibra hueca⁵⁷.

⁴⁹ F. F. Al-Qaim, Z. H. Mussa, A. Yuzir, Development and validation of a comprehensive solid-phase extraction method followed by LC-TOF/MS for the analysis of eighteen pharmaceuticals in influent and effluent of sewage treatment plants. *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, 4829-4846, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1120-9>

⁵⁰ H. R. Rogers, Sources, behaviour and fate of organic contaminants during sewage treatment and in sewage sludges, *Sci. Total Environ.*, 185, 3–26, 1996. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05039-5](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05039-5)

⁵¹ Y. Liang, J. Liu, Q. Zhong, D. Yu, J. Yao, T. Huang, T. Zhou, A fully automatic cross used solid-phase extraction online coupled with ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry system for the trace analysis of multi-class pharmaceuticals in water samples. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 174, 330-339, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.004>.

⁵² V. I. Iancu, R. E. Scutariu, F. L. Chiriac, G. L. Radu, Sensitive detection of antidiabetic compounds and one degradation product in wastewater samples by a new SPE-LC-MS/MS method. *J. Environ. Sci. Health A*, 56(3), 310-323, 2021. <https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1873671>.

⁵³ S.S. Caldas, C.M. Bolzan, J.R. Guilherme, M.A. Kisner Silveira, A.L. Venquiaruti Escarrone, E.G. Primel, Determination of pharmaceuticals, personal care products, and pesticides in surface and treated waters: method development and survey, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 5855-5863, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1650-9>.

⁵⁴ Y. Liang, J. Liu, Q. Zhong, D. Yu, J. Yao, T. Huang, M. Zhu, T. Zhou, A fully automatic cross used solid-phase extraction online coupled with ultra-high performance liquid chromatography– tandem mass spectrometry system for the trace analysis of multi-class pharmaceuticals in water samples, *J. Pharmaceut Biomed.*, 174, 330-339, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.06.004>.

⁵⁵ C. Hess, F. Musshoff, B. Madea, Simultaneous identification and validated quantification of 11 oral hypoglycaemic drugs in plasma by electrospray ionisation liquid chromatography–mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 400, 33–41, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-4698-8>.

⁵⁶ M. Miskam, Vortex Assisted Liquid-Liquid Microextraction with Back Extraction of Repaglinide, Glibenclamide and Glimepiride in Water Samples, *Sains Malaysiana* 50(5), 1297-1307, 2021. <http://doi.org/10.17576/jsm-2021-5005-10>

⁵⁷ V. Salvatierra-stamp, R. Muñoz-Valencia, J. M. Jurado, S. G. Ceballos-Magaña, Hollow fiber liquid phase microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of emerging contaminants in water samples, *Microchem. J.*, 140, 87-95, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.04.012>.

Diferentes autores han propuesto métodos de DLLME para preconcentrar la GLB a partir de diferentes matrices, utilizando diclorometano⁵⁸, 1-dodecanol ⁵⁹ hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio [C₆MIM][PF₆]⁶⁰, octanol ⁶¹ y acetonitrilo ⁶² como solventes de extracción.

Para cumplir los principios de la química analítica amigable con el ambiente y reducir el impacto del empleo de solventes tóxicos, se recomienda el uso de solventes más ecológicos⁶³. Entre los solventes que pueden ser considerados ecológicos se encuentran los líquidos iónicos (ILs), los disolventes eutécticos profundos (DESs), los disolventes eutécticos profundos naturales (NADES) y los surfactantes⁶³. Por ello, algunas de las técnicas de microextracción propuestas se basan en el empleo de surfactantes⁶⁴. Los surfactantes son moléculas anfifílicas compuestas por un grupo de "cabeza" polar conectado a un grupo de "cola" hidrofóbico (Figura 3.2)⁶⁴.

⁵⁸ C.M. Monzón, C.M. Teglia, M.R. Delfino, H.C. Goicoechea, Chemometric optimization and validation of a novel dispersive liquid-liquid microextraction-HPLC method for gliclazide, glibenclamide and glimepiride quantitation in serum samples, *Microchem. J.* 127, 113-119, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.02.011>.

⁵⁹ L.C. Marube, S.S. Caldas, K.L. Soares, E.G. Primel, Dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic droplets for simultaneous extraction of pesticides, pharmaceuticals and personal care products, *Microchim. Acta* 182, 1765-1774, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00604-015-1507-7>.

⁶⁰ L.C. Marube, S.S. Caldas, E.O. dos Santos, A. Michaelsen, E.G. Primel, Multi-Residue Method for Determination of Thirty-Five Pesticides, Pharmaceuticals and Personal Care Products in Water Using Ionic Liquid-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Combined with Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Braz. Chem. Soc.* 00, 1-11, 2018. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20170234>.

⁶¹ S.S. Caldas, C. Rombaldi, J.L. de Oliveira Arias, L.C. Marube, E.G. Primel, Multi-residue method for determination of 58 pesticides, pharmaceuticals and personal care products in water using solvent demulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta* 146, 676-688, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.06.047>.

⁶² P.K. Porwal, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.10.002>

⁶³ J. Płotka-Wasyłka, M. Rutkowska, K. Owczarek, M. Tobiszewski, J. Namiesnik, Extraction with environmentally friendly solvents, *Trends Anal. Chem.* 91, 12-25, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.03.006>.

⁶⁴ H. Ghouas, B. Haddou, M. Kameche, Z. Derriche, C. Gourdon, Extraction of humic acid by coacervate: Investigation of direct and back processes, *J. Hazard. Mater.* 205- 206, 171- 178, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.12.057>.

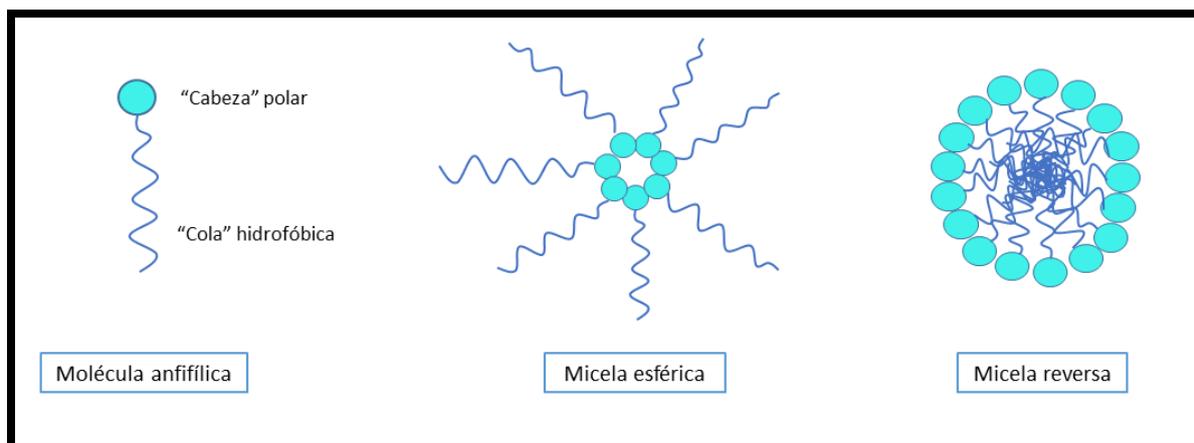


Fig 3.2 Esquema de las formas micelares según referencia 64

Se pueden clasificar en tensioactivos aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos. Los surfactantes se adhieren a la interfaz entre una solución acuosa y una solución orgánica. En este proceso, la parte hidrofílica de las moléculas siempre se orienta hacia la fase acuosa. A medida que aumenta la concentración, las moléculas anfifílicas presentes en un solvente se ven influenciadas por las propiedades anfifílicas de las cadenas hidrofóbicas, y se autoensamblan formando grupos de tamaño coloidal. Este proceso de asociación ocurre una vez que se supera una concentración específica conocida como concentración micelar crítica (CMC), que es característica de los compuestos tensioactivos. Los agregados formados por encima de la CMC se llaman micelas⁶⁵.

Como se mencionó anteriormente, las principales técnicas de extracción que involucran surfactantes como solventes de extracción son la CPE y la CAE⁶⁵. En cualquiera de estas técnicas, se requiere la formación de una fase de solución opalescente. Sin embargo, la principal diferencia entre ellas radica en los procesos involucrados en la separación de fases y la formación de la fase micelar. La CPE implica la separación de la fase de tensioactivo con carga total neutra (no iónicos o zwitteriónicos) del resto de la disolución, inducida por la temperatura⁶⁶. Por otro lado, en la CAE se utilizan tensioactivos iónicos

⁶⁵ A. Melnyk, J. Namieśnik, L. Wolska, Theory and recent applications of coacervate-based extraction techniques, *Trends Anal. Chem.*, 71, 282-292, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.03.013>.

⁶⁶ D.R. Bhatt, K.C. Maheria, J.K. Parikh, Highly efficient micellar extraction of toxic picric acid into novel ionic liquid: Effect of parameters, solubilization isotherm, evaluation of thermodynamics and design parameters, *J. Hazard. Mater.* 300, 338–346, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.07.040>.

y están involucrados otros factores además de la temperatura, como la adición de sal o el ajuste del pH⁶³. Por esta razón, las condiciones de extracción tales como tipo, concentración y volumen de surfactante, pH, temperatura, tiempo de extracción y adición de sal, deben optimizarse cuidadosamente.

El proceso de extracción en la CAE implica tres pasos:

- (1) solubilización de los analitos en la fase acuosa;
- (2) formación del punto nube y separación de una fase rica en tensioactivo de la fase acuosa, inducida por el ajuste de los parámetros de extracción; y
- (3) recuperación y cuantificación del analito en la fase rica en surfactante^{65 67}.

Se han utilizado diferentes tensioactivos como solventes para la extracción de diferentes compuestos en muestras ambientales. Por ejemplo, el dodecilsulfato de sodio (SDS) se ha utilizado para la extracción de verde brillante⁶⁸ y para la extracción de pesticidas organofosforados⁶⁹ en muestras de agua. El bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) se usó para extraer Mo(VI) de soluciones acuosas⁷⁰ y se mezcló con un líquido iónico (usado como factor coacervativo) para lograr la preconcentración de un grupo de contaminantes orgánicos presentes en muestras acuosas y muestras sólidas⁷¹. Se ha informado también la extracción micelar de famotidina de muestras acuosas mediante el uso de una

⁶⁷ A.S. Yazdi, Surfactant based extractions, Trends Anal Chem. 30 (2011) 918-929. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.010>.

⁶⁸ S.S.S. Hosseini, S. Khezri, A. Khosravi, Experimental design for the optimization of coacervative extraction of brilliant green in water samples using anionic surfactant, Appl Water Sci 8, 109, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13201-018-0757-z>.

⁶⁹ S. B. Mammana, P. Berton, A. B. Camargo, G. E. Lascalea, J. C. Altamirano, Coprecipitation-assisted coacervative extraction coupled to high-performance liquid chromatography: An approach for determining organophosphorus pesticides in water samples. *Electrophoresis*, 38(9-10), 1334-1343, 2017. <https://doi.org/10.1002/elps.201600335>.

⁷⁰ T. Madrakian, F. Ghazizadeh, Cloud-point preconcentration and spectrophotometric determination of trace amounts of molybdenum(VI) in steels and water samples, J. Hazard Mater. 153, 695–700, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.09.013>.

⁷¹ B. Delgado, V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Afonso, V. González, A novel preconcentration strategy for extraction methods based on common cationic surfactants: An alternative to classical coacervative extraction, J. Chromatogr. A. 1257, 9-18, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.026>.

mezcla de SDS y Triton X-114 como solventes de extracción antes de su determinación cromatográfica⁷².

El propósito de este trabajo fue desarrollar un método analítico amigable con el ambiente para la microextracción coacervativa (CAME) y la determinación fluorimétrica de GLB, utilizando una solución de SDS como solvente de extracción. Debido a que el SDS tiene un punto de fusión bajo, fue posible la solidificación de la fase de extracción. Se aplicó la técnica de microextracción coacertiva con gota flotante solidificada (CAME-SFD, del inglés *coacertive microextraction with solidified floating droplet*) a la extracción de GLB de muestras de agua ambiental con resultados satisfactorios. La principal ventaja de este trabajo es el uso de un extractante ecológico y económico en lugar de solventes halogenados, aromáticos y tóxicos.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Reactivos, soluciones e instrumentación

La GLB ($\geq 99\%$) se adquirió de Sigma-Aldrich (Alemania). La metformina, glicazida y glimepirida fueron suministradas por Parafarm (Argentina). Se preparó una solución patrón de 200 mg L^{-1} de cada analito en acetonitrilo ($\geq 99\%$, Merck, Alemania, ACN) y se almacenó en frascos oscuros a 4°C . Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente a partir de una dilución adecuada de las soluciones patrón con agua destilada. El metanol ($\geq 99\%$, MeOH) se adquirió de Sigma-Aldrich (Alemania). Cicarelli (Argentina) suministró el HCl 36,5-38,0% (m/m) y el NaCl. El SDS, triton X-100, triton X-114, octanol y etanol se obtuvieron de ANEDRA (Argentina). El CTAB se adquirió de Hopkings & Williams (Reino Unido). El tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ([BMIm][BF₄]) fue suministrado por Merck (Alemania).

⁷² I. Kiszkiel-Taudul, B. Starczewska, J. Karpin´ska, M. Kasabuła, Application of Micellar Extraction for Isolation of Famotidine from Aqueous Samples Prior to its Chromatographic Determination. J. Surfact. Deterg. 20, 1401-1409, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11743-017-2003-3>.

Para la extracción, se preparó una solución de SDS de $0,8 \text{ mol L}^{-1}$, disolviendo una cantidad apropiada de SDS en agua ultrapura, y soluciones de tritón X-100 y tritón X-114 y CTAB al 4 % (v/v).

Para la determinación de la GLB por fluorescencia molecular, se usó un espectrofluorímetro Jasco FP 6500 (ancho de banda de excitación 5 nm y ancho de banda de emisión 10 nm; voltaje PMT 535 V; adquisición de datos cada 1 nm). Las mediciones se realizaron en una cubeta de cuarzo de 0,5 mL suministrada por Hellma (Alemania). Las muestras se filtraron con papel de filtro cualitativo (Microclar, Argentina), se calentaron en un agitador magnético (Auto Science AM-5250B) y se agitaron con un vórtex Vortexer (Heathrow Scientific).

3.3.2 Procedimiento CAME-SFD

El esquema del procedimiento experimental se muestra en la figura 3.3. Para realizar la extracción de GLB, se transfirieron alícuotas de un volumen adecuado de solución de trabajo o de muestra a un tubo de centrífuga de 50,0 mL. Luego se agregaron 5,0 mL de HCl 36,5-38,0% (m/m), 800 μL de SDS $0,8 \text{ mol L}^{-1}$ (solvente de extracción), 500 mg de NaCl y 800 μL de MeOH, y se diluyeron hasta 50,00 mL con agua destilada. Los tubos se agitaron durante un minuto e inmediatamente se colocaron en un baño de agua a 100°C durante 23 minutos hasta que se formó la fase superior de SDS (Figura 3.4). A continuación, los tubos se colocaron en un baño de hielo durante 10 minutos para la solidificación de la fase de extracción.

Luego, la fase de SDS solidificada se recogió y se transfirió a un tubo Eppendorf donde se agregaron 500 μL de etanol. Finalmente, una vez disuelto el SDS, se realizaron las medidas de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 300 nm y una longitud de onda de emisión de 400 nm.



Fig 3.3 Esquema del procedimiento de CAME-SFD de la GLB.



Fig 3.4 Separación de la fase de extracción antes de su solidificación.

3.3.3 Muestreo y preparación de muestras

Las muestras se recolectaron en diferentes puntos del arroyo Napostá, que atraviesa la ciudad de Bahía Blanca, del arroyo Sauce Chico, ubicado cerca de la ciudad de General Daniel Cerri (Figura 3.5,

puntos 1, 2, 3 y 4), y del río Negro, ubicado en la ciudad de Carmen de Patagones, Buenos Aires (Figura 3.6, punto 5). Como se puede observar, todos los sitios de muestreo se encuentran cerca de ciudades densamente pobladas donde las aguas superficiales tienen un fuerte impacto de actividades antropogénicas.

Las muestras se acidificaron y se almacenaron en botellas de vidrio oscuro de 1,0 L a 4°C hasta su extracción. Para proceder con el análisis, las muestras se dejaron a temperatura ambiente, se homogeneizaron y luego se filtraron con un filtro de papel de poro de 4-12 µm para retener el material sólido en suspensión.

Para realizar el estudio de recuperación, las muestras se enriquecieron con GLB a tres niveles de concentración dentro del intervalo lineal y se siguió el mismo protocolo de preparación de la muestra.

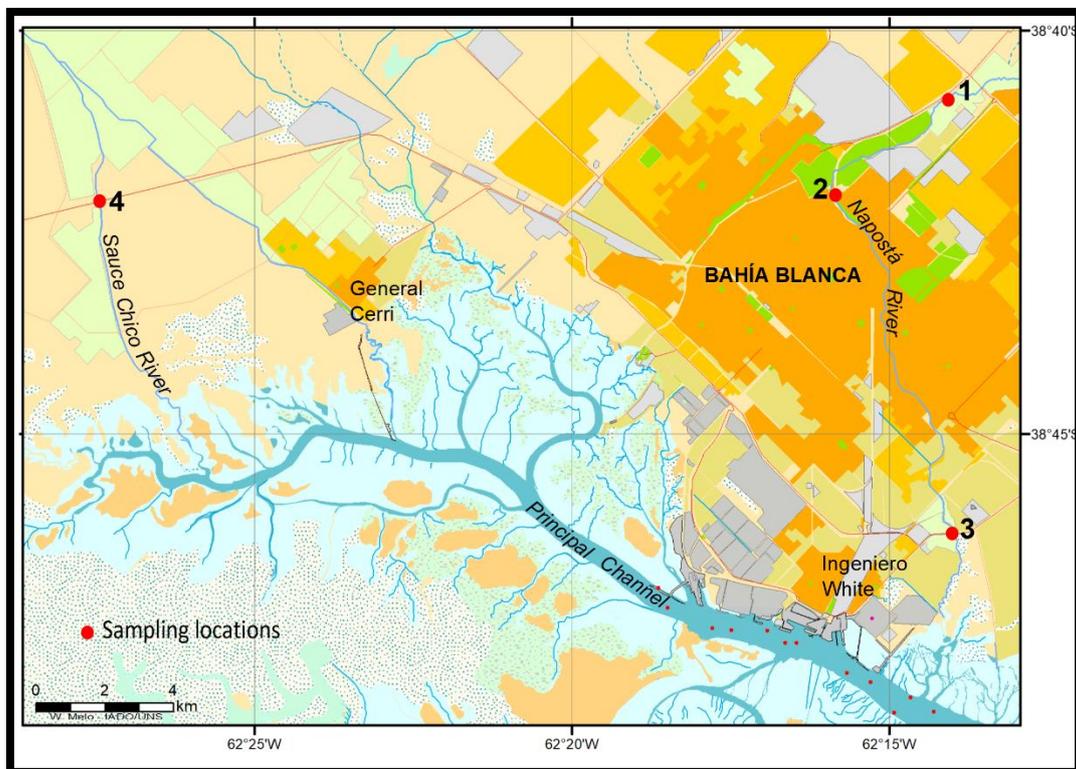


Fig 3.5 Puntos de muestreo en el partido de Bahía Blanca, Provincia de Buenos Aires. Puntos 1,2 y 3: Arroyo Napostá, Bahía Blanca; Punto 4, Arroyo Sauce Chico, Gral. Daniel Cerri

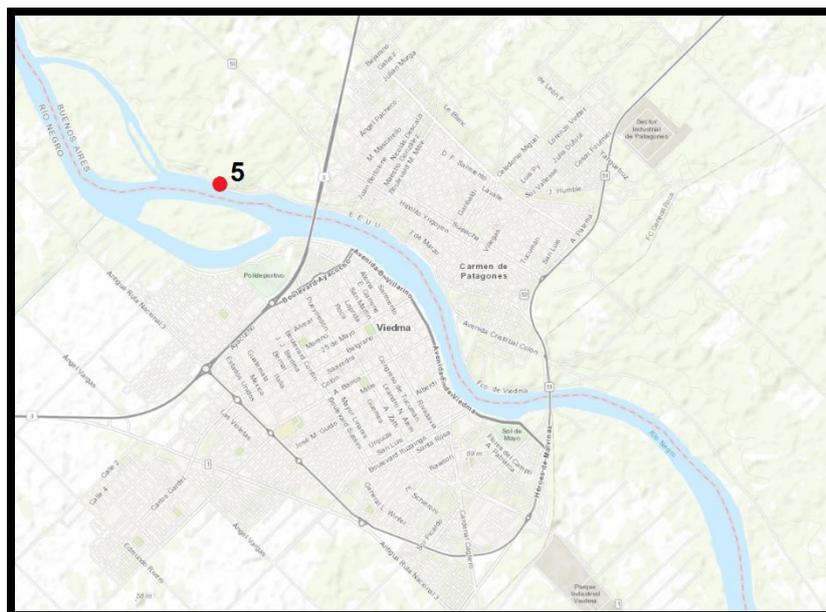


Fig. 3.6 Punto de muestreo en la ciudad de Carmen de Patagones, Provincia de Buenos Aires.

3.3.4 Diseño experimental

Con el fin de identificar los principales factores que afectan la extracción de GLB, se construyó un diseño de Plackett-Burman⁷³. Se realizó un conjunto de 12 experimentos con cinco parámetros independientes (factores reales) y siete factores ficticios en dos niveles (bajo y alto), representados como -1 y +1. El diseño experimental incluyó seis factores ficticios para determinar si existe un error sistemático o variables desconocidas que afecten los resultados⁷⁴. Para reducir el efecto de variables extrañas, los experimentos se realizaron aleatoriamente. Las variables fueron: volumen de MeOH, volumen de SDS, concentración de SDS, tipo de sal y volumen de HCl (Tabla 4). Para realizar los experimentos, las extracciones se realizaron empleando una solución de GLB de concentración 4,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, y los porcentajes de recuperación obtenidos se utilizaron para calcular el efecto de cada variable en la extracción.

⁷³ R.H. Myers, D.C. Montgomery, C.M Anderson-Cook, Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments, fourth ed., Wiley, New York, 2016.

⁷⁴ J. Zhou, X.H. Chen, S.D. Pan, J.L. Wang, Y.B. Zheng, J.J. Xu, Y.G. Zhao, Z.X. Cai, 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 Chem, 294 (2019) 160-170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.05.022>.

Tabla 3.1. Niveles de las variables de extracción probadas en el diseño de Plackett-Burman

Variables de extracción	Valor experimental	
	Bajo (-1)	Alto (+)
Volumen de MeOH (μL)	500	800
Concentración de la solución de SDS (mol L^{-1})	0,50	0,80
Volumen de la solución de SDS (μL)	500	800
Tipo de sal	NaCl	MgSO ₄
Concentración final de HCl (mol L^{-1})	0,96	1,2

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Experimentos preliminares

Se realizaron diferentes experimentos preliminares para establecer las variables que permitían la formación de la fase de extracción con la señal de blanco más baja posible. Para ello se preparó una solución de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GLB y la extracción se llevó a cabo como se describió en la Sección 3.3.2. Es necesario señalar que la GLB se mantuvo estable en las condiciones de extracción propuestas⁷⁵.

3.4.1.2 Selección del solvente de extracción

Para seleccionar el solvente adecuado para la extracción de GLB, se consideró la diferencia entre la señal obtenida después de la extracción de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de solución de GLB y la señal del blanco de la extracción.

Se probaron diferentes tensioactivos, un líquido iónico y mezclas de ellos como solventes de extracción. En primer lugar, se probaron tensioactivos no iónicos como Triton X-100, Triton X-114 y una mezcla compuesta por Triton X-100 y tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio

⁷⁵ El-Adl SM, El-Sadek ME, Hasan MH, Design and validation of stability indicating assay of glibenclamide using RP-HPLC technique in both bulk, pharmaceutical formulations and human plasma, J. Appl. Pharm. 9, 1000250, 2017. <https://doi.org/10.21065/1920-4159.1000250>

([BMIm][BF₄]) en proporción 50/50. Se realizó el blanco de extracción para cada uno de ellos y para la mezcla, obteniéndose señales de intensidad de fluorescencia altas a las longitudes de onda seleccionadas. Por esta razón, no fue posible observar si estos solventes fueron capaces de extraer al analito. También se probó CTAB, que es un tensioactivo catiónico. En este caso, no fue posible formar la capa de tensioactivo para separarla de la fase acuosa en las condiciones experimentales elegidas. Finalmente, se probaron SDS, un tensioactivo aniónico, y una mezcla de SDS y ([BMIm][BF₄]) en proporción 50/50 como posibles extractantes. El blanco de extracción para SDS resultó en señales de fluorescencia bajas. Por otro lado, el SDS presentó una mayor eficiencia de extracción que la mezcla SDS/([BMIm][BF₄]). Por esta razón, se eligió SDS como solvente de extracción. En la figura 3.7 se observan las señales obtenidas para los surfactantes probados.

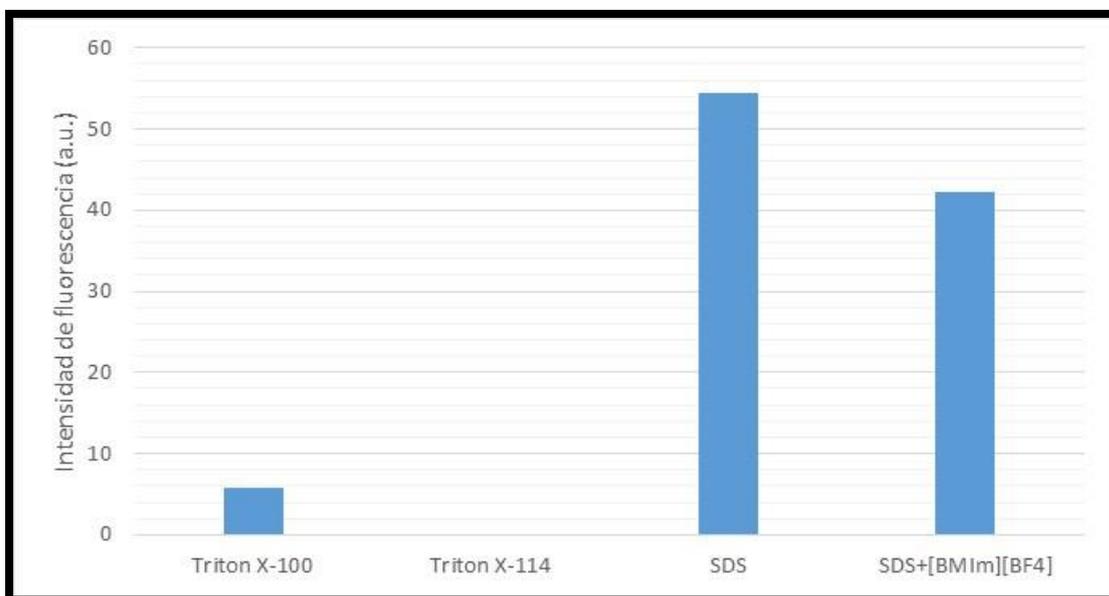


Fig 3.7 Diferentes tensioactivos probados utilizados para realizar la CAME-SFD de GLB. Los resultados se obtuvieron por triplicado. La intensidad de fluorescencia indicada en el gráfico corresponde a la diferencia entre la señal del blanco y la señal de la GLB. Concentración de GLB: 1,0 mg L⁻¹, λ_{ex} = 300 nm, λ_{em} = 400 nm.

3.4.1.3 Concentración de HCl

El uso de SDS como solvente de extracción llevó al uso de una alta concentración de HCl⁷⁶ ya que la fase de extracción se logró a un pH muy bajo (1,0). Se observó que concentraciones de HCl inferiores a 0,95 mol L⁻¹ resultaron en una fase de extracción indefinida, difícil de separar de la fase acuosa. Por lo tanto, considerando estos aspectos experimentales, se incluyeron en el diseño experimental concentraciones de HCl superiores a 0,95 mol L⁻¹ para su optimización.

3.4.1.4 Selección del co-solvente

En muchos casos, el empleo de los solventes orgánicos en las extracciones con surfactantes puede mejorar la eficiencia de extracción ya que reducen la rigidez de la interface entre el núcleo de agua y el tensioactivo⁷⁷. Por esta razón, se probaron octanol, metanol y acetonitrilo como co-solventes, y se comparó la señal obtenida luego de la extracción de la GLB sin adición y con adición de co-solventes (Figura 3.8). Cuando se añadió octanol a la solución de GLB con surfactante, no se formó la fase de tensioactivo. Por otro lado, no se observó un aumento significativo en la señal de fluorescencia cuando se llevó a cabo la extracción agregando a la fase acuosa acetonitrilo. Sin embargo, el uso de metanol en el procedimiento de extracción condujo a una señal de GLB más alta. Por lo tanto, se eligió el metanol como co-disolvente para mejorar la eficiencia de extracción, y el volumen agregado se incluyó como variable en el diseño experimental.

⁷⁶ Q. Xia, Y. Yang, M. Liu, Vortex-assisted acid-induced cloud point extraction coupled with spectrofluorometry for the determination of fluoroquinolones in environmental water samples. *Spectrosc. Lett.*, 47(3), 206-213, 2014.

⁷⁷ S.N. Mohamad-Aziz, A.W. Zularisam, A.M. Mimi Sakinah, Reverse micellar modified mixed anionic and zwitterionic surfactant system for antibiotic extraction, *Sep. Purif. Technol.* 229, 115816, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115816>.

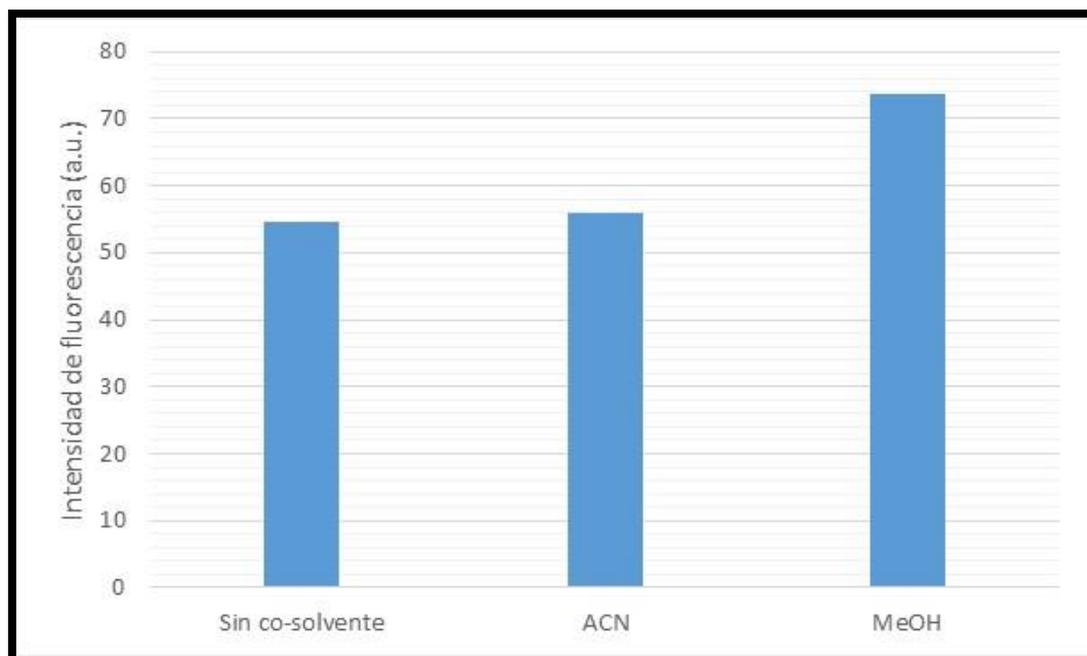


Fig 3.8 Señales de fluorescencia obtenida para la CAME-SFD de GLB sin la adición y luego de la adición de un co-solvente. Los resultados se obtuvieron por triplicado. La intensidad de fluorescencia indicada en el gráfico corresponde a la diferencia entre la señal del blanco y la señal de la GLB. Concentración de GLB: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 400 \text{ nm}$.

3.4.1.5 Adición de sal

Es bien sabido que el agregado de sales en la fase acuosa puede disminuir la solubilidad de los analitos y promover su distribución en la fase extractante (efecto “salting-out”)⁷⁸. Con este fin, se añadió una cantidad fija (0,15 g) de NaCl para probar la influencia de la adición de sal en la CAME de GLB. Se notó que la adición de sal fue necesaria para lograr la fase de extracción del surfactante en un período de tiempo más corto, disminuyendo el tiempo de extracción de 45 a 23 minutos. Esto probablemente se debió a una mejor interacción entre la molécula de GLB y la parte hidrofóbica de las micelas de SDS. En la figura 3.9 se puede observar que, luego de 23 minutos de extracción, no se obtiene señal de fluorescencia cuando no se agrega NaCl. Sin embargo, con el agregado de NaCl en la extracción, se

⁷⁸ T. Bedassa, N. Megersa, A. Gure, Salting-out assisted liquid-liquid extraction for the determination of multiresidue pesticides in alcoholic beverages by high performance liquid chromatography, *Sc. J. Anal. Chem.* 5, 38-45, 2017. <https://doi.org/10.11648/j.sjac.20170503.11>

observa una señal de fluorescencia comparable a la obtenida sin el agregado de sal luego de 45 minutos.

Por lo tanto, se probaron diferentes concentraciones de sal ($0,01-0,34 \text{ mol L}^{-1}$) y se observó un aumento de la señal de GLB y una mejor separación de fases a medida que se incrementó la concentración de sal, pero la señal se mantuvo constante después del agregado de una concentración de $0,17 \text{ mol L}^{-1}$ (500 mg) (Figura 3.9).

Algunos autores informaron que el MgSO_4 puede mejorar el efecto de salinización en una solución acuosa debido a su mayor fuerza iónica por unidad de concentración en comparación con otras sales, como el NaCl ⁷⁸. Por lo tanto, se incluyó MgSO_4 en el diseño experimental, con una concentración final de $0,17 \text{ mol L}^{-1}$.

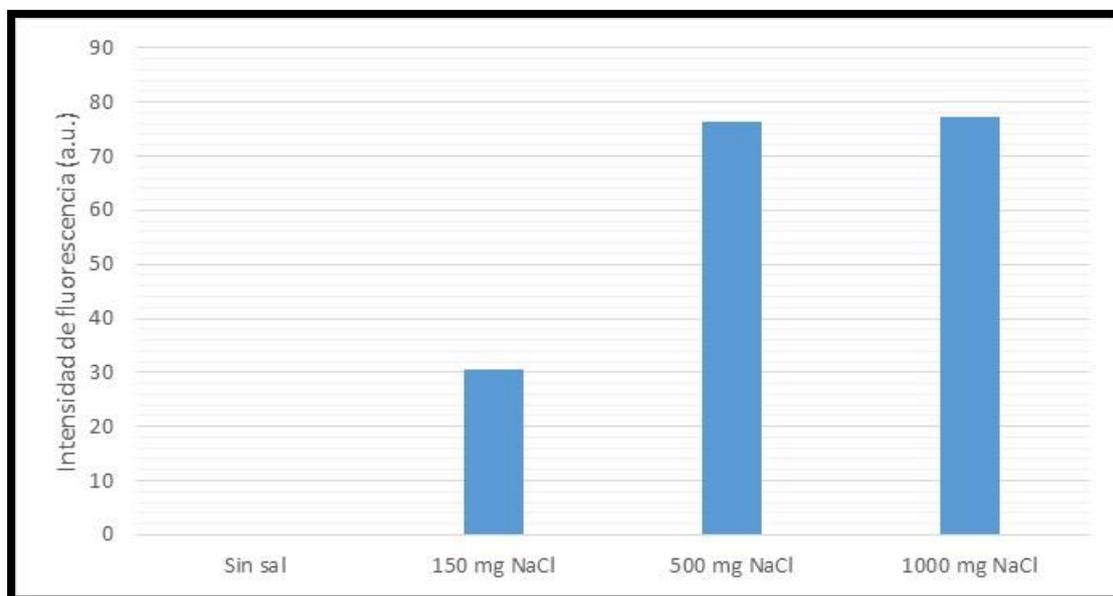


Fig 3.9 Señal de fluorescencia obtenida después de 23 minutos de extracción sin y con adición de NaCl. Los resultados se obtuvieron por triplicado. La intensidad de fluorescencia indicada en el gráfico corresponde a la diferencia entre la señal del blanco y la señal de la GLB. Concentración de GLB: $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, $\lambda_{\text{ex}}= 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}= 400 \text{ nm}$.

3.4.1.1 Prueba de estabilidad térmica

Se probó la estabilidad térmica de la GLB en las condiciones experimentales. Para ello, se preparó una solución de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ de GLB en $\text{HCl } 1,2 \text{ mol L}^{-1}$ y se calentó en un baño de agua a 100°C durante 23

minutos. Luego, la solución se dejó enfriar a temperatura ambiente y se realizó el espectro de absorción molecular entre 220 nm y 400 nm. El espectro obtenido se comparó con el espectro de la misma solución antes del calentamiento y no se observó variación, por lo que se pudo inferir que la GLB es estable en las condiciones de extracción (Figura 3.10).

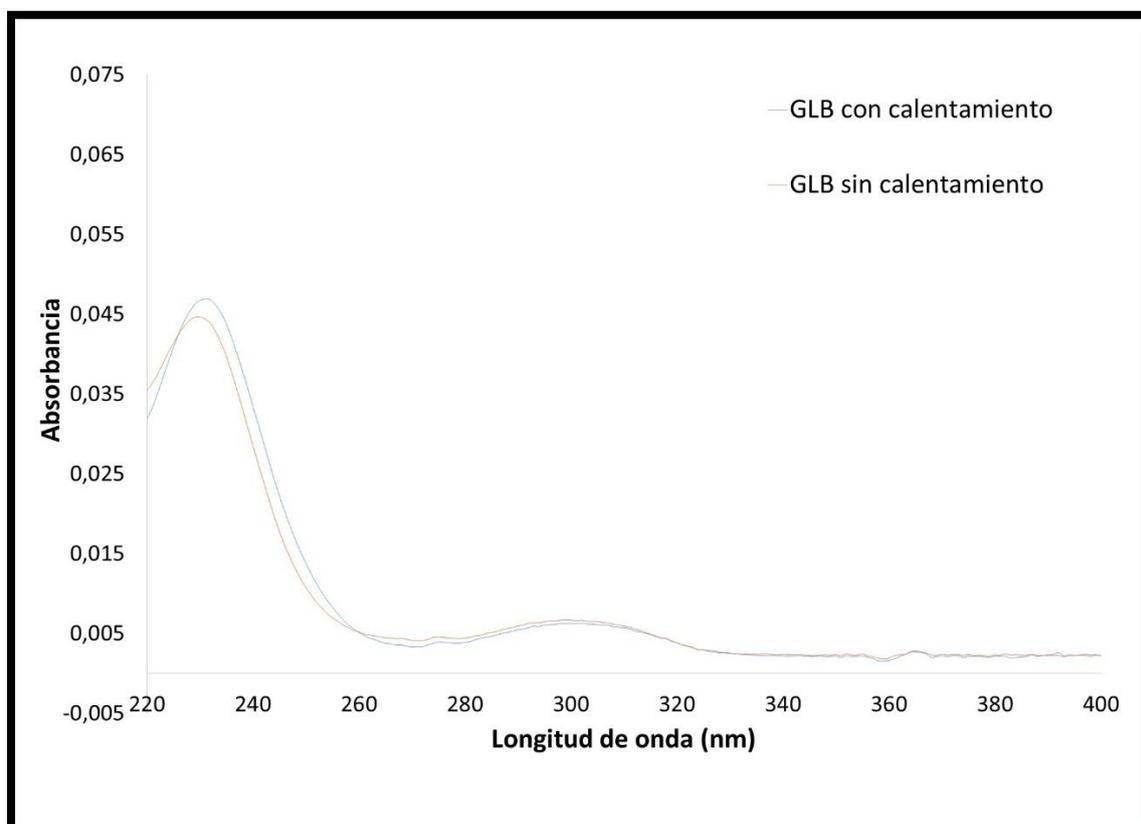


Fig 3.10 Espectros de una solución estándar de GLB antes y después de calentar en un baño de agua a 100°C durante 23 min.

3.4.2 Diseño experimental

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos preliminares, se evaluó el efecto de las cinco variables mencionadas anteriormente en el procedimiento de extracción mediante un diseño experimental Plackett-Burman. Se utilizó una prueba t para calcular la significación estadística de los efectos. Un factor se consideró significativo si $|E_x|$ (efecto sobre el factor X) fue mayor que el valor del efecto crítico, $E_{crítico}$: $|E_x| \geq E_{crítico} = t_{crítico}$. Los resultados demostraron que $E_{crítico} = 33,73$. En la Figura 3.11 se muestra el diagrama de Pareto. Teniendo en cuenta que, cuando la longitud de la barra no

supera la línea vertical de referencia (color azul en la figura), el efecto estimado no es significativo, se observa que ninguna de las variables fue significativa en el intervalo estudiado. Por lo tanto, el valor óptimo se seleccionó de acuerdo con la contribución de cada variable según los valores obtenidos a partir del diseño Plackett-Burman⁷⁹. Si el efecto de la variable fue positivo, se consideró óptimo el extremo del diseño (+1). Si el efecto fue negativo, se optó por el otro extremo (-1). La proximidad entre los niveles elegidos puede ser probablemente la razón de los efectos no significativos⁸⁰. Los valores óptimos para los diferentes factores calculados a partir del diseño fueron los siguientes: 800 μL de MeOH, 800 μL de una solución de SDS 0,80 mol L^{-1} (fase coacervativa: 400 mg), 0,17 mol L^{-1} de NaCl y 1,2 mol L^{-1} de HCl.

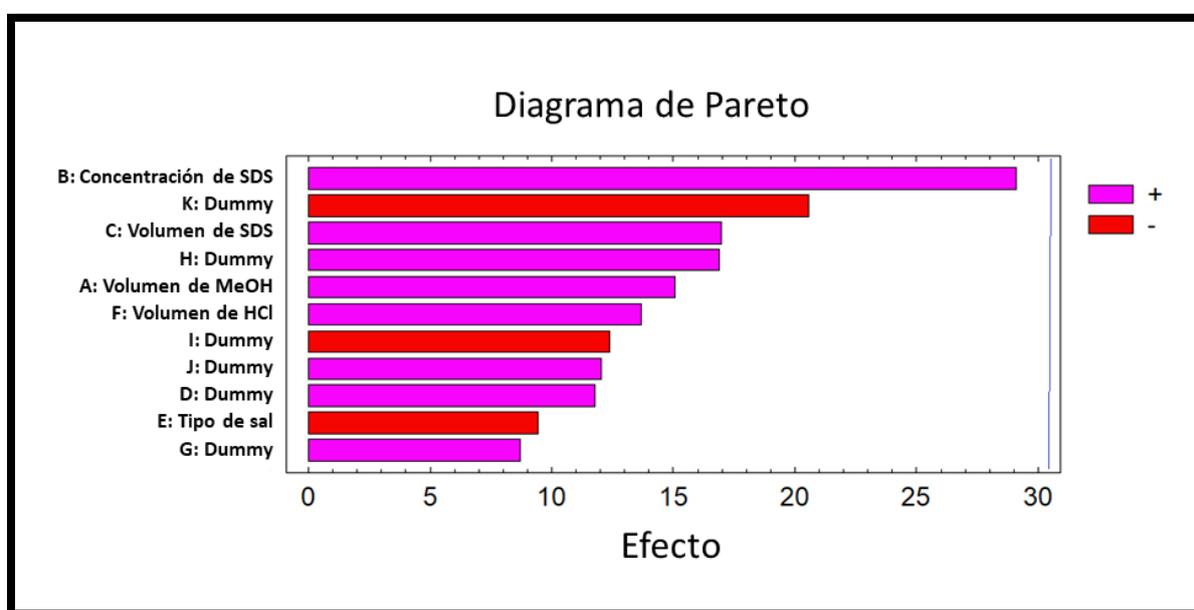


Fig 3.11 Diagrama de Pareto obtenido a partir del diseño Plackett-Burman.

⁷⁹ M. J. Mato-Fernández, J.R. Otero-Rey, J. Moreda-Pineiro, E. Alonso-Rodríguez, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, Arsenic extraction in marine biological materials using pressurised liquid extraction, *Talanta*, 71, 515-520, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.03.045>.

⁸⁰ E. Fernández, L. Vidal, A. Canals, Hydrophilic magnetic ionic liquid for magnetic headspace single-drop microextraction of chlorobenzenes prior to thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, 4679-4687, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0755-2>.

3.4.3 Parámetros analíticos del método propuesto

El método propuesto se evaluó en términos de selectividad, linealidad, límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), repetibilidad y precisión intermedia, calculadas como porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) (Tabla 3.2).

El gráfico de calibración se construyó en el intervalo entre 0,50 y 4,20 $\mu\text{g L}^{-1}$ y se obtuvo un excelente coeficiente de correlación con un valor superior a 0,99. El valor del LOD fue de 0,37 $\mu\text{g L}^{-1}$, calculado a partir de la recta de regresión, y el LOQ fue de 0,50 $\mu\text{g L}^{-1}$. La repetibilidad se evaluó mediante los valores de %RSD obtenidos al realizar la extracción de 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de solución de GLB, de forma sucesiva, cinco veces en un día. Para la precisión intermedia se empleó la misma concentración y se llevó a cabo la extracción por triplicado en 3 días consecutivos. Los valores %RSD obtenidos fueron de 1,0% y 3,4%, respectivamente, demostrando una alta precisión para el método propuesto.

La selectividad del método se estudió probando la intensidad de fluorescencia obtenida tras el proceso de extracción de algunos otros fármacos antidiabéticos, como metformina, glicazida y glimepirida. Para ello, se adicionó junto con la GLB una solución de 3,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada uno de los fármacos antes mencionados y se procedió a la extracción. La señal fluorescente obtenida después de la extracción no varió de la obtenida luego de la extracción de GLB sola, lo que demuestra que este método fue selectivo para GLB.

Tabla 3.2. Parámetros analíticos obtenidos para la determinación de GLB.

Ecuación de regresión	Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	LOD ² ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidad (RSD%) ³	Precisión intermedia (RSD%) ⁴
$y = 23,39^1 (\pm 1,08) x + 11,35 (\pm 2,89)$	0,50-4,25	0,994	0,37	0,50	1,0	3,4

¹ ($\mu\text{g L}^{-1}$)⁻¹; ²LOD calculado como $3s/A$, donde, s: desviación estándar, A: pendiente de la curva de calibración. ³ n=5, 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$; ⁴ 3,00 $\mu\text{g L}^{-1}$, medida realizada por triplicado por tres días.

3.4.4 Aplicación del método a muestras de agua superficial

Hay pocos estudios que investiguen la presencia de CECs, incluida la GLB, en América Latina. Por ejemplo, se han analizado diferentes muestras de agua de Brasil y México⁸¹. La GLB y la nimesulida fueron los productos farmacéuticos detectados con más frecuencia en Brasil, tanto en muestras de agua potable como superficiales⁸². También se ha encontrado GLB en efluentes de plantas de tratamientos de aguas y agua de varios ríos de la ciudad de Colima, México⁵⁷. Los estudios que evalúan la presencia de CECs en Argentina son escasos^{83 84}, y hasta la fecha ninguno ha evaluado la presencia de GLB. Teniendo en cuenta que, después de la metformina, la GLB es el hipoglucemiante más consumido en la Argentina para el tratamiento de la diabetes tipo 2⁸⁵, es de importancia su cuantificación.

En este trabajo, se analizaron cinco muestras de agua superficial para demostrar la aplicabilidad del método CAME-SFD. Aunque las muestras se recogieron de diferentes fuentes de agua potencialmente contaminadas, no se encontraron residuos de GLB en concentraciones superiores al LOD del método propuesto. Las muestras se enriquecieron según se indicó en la Sección 3.3.3 y se realizó el procedimiento de extracción. La Tabla 3.3 muestra las concentraciones añadidas y los porcentajes de recuperación calculados. Los valores de recuperación obtenidos oscilaron entre 92,6 % y 103,1 %, y fueron valores satisfactorios para la determinación del compuesto en estudio a niveles de trazas.

⁸¹ G. Reichert, S. Hilgert, S. Fuchs, J.C. Rodrigues Azevedo, Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America, *Environmental Pollution*, 255, 113-140, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113140>

⁸² S.S. Caldas, J.L. O. Arias, C. Rombaldi, L.L. Mello, M.B.R. Cerqueira, A.F. Martins, E.G. Primel, Occurrence of Pesticides and PPCPs in Surface and Drinking Water in Southern Brazil: Data on 4-Year Monitoring, *J. Braz. Chem. Soc.* 30, 71-80, 2019. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20180154>

⁸³ Y. Elorriaga, D.J. Marino, P. Carrquiriborde, A.E. Ronco, Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 397-400, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0919-x>

⁸⁴ P.M. Ondarza, S.P. Haddad, E. Avigliano, K.S.B. Miglioranza, B.W. Brooks, Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: Implications for protected areas influenced by urbanization, *Sci. Total Environ.* 649, 1029-1037, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.383>

⁸⁵ Antidiabéticos Orales: Evolución de la dispensación durante 2016, Confederación Farmacéutica Argentina (2017), <http://www.cofa.org.ar/?p=20847>.

Tabla 3.3. Determinación de GLB en muestras de agua superficial

Muestras de agua (Punto de muestreo)	Concentración de fortificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración determinada¹ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación² (%)
Arroyo Napostá (1)	1,00	0,97 \pm 0,09	97,6
	2,50	2,40 \pm 0,23	96,0
	3,50	3,28 \pm 0,28	93,6
Arroyo Napostá (2)	1,00	0,92 \pm 0,08	92,6
	2,50	2,57 \pm 0,20	102,7
	3,50	3,45 \pm 0,14	98,6
Arroyo Napostá (3)	1,00	1,02 \pm 0,07	101,9
	2,50	2,58 \pm 0,21	103,1
	3,50	3,54 \pm 0,19	101,2
Arroyo Sauce Chico (4)	1,00	0,93 \pm 0,07	93,1
	2,50	2,58 \pm 0,15	103,1
	3,50	3,47 \pm 0,17	99,1
Río Negro (5)	1,00	0,94 \pm 0,04	94,0
	2,50	2,36 \pm 0,12	94,5
	3,50	3,44 \pm 0,19	98,4

¹ Las muestras fueron analizadas por triplicado. n=3

El efecto matriz se evaluó comparando la pendiente de la gráfica de calibración construida con las soluciones estándar, y la pendiente obtenida con las muestras enriquecidas a los mismos niveles de concentración⁸⁶. No hubo diferencia significativa entre las pendientes para el nivel de probabilidad elegido ($p > 0,1$), lo que significa que no hubo efecto de matriz presente.

La Tabla 3.4 muestra los diferentes métodos de LPME que se han propuesto para la extracción de GLB en diferentes muestras, comparados en términos de la técnica de detección, LOD, valores de %RSD y parámetros de extracción. El método CAME-SFD propone el empleo de un nuevo extractante como

⁸⁶ D. L. Massart. Handbook of Chemometrics and Qualimetrics. 1st ed. Elsevier Science; 1997.

una alternativa ecológica a algunos disolventes orgánicos tóxicos, como el diclorometano o el acetato de etilo utilizados en métodos anteriores. Además, la mayoría de los métodos de extracción encontrados en la literatura se basan en una determinación cromatográfica con diferentes técnicas de detección, como absorción molecular UV-Vis o MS, lo que implica un aumento en el uso de solventes orgánicos. El método CAME-SFD propone el uso de un instrumento más sencillo con un menor costo de mantenimiento, como es un espectrofluorímetro. Además, el LOD obtenido fue menor o similar en comparación con los métodos encontrados. Asimismo, el método CAME-SFD presenta valores de %RSD inferiores a los métodos encontrados en la literatura, demostrando una precisión satisfactoria.

Tabla 3.4. Comparación de diferentes métodos de LPME de GLB en muestra ambientales.

Método de extracción	Muestra	Técnica de detección	Volumen de muestra (mL)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Solvente de extracción	Solvente dispersivo	Ref.
IL-DLLME	Agua	LC-MS/MS	10	0,80	2,0-8,0	100 μL [C ₆ MIM][PF ₆]	500 μL MeOH	60
DLLME-SFO	Agua	LC-MS/MS	10	0,03	3,0-11,0	100 μL 1-dodecanol	500 μL MeOH	59
SD-DLLME	Agua	LC-MS/MS	10	0,25	9,0-18,0	120 μL 1-octanol	750 μL acetona	61
CAME	Agua	Fluorescencia molecular	43	0,37	1,0-3,4	400 mg SDS	-	Este trabajo

IL- DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva con líquidos iónicos; DLLME-SFO: Microextracción líquido-líquido dispersiva con solidificación de gota flotante; LLME: Microextracción líquido-líquido; LLE: Extracción líquido-líquido

3.5 CONCLUSIÓN

El método propuesto combina la microextracción CAE con SFD y detección por fluorescencia y se ha aplicado con éxito para la extracción y determinación de GLB en muestras de aguas naturales. Los parámetros más importantes involucrados en la extracción han sido evaluados y optimizados utilizando un diseño de Plackett-Burman. Esta es la primera vez que se utiliza una solución de SDS como solvente de extracción para la preconcentración y determinación de GLB, con su posterior solidificación con el fin de simplificar el método y minimizar los errores cuando el surfactante se separa de la fase acuosa. Este método es rápido, simple, proporciona altas recuperaciones, buena reproducibilidad y es amigable con el ambiente, ya que el volumen total de solventes orgánicos utilizados fue muy bajo. Además, como este método implica una determinación fluorimétrica, no es costoso y puede realizarse en cualquier laboratorio de rutina.

CAPÍTULO 4

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EMPLEANDO NANOPARTÍCULAS A BASE DE CARBONO

4.1 INTRODUCCIÓN

En este capítulo se emplearon diferentes nanopartículas a base de carbono para la extracción y preconcentración de fármacos de muestras ambientales. Se desarrollaron tres métodos de SPE empleando nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados (ox-MWCNTs) y grafeno (G), empacados en columnas de extracción o en forma de films. A continuación, se realiza un breve repaso de algunos conceptos teóricos.

4.1.1 Extracción SPE con nanopartículas a base de carbono

En los últimos años, el uso de materiales nanoestructurados en la química analítica ha tenido un gran impacto, permitiendo el desarrollo de nuevos y mejores métodos de análisis. Las propiedades únicas de las nanopartículas (NPs) han permitido, por ejemplo, mejorar la sensibilidad y/o selectividad de los métodos; y al mismo tiempo, facilitar la miniaturización del proceso analítico⁸⁷. Es por este motivo que las NPs presentan un gran potencial como adsorbentes, filtros o como fases pseudoestacionarias en el tratamiento de la muestra⁸⁷.

Las NPs se pueden clasificar según sus propiedades y según el tipo de materiales que las constituyen, siendo esta última la forma más convencional de clasificarlas. En este sentido, se pueden clasificar en NPs inorgánicas y orgánicas. Las NPs inorgánicas incluyen las NPs basadas en carbono, NPs de óxido de metal, NPs semiconductoras, entre otras; mientras que las NPs orgánicas se pueden clasificar en NPs poliméricas y NPs derivadas de biomoléculas⁸⁸. Dentro de las NPs inorgánicas, las NPs basadas en carbono han sido ampliamente utilizadas en muchas aplicaciones científicas y tecnológicas debido a sus inherentes propiedades físicas y químicas, buena biocompatibilidad, baja toxicidad y bajo costo, así como rutas de síntesis relativamente ecológicas⁸⁸. Particularmente, es de relevancia la aplicación de las mismas en técnicas de extracción y preconcentración debido a su excelentes capacidades como

⁸⁷ C.C. Acebal, B.M. Simonet, M. Valcárcel, Nanoparticles and continuous-flow systems combine synergistically for preconcentration, *Trends Anal. Chem.*, 43, 109-120, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.013>

⁸⁸ M. Sajid, J. Płotka-Wasyłka, Nanoparticles: Synthesis, characteristics, and applications in analytical and other sciences. *Microchem. J.*, 154, 104623, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104623>.

adsorbentes⁸⁹. Un ejemplo de NPs a base de carbono son los nanotubos de carbono (CNTs), una forma alotrópica del carbono consistente en una o varias láminas de grafeno. Los nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) están constituidos por una única lamina de grafeno enrollada sobre sí misma, mientras que los MWCNTs consisten en dos o más láminas de grafeno organizadas coaxialmente alrededor de un núcleo central, unidas por fuerzas de Van der Waals⁸⁹. Los CNTs, además de ser hidrofóbicos, establecen interacciones del tipo π - π con los compuestos de interés⁸⁷. Otra característica importante de los CNTs es tener un área superficial específica que puede alcanzar valores mayores a $3000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, lo que implica un aumento de la capacidad de adsorción, superior a la de otros materiales⁹⁰. Debido a que su proceso de síntesis es más sencillo y a una mejor interacción con los analitos, se prefiere los MWCNTs sobre los SWCNTs como adsorbentes en procedimientos de SPE.

El empaquetamiento de columnas de SPE con CNTs puede presentar algunos problemas como la compactación de los mismos, lo cual afecta el rendimiento del proceso de adsorción y, por lo tanto, limita su implementación como adsorbente⁹⁰. Este inconveniente ha dado lugar a diferentes alternativas que evitan la aglomeración del material y permiten aprovechar su potencial de adsorción. Una alternativa interesante, es la funcionalización de los CNTs con grupos orgánicos e inorgánicos, convirtiéndolos en adsorbentes muy útiles para el tratamiento de muestras. Particularmente, la funcionalización de la superficie de los CNTs a través de un tratamiento oxidativo ácido, que da lugar a CNTs oxidados, genera una cantidad mayor de grupos funcionales oxigenados y una estructura superficial más hidrófila⁹¹. Esta hidrofiliadad hace que los ox-CNTs sean adecuados para la adsorción de compuestos moderadamente polares y polares⁹¹.

El G ha demostrado tener muchas potenciales aplicaciones en un gran número de campos debido a su estructura planar única, su gran área específica y su sistema conjugado de electrones π . La

⁸⁹ Z. A. AlOthman, S. M. Wabaidur, Application of carbon nanotubes in extraction and chromatographic analysis: a review. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(5), 633-651, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2018.05.012>

⁹⁰ J. Ding, Q. Gao, X. Li, W. Huang, Z. Shi, Y. Feng, Magnetic solid-phase extraction based on magnetic carbon nanotube for the determination of estrogens in milk, *J. Sep. Sci.*, 34, 2498–2504, 2011. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100323>

⁹¹ C. C. Acebal, M. Grünhut, N. E. Llamas, M. Insausti, L. Zelená, H. Sklenářová, P. Solich, B. S. Fernández Band, *Microchem. J.*, 129, 90–97, 2016.

deslocalización de los electrones π en la superficie de las láminas de G es capaz de generar interacciones π - π con los compuestos aromáticos⁹². Tanto el G como el GO se pueden modificar con diversos materiales resultando en nuevos nanocompuestos con mayores ventajas, como el incremento en la capacidad de adsorción, mejores características mecánicas y de manipulación y, en algunos casos, alta selectividad⁹³.

El G y los materiales a base de G han sido utilizados como adsorbentes en varias aplicaciones ambientales como por ejemplo, para la extracción de diclofenac en muestras de agua y efluentes⁹⁴, de iones de metales pesados en muestras de aguas⁹⁵ y de atrazina de muestras de aguas naturales⁹⁶, entre otros⁹³.

4.1.2 Empleo de biopolímeros en técnicas de extracción en fase sólida

En los últimos años, uno de los desafíos de la Química Analítica ha sido la extracción y cuantificación de los analitos presentes en matrices complejas o de composición variable. Por ello, el desarrollo de nuevos y mejores materiales con mayor capacidad de extracción y estabilidad mecánica o fisicoquímica mejorada, en comparación con los adsorbentes tradicionales, es de gran interés³⁷.

Por otro lado, en concordancia con los principios de la Química Analítica amigable con el ambiente, existe una tendencia significativa a mejorar la sustentabilidad del proceso de preparación de

⁹² X. Li, S. Li, J. Bai, Y. Peng, B. Ning, H. Shi, W. Kang, H. Zhou, Z. Gao, Determination of Bisphenol A by High-Performance Liquid Chromatography Based on Graphene Magnetic Dispersion Solid Phase Extraction, *J. Chromatogr. Sci.*, 00, 1-7, 2019. doi: 10.1093/chromsci/bmz103

⁹³ T. Huang, X. Tang, K. Luo, Y. Wu, X. Hou, S. Tang, An overview of graphene-based nanoadsorbent materials for environmental contaminants detection. *Trends Anal. Chem.*, 139, 116255, 2021. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2021.116255>.

⁹⁴ R. de Souza Gomes, A. Thesing, J. Ferreira Leite Santos, A. Neves Fernandes, Self-supported 3D reduced graphene oxide for solid-phase extraction: An efficient and low-cost sorbent for environmental contaminants in aqueous solution *Talanta*, 235, 122750, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122750>.

⁹⁵ L. Suo, X. Dong, X. Gao, J. Xu, Z. Huang, J. Ye, X. Lu, L. Zhao, Silica-coated magnetic graphene oxide nanocomposite based magnetic solid phase extraction of trace amounts of heavy metals in water samples prior to determination by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Microchem. J.*, 149, 104039, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104039>.

⁹⁶ X. Zhang, X. Ma, X. Li, Development of Ultra-sensitive Method for Determination of Trace Atrazine Herbicide in Environmental Water Using Magnetic Graphene Oxide-Based Solid-Phase Extraction Coupled with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Prior to Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Water Air Soil Pollut* 229, 270 (2018). <https://doi.org/10.1007/s11270-018-3930-y>

muestras⁹⁷. Por esta razón, se ha puesto especial atención al desarrollo de nuevos adsorbentes más ecológicos, biodegradables y biocompatibles⁹⁸. En particular, los biopolímeros que se obtienen a partir de macromoléculas biológicas, como el quitosano, la celulosa o la agarosa, han sido utilizados para reemplazar a los adsorbentes sintetizados químicamente (Figura 4.1). Estos materiales presentan la ventaja de ser renovables, biodegradables y no tóxicos⁹⁹.

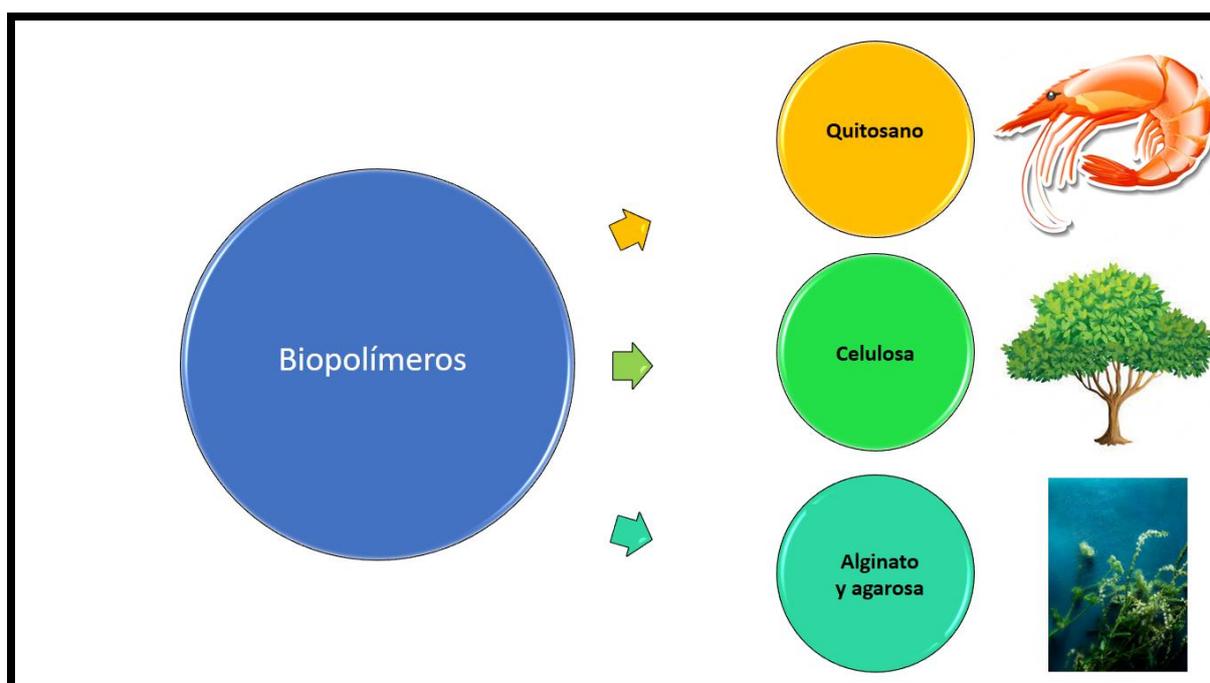


Fig 4.1 Biopolímeros que se obtienen a partir de distintas fuentes naturales. Adaptado de referencia 98.

El uso de biopolímeros en técnicas de SPE se ha incrementado en los últimos años, siendo utilizados en diferentes formatos, tales como partículas esféricas, geles y films o membranas¹⁰⁰. Es importante destacar que, a pesar de ser materiales versátiles, han sido empleados principalmente en combinación

⁹⁷ S. Armenta, S. Garrigues, F. A. Esteve-Turrillas, M. de la Guardia, Green extraction techniques in green analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.*, 116, 248-253, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>

⁹⁸ S. Abbasi, S. A. Haeri, Biodegradable materials and their applications in sample preparation techniques—A review. *Microchem. J.*, 171, 106831, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106831>

⁹⁹ H. Tabani, M. Alexovič, J. Sabo, M. R. Payán, An overview on the recent applications of agarose as a green biopolymer in micro-extraction-based sample preparation techniques. *Talanta*, 224, 121892, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121892>

¹⁰⁰ N. H. Godage, E. Gionfriddo, E., Use of natural sorbents as alternative and green extractive materials: A critical review. *Anal. Chim. Acta*, 1125, 187-200, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2020.05.045>

con otros materiales funcionales, ya sea para incrementar la eficiencia de extracción o como soporte de los mismos¹⁰¹.

La agarosa es un polímero natural obtenido a partir de algas formado por unidades repetidas de 1,3-β-D-galactosa y 3,6-anhidro-α-L-galactosa^{102 103}. Se considera un material sustentable por su naturaleza biodegradable¹⁰⁴ y su capacidad gelificante que facilita la obtención de films. Además, la estructura de gel de la agarosa puede modificarse convenientemente añadiendo diferentes materiales mientras se produce el proceso de gelificación, lo que da lugar a la obtención de materiales híbridos que resultan de interés para procesos de extracción⁹⁹. En este sentido, la agarosa ha sido combinada con adsorbentes como los MWCNTs y C18 para realizar la extracción de diferentes contaminantes de muestras de agua y algunas bebidas^{104 105 106 107}.

4.1.3 Automatización en química analítica

El fin fundamental de la química analítica es la resolución de problemas analíticos, que satisfagan las necesidades socio-económicas, proporcionando información de calidad. En este sentido,

¹⁰¹ I. Pacheco-Fernández, D. W. Allgaier-Díaz, G. Mastellone, C. Cagliero, D. D. Díaz and V. Pino, Biopolymers in sorbent-based microextraction methods, Trends. Anal. Chem., 125,115839, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115839>

¹⁰² M. N. H. Rozaini, N. F. Semail, B. Saad, S. Kamaruzaman, W. N. Abdullah, N. A. Rahim and N. Yahaya, Molecularly imprinted silica gel incorporated with agarose polymer matrix as mixed matrix membrane for separation and preconcentration of sulfonamide antibiotics in water samples, Talanta, 199, 522-531, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.096>

¹⁰³ M. K. Yazdi, A. Taghizadeh, M. Taghizadeh, F. J. Stadler, M. Farokhi, F. Mottaghitalab, P. Zarrintaj, J. D. Ramsey, F. Seidi, M. R. Saeb, M. Mozafari, Agarose-based biomaterials for advanced drug delivery, J. Control Release, 326, 523-543, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.07.028>.

¹⁰⁴ S. Hong Loh, M. Marsin Sanagi, W. Aini Wan Ibrahim, M. Noor Hasan, Multi-walled carbon nanotube-impregnated agarose film microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in green tea beverage, Talanta, 106, 200-205, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2012.12.032>

¹⁰⁵ S. Hong Loh, P. Ee Neoh, C. Tung Tai and S. Kamaruzaman, Simple μ-solid phase extraction using C18 film for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in coffee beverage, Malay. J. Anal. Sci., 22, 1-7, 2018. <https://doi.org/10.17576/mjas-2018-2201-01>

¹⁰⁶ M. Marsin Sanagi, M. Nazirul Muzakkir Mat Jais, S. Kamaruzaman, W. Aini Wan Ibrahim and U. Baig, Multi-walled carbon nanotubes-agarose gel micro-solid phase extraction for the determination of triazine herbicides in water samples, Anal. Methods, 2015, 7, 2862-2868. <https://doi.org/10.1039/C4AY03033H>

¹⁰⁷ N. T. Ng, M. M. Sanagi, W. N. W. Ibrahim and W. A. W. Ibrahim, Agarose-chitosan-C₁₈ film micro-solid phase extraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of phenanthrene and pyrene in chrysanthemum tea samples, Food Chem., 2017, 222, 28-34. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.147>

podemos definir ciertos objetivos conducentes al desarrollo de nuevos métodos analíticos que provean información química de calidad pero que a su vez minimicen la cantidad de materiales (reactivos, muestras, equipamientos, etc.), tiempo, esfuerzos, costos y riesgos posibles (Figura 4.2)¹⁰⁸.



Fig 4.2 Finalidad y objetivos de la química analítica. Adaptado de referencia 108.

Una de las estrategias de la Química Analítica amigable con el ambiente consiste en la miniaturización y automatización del proceso analítico o de alguna(s) de sus etapas⁹⁷.

Dentro de los beneficios de la miniaturización y automatización se destaca la disminución del consumo de reactivos, disolventes y muestras, reduciendo también drásticamente la generación de residuos; la rapidez del análisis, lo que resulta en el incremento de la frecuencia de muestreo; y la minimización de la manipulación de la muestra, evitando así la contaminación o alteración de la misma. También se pueden mencionar como ventajas, la simplificación del proceso analítico y la posibilidad de realizar medidas in-situ; pero sobre todo, se destaca un incremento de la reproducibilidad y repetibilidad de los resultados obtenidos, ya que se minimiza la participación humana y, de esta manera, los errores

¹⁰⁸ M. Valcárcel, Principios de Química Analítica, Springer-Verlag Ibérica, 1999

derivados de la misma¹⁰⁹. Además, la automatización también resulta de especial interés cuando se debe tratar con muestras o reactivos peligrosos o tóxicos, tales como muestras radioactivas o sustancias carcinogénicas, ya que se reduce la exposición y, por lo tanto, la seguridad del analista también se ve mejorada.

Para lograr la automatización del proceso analítico o de alguna de sus etapas, se han desarrollado diferentes técnicas de análisis en flujo como Análisis por Inyección en Flujo (FIA), Análisis por Inyección Secuencial (SIA), Análisis en flujo multiconmutado (MCFIA), Análisis Flow-Batch (FBA), entre otras¹¹⁰.

En particular, en esta tesis se empleó la técnica FIA, que se basa en la inyección de la muestra en una corriente portadora que fluye continuamente a un caudal constante¹¹¹. Durante su transporte, la zona de muestra se dispersa gradualmente a medida que se mueve a través del sistema en condiciones de flujo laminar¹¹². La muestra es propulsada hacia el detector y se registra la señal en función del tiempo de análisis. La altura del pico obtenido se utiliza para cuantificar el analito¹¹². En el camino de la muestra hacia el detector, se pueden incorporar diversos reactivos, ya sea en el canal de la corriente portadora o en canales auxiliares que confluyen con el mismo. Por último, una vez que se lleva a cabo la detección, la muestra y los reactivos son enviados al desecho. Este procedimiento, que incluye la inyección de la muestra, el transporte, la reacción y detección, se puede realizar en un tiempo relativamente corto.

Un sistema FIA básico, como el que se muestra en la Figura 4.3, está compuesto por una bomba peristáltica (BP) conectada a una válvula de inyección (VI). Para propulsar las disoluciones de los reactivos y de la muestra en el sistema se emplean tubos de Tygon® u otro material (dependiendo de la aplicación) de diferentes diámetros internos. Las líneas de conexión en el sistema son de

¹⁰⁹ V. Cerdà, L. Ferrer, J. Avivar, A. Cerdà, *Flow Analysis. A Practical Guide* (2014).

¹¹⁰ B. Horstkotte, M. Miró, P. Solich, Where are modern flow techniques heading to?, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410, 6361-6370, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1285-2>

¹¹¹ <http://www.flowinjection.com/tutorials/principles>

¹¹² M. Valcárcel, S. Cárdenas, Vanguard-rearguard analytical strategies. *Trends Anal. Chem.*, 24, 67-74, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.07.016>

politetrafluoroetileno (PTFE). Para realizar la detección en continuo, se emplean celdas de flujo, que se colocan en el portacelda del instrumento.

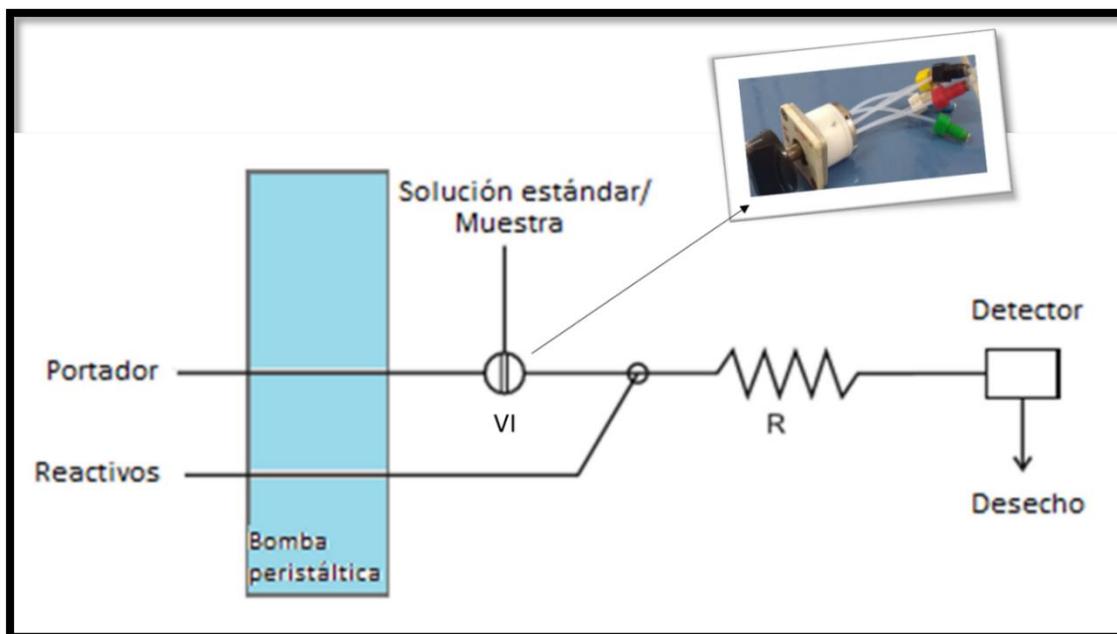


Fig 4.3 Componentes básicos de un sistema FIA. VI válvula de inyección. R: reactor

En particular, la automatización del procedimiento de SPE representa un beneficio considerable que se materializa en la simplificación de los diferentes pasos del mismo, una alta reproducibilidad de los resultados y un aumento de la frecuencia de muestreo. También implica la minimización de la manipulación de la muestra, lo que evita su contaminación o alteración, y la reducción del consumo de reactivos y de la muestra^{112 113}

¹¹³ Cerdà V, Ferrer L, Avivar J, Cerdà A (2014) A. Flow Analysis. A Practical Guide. 1st ed. Elsevier Science

4.2 Objetivo

Desarrollar nuevos métodos analíticos para la extracción y preconcentración de fármacos en muestras ambientales mediante técnicas de extracción en fase sólida, empleando como adsorbentes NPs a base de carbono.

4.3 Empleo de nanotubos de carbono oxidados como adsorbente para la extracción en fase sólida de progestinas de muestras ambientales

4.3.1 INTRODUCCIÓN

Dentro de los CECs se encuentran las hormonas esteroideas (HEs), como los estrógenos y los progestágenos, que forman parte de las píldoras anticonceptivas y se utilizan en tratamientos de fertilidad¹¹⁴. En los últimos años, ha habido un incremento considerable en el consumo de HEs en la medicina humana (principalmente como anticonceptivos) y veterinaria¹¹⁵. Su presencia en medios acuáticos es debida a la descarga directa de efluentes y de aguas residuales domésticas. Además, hay que tener en cuenta, como se mencionó anteriormente, que las plantas de tratamiento de agua convencionales no están diseñadas para la remoción ni degradación de este tipo de compuestos¹¹⁶. En consecuencia, los efluentes de estas plantas pueden contener fracciones significativas de estas hormonas que son descargadas y acumuladas en el ambiente¹¹⁷.

Las HEs, así como también algunos otros CECs, pueden actuar como disruptores endócrinos y afectar el equilibrio hormonal de los organismos de muchas especies incluyendo al ser humano. Estas sustancias son capaces de interrumpir los procesos fisiológicos controlados por hormonas aún en muy bajas concentraciones. Es decir, pueden modificar la biosíntesis, transporte y metabolismo de los esteroides sexuales^{118 119}, provocando alteraciones importantes en numerosas especies de peces,

¹¹⁴ C. Payus, A. O. Payus, M. P. Yan, Steroid hormones assay on estrogen and progesterone group occurrences fate and pathway distributions in river and coastal environment. *Journal of Sustainability Science and Management*, 16(3), 103-115, 2021. <http://dx.doi.org/http://doi.org/10.46754/jssm.2021.04.009>.

¹¹⁵ H. Tomsíková, J. Aulfartová, P. Solich, Z. Sosa-Ferrera, J. J. Santana-Rodríguez, L. Nováková, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 34, (2012).

¹¹⁶ B. Almazrouei, D. Islayem, F. Alskafi, M. K. Catacutan, R. Amna, S. Nasrat, I. Yildiz, Steroid hormones in wastewater: Sources, treatments, environmental risks, and regulations. *Emerging Contaminants*, 9(2), 100210, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2023.100210>

¹¹⁷ I. M. Ramírez-Sánchez, P. Martínez-Austria, M. A. Quiroz-Alfaro, E. R. Bandala, *Tecnología y ciencia del agua*, vol. VI, núm. 5, 31-42, 2015

¹¹⁸ L. Yang, T. Luan, C. Lan, Solid-phase microextraction with on-fiber silylation for simultaneous determinations of endocrine disrupting chemicals and steroid hormones by gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1104, 23-32, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.108>

¹¹⁹ H. Scaglia, C. Chichizola, M. C. Franconi, B. Ludueña, C. Mastandrea, J. Scaglia, *Disruptores endócrinos. Composición química, mecanismo de acción y efecto sobre el eje reproductivo*, Reproducción 24, 74-86, 2009.

invertebrados y mamíferos⁴⁴. Además, las HEs pueden tener un efecto tóxico sobre algunas especies vegetales, específicamente sobre la raíz, inhibiendo la división celular⁴². En humanos, las concentraciones no fisiológicas de estrógenos pueden incrementar el riesgo de cáncer mamario, uterino y testicular¹²⁰.

Los progestágenos son lípidos de bajo peso molecular, biológicamente activos y sintetizados a partir del colesterol. Estos pueden ser clasificados en sintéticos (progestinas) o naturales. Dentro del primer grupo se encuentran, por ejemplo, la noretisterona (NET), el levonorgestrel (LV) y la medroxiprogesterona (MPG); y en el segundo, la progesterona (PRO)¹²¹.

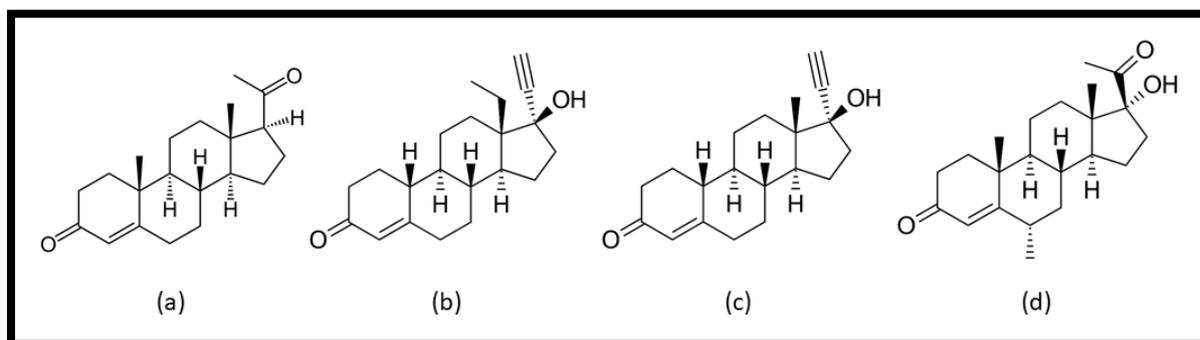


Fig 4.4 Estructura química de la progesterona y las progestinas en estudio. (a) PRO; (b) LV; (c) MPG; y (d) NET.

Recientemente, se ha puesto especial interés en conocer la ecotoxicidad de los progestágenos, ya que tienen una actividad endocrina similar al etinilestradiol o la trembolona, y se encuentran entre el grupo de fármacos de mayor preocupación ambiental¹²².

Sin embargo, la mayoría de los artículos científicos se han centrado en la determinación de estrógenos y muy pocos se han interesado por los progestágenos, cuya determinación es igualmente importante

¹²⁰ A. Azzouz, S. K. Kailasa, P. Kumar, E. Ballesteros, K. H. Kim, Advances in functional nanomaterial-based electrochemical techniques for screening of endocrine disrupting chemicals in various sample matrices. Trends Anal. Chem., 113, 256-279, 2019. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2019.02.017>

¹²¹ A. E. Schindler, C. Campagnoli, R. Druckmann, J. Huber, J. R. Pasqualini, K. W. Schweppe, J. H. H. Thijssen, Classification and pharmacology of progestins, Maturitas 46S1, S7-S16, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2003.09.014>

¹²² K. Fent, Progestins as endocrine disrupters in aquatic ecosystems: Concentrations, effects and risk assessment, Environ. Int., 84, 115-130, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.06.012>

por los efectos que su presencia puede tener en el ecosistema. Por esta razón, el desarrollo de métodos analíticos para la extracción y determinación de estos compuestos es relevante¹²³.

En bibliografía, se pueden encontrar diferentes métodos desarrollados para la cuantificación de progesterona y progestinas. Por ejemplo, la extracción de acetato de megestrol y LV de muestras biológicas y de aguas residuales se realizó utilizando nanopartículas magnéticas de Fe₃O₄ recubiertas de polipirrol¹²⁴. Por otro lado, Es'haghi et al. propusieron un nuevo nanocompuesto de magnetita de Fe₃O₄/poli(ε-caprolactona) (PCL) que se usó como adsorbente para la detección de PRO en muestras ambientales¹²⁵. La PRO también ha sido extraída de muestras de agua mediante el uso de nanoestructuras metal-orgánicas (MOFs)¹²⁶.

Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue la extracción y determinación simultánea de tres progestinas sintéticas de uso masivo: LV, MPG y NET, utilizando ox-MWCNTs como adsorbente.

4.3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.3.2.1 Preparación de soluciones e instrumentación

El LV y el acetato de NET se adquirieron de Sigma-Aldrich, (Alemania). El acetato de MPG fue suministrado por Parafarm (Argentina). Se preparó una solución patrón de 200 mg L⁻¹ de cada analito en MeOH (≥99 %, Sigma-Aldrich, Alemania) y se almacenó en botellas oscuras a 4 °C. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante una dilución adecuada de las soluciones patrón con HCl pH 2,8. El ACN (≥99 %) se adquirió en Merck (Alemania). Se prepararon 50,0 mL de una solución

¹²³ H. Tomsíková, J. Aupartová, P. Solich, Z. Sosa-Ferrera, J. J. Santana-Rodríguez, L. Nováková, High-sensitivity analysis of female-steroid hormones in environmental samples. *Trends Anal. Chem.*, 34, 35-58, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.11.008>

¹²⁴ B. Ebrahimpour, Y. Yamini, S. Seidi, M. Tajik, Nano polypyrrole-coated magnetic solid phase extraction followed by dispersive liquid phase microextraction for trace determination of megestrol acetate and levonorgestrel. *Anal. Chim. Acta*, 885, 98-105, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.05.025>

¹²⁵ Z. Es'haghi, A. Nezhadali, A. D. Khatibi, Magnetically responsive polycaprolactone nanoparticles for progesterone screening in biological and environmental samples using gas chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, 408, 37-49, 2016. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-016-9650-5>

¹²⁶ L. Li, Y. Chen, Y. Yang, Y. Yang, L. Yang, Z. Wang, Rapid and sensitive analysis of progesterone by solid-phase extraction with amino-functionalized metal-organic frameworks coupled to direct analysis in real-time mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 412, 2939-2947, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02535-6>

1,0 mol L⁻¹ de NaOH (Merck, Alemania) disolviendo una cantidad adecuada del reactivo sólido en agua destilada. Se prepararon 50,0 mL de una solución de HCl 1,0 mol L⁻¹ diluyendo el volumen apropiado de HCl al 37 % (m/m) (Merck, Alemania) con agua destilada. Los MWCNTs (diámetro externo promedio entre 13 y 16 nm y pureza >95 %) fueron adquiridos en Bayer® (Alemania). Los ox-MWCNT se sintetizaron en nuestro laboratorio según se encuentra informado en la literatura¹²⁷. Los ácidos nítrico y sulfúrico para la síntesis de ox-MWCNTs se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Alemania). El adsorbente C18 Polygoprep 60-80 con un tamaño de partícula de 63–100 µm se adquirió en Macherey-Nagel (Alemania). Las muestras se filtraron con papel de filtro cualitativo Microclar (Argentina)

El sistema FIA consistió en una BP (Gilson® Minipuls 3, Estados Unidos,) utilizada para impulsar los fluidos. Además, el sistema consta de una VI Rheodyne 5041 de cuatro vías y una válvula de selección (VS) Rheodyne 5011 de seis vías, ambas adquiridas en Sigma Aldrich, Alemania. Se utilizaron tubos Tygon® MHLL, para solventes orgánicos, (Ismatec, Alemania, 1,14 mm de d.i.) en todos los canales de bombeo. Las conexiones del sistema fueron de PTFE (Omnifit, Inglaterra, 0,8 mm de d.i.).

El análisis de HPLC se realizó en un cromatógrafo Thermo Scientific-UltiMate 3000-MSQ PLUS (Thermo Fisher Scientific, Argentina) equipado con un detector UV. Los analitos se separaron en una columna ACCLAIM 120 C18 (2,1 mm x 150 mm, 3 µm) adquirida en Thermo Fisher Scientific, Argentina. Como fase móvil se utilizó una mezcla de ACN-agua (50:50 v/v). La temperatura de la columna se fijó a 25 °C y el caudal fue de 0,3 mL min⁻¹, el volumen de inyección fue de 20 µL y los analitos separados se detectaron a 240 nm.

El solvente se evaporó con un sistema rotavaporador Buchi Rotavapor R-124 (Buchi, Argentina).

La caracterización de los MWCNTs y los ox-MWCNTs se realizó con un espectrómetro Nicolet Nexus FTIR (Thermo Fisher Scientific, Argentina).

¹²⁷ X. Xiong, J. Ouyang, W. R. G. Baeyens, J. R. Delanghe, X. Shen, Y. Yang, Enhanced separation of purine and pyrimidine bases using carboxylic multiwalled carbon nanotubes as additive in capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 27, 3243–3253, 2006. <https://doi.org/10.1002/elps.200500870>

4.3.2.2 Preparación de ox-MWCNTs

Para preparar los ox-MWCNTs, se añadieron 100 mg de MWCNTs a 400 mL de una mezcla de $\text{H}_2\text{SO}_4:\text{HNO}_3$ concentrados en proporción 3:1 v/v. Esta mezcla se sonicó en un baño de ultrasonido (50 W, 70 Hz) durante 5 h a temperatura ambiente. Los ox-MWCNTs resultantes se diluyeron con 2000 mL de agua desionizada, se filtraron y lavaron con agua hasta la eliminación completa de los ácidos residuales. Finalmente, los ox-MWCNTs se secaron a temperatura ambiente y se caracterizaron mediante espectros de absorción en el infrarrojo. Para ello, se prepararon pastillas de MWCNTs y ox-MWCNTs mezclando 1,20 mg de cada uno de ellos con 200 mg de KBr (Grado espectroscópico IR, Sigma-Aldrich, Alemania). Las mediciones se realizaron a temperatura ambiente y los espectros se registraron en el intervalo de números de onda entre 500 y 4000 cm^{-1} .

4.3.2.3 Procedimiento de SPE

Se diseñó un sistema FIA para llevar a cabo la SPE de forma automática. Para ello, y en primer lugar, se empacó una minicolumna de SPE con 60 mg de ox-MWCNTs mezclados previamente con 50 mg de lana de vidrio. La inclusión de la lana de vidrio evito la posible aglomeración del adsorbente en la minicolumna, que puede dar lugar a una sobrepresión en el sistema en flujo. La mezcla se colocó en un tubo de vidrio cilíndrico (3,2 cm de largo, 0,4 cm de d.i.). Se utilizó algodón como frita en ambos lados de la columna para evitar pérdidas de adsorbente.

La minicolumna de ox-MWCNTs se acopló al sistema FIA como se muestra en la Figura 4.5. Para realizar la extracción y preconcentración de las progestinas se encendió la BP con la VI en la posición de carga. Primero, el adsorbente se activó con 3,0 mL de MeOH que ingreso al sistema por la posición 1 de la VS. Luego, pasó por la columna de extracción (CE) y finalmente se dirigió al desecho. Una vez acondicionado el adsorbente, se giró la VS a la posición 2 para equilibrar la columna con 2,0 mL de la solución de HCl pH 2,8. A continuación, se introdujeron 100,0 mL de la solución estándar o muestra, por la posición 3 de la VS, para realizar la extracción y preconcentración de los analitos. Posteriormente, se lavó la CE con la solución de HCl pH 2,8 para eliminar los residuos de muestra que

podieran haber quedado en la columna. Luego, la VI se giró a la posición de inyección y se inyectó 1,0 mL de ACN para la elución de los analitos. El caudal en cada etapa fue de 0,98 mL min⁻¹.

El eluato se recogió y se evaporó a sequedad utilizando un rotavapor, en condiciones de vacío, a 45°C. Luego, los extractos se reconstituyeron en 600 µL de la fase móvil. El blanco de extracción se realizó de manera similar.

Para comparar la eficiencia de extracción de los ox-MWCNTs, se empacaron de manera similar dos columnas con MWCNTs (60 mg) y C18 (188 mg) y se acoplaron al sistema FIA para realizar la extracción.

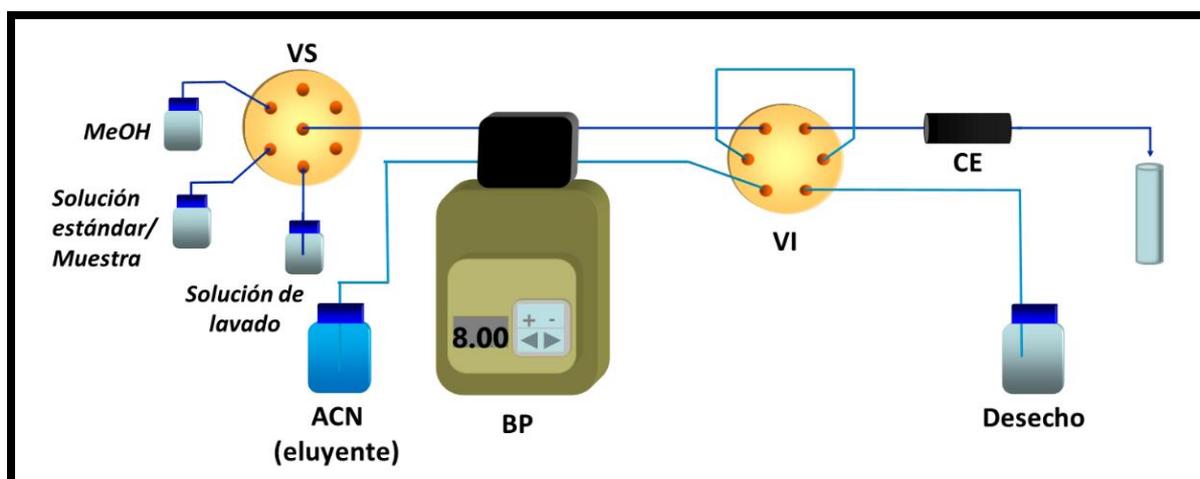


Fig 4.5 Sistema FIA propuesto. VS: válvula de selección; BP: Bomba peristáltica; VI: válvula de inyección; CE: columna de extracción

4.3.2.4 Muestreo y preparación de muestras

Se tomaron muestras de agua del arroyo Napostá y de agua subterránea de perforación para uso recreativo y riego, ambos puntos ubicados en la ciudad de Bahía Blanca. Otra muestra de agua se tomó de un efluente a la salida de la planta de tratamiento de aguas residuales Ingeniero White, partido de Bahía Blanca. Las muestras se recolectaron en envases color caramelo y se mantuvieron 4°C hasta su análisis. Para proceder con el análisis, las muestras se dejaron a temperatura ambiente y luego se filtraron con un filtro de poro de 4-12 µm para retener el material sólido en suspensión. A

continuación, se tomaron alícuotas de 10,00 mL de las muestras filtradas y se acidificaron hasta pH 2,8 para realizar la extracción.

Para llevar a cabo el estudio de recuperación, las muestras se enriquecieron con LV, MGP y NET al inicio del proceso analítico, a tres niveles de concentración dentro del intervalo de calibración y se siguió el mismo protocolo de preparación. Luego se calcularon los valores de recuperación de acuerdo con la definición de la AOAC¹²⁸. Los análisis de las muestras se realizaron por triplicado.

4.3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.3.1 Caracterización de ox-MWCNT mediante espectrometría de absorción IR

Los grupos carboxílicos e hidroxilo en la superficie de los ox-MWCNTs se generan como resultado de su oxidación, lo que conduce a un aumento de su hidrofiliidad y por lo tanto, mejora su dispersión en soluciones acuosas. La Figura 4.6 muestra la comparación entre los espectros FTIR de MWCNTs y ox-MWCNTs. El espectro de ox-MWCNTs indica bandas intensas en números de onda de 3410 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones de estiramiento de los enlaces –OH superficiales aislados y/o a los enlaces –OH de los grupos carboxilo. Las bandas C=O características de los grupos carboxilo (–COOH) y de la cetona/quinona se observan a 1718 y 1635 cm^{-1} , respectivamente. El incremento de la intensidad de las bandas en la región de 1250–900 cm^{-1} indica un aumento en las cantidades de óxidos superficiales hidratados.

¹²⁸ AOAC Peer-Verified Methods Program, Manual on Policies and Procedures, Arlington, VA, USA, 1998.

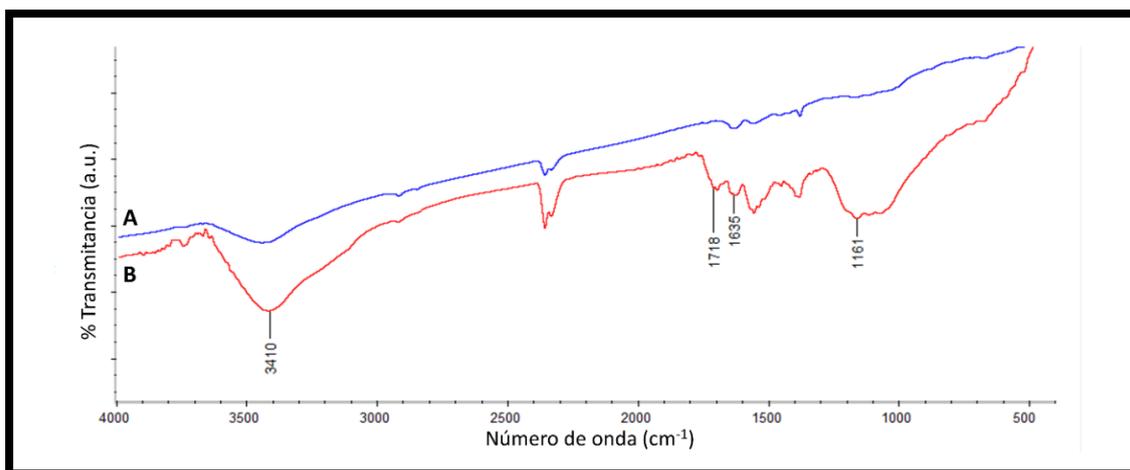


Fig 4.6 Espectros de FTIR de (A) MWCNTs sin procesar y (B) ox-MWCNTs. Los comprimidos se prepararon mezclando 1,20 mg de cada tipo de CNTs con 200 mg de KBr

4.3.3.2 Elección del adsorbente

Teniendo en cuenta las características de los analitos, los MWCNTs pueden ser un adsorbente adecuado para su extracción debido a sus propiedades químicas únicas y la posibilidad de establecer interacciones tipo π - π , enlaces puente de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas¹²⁹. Por otro lado, la oxidación de los MWCNTs genera una estructura superficial más hidrófila que puede mejorar la interacción con compuestos moderadamente polares así como disminuir la agregación de estas NPs (Figura 4.7).

Así, para realizar la extracción de las progestinas, se compararon tres adsorbentes: MWCNTs, ox-MWCNTs y C18. Todos ellos han sido ampliamente utilizados en la extracción de compuestos orgánicos e inorgánicos de muestras de agua bajo diferentes condiciones experimentales. Sin embargo, solo el C18 fue usado previamente en la extracción de los analitos en estudio^{130 131}.

¹²⁹ F. Augusto, L. Hantao, N. Mogollón, S. Braga, New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction. Trends Anal. Chem., 43, 14-23, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.08.012>

¹³⁰ O. Golovko, P. Šauer, G. Fedorova, H. Kocour Kroupová, R. Grabic, Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC- APCI/APPI-HRPS. Sci. Tot. Environ., 621, 1066-1073, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.120>

¹³¹ L. Sun, W. Yong, X. Chu, J. M. Lin, Simultaneous determination of 15 steroidal oral contraceptives in water using solid-phase disk extraction followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J Chromatogr. A, 1216, 5416-5423, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.041>

Se probaron MWCNTs y ox-MWCNTs como posibles adsorbentes. Para este propósito, se empacaron dos minicolumnas con MWCNTs y ox-MWCNTs para realizar pruebas preliminares. Los analitos fueron extraídos por ambos adsorbentes. Sin embargo, los ox-MWCNTs mostraron mayor eficiencia de extracción, probablemente debido a las interacciones hidrofílicas con los grupos polares de los analitos. La disminución de la eficiencia de extracción de los MWCNTs podría atribuirse a la agregación de los mismos. Además, el uso de columnas empacadas con MWCNTs presentó problemas de sobrepresión en el sistema FIA.

Luego, se realizó la comparación entre las columnas de ox-MWCNTs y de C18 en términos del volumen de la muestra. Para ello, se colocaron 188 mg de C18 en un tubo de vidrio cilíndrico (3,2 cm de largo, 0,4 cm de d.i.) y se siguió el procedimiento de extracción descrito en la Sección 4.3.2.3 para ambas columnas, teniendo en cuenta las condiciones óptimas para cada adsorbente. La columna de ox-MWCNTs presentó buenas recuperaciones para volúmenes de hasta 100,0 mL mientras que para la columna C18, se obtuvieron buenas recuperaciones con volúmenes de muestra de hasta 70,0 mL.

Por lo tanto, la columna de ox-MWCNTs presentó un mayor factor de preconcentración, con una menor cantidad de adsorbente (60 mg), que la columna de C18. Esto se puede atribuir a la mayor área superficial y la superficie más polar de los nanotubos que promovieron una mejor interacción con los analitos. Por ello, los ox-MWCNTs resultaron ser la mejor opción para los analitos seleccionados.

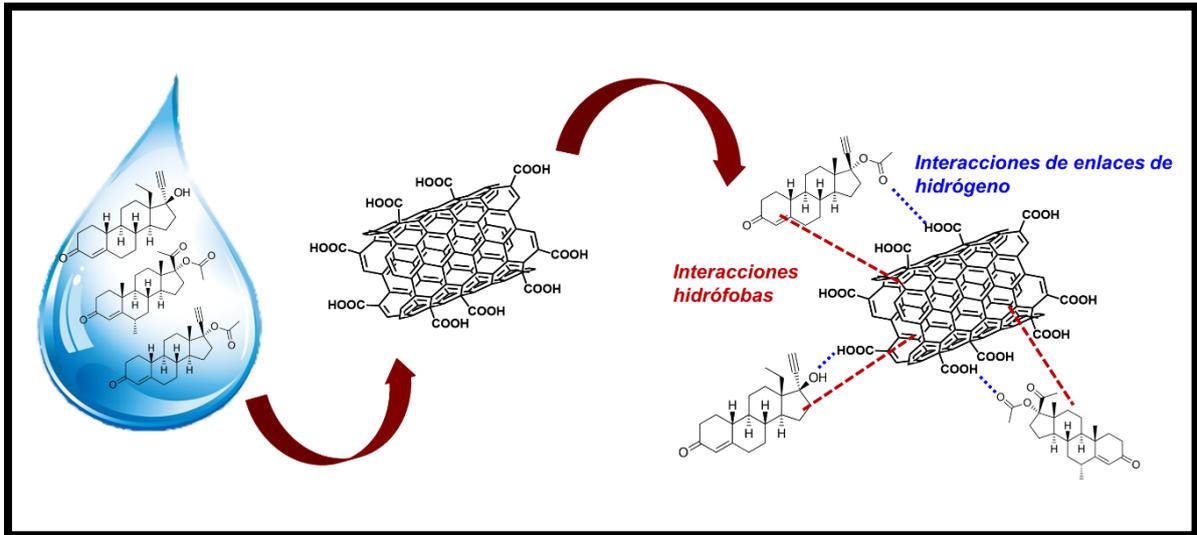


Fig 4.7 Interacciones entre los analitos y los ox-MWCNTs

4.3.3.3 Estudio de las variables de extracción

La optimización de las diferentes variables de extracción se llevó a cabo de forma univariada. Se tomó como valor óptimo aquel que obtuvo el mayor valor de recuperación. A continuación, se describen las variables estudiadas.

Optimización del pH de la muestra y de la solución de lavado

La interacción analito-adsorbente se estudió a diferentes valores de pH entre 2,8, y 10,3. Para ello, el procedimiento de extracción se realizó pasando 10,0 mL de solución de los analitos de concentración $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ por la columna de extracción al pH correspondiente. Como solución para equilibrar la columna se utilizó una solución del mismo valor de pH de la muestra.

El mayor valor de recuperación para los analitos se obtuvo cuando, tanto la muestra como la solución de lavado, estaban a un valor de pH 2,8. Esto puede explicarse porque a ese valor de pH los grupos carboxílicos de los ox-MWCNTs se encuentran por debajo del punto isoelectrónico, lo que probablemente mejora las interacciones entre los analitos y el adsorbente. Por lo tanto, se eligió un valor de pH de 2,8 como óptimo para posteriores experimentos.

Optimización del caudal

El caudal se optimizó en el intervalo entre 0,73 y 1,71 mL min⁻¹ (Figura 4.8). El porcentaje de recuperación más alto se obtuvo a un caudal de 0,98 mL min⁻¹. A caudales mayores, se observó una disminución significativa en los valores de recuperación, probablemente debido al menor tiempo de contacto entre los analitos y el adsorbente. Por lo tanto, 0,98 mL min⁻¹ fue el caudal seleccionado.

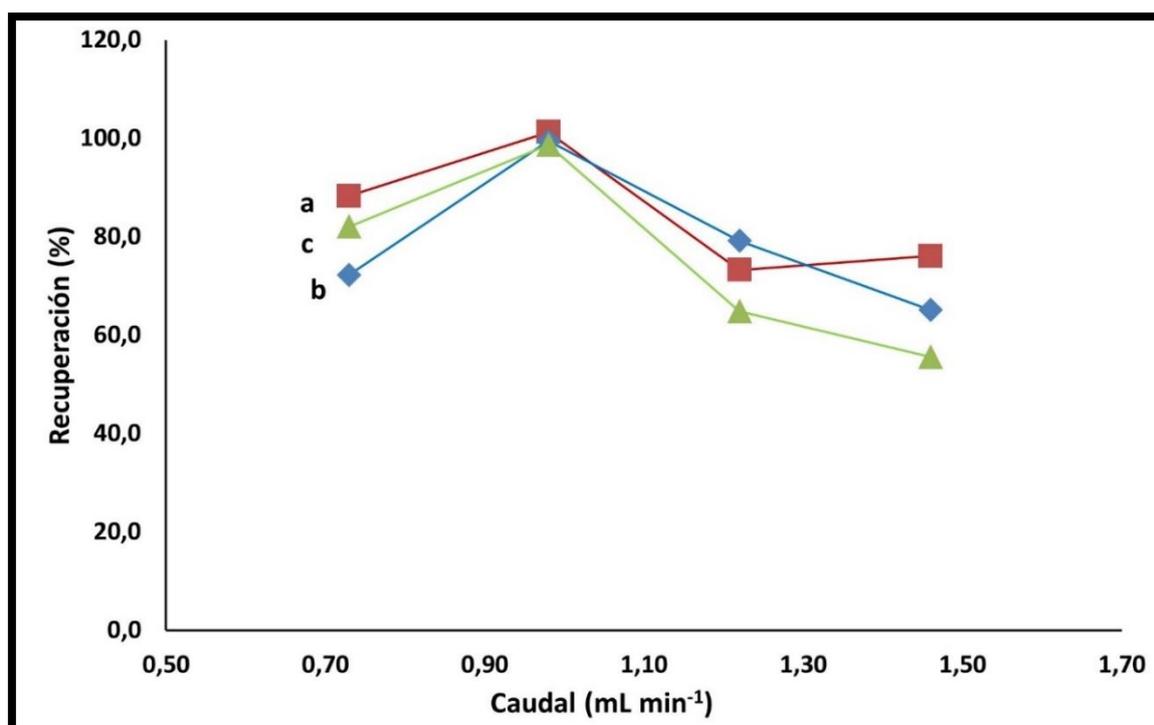


Fig 4.8 Optimización del caudal (0,73- 1,71 mL min⁻¹) con 10,00 mL de soluciones estándar de 1,0 mg L⁻¹) para (a) LV, (b) NET y (c) MPG.

Optimización del eluyente y volumen de eluyente

Se probaron MeOH, ACN y mezclas de ambos como posibles eluyentes. Para ello, se pasaron por la columna 10,00mL de la solución estándar y luego se eluyó con 1,00 mL de solvente. El uso de MeOH, tanto puro como mezclado con ACN (50:50), dio como resultado blancos de extracción con señales significativas. También se ensayaron mezclas de ACN y agua (50:50), observándose una disminución de las recuperaciones de los analitos a medida que aumentaba el porcentaje de agua. Por lo tanto, se eligió ACN para la elución de todos los analitos.

El volumen de ACN necesario se estudió en el intervalo entre 0,70 y 1,50 mL. Como puede verse en la Figura 4.9, el valor de recuperación más alto se obtuvo con un volumen de 1,00 mL de eluyente, por lo que este fue el volumen de solvente elegido.

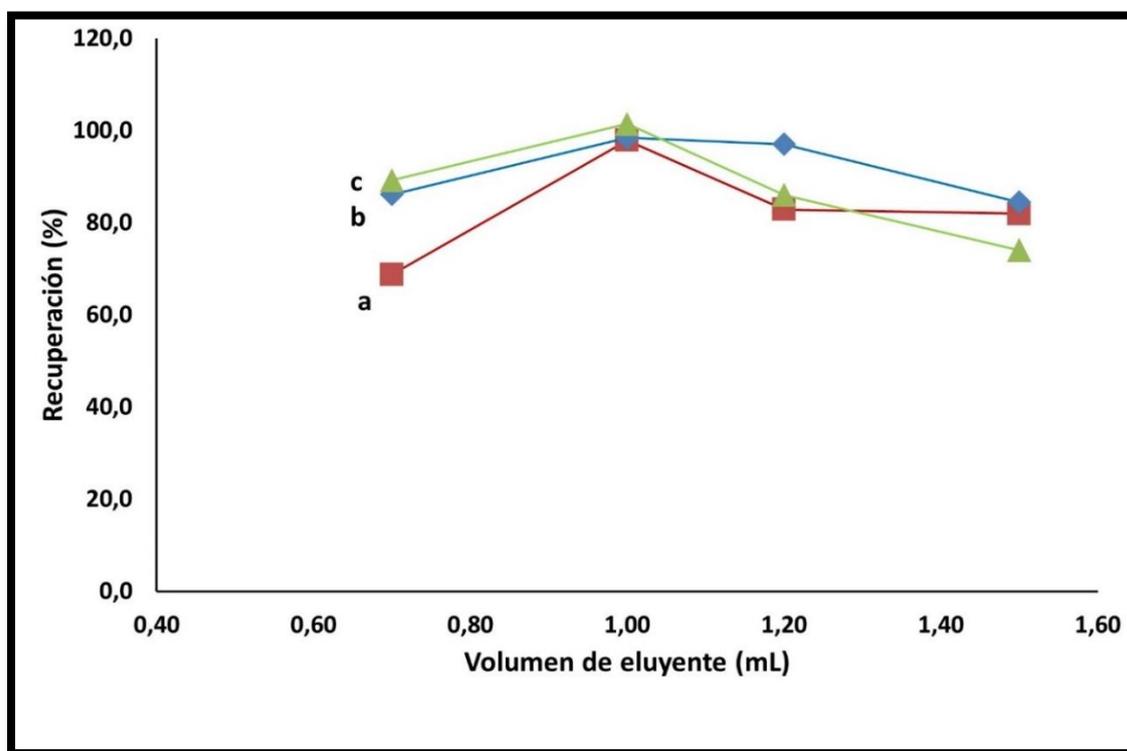


Fig 4.9 Optimización del volumen de eluyente (0,7-1,5 mL con 10,0 mL de soluciones estándar de 1,0 mg L⁻¹) para (a) LV, (b) NET y (c) MPG.

Optimización del volumen de muestra

Este parámetro implica el máximo volumen de muestra que se puede emplear en la extracción sin una disminución significativa del porcentaje de recuperación¹³². Además, este valor es necesario para calcular el factor de enriquecimiento. Por ello, el volumen de muestra se evaluó en el intervalo entre 10,00 y 150,00 mL, manteniendo constante la masa de los analitos y el volumen de elución. Los datos experimentales se muestran en la Figura 4.10, donde se observa que no ocurrieron variaciones

¹³² S. Seidi, M. Tajik, M. Baharfar, M. Rezazadeh, Micro solid-phase extraction (pipette tip and spin column) and thin film solid-phase microextraction: Miniaturized concepts for chromatographic analysis. Trends Anal. Chem., 118, 810-827, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.036>

significativas de las recuperaciones (94,0-104,7 %) cuando el volumen de muestra aumentó de 10,00 a 100,00 mL para los tres analitos. A un volumen mayor, las recuperaciones de LV y MPG disminuyeron, mientras que la recuperación de NET se mantuvo prácticamente constante. Teniendo en cuenta que las recuperaciones de LV y MPG se vieron afectadas a volúmenes superiores a 100,00 mL, se seleccionó éste como el volumen de muestra óptimo.

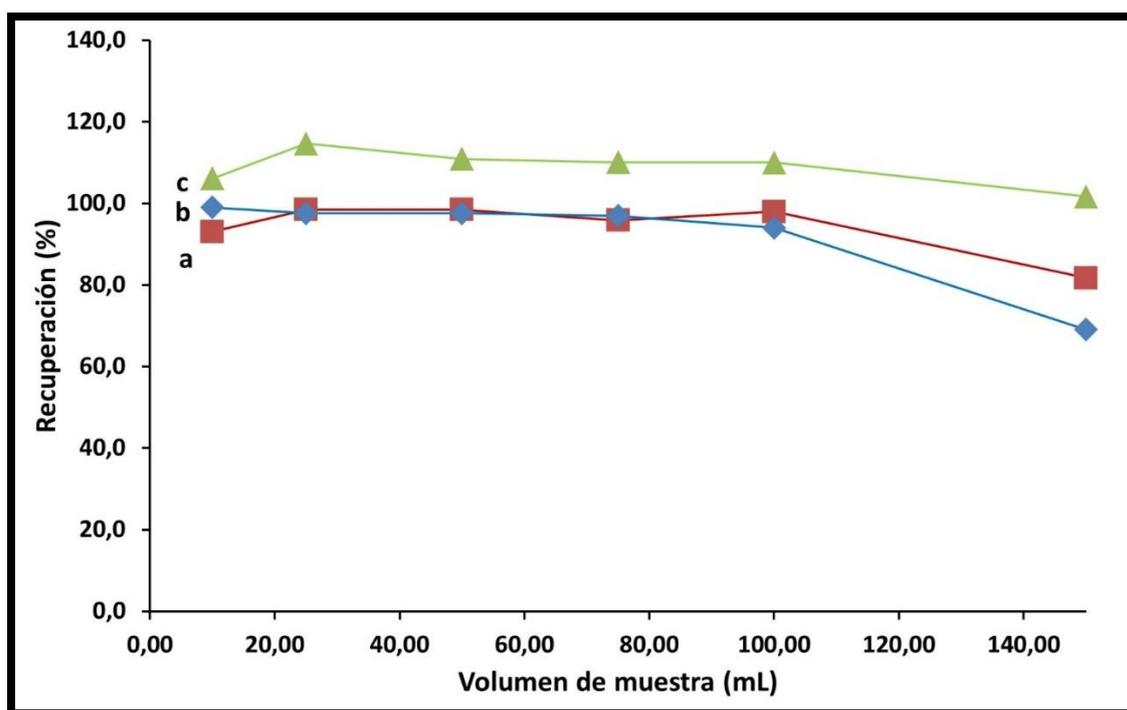


Fig 4.10 Optimización del volumen de muestra (10,0-150,0 mL, 0,01 mg de cada analito) para (a) LV, (b) NET y (c) MPG.

4.3.3.4 Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos del método propuesto se evaluaron en términos de linealidad, límite de detección (LOD), repetibilidad y precisión intermedia como porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) (Tabla 4.1).

Se construyeron curvas de calibración para todos los compuestos en estudio en el intervalo entre 0,90 ya 9,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ (cinco puntos con tres repeticiones cada uno). Se lograron excelentes coeficientes de correlación con valores superiores a 0,99. Los valores de LOD fueron 0,14, 0,07 y 0,05 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LV,

NET y MPG respectivamente, calculados a partir de la recta de regresión. La repetibilidad se evaluó con una solución de 6,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada compuesto, llevando a cabo el procedimiento de extracción cinco veces sucesivas en un día. Para la precisión intermedia se midió la misma concentración por triplicado en 3 días consecutivos. Los valores de %RSD obtenidos demostraron una alta precisión para el método de extracción propuesto.

En cuanto a la selectividad, los ox-MWCNTs han sido utilizados como adsorbente para la preconcentración de varios compuestos orgánicos, como pesticidas organofosforados polares¹³³, atrazina, propoxur y metidatió¹³⁴, antibióticos de quinolona¹³⁵, y algunos cationes metálicos como Cr, Cu, Co y Pb¹³⁶ ¹³⁷. En el caso de los cationes metálicos, las condiciones de extracción son completamente diferentes a las condiciones seleccionadas para las progestinas, ya que el procedimiento debe realizarse a pH por encima del punto isoeléctrico (4,0) donde la superficie de los ox-MWCNTs está cargada negativamente⁷⁸. La disminución del pH conduce a la neutralización de la superficie, por lo que la adsorción de cationes disminuye notablemente. En cuanto a los compuestos orgánicos, la retención de los pesticidas polares organofosforados, atrazina, propoxur, metidatió y quinolonas fue óptima a pH 5,0, mostrando baja retención a pH 2,8. Por lo tanto, el pH al que se realizó la extracción fue un factor importante en términos de selectividad. Sin embargo, es posible que algunos compuestos orgánicos se puedan extraer al mismo valor de pH. En ese caso, se deberían ajustar las condiciones de la separación cromatográficas para evitar interferentes.

¹³³ Q. Li, X. Wang, D. Yuan, Solid-phase extraction of polar organophosphorous pesticides from aqueous samples with oxidized carbon nanotubes. *J. Environ. Monit.*, 11, 439-444, 2009. <http://doi.org/10.1039/b816271a>

¹³⁴ A. H. El-Sheikh, A. A. Insisi, J. A. Sweileh, Effect of oxidation and dimensions of multi-walled carbon nanotubes on solid phase extraction and enrichment of some pesticides from environmental waters prior to their simultaneous determination by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1164, 25-32, 2007. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.009>

¹³⁵ A. V. Herrera-Herrera, L. M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, M. M. Afonso, J. A. Palenzuela, M. A. Roríguez-Delgado, Oxidized multi-walled carbon nanotubes for the dispersive solid-phase extraction of quinolone antibiotics from water samples using capillary electrophoresis and large volume sample stacking with polarity switching. *J. Chromatogr. A*, 1218, 5352-5361, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.031>

¹³⁶ S. Chen, C. Liu, M. Yang, D. Lu, L. Zhu, Z. Wang, Solid-phase extraction of Cu, Co and Pb on oxidized single-walled carbon nanotubes and their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Hazard. Mater.*, 170, 247-251, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.04.104>

¹³⁷ C. Herrero-Latorre, J. Barciela-García, S. García-Martín, R. M. Pena-Crecente, Graphene and carbon nanotubes as solid phase extraction sorbents for the speciation of chromium: A review. *Anal. Chim. Acta*, 1002, 1-17, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.11.042>

Tabla 4.1. Parámetros analíticos del método propuesto para la determinación de progestinas.

Analitos	Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R ²	LOD ¹ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidad (RSD%) ²	Reproducibilidad (RSD%) ³	Ecuación de regresión
LV	0,90-9,00	0,993	0,14	0,8	4,6	$y = 2,51 (\pm 0,03)x + 1,09 (\pm 0,13)$
NET	0,90-9,00	0,993	0,07	2,6	2,4	$y = 1,05 (\pm 0,05)x + 0,45 (\pm 0,01)$
MPG	0,90-9,00	0,997	0,05	1,2	3,1	$y = 0,93 (\pm 0,02)x - 0,05 (\pm 0,004)$

¹LOD calculado como $3s/A$, donde, s: desviación estándar, A: pendiente de la curva de calibrado. ² n=5, $6,00 \mu\text{g L}^{-1}$; ³ $6,00 \mu\text{g L}^{-1}$, medido por triplicado durante 3 días.

En la Tabla 4.2 se muestran diferentes métodos de SPE propuestos para la extracción de los analitos en estudio, comparando el tipo de adsorbente, técnica de detección, LOD, valores de %RSD y parámetros de la SPE (cantidad de adsorbente, volumen de eluyente y volumen de muestra). Como se puede observar, nuestro método requirió menor cantidad de adsorbente y eluyente, con factores de preconcentración obtenidos similares a los de los métodos que se pueden encontrar en la literatura. Además, los LODs son satisfactorios considerando que la determinación se realizó con un cromatógrafo con detección UV, a diferencia de los otros métodos que utilizan espectrometría de masas como técnica de detección. Además, los valores de %RSD fueron menores comparados con los valores presentados por los métodos encontrados en la literatura, lo que se puede atribuir al empleo de un sistema automático para llevar a cabo la extracción y preconcentración.

Table 4.2. Comparación de diferentes métodos de SPE para la determinación de progestinas

Adsorbente de SPE	Separación/Detección	LOD (ng L ⁻¹)	RSD (%)	Cantidad de adsorbente (mg)	Volumen de eluyente (mL)	Volumen de muestra (mL)	Ref.
SPE Oasis® HLB	UHPLC-MS/MS	0,01-0,24	0,6-4	500	12,0	1000	16
SPE C18 disks	UPLC/MS/MS	0,5-3,4	0,4-7,4	n.i.	30,0	100,00	131
SPE Oasis® HLB	UHPLC-MS/MS	0,03-0,40	1,0-11	500	6,0	1000	138
SPE Oasis® HLB- Bioassay	UPLC-tQ-MS	n.i.	1,7-4,3	500	9,0	1000	139
SPE hydrophilic DVB Speedisks®	APCI-UHPLC-HR- QOrbitrap-MS	0,06-2,50	3,5-6,2	n.i.	10,0	2500	140
SPE C18 disks	LC-APCI/APPI-HRPS	0,02-0,87	8,0-34	n.i.	10,0	1000	141
SPE ox-CNTs	HPLC-UV	50-140	0,8 -4,6	60,0	1,0	100,00	Este trabajo

n.i.: no informado

¹³⁸ X. Shen, H. Chang, D. Sun, L. Wang, F. Wu, Trace analysis of 61 natural and synthetic progestins in river water and sewage effluents by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Water Res.*, 133, 142–152, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.01.030>

¹³⁹ C. J. Houtman, R. Broek, A. Brouwer, Steroid hormonal bioactivities, culprit natural and synthetic hormones and other emerging contaminants in waste water measured using bioassays and UPLC-tQ-MS. *Sci. Total Environ.*, 630, 1492–1501, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.273>

¹⁴⁰ S. Huysman, L. Van Meulebroek, F. Vanryckeghem, H. Van Langenhove, K. Demeestere, L. Vanhaecke, Development and validation of an ultra-high performance liquid chromatographic high resolution Q-Orbitrap mass spectrometric method for the simultaneous determination of steroidal endocrine disrupting compounds in aquatic matrices. *Anal. Chim. Acta*, 984, 140–150, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.07.001>

¹⁴¹ O. Golovko, P. Šauer, G. Fedorova, H. Kocour Kroupová, R. Grabic, Determination of progestogens in surface and waste water using SPE extraction and LC-APCI/APPI-HRPS. *Sci. Total Environ.*, 621, 1066–1073, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.10.120>

4.3.3.5 Aplicación a muestras ambientales

Como se mencionó en la Sección 4.3.2.4, se analizaron tres muestras ambientales (agua de arroyo, agua subterránea y agua de efluente) para demostrar la aplicabilidad del método. Aunque las muestras se recogieron de diferentes fuentes de agua potencialmente contaminadas, no se encontraron residuos de los analitos en estudio en concentraciones superiores al LOD del método. Por lo tanto, las muestras se enriquecieron, se trataron como se describe en la misma sección y se introdujeron en el sistema FIA para realizar el procedimiento de SPE. La Tabla 4.3 muestra las concentraciones añadidas y el porcentaje de recuperación calculado para los tres analitos. Los valores de recuperación variaron entre 73,8% y 121,0%, con la mayoría de los resultados entre 89,3 y 114,6%. Estos valores de recuperación son aceptables para la determinación de los compuestos en estudio a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$. En la Figura 4.11, se muestran los cromatogramas obtenidos para la solución estándar de $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$ y las muestras enriquecidas a la misma concentración.

Además, el efecto de la matriz se evaluó comparando la pendiente del gráfico de calibración y la pendiente de una muestra enriquecida con los mismos niveles de concentración⁸⁶. No hubo diferencia significativa entre las pendientes para el nivel de probabilidad elegido ($p > 0,1$), lo que significa que no tiene efecto matriz.

Table 4.3. Recuperaciones de las progestinas determinadas en muestras ambientales

Muestra	Concentración			Recuperación ²			
	de fortificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Concentración determinada ¹ ($\mu\text{g L}^{-1}$)			(%)		
		LV	NET	MPG	LV	NET	MPG
Arroyo	2,5	2,86 \pm 0,01	3,02 \pm 0,01	2,61 \pm 0,00	114,6	121	104,4
	5,0	4,94 \pm 0,01	4,34 \pm 0,05	3,69 \pm 0,02	98,8	86,7	73,8
	7,5	6,92 \pm 0,04	7,58 \pm 0,01	6,38 \pm 0,04	92,3	101,0	85,1
Agua subterránea	2,5	2,31 \pm 0,02	2,55 \pm 0,00	2,48 \pm 0,01	92,4	101,9	99,0
	5,0	4,61 \pm 0,02	4,46 \pm 0,02	4,17 \pm 0,06	92,2	89,3	83,4
	7,5	7,76 \pm 0,05	7,34 \pm 0,02	6,96 \pm 0,03	103,4	97,9	92,8
Agua de efluente	2,5	1,92 \pm 0,09	2,12 \pm 0,04	2,09 \pm 0,07	76,8	84,1	83,1
	5,0	3,69 \pm 0,06	3,72 \pm 0,08	4,20 \pm 0,04	73,8	74,7	84,5
	7,5	7,56 \pm 0,04	5,58 \pm 0,04	6,92 \pm 0,20	100,8	75,8	92,2

¹ Las muestras fueron analizadas por triplicado

² Las recuperaciones fueron calculadas de acuerdo a la referencia 86.

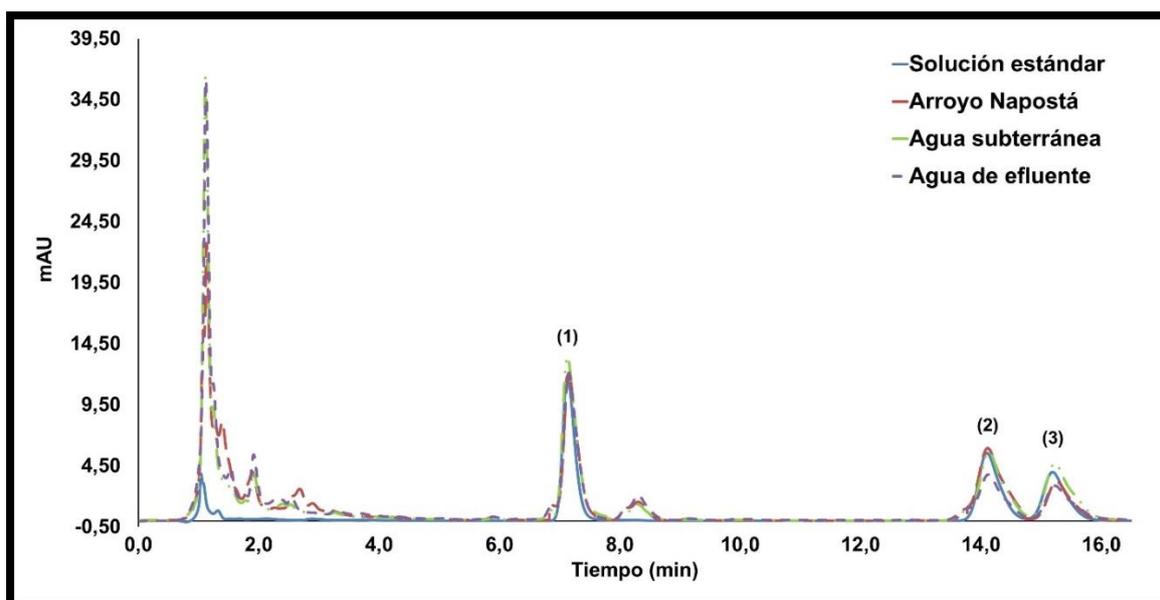


Fig 4.11 Cromatogramas de la solución estándar y muestras de agua enriquecidas. Identificación de picos: (1) LV, (2) NET y (3) MPG. Condiciones de extracción: volumen de muestra, 100,00 mL; concentración de progestinas, 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$; masa de ox-MWCNT, 60 mg; pH de la muestra, 2,8; volumen de eluyente, 1,00 mL. Condiciones cromatográficas: columna ACCLAIM 120 C18 (2,1 mm x 150 mm, 3 μm); fase móvil: ACN-agua (50:50 v/v); temperatura de la columna: 25 $^{\circ}\text{C}$; caudal: 0,3 mL min^{-1} ; volumen de inyección: 20 μL ; $\lambda = 240 \text{ nm}$.

4.3.4 CONCLUSIÓN

En este trabajo se presentó, por primera vez, la aplicación de ox-MWCNTs como adsorbente para la SPE de LV, NET y MPG a niveles traza en muestras ambientales. La oxidación de los MWCNTs introdujo grupos funcionales polares en su superficie y mejoró significativamente su capacidad de extracción de las progestinas. En comparación con otros adsorbentes utilizados para estos analitos, los ox-MWCNTs exhibieron una excelente eficiencia de extracción, con factores de preconcentración similares a algunos de los métodos encontrados en la literatura, utilizando una cantidad menor de adsorbente (60 mg). Además, la columna empacada se reutilizó durante todo el trabajo (más de 100 veces) sin pérdida de su capacidad de extracción. El método presentó valores satisfactorios para los parámetros analíticos. Por lo tanto, este trabajo contribuye a demostrar que, aunque no se han implementado comercialmente, los ox-MWCNTs pueden considerarse como un buen adsorbente para SPE. Por otro lado, la automatización del procedimiento de SPE permitió disminuir el consumo de solventes

orgánicos, logrando una muy buena reproducibilidad. Además, se aprovecharon las características inherentes a las técnicas en flujo, como la minimización de la manipulación de la muestra y el empleo de un sistema cerrado para el análisis, lo que reduce significativamente la exposición del operador a reactivos potencialmente tóxicos. El método FIA-SPE se validó utilizando muestras ambientales, obteniendo resultados satisfactorios.

4.4 Preparación de un film de nanotubos de carbono y agarosa para la extracción y preconcentración de antiinflamatorios no esteroideos

4.4.1 INTRODUCCIÓN

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) pertenecen al grupo de los fármacos más utilizados, con efectos analgésicos y antiinflamatorios¹⁴².

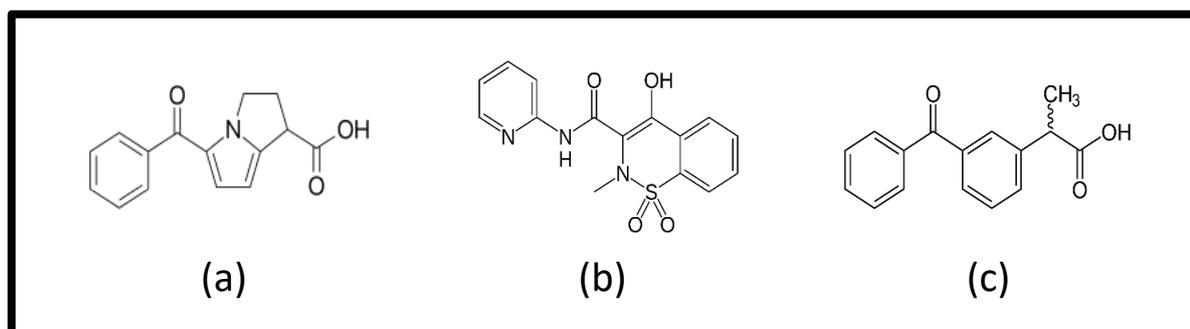


Fig 4.12 Estructura química de los AINEs en estudio (a) Ketorolac (b) Piroxicam (c) Ketoprofeno

Los AINEs son considerados CECs y se introducen al ambiente provenientes de diferentes fuentes domésticas y hospitalarias¹⁴³. Estos compuestos presentan alta solubilidad en agua, estabilidad ambiental relativamente baja y pueden ser biodegradados¹⁴⁴. Sin embargo, esto se ve contrarrestado por su continua descarga a los diferentes ecosistemas acuáticos.

¹⁴² Y. Zhou, J. Xu, N. Lu, X. Wu, Y. Zhang, X. Hou, Development and application of metal-organic framework@GA based on solid-phase extraction coupling with UPLC-MS/MS for the determination of five NSAIDs in water, *Talanta*, 225, 121846, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121846>.

¹⁴³ K. Świacka, A. Michnowska, J. Maculewicz, M. Caban, K. Smolarz, Toxic effects of NSAIDs in non-target species: A review from the perspective of the aquatic environment, *Environ. Pollut.*, 273, 115891, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115891>.

¹⁴⁴ K. Świacka, J. Maculewicz, D. Kowalska, M. Caban, K. Smolarz, J. Świeżak, Presence of pharmaceuticals and their metabolites in wild-living aquatic organisms – Current state of knowledge, *Journal of Hazardous Materials*, 424, Part A, 127350, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127350>.

Aunque la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) elaboro una guía sobre la eliminación segura de productos farmacéuticos¹⁴⁵, esta información es desconocida para la mayoría de la población.

Diferentes estudios han demostrado que los AINEs pueden producir efectos tóxicos en organismos acuáticos, como peces e invertebrados, incluso a niveles bajos de concentración¹⁴⁶. Por ello, su cuantificación en diferentes fuentes de agua es de gran interés.

La presencia de AINEs de consumo masivo en el ambiente ha sido estudiada para determinar la ocurrencia, fuentes, destino y efectos de los mismos¹⁴⁷. Estos estudios han sido realizados, mayoritariamente, en América del Norte, Europa y Asia, y en menor medida, en América Latina¹⁴⁸. En particular, algunos autores han determinado AINEs, como ibuprofeno y diclofenac, en áreas urbanas de Argentina, especialmente de ciudades ubicadas en la provincia de Buenos Aires, Córdoba y La Pampa^{149 150}.

Debido a que estos compuestos se han encontrado en aguas residuales, superficiales, subterráneas, e incluso en agua potable a niveles traza (ppm o ppb), es necesaria su extracción de la matriz de muestra, así como su preconcentración. La técnica de SPE es la más utilizada para este tipo de muestras¹⁵¹, siendo de importancia la elección de un adsorbente adecuado. En este sentido, varios materiales han

¹⁴⁵ Food and Drug Administration, Information for Consumers and Patients, Safe disposal of medicines. <https://www.fda.gov/drugs/ensuring-safe-use-medicine/safe-disposal-medicines>. Accessed March 7, 2023.

¹⁴⁶ H. Wang, H. Xi, L. Xu, M. Jin, W. Zhao and H. Liu, Ecotoxicological effects, environmental fate and risks of pharmaceutical and personal care products in the water environment: A review, *Sci. Tot. Environ.*, 788, 147819, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147819>.

¹⁴⁷ E. A. Tyumina, G. A. Bazhutin, A. d. Cartagena Gómez, Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs as Emerging Contaminants. *Microbiology* 89, 148–163, 2020. <https://doi.org/10.1134/S0026261720020125>

¹⁴⁸ M. Valdez-Carrillo, L. Abrell, J. Ramírez-Hernández, Pharmaceuticals as emerging contaminants in the aquatic environment of Latin America: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27, 44863–44891, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-10842-9>

¹⁴⁹ Y. Elorriaga, D. J. Marino, P. Carrquiriborde and A. E. Ronco, Human Pharmaceuticals in Wastewaters from Urbanized Areas of Argentina. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 90, 397–400, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00128-012-0919-x>

¹⁵⁰ Y. Elorriaga, D. J. Marino, P. Carrquiriborde, A. E. Ronco, Screening of pharmaceuticals in surface water bodies of the Pampas region of Argentina, *Int. J. Environment and Health*, 6(4), 330-339, 2013. <https://doi.org/10.1504/IJENVH.2013.056974>

¹⁵¹ N. Nouri, P. Khorram, O. Duman, T. Sibel, S. Hassan, Overview of nanosorbents used in solid phase extraction techniques for the monitoring of emerging organic contaminants in water and wastewater samples. *Trends Environ. Anal. Chem.*, 25, e00081, 2020. <http://dx.doi.org/10.1016/j.teac.2020.e00081>

sido empleados como adsorbentes para realizar la SPE de AINEs presentes en muestras ambientales. En la mayoría de los métodos, se han utilizado adsorbentes comerciales, como C18¹⁵², Strata X^{153 154} y Oasis® HLB. También se ha propuesto el uso de nuevos materiales para extraer AINEs en estas matrices, como por ejemplo, MOFs, criogeles¹⁵⁵ y MWCNTs^{156 157 158 159}. Además, se han sintetizado nanofibras de polianilina/poliacrilonitrilo¹⁶⁰ y nanoesferas microporosas magnética decorada con polietilenimina-600¹⁶¹ para extraer algunos de estos analitos con buenos resultados. En cuanto al uso de biomateriales, Ibrahim et al.¹⁶² propusieron un adsorbente no reutilizable compuesto de MWCNTs,

¹⁵² H. H. Ortega Soto, J. J. Ramírez García, P. Gamboa Suárez and A. M. Dávila, Estrada, Determination of Ketorolac in the Effluent from a Hospital Treating Plant and Kinetics Study of Its Photolytic Degradation, *Int. J. Photoenergy*, 6781310, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/6781310>

¹⁵³ C. L. Chitescu, G. Kaklamanos, A. I. Nicolau and A. A. M. (L.) Stolker, High sensitive multiresidue analysis of pharmaceuticals and antifungals in surface water using U-HPLC-Q-Exactive Orbitrap HRMS. Application to the Danube river basin on the Romanian territory, *Sci. Tot. Environ.*, 532, 501-511, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.010>

¹⁵⁴ I. Pugajeva, J. Rusko, I. Perkons, and V. Bartkevics, Determination of pharmaceutical residues in wastewater using high performance liquid chromatography coupled to quadrupole-Orbitrap mass spectrometry *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 133, 64-74, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.11.008>

¹⁵⁵ Y. Wang, M. Ji, X. Wu, T. Wang, J. Wang, X. Hou, PEG modified column MIL-101(Cr)/PVA cryogel as a sorbent in stir bar solid phase extraction for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples, *Microchem. J.*, 146, 214-219, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.12.045>

¹⁵⁶ A. Amiri and F. Ghaemi, Solid-phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples using sol-gel-based metal-organic framework coating, *J. Chromatogr. A*, 1648, 462168, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462168>

¹⁵⁷ Y. Gao, S. Wang, N. Zhang, X. Xu and T. Bao, Novel solid-phase extraction filter based on a zirconium meta-organic framework for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues, *J. Chromatogr. A*, 2021, 1652, 462349. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462349>

¹⁵⁸ I. Reinholds, I. Pugajeva, Dz. Zacs, E. Lundanes, J. Rusko, I. Perkons and V. Bartkevics, Determination of acidic non-steroidal anti-inflammatory drugs in aquatic samples by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry combined with carbon nanotubes-based solid-phase extraction, *Environ. Monit. Assess.*, 2017, 189, 568. <https://doi.org/10.1007/s10661-017-6304-9>

¹⁵⁹ T. Wang, S. Liu, G. Gao, P. Zhao, N. Lu, X. Lun and X. Hou, Magnetic solid phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from water samples using a metal organic framework of type Fe₃O₄/MIL-101(Cr), and their quantitation by UPLC-MS/MS, *Microchim. Acta*, 2017, 184, 2981–2990. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2319-8>

¹⁶⁰ N. Jian, L. Qian, C. Wang, R. Li, Q. Xu and J. Li, Novel nanofibers mat as an efficient, fast and reusable adsorbent for solid phase extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water, *J. Hazard. Mater.*, 363, 81–89, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.09.052>

¹⁶¹ X. Q. He, Y. Y. Cui, and C. X. Yang, Fabrication of polyethyleneimine modified magnetic microporous organic network nanosphere for efficient enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs from wastewater samples prior to HPLC-UV analysis, *Talanta*, 2021, 233, 122471. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122471>

¹⁶² W. N. Wan Ibrahim, M. Marsin Sanagi, N. S. Mohamad Hanapi, S. Kamaruzaman, N. Yahaya and W. A. Wan Ibrahim, Solid-phase microextraction based on an agarose-chitosan-multiwalled carbon nanotube composite film combined with HPLC-UV for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in aqueous samples, *J. Sep. Sci.*, 41, 2942–2951, 2018. <https://doi.org/10.1002/jssc.201800064>

quitosano y agarosa para realizar la microextracción en fase sólida de naproxeno, diclofenac y ácido mefenámico.

En este trabajo, se preparó un film único y reutilizable compuesto por agarosa y MWCNTs para la extracción, preconcentración y determinación de ketorolac, ketoprofeno y piroxicam. La posibilidad de reutilizar varias veces el mismo film, sin pérdida de su capacidad de extracción, incrementó la reproducibilidad de los resultados. Además, dió lugar a una disminución en el uso de reactivos (y generación de desechos), y menores costos de análisis. Así mismo, este material híbrido es potencialmente biodegradable ya que tanto la agarosa como los MWCNTs son materiales que pueden ser degradados por bacterias y enzimas^{163 164}. El film se utilizó con éxito en la extracción de los AINEs seleccionados de muestras de aguas naturales de la región de Bahía Blanca.

4.4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.4.2.1 Reactivos e instrumentación

Se diluyó la cantidad adecuada de ketorolac (KEC), ketoprofeno (KEN) y piroxicam (PIR) (Sigma-Aldrich, Alemania) en MeOH ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Alemania), para preparar 200 mg L^{-1} de las soluciones patrón. Las mismas se almacenaron en recipientes oscuros (4°C). Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente diluyendo un volumen adecuado de las soluciones patrón con una solución de ácido acético pH 3,0 (Sintorgan, Argentina). Para la preparación del film se utilizó agarosa (BioReagent, bajo EEO, Sigma-Aldrich) y los MWCNTs (13–16 nm, pureza $>95\%$, Bayer®). El alcohol isopropílico, IPA ($\geq 99,8\%$) se adquirió de Dorwil (Argentina). Las muestras se filtraron con papel de filtro cualitativo Microclar (Argentina).

La separación por HPLC se llevó a cabo en un cromatógrafo HPLC Waters 600 (Waters, EE. UU.) combinado con un detector de arreglo lineal de fotodiodos (PDA). Los analitos se separaron utilizando

¹⁶³ M. Chen, X. Qin and G. Zeng, Biodegradation of Carbon Nanotubes, Graphene, and Their Derivatives, Trends Biotechnol., 2017, 35(9), 836-846. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.12.001>

¹⁶⁴ C. Jiang, Z. Liu, D. Cheng and X. Mao, Agarose degradation for utilization: Enzymes, pathways, metabolic engineering methods and products, Biotechnol. Adv., 2020, 45, 107641. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107641>

una columna C18 Gemini (150 mm × 4,6 mm, 5 μm, Phenomenex) en modo isocrático. La fase móvil se preparó con ACN (≥99%, Sigma-Aldrich, Alemania) y agua acidificada con 0,07% de ácido fórmico (Sintorgan, Argentina) en una proporción 50:50 (v/v). La temperatura de la columna, el volumen de inyección y el caudal fueron de 25 °C, 10 μL y 1,0 mL min⁻¹, respectivamente. Los analitos separados se detectaron a 254 nm (KEN), 312 nm (KEC) y 326 nm (PIR).

Los MWCNTs se dispersaron en un baño ultrasónico Cole-Parmer EW-08895-16. El film de MWCNTs-agarosa se secó en una estufa (Modelo SL30S, San Jor, Argentina). Se utilizó un sistema evaporador al vacío (Speed -Vac SPD11V, Thermo Fisher Scientific, Argentina) para evaporar el solvente.

La caracterización de los films de agarosa y MWCNTs-agarosa, antes y después del secado, se realizó con un Microscopio Electrónico de Barrido, SEM (LEO, EVO 40 XVP) con detector de electrones secundarios (SE).

4.4.2.2 Preparación del film de MWCNTs-agarosa

La preparación del film de MWCNTs-agarosa se basó en el procedimiento desarrollado por Hong Loh et al.¹⁰⁴ con modificaciones (Figura 4.13). Brevemente, se mezclaron 0,1 g de agarosa y 5,0 mL de agua en un vaso de precipitado. La mezcla se sumergió en un baño de agua a 80 °C. La solución se agitó magnéticamente hasta que la agarosa se disolvió por completo. En otro vaso de precipitado, se mezclaron 80 mg de MWCNTs con 5,0 mL de agua y se sonicaron en un baño ultrasónico durante 15 minutos. Luego, los MWCNTs dispersos se agregaron a la solución de agarosa. La mezcla final se calentó con agitación magnética a 80 °C durante 30 minutos para dispersar los MWCNTs en la agarosa y lograr un volumen final de 5,0 mL. La mezcla se colocó sobre un recipiente circular (5,0 cm de diámetro) y se enfrió a 25°C. El film obtenido se secó a 40°C durante 24 h. Las imágenes del film de MWCNT-agarosa obtenidas, antes y después del secado, se observan en la Figura 4.14.

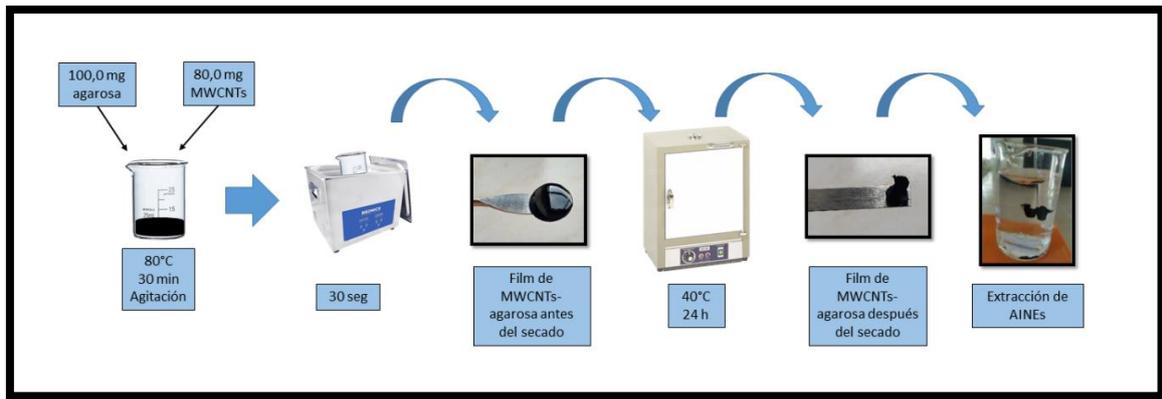


Fig 4.13 Esquema del procedimiento de preparación del film.

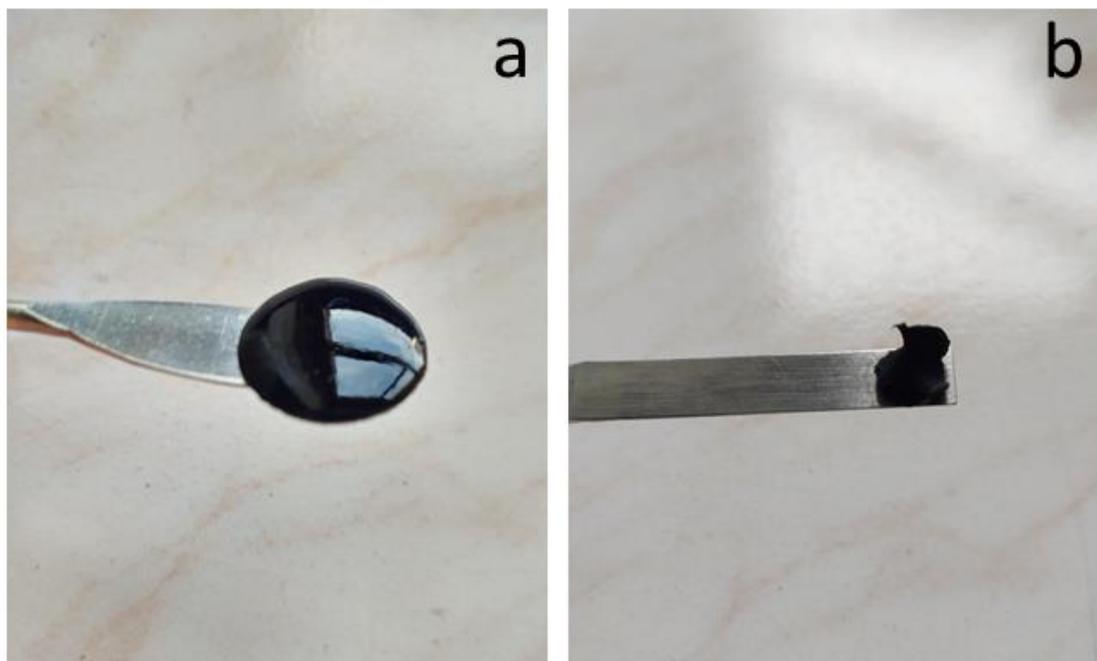


Fig 4.14 Imágenes del film de MWCNTs-agarosa antes (a) y luego (b) de su secado.

4.4.2.3 Procedimiento de SPE

En primer lugar, se llevó a cabo el acondicionamiento del film MWCNTs-agarosa. Para ello, se lo se sumergió en IPA durante 5 minutos y luego se lavó con agua destilada. A continuación, se colocó dentro de 250,00 mL de una solución estándar de la mezcla de los analitos o de muestra (ambas a pH 3,0) para llevar a cabo la extracción. La solución se agitó magnéticamente y se realizó la extracción

durante 30 minutos. Luego, el film se separó de la solución y se lavó con agua. Posteriormente, se colocó dentro de un vaso de precipitado que contenía 2,00 mL de ACN y se sonicó en un baño ultrasónico durante 5 minutos para la elución. Se retiró el film, y el eluato se evaporó hasta sequedad utilizando un sistema de evaporación al vacío a 30°C. Luego, el extracto se reconstituyó en 600 µL de la fase móvil. El blanco de extracción se realizó solución de ácido acético pH 3,0 aplicando el mismo procedimiento.

4.4.2.4 Muestreo y preparación de muestras

Las muestras fueron tomadas de varios puntos de muestreo del arroyo Napostá. Dos de ellos (1: 38° 40' 51.822"S 62° 14' 13.707"W; 2: 38°45'09.0"S 62°14'10.2"W) se ubicaron en la ciudad de Bahía Blanca y el otro (3: 38°32'00.1"S 61°52'26.4"W) en la localidad de Cabildo (Figura 4.15). Las muestras fueron acidificadas y mantenidas en heladera (4 °C) hasta su análisis. Antes del procedimiento de extracción, las muestras se dejaron a 25 °C, se homogeneizaron y se filtraron con un papel de filtro sin cenizas (4-12 µm de poro, Microclar, EE. UU.). Posteriormente, se tomaron alícuotas de 250,00 mL, se ajustó el valor de pH a 3,0 y se extrajeron siguiendo el procedimiento mencionado en la Sección 4.4.2.3.

Para evaluar la veracidad del método propuesto, se realizó un estudio de recuperación. Las muestras se enriquecieron con KEC, KEN y PIR a tres niveles de concentración dentro del intervalo lineal, por triplicado, al comienzo del proceso analítico.

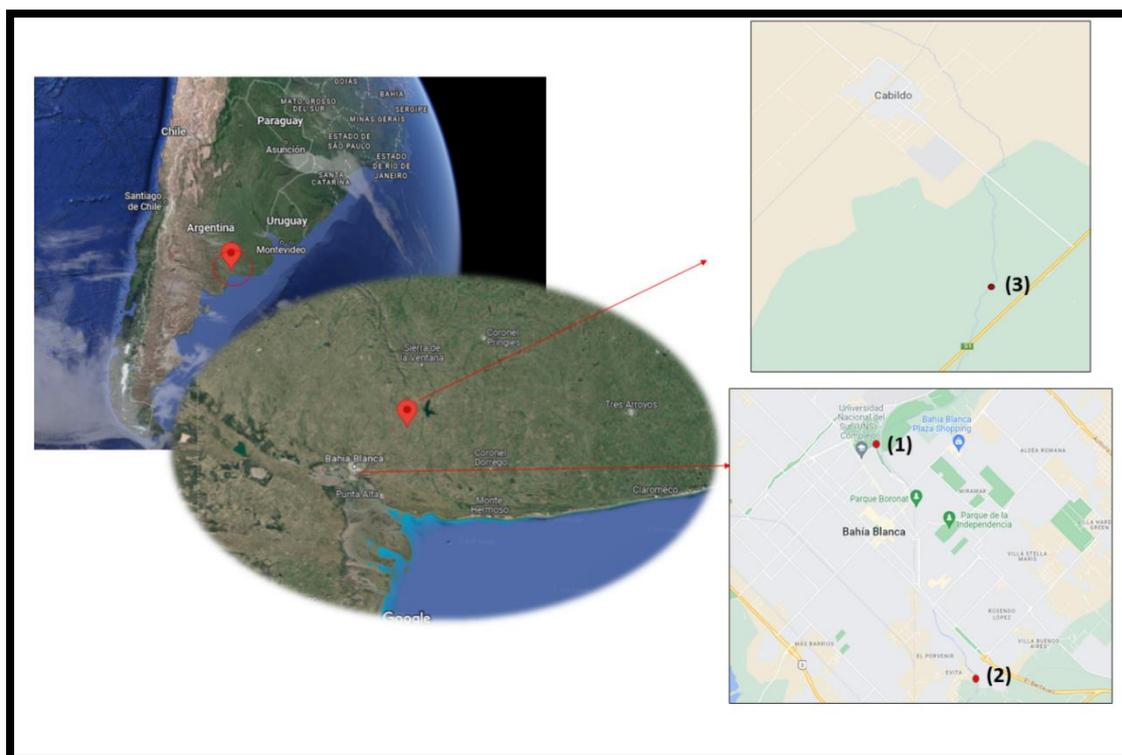


Fig. 4.15 Puntos de muestreo en la ciudad de Bahía Blanca (puntos 1 y 2) y Cabildo (punto 3)

4.4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.4.3.1 Optimización del procedimiento de preparación de films de MWCNTs-agarosa

La mayoría de los métodos de SPE que utilizan bioadsorbentes involucran el uso de varios films o múltiples piezas del mismo film^{104 105 106 107 162}. Esto puede causar dificultades durante el procedimiento de extracción, especialmente durante las etapas de lavado y elución. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo fue obtener un adsorbente único, con una alta eficiencia de extracción, que pueda reutilizarse tantas veces como sea posible. Para ello, se realizó la optimización del proceso de preparación del film. La concentración de agarosa se mantuvo constante en todos los experimentos. Al principio, los MWCNTs se dispersaron directamente en la solución de agarosa, pero se requería mucho tiempo para lograr una dispersión homogénea ya que los MWCNTs tendían a agregarse. Así, para asegurar la homogeneidad de la mezcla final, la dispersión de los MWCNTs se realizó en agua, asistida por ultrasonidos, antes de mezclarlos con la solución de agarosa. Se observó que la dispersión

de los MWCNTs en agua requirió 15 minutos. A tiempos menores, la dispersión fue incompleta, lo que resultó en tiempos más largos para alcanzar una mezcla homogénea con la solución de agarosa.

Para aumentar la capacidad de extracción del film de MWCNTs-agarosa, se evaluó una concentración de MWCNTs superior a la encontrada en la literatura^{103 106 160}. Por lo tanto, la cantidad de MWCNTs se estudió en un intervalo entre 30 y 120 mg. Los valores de recuperación más altos se obtuvieron cuando el film se preparó con 80 mg de MWCNTs. Cuando la cantidad de MWCNTs fue superior a 80 mg, el film se rompió en la etapa de secado.

La temperatura de la solución de agarosa se mantuvo en el intervalo entre 80°C y 85°C para asegurar la completa disolución de la misma. Se notó que, cuando la temperatura descendía por debajo de 75°C durante la preparación del film, éste se rompía durante el secado. Esto se atribuyó a una estructura más frágil, debido a una disolución incompleta de la agarosa, lo que dificultó los procesos de gelificación y secado.

El film de MWCNTs-agarosa se probó en el procedimiento de extracción con y sin paso de secado previo. Cuando el film no estaba seco, no fue posible la extracción de los analitos. Por ello, se evaluaron la temperatura y el tiempo de la etapa de secado. La temperatura se estudió entre 40°C y 60°C, y no se observó diferencia en la apariencia del film ni en los valores de recuperación en este intervalo de temperatura. Por lo tanto, se seleccionó 40°C como temperatura de secado. El tiempo de secado se probó entre 24 y 48 horas. Se obtuvieron valores de recuperación satisfactorios con 24 horas de secado. A tiempos menores, el film no se secó completamente, lo que llevó a valores de recuperación menores.

En la Tabla 4.4 se muestra una comparación de los diferentes procedimientos y formatos para adsorbentes a base de agarosa. Como se puede observar, los trabajos encontrados en bibliografía, emplean varios films o varias piezas de un mismo film. Además, para la preparación del film propuesto se utiliza una mayor concentración final de MWCNTs, con el objetivo de aumentar la eficiencia de extracción.

Tabla 4.4. Comparación de diferentes procedimientos y formatos para adsorbentes basados en agarosa

Solución de agarosa (g L ⁻¹) ¹	Adsorbente	Concentración (% m/v) ²	Temperatura (°C)	Paso de secado	Formato de film	Reutilización	REF
10	MWCNTs	0,30	100	40°C, 24 h	Piezas circulares de determinado tamaño (5 mm de diámetro)	No	104
10	C18	0,40	100	Temperatura ambiente, 48h	Pequeñas piezas cuadradas (1,5 cm x 1,5 cm)	n.i.	105
8	MWCNTs	0,14	n.i	Sin secado	Pequeñas piezas cúbicas (3x3x3 mm)	No	106
10	C18	0,50	90	60 °C, 48 h	Discos circulares de 5 mm de diámetro	n.i.	107
10	MWCNTs	0,20	90	60°C, 48 h	Piezas circulares de 5 mm de diámetro (0,15 mg MWCNTs cada uno)	No	162
10	MWCNTs	1,60	80	40°C, 24 h	Única pieza	Si (50 veces)	Este trabajo

¹Concentración inicial; ²Calculado en la solución final usada para el film; n.i.: No informado

4.4.3.2 Caracterización de los films de agarosa-MWCNTs

La morfología del film de agarosa-MWCNTs fue estudiada mediante SEM. En las microfotografías obtenidas se observó la homogeneidad superficial de los MWCNTs en la matriz de agarosa. La Figura 4.16 muestra la superficie de un film de agarosa después de su secado (a), y la superficie del film de MWCNTs-agarosa antes (b) y después (c) de su secado. Como se puede observar, mientras que la superficie del film de agarosa es lisa, la adición de MWCNTs genera mayor rugosidad que facilita la interacción entre los sitios activos del adsorbente y los analitos, mejorando el proceso de transferencia de masa y, por ende, su capacidad de extracción. Además, se puede observar que la superficie del film antes del secado es menos rugosa que la superficie del film después del secado, como se observa en las figuras 4.16 (d) y 4.16 (e), respectivamente. Además, la figura 4.16 (e) muestra una mezcla adecuada de los MWCNTs en la matriz de agarosa, lo que sugiere una buena dispersión y adhesión.

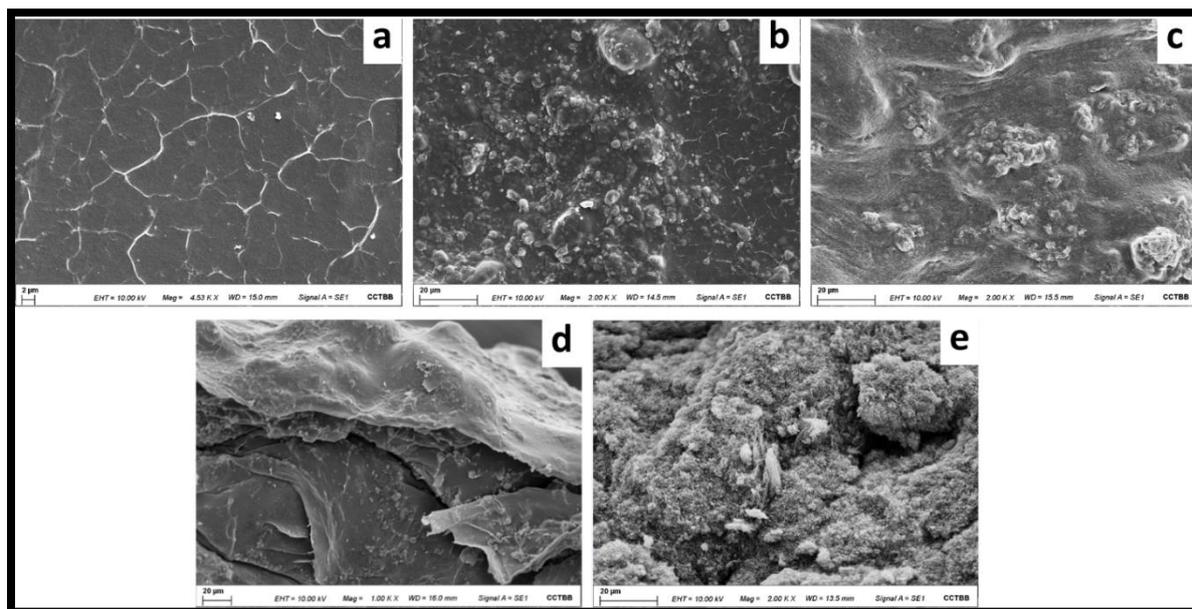


Fig 4.16 Caracterización del film MWCNTs-agarosa mediante SEM. (a) Morfología superficial SEM del film de agarosa después de su secado; (b) Morfología superficial SEM del film de MWCNTs-agarosa antes de su secado; (c) Morfología superficial SEM del film de MWCNTs-agarosa después de su secado; (d) SEM de la sección transversal del film de MWCNTs-agarosa antes del secado; (e) SEM de la sección transversal del film de MWCNTs-agarosa después del secado.

4.4.3.3 Optimización del procedimiento de extracción

El mecanismo de extracción del film se puede atribuir, principalmente, a las interacciones entre los MWCNTs y los analitos a través de interacciones hidrofóbicas y π - π ³⁷. En particular, las interacciones π - π se ven favorecidas por la estructura de los analitos que poseen anillos aromáticos y grupos funcionales cíclicos con dobles enlaces carbono-carbono conjugados. Para confirmar que la agarosa no intervino en la extracción, el procedimiento se realizó con un film preparado únicamente de este material. Como ejemplo, en la Figura 4.17 se observan los espectros correspondientes a la extracción de una solución de KET de concentración 2,0 mg L⁻¹ en donde se puede apreciar una mayor eficiencia de extracción en el film que contiene los MWCNTs.

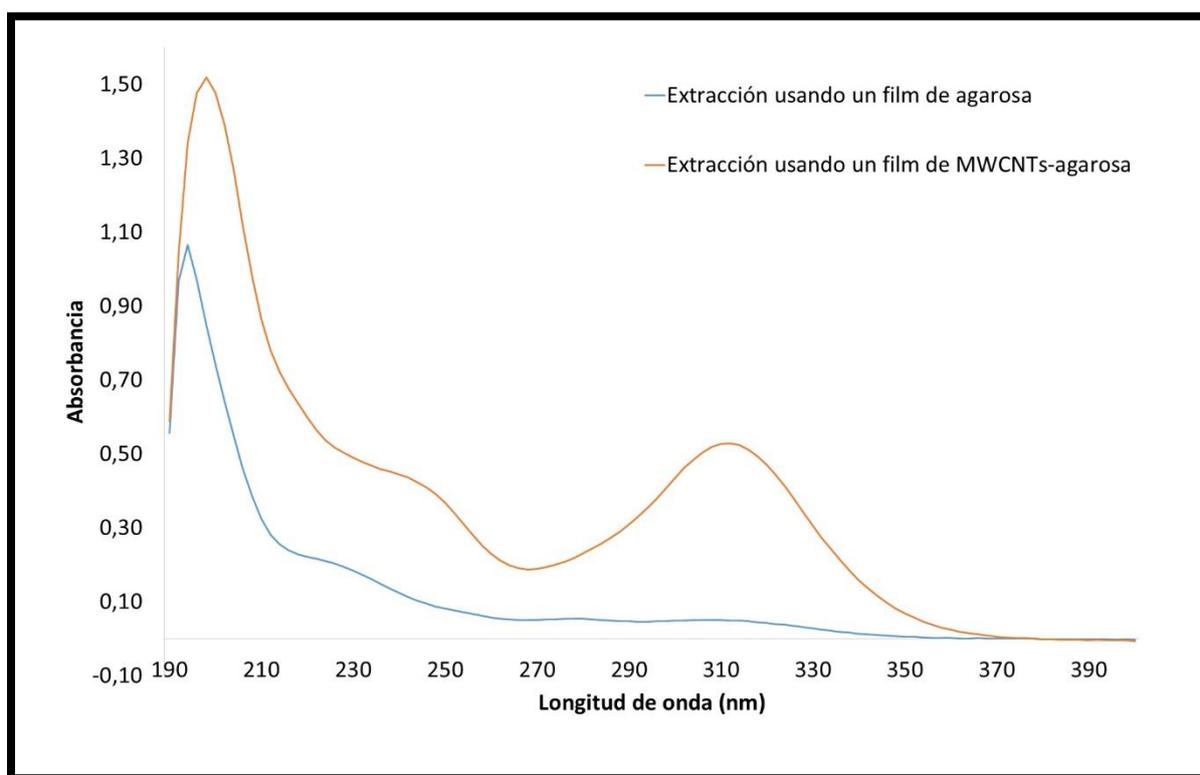


Fig 4.17 Comparación entre los espectros de la extracción de KET utilizando un film compuesto únicamente por agarosa y un film de MWCNTs-agarosa

Por lo tanto, para lograr una alta eficiencia de extracción, se optimizaron diferentes factores que pueden afectar las interacciones entre los MWCNTs y los analitos, incluidos el solvente de activación,

el tiempo de extracción, el valor de pH de la muestra, el eluyente y el volumen del eluyente, el volumen de la muestra y el tiempo de elución. Se probaron todas las variables para los tres analitos y los experimentos se realizaron por triplicado utilizando 50,00 mL de una solución estándar con una concentración de 0,10 mg L⁻¹ para los tres fármacos.

Valor de pH de la muestra

El pH de la muestra es un parámetro que influye fuertemente en la eficiencia de la extracción, principalmente para compuestos ácidos y básicos. Los AINEs son compuestos ácidos que existen principalmente en su forma molecular a valores de pH inferiores a sus valores de pK_a (KEC: 3,5; KEN: 4,0; PIR: 6,3)^{165 166 167}. Por lo tanto, se estudiaron los valores de pH en el intervalo entre 2,0 y 6,0, ajustando el pH con ácido acético. Se observó que, cuando el valor de pH de la solución fue de 3,0, la eficiencia de extracción aumentó significativamente para todos los analitos y se mantuvo constante a un pH menor. Por lo tanto, se seleccionó pH 3,0 para los siguientes experimentos.

¹⁶⁵ National Center for Biotechnology Information, 2022a. PubChem Compound Summary for CID 3826, Ketorolac. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketorolac>. Accessed March 7, 2023.

¹⁶⁶ National Center for Biotechnology Information, 2022b. PubChem Compound Summary for CID 3825, Ketoprofen. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ketoprofen>. Accessed March 7, 2023.

¹⁶⁷ National Center for Biotechnology Information, 2022c. PubChem Compound Summary for CID 54676228, Piroxicam. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Piroxicam>. Accessed March 7, 2023.

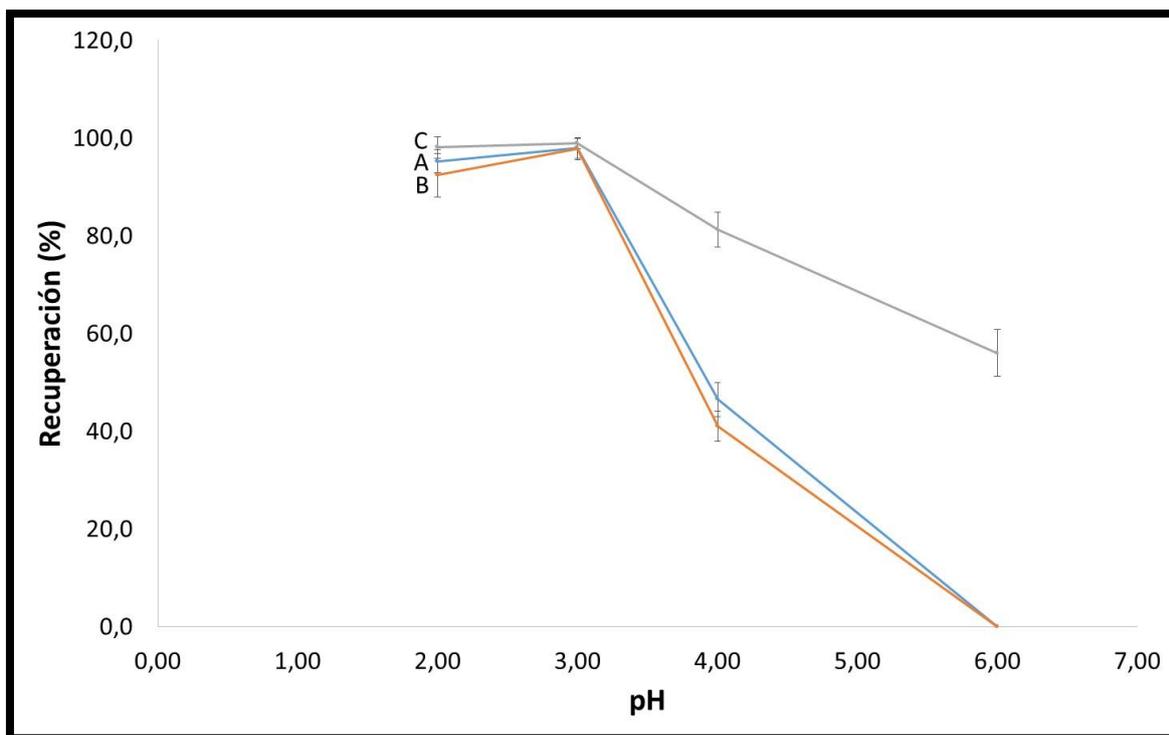


Fig 4.18 Optimización del pH en la recuperación de AINEs (2,00-6,00 con 250,0 mL de soluciones estándar de 1,0 mg L⁻¹) para (A) KEC, (B) KEN y (C) PIR.

Solvente de activación y tiempo de extracción

Primero, se realizó el procedimiento de extracción sin activación del adsorbente. Como se observó que los analitos no fueron extraídos por el film de MWCNTs-agarosa, se probaron como solventes de activación MeOH e IPA¹⁶⁸. Dado que el IPA es un solvente menos polar que el MeOH¹⁶⁸, las interacciones hidrofóbicas entre MWCNT y los analitos se vieron favorecidas por el uso de IPA, lo que llevó a una mayor eficiencia de extracción. Esto se puede observar en la Figura 4.19 que muestra, a modo de ejemplo, la diferencia entre los espectros de absorción UV a $\lambda=312$ para la extracción de una solución de KET de concentración 2,00 mg L⁻¹ cuando el film se activó con MeOH y cuando se activó con IPA. Por lo tanto, se seleccionó IPA para realizar la activación del film de MWCNTs-agarosa.

¹⁶⁸ M. Razali, C. Didaskalou, J. F. Kim, M. Babaei, E. Drioli, Y. M. Lee and G. Szekely, Exploring and Exploiting the Effect of Solvent Treatment in Membrane Separations, ACS Appl. Mat. Inter., 9(12), 11279-11289, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b01879>.

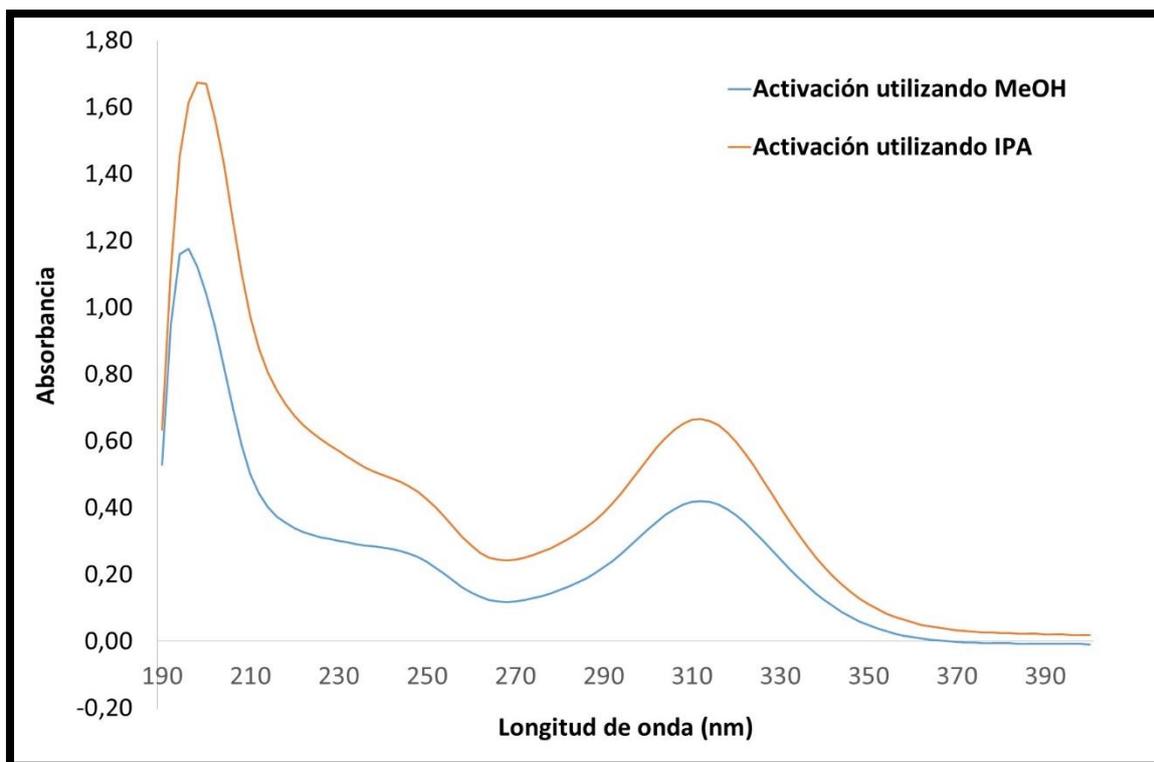


Fig 4.19 Comparación entre los espectros obtenidos para la extracción de KET ($\lambda=312$ nm) utilizando un film de MWCNTs-agarosa acondicionado con MeOH y un film acondicionado con IPA.

Por otro lado, el tiempo de extracción se estudió en el intervalo entre 10 y 40 minutos (Figura 4.20). Los porcentajes de recuperación mayores para los analitos se obtuvieron a los 30 minutos de extracción. A tiempos de extracción más largos, las recuperaciones permanecieron constantes.

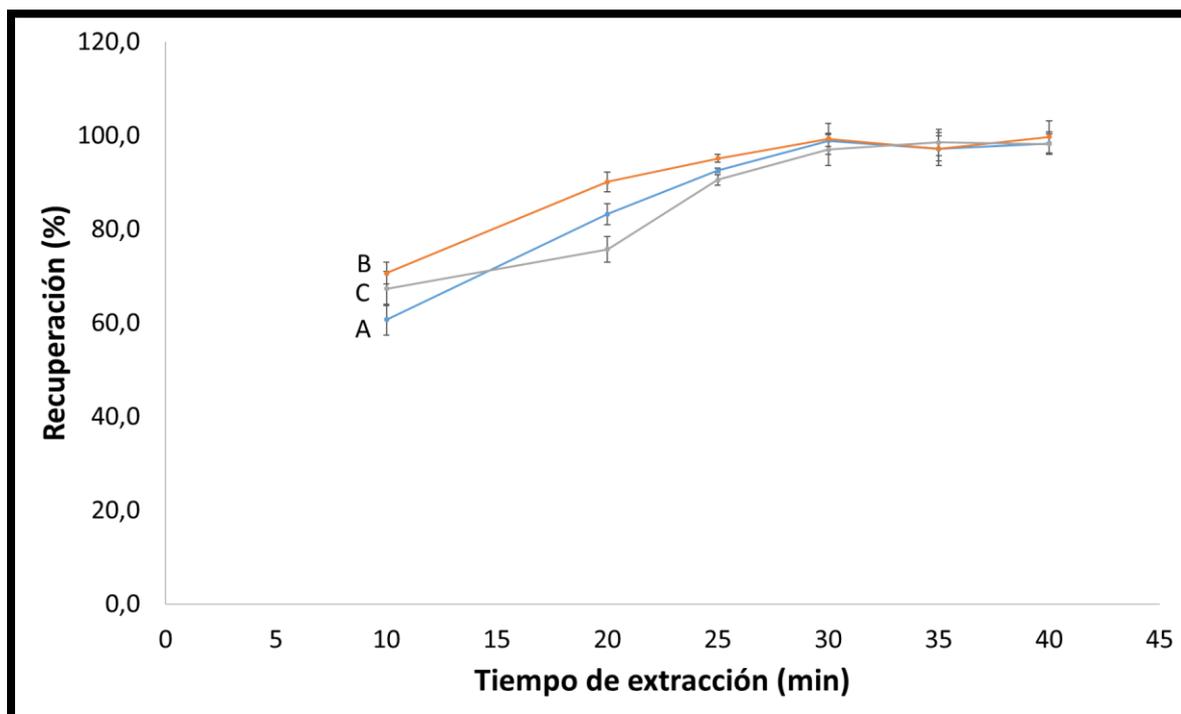


Fig 4.20 Optimización del tiempo de extracción en la recuperación de AINEs (10-40 min con 250,0 mL de soluciones estándar de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) para (A) KEC, (B) KEN y (C) PIR.

Tipo de eluyente, volumen y tiempo de elución

Se probaron MeOH y ACN como posibles solventes de elución. Para realizar la optimización se siguió el procedimiento de extracción para cada analito, según la Sección 4.4.2.3, y se eluyó con 2,0 mL del eluyente. El uso de MeOH dio como resultado blancos de extracción más altos que el ACN. También, se probaron mezclas de ACN:agua (70:30, 50:50 y 40:60), observándose una disminución de las recuperaciones de los analitos a medida que aumentó el porcentaje de agua. Por lo tanto, se eligió ACN como solvente de elución.

El volumen de ACN necesario para realizar la elución cuantitativa de los analitos se estudió en el intervalo entre 2,00 y 5,00 mL. 2,00 mL de ACN fue el volumen mínimo necesario para cubrir completamente el film de MWCNTs-agarosa. El mayor valor de recuperación se obtuvo con un volumen de 2,00 mL de eluyente (Figura 4.21). La disminución de los valores de recuperación por encima de este volumen se pueden atribuir a un efecto de dilución. Debido al bajo volumen de elución,

el paso de elución fue asistido por ultrasonido ya que la agitación de la solución provocó la ruptura del film.

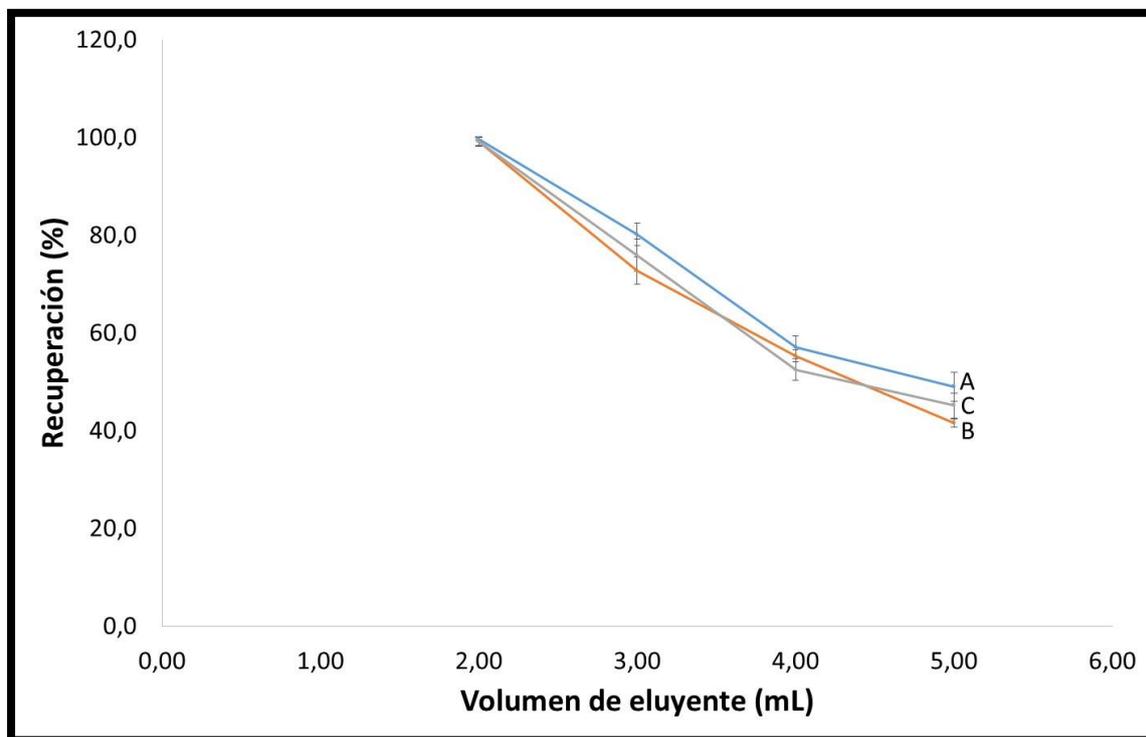


Fig 4.21 Optimización del volumen de eluyente en la recuperación de AINEs (2,00-5,00 mL con 250,0 mL de soluciones estándar de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$) para (A) KEC, (B) KEN y (C) PIR).

El tiempo de elución se probó en el intervalo entre 2 y 15 minutos (Figura 4.22). Los porcentajes de recuperación mayores para todos los AINEs se lograron a los 5 minutos de elución y no hubo un aumento sustancial en las recuperaciones a tiempos mayores.

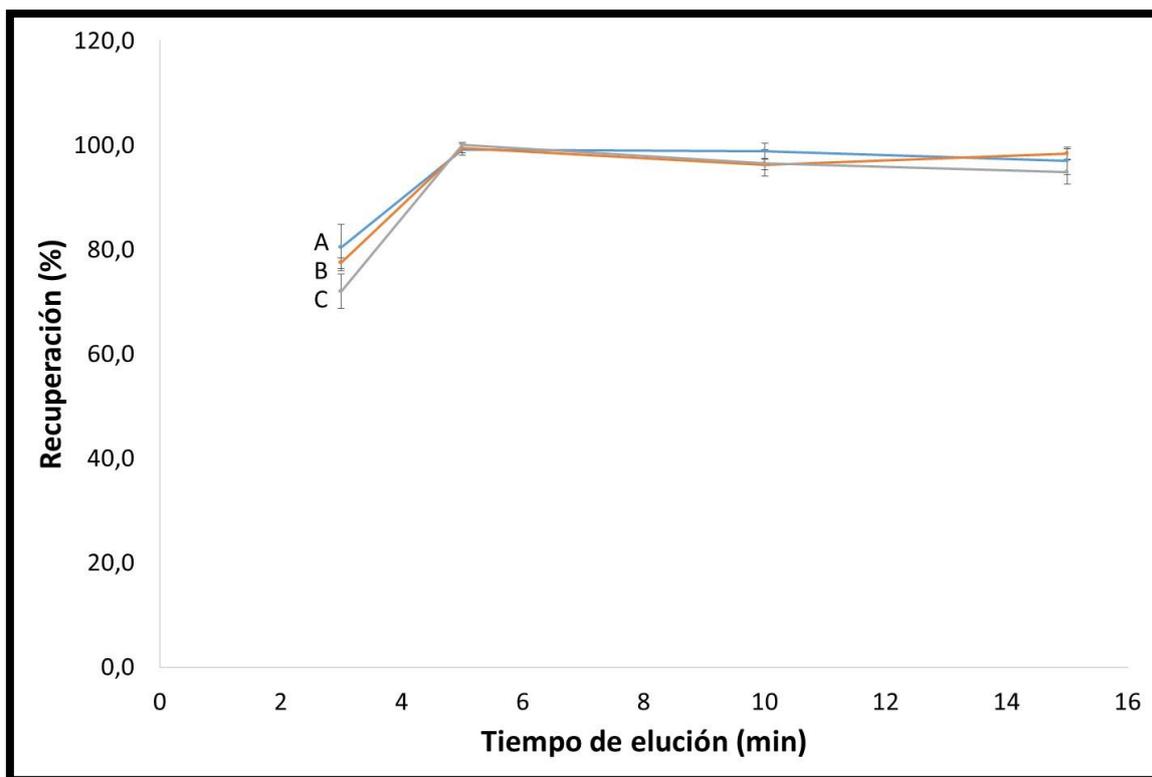


Fig 4.22 Optimización del efecto del tiempo de elución en los porcentajes de recuperación de los AINEs (2-15 min con 250,0 mL de soluciones estándar de 1,0 mg L⁻¹) para (A) KEC, (B) KEN y (C) PIR.

Volumen de muestra

Se estudió el volumen de muestra adecuado para la extracción de los analitos sumergiendo el film de MWCNTs-agarosa en volúmenes crecientes la muestra, en el intervalo entre 10,00 mL y 500,00 mL, manteniendo la masa de los analitos constante y empleando el mismo volumen de elución. Los datos experimentales se muestran en la Figura 4.23 Como se puede observar, los porcentajes de recuperación no variaron significativamente (95,5-100,0 %) cuando el volumen de muestra aumentó de 10,00 a 250,00 mL para los tres analitos. A volúmenes mayores, las recuperaciones de KEC y KEN disminuyeron. Por lo tanto, se seleccionó 250,00 mL como el volumen de muestra óptimo.

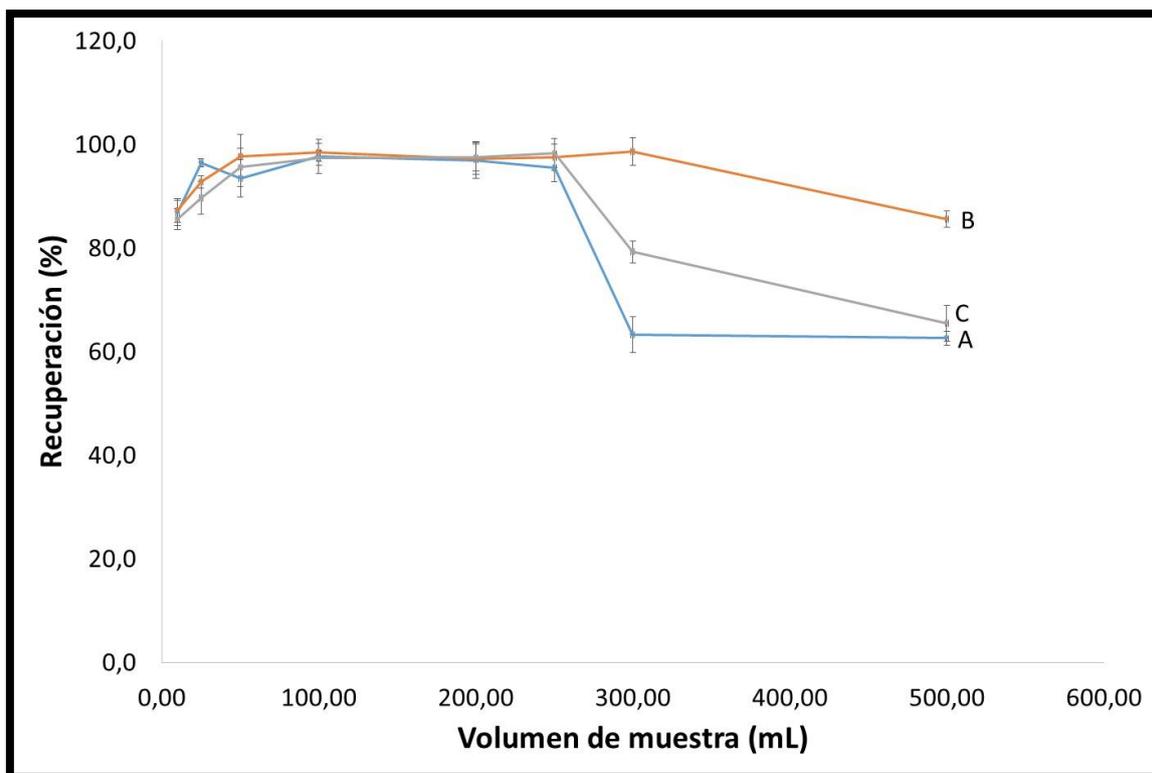


Fig 4.23 Optimización del volumen de ruptura en los porcentajes de recuperación de los AINEs (10,00-500,00 mL con 250,0 mL de soluciones estándar de 1,0 mg L⁻¹) para (A) KEC, (B) KEN y (C) PIR).

4.4.3.4 Reutilización del film de MWCNTs-agarosa

La reutilización y la estabilidad del adsorbente son factores importantes para evaluar su desempeño. Por esta razón, el film de MWCNTs-agarosa se sometió diariamente a ciclos consecutivos de adsorción/elución en las condiciones óptimas de extracción. Al final de la jornada de trabajo, el film se lavó con ACN y agua destilada, y luego se secó hasta su reutilización. El film se utilizó hasta 50 veces sin pérdida de la capacidad de extracción de los analitos en estudio.

El uso de biopolímeros como soporte para la inmovilización de los adsorbentes es importante no solo porque el material obtenido es no tóxico y potencialmente biodegradable, sino también para evitar otros tipos de inmovilización, como por ejemplo la funcionalización del material, lo que requiere reactivos orgánicos que pueden contaminar el ambiente. Sin embargo, en los trabajos que se pueden encontrar en la literatura, los bioadsorbentes propuestos no son reutilizables o se usan pocas veces y se descartan después de cada extracción de muestra (Tabla 4.4). Esto representa una gran desventaja

ya que, aunque son materiales biodegradables, la preparación de films diferentes para cada extracción reduce la reproducibilidad del método, aumenta la cantidad de reactivos necesarios y requiere mucho tiempo.

4.4.3.5 Parámetros analíticos

La Tabla 4.5 muestra las cifras analíticas de mérito que se calcularon para evaluar el método propuesto. Se construyeron curvas de calibración, luego de realizar el procedimiento de extracción de una mezcla de las soluciones estándar de los analitos, en el intervalo entre 0,10 y 1,20 $\mu\text{g L}^{-1}$. En todos los casos, se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0,99. Los valores de LOD fueron 0,0089, 0,0075 y 0,0082 $\mu\text{g L}^{-1}$ para KEC, KEN y PIR, respectivamente, y los valores de LOQ fueron 0,030, 0,025 y 0,027 $\mu\text{g L}^{-1}$ para KEC, KEN y PIR, respectivamente. La repetibilidad se evaluó calculando el RSD % con los valores obtenidos cuando el análisis se realizó con una solución estándar de 0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada compuesto cinco veces en un día. Para estudiar la precisión intermedia, la solución de la misma concentración se midió por triplicado en tres días consecutivos. Los valores %RSD obtenidos demostraron una alta precisión del método de extracción.

Tabla 4.5. Parámetros analíticos del método propuesto para la determinación de los AINEs

Analitos	Intervalo Lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	LOD ¹ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ² ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidad (RSD%) ³	Presición intermedia (RSD%) ⁴	Ecuación de regresión
KEC	0,10-1,20	0,997	0,0089	0,030	0,46	3,13	$y=90300 (\pm 1910)x + 7300 (\pm 268)$
KEN	0,10-1,20	0,998	0,0075	0,025	1,20	3,08	$y=193000 (\pm 3330)x - 3150 (\pm 483)$
PIR	0,10-1,20	0,998	0,0082	0,027	0,99	2,90	$y=144000 (\pm 2700)x + 1630 (\pm 394)$

¹LOD calculado como $3s/A$, donde, s: desviación estándar, A: pendiente de la curva de calibración. ²LOQ calculado como $10s/A$, donde, s: desviación estándar, A: pendiente de la curva de calibración. ³ $n=5$, 0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$; ⁴ 0,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, medida por triplicado durante 3 días.

4.4.3.6 Aplicación a muestras de aguas naturales

Se evaluó la aplicabilidad del film de MWCNTs-agarosa en la extracción de los analitos de muestras de aguas naturales. Las muestras se tomaron en diferentes puntos del arroyo Napostá (puntos de muestreo 1 y 2), y el punto de muestreo 3 se tomó del arroyo Napostá chico (Sección 4.4.2.3). Los sitios de muestreo se seleccionaron en lugares estratégicos en la ciudad de Bahía Blanca y en la región¹⁶⁹. Así, el punto 1 fue seleccionado antes del paso del arroyo por la ciudad y el punto 2 en la desembocadura del arroyo y antes de su ingreso al estuario.

Aunque los puntos de muestreo se seleccionaron teniendo en cuenta una posible contaminación del agua, no se encontraron residuos de los compuestos de interés en concentraciones superiores al límite de cuantificación del método.

Para evaluar la veracidad del método propuesto, se realizó un estudio de recuperación. Para eso, las muestras fueron enriquecidas al inicio del proceso analítico y tratadas como se describe en la Sección 4.4.2.3. En la tabla 4.6 se muestran las concentraciones añadidas (0,30, 0,60 y 1,10 $\mu\text{g L}^{-1}$) y las recuperaciones obtenidas para KEN, KEC y PIR, las cuales oscilaron entre 82,0 % y 109,0 %, con la mayoría de los resultados entre 90,0 y 103,3 %.

Tabla 4.6. Estudio de recuperación para la extracción y determinación de los AINEs en muestras de aguas naturales.

Muestras ¹	Concentración de fortificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Recuperación (%)		
		KEN	KEC	PIR
Arroyo Napostá (1) ²	0,30	90,0	106,7	97,0
	0,60	85,0	108,3	98,3
	1,10	82,7	109,0	99,1

¹⁶⁹ M. E. Streitenberger and M. D. Baldini, Streitenberger, Aporte de los afluentes a la contaminación fecal del estuario de Bahía Blanca, Argentina, Rev. Int. Contam. Ambie., 32(2), 243-248, 2016.

Arroyo Napostá (2)²	0,30	100,0	106,7	90,0
	0,60	91,7	100,0	96,0
	1,10	96,4	99,1	99,1
Arroyo Napostá Chico (3)	0,30	103,3	100,0	100,0
	0,60	83,3	99,1	82,0
	1,10	102,7	99,7	99,1

¹ Las recuperaciones se calcularon por triplicado. ² (1) y (2) fueron puntos de muestreo diferentes.

La Figura 4.24 muestra los cromatogramas de las soluciones estándar de los analitos a una concentración de 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$, y de las muestras enriquecidas al mismo nivel de concentración para su comparación.

Para evaluar el efecto de matriz, se comparó la pendiente de la curva de calibración construida con los testigos y la pendiente de la curva de calibración construida utilizando una muestra enriquecida con los mismos niveles de concentración⁸⁶. En el nivel de probabilidad calculado ($p > 0,1$), no hubo diferencia significativa entre las pendientes. Por lo tanto, se puede concluir que no hubo efecto matriz.

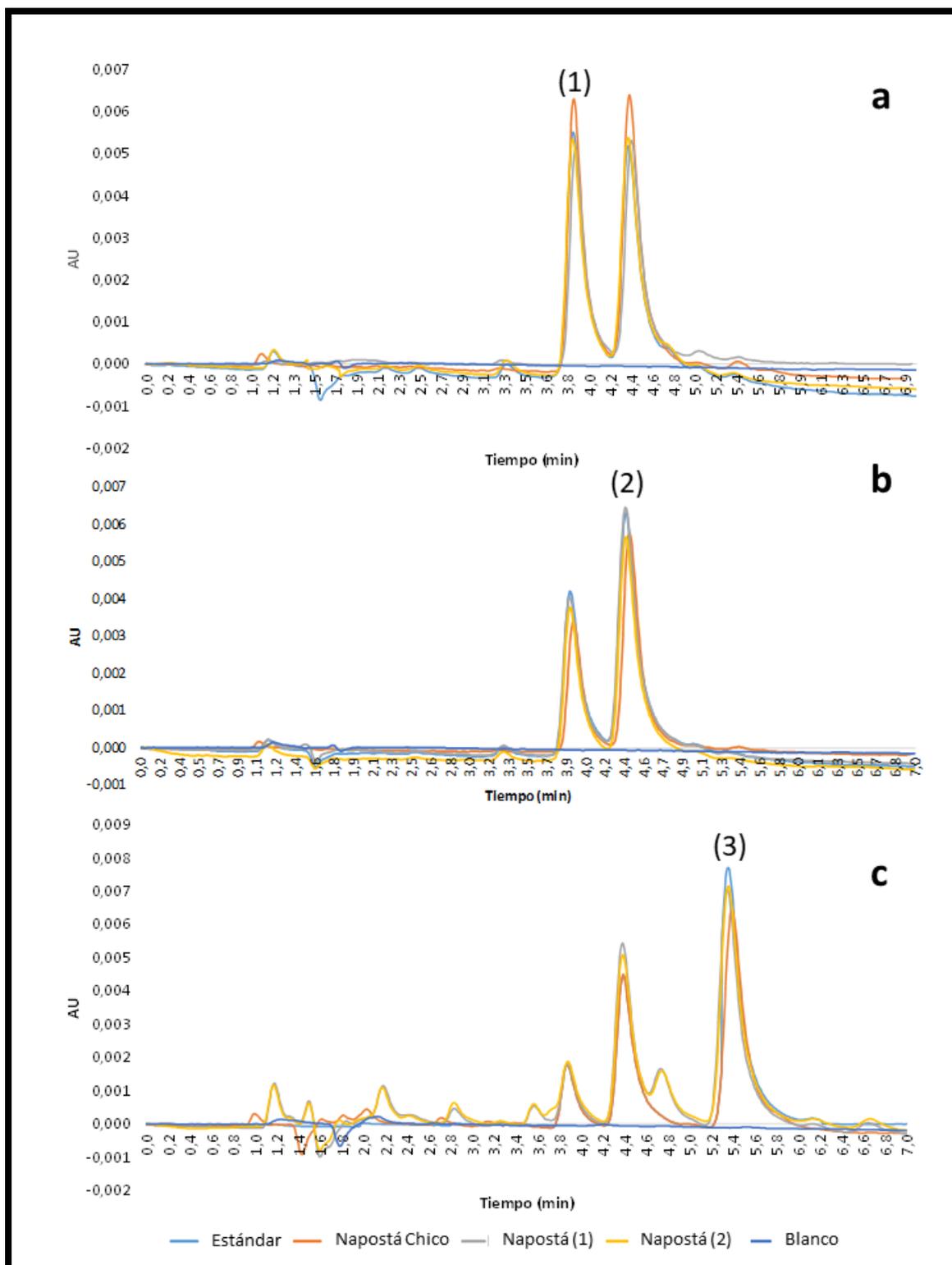


Fig 4.24 Cromatogramas de la solución estándar y muestras de agua enriquecidas medidas a $\lambda = 310$ nm para KEC (a), $\lambda = 326$ nm para PIR (b) y $\lambda = 254$ nm para KEN (c). Identificación de picos: (1) KEC, (2) PIR y (3) KET.

Condiciones de extracción: volumen de muestra, 250,00 mL; concentración de AINEs, $0,30 \mu\text{g L}^{-1}$; masa de MWCNTs, 80 mg; pH de la muestra, 3,0; volumen de eluyente, 2,00 mL. Condiciones cromatográficas: Columna Gemini C18 Phenomenex de $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$; fase móvil: ACN-ácido fórmico 0,07% (v/v), 50:50 (v/v); caudal: $1,0 \text{ mL min}^{-1}$; volumen de inyección: $10 \mu\text{L}$.

En la Tabla 4.7 se muestran los diferentes métodos de SPE que se han encontrado en la literatura para la extracción de los analitos estudiados, comparados en términos de técnica de extracción, tipo de adsorbente, parámetros de SPE, reutilización del adsorbente, técnica de detección, LOD y valores %RSD. El uso de menor cantidad de adsorbente y menor volumen de solvente orgánico fueron las principales ventajas del método propuesto, junto con la reutilización del film de MWCNTs-agarosa. Como se puede observar, fue posible obtener factores de preconcentración comparables con la mayoría de los métodos encontrados en la literatura. Además, el valor LOD obtenido fue significativamente menor que los LODs de los métodos que utilizan la misma técnica de detección. Más aun, el LOD obtenido fue comparable con algunos de los métodos que utilizan la espectrometría de masas como técnica de detección. En cuanto a %RSD, los valores obtenidos fueron similares o incluso inferiores a los métodos publicados.

Tabla 4.7. Comparación de los métodos de SPE publicados para la determinación de AINEs

Analitos	Técnica de extracción	Adsorbente	Cantidad de adsorbente (mg)	Volumen de eluyente (mL)	Volumen de muestra (mL)	Reutilización del adsorbente	Técnica de detección	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Ref.
Ácido tolfenámico, naproxeno, ácido clofíbrico, diclofenac, indometacina, ibuprofeno, aspirina, ketoprofeno	SPE	PANI/Pan NFsM	3	0,5	10	Si (20 veces)	UPLC-MS/MS	0,2-5,0 ng L^{-1}	0,4-11,1**	122
Ketorolac	SPE	C18	1000	5,0	250	n.i.	HPLC-UV	2,83	1,8	137
Ketoprofeno, naproxeno, piroxicam, diclofenac, indometacina, carprofeno, ácido meclofenámico	SPE	Strata-X	200	6,0	200	n.i.	HPLC-Q-Orbitrap-HRMS	3,7-11,7 ng L^{-1}	6,2-32,7*	142
Ketoprofeno, naproxeno, diclofenac, ibuprofeno	SPE	Strata- X	200	6,0	200	n.i.	HPLC-Q-Orbitrap-HRMS	n.i.	4,2-56**	143
Ketoprofeno	SPE	Oasis®HLB	n.i	n.i	2,5	n.i	HPLC-MS/MS	n.i.	2-20	144

Ketoprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, diclofenac sódico e ibuprofeno	SPE	CF@UiO-66-NH ₂	50	0,5	20	Si (5 veces)	UPLC-PDA	0,12-3,50	2,36-8,49	147
Ácido tolfenámico, diclofenac, flunixinina, ibuprofeno, carprofeno, ketoprofeno, ácido mefenámico, meloxicam, naproxeno, ácido niflúmico, vedaprofeno, ácido flufenámico	SPE	CNTs	20	10,0	100,0	n.i.	LC-QqQ-MS/MS	0,01-1,3 ng L ⁻¹	2-14***	148
Ácido 1-naftilacético, naproxeno, ibuprofeno, ketoprofeno	MSPE	Fe ₃ O ₄ @MO N-PEI ₆₀₀	4,0	0,4	10,0	Si (8 veces)	HPLC-UV	0,042-0,149	0,3-4,5***	150
Naproxeno, sal sódica de diclofenac, ácido mefenámico	SPME	Film de agarose-quitosano-MWCNTs	0,6 (cuatro discos por extracción)	0,1	10	No	HPLC-UV	0,89-8,05	1,03-4,59**	151
Carprofeno, ácido mefenámico naproxeno, diclofenac, ketoprofeno	SB-SPE	MIL-101(Cr)/PVA	60 mg mL ⁻¹	1,0	10,0	Si	HPLC-MS/MS	0,011-0,093	1,67-9,52	

Ketorolac, piroxicam, ketoprofeno	Film de agarosa- MWCNTs	80	2,0	250,0	Si (50 veces)	HPLC-DAD	0,06- 0,07	2,90- 3,13	Nuestro trabajo
--	-------------------------------	----	-----	-------	---------------	----------	---------------	---------------	--------------------

MSPE: Extracción en fase sólida magnética; SB-SPE: extracción por adsorción con barra agitadora * Calculada de las muestras

** Calculada de las muestras a diferentes niveles de concentración

*** Calculada a diferentes niveles de concentración

4.4.4 CONCLUSIÓN

Para la inmovilización de los MWCNTs se utilizó agarosa, que es un material no tóxico, renovable y biodegradable. El film de MWCNTs-agarosa presentó excelentes propiedades adsorbentes y permitió la extracción y preconcentración de KEC, KEN y PIR, obteniendo parámetros analíticos satisfactorios. Además, el film fue reutilizado hasta 50 veces sin perder su capacidad de extracción. Por otro lado, fue posible realizar la extracción con un solo film, lo que simplificó notablemente el procedimiento experimental. El método propuesto se aplicó con éxito para la cuantificación de los analitos seleccionados en muestras de aguas naturales de la región de Bahía Blanca, con resultados satisfactorios.

4.5 Preparación de un film magnético de grafeno y agarosa para la extracción y preconcentración de progestinas

4.5.1 INTRODUCCIÓN

La extracción en fase sólida magnética (MSPE) emplea adsorbentes magnéticos o modificados magnéticamente para extraer analitos de manera altamente eficiente, lo que representa un gran potencial para el pretratamiento de muestras en análisis ambiental¹⁷⁰. Esta técnica no solo evita los lentos procedimientos de empaquetamiento de columnas SPE, la carga de muestras y filtración o centrifugación sino que también simplifica el proceso operativo de extracción¹⁷¹. La MSPE consiste en la dispersión del adsorbente magnético en la solución acuosa de la muestra durante un determinado tiempo de extracción. Posteriormente, el adsorbente se recoge mediante el uso de un campo magnético externo, y se coloca en un recipiente adecuado para llevar a cabo el paso de elución. Nuevamente, el adsorbente se retira mediante la ayuda de un imán, se lava y se recupera para su reutilización¹⁷².

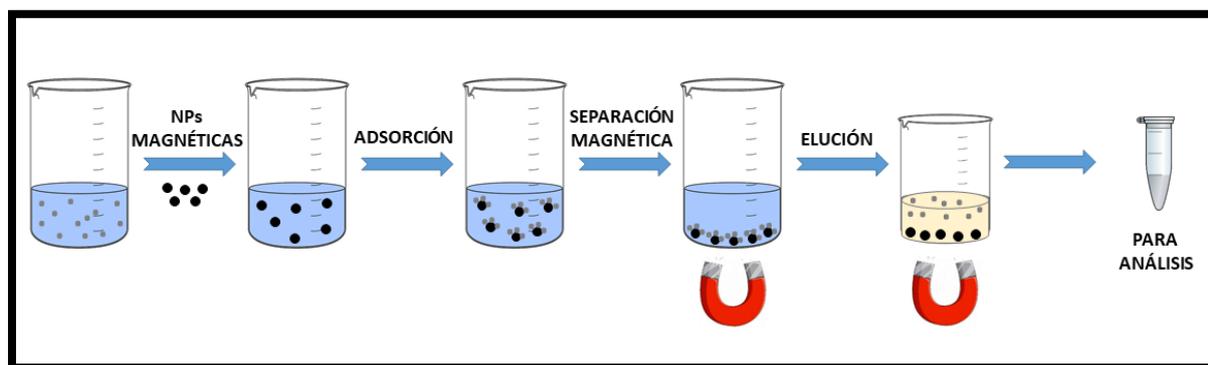


Fig 4.25 Esquematización de una MSPE convencional según ref ¹⁷³

¹⁷⁰ W. Li, Y. Shi, Recent advances and applications of carbon nanotubes based composites in magnetic solid-phase extraction, *Trends Anal. Chem.*, 118, 652-665, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.06.039>.

¹⁷¹ T. Huang, X. Tang, K. Luo, Y. Wu, X. Hou, S. Tang, An overview of graphene-based nanoadsorbent materials for environmental contaminants detection, *Trends Anal. Chem.*, 139, 116255, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116255>.

¹⁷² M. Faraji, M. Shirani, H. Rashidi-Nodeh, The recent advances in magnetic sorbents and their applications, *Trends Anal. Chem.*, 141, 116302, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116302>

¹⁷³ H. L. Jiang, N. Li, L. Cui, X. Wang, R. S. Zhao, Recent application of magnetic solid phase extraction for food safety analysis, *Trends Anal. Chem.*, 120, 115632, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.115632>.

En los últimos años, se han estudiado varios adsorbentes magnéticos para la extracción y determinación de contaminantes emergentes en muestras acuosas, como por ejemplo, microesferas de nanoláminas de poliimida magnética para la determinación de estrógenos¹⁷⁴, estructuras orgánicas covalentes magnéticas para la determinación de parabenos¹⁷⁵ y nanopartículas de Fe₃O₄/palmitato para la determinación de hormonas esteroideas¹⁷⁶, entre otros.

Los nanomateriales magnéticos basados en GO/Fe₃O₄ han sido usados en el tratamiento de agua debido a sus grupos funcionales oxigenados que favorecen el proceso de adsorción de muchos contaminantes¹⁷⁷.

En este trabajo se preparó un film compuesto por agarosa y G funcionalizado con nanopartículas magnéticas (G-NPM) para la extracción y preconcentración de LV, PRO, NET y MPG. Se optimizó la preparación del film y se aplicó para la determinación de los compuestos de interés en aguas naturales.

4.5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.5.2.1 Preparación de soluciones e instrumentación

Se diluyó la cantidad adecuada de LV y NET, PRO y MPG en MeOH (≥99%, Sigma-Aldrich, Alemania), para preparar las respectivas soluciones patrón de 1000 mg L⁻¹. Las mismas se almacenaron en recipientes oscuros a 4°C. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente diluyendo un volumen

¹⁷⁴ Y. Du, X. Yan, Y. Chen, Y. Wu, Q. Qiu, Y. Li, D. Wu, Magnetic polyimide nanosheet microspheres for trace analysis of estrogens in aqueous samples by magnetic solid-phase extraction-gas chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1675, 463184, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463184>

¹⁷⁵ X. S. Yang, J. Zhao, L. L. Wang, Core–shell-structured magnetic covalent organic frameworks for effective extraction of parabens prior to their determination by HPLC, *Microchim. Acta* 189, 340, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00604-022-05444-w>

¹⁷⁶ R. A. Pérez, B. Albero, J. L. Tadeo, Analysis of Steroid Hormones in Water Using Palmitate-Coated Magnetite Nanoparticles Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Chromatographia* 77, 837–843, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2688-7>

¹⁷⁷ F. Nunes Ferreira, A. P. Benevides, D. Vargas Cesar, A. S. Luna, J. Santos de Gois, Magnetic solid-phase extraction and pre-concentration of 17β-estradiol and 17α-ethinylestradiol in tap water using maghemite-graphene oxide nanoparticles and determination via HPLC with a fluorescence detector, *Microchem. J.*, 157, 104947, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104947>.

adecuado de las soluciones patrón con una solución de ácido acético de pH 3,0 (Sintorgan, Argentina). La agarosa (BioReagent, para biología molecular, bajo EEO) se compró a Sigma-Aldrich (Alemania). Para la fase móvil se utilizó ACN ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, Alemania). El alcohol isopropílico, IPA ($\geq 99,8\%$) se adquirió de Dorwil (Argentina). El G fue suministrado por Mk Nano (Canadá). El sulfato férrico nanohidratado y sulfato ferroso heptahidratado se adquirieron de Mallinckrodt Chemical Works (USA). Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua ultrapura. Las muestras se filtraron con papel de filtro sin cenizas (4-12 μm de poro, Microclar, EE. UU.). La separación por HPLC se llevó a cabo en un equipo HPLC Waters 600 (Waters, EE. UU.) combinado con un detector de arreglo lineal de fotodiodos (PDA). Los analitos se separaron utilizando una columna Zorbax C18 (150 mm \times 4,6 mm, 5 μm , Agilent) en modo isocrático. Para la fase móvil se utilizó ACN y agua ultra-pura en una proporción 50:50 (v/v). La temperatura de la columna, el volumen de inyección y el caudal fueron de 25 °C, 50 μL y 1,0 mL min^{-1} , respectivamente. Los analitos separados se detectaron a 240 nm.

Para la preparación de las nanopartículas de G-NPM se empleó un baño ultrasónico Cole-Parmer EW-08895-16. El film de G-NPM-agarosa se secó en una estufa (Modelo SL30S, San Jor, Argentina). Se utilizó un sistema evaporador al vacío (Speed-Vac SPD11V, Thermo Fisher Scientific, Argentina) para evaporar el solvente.

La caracterización de los films de G-NPM-agarosa se realizó con un Microscopio Electrónico de Barrido, SEM (LEO, EVO 40 XVP) con detector de electrones secundarios (SE).

4.5.2.2 Procedimiento de preparación del G funcionalizado con las NPMs

El procedimiento para funcionalizar el G fue el propuesto por Li et al.¹⁷⁸. Brevemente, 0,70 g de G, 4,17 g de sulfato ferroso heptahidratado y 5,62 g de sulfato férrico nonahidratado se dispersaron en 200,0 mL de una mezcla de agua y etanol 1:1 (v/v). Se agregó 0,80 mL de ácido clorhídrico a la mezcla, se sonicó durante 5 min y, posteriormente, se agitó durante 10 minutos a temperatura ambiente. La

¹⁷⁸ Li X., Li S., Bai J., Peng Y., Ning B., Shi H., Kang W., Zhou H., Gao Z., Determination of Bisphenol A by High-Performance Liquid Chromatography Based on Graphene Magnetic Dispersion Solid Phase Extraction. *J. Chromatogr. Sci.* 58(3), 280-286, 2020. <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmz103>

temperatura de reacción se fue incrementado gradualmente y se mantuvo a 80°C. Luego se agregaron 80,0 mL de amoníaco a la mezcla para ajustar el pH a un valor mayor a 10,0 y se agitó durante 40 minutos. El producto se lavó con agua ultrapura y etanol para eliminar impurezas, y se secó a 40°C durante 24 h.

4.5.2.3 Procedimiento de preparación del film

Para la preparación del film, se mezclaron 80 mg de agarosa y 5,0 mL de agua en un vaso de precipitado y se sumergieron en un baño de agua a 80 °C. La solución se agitó magnéticamente hasta que la agarosa se disolvió por completo. En otro vaso de precipitado, se mezclaron 300 mg de las G-NPMs con 5,0 mL de agua y se sonicaron en un baño ultrasónico durante 10 minutos. Luego, las G-NPMs dispersadas se calentaron a 80°C durante 5 minutos y se agregaron a la solución de agarosa. La mezcla final se calentó con agitación magnética a 80 °C durante 30 minutos hasta un volumen final de 5,0 mL. La mezcla se colocó en un recipiente circular (5,0 cm de diámetro) y se dejó enfriar a temperatura ambiente. El film obtenido se secó en estufa a 40°C durante 15 h.

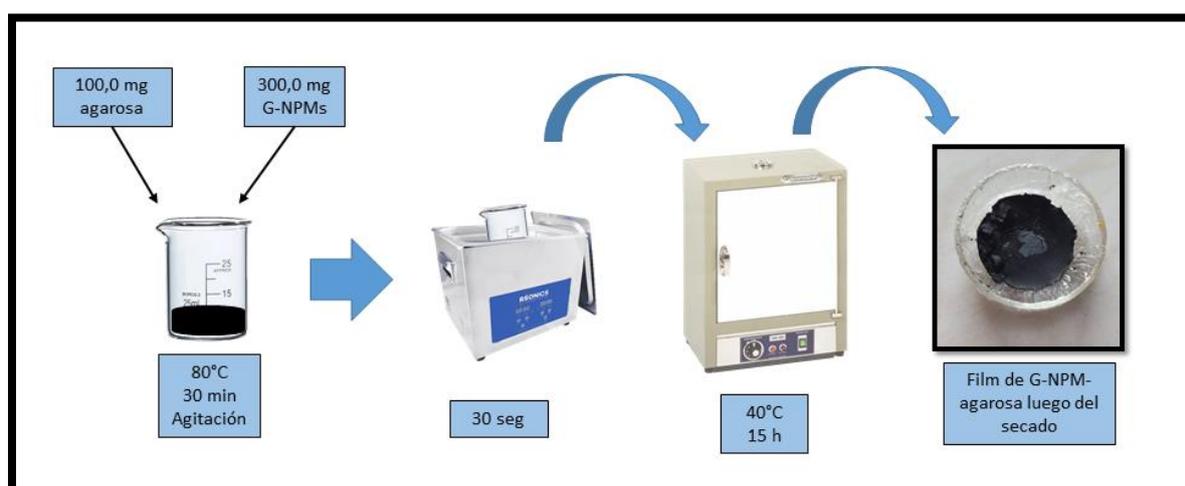


Fig 4.26 Esquematación del procedimiento de preparación del film de G-NPMs-agarosa

4.5.2.4 Procedimiento SPE

El film de G-NPMs-agarosa primero se acondicionó sumergiéndolo en IPA durante 5 minutos y luego se lavó con agua destilada. A continuación, el film se colocó dentro de 100,00 mL de una solución estándar o muestra que contenía la mezcla de analitos en estudio. El valor de pH de la solución estándar o de las muestras se ajustó a 3,0 con ácido acético. La solución se agitó magnéticamente y se realizó la extracción durante 30 minutos. Luego, el film se separó de la solución con un imán y se lavó con agua. Después de eso, se colocó dentro de un vaso de precipitado que contenía 1,00 mL de ACN y se sonicó en un baño ultrasónico durante 5 minutos para la elución. Se separó el film del eluato, que se evaporó hasta sequedad utilizando un sistema de evaporación al vacío a 40°C. Luego, el extracto se reconstituyó en 300 µL de la fase móvil. El blanco de extracción se realizó con solución de ácido acético pH 3,0 aplicando el mismo procedimiento.

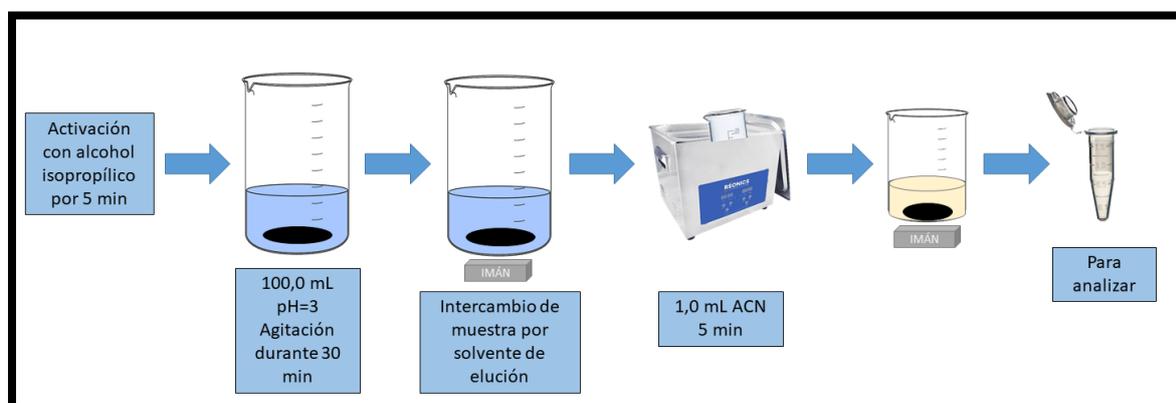


Fig 4.27 Esquematación del procedimiento de extracción de los analitos en estudio

4.5.2.5 Muestreo y preparación de muestras

Las muestras fueron tomadas del arroyo Napostá (1: 38°40'48.3"S 62°14'00.9"W) ubicado en la ciudad de Bahía Blanca, del arroyo Napostá Chico (2: 38°32'00.1"S 61°52'26.4"W), en la localidad de Cabildo y en el arroyo Tres Arroyos (3: 38°24'30.8"S 60°15'13.8"W) de la ciudad de Tres Arroyos. Los diferentes puntos de muestreo se observan en la Figura 4.28. Las muestras fueron acidificadas hasta pH 3,0 y conservadas en heladera (4 °C) hasta su análisis. Antes del procedimiento de extracción, las muestras

se dejaron a temperatura ambiente, se homogeneizaron y se filtraron con un papel de filtro sin cenizas (4-12 μm de poro, Microclar, EE. UU.). Posteriormente se tomaron alícuotas de 100,00 mL y se siguió el procedimiento de extracción mencionado en la Sección 4.5.5.

Para evaluar la veracidad del método propuesto, se realizó un estudio de recuperación. Las muestras se enriquecieron con LV, PRO, NET y MPG a tres niveles de concentración dentro del intervalo de calibración, por triplicado, al comienzo del proceso analítico.

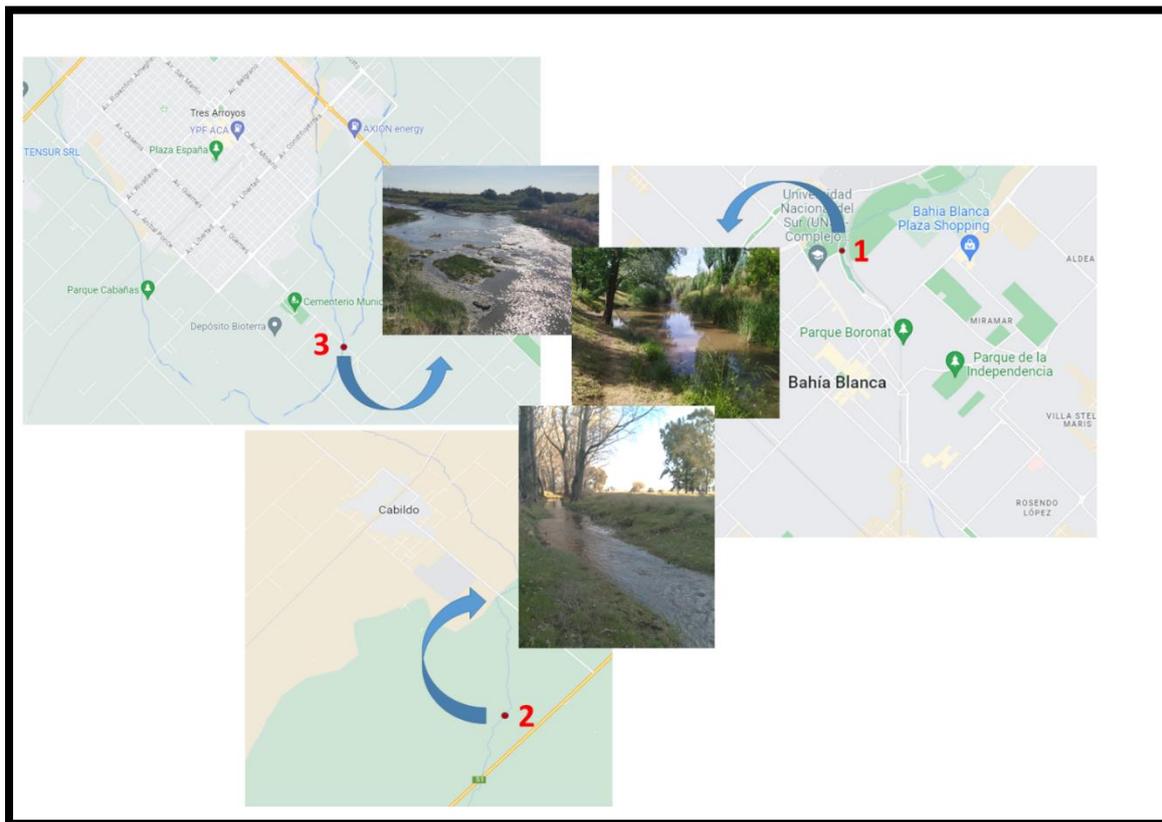


Fig 4.28 Puntos de muestreo ubicados en la ciudad de Bahía Blanca (1), Cabildo (2) y Tres Arroyos (3)

4.5.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.3.1 Optimización de preparación del film

Las variables de preparación del film optimizadas fueron la concentración de la solución de agarosa (10,0 g L⁻¹- 24,0 g L⁻¹) y tiempo de secado del film (8 - 24 h), dejando constante la concentración de G-NPMs (60,0 g L⁻¹).

En primer lugar, se observó que cuando la concentración de agarosa era menor a $16,0 \text{ g L}^{-1}$, el film se rompía durante el secado. Cuando las concentraciones de la solución de agarosa fueron mayores a 16 g L^{-1} , los porcentajes de recuperación obtenidos para los analitos fueron menores a 80%. Por lo tanto, las mejores recuperaciones se obtuvieron cuando la concentración fue de $16,0 \text{ g L}^{-1}$. Por ello, esta concentración fue la elegida para su preparación.

Con respecto al tiempo de secado, se prepararon diferentes films y se secaron a diferentes tiempos. Luego, se llevó a cabo la extracción según Sección 4.5.2.4. Se observó que, los mayores porcentajes de recuperación para todos los analitos se obtuvieron cuando el film se secó durante 15 h, manteniéndose constantes para tiempos mayores de secado. Por lo tanto, éste fue el tiempo seleccionado.

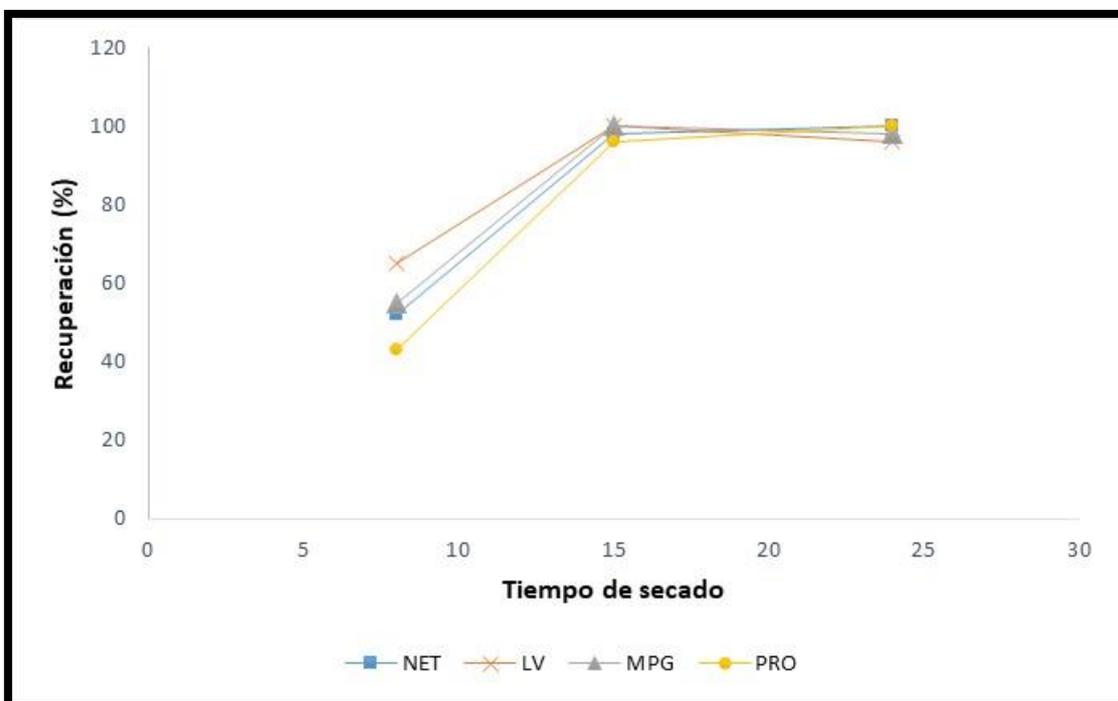


Fig 4.29 Optimización del tiempo de secado del film

4.5.3.2 Caracterización del film

Se realizaron microfotografías electrónicas de barrido (SEM) para observar la superficie del film de G-NPM-agarosa a distintos tiempos de secado luego de su preparación (Figura 4.30). Se observó que con 15 h de secado la superficie del film obtenido es más rugosa que la del film obtenido con 8 h de secado. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas con el film que se secó durante 24 h. La mayor superficie rugosa del film facilita la interacción entre los sitios activos del adsorbente y los analitos, mejorando el proceso de transferencia de masa y, por lo tanto, la eficiencia de extracción. Esto se condice con lo observado experimentalmente (Sección 4.5.3.1).

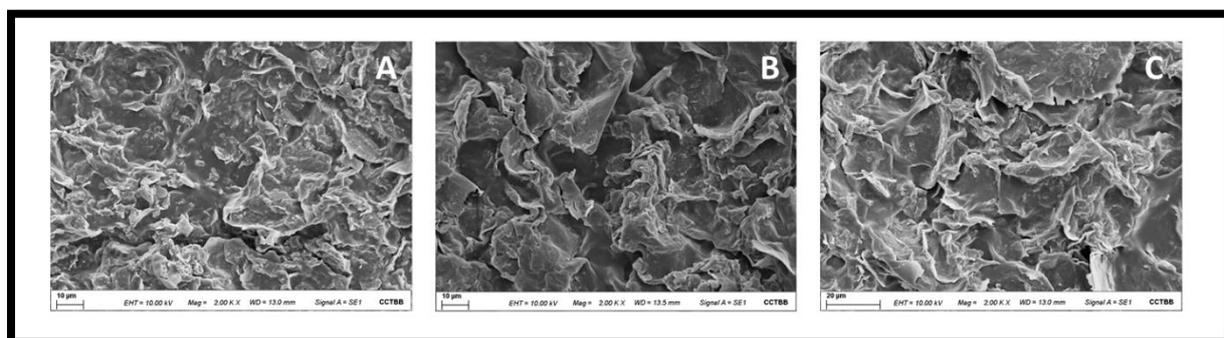


Fig 4.30 Caracterización del film G-NPMs-agarosa mediante SEM. Microfotografías del film después de 8 horas (A), 15 horas (B) y 24 horas (C) de secado.

4.5.3.3 Optimización de las variables de extracción

Las interacciones entre el film de G-NPMs-agarosa y los analitos son probablemente debidas a las interacciones hidrofóbicas y π - π entre el G y los grupos funcionales cíclicos con dobles enlace carbono-carbono conjugados de los analitos¹⁷⁹ (Figura 4.4).

Por lo tanto, para lograr una alta eficiencia de extracción, se optimizaron diferentes factores como el solvente de activación, el tiempo de extracción, el valor de pH de la muestra, el eluyente y el volumen del eluyente, el volumen de la muestra y el tiempo de elución. Estas variables fueron probadas para

¹⁷⁹ F. Pena-Pereira, V. Romero, I. de la Calle, I. Lavilla, C. Bendicho, Graphene-based nanocomposites in analytical extraction processes, Trends Anal. Chem., 142, 116303, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116303>.

cada uno de los analitos, realizando los experimentos por triplicado. Para ello, se tomaron 50,00 mL de cada solución estándar de concentración 0,10 mg L⁻¹, y se llevó a cabo el procedimiento de extracción.

Valor de pH de la muestra

La progesterona y las progestinas son compuestos cuyo valor de pK_a está cercano a 14,0^{180 181} o supera ese valor. Por ello, se tuvo en cuenta las posibles interacciones entre el adsorbente y los analitos para seleccionar el intervalo de pH a estudiar. Por lo tanto, los valores de pH se evaluaron en el intervalo de 2,0 a 8,0 ajustándolo con una solución de ácido acético 1,0 M o con una solución de NaOH 1,0 M, según corresponda. Como se observa en la Fig 4.31, los porcentajes de recuperación disminuyen notablemente a valores de pH superiores a 3,0. La mayor eficiencia de extracción se observa a pH 3,0. A valores de pH menores, los valores de recuperación se mantuvieron aproximadamente constantes. Por lo tanto, se seleccionó pH 3,0 para los siguientes experimentos.

¹⁸⁰ X. Feng, X. Xu, Z. Liu, S. Xue, L. Zhang, Novel functionalized magnetic ionic liquid green separation technology coupled with high performance liquid chromatography: A rapid approach for determination of estrogens in milk and cosmetics, *Talanta*, 209, 120542, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120542>.

¹⁸¹ Rayco Guedes-Alonso, Lorenzo Ciofi, Zoraida Sosa-Ferrera, José Juan Santana-Rodríguez, Massimo del Bubba, Abuzar Kabir, Kenneth G. Furton, Determination of androgens and progestogens in environmental and biological samples using fabric phase sorptive extraction coupled to ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1437, 116-126, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.077>

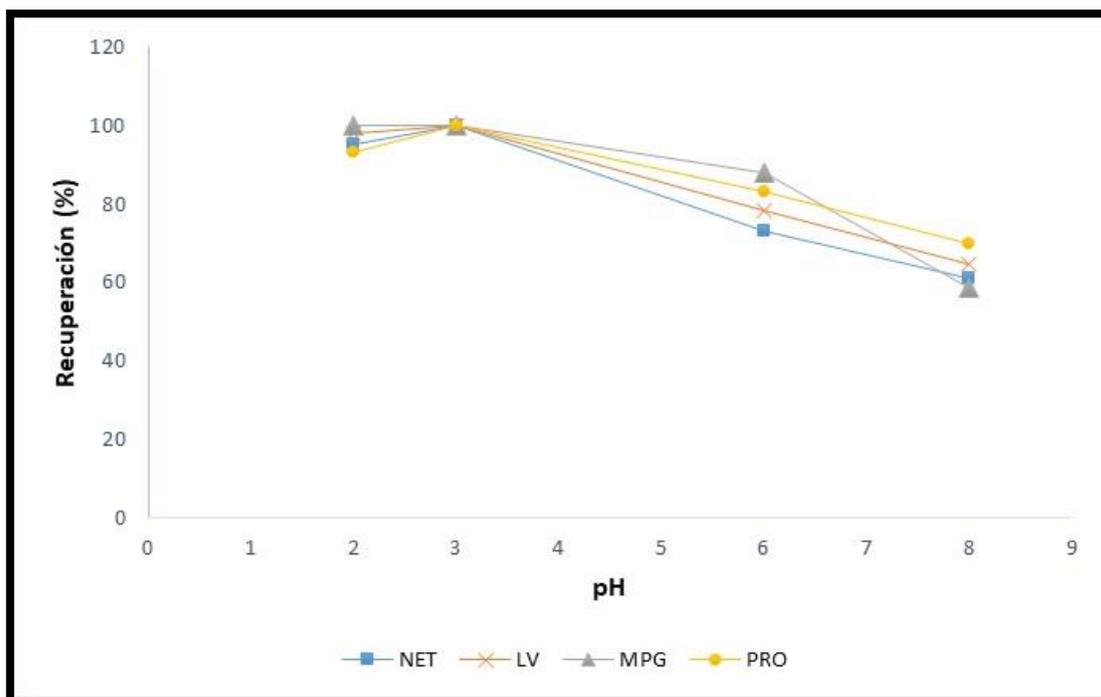


Fig 4.31 Optimización del valor de pH de la muestra para los compuestos en estudio.

Solvente de activación y tiempo de extracción

En primer lugar, el procedimiento de extracción se realizó sin activación del adsorbente. Como se observó que los analitos no fueron extraídos por el film de G-NPM-agarosa, se probaron diferentes solventes, como el MeOH y el alcohol isopropílico¹⁰⁶, como solventes de activación. En este caso, los mayores porcentajes de recuperación se obtuvieron cuando el film se activó con alcohol isopropílico. El tiempo de extracción se estudió en el intervalo entre 10 y 50 minutos. Las mejores recuperaciones para todos los analitos se obtuvieron a los 30 minutos de extracción (Figura 4.32). A tiempos de extracción más largos, los porcentajes de recuperación fueron variables entre los diferentes analitos.

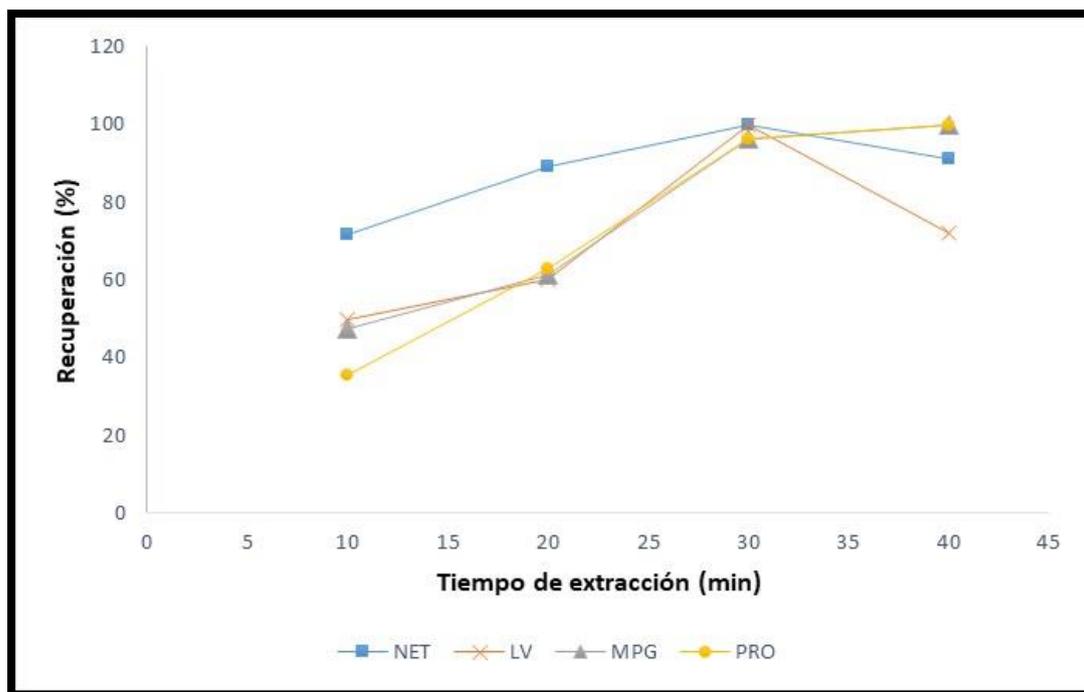


Fig 4.32 Gráfico de la optimización del tiempo de extracción para los analitos

Tipo de eluyente, volumen y tiempo de elución

Como solventes de elución, y teniendo en cuenta las posibles interacciones entre el film y los analitos, se probaron MeOH y ACN. Para realizar la optimización, se siguió el protocolo de extracción para cada analito y se eluyó con 1,00 mL del eluyente. Por otro lado, se realizaron blancos de extracción empleando una solución de ácido acético pH 3,0 en lugar de las soluciones estándar. La línea de base del blanco fue inestable cuando se usó MeOH como extractante, comparada con la línea de base cuando se utilizó ACN. Por lo tanto, se seleccionó ACN como solvente de elución.

El volumen de ACN necesario para eluir cuantitativamente los analitos se estudió en el intervalo de 1,00 a 5,00 mL, siendo 1,00 mL el volumen mínimo necesario para cubrir completamente el film de G-NPM-agarosa. Los mayores porcentajes de recuperación para los analitos se obtuvieron cuando el volumen fue de 1,00 mL. La disminución de los valores de recuperación por encima de este volumen pueden atribuirse a un efecto de dilución.

El paso de elución fue asistido por ultrasonido, colocando el film con el solvente de extracción en un baño ultrasónico. El tiempo de elución se probó en un intervalo entre 2 y 15 minutos. Como se observa

en la Figura 4.33, las recuperaciones más altas se lograron a los 5 minutos de elución y no hubo una mejora significativa en los valores de recuperación para los analitos a tiempos más altos.

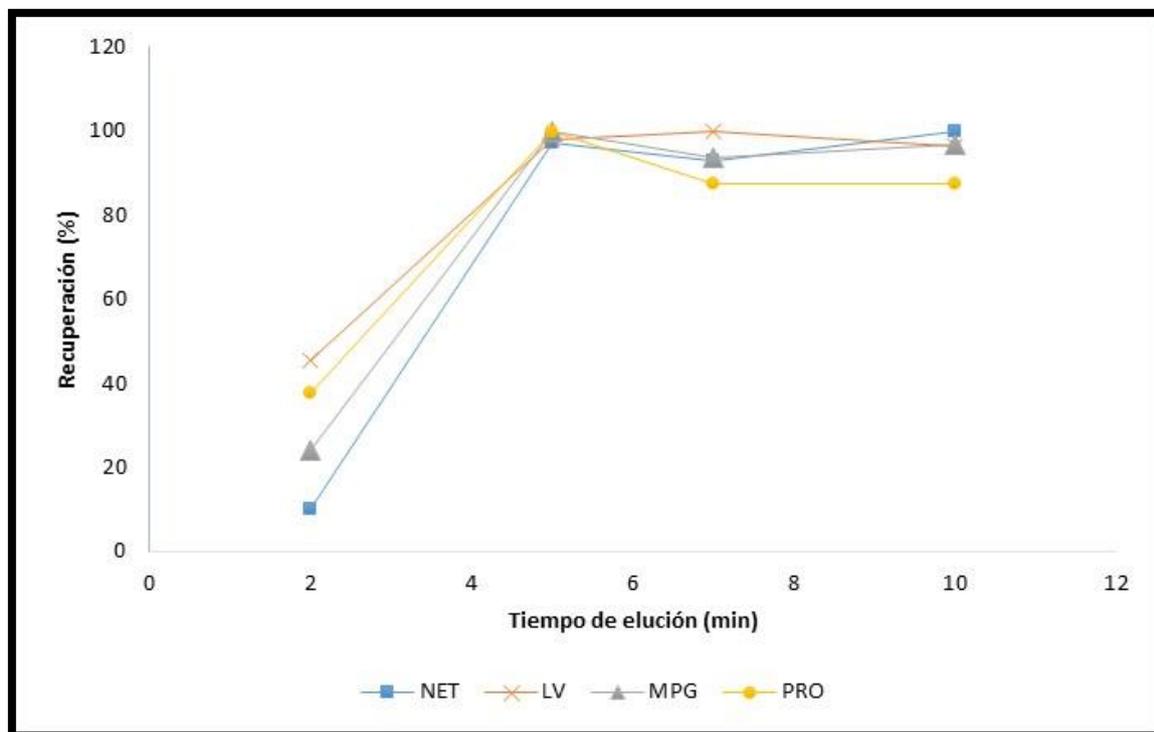


Fig 4.33 Optimización del tiempo de elución empleando ultrasonido

Volumen de muestra

El volumen de muestra es una variable importante a evaluar ya que, no solo influye en el factor de enriquecimiento obtenido, sino que es fundamental para garantizar que los analitos no se desorban de la fase sólida durante la extracción de la muestra. Así, se estudió el volumen de muestra sumergiendo el film de G-NPM-agarosa en volúmenes crecientes, en el intervalo entre 10,00 y 250,00 mL, y manteniendo constante la masa de los analitos. Los datos experimentales se muestran en la Figura 4.34 Como se puede observar, no ocurrieron variaciones significativas de los porcentajes de recuperación (95,5-100,0 %) cuando el volumen de muestra aumentó de 10,00 a 100,00 mL para los cuatro analitos. Sin embargo, las recuperaciones fueron inferiores a volúmenes mayores de muestra. Por lo tanto, se seleccionó 100,00 mL como el volumen de muestra óptimo.

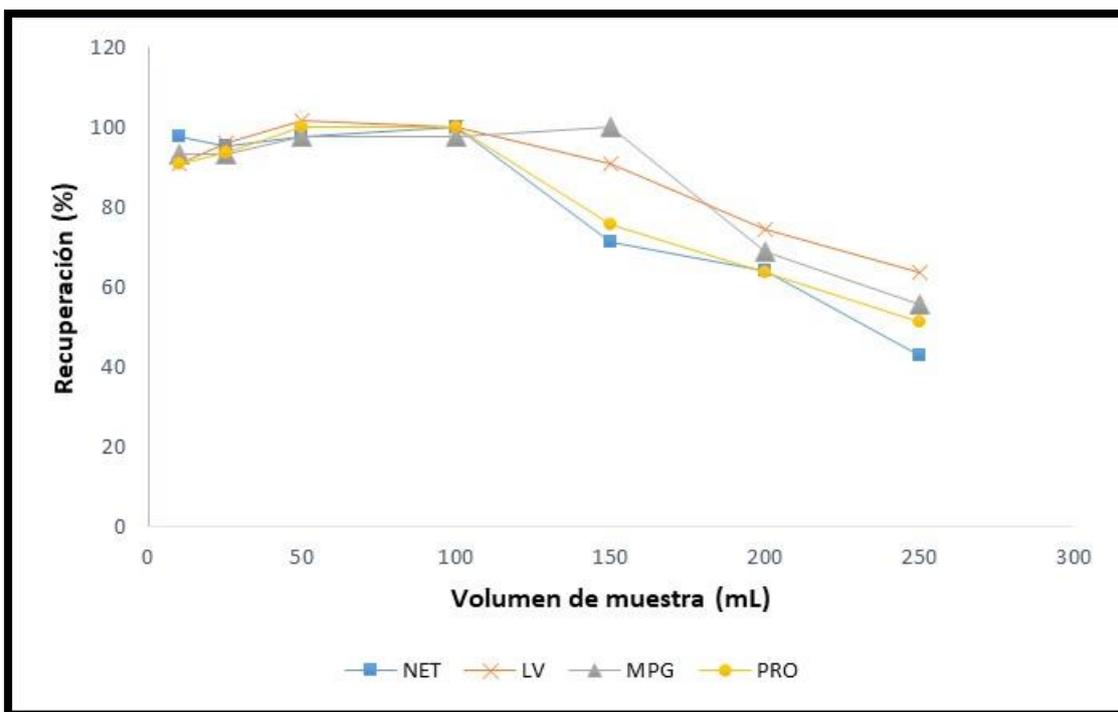


Fig 4.34 Optimización del volumen de muestra empleado en la extracción de los compuestos en estudio

4.5.3.4 Parámetros analíticos

La Tabla 4.8 muestra las cifras analíticas de mérito que se calcularon para evaluar el método propuesto. Para construir las curvas de calibración, se prepararon soluciones estándar de la mezcla de los analitos en el intervalo entre 2,50 y 75,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, y se llevó a cabo el procedimiento de extracción. Se obtuvieron coeficientes de correlación superiores a 0,99 para todos los analitos. Los valores LOD fueron 1,50, 1,80, 1,50 y 1,40 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LV, PRO, NET y MPG, respectivamente, y el valor LOQ fue 2,50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para LV, PRO, NET y MPG. La repetibilidad se evaluó calculando la desviación estándar relativa (RSD %) con una solución estándar de 0,10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada compuesto, en la mezcla, cinco veces en un mismo día. Con una solución de la misma concentración, se evaluó la precisión intermedia, por triplicado en tres días consecutivos. Los valores RSD % obtenidos demostraron una alta precisión del método de extracción.

Tabla 4.8 Parámetros analíticos del método propuesto para la determinación de progestinas.

Analitos	Intervalo Lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	LOD ¹ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ² ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidad (RSD%) ³	Precisión intermedia (RSD%) ⁴	Ecuación de regresión
LV	2,50-75,0	0,9993	1,50	2,50	0,52	2,43	$y=3830000 (\pm 44900)x + 43300 (\pm 1970)$
PRO	2,50-75,0	0,9991	1,80	2,50	0,45	2,38	$y=10700000 (\pm 156000)x + 46200 (\pm 6530)$
NET	2,50-75,0	0,9993	1,50	2,50	1,23	3,11	$y=5110000 (\pm 6000)x + 17000 (\pm 2640)$
MPG	2,50-75,0	0,9995	1,40	2,50	0,99	3,68	$y=3070000 (\pm 34800) + 99600 (\pm 1460)$

¹LOD calculado como $3s/A$, donde, s : desviación estándar, A : pendiente de la curva de calibración. ²LOQ calculado como $10s/A$, donde, s : desviación estándar, A : pendiente de la curva de calibración. ³ $n=5$, $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$; ⁴ $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$, medida por triplicado durante 3 días.

4.5.3.5 Aplicación a muestras de aguas naturales

Se evaluó la aplicabilidad del film de G-NPM-agarosa en la extracción de los analitos de muestras de aguas naturales. Como se mencionó en la Sección 4.5.2.5, las muestras se tomaron del arroyo Napostá (1), del arroyo Napostá chico (2) y del arroyo Tres Arroyos (3). Estos puntos fueron seleccionados debido a su potencial contaminación por descargas clandestinas de aguas residuales que llegan por cursos de agua dulce¹⁶⁹. Sin embargo, y después de haber realizado el análisis correspondiente, no se encontraron los analitos en concentraciones superiores al límite de cuantificación del método.

La veracidad del método propuesto se evaluó mediante un estudio de recuperación. Para eso, las muestras fueron enriquecidas al inicio del proceso analítico y tratadas como se describió anteriormente. En la tabla 4.9 se muestran las concentraciones añadidas ($5,00$, $25,0$ y $50,0 \mu\text{g L}^{-1}$) y las recuperaciones obtenidas para LV, PRO, NET y MPG, con resultados satisfactorios.

En la Figura 4.35 se muestran los cromatogramas obtenidos para el blanco de extracción, una solución estándar de los analitos de concentración $25 \mu\text{g L}^{-1}$ y las muestras estudiadas.

Tabla 4.9 Estudio de recuperación para los analitos en muestras de aguas naturales

Muestra ¹	Concentración de fortificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Concentración determinada ($\mu\text{g L}^{-1}$)				Recuperación (%)			
			LEV	PRO	NOR	MED	LEV	PRO	NOR	MED
Arroyo Napostá	5,00		4,51 ± 0,52	5,26 ± 0,38	4,78 ± 1,01	4,71 ± 0,42	90,22	105,23	95,56	94,26
	25,0		22,71 ± 1,99	23,75 ± 2,11	24,51 ± 5,84	18,84 ± 0,99	90,84	94,99	98,04	75,35
	50,0		48,20 ± 3,21	45,98 ± 7,30	47,20 ± 3,82	49,60 ± 13,93	96,40	91,95	94,41	99,21
Arroyo Napostá Chico	5,00		4,27 ± 0,90	4,31 ± 1,05	5,33 ± 1,35	4,65 ± 0,96	85,36	86,15	106,52	93,06
	25,0		22,88 ± 2,57	23,73 ± 6,61	23,06 ± 3,76	26,11 ± 0,41	91,53	94,90	92,26	104,44
	50,0		43,29 ± 0,77	50,00 ± 13,22	55,69 ± 4,24	49,62 ± 4,95	86,58	100,00	111,38	99,23
Arroyo Tres Arroyos	5,00		4,72 ± 1,81	4,64 ± 0,23	4,94 ± 0,49	5,04 ± 0,46	80,67	92,74	98,82	100,83
	25,0		24,15 ± 1,23	24,46 ± 1,38	29,04 ± 2,65	21,54 ± 3,97	96,62	97,83	106,16	86,15
	50,0		50,34 ± 3,56	44,91 ± 5,27	46,45 ± 2,63	43,99 ± 7,30	100,69	89,82	92,90	87,98

¹ Las recuperaciones se calcularon por triplicado

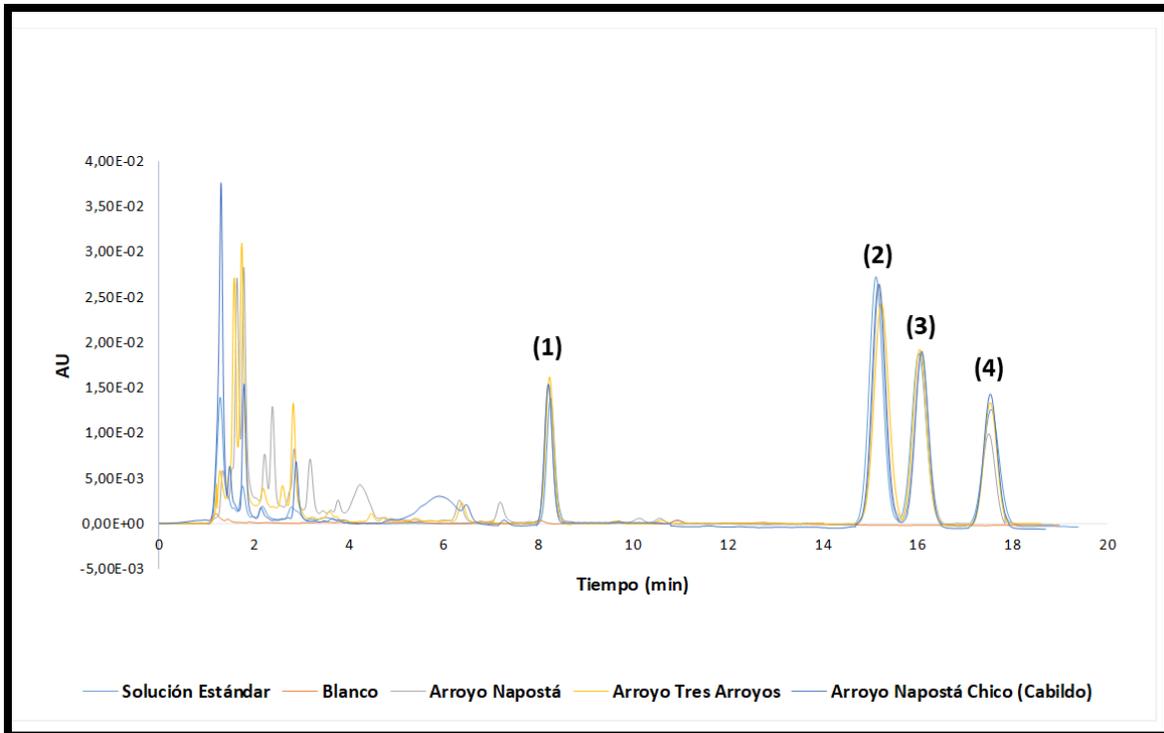


Fig 4.35 Cromatogramas obtenidos para el blanco de reacción, una solución estándar de la mezcla de los analitos y las muestras de agua enriquecidas. Identificación de picos: (1) LV (2) PRO, (3) NET y (4) MPG. Condiciones de extracción: volumen de muestra, 100,00 mL; concentración de progestinas, 25 $\mu\text{g L}^{-1}$; masa de G-NPMs, 300 mg; pH de la muestra, 3,0; volumen de solvente de desorción, 1,00 ml. Condiciones cromatográficas: columna Zorbax C18 (150 mm \times 4,6 mm, 5 μm , Agilent); fase móvil: ACN-agua (50:50 v/v); caudal: 1,0 mL min^{-1} ; volumen de inyección: 50 μL . Las medidas de absorbancia se llevaron a cabo a $\lambda=240\text{ nm}$.

4.5.4 CONCLUSIÓN

Para la inmovilización del G-NPMs se utilizó agarosa, que es un material no tóxico, renovable y biodegradable. El film de G-NPMs-agarosa presentó excelentes propiedades adsorbentes y permitió la extracción y preconcentración de MPG, LV, NET y PRO. La funcionalización del G con nanopartículas magnéticas simplificó el método de extracción, disminuyendo la manipulación del film y, por lo tanto, aumentando la posibilidad de utilizarlo reiteradas veces sin que se dañe. El film mantuvo su capacidad de extracción por más de 70 veces. Por otro lado, al poder reutilizar el film varias veces, se redujo el uso de reactivos (y generación de desechos) y se disminuyó el costo de análisis.

Los parámetros analíticos obtenidos para el método propuesto fueron satisfactorios, logrando LOD y LOQ comparables con los encontrados en la literatura^{182 183 184}. Se realizó la extracción y preconcentración de los analitos en muestras de aguas naturales, con excelentes resultados.

¹⁸² D. T. Lebre, V. C. Thipe, M. E. B. Cotrim, J. O. V. Bustillos, Use of Sugar Cane Bagasse as Solid Extraction Phase Sorbent to Analyze Hormones from Industrial Effluent, *ACS Omega*, 7, 12, 10069–10076, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c06064>

¹⁸³ Q. Li, J.-H. Zhao, H.-J. Lai, B. Liu, M. Zhang, N.-L. Xiao, H.-D. Wang, T. Jin, Benzoyl isothiocyanate modified surface of silica gel as the extraction material for adsorbing steroid hormones in water, *Anal. Methods*, 15, 1206-1214, 2023. <https://doi.org/10.1039/D2AY01852G>

¹⁸⁴ K. Czarny, D. Szczukocki, B. Krawczyk, R. Juszcak, S. Skrzypek, R. Gadzała-Kopciuch, Molecularly imprinted polymer film grafted from porous silica for efficient enrichment of steroid hormones in water samples, *J. Sep. Sci.*, 42, 2858-2866, 2019. <https://doi.org/10.1002/jssc.201900281>

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

GENERALES

Las principales conclusiones obtenidas durante el desarrollo de la investigación que se recopila en esta Tesis son las siguientes:

- Se desarrollaron métodos de extracción y preconcentración de contaminantes emergentes, particularmente de fármacos, mediante la aplicación de las técnicas de extracción coacertiva y en fase sólida.
- En todos los trabajos, se priorizó cumplir con los principios de la Química Analítica amigable con el ambiente, mediante la miniaturización, automatización, uso de reactivos renovables y disminución de los residuos tóxicos generados.
- Para la microextracción líquido-líquido de glibenclamida, se reemplazó el uso de solventes tóxicos por el uso de un surfactante como solvente de extracción.
- Se desarrolló un método automático para la extracción y determinación de progestinas, aprovechando las características inherentes a las técnicas en flujo, como la minimización de la manipulación de la muestra y la reducción significativa del uso de reactivos, y por ende, de los residuos generados.
- Se utilizaron nanopartículas a base de carbono como adsorbentes, lo que facilitó la miniaturización del proceso analítico.
- Se utilizó un biopolímero como es la agarosa, que es un material no tóxico, renovable y biodegradable para la inmovilización de los MWCNTs y el G, eliminando el uso de reactivos orgánicos comúnmente usados para tal fin.
- Se optimizaron las variables experimentales para preparar films de nanopartículas a base de carbono y agarosa, que sean reutilizables, lo que aumentó la reproducibilidad de los resultados y facilitó el procedimiento de extracción.

APÉNDICE 1

PRODUCTIVIDAD

Artículos publicados

- “Oxidized carbon nanotubes as sorbent for miniaturized solid-phase extraction of progestins from environmental water samples prior to their determination by HPLC-UV”, Maite V. Aguinaga Martínez, Natalia E. Llamas, Francisco Ávila Orozco, Carolina Acebal, Claudia E. Domini, *Microchimica Acta*, 2020, 187. Springer Wien. ISSN: 0026-3672. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00604-020-4116-z>.
- “Coacervative microextraction with solidification of floating surfactant droplets for the determination of glibenclamide in environmental water samples”, Maite V. Aguinaga Martínez, Natalia González, Carolina C. Acebal, Claudia E. Domini, *Microchemical Journal*, 2020, 159. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105564>.
- “Current trends in sample preparation for the determination of primary aromatic amines in environmental samples”, Natalia González, Maite V. Aguinaga Martínez, Claudia E. Domini, Carolina C. Acebal, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 2023, 37. Elsevier. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.teac.2023.e00197>.
- “Preparation of a single and reusable biopolymer-based film for the extraction and preconcentration of anti-inflammatory drugs from environmental water samples, Maite V. Aguinaga Martínez, Claudia E. Domini, Carolina C. Acebal, *RSC Advances*, 2023, **13**, 9055-9064. Royal Society of Chemistry. DOI: <https://doi.org/10.1039/D3RA00166K>.

Capítulo de libro

- Natalia A. Gomez, **Maite V. Aguinaga**, Natalia Llamas, Mariano Garrido, Carolina Acebal, Claudia Domini
AN INSIGHT INTO GREEN MICROWAVE-ASSISTED TECHNIQUES: DEGRADATION AND MICROEXTRACTION
K338613: *Advances in Microwave Chemistry (Chapter 3)*, Editores: Bimal K Banik, Debasish Bandyopadhyay. **Taylor & Francis Group, 2018. ISBN 9780815375197**

Trabajos presentados en congresos

- *Empleo de nanotubos de carbono oxidados para la preconcentración de progestinas en muestras ambientales. Modalidad: Poster*
Autores: Maite Aguinaga, Natalia Llamas, Francisco Ávila Orozco, Carolina Acebal.
9° Congreso Argentino de Química Analítica, realizado en la ciudad de Río Cuarto, en noviembre del 2017.
- *Extracción por dispersión de matriz en fase sólida de metsulfurón metil empleando nanotubos de carbono como adsorbente. Modalidad: Poster.*
Autores: Natalia Llamas, Maite Aguinaga, Carolina Acebal.
9° Congreso Argentino de Química Analítica, realizado en la ciudad de Río Cuarto, en noviembre del 2017.
- *Microextracción líquido-líquido dispersiva mediante el empleo de un surfactante para la extracción de Glibenclamida en muestras ambientales. Modalidad: Poster.*
Autores: Maite V. Aguinaga Martínez, Natalia González, Paula S. Rivero, Carolina Acebal, Claudia Domini
10° Congreso Argentino de Química Analítica, realizado en la ciudad de Santa Rosa, en septiembre del 2019.
- *Extracción en fase sólida utilizando films de nanotubos de carbono y agarosa para la extracción y preconcentración de anti-inflamatorios en aguas naturales. Modalidad: Poster.*
Autores: Maite V. Aguinaga Martínez, Claudia Domini, Carolina Acebal.
11° Congreso Argentino de Química Analítica, realizado en la ciudad de Corrientes, en diciembre del 2021.
- *Empleo de un sistema de inyección secuencial para la determinación de aminas aromáticas primarias presentes en envases de alimentos. Modalidad: Poster.*
Autores: Natalia González, Maite V. Aguinaga Martínez, Claudia Domini, Carolina C. Acebal.

11° Congreso Argentino de Química Analítica, realizado en la ciudad de Corrientes, en diciembre del 2021.

- *Preparación de un film biodegradable para la extracción de fármacos presentes en aguas superficiales. Modalidad: Virtual.*

Autores: Maite V. Aguinaga Martínez, Claudia Domini, Carolina Acebal.

XXI Encuentro de superficies y materiales nanoestructurados, realizado en la ciudad de Río Cuarto, en agosto del 2022.

- *Preparación de un film de agarosa y grafeno funcionalizado con nanopartículas magnéticas para la extracción y preconcentración de progestinas en aguas naturales. Modalidad: Póster*

Autores: Maite V. Aguinaga Martínez, Fernando Peralta, Manuela Palenzona, Marcelo T. Pereyra, Claudia E. Domini, Carolina C. Acebal.

V Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología Ambiental. Argentina y Ambiente 2023, realizado en la ciudad de San Luis, en mayo del 2023.