



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Implementación de métodos analíticos para la determinación de metales y contaminantes orgánicos. Empleo de nanopartículas y líquidos iónicos.

Lic. Cintia J. Fernandez

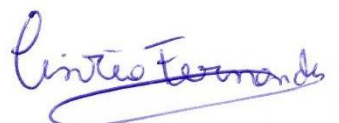
BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2024

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 abril del 2015 y el 09 de febrero del 2024, bajo la dirección de la Dra. Adriana G. Lista y el Dr. Marcos Grünhut.



.....
Lic. Cintia J. Fernandez



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

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

Agradecimientos

- ✓ En primer lugar, agradezco a la Universidad Nacional del Sur por ser mi segunda casa, mi lugar de celebración para muchos logros personales a lo largo de todos estos años, y también mi refugio en momentos difíciles.
Celebro la educación pública, gratuita y de calidad que me ha brindado esta casa de estudios y sin lo cual, nada de esto hubiese sido posible
- ✓ A todos los que forman parte de esta institución, especialmente docentes e investigadores que han aportado su granito de arena en mi camino profesional
- ✓ A CONICET por otorgarme la beca doctoral que me permitió su desarrollo
- ✓ A la Universidad Federal de Paraíba y toda su gente, gracias por tan magnífica experiencia
- ✓ A mis directores Adriana y Marcos. Especialmente a Marcos quien con su infinita paciencia, templanza y sabiduría ha trabajado a mi lado en el desarrollo de esta tesis. Sin dudas ha sido mi gran maestro y sin él esta tesis no hubiese sido la misma.
Gracias por escucharme, por confiar y por guiarme en estos años. Haber confiado en mí como profesional ha hecho que recupere confianza en mí y eso nunca lo olvidaré.
- ✓ A mis padres, por haberme dado la vida y traerme a este loco mundo y por haberme inculcado valores que llevaré siempre conmigo
- ✓ A mi compañero de vida y gran amor Sergio quien, con su amor e incondicionalidad en estos 10 años juntos, ha sido mi amor, sostén y paz en el mundo
- ✓ A mi hermana amada quien me ha enseñado a cuidar cuerpo, mente y alma y a valorarlo como un tesoro. Me ha contagiado el amor por el deporte y eso sin dudas, cambió mi vida
- ✓ A Dorita y Koba por todo su amor, apoyo y por hacerme parte de su familia
- ✓ A mi familia del cuore Ramón, Seba, Tify y Juli, por hacer mi vida más divertida.
Agradezco cada momento compartido, su apoyo y su aliento
- ✓ A mis amigas Aye y Alu por transmitirme alegría y sabiduría en cada encuentro
- ✓ A mis amigos Anto y Pacho por su cariño, aliento y risas compartidas
- ✓ A mis amigos Fran y Marcos gracias por todos estos años de alegría, risas y anécdotas compartidas

-
- ✓ A mi gran amiga Cin, gracias por su cariño, por acompañarme siempre, por escucharme y aconsejarme
 - ✓ A mi gran amiga Mai por su cariño, sus consejos y por ser incondicional, sabia, y estar siempre a mi lado en todo momento
 - ✓ A toda el Área III. Especialmente a Vale, Marce P y Caro A., por su aliento y por cada encuentro de risas y buenos momentos
 - ✓ A todos mis compañeros Mai, Pacho, Nati Gómez, Nati González, Dani, Vero, Checho, Ana, Flor, Nico, Manu y Claus por los almuerzos, viernes de tortas y risas compartidos
 - ✓ A todos los que han trabajado conmigo a lo largo de esta tesis Cali, Pacho y Nati Gómez. Especialmente agradezco a Nati quien ha sido no sólo compañera sino amiga y me ha compartido su sabiduría a cada instante de un modo que siempre recordaré
 - ✓ A Susana R gracias por confiar siempre en mí. Llevo en mi corazón todas sus palabras, enseñanzas y su apoyo. Sin ella mi camino no hubiese tenido tantos recuerdos hermosos
 - ✓ A mi hogar dentro de esta institución: mi querida cátedra de Bromatología y toda su gente con quienes compartí hermosos momentos, Susana, Lili, Mirta, Adri D., Romi, Caro D., Marcos, Olivia, Gime, Yael, Nati G., Pacho, Mai y especialmente a una persona que me ha enseñado tanto..... y me ha contagiado su entusiasmo infinito y su gran amor por la docencia, ese amor y alma docente que nunca dejaré, es mi pilar, pasión, orgullo y fortaleza, Gracias Sonia!
 - ✓ Por ultimo quiero agradecer a mi gran y único mentor en la vida, a Dios

RESUMEN

En el presente trabajo de Tesis se desarrollaron nuevos métodos analíticos para la determinación de contaminantes inorgánicos y orgánicos en muestras de aguas y de residuos de la industria olivícola.

En primer lugar, se desarrolló un método para la determinación de cromo (III) y cromo (VI) en aguas. La especiación de cromo es de gran interés debido a la biodisponibilidad y toxicidad de algunas de sus formas químicas. Cromo (III) es considerado un oligoelemento esencial mientras que cromo (VI) es tóxico para el organismo e incluso está clasificado como carcinógeno humano de clase I por la Organización Mundial de la Salud. Por ello, la determinación de las diferentes especies de cromo presenta un mayor interés que la determinación de cromo total. La especiación del metal se realizó exitosamente utilizando un material blando sintetizado a partir de nanotubos de carbono de pared múltiple y el líquido iónico cloruro de 1-butil-3-metil imidazolio. El proceso se realizó mediante un sistema de flujo multiconmutado que presentó una minicolumna empaquetada con el material blando. El procedimiento de especiación se basó en la capacidad del material adsorbente para retener Cr(VI) como $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ y dejar pasar Cr(III) a través de la minicolumna. La cuantificación de ambas especies se realizó mediante un sistema automático Flow-batch con detección quimioluminiscente. Cr(III) se cuantificó como catalizador de la reacción entre luminol y peróxido de hidrógeno y Cr(VI) como oxidante de igual reacción. Los límites de detección fueron $0,0015 \text{ mg L}^{-1}$ para Cr(VI) y $0,0064 \text{ mg L}^{-1}$ para Cr(III). La precisión del método fue 7,0% y 3,8% para

Cr(III) y Cr(VI), respectivamente. El estudio de recuperación presentó valores entre 95% y 107%.

A continuación, se desarrolló un método analítico para la cuantificación de los filtros químicos UV benzofenona-3, octocrileno, octisalato y octinoxato en diferentes cuerpos de agua. Estos compuestos están normalmente presentes en productos cosméticos y de cuidado personal y luego de su uso llegan al medio ambiente, considerándose actualmente a los mismos contaminantes emergentes. La extracción y preconcentración de los filtros químicos UV se realizó mediante microextracción líquido-líquido utilizando como material, una nanoemulsión basada en una mezcla de los líquidos iónicos cloruro de 1,3-didecil-2-metilimidazolio y hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, y el tensioactivo Triton X-100. Se estudió el efecto de las diferentes variables involucradas en el proceso de extracción aplicando un diseño experimental Pluckett-Burman saturado. El proceso de extracción se realizó utilizando 475 μL de material extractante y 10,00 mL de muestra, alcanzando un factor de preconcentración óptimo de 100. La separación cromatográfica y la detección se realizaron mediante HPLC-UV en menos de 5 min para todos los filtros químicos UV. Se obtuvieron límites de detección inferiores a 2,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ y una precisión óptima (RSD inferior al 6,7%) para los cuatro filtros UV. Se analizaron diferentes muestras de agua (piscina, arroyo, río, mar y una muestra simulada) obteniendo valores de recuperación satisfactorios en todos los casos (82-119%). El método fue rápido (15 min^{-1}) y presentó un valor óptimo de verbor (0,50) en comparación con otros métodos cromatográficos de acuerdo a la métrica AGREE.

Finalmente, se desarrolló un sistema para la fotodegradación y determinación del contaminante 1,2-dihidroxibenceno (pirocatecol) presente en aguas y alperujo, el cual es un residuo de la industria de la producción de aceite de oliva. Este compuesto es

ampliamente estudiado debido a su difícil degradación en el ambiente y a su toxicidad para los humanos como resultado de la exposición a altas dosis. La fotodegradación del catecol se realizó en un sistema en línea empleando como catalizador nanopartículas de óxido de zinc. La variación de la concentración de catecol en el tiempo fue monitoreada utilizando la enzima polifenol oxidasa y detectando los productos coloreados mediante análisis de imágenes digitales. La fotodegradación catalizada con nanopartículas de óxido de zinc permitió una reducción en la concentración de catecol mayor al 89% en tan solo 15 min de exposición y en un medio alcalino (pH = 8,3). Por otro lado, el extracto de polifenoloxidasa presentó una óptima actividad enzimática (1577 ± 35) UE mL⁻¹. Las imágenes fueron obtenidas con la cámara de un smartphone y un portaceldas portátil impreso con tecnología 3D. Los parámetros analíticos del método basado en imágenes digitales fueron satisfactorios, obteniendo valores de $R^2 = 0,9994$, LOD = 1,32 mg L⁻¹ y LOQ = 4,00 mg L⁻¹. De esta manera, se diseñó un sistema eficiente para la fotodegradación de catecol empleando un catalizador nanoparticulado y su monitoreo mediante un método selectivo, de bajo costo y amigable con el medio ambiente.

En términos generales, se intentó conseguir el mayor grado de miniaturización, simplificación y automatización de las nuevas metodologías propuestas, evitando así la generación de grandes volúmenes de residuos contaminantes, reduciendo el consumo de reactivos, disminuyendo el consumo de energía y los costos económicos del proceso analítico.

ABSTRACT

In this thesis work, new analytical methods were developed for the determination of inorganic and organic contaminants in water and waste samples from the olive industry.

First, a method was developed for the determination of chromium (III) and chromium (VI) in water. Chromium speciation is of great interest due to the bioavailability and toxicity of some of its chemical forms. Chromium (III) is considered an essential trace element while chromium (VI) is toxic to the body and is classified as a class I human carcinogen by the World Health Organization. Therefore, the determination of the different chromium species is of greater interest than the determination of total chromium. Metal speciation was successfully performed using a soft material synthesized from multi-walled carbon nanotubes and the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. The process was performed using a multi-commuted flow system that featured a mini-column packed with the soft material. The speciation procedure was based on the ability of the adsorbent material to retain Cr(VI) as $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ and allow Cr(III) to pass through the minicolumn. The quantification of both species was carried out using an automatic flow-batch system with chemiluminescence detection. Cr(III) was quantified as a catalyst for the reaction between luminol and hydrogen peroxide and Cr(VI) as an oxidant for the same reaction. The detection limits were 0.0015 mg L^{-1} for Cr(VI) and 0.0064 mg L^{-1} for Cr(III). The precision of the method was 7.0% and 3.8% for Cr(III) and Cr(VI), respectively. The recovery study presented values between 95% and 107%.

Next, an analytical method was developed for the quantification of the UV chemical filters benzophenone-3, octocrylene, octisalate and octinoxate in different water samples. These compounds are normally present in cosmetic and personal care products and after use they reach the environment, currently being considered emerging contaminants. The extraction and preconcentration of the UV chemical filters was carried out by liquid-liquid microextraction using as material, a nanoemulsion based on a mixture of the ionic liquids 1,3-didecyl-2-methylimidazolium chloride and 1-butyl-3-hexafluorophosphate. -methylimidazolium, and the surfactant Triton X-100. The effect of the different variables involved in the extraction process was studied applying a saturated Plackett-Burman experimental design. The extraction process was carried out using 475 μL of extractant material and 10.00 mL of sample, obtaining an optimal preconcentration factor of 100. Chromatographic separation and detection were performed by HPLC-UV in less than 5 min for all UV chemical filters. Detection limits lower than $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$ and optimal precision (RSD less than 6.7%) were obtained for all four UV filters. Different water samples were analyzed (swimming pool, stream, river, sea and a simulated sample) obtaining satisfactory recovery values in all cases (82-119%). The method was fast (15 min^{-1}) and presented an optimal greenness value (0.50) compared to other chromatographic methods according to the AGREE metric.

Finally, a system was developed for the photodegradation and determination of the contaminant 1,2-dihydroxybenzene (pyrocatechol) present in water and alperujo which is a waste from the olive oil production industry. This compound is widely studied due to its difficult degradation in the environment and its toxicity to humans as a result of exposure to high doses. The photodegradation of pyrcatechol was carried out in an

online system using zinc oxide nanoparticles as a catalyst. The variation of pyrocatechol concentration over time was monitored using the enzyme polyphenol oxidase and detecting the colored products by digital image analysis. The photodegradation catalyzed with zinc oxide nanoparticles allowed a reduction in the catechol concentration greater than 89% in just 15 min of exposure and in an alkaline medium (pH = 8.3). On the other hand, the polyphenol oxidase extract presented optimal enzymatic activity (1577 ± 35) EU mL⁻¹. The images were obtained with a smartphone camera and a portable cell holder printed with 3D technology. The analytical parameters of the method based on digital images were satisfactory, obtaining values of $R^2 = 0.9994$; LOD = 1.32 mg L⁻¹; LOQ = 4.00 mg L⁻¹. In this way, it was designed an efficient system for the photodegradation of pyrocatechol using a nanoparticulate catalyst and its monitoring using a selective, low-cost and environmentally friendly method.

In general terms, an attempt was made to achieve the highest degree of miniaturization, simplification and automation of the new proposed methodologies, thus avoiding the generation of large volumes of contaminating waste, reducing the consumption of reagents, reducing energy consumption and the economic costs of the analytical process.

ÍNDICE GENERAL

Capítulo 1: Introducción general

1.1 Contaminantes ambientales.....	1
1.2 Métodos de separación y preconcentración de contaminantes.....	2
1.2.1 Nanomateriales, líquidos iónicos y materiales híbridos en técnicas de extracción y preconcentración.....	6
1.3 Métodos para remediación de muestras ambientales.....	11

Capítulo 2: Material híbrido para la especiación de cromo en muestras de agua utilizando un sistema automático con detección quimioluminiscente

2.1 Introducción.....	19
2.2 Objetivo.....	28
2.3 Parte Experimental.....	29
2.3.1 Reactivos y soluciones.....	29
2.3.2 Materiales y métodos.....	30
2.3.2.1 Especiación de Cr(III) y Cr(VI).....	30
2.3.2.1.1 Preparación del material híbrido.....	30
2.3.2.1.2 Caracterización del material híbrido.....	31
2.3.2.1.3 Sistema de flujo para la especiación de Cr(III) y Cr(VI).....	31
2.3.2.2 Detección de Cr(III) y Cr(VI).....	34
2.3.2.2.1 Sistema FBA.....	34
2.3.2.2.2 Procedimiento del sistema FBA.....	36
2.4. Resultados y Discusión.....	39
2.4.1. Mecanismo de adsorción.....	39
2.4.2 Caracterización del material híbrido.....	40
2.4.3. Selectividad del material.....	42
2.4.4. Optimización del proceso de especiación.....	43
2.4.4.1. Acondicionamiento de la minicolumna.....	44
2.4.4.2. Variables hidrodinámicas.....	44
2.4.4.3. Variables físicas y químicas.....	45
2.4.5. Optimización del proceso de detección.....	46
2.4.5.1. Variables Químicas.....	47

2.4.5.2. Variables FBA.....	48
2.4.6. Performance analítica.....	49
2.4.7. Selectividad del método quimioluminiscente.....	51
2.4.7.1. Interferencia de cationes.....	51
2.4.7.2. Interferencia de aniones.....	52
2.4.8. Análisis de muestras reales.....	53
2.5 Conclusiones.....	54

Capítulo 3: Nanoemulsión basada en líquidos iónicos para la extracción y preconcentración de filtros químicos solares en muestras de aguas

3.1 Introducción.....	55
3.2 Objetivo.....	64
3.3 Parte Experimental.....	65
3.3.1 Reactivos y soluciones.....	65
3.3.2. Materiales y métodos.....	66
3.3.2.1 Preparación del material extractante.....	66
3.3.2.2 Caracterización del material extractante.....	66
3.3.2.3 Procedimiento de extracción y preconcentración de filtros UV.....	67
3.3.2.4 Optimización de variables.....	69
3.3.2.5 Procedimiento cromatográfico.....	70
3.3.2.6 Muestras.....	71
3.4 Resultados y Discusión.....	73
3.4.1 Preparación y caracterización del material extractante.....	73
3.4.2 Determinación de los filtros químicos UV.....	77
3.4.3 Optimización de variables.....	78
3.4.3.1 Estudios preliminares.....	78
3.4.3.2 Diseño experimental.....	80
3.4.3.2.1 Diseño Plackett-Burman.....	80
3.4.3.2.2 Diseño factorial completo.....	82

3.4.4 Performance analítica.....	84
3.4.5 Análisis de muestras reales.....	86
3.4.6 Comparación y ventajas del método propuesto.....	89
3.4.7 Estudio de impacto sobre el medioambiente.....	94
3.5 Conclusiones.....	96

Capítulo 4: Monitoreo enzimático de la fotodegradación de catecol (1,2-dihidroxibenceno) empleando nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) como catalizador

4.1 Introducción.....	98
4.2 Objetivos.....	109
4.3 Parte Experimental.....	110
4.3.1 Reactivos y soluciones.....	110
4.3.2 Materiales y métodos.....	111
4.3.2.1 Determinación de PCT utilizando PFO e imágenes digitales.....	111
4.3.2.1.1 Obtención del extracto natural.....	112
4.3.2.1.2 Determinación de la actividad enzimática en el extracto natural.....	113
4.3.2.1.3 Optimización de variables para la determinación enzimática de PCT.....	114
4.3.2.1.4 Cuantificación de PCT mediante imágenes digitales	115
4.3.2.2 Nano-fotocatálisis de PCT.....	117
4.3.2.2.1 Caracterización de las NPs-ZnO.....	117
4.3.2.2.2 Sistema de fotodegradación en flujo.....	119
4.3.2.2.3 Estudio de variables en el proceso de fotodegradación.....	120
4.3.2.3 Determinación de carbono orgánico total.....	121
4.3.2.4 Análisis cromatográfico.....	122
4.3.2.5 Análisis de muestras.....	122
4.4 Resultados y Discusión.....	123
4.4.1 Determinación enzimática de PCT.....	123
4.4.1.1. Extracto de PFO.....	123
4.4.1.2 Optimización del método enzimático.....	123

4.4.1.3. Determinación espectrofotométrica.....	124
4.4.1.4. Detección mediante imágenes digitales.....	126
4.4.2 Nano-fotocatálisis de PCT.....	128
4.4.2.1 Caracterización de NPs-ZnO.....	128
4.4.3. Sistema de fotodegradación en flujo.....	132
4.4.4 Optimización del proceso de fotodegradación de PCT.....	132
4.4.4.1 Efecto del pH.....	132
4.4.4.2. Efecto de la presencia y concentración de NPs-ZnO.....	135
4.4.5 Estudio de la eficiencia catalítica.....	136
4.4.5.1 Análisis de carbono orgánico total.....	136
4.4.5.2. Análisis por HPLC-UV.....	137
4.4.6 Análisis de muestras.....	139
4.5 Conclusiones.....	139
Conclusiones generales.....	141
<i>Apéndice 1: Productividad.....</i>	<i>143</i>
<i>Artículos publicados.....</i>	<i>143</i>
<i>Trabajos presentados a congresos nacionales.....</i>	<i>143</i>
<i>Trabajos presentados a congresos internacionales.....</i>	<i>145</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1: Introducción

Figura 1.1 Técnicas de microextracción en fase líquida (LPME) y en fase sólida (SPME)..	4
Figura 1.2 Representación esquemática general del procedimiento de obtención de materiales híbridos basados en nanomateriales y líquidos iónicos.....	11
Figura 1.3 Mecanismo general de una reacción fotocatalítica donde se muestra la generación de radicales libres.....	15

Capítulo 2: Material híbrido para la especiación de cromo en muestras de agua utilizando un sistema automático con detección quimioluminiscente

Figura 2.1 MFS desarrollado para la especiación de Cr(III) y Cr(VI).....	33
Figura 2.2 Material híbrido sintetizado (izquierda) y empacado en la minicolumna (derecha) para ser acoplado en el MFS.....	33
Figura 2.3 Esquema del sistema FBA propuesto para la determinación quimioluminiscente de Cr(III) y Cr(VI).....	35-36
Figura 2.4 Mecanismo de adsorción de Cr(VI) propuesto utilizando el material híbrido (MWCNTS-Ox/IL).....	40
Figura 2.5 Resultados obtenidos por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).....	41
Figura 2.6 Imágenes SEM correspondientes al material híbrido obtenido.....	42

Capítulo 3: Nanoemulsión basada en líquidos iónicos para la extracción y preconcentración de filtros químicos solares en muestras de aguas

Figura 3.1 Estructura molecular de los filtros químicos orgánicos benzofenona-3 (BZ3), octinoxato (OMC), octocrileno (OCR) y octisalato (EHS).....	67
Figura 3.2 Representación esquemática del procedimiento de extracción, preconcentración y detección mediante HPLC de filtros UV utilizando una nanoemulsión basada en líquidos iónicos para la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido (ILs-NE/US-DLLME).....	68
Figura 3.3 Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en las regiones de Bahía Blanca (A y B) y Viedma (C y D).....	72
Figura 3.4 Estructura molecular de los ILs estudiados para la formación de una NE.....	74

Figura 3.5 Distribución de tamaño de las gotas de la ILS-NE obtenida (ME-8) para la extracción de filtros orgánicos UV.....	75
Figura 3.6 Cromatograma correspondiente a la separación por HPLC de los cuatro filtros químicos UV estudiados.....	77
Figura 3.7 Efecto del pH en el proceso de extracción de BZ3, OMC, OCR y EHS utilizando el material propuesto (ILs-NE).....	80
Figura 3.8 Diagramas de Pareto correspondientes al diseño experimental de Plackett-Burman.....	81
Figura 3.9 Superficies de respuesta estimadas correspondientes a las variables seleccionadas (tiempo de ultrasonido y relación de ILS) para los cuatro filtros UV mediante la aplicación del diseño experimental de Plackett-Burman.....	82
Figura 3.10 Diagramas de Pareto correspondientes al diseño experimental factorial completo.....	83
Figura 3.11 Superficies de respuesta estimadas para las variables relación de ILS (A) y tiempo de ultrasonido (B) para los cuatro filtros UV correspondientes al diseño experimental factorial completo.....	84
Figura 3.12 Pictogramas de color obtenidos aplicando la metodología AGREE a diferentes trabajos reportados en la literatura para la determinación de filtros químicos UV y el método ILS-NE/US-DLLME propuesto.....	94

Capítulo 4: Monitoreo enzimático de la fotodegradación de catecol (1,2-dihidroxibenceno) empleando nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) como catalizador

Figura 4.1 Reacción de oxidación de PCT catalizada por la enzima PFO.....	111
Figura 4.2 Esquema del procedimiento de obtención de PFO a partir de batatas (Ipomoea batatas) e imagen del extracto final obtenido.....	113
Figura 4.3 Representación gráfica del dispositivo para la captura de imágenes digitales utilizado para la determinación de PCT.....	116
Figura 4.4 Diagrama del sistema de flujo utilizado para la fotodegradación de muestras conteniendo PCT y su determinación mediante la reacción enzimática con PFO.....	120
Figura 4.5 Estudio de la variación de la señal analítica (A) en función del tiempo (min) para soluciones de PCT a distintas concentraciones.....	124

Figura 4.6 Espectros de absorción molecular de soluciones testigo con distintas concentraciones de PCT luego de la reacción con PFO bajo las condiciones óptimas establecidas.....	125
Figura 4.7 Curva de calibrado de PCT obtenida mediante el método enzimático empleado.....	125
Figura 4.8 Comparación entre los valores de intensidad lumínica percibida en cada uno de los canales del espacio de color sRGB y GSV.....	126
Figura 4.9 Curva de calibrado para PCT obtenida mediante análisis por imágenes digitales.....	127
Figura 4.10 Micrografía TEM de la muestra de NPs-ZnO estudiada con una amplificación de 140.000X.....	128
Figura 4.11 Histograma de frecuencias de tamaño obtenido correspondiente a la muestra de NPs-ZnO analizadas por TEM.....	129
Figura 4.12 Espectro de absorción molecular de NPs-ZnO.....	130
Figura 4.13 Gráfico de potencial Z en función del pH para las NPs-ZnO utilizadas como fotocatalizador.....	131
Figura 4.14 Espectros de absorción molecular UV-Vis correspondientes a la fotodegradación de PCT durante distintos tiempos a pH=6,00 (a) y pH=8,30 (b).....	134
Figura 4.15 Concentración de PCT remanente (mg L ⁻¹) a diferentes TFD (pH=8,30) sin NPs-ZnO (curva azul) y con NPs-ZnO (curva roja).....	135
Figura 4.16 Cromatogramas de PCT (100 mg L ⁻¹), fotodegradado a. 5 min y b. 15 min.....	137
Fig 4.17 Mecanismo de fotodegradación de PCT propuesto.....	138

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo 2: Material híbrido para la especiación de cromo en muestras de agua utilizando un sistema automático con detección quimioluminiscente

Tabla 2.1 Tiempos de conmutación de válvulas solenoides, bombas peristálticas y agitador magnético correspondientes al sistema FBA propuesto.....	38
Tabla 2.2 Estudio de selectividad del material híbrido empleando la reacción de Cr(VI) con DPC.....	43
Tabla 2.3 Rangos estudiados y valores óptimos obtenidos para el proceso de especiación de Cr(III) y Cr(VI).....	45
Tabla 2.4 Resultados de la optimización de variables químicas en la detección por quimioluminiscencia de Cr(III) y Cr(VI).....	48
Tabla 2.5 Parámetros estadísticos y performance analítica del método quimioluminiscente propuesto para la determinación de Cr(III) y Cr(VI).....	50
Tabla 2.6 Límites de concentración de cationes que interfieren en la detección quimioluminiscente de Cr(III).....	52
Tabla 2.7 Estudio de recuperación de Cr(III) y Cr(VI) en diferentes muestras de agua aplicando el método de especiación propuesto.....	54

Capítulo 3: Nanoemulsión basada en líquidos iónicos para la extracción y preconcentración de filtros químicos solares en muestras de aguas

Tabla 3.1 Lista de los filtros UV admitidos en productos cosméticos según la directiva 83/574/CEE	57-58
Tabla 3.2 Variables y niveles estudiados mediante el diseño experimental de Plackett-Burman.....	70
Tabla 3.3 Estudio de diferentes materiales extractantes obtenidos a partir de la combinación de diferentes ILs y surfactante.....	76
Tabla 3.4 Parámetros estadísticos y performance analítica del método ILs-NE/US-DLLME propuesto.....	86
Tabla 3.5 Resultados del análisis de diferentes muestras de agua (A-E) aplicando el procedimiento ILs-NE/US-DLLME propuesto.....	88

Tabla 3.6 Comparación de diferentes trabajos reportados en la literatura para la determinación de filtros químicos UV en muestras de agua y el método ILS-NE/US-DLLME propuesto.....	91-92
Tabla 3.7 Comparación del veredor calculado con la métrica AGREE para diferentes métodos cromatográficos publicados en la literatura y el método ILS-NE/US-DLLME propuesto.....	95

Capítulo 4: Monitoreo enzimático de la fotodegradación de catecol (1,2-dihidroxibenceno) empleando nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) como catalizador

Tabla 4.1 Parámetros estudiados en la optimización de la reacción enzimática de PFO sobre PCT.....	114
Tabla 4.2 Parámetros de captura de imágenes digitales del smartphone.....	115
Tabla 4.3 Parámetros operacionales para la obtención del espectro UV-Vis de NPs-ZnO..	118
Tabla 4.4 Parámetros estudiados en el proceso de fotodegradación.....	120
Tabla 4.5 Parámetros de trabajo establecidos para realizar la determinación de PCT por HPLC.....	122
Tabla 4.6 Parámetros analíticos correspondientes al método espectrofotométrico (MEF) y por imágenes digitales (ID).....	127
Tabla 4.7 Resultados de los $D_{PCT}\%$ obtenidos a distintos pHs y durante diferentes TFD.....	133
Tabla 4.8 Resultados de los $D_{PCT}\%$ obtenidos con el agregado y sin el agregado de NPs-ZnO a diferentes TFD de una solución de PCT (100 mg L^{-1}).....	135
Tabla 4.9 Resultados de los $M_{PCT}\%$ obtenidos mediante el análisis de TOC a muestras sometidas a distintos tiempos de fotodegradación.....	136

ABREVIATURAS

(BmIm)(BF ₄)	Tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio
(BmIm)(PF ₆)	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio
(BmimCl)	Cloruro de 1-butil-3 metilimidazolio
(DDmimCl)	Cloruro de 1,3-didecil 2-metilimidazolio
(DmimCl)	Cloruro de 1-decil-3 metilimidazolio
AAS	Espectrometría de absorción atómica
AcE	Accionador electrónico
ADN	Ácido desoxirribobucleico
AE	Actividad enzimática
AM	Agitador magnético
APDC	Pirrolidina -ditiocarbamato de amonio
ARA	Agua residual de alperujo
BP	Bomba peristáltica
BPA	Bomba peristáltica auxiliar
BR	Britton Robinson
BZ3	Benzofenona-3
C	CANALES
CE	Contaminantes emergentes
CMD	Cámara de mezclado y detección

CMYK	Del inglés, cyan, magenta, yellow and key
CNTs	Nanotubos de carbono
CO	contaminantes orgánicos
CPE HPLC-UV	Extracción del punto nube acoplada a cromatografía líquida de alta performance con detector UV
DI-SPME	Microextracción en fase sólida por inmersión directa
DI-SPME	Microextracción en fase sólida por inmersión directa
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DLLME-GC	Microextracción líquido-líquido dispersiva acoplada a cromatografía de gases
DPC	Difenilcabazida
DSPME	Microextracción dispersiva en fase sólida
E_{crit}	Efecto crítico
EDS	Espectroscopía por energía dispersiva de rayos X
EDTA	Ácido etilendiamino tetra-acético
EE	Extracto enzimático
Eg	Energía de la banda prohibida
EHS	Octisalato
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos
ETAAS	Espectrometría de absorción atómica
EV	Valor de exposición (del inglés exposition value).

FAAS	Espectrometría de absorción atómica de llama
FBA	Análisis Flow-Batch
FP	Factor de preconcentración
FPS	Factor de protección solar
GAC	Química analítica verde
GC-MS	Cromatografía de gases-detector de masas
GC-MS/MS	Cromatografía de gases-detector masa-masa
GSV	Escala de grises
HF-LPME	Microextracción líquido-líquido en fibra hueca
HF-SPME	Microextracción en fase sólida en fibra hueca
HPLC	Cromatografía líquida de alta performance
HPLC-UV	Cromatografía líquida de alta performance-detector UV.
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
IC	Carbono inorgánico
ICP-OES	Espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente
ICP-MS	Espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente
ID	Imágenes digitales
ILs	Líquidos iónicos
ILs-NE	Nanoemulsión a base de líquidos iónicos
ILs-NE/US-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido

INCI	Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos
ISO	Organización internacional de estandarización
LLE	Extracción líquido-líquido
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPME	Microextracción líquido-líquido
MA	Muestra analizada
ME	Material extractante
MEF	Método espectrofotométrico
MeOH	Metanol
MFS	Sistemas en flujo de multiconmutación
MS	Espectrometría de masas
MSA-DLLME-HPLC	Microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por agitación magnética en jeringa acoplada a cromatografía líquida de alta resolución
MWCNTs	Nanotubos de carbono de pared múltiple
MWCNTs-Ox	Nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados
NEs	Nanoemulsiones
NPOC	Carbono orgánico no purgable
NPs	Nanopartículas
NPs-ZnO	Nanopartículas de óxido de zinc

OCR	Octocrileno
OMC	Octinoxato
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCT	Pirocatecol
PdI	Polidispersidad
PFCPs	Productos farmacéuticos y de cuidado personal
PFO	Polifenol oxidasa
PLA	Ácido poliláctico
POAs	Procesos de oxidación avanzados
PTFE	Politetrafluoroetileno
RGB	Del inglés, red, green and blue
ROI	Región de interés
RSD	Desviación estándar relativa
S	Desviación estándar
S	Pendiente
SBSE	Extracción por adsorción en barra agitadora
SDME	Microextracción en gota
SEM	Microscopio Electrónico de Barrido
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida

SWCNTs	Nanotubos de carbono de pared simple
TD	Tiempo de detección
TE	Tiempo de extracción
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TF	Tiempo final
TFD	Tiempo de fotodegradación
TiO ₂	Nanopartículas de óxido de titanio
TOC	Carbono orgánico total
TX-100	Triton X 100
UDSA-IL-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva a base de líquido iónico asistida por agitador
UE	Unión Europea
U _{ENZ}	Unidad enzimática
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta visible
V	Válvula solenoide
VI	Válvula de inyección
VS	Válvula de selección
WB	Balance de blancos
XRF	Espectrometría de fluorescencia de rayos X

Z	Tamaño medio de gota
ZnO	Nanopartículas de óxido de zinc
Z	Potencial Z (ζ)

CAPÍTULO 1

Introducción General

1.1 Contaminantes ambientales

En los últimos años, ciertos metales, así como diversos compuestos orgánicos se han liberado de manera extensa como contaminantes en el medio ambiente debido principalmente a actividades antropogénicas, es decir, aquellas actividades generadas por la acción humana. La distribución generalizada de estos contaminantes representa serias amenazas para la ecología y conlleva riesgos potenciales tanto para la salud humana como para la vida acuática, incluso cuando se encuentran en mínimas concentraciones. Como es conocido, los metales pesados, gases de efecto invernadero, hidrocarburos, pesticidas, y fertilizantes químicos, entre otros, representan una importante amenaza para el medio ambiente¹.

Por otro lado, los denominados *contaminantes emergentes* (CE) son sustancias químicas o materiales que se detectan actualmente en diversos cuerpos de agua y cuya presencia puede suponer un riesgo para el medio ambiente y la salud humana². El número de contaminantes que pueden considerarse emergentes es indeterminado e incluye fármacos de uso humano o veterinario, cosméticos, pesticidas, aditivos para diferentes materiales (antioxidantes, retardantes de llama, plastificantes, anticorrosivos, etc.), entre otros. Normalmente, se trata de compuestos que no están sometidos a una regulación específica que limite su presencia en el agua pero que podrían estar reguladas en el futuro si se establece que representan un riesgo para el

¹ Rasheed, T., Bilal, M., Nabeel, F., Adeel, M., & Iqbal, H. M. (2019). Environmentally-related contaminants of high concern: potential sources and analytical modalities for detection, quantification, and treatment. *Environment international*, 122, 52-66. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.11.038>

² Gomes, I. B., Simões, L. C., & Simões, M. (2018). The effects of emerging environmental contaminants on *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from drinking water in planktonic and sessile states. *Science of the total environment*, 643, 1348-1356. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.263>

medio acuático o a través de él. Por ejemplo, algunos CE se comportan como disruptores endocrinos, aunque pueden tener otros efectos tóxicos. Dicho riesgo se determina atendiendo a la peligrosidad y a la concentración de los contaminantes en el agua. Por otro lado, el origen de los CE en el medio acuático es diverso, aunque suele considerarse como principal causa la actividad humana, por ello las aguas residuales urbanas son una importante fuente de estos contaminantes³.

1.2 Métodos de separación y preconcentración de contaminantes

En las últimas décadas se ha enfocado considerablemente la atención en el desarrollo de métodos analíticos de rápida ejecución, alta precisión, elevada sensibilidad, seguridad y automatización para su aplicación en el análisis de muestras ambientales. Hasta el momento, se han propuesto diversos materiales y estrategias analíticas como herramientas para la determinación de contaminantes ambientales que se encuentran en baja concentración. No obstante, a pesar de los notables avances tecnológicos, la mayoría de las metodologías analíticas aún no permiten llevar a cabo mediciones directas sobre la muestra ambiental en su estado original. Además, sólo un número reducido de técnicas analíticas posee la suficiente sensibilidad para llevar a cabo la detección a niveles de trazas de contaminantes. Por consiguiente, en muchos casos, se hace necesario llevar a cabo una etapa preliminar de separación y enriquecimiento del analito previo al análisis.

En este sentido, uno de los pasos fundamentales en el proceso analítico es el paso de preparación de muestras, dirigido a resolver diversas problemáticas relacionadas con la

³<https://www.miteco.gob.es/es/agua/temas/estado-y-calidad-de-las-aguas/contaminantes-emergentes>.

naturaleza de la matriz, la detección de analitos en bajas concentraciones, o la adecuación de las características del analito con la instrumentación empleada. Las técnicas tradicionales de extracción suelen implicar la utilización de volúmenes considerables de solventes, en muchos casos tóxicos, no ajustándose a los principios actuales de la Química Analítica Verde (GAC, del inglés *Green Analytical Chemistry*). En contraposición a las técnicas de extracción tradicionales, actualmente hay una tendencia al desarrollo de metodologías innovadoras que presenten ventajas como una extracción más eficiente, tiempos reducidos, menor consumo de sustancias químicas nocivas y un enfoque general más asequible y verde, entre otros beneficios. De esta manera, los métodos propuestos se basan en gran medida en la miniaturización de los procedimientos de extracción convencionales tales como la extracción en fase líquida (LLE, del inglés *liquid-liquid extraction*) y la extracción en fase sólida (SPE, del inglés *solid phase extraction*)⁴. Por ello, se han desarrollado e implementado metodologías de microextracción como la microextracción en fase líquida (LPME, del inglés *liquid phase microextraction*) o la microextracción en fase sólida (SPME, del inglés *solid phase microextraction*). En la **Fig. 1.1** se presentan las variantes más comunes de estas metodologías y su aplicación para el estudio de distintos contaminantes en muestras ambientales.

Las técnicas de LPME se pueden clasificar en tres grupos: microextracción en gota (SDME, del inglés *single drop microextraction*), microextracción líquido-líquido en fibra hueca (HF-LPME, del inglés *hollow fiber liquid phase microextraction*), y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction*).

⁴ Sarafraz-Yazdi, A., & Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003>

Estas variantes difieren en la manera en que el solvente se pone en contacto con la fase acuosa⁵.

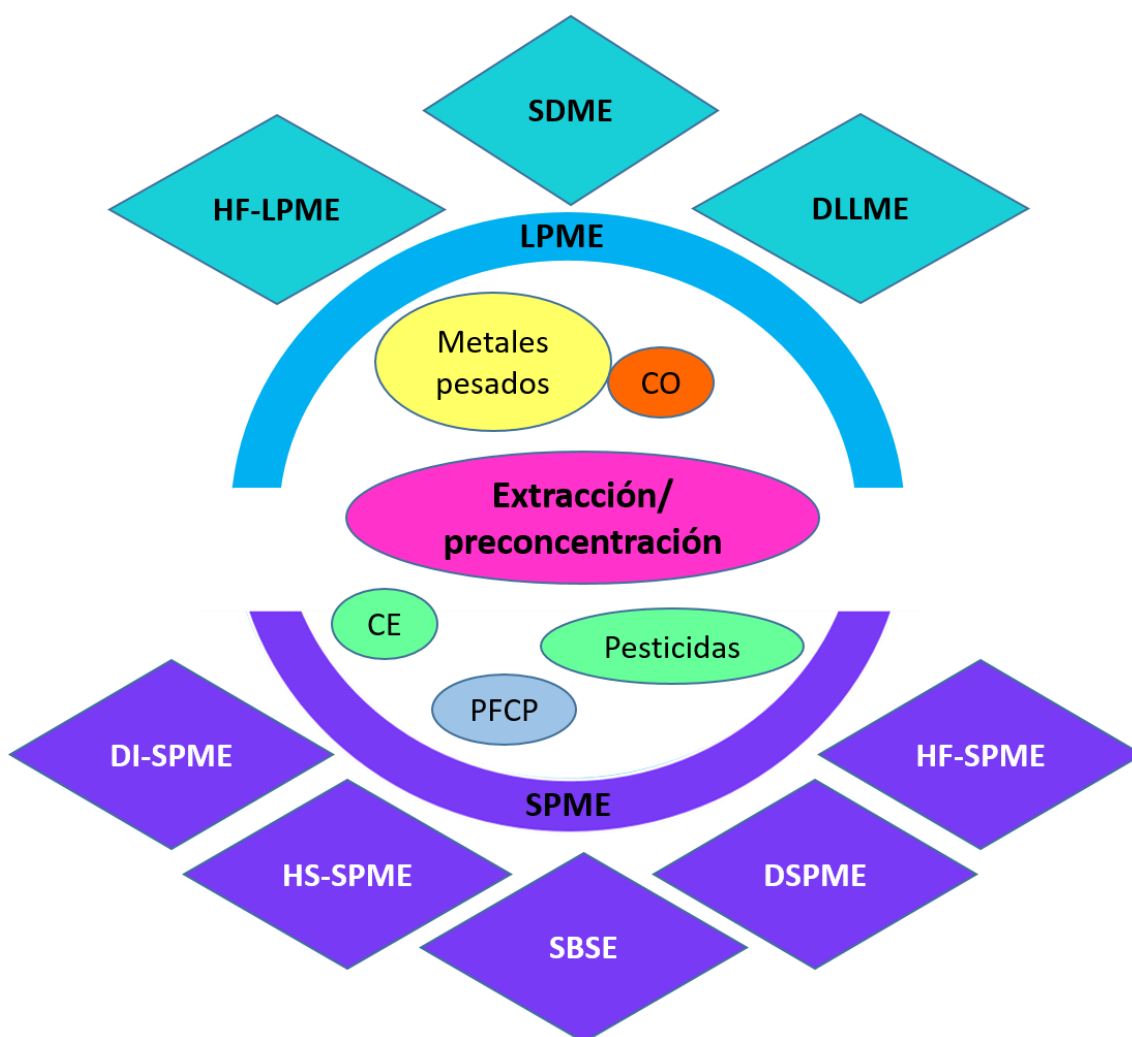


Fig. 1.1 Técnicas de microextracción en fase líquida (LPME) y en fase sólida (SPME). CE: contaminantes emergentes; CO: contaminantes orgánicos; PFCP: productos farmacéuticos y de cuidado personal; HF-LPME: microextracción líquido-líquido en fibra hueca; SDME: microextracción en gota; DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva; SPME: microextracción en fase sólida; DI-SPME: microextracción en fase sólida por inmersión directa; HS-SPME: microextracción en fase sólida con espacio de cabeza; SBSE: extracción por adsorción en barra agitadora; DSPME: microextracción dispersiva en fase sólida; HF-SPME: microextracción en fase sólida en fibra hueca.

⁵ Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Sajid, M. & Andruch, V. (2019). Liquid-phase microextraction: A review of reviews. *Microchemical Journal*, 149, 103989. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.103989>

Por otro lado, en SPME se emplea un soporte recubierto con un material adsorbente que se introduce en la muestra para la extracción de los analitos. Dicho material puede alojarse en una estructura similar a una jeringa o bien en una columna para su inserción en un sistema en flujo. Existen dos configuraciones principales de SPME dependiendo del tipo de muestra y analitos: la microextracción en fase sólida por inmersión directa (DI-SPME, del inglés *direct immersion solid phase microextraction*), la cual se usa para muestras gaseosas y líquidas, y la microextracción en fase sólida con espacio de cabeza (HF-SPME, del inglés *head-space solid phase microextraction*) la cual es adecuada para muestras sólidas y líquidas. Existen además otras variantes de la SPME, tales como la microextracción dispersiva en fase sólida (DSPME, del inglés *dispersive solid phase microextraction*). En este tipo de microextracción, el adsorbente no se adhiere a un núcleo de fibra, sino que se introduce directamente en la solución de muestra para la extracción del analito. A continuación, el adsorbente se dispersa, lo que amplía la superficie de contacto con la solución de muestra (para extraer el analito) o con la fase receptora (para desorber el analito en un disolvente orgánico). La DSPME se puede realizar tanto en modo tradicional, como también asistida por vórtex o por ultrasonidos⁶. Otra variante de este tipo de extracción es la extracción por adsorción en barra agitadora (SBSE, del inglés *stir bar sorptive extraction*), la cual se basa en la extracción por adsorción, mediante la cual los solutos se extraen en un recubrimiento de polímero sobre una varilla agitadora magnética⁷. Por último, la microextracción en fase sólida de fibra hueca (HF-SPME, del inglés *hollow fiber solid-phase microextraction*),

⁶ Ghorbani, M., Aghamohammadhassan, M., Chamsaz, M., Akhlaghi, H., & Pedramrad, T. (2019). Dispersive solid phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 118, 793-809. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.012>

⁷ David, F., & Sandra, P. (2007). Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 1152(1-2), 54-69. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.032>

se fundamenta en el establecimiento de un equilibrio entre el analito presente en la muestra y la fase estacionaria revestida en la fibra, la cual puede consistir en un polímero líquido, un sorbente sólido, o una combinación de ambos. La fase estacionaria desempeña un papel crucial en la extracción y preconcentración de los analitos deseados⁸.

En términos generales, en SPME se trabaja con volúmenes de fase de extracción inferiores a 1,0 mL, y la eficiencia de la extracción se relaciona estrechamente con la selección de materiales que presenten una adecuada afinidad por los analitos de interés⁹. Aunque las opciones de materiales disponibles comercialmente varían en términos de espesor, polaridad y naturaleza absorbente o adsorbente, no siempre proporcionan las propiedades de adsorción óptimas para todas las combinaciones de analitos y matrices de muestras. Por ello, a lo largo de los años se han explorado materiales con una adecuada afinidad por los analitos y la matriz específica de la muestra.

1.2.1 Nanomateriales, líquidos iónicos y materiales híbridos en técnicas de extracción y preconcentración

La incursión de la nanotecnología en el ámbito de la Química Analítica, se presenta como una alternativa de gran interés en el desarrollo de métodos innovadores en

⁸ Nomngongo, P. N., & Ngila, J. C. (2014). Determination of trace Cd, Cu, Fe, Pb and Zn in diesel and gasoline by inductively coupled plasma mass spectrometry after sample clean up with hollow fiber solid phase microextraction system. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 98, 54-59. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2014.06.001>

⁹ Delińska, K., Rakowska, P. W., & Kloskowski, A. (2021). Porous material-based sorbent coatings in solid-phase microextraction technique: recent trends and future perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 143, 116386. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116386>

técnicas de extracción (SPE o LLE), con el fin de lograr una eficiente separación y preconcentración de diversas especies químicas, entre ellas contaminantes ambientales.

Las características fundamentales de un adsorbente adecuado incluyen estabilidad química y térmica, resistencia mecánica, eficiente capacidad de adsorción y bajo costo. Los nanomateriales, a diferencia de los materiales convencionales, cumplen en la mayoría de los casos con estas especificaciones y se destacan por su mayor área superficial, abundantes sitios activos y mayor actividad en la superficie, lo que los convierte en óptimos candidatos para este tipo de aplicaciones¹⁰. En este sentido, uno de los nanomateriales que más atención han atraído son los nanotubos de carbono (CNTs, del inglés *carbon nanotubes*). Estos nanomateriales están formados por moléculas de carbono y fueron descubiertos en 1991 por (Iijima,1991).¹¹. Debido a sus notables propiedades físicas y químicas, los CNTs se han utilizado en muchos campos debido a su particular estructura grafitica y sus importantes características hidrofóbicas. Estas propiedades, le confieren una capacidad de adsorción singular que los hace efectivos en la separación de analitos tanto orgánicos como inorgánicos y por medio de diferentes procesos de adsorción¹². De esta manera, se han propuesto métodos

¹⁰ Sheikhan, L., & Jamalifard, Y. (2022). Multi-walled carbon nanotube-based dispersive solid phase extraction with following back-extraction for HPLC/UV determination of Rosmarinic acid in lemon balm and Rosemary plant samples. *Journal of the Indian Chemical Society*, 99(8), 100595. <https://doi.org/10.1016/j.jics.2022.100595>

¹¹ Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *nature*, 354(6348), 56-58. <https://doi.org/10.1038/354056a0>

¹² Song, X. Y., Chen, J., & Shi, Y. P. (2017). Different configurations of carbon nanotubes reinforced solid-phase microextraction techniques and their applications in the environmental analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 86, 263-275. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.11.006>

utilizando CNTs para extraer y preconcentrar diversos contaminantes orgánicos^{13 14}, así como inorgánicos^{15 16}.

Por otro lado, en LLME se ha demostrado que materiales como líquidos iónicos (ILs, del inglés *ionic liquids*) pueden ser herramientas eficaces para mejorar los límites de detección, la selectividad y la sensibilidad cuando se implementan en métodos de extracción y preconcentración. Los ILs representan una interesante alternativa a los solventes orgánicos volátiles tradicionales comúnmente empleados en métodos de extracción y preconcentración, debido a la obtención de óptimos parámetros analíticos. Estos compuestos se caracterizan por su composición exclusivamente iónica, y están formados por cationes orgánicos voluminosos y aniones de carácter orgánico o inorgánico. Los ILs poseen puntos de fusión inferiores a 100°C, una muy baja volatilidad, son estables en un amplio rango de temperaturas y resultan versátiles en su comportamiento debido a la presencia específica de aniones y cationes¹⁷. Algunas de sus propiedades, como la estabilidad térmica y la solubilidad en diversos solventes se

¹³ Acebal, C. C., Grünhut, M., Llamas, N. E., Insausti, M., Zelená, L., Sklenářová, H., ... & Band, B. S. F. (2016). An integrated on-line method for the preconcentration and simultaneous determination of metsulfuron methyl and chlorsulfuron using oxidized carbon nanotubes and second order fluorescent data. *Microchemical Journal*, 129, 90-97. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.06.011>

¹⁴ Nasir, A. N. M., Yahaya, N., Zain, N. N. M., Lim, V., Kamaruzaman, S., Saad, B., ... & Hirota, Y. (2019). Thiol-functionalized magnetic carbon nanotubes for magnetic micro-solid phase extraction of sulfonamide antibiotics from milks and commercial chicken meat products. *Food chemistry*, 276, 458-466. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.044>

¹⁵ Naseri, A., Abed, Z., Rajabi, M., Lal, B., Asghari, A., Baigenzhenov, O., ... & Hosseini-Bandegharai, A. (2023). Use of Chrysosporium/carbon nanotubes for preconcentration of ultra-trace cadmium levels from various samples after extensive studies on its adsorption properties. *Chemosphere*, 335, 139168. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139168>

¹⁶ Bhanjana, G., Dilbaghi, N., Kim, K. H., & Kumar, S. (2017). Carbon nanotubes as sorbent material for removal of cadmium. *Journal of Molecular Liquids*, 242, 966-970. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.07.072>

¹⁷ Haq, H. U., Elik, A., Durukan, H., Sarac, H., Demirbas, A., Boczkaj, G., ... & Altunay, N. (2023). Application of chemometric modeling for ionic liquid-based ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction: Analysis of fosetyl-aluminum in fruit and vegetable samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105725. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2023.105725>

encuentran principalmente influenciadas por la naturaleza del anión. Por otra parte, propiedades como la viscosidad, la tensión superficial y la densidad están vinculadas al catión y su estructura, longitud de la cadena alquílica, así como su simetría. Esta singularidad les otorga un valor incuestionable para diversas aplicaciones en el ámbito de las técnicas de preparación de muestras¹⁸. Se han propuesto ILs para la extracción y preconcentración de contaminantes tales como metales¹⁹ y contaminantes orgánicos, entre otros^{20 21}. Además, un punto a destacar es que los ILs son considerados solventes verdes, haciéndolos apropiados para el desarrollo de métodos analíticos sostenibles, contribuyendo a los principios de la GAC. No obstante, en algunos casos, se han identificado limitaciones en la implementación de ILs en procesos de extracción, como su elevada solubilidad en agua. En este sentido, el empleo de ILs soportados en nanomateriales sólidos se presenta como una estrategia valiosa para superar esta dificultad. Además, la combinación de nanomateriales dispersos en ILs se convierte en una herramienta sinérgica que puede mejorar significativamente la eficiencia de extracción de ciertos analitos.

¹⁸ Yavir, K., Konieczna, K., Marcinkowski, Ł., & Kloskowski, A. (2020). Ionic liquids in the microextraction techniques: The influence of ILs structure and properties. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 130, 115994. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115994>

¹⁹ Alsohaimi, I. H., Kariri, M. A., Alzaid, M., Alhumaimess, M. S., El-Sayed, M. Y., Alshammari, M. S., ... & Hassan, H. M. (2023). Efficient extraction of heavy metals from aqueous environments using magnetic effervescent Tablet-Assisted Ionic Liquid-Based Dispersive Solid-Phase microextraction. *Journal of Molecular Liquids*, 123663. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2023.123663>

²⁰ Qiao, L., Tao, Y., Qin, H., & Niu, R. (2023). Multi-magnetic center ionic liquids for dispersive liquid-liquid microextraction coupled with in-situ decomposition based back-extraction for the enrichment of parabens in beverage samples. *Journal of Chromatography A*, 1689, 463771. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463771>

²¹ Fiorentini, E. F., Botella, M. B., & Wuilloud, R. G. (2021). A simple preconcentration method for highly sensitive determination of Pb in bee products by magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 95, 103661. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103661>

Teniendo en cuenta estas consideraciones, así como las ventajas potenciales derivadas de la combinación de ILs y nanomateriales, el empleo de materiales híbridos se plantea como una alternativa prometedora para el desarrollo de técnicas de extracción. Los ILs han demostrado ser excelentes componentes de nanomateriales híbridos, otorgando propiedades químicas específicas que mejoran la selectividad, la eficiencia de extracción y su reutilización. El empleo de estos materiales ha sido reportado en diversos métodos de extracción y preconcentración de contaminantes, basados en DSPME²², HF-SPME²³, así como en métodos de preconcentración en línea²⁴, entre otros.

La síntesis de este tipo de material híbrido se basa comúnmente en la impregnación del nanomaterial con un IL específico²⁵. El contacto directo se logra mediante la adición gradual gota a gota o la dispersión del nanomaterial en la fase del IL durante un período de tiempo predeterminado. Ocasionalmente, se utilizan otros reactivos, tales como surfactantes y solventes orgánicos como etanol, que actúan como dispersantes del IL, lo que facilita el procedimiento. A continuación, el material obtenido se somete a un proceso de limpieza, filtración y secado. En la **Fig. 1.2** se presenta un diagrama de los pasos de obtención de nanomateriales híbridos basados en ILs.

²² Nyaba, L., Matong, J. M., Dimpe, K. M., & Nomngongo, P. N. (2016). Speciation of inorganic selenium in environmental samples after suspended dispersive solid phase microextraction combined with inductively coupled plasma spectrometric determination. *Talanta*, 159, 174-180. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.023>

²³ Ebrahimi, M., Es'haghi, Z., Samadi, F., & Hosseini, M. S. (2011). Ionic liquid mediated sol-gel sorbents for hollow fiber solid-phase microextraction of pesticide residues in water and hair samples. *Journal of Chromatography A*, 1218(46), 8313-8321. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.058>

²⁴ Polo-Luque, M. L., Simonet, B. M., & Valcárcel, M. (2013). Solid-phase extraction of nitrophenols in water by using a combination of carbon nanotubes with an ionic liquid coupled in-line to CE. *Electrophoresis*, 34(2), 304-308. <https://doi.org/10.1002/elps.201200367>

²⁵ Martinis, E. M., Grijalba, A. C., Pérez, M. B., Llaver, M., & Wuilloud, R. G. (2017). Synergistic analytical preconcentration with ionic liquid-nanomaterial hybrids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.004>

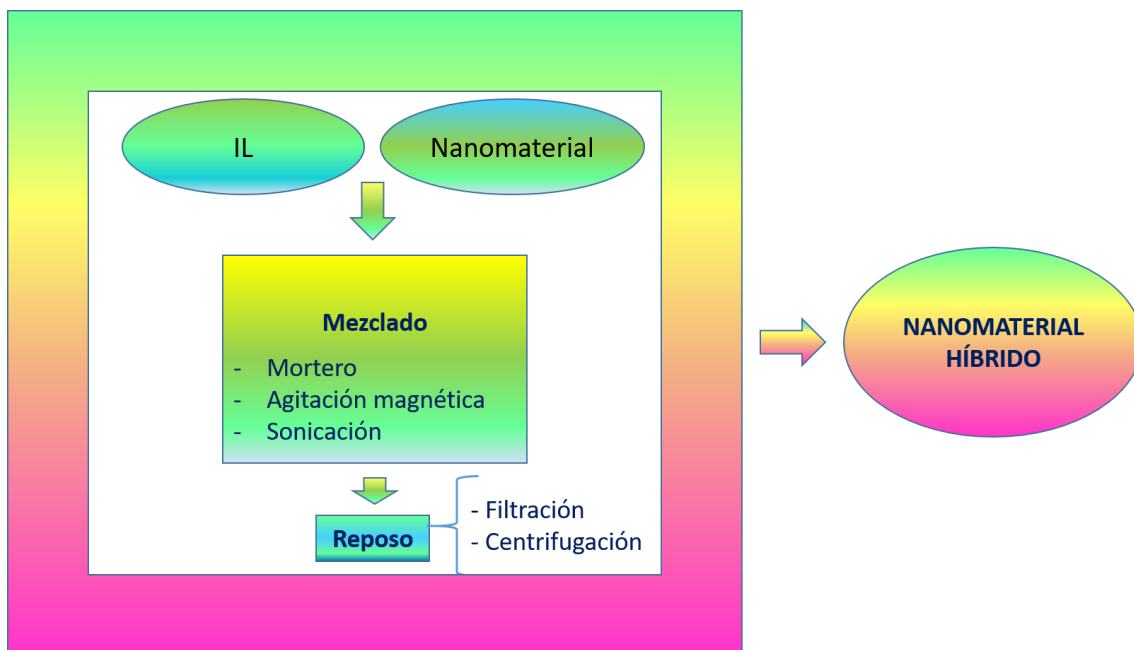


Fig. 1.2 Representación esquemática general del procedimiento de obtención de materiales híbridos basados en nanomateriales y líquidos iónicos.

1.3 Métodos para remediación de muestras ambientales

Para contribuir a solucionar los problemas ocasionados por la contaminación ambiental, se han desplegado considerables esfuerzos en investigación con el fin de mejorar la eficacia de las técnicas de remediación o de desarrollar nuevos enfoques para la detección, cuantificación y tratamiento eficiente de muestras. Las tecnologías de tratamiento convencionales, tales como procesos de filtración²⁶, sedimentación²⁷,

²⁶ Kurniawan, T. A., Chan, G. Y., Lo, W. H., & Babel, S. (2006). Physico-chemical treatment techniques for wastewater laden with heavy metals. *Chemical engineering journal*, 118(1-2), 83-98.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2006.01.015>

²⁷ Li, G., Yang, H., An, T., & Lu, Y. (2018). Antibiotics elimination and risk reduction at two drinking water treatment plants by using different conventional treatment techniques. *Ecotoxicology and environmental safety*, 158, 154-161. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.04.019>

floculación²⁸ y adsorción²⁹, entre otros, presentan importantes ventajas pero no siempre permiten la completa eliminación o reducción significativa de contaminantes.

El desarrollo y uso de nuevos materiales brinda oportunidades prometedoras para el desarrollo de técnicas de remediación avanzadas capaces de brindar soluciones en el ámbito del tratamiento de aguas. En particular, los procesos de oxidación avanzados (POAs) ocupan una posición central en el tratamiento de aguas superficiales y aguas residuales industriales, destacándose de manera particular en la eliminación de contaminantes orgánicos y contaminantes emergentes³⁰. En el contexto de los POAs, la generación de radicales libres desempeña un papel fundamental al promover la transformación de contaminantes en compuestos de menor peligrosidad y mayor biodegradabilidad. De esta manera, una de las ventajas inherentes de los POAs sobre los procedimientos químicos y biológicos se basa en que suelen ser amigables con el medio ambiente. Esto se debe a que no conllevan la transferencia de contaminantes de una fase a otra, como ocurre en la precipitación y adsorción química, ni generan volúmenes considerables de residuos peligrosos.

Los POAs poseen la capacidad de degradar un alto número de contaminantes orgánicos y transformarlos en productos simples y que resultan menos tóxicos. La

²⁸ Saitoh, T., Shibata, K., Fujimori, K., & Ohtani, Y. (2017). Rapid removal of tetracycline antibiotics from water by coagulation-flotation of sodium dodecyl sulfate and poly (allylamine hydrochloride) in the presence of Al (III) ions. *Separation and Purification Technology*, 187, 76-83.

<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.06.036>

²⁹ Crini, G., Lichtfouse, E., Wilson, L. D., & Morin-Crini, N. (2018). Adsorption-oriented processes using conventional and non-conventional adsorbents for wastewater treatment. *Green adsorbents for pollutant removal: fundamentals and design*, 23-71. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92111-2_2

³⁰ Kumar, R., Qureshi, M., Vishwakarma, D. K., Al-Ansari, N., Kuriqi, A., Elbeltagi, A., & Saraswat, A. (2022). A review on emerging water contaminants and the application of sustainable removal technologies. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, 6, 100219. <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2022.100219>

mayoría de estos procesos se basan en la generación de radicales hidroxilos altamente reactivos ($\text{OH}\bullet$), los cuales presentan un potencial redox de 2,8 V. De esta manera, dichos radicales inician una serie de reacciones de oxidación que finalmente resultan en la formación de productos de mineralización (dióxido de carbono y agua). Por otro lado, una de las ventajas de los POAs es su versatilidad, ya que se pueden emplear diversos mecanismos para la generación de radicales hidroxilos ($\text{OH}\bullet$). Entre los métodos más comúnmente utilizados en los POAs se incluyen: (I) oxidación de Fenton, (II) oxidación de plasma, (III) ozonización y (IV) fotocátalisis³¹.

(I) *Oxidación de Fenton*. Este método de oxidación se fundamenta en la utilización de una combinación de peróxido de hidrógeno y sales de hierro (Fe^{2+}), generando radicales hidroxilos ($\text{OH}\bullet$) en un medio ácido. Este mecanismo suele requerir tiempos de reacción relativamente cortos en comparación con otros POAs³². Sin embargo, una limitación importante de la oxidación de Fenton es la necesidad de mantener el pH operativo en un rango ácido estrecho, generalmente comprendido entre 2,8 y 3,5, para garantizar una óptima eficacia. Este intervalo de pH es esencial para asegurar la actividad del catalizador de hierro y prevenir su precipitación como hidróxido férrico. No obstante, trabajar a estos valores de pH implica el uso de cantidades significativas de ácido y, posteriormente, la necesidad de neutralizar la solución tratada. En consecuencia, esta

³¹ Cheng, M., Zeng, G., Huang, D., Lai, C., Xu, P., Zhang, C., & Liu, Y. (2016). Hydroxyl radicals based advanced oxidation processes (AOPs) for remediation of soils contaminated with organic compounds: a review. *Chemical Engineering Journal*, 284, 582-598. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.09.001>

³² Bautista, P., Mohedano, A. F., Gilarranz, M. A., Casas, J. A., & Rodriguez, J. J. (2007). Application of Fenton oxidation to cosmetic wastewaters treatment. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1-2), 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.004>

exigencia conlleva desventajas prácticas y económicas, lo que limita la aplicabilidad de la oxidación de Fenton en situaciones reales de tratamiento de aguas residuales³³.

(II) *Oxidación de plasma*. Este proceso se inicia a través de la colisión de electrones generados en una descarga, con átomos o moléculas presentes en el gas generando especies altamente reactivas. Estas especies incluyen radicales hidroxilo, ozono y peróxido de hidrógeno³⁴. Una de las limitaciones más importantes de esta técnica es el consumo de energía y el alto costo económico.

(III) *Ozonización*: La ozonización, ya sea convencional o catalítica, emerge como una tecnología amigable con el ambiente para el tratamiento de aguas residuales. En este proceso, una molécula de ozono, con un potencial de oxidación de 2,07 V, resulta capaz de oxidar una gran diversidad de contaminantes orgánicos y, de forma directa, llevar a cabo su degradación. Además, en presencia de un catalizador, el ozono puede reaccionar con el agua para dar origen a radicales hidroxilos, que presentan, como hemos mencionado, una elevada capacidad de oxidación³⁵. Una limitación significativa del ozono reside en su capacidad para oxidar compuestos orgánicos refractarios. Otras desventajas incluyen un rendimiento bajo del generador de ozono (aproximadamente del 6 al 12% con oxígeno y del 4 al 6% con aire) y la inestabilidad del ozono, lo que requiere su generación *in situ* debido a problemas relacionados con el almacenamiento y el transporte, entre otros³⁶.

³³ Bello, M. M., Raman, A. A. A., & Asghar, A. (2019). A review on approaches for addressing the limitations of Fenton oxidation for recalcitrant wastewater treatment. *Process Safety and Environmental Protection*, 126, 119-140. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2019.03.028>

³⁴ Magureanu, M., Bradu, C., & Parvulescu, V. I. (2018). Plasma processes for the treatment of water contaminated with harmful organic compounds. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 51(31), 313002. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/aacd9c>

³⁵ Wang, J., & Zhuan, R. (2020). Degradation of antibiotics by advanced oxidation processes: An overview. *Science of the Total Environment*, 701, 135023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135023>

³⁶ Mecha, A. C., & Chollom, M. N. (2020). Photocatalytic ozonation of wastewater: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 18, 1491-1507. <https://doi.org/10.1007/s10311-020-01020-x>

(IV) *Fotocatálisis*. Esta metodología está basada en la eliminación o reducción de contaminantes presentes en muestras tanto gaseosas como líquidas por medio de una reacción que ocurre en la superficie fotocatalítica de un catalizador activada mediante radiación. Entonces, la degradación de los contaminantes presentes en la muestra se realiza a través de una reacción catalítica impulsada por la acción de la radiación sobre la superficie de un material semiconductor (fotocatalizador), como se puede ver en la **Fig. 1.3**. De esta forma, la fotocátalisis permite la degradación, e incluso la mineralización, de gran variedad de compuestos orgánicos según la siguiente reacción:

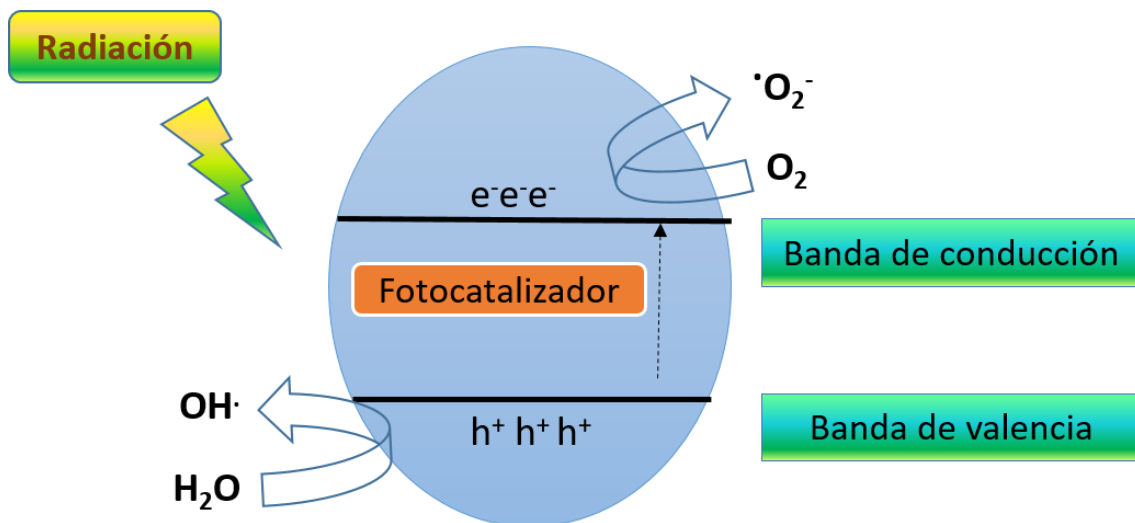
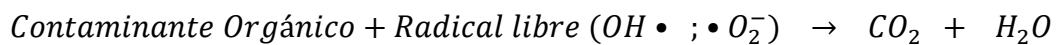


Fig. 1.3 Mecanismo general de una reacción fotocatalítica donde se muestra la generación de radicales libres. Esquema modificado de Pattnaik y col.³⁷

³⁷ Pattnaik, A., Sahu, J. N., Poonia, A. K., & Ghosh, P. (2023). Current perspective of nano-engineered metal oxide based photocatalysts in advanced oxidation processes for degradation of organic pollutants in wastewater. *Chemical Engineering Research and Design*. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2023.01.014>

En particular, la fotocatalisis heterogénea ha surgido como una estrategia cada vez más viable en el ámbito de la remediación ambiental. En términos generales, este proceso fotocatalítico requiere la inclusión de los siguientes componentes: un semiconductor o fotocatalizador, una fuente de radiación (natural o artificial), un sistema reactor y oxígeno. Los fotocatalizadores son compuestos semiconductores de óxidos metálicos que se activan mediante la absorción de fotones y tienen la capacidad de catalizar reacciones sin agotarse en el proceso³⁸. Algunos requisitos esenciales para un fotocatalizador eficiente abarcan ser estable, económico, no tóxico y, por supuesto, altamente fotoactivo. La fotocatalisis heterogénea ofrece una serie de ventajas con respecto a otros POAs como la utilización de oxígeno del aire como agente oxidante, la degradación completa de la mayoría de los contaminantes sin generar residuos secundarios (mineralización)³⁹, la versatilidad y su alineamiento con varios principios de la Química Verde. Además, varias de las ventajas asociadas con esta metodología pueden potenciarse a partir del empleo de nuevos materiales como catalizadores.

La utilización de semiconductores de óxidos metálicos como TiO₂ y ZnO han atraído considerablemente la atención gracias a la capacidad de estos materiales para degradar contaminantes bajo irradiación UV. A pesar de que el TiO₂ es un catalizador ampliamente conocido y comúnmente utilizado⁴⁰, muchos trabajos demuestran las propiedades del

³⁸ Umar, M., & Aziz, H. A. (2013). Photocatalytic degradation of organic pollutants in water. *Organic pollutants-monitoring, risk and treatment*, 8, 196-197. <http://doi.org/10.5772/53699>

³⁹ Zangeneh, H., Zinatizadeh, A. A. L., Habibi, M., Akia, M., & Isa, M. H. (2015). Photocatalytic oxidation of organic dyes and pollutants in wastewater using different modified titanium dioxides: A comparative review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 26, 1-36. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.10.043>

⁴⁰ Fujishima, A., Rao, T. N., & Tryk, D. A. (2000). Titanium dioxide photocatalysis. *Journal of photochemistry and photobiology C: Photochemistry reviews*, 1(1), 1-21. [https://doi.org/10.1016/S1389-5567\(00\)00002-2](https://doi.org/10.1016/S1389-5567(00)00002-2)

ZnO en reacciones fotocatalíticas⁴¹. Así, el ZnO resulta una alternativa interesante al TiO₂ dado que éste absorbe una porción más amplia del espectro UV y ofrece una alternativa más económica para aplicaciones fotocatalíticas⁴².

Por otro lado, este tipo de materiales mejoran notoriamente sus propiedades fotocatalíticas cuando presentan mayor área de contacto superficial. Es por ello que los nanomateriales de óxidos metálicos y sus nanocompuestos asociados han sido objeto de una extensa investigación debido a su potencial aplicación en el tratamiento de aguas⁴³.

Las nanopartículas (NPs) representan partículas cuyo diámetro es inferior a los 100 nanómetros, y constan de una composición que abarca desde 20 hasta 15,000 átomos. Este tipo de material ha promovido un notable interés en la comunidad científica, y se han aplicado en múltiples disciplinas que engloban la electrónica, optoelectrónica, los materiales avanzados, industria cosmética, farmacéutica, biomedicina, energía, y catalizadores, así como en las aplicaciones relacionadas con la monitorización y la detección ambiental⁴⁴. Estas partículas se manifiestan en escalas tanto newtonianas como cuánticas y pueden adoptar diversas configuraciones geométricas, incluyendo varillas, tubos y esferas. Gracias a su morfología controlada, características texturales,

⁴¹ Lee, K. M., Lai, C. W., Ngai, K. S., & Juan, J. C. (2016). Recent developments of zinc oxide based photocatalyst in water treatment technology: a review. *Water research*, 88, 428-448. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.09.045>

⁴² Saleh, R., & Djaja, N. F. (2014). UV light photocatalytic degradation of organic dyes with Fe-doped ZnO nanoparticles. *Superlattices and Microstructures*, 74, 217-233. <https://doi.org/10.1016/j.spmi.2014.06.013>

⁴³ Kumar, U., Hassan, J. Z., Bhatti, R. A., Raza, A., Nazir, G., Nabgan, W., & Ikram, M. (2022). Photocatalysis vs adsorption by metal oxide nanoparticles. *Journal of Materials Science & Technology*, 131, 122-166. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2022.05.020>

⁴⁴ Dutta, V., Devasia, J., Chauhan, A., Jayalakshmi, M., Vasantha, V., Jha, A., ... & Ghotekar, S. (2022). Photocatalytic nanomaterials: Applications for remediation of toxic polycyclic aromatic hydrocarbons and green management. *Chemical Engineering Journal Advances*, 11, 100353. <https://doi.org/10.1016/j.ceja.2022.100353>

variabilidad en la química de superficie, naturaleza cristalina y alta estabilidad, los materiales nanoestructurados de óxidos metálicos demuestran una gran selectividad para la eliminación de contaminantes orgánicos e iones de metales pesados a través de procesos de adsorción y fotocatalisis.

En particular, las nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO), representan un excelente material que exhibe propiedades fisicoquímicas excepcionales al ser empleado en aplicaciones fotocatalíticas. Específicamente, como semiconductor, el ZnO presenta notables características, incluyendo alta conductividad térmica, elevada movilidad electrónica y una banda prohibida que oscila entre 3,2 y 3,4 eV ⁴⁵. Debido a estas cualidades, las NPs-ZnO han sido empleadas como catalizadores en procesos de fotodegradación de una amplia variedad de contaminantes ambientales⁴⁶.

⁴⁵ Zhang, Q., Dandeneau, C. S., Zhou, X., & Cao, G. (2009). ZnO nanostructures for dye-sensitized solar cells. *Advanced materials*, 21(41), 4087-4108. <https://doi.org/10.1002/adma.200803827>

⁴⁶ Mutalib, A. A., & Jaafar, N. F. (2022). ZnO photocatalysts applications in abating the organic pollutant contamination: A mini review. *Total Environment Research Themes*, 100013. <https://doi.org/10.1016/j.totert.2022.100013>

CAPÍTULO 2

Material híbrido para la
especiación de cromo en
muestras de agua utilizando
un sistema automático con
detección
quimioluminiscente

2.1 Introducción

En el año 1766, un mineral conocido como “*plomo rojo de Siberia*” fue estudiado por un mineralogista alemán llamado Johann Gottlob Lehmann, dejando una nueva inquietud en la química de ese entonces. En el estudio se pudo determinar que dicho mineral contenía plomo, pero también otro elemento que no se lograba determinar. Sin embargo, se pudo conocer una cualidad muy útil y valiosa de este mineral que fue su elevada estabilidad como pigmento cuando se lo utilizaba molido, lo cual lo hacía apropiado para su aplicación en pinturas. Más tarde en 1797, un químico francés llamado Louis Nicolas Vauquelin continuó estudiando este mineral y, utilizando carbonato de potasio para el tratamiento del mismo, logró aislar el plomo como un precipitado, quedando así en disolución un compuesto desconocido que al ser combinado con otros metales generaba sales coloreadas. De esa manera, preparó entonces el óxido del elemento y un año más tarde logró aislar el mismo en su forma metálica calentando la mezcla con carbón en polvo. Finalmente, llamó cromo (del griego *chrōma*, "color") a este elemento por la propiedad coloreada que presentaban sus diversos compuestos⁴⁷. Aunque sus primeras aplicaciones fueron en pinturas, no fue hasta finales del siglo XIX que se extendió su aplicación en la industria del acero. Allí era utilizado como aditivo, no obstante, hasta principios del siglo XX no se empleó de manera masiva debido a la falta de disponibilidad a gran escala de cromo metálico.

⁴⁷ Jacobs, J. A., & Testa, S. M. (2005). Overview of chromium (VI) in the environment: background and history. Chromium (VI) handbook, 1-21. <https://doi.org/10.1201/9780203487969>

De esta manera, diversas industrias fijaron su atención en el cromo, tales como industrias del cuero, textil, y galvanoplastia, entre otras. Sin embargo, estas aplicaciones comenzaron a generar un impacto en el medio ambiente debido a los aportes de este compuesto junto con los desechos originados por dichas industrias.

El cromo puede encontrarse como contaminante en aire, suelos y diferentes cuerpos de agua, en sus diferentes estados de oxidación, dependiendo de las condiciones o el medio en el cual se encuentre. Los principales estados de oxidación del cromo son cromo trivalente o Cr(III), cromo hexavalente o Cr(VI) y cromo metálico o Cr(0). En particular, los compuestos de Cr(VI) suelen ser altamente solubles, móviles y biodisponibles en comparación con las especies de Cr(III) escasamente solubles. Por otro lado, Cr(IV) y Cr(V) forman sólo intermedios inestables en reacciones de estados de oxidación trivalente y hexavalente con agentes oxidantes y reductores, respectivamente.

El estado hexavalente Cr(VI) es la segunda oxidación más estable y el más importante toxicológicamente. A diferencia de algunas formas menos tóxicas de cromo, que se encuentran naturalmente en el ambiente (suelo, rocas, polvo, plantas y animales), Cr(VI) se origina principalmente por procesos industriales formando parte de cromatos, dicromatos y ácido crómico. Una vez absorbido, Cr(VI) es distribuido rápidamente a todos los tejidos, encontrándose en altas concentraciones en riñón, hígado y huesos. Se absorbe fácilmente y es rápidamente tomado por los eritrocitos e integrado a otras células por el sistema transportador de sulfatos. Además, Cr(VI) se reduce intracelularmente a Cr(III) a nivel de mitocondrias y núcleo. A su vez, la reducción intracelular genera intermediarios reactivos como Cr(V), Cr(IV) y Cr(III), así como

radicales libres hidroxilo y oxígeno. Estas formas reactivas de Cr son susceptibles de alterar el ADN (ácido desoxirribobucleico)⁴⁸. Por ende, la exposición a Cr(VI) conlleva a una variedad de problemas clínicos, afectando diversos órganos en función de la vía de exposición (inhalación, ingestión o dérmica). Además, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés *International Agency for Research on Cancer*) dependiente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó al Cr(VI) como un carcinógeno humano de clase I⁴⁹.

Por el contrario, Cr(III) es un oligoelemento esencial necesario para el buen desempeño y funcionamiento de los organismos vivos. La deficiencia dietética de Cr(III) se ha asociado con problemas de crecimiento y fertilidad, diabetes relacionada con intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, hipercolesterolemia y aterogénesis, entre otros⁵⁰. Cr(III) no atraviesa las membranas celulares, uniéndose directamente a la transferrina. En el caso de Cr(III) sus compuestos tanto solubles como insolubles generalmente no son activos como carcinógenos⁵¹. Sin embargo, una exposición excesiva a Cr(III) puede promover su unión al ADN, lo que lleva a efectos adversos en la estructura celular⁵².

En base a lo expuesto, podemos inferir que las determinaciones de las diversas especies de cromo resultan de gran relevancia desde el punto de vista toxicológico y

⁴⁸ https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/13_cromo_guia_de_actuacion_y_diagnostico.pdf

⁴⁹ IARC. (1990). Chromium, nickel and welding. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. *Int Agency Res Cancer Lyon*, 49, 49-256. PMID:2232124

⁵⁰ Shapcott, D., & Hubert, J. (1979). Chromium in nutrition and metabolism. In *Symposium on Chromium in Nutrition and Metabolism (1979: Sherbrooke, Canada)*. Elsevier.

⁵¹ Katz, S. A., & Salem, H. (1993). The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. *Journal of Applied Toxicology*, 13(3), 217-224. <https://doi.org/10.1002/jat.2550130314>

⁵² Shahrivari, S., Faridbod, F., & Ganjali, M. R. (2018). Highly selective and sensitive colorimetric determination of Cr³⁺ ion by 4-amino-5-methyl-4H-1, 2, 4-triazole-3-thiol functionalized Au nanoparticles. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 191, 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.09.064>

ambiental. En particular, el análisis de muestras de agua es de vital importancia para garantizar la calidad y seguridad de los suministros para consumo humano. La OMS informó que el nivel de Cr(VI) en agua potable no debe superar los 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ ⁵³.

El análisis de especiación de un elemento proporciona información sobre las concentraciones individuales de sus diversas formas químicas. En particular, la especiación de cromo ha atraído el interés de los investigadores y por ello se han propuesto hasta el momento diversos métodos analíticos para cuantificar las diversas formas de cromo en muestras ambientales aplicando técnicas tales como espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS, del inglés *flame atomic absorption spectrometry*)⁵⁴, espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ETAAS, del inglés *electrothermal atomic absorption spectrometry*)⁵⁵, espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, del inglés *inductively coupled plasma-optical emission spectrometry*)⁵⁶, espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, del inglés *inductively coupled plasma mass spectrometry*)⁵⁷ y espectrometría de fluorescencia de rayos X (XRF, del inglés *X-ray fluorescence*)⁵⁸. En

⁵³ World Health Organization. (2020). Chromium in Drinking-water (No. WHO/HEP/ECH/WSH/2020.3). World Health Organization. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/338062/WHO-HEP-ECH-WSH-2020.3-eng.pdf>

⁵⁴ Gomez, V., & Callao, M. P. (2006). Chromium determination and speciation since 2000. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 25(10), 1006-1015. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2006.06.010>

⁵⁵ Aparna, A., Sumithra, M., Venkateswarlu, G., Sahayam, A. C., Chaurasia, S. C., & Mukherjee, T. (2006). Speciation of Cr (III) and Cr (VI) in seawater after separation with a sulphate-form of Dowex-1 and ETAAS determination. *ATOMIC SPECTROSCOPY-NORWALK CONNECTICUT-*, 27(4), 123.

⁵⁶ Gil, R. A., Cerutti, S., Gasquez, J. A., Olsina, R. A., & Martinez, L. D. (2005). On-line preconcentration and determination of chromium in parenteral solutions by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 60(4), 531-535. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2005.02.008>

⁵⁷ Zhu, Q. Y., Zhao, L. Y., Sheng, D., Chen, Y. J., Hu, X., Lian, H. Z., ... & Cui, X. B. (2019). Speciation analysis of chromium by carboxylic group functionalized mesoporous silica with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 195, 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.11.043>

⁵⁸ Bahadir, Z., Bulut, V. N., Hidalgo, M., Soylak, M. U. S. T. A. F. A., & Marguí, E. (2016). Cr speciation in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 115, 46-51. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2015.11.001>

muchos de estos métodos se propone la determinación de Cr(VI) y se determina Cr(III) después de su oxidación a Cr(VI)⁵⁹ o bien se determina Cr(III) y luego por diferencia entre Cr(III) y cromo total, Cr(VI) previa reducción de este a Cr(III)⁶⁰.

Por otro lado, se han propuesto diversos métodos para la determinación simultánea de compuestos de cromo con diferentes estados de oxidación basados en cromatografía líquida de par iónico⁶¹, de fase reversa⁶², acoplada a espectrometría de masas⁶³ y electroforesis capilar⁶⁴. No obstante, todos estos métodos necesitaron algún paso de pretratamiento. Además, se han propuesto sistemas en línea para la determinación de Cr(VI) acoplados a cromatografía líquida de alta performance (HPLC, del inglés *high-performance liquid chromatography*) con detección UV⁶⁵ y espectrometría de absorción atómica (AAS, del inglés *atomic absorption spectrometry*)⁶⁶. Sin embargo, algunas de

⁵⁹ Tuzen, M., & Soylak, M. (2007). Multiwalled carbon nanotubes for speciation of chromium in environmental samples. *Journal of Hazardous materials*, 147(1-2), 219-225.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.069>

⁶⁰ Ren, Y., Fan, Z., & Wang, J. (2007). Speciation analysis of chromium in natural water samples by electrothermal atomic absorbance spectrometry after separation/preconcentration with nanometer-sized zirconium oxide immobilized on silica gel. *Microchimica Acta*, 158, 227-231.

<https://doi.org/10.1007/s00604-006-0680-0>

⁶¹ Lintschinger, J., Kalcher, K., Gössler, W., Kölbl, G., & Novic, M. (1995). Simultaneous determination of chromium (III) and chromium (VI) by reversed-phase ion-pair HPLC with chromium-specific detection. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 351, 604-609. <https://doi.org/10.1007/BF00323333>

⁶² Séby, F., Charles, S., Gagean, M., Garraud, H., & Donard, O. F. X. (2003). Chromium speciation by hyphenation of high-performance liquid chromatography to inductively coupled plasma-mass spectrometry—study of the influence of interfering ions. *Journal of analytical atomic spectrometry*, 18(11), 1386-1390. <https://doi.org/10.1039/B306249J>

⁶³ Lin, Y. A., Jiang, S. J., Sahayam, A. C., & Huang, Y. L. (2016). Speciation of chromium in edible animal oils after microwave extraction and liquid chromatography inductively coupled plasma mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 128, 274-278. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.05.001>

⁶⁴ Chen, Y., Chen, J., Xi, Z., Yang, G., Wu, Z., Li, J., & Fu, F. (2015). Simultaneous analysis of Cr (III), Cr (VI), and chromium picolinate in foods using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Electrophoresis*, 36(9-10), 1208-1215. <https://doi.org/10.1002/elps.201500015>

⁶⁵ Padarauskas, A., Judžentien, A., Naujalis, E., & Paliulionyt, V. (1998). On-line preconcentration and determination of chromium (VI) in waters by high-performance liquid chromatography using pre-column complexation with 1, 5-diphenylcarbazide. *Journal of Chromatography A*, 808(1-2), 193-199. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00118-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00118-6)

⁶⁶ Gáspár, A., & Posta, J. (1997). On-line sorption preconcentration of chromium (VI) and its determination by flame atomic absorption spectrometry. *Analytica chimica acta*, 354(1-3), 151-158. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00457-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00457-1)

estas técnicas mostraron baja sensibilidad, requirieron una manipulación compleja de la muestra y presentaron largos tiempos de análisis. Por ejemplo, Andrle y col. propusieron un método para la determinación simultánea de Cr(III) y Cr(VI) mediante HPLC con detección UV⁶⁷. En el método, tanto Cr(III) como Cr(VI) reaccionaron con pirrolidina-ditiocarbamato de amonio (APDC), el cual es uno de los agentes quelantes más efectivos que se utiliza en reacciones de formación de complejos con iones Cr(III) y Cr(VI). Entonces, los complejos formados se extrajeron con acetato de etilo, el cual se evaporó posteriormente a presión reducida. Los complejos separados se disolvieron en acetonitrilo puro, y la solución se inyectó en el cromatógrafo. Si bien el método presentó un amplio rango lineal, el análisis resultó extenso ya que el procedimiento consume más de 3 h para el análisis de una muestra. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de métodos de preparación de muestras adecuados para separar y preconcentrar previamente las diferentes especies de cromo antes de su detección. Diversos métodos de extracción basados en LLE⁶⁸ y SPE⁶⁹ se han empleado para la separación y preconcentración de especies de cromo. En particular, SPE es una de las técnicas más utilizadas debido a su relativa simplicidad, bajo consumo de solventes orgánicos y la posibilidad de automatización del proceso, entre otros. Sin embargo, en esta técnica, la selección adecuada del adsorbente es crucial para asegurar la adecuada y selectiva

⁶⁷ Andrle, C. M., & Broekaert, J. A. C. (1993). Speciation of Cr (III) and Cr (VI) by reversed phase high-performance liquid chromatography using UV-detection. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 346, 653-658. <https://doi.org/10.1007/BF00321265>

⁶⁸ Béni, Á., Karosi, R., & Posta, J. (2007). Speciation of hexavalent chromium in waters by liquid-liquid extraction and GFAAS determination. *Microchemical Journal*, 85(1), 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2006.05.004>

⁶⁹ Filik, H., & Avan, A. A. (2019). Dextran modified magnetic nanoparticles based solid phase extraction coupled with linear sweep voltammetry for the speciation of Cr (VI) and Cr (III) in tea, coffee, and mineral water samples. *Food chemistry*, 292, 151-159. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.058>

adsorción de los analitos. Materiales, como carbón activado⁷⁰, resinas⁷¹, nanofibras de carbono⁷² y nanotubos de carbono (CNTs, del inglés *carbon nanotubes*)⁷³, tienen un papel destacado en la eficiencia de extracción de los analitos. Entre los nanomateriales introducidos, se encuentra que estos últimos, poseen excelentes propiedades como materiales adsorbentes. No obstante, una de las principales desventajas que presentan los CNTs es que no son selectivos hacia los iones metálicos y también tienden a sufrir agregación en soluciones acuosas que pueden reducir la capacidad de adsorción y la eficiencia de extracción, especialmente cuando no existe una funcionalización previa. Por ello, la funcionalización química de las superficies de los nanotubos puede considerarse como una buena estrategia para resolver algunos de estos inconvenientes^{74 75}.

En cuanto a la agregación, se propusieron diferentes alternativas para dispersar los CNTs utilizando diferentes solventes, tales como surfactantes, solventes orgánicos y líquidos iónicos (ILs, del inglés *ionic liquids*)⁷⁶. En los últimos años, los ILs se han

⁷⁰ Feist, B., & Mikula, B. (2014). Preconcentration of heavy metals on activated carbon and their determination in fruits by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Food chemistry*, 147, 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.002>

⁷¹ Tokaloğlu, Ş., Papak, A., & Kartal, Ş. (2017). Separation/preconcentration of trace Pb (II) and Cd (II) with 2-mercaptobenzothiazole impregnated Amberlite XAD-1180 resin and their determination by flame atomic absorption spectrometry. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(1), 19-23. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.04.017>

⁷² Mubarak, N. M., Faghihzadeh, A., Tan, K. W., Sahu, J. N., Abdullah, E. C., & Jayakumar, N. S. (2017). Microwave assisted carbon nanofibers for removal of zinc and copper from waste water. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 17(3), 1847-1856. <https://doi.org/10.1166/jnn.2017.12818>

⁷³ Thines, R. K., Mubarak, N. M., Nizamuddin, S., Sahu, J. N., Abdullah, E. C., & Ganesan, P. (2017). Application potential of carbon nanomaterials in water and wastewater treatment: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 72, 116-133. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2017.01.018>

⁷⁴ Huang, D., Deng, C., & Zhang, X. (2014). Functionalized magnetic nanomaterials as solid-phase extraction adsorbents for organic pollutants in environmental analysis. *Analytical Methods*, 6(18), 7130-7141. <https://doi.org/10.1039/C4AY01100G>

⁷⁵ Filik, H., & Avan, A. A. (2019). Magnetic nanostructures for preconcentration, speciation and determination of chromium ions: A review. *Talanta*, 203, 168-177. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.05.061>

⁷⁶ Lu, F., Zhang, S., & Zheng, L. (2012). Dispersion of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) by ionic liquid-based phosphonium surfactants in aqueous solution. *Journal of Molecular Liquids*, 173, 42-46.

combinado con materiales adsorbentes para mejorar la eficiencia y la selectividad en procesos de extracción⁷⁷. El papel de los ILs es mejorar la dispersión de los CNTs, obteniendo de esta manera un material híbrido capaz de extraer y preconcentrar analitos orgánicos⁷⁸. Sin embargo, hasta el momento, no se ha informado un material híbrido para llevar a cabo la especiación de cromo. Solo unos pocos trabajos proponen la especiación en un paso previo a la determinación de los analitos. Uno de ellos utiliza un nanomaterial de alúmina⁷⁹ y otro utiliza nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs, del inglés *multi-walled carbon nanotubes*) para la adsorción del quelato de Cr(VI) obtenido con APDC⁵⁹.

Por otro lado, las técnicas luminiscentes son una importante alternativa para el análisis de muestras complejas y con bajas concentraciones de analito, debido principalmente a su alta selectividad y sensibilidad analítica. En particular, la quimioluminiscencia es una técnica sencilla y económica debido a que no requiere una fuente de radiación ni el uso de monocromadores. Seitz y col. describieron la determinación de Cr(III) por quimioluminiscencia utilizando esta especie como catalizador de la reacción entre luminol y peróxido de hidrógeno⁸⁰. Sin embargo, en

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2012.06.012>

⁷⁷ Tokalioğlu, Ş., Yavuz, E., Şahan, H., Çolak, S. G., Oçakoğlu, K., Kaçer, M., & Patat, Ş. (2016). Ionic liquid coated carbon nanospheres as a new adsorbent for fast solid phase extraction of trace copper and lead from sea water, wastewater, street dust and spice samples. *Talanta*, 159, 222-230. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.06.022>

⁷⁸ Polo-Luque, M. L., Simonet, B. M., & Valcárcel, M. (2013). Ionic liquid combined with carbon nanotubes: a soft material for the preconcentration of PAHs. *Talanta*, 104, 169-172. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.10.025>

⁷⁹ Monasterio, R. P., Lascalea, G. E., Martínez, L. D., & Wuilloud, R. G. (2009). Determination of Cr (VI) and Cr (III) species in parenteral solutions using a nanostructured material packed-microcolumn and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 23(3), 157-166. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2009.03.002>

⁸⁰ Seitz, W. R., Suydam, W. W., & Hercules, D. M. (1972). Determination of trace amounts of chromium (III) using chemiluminescence analysis. *Analytical Chemistry*, 44(6), 957-963. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ac60314a011>

general, los métodos quimioluminiscentes requieren el acoplamiento a un sistema automático que permita el agregado de reactivos y muestra a una celda de reacción en un espacio aislado de la luz externa.

Los sistemas automáticos en flujo basados en la multiconmutación (MFS) y el análisis Flow-Batch (FBA), son alternativas interesantes para hacer factible un método o para transformar procesos en batch en procesos automáticos. Los sistemas MFS y FBA pueden realizar diferentes etapas del procedimiento analítico, como la separación y/o la pre-concentración previa de analitos y la determinación que puede incluir el acoplamiento a instrumentos analíticos convencionales.

La conformación y las ventajas de los sistemas FBA se han descrito en la literatura⁸¹. En particular, se puede resaltar la capacidad de poder programar la totalidad o gran parte del proceso y la posibilidad de realizar las mediciones de la señal analítica directamente en una cámara de mezclado que puede actuar como celda de detección. Ambos son hechos importantes para la automatización de los métodos en los que se utiliza quimioluminiscencia como técnica de detección⁸².

⁸¹ Diniz, P. H. G. D., de Almeida, L. F., Harding, D. P., & de Araújo, M. C. U. (2012). Flow-batch analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 35, 39-49. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.02.009>

⁸² Grünhut, M., Martins, V. L., Centurión, M. E., Ugulino Araujo, M. C., & Band, B. S. F. (2011). Flow-batch analyzer for the chemiluminescence determination of catecholamines in pharmaceutical preparations. *Analytical letters*, 44(1-3), 67-81. <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.500765>

2.2 Objetivo

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método analítico para determinar Cr(III) y Cr(VI) en muestras de agua potable. Se propuso obtener y caracterizar un material híbrido basado en la combinación de nanotubos de carbono y líquidos iónicos para separar y/o preconcentrar ambas especies y realizar su posterior detección mediante quimioluminiscencia. Además, se planteó como objetivo la automatización de las distintas etapas del proceso analítico mediante la utilización de técnicas en flujo.

2.3 Parte Experimental

2.3.1 Reactivos y soluciones

Todas las soluciones se prepararon utilizando reactivos de calidad analítica y agua ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) obtenida con un sistema Milli-Q (Millipore, EEUU).

Una solución buffer (pH=12,0) se preparó mezclando 25,0 mL de solución $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl (Merck, Alemania) y 6,0 mL de solución $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH (Merck, Alemania), en un volumen final de 100,0 mL con agua destilada.

Una solución patrón de luminol $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$ se preparó disolviendo 0,1770 g de luminol (Sigma-Aldrich, Alemania) con 100 mL de la solución buffer (pH=12,0). Esta solución se almacenó en una botella oscura a 4°C y permaneció estable durante una semana. Una solución de trabajo de luminol ($5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) se preparó diariamente mediante dilución apropiada de la solución patrón en solución buffer.

Una solución de peróxido de hidrógeno $0,0100 \text{ mol L}^{-1}$ se preparó por dilución apropiada de una solución de peróxido de hidrógeno al 30% (Merck, Alemania). Se preparó una solución de EDTA de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ diluyendo una solución madre de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ (Merck, Alemania).

Se prepararon soluciones madre de Cr(III) y Cr(VI) de 100 mg L^{-1} cada una disolviendo cantidades adecuadas de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (Mallinckrodt, EEUU) y $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Sigma-Aldrich, Alemania) en agua ultrapura, respectivamente. Estas soluciones se acidificaron con ácido nítrico al 65% (Merck, Alemania). Se prepararon soluciones de trabajo de Cr(III) y Cr(VI) mediante dilución con agua de las soluciones madre.

Para la preparación del material adsorbente, se emplearon nanotubos de carbono de pared múltiple con diámetros externos de 40-60 nm y una pureza > 95 % (Bayer, Alemania), una solución acuosa 0,500 mol L⁻¹ del líquido iónico cloruro de 1-butil-3 metilimidazolio (Merck, Alemania) y una solución acuosa 0,500 mol L⁻¹ del líquido iónico cloruro de 1-butil-3 metilimidazolio (Merck, Alemania) de pH=11,0 la cual se preparó adicionando NaOH 0,10 mol L⁻¹ a la solución hasta alcanzar el pH adecuado y finalmente se le adicionó NaCl hasta obtener una concentración 0,1 g %.

El reactivo de color de difenilcabazida (DPC) se preparó pesando 0,20 g de DPC a los que se les añadió 25,00 mL de acetona y 0,3 mL de H₂SO₄ concentrado y llevando finalmente a un volumen de 50,00 mL con acetona.

2.3.2 Materiales y métodos

2.3.2.1 Especiación de Cr(III) y Cr(VI)

2.3.2.1.1 Preparación del material híbrido

En primer lugar, se obtuvieron nanotubos de carbono de pared múltiple oxidados (MWCNTs-Ox). Para ello, se dispersaron 0,3000 g de MWCNTs en 25 mL de ácido nítrico concentrado. Luego, la mezcla se sometió a reflujo durante 48 h bajo agitación magnética. Posteriormente, la dispersión resultante se diluyó en agua y se filtró. El sólido resultante se lavó hasta alcanzar un pH neutro y la muestra se secó en estufa de vacío a 40°C⁸³. Entonces, el material híbrido se preparó pesando 0,100 g de MWCNTs-Ox y añadiendo 0,50 mL de una solución 0,050 mol L⁻¹ del líquido iónico cloruro de 1-

⁸³ Datsyuk, V., Kalyva, M., Papagelis, K., Parthenios, J., Tasis, D., Siokou, A., ... & Galiotis, C. (2008). Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *carbon*, 46(6), 833-840. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2008.02.012>

butil-3 metilimidazolio (BmimCl). La mezcla fue homogeneizada en un mortero y refrigerada a 4°C durante 24 h. A continuación, este material se utilizó para rellenar una minicolumna de Tygon (longitud: 30 mm y d.i.: 4 mm). En cada extremo se colocó un algodón a modo de frita, con el fin de retener el material dentro de la columna.

2.3.2.1.2 Caracterización del material híbrido

La composición del material híbrido se examinó mediante espectroscopía por energía dispersiva de rayos X (EDS, del inglés *energy-dispersive X-ray spectroscopy*) utilizando un equipo Oxford modelo X-Max⁵⁰ (Reino Unido). La estructura física y la morfología del material híbrido, antes y después de la adsorción de Cr(VI), se analizó mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, del inglés *scanning electron microscope*) utilizando un microscopio LEO modelo EVO 40 XVP (Reino Unido). En ambos casos, la preparación de la muestra se llevó a cabo metalizándola con oro utilizando un equipo Pelco modelo Sputter Coater 91000 (EEUU).

2.3.2.1.3 Sistema de flujo para la especiación de Cr(III) y Cr(VI)

La especiación de cromo se realizó en línea mediante un MFS el cual se muestra en la **Fig. 2.1**. El mismo constó de dos válvulas solenoides de tres vías (V1 y V2) marca NResearch (EEUU) y sólo un canal (C1) donde se insertó una minicolumna conteniendo el material híbrido sintetizado (**Fig. 2.2**). El flujo a través de C1 circuló a un caudal de 0,85 mL min⁻¹ propulsado por una bomba peristáltica Gilson modelo Minipuls 3 (Francia). El proceso de especiación fue realizado en diferentes etapas. En primer lugar, se llevó a cabo el acondicionamiento del material. Para ello, V1 y V2 estuvieron en

posición OFF y por activación de la bomba peristáltica durante 60 s se hizo fluir a través de la minicolumna 0,85 mL de agua y, a continuación, 2,12 mL de la solución BmimCl 0,05 mol L⁻¹ (150 s). Luego, se procedió a pasar por la minicolumna un volumen de 5,0 mL de solución estándar/muestra (353 s). Dado que Cr(III) no tiene afinidad por el material de extracción, se colectó la muestra en un vial luego de su paso por la minicolumna, mientras que Cr(VI) quedó retenido en el material híbrido. Entonces, el vial conteniendo Cr(III) fue reemplazado por un recipiente de desecho y la minicolumna fue sometida a un lavado con 0,85 mL de agua (60 s) seguido por el paso de aire durante 60 s a fin de eliminar el agua remanente en la minicolumna. Finalmente, el paso de elución fue llevado a cabo activando las válvulas V1 y V2 (posición ON) y en modo de flujo reverso, es decir, invirtiendo el sentido de circulación de la bomba peristáltica y a un caudal de 1,0 mL min⁻¹. Entonces, se cargó la minicolumna con 0,30 mL de eluyente conformado por una solución alcalina de BmimCl conteniendo 0,10 g% de NaCl. Una vez que todo el volumen de eluyente se encontraba contenido en la minicolumna, se detuvo el flujo durante 10 min. Transcurrido este lapso, se reestableció el flujo y se recogió el eluyente conteniendo Cr(VI) en su respectivo vial. Luego, se lavó el sistema haciendo pasar 1 min de agua y finalmente se acondicionó la minicolumna para la siguiente determinación.

Se desarrolló un programa específico para el control del MFS utilizando LabVIEW® 5.1 (EEUU). El mismo permitió el control de la bomba peristáltica, incluyendo el sentido de giro, y las válvulas solenoides (V1 y V2) a través de un accionador electrónico (AcE) *lab-made* de 7 salidas, el cual estuvo conectado a una computadora con procesador Intel Pentium® 4 (EEUU) mediante una interfaz que utilizó el puerto paralelo de la PC.

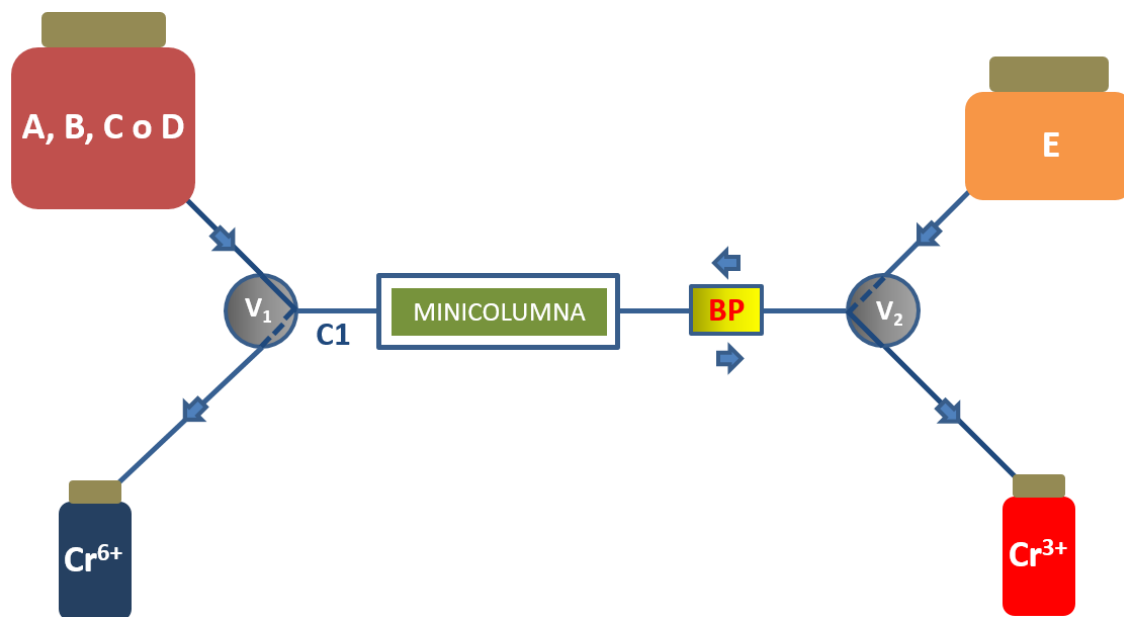


Fig. 2.1 MFS desarrollado para la especiación de Cr(III) y Cr(VI). A: solución de acondicionamiento; B: muestra; BP: bomba peristáltica; C: agua; C1: canal 1; D: aire; E: eluyente; V: válvula solenoide. La columna está rellena con el material híbrido compuesto por MWCNTs-Ox e IL.

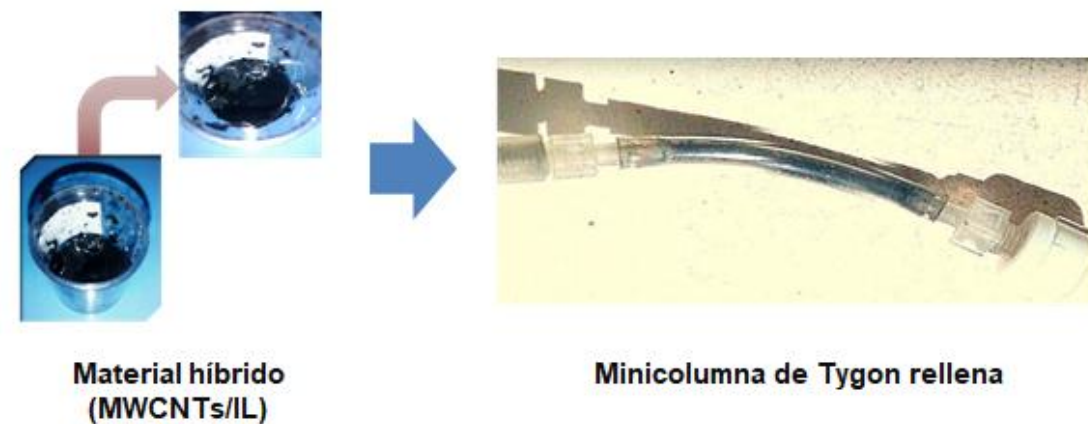


Fig. 2.2 Material híbrido sintetizado (izquierda) y empacado en la minicolumna (derecha) para ser acoplado en el MFS.

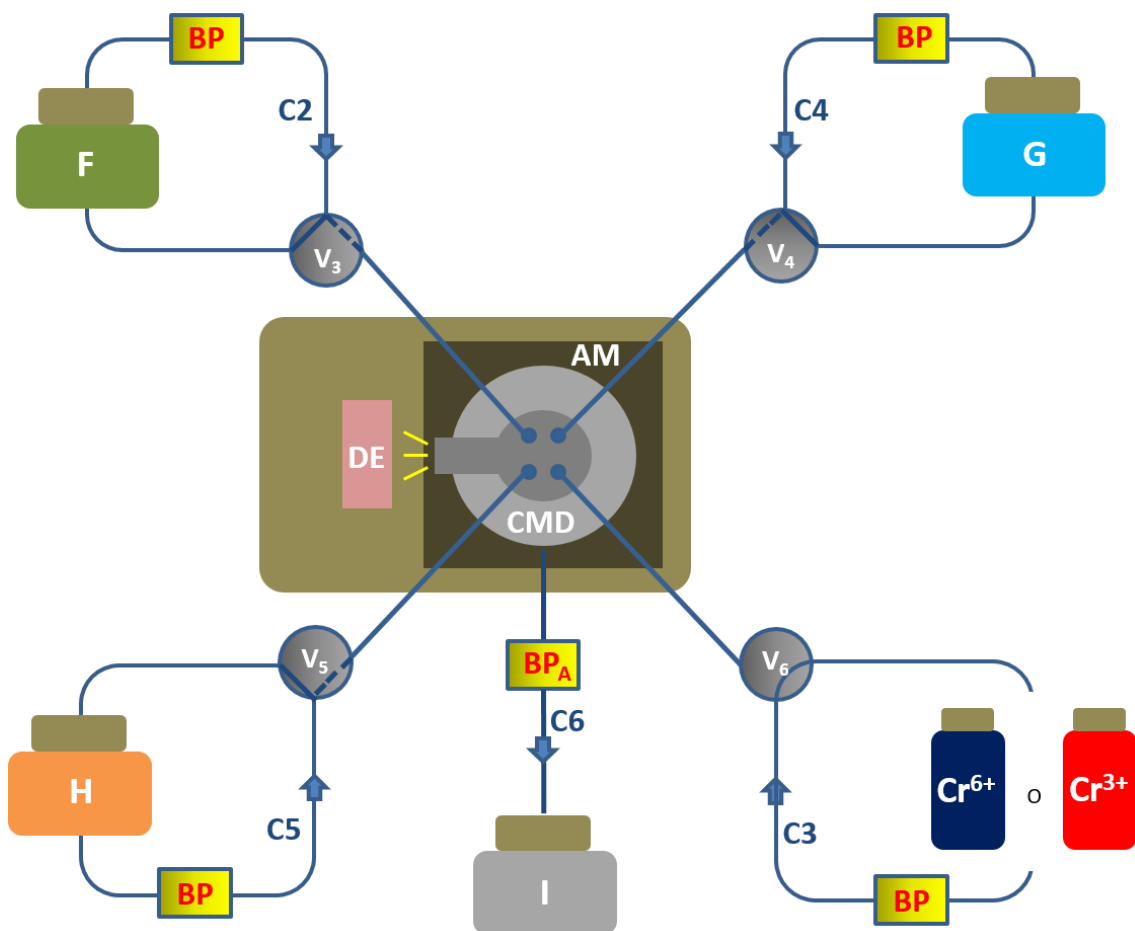
2.3.2.2 Detección de Cr(III) y Cr(VI)

2.3.2.2.1 Sistema FBA

En la **Fig. 2.3a** se muestra un diagrama esquemático del sistema FBA propuesto para la detección quimioluminiscente de Cr(III) y Cr(VI). El sistema constó de cinco canales, a través de los cuales fluyeron luminol (C2), muestra ó estándar (C3), peróxido de hidrógeno (C4), agua (C5) y residuos (C6). La dirección del flujo en los canales C2 a C5 fue controlada por válvulas solenoides de tres vías NResearch (EEUU). En un comienzo, mientras las válvulas V3 a V6 estaban en posición OFF, las soluciones circularon desde y hacia sus respectivos recipientes. Cuando estas válvulas se activaron (posición ON) las soluciones se dirigieron a la cámara de mezclado y detección (CMD).

La **Fig. 2.3b** muestra la CMD fabricada en el laboratorio utilizando como material PTFE (Politetrafluoroetileno). La misma fue diseñada con cuatro entradas para permitir el ingreso de las soluciones de luminol, estándar o muestra, peróxido de hidrógeno y agua, y una salida para permitir su vaciado. A su vez, la CMD presentó en el lateral una ventana de cuarzo, la cual fue ubicada lo más abajo posible con el fin de minimizar el volumen final de la mezcla de reacción (1,50 mL). De esta manera, la CMD se utilizó para realizar tanto la reacción química como la detección de quimioluminiscencia. Además, se construyó en el laboratorio un pequeño sistema de agitación magnética utilizando un motor tipo *cooler* (4x4 cm) al que se le acopló una barra con un imán en cada extremo. Este dispositivo fue colocado debajo de la CMD (**Fig. 2.3b**). Entonces, la CMD acoplada al sistema de agitación fue colocada en el espectrofluorímetro marca Aminco Bowman modelo Serie 2 (EEUU) utilizado como detector, reemplazando el portacelda original del

equipo, el cual fue circunstancialmente removido (**Fig. 2.3c**). La ventana de cuarzo de CMD estuvo orientada hacia el detector del equipo, mientras que la lámpara del mismo se mantuvo apagada durante todo el procedimiento. Por otro lado, el quinto canal (C6) fue utilizado para vaciar la CMD por medio de una bomba peristáltica auxiliar (BPA) marca Ismatec (EEUU). De este modo, una vez finalizada la reacción de quimioluminiscencia, la solución presente en la CMD fue propulsada hacia el desecho. En este caso también se desarrolló un programa específico para el control del sistema FBA utilizando LabVIEW® 5.1 (EEUU). El mismo permitió el control de ambas bombas peristálticas (BP y BPA), las válvulas solenoides (V3 a V6) y el agitador magnético, a través del AE, el cual estuvo conectado a la computadora citada anteriormente.



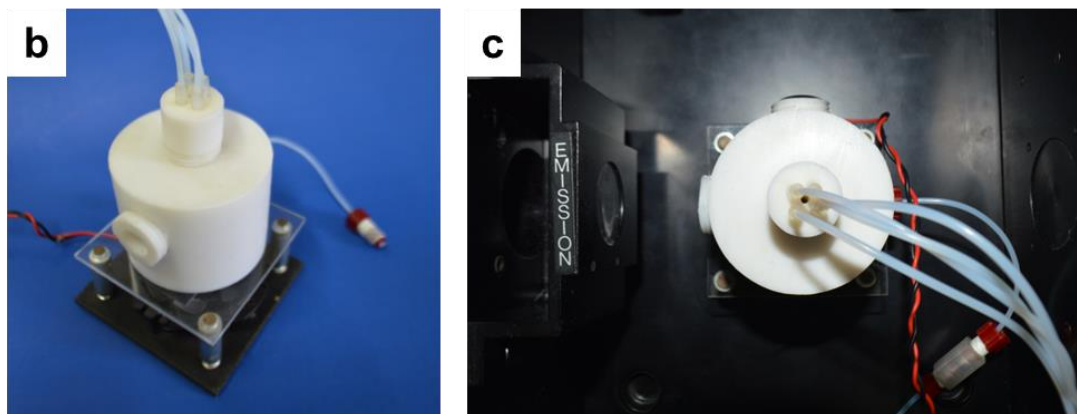


Fig. 2.3 a- Esquema del sistema FBA propuesto para la determinación quimioluminiscente de Cr(III) y Cr(VI). **b-** CMD acoplada al sistema de agitación. **c-** CMD y sistema de agitación acoplados al detector. AM: agitador magnético; BP: bomba peristáltica; BPA: bomba peristáltica auxiliar; CMD: cámara de mezclado y detección; F: luminol; G: peróxido de hidrógeno; H: agua; I: desecho; V: válvula solenoide.

2.3.2.2.2 Procedimiento del sistema FBA

Preparación del sistema. Como paso inicial, se estudió el caudal de cada canal. Esto es necesario ya que en un sistema FBA el volumen introducido en la CMD es regulado a través del tiempo de activación de la correspondiente válvula solenoide. Para ello, cada canal fue llenado con agua y se determinó la masa de agua recogida durante un período de 30 s por activación de la bomba peristáltica y la válvula solenoide correspondiente. El volumen correspondiente se calculó mediante el dato de densidad de agua teniendo en cuenta las condiciones experimentales (25°C y 1,0 atm). Estas medidas se realizaron por quintuplicado (n=5) en cada canal.

Antes de comenzar el procedimiento analítico, las válvulas se configuraron en posición OFF de manera que todas las soluciones circularon desde y hacia sus respectivos

reservorios cuando la bomba estaba encendida. Luego, las válvulas V3, V4, V5 y V6 fueron activadas (ON) durante 10 s y así las soluciones se dirigieron hacia la CMD. De esta manera, se completaron los canales entre las válvulas solenoides y la CMD con sus respectivas soluciones. Inmediatamente, se encendió la BPA y el exceso de las soluciones contenidas en la CMD fue aspirada a los residuos durante 20 s. Esta operación consumió un tiempo total de 30 s. Finalmente, el sistema quedó preparado para realizar el procedimiento de calibración para Cr(III) y Cr(VI), y el análisis de las muestras.

Procedimiento para Cr(III). En el caso de la determinación de Cr(III), el análisis de las soluciones estándar y de las muestras se realizó activando secuencialmente las válvulas V3, V4 y V5 durante intervalos de tiempo previamente definidos (26, 7 y 7 s, respectivamente). De esta forma, 1,00 mL de luminol, 0,30 mL de estándar de Cr(III) o muestra y 0,20 mL de peróxido de hidrógeno fueron propulsados hacia la CMD. Entonces, se registró la señal de quimioluminiscencia a 425 nm como altura de pico, en el espectrofluorímetro con el fotomultiplicador operando a 900 V. Una vez que se terminó de registrar la señal, la CMD fue vaciada por activación de la BPA durante 45 s. La agitación magnética se mantuvo activa durante todo el análisis. Este procedimiento se repitió para cada solución estándar de Cr(III) y para cada muestra.

Procedimiento para Cr(VI). La determinación de Cr(VI) se realizó activando secuencialmente las válvulas V3 y V4 durante intervalos de tiempo previamente definidos (31 y 7 s, respectivamente). De esta manera, 1,20 mL de luminol y 0,30 mL de estándar de Cr(VI) o muestra fueron propulsados hacia la CMD. Entonces, se registró la señal de quimioluminiscencia a 425 nm como altura de pico. Una vez que se terminó de registrar la señal, la CMD fue vaciada aspirando las soluciones contenidas en ella

mediante la BPA (45 s). En este caso también, la agitación magnética se mantuvo activa durante todo el análisis. Este procedimiento fue repetido para cada solución estándar de Cr(VI) y para cada muestra.

Lavado de la CMD. La CMD siempre se lavó entre medidas. Para ello, se completó la CMD con agua por activación de la V6 durante 40 s y manteniendo la agitación magnética durante todo el procedimiento. Finalmente, se vació la CMD por activación de la BPA durante 45 s.

La **Tabla 2.1** resume los intervalos de tiempo de conmutación para el procedimiento FBA completo, es decir, para la determinación de Cr(III), Cr(VI) y lavado de la CMD.

Tabla 2.1 Tiempos de conmutación de válvulas solenoides, bombas peristálticas y agitador magnético correspondientes al sistema FBA propuesto.

	Tiempos de conmutación (s)						
	V3	V4	V5	V6	BP	BPA	AM
Cr (III)							
Luminol (5×10^{-3} mol L ⁻¹)	26	OFF	OFF	OFF	26	OFF	ON
Estándar o muestra	OFF	7	OFF	OFF	7	OFF	ON
H ₂ O ₂ (1×10^{-2} mol L ⁻¹)	OFF	OFF	7	OFF	7	OFF	ON
Cr (VI)							
Luminol (5×10^{-3} mol L ⁻¹)	31	OFF	OFF	OFF	31	OFF	ON
Estándar o muestra	OFF	7	OFF	OFF	7	OFF	ON
Lavado							
Agua	ON	ON	ON	40	40	OFF	ON

V: Válvula solenoide; BP: bomba peristáltica; BPA: bomba peristáltica auxiliar; AM: agitador magnético.

2.4. Resultados y Discusión

2.4.1. Mecanismo de adsorción

El método de especiación propuesto se basa en que el Cr(VI) se adsorbe en el material híbrido en forma de ión Cr_2O_7^- , mientras que el Cr(III) pasa sin ser retenido a través de la minicolumna. Wang y col. han demostrado que en un material blando conformado por SWCNTs (del inglés, *single walled carbon nanotubes*) dispersos en ILs con cationes imidazolio, los átomos de los grupos alquilo del IL están más cerca de la superficie de los SWCNTs que los átomos de nitrógeno y carbono de los anillos de imidazolio⁸⁴. Por ello, se produce un fenómeno de fisisorción, donde las interacciones electrostáticas y las fuerzas de Van der Waals tienen lugar en la superficie de los SWCNTs y los grupos de iones cargados rodean esta superficie⁸⁵. En nuestro caso, los cationes imidazolio estarían libres para interactuar con los iones Cr_2O_7^- y, por lo tanto, el analito se retiene sobre el material híbrido, mientras el Cr(III) pasaría a través de la minicolumna sin ser retenido. El mecanismo propuesto para la especiación de Cr(III) y Cr(VI) se muestra en la **Fig. 2.4**.

⁸⁴ Wang, J., Chu, H., & Li, Y. (2008). Why single-walled carbon nanotubes can be dispersed in imidazolium-based ionic liquids. *Acs Nano*, 2(12), 2540-2546. <https://doi.org/10.1021/nn800510g>

⁸⁵ Martinis, E. M., Grijalba, A. C., Pérez, M. B., Llaver, M., & Wuilloud, R. G. (2017). Synergistic analytical preconcentration with ionic liquid–nanomaterial hybrids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 333-344. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.004>

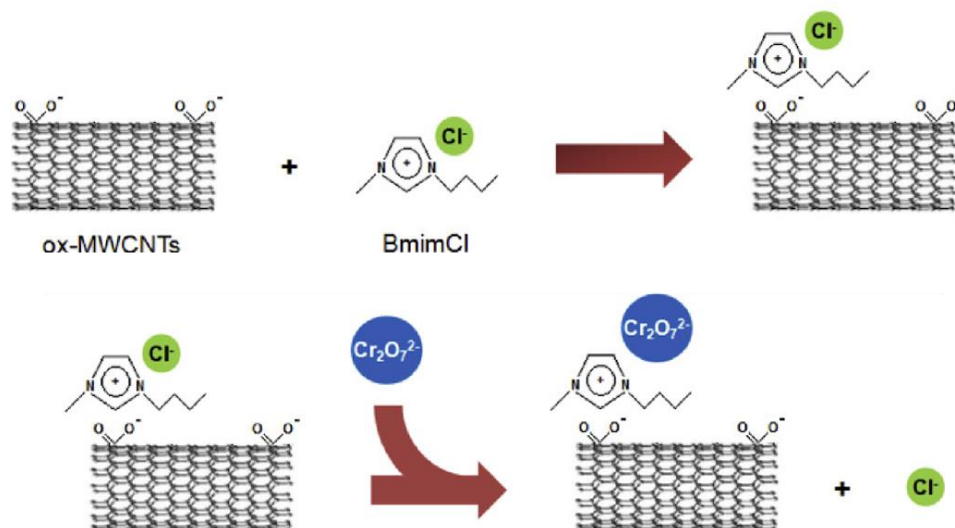


Fig. 2.4 Mecanismo de adsorción de Cr(VI) propuesto utilizando el material híbrido (MWCNTS-Ox/IL).

2.4.2 Caracterización del material híbrido

Los resultados obtenidos por EDS mostraron que el material blando se encontraba libre de impurezas. En la **Fig. 2.5a** se muestran las cinco áreas analizadas y en la **Fig. 2.5b** puede verse el espectro de energía de rayos X correspondiente al área 3. Dicho espectro muestra que los elementos encontrados fueron los correspondientes a la composición del material híbrido: carbono, oxígeno, nitrógeno y cloro.

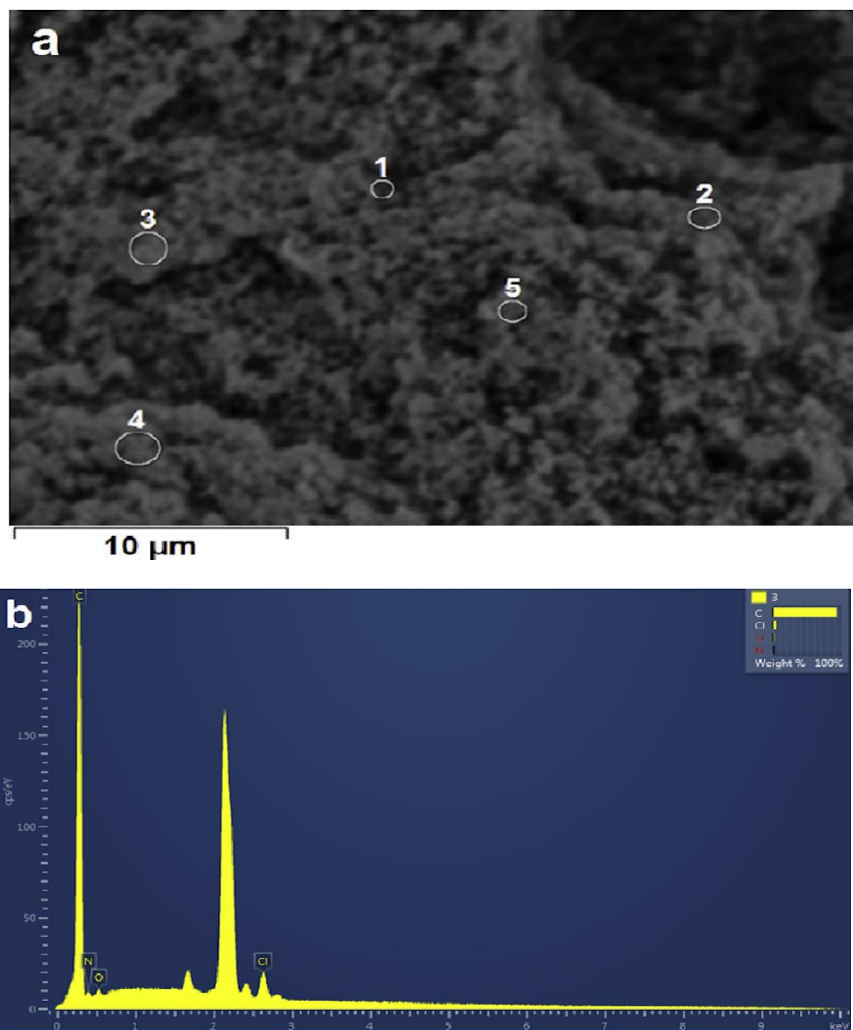


Fig. 2.5 Resultados obtenidos por espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS). **a-** Se indican las cinco áreas analizadas. **b-** Espectro de rayos X correspondiente al área 3.

Por otro lado, la **Fig. 2.6** muestra las imágenes obtenidas por SEM en las cuales puede apreciarse la estructura física y la morfología del material blando antes y después de la adsorción de Cr(VI). Previo a la adsorción, se puede ver que los MWCNTs-Ox presentaron una estructura suave formando un patrón entrelazado, probablemente debido a su combinación con el IL (**Fig. 2.6.a**). Además, se pudo demostrar que los MWCNTs-Ox presentaron un diámetro uniforme en escala nanométrica entre 35 y 45 nm, demostrando una baja dispersión. Sin embargo, luego de la adsorción de Cr(VI) los nanotubos se ensancharon, especialmente en los extremos (**Fig. 2.6b**), mostrando diámetros ligeramente mayores entre 47 y 52 nm. Además, la superficie del material se

mostró diferente, con un aspecto menos liso y aplanado, y por el contrario más compacto con respecto al material previo a la adsorción. Probablemente esto pueda deberse a la incorporación de Cr(VI) en el material.

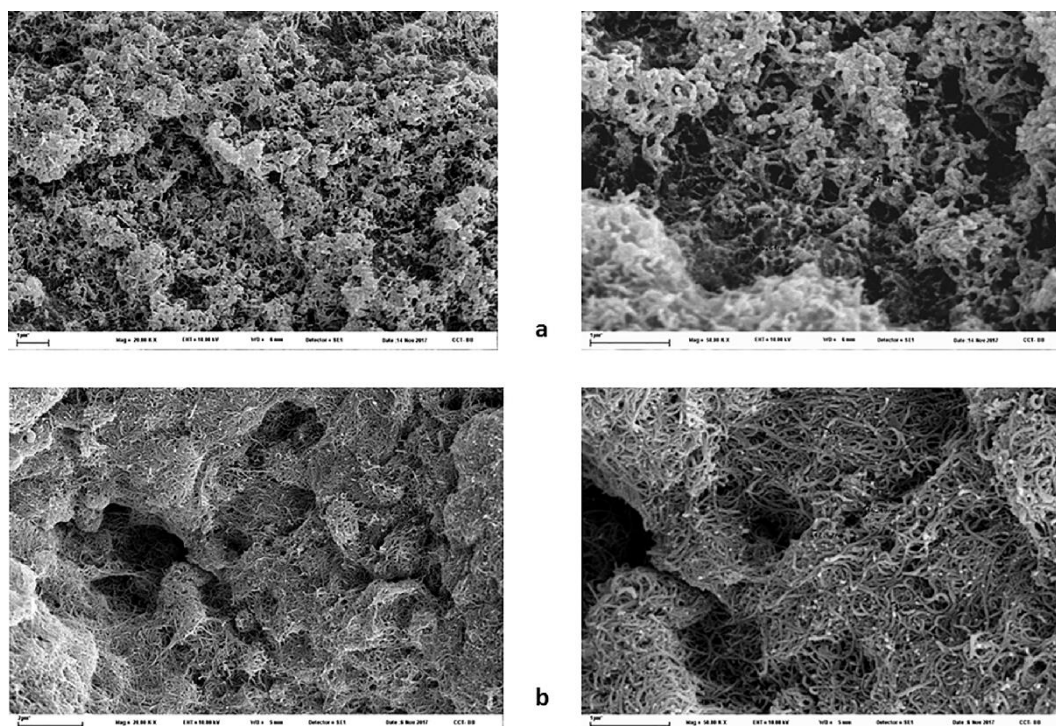


Fig. 2.6 Imágenes SEM correspondientes al material híbrido obtenido. **a-** Fotografías antes de la adsorción de Cr(VI) (Izq.: 20000x; Der.: 50000x). **b)** Fotografías después de la adsorción de Cr(VI) (Izq.: 20000x; Der.: 50000x).

2.4.3. Selectividad del material

El estudio de la selectividad del material híbrido se realizó mediante la reacción espectrofotométrica típica para Cr(VI) con 1,5-difenilcarbazida (DPC)⁸⁶. Entonces, Cr(VI) fue determinado luego de su elución de la minicolumna mientras que Cr(III) se determinó previa oxidación del mismo a Cr(VI) con peróxido de hidrógeno⁸⁷. Como

⁸⁶ Bose, M. (1954). The reaction of chromate with diphenylcarbazine. I. *Analytica Chimica Acta*, 10, 201-208. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)89648-8](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)89648-8)

⁸⁷ Andersen, J. E. (1998). Introduction of hydrogen peroxide as an oxidant in flow injection analysis: speciation of Cr (III) and Cr (VI). *Analytica Chimica Acta*, 361(1-2), 125-131. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00041-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00041-5)

puede observarse en la **Tabla 2.2.**, los resultados obtenidos para dos muestras (A y B) en términos de porcentaje de recuperación (RR%) fueron mayores al 90% en todos los casos. La pequeña diferencia encontrada pudo deberse a pérdidas durante el proceso de oxidación previo a la determinación espectrofotométrica con DPC. Por lo tanto, podemos decir que Cr(III) no fue retenido en el material híbrido, quedando de esta manera asegurada la selectividad del material para la especie Cr(VI).

Tabla 2.2 Estudio de selectividad del material híbrido empleando la reacción de Cr(VI) con DPC.

Muestras	Cr(III)			Cr(VI)		
	C_{add} (mg L ⁻¹)	C_{cal} (mg L ⁻¹)	RR%	C_{add} (mg L ⁻¹)	C_{cal} (mg L ⁻¹)	RR%
A	0,050	0,045 ± 0,003	90	0,050	0,047 ± 0,003	94
B	0,050	0,043 ± 0,005	88	0,050	0,048 ± 0,003	96

C_{add} : concentración adicionada a la muestra; C_{cal} : concentración calculada en la muestra; RR%: recuperación relativa porcentual.

2.4.4. Optimización del proceso de especiación

Como se mencionó anteriormente, el proceso de separación se llevó a cabo en la minicolumna empaquetada con el material híbrido e insertada en un canal del MFS. Por lo tanto, en primer lugar, se realizó un acondicionamiento del material y luego se optimizaron las variables hidrodinámicas y químicas del proceso en diversos rangos establecidos.

2.4.4.1. Acondicionamiento de la minicolumna

Se estudiaron diferentes soluciones y diferentes tiempos necesarios para realizar el acondicionamiento del material híbrido. Soluciones del IL (BmimCl) de concentración $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ a $\text{pH}=5,0$ y a $\text{pH}=8,0$ (por agregado de $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), se hicieron fluir a través de la minicolumna entre 1 y 3 min. La solución de acondicionamiento compuesta por IL a $\text{pH}=5,0$ que fluyó durante 2,5 min dio los mejores resultados en términos de porcentajes de recuperación para Cr(VI) .

2.4.4.2. Variables hidrodinámicas

Los valores óptimos para caudal de carga, caudal de elución, volumen de muestra, volumen de eluyente y tiempo de "stop-flow" fueron $1,21 \text{ mL min}^{-1}$, $7,88 \text{ mL min}^{-1}$, 5,0 mL, 0,30 mL y 10 min, respectivamente (**Tabla 2.3**). El valor óptimo de caudal de carga fue cercano al valor mínimo del rango estudiado, evidenciando que es necesario un adecuado tiempo de contacto entre el analito y el material adsorbente. Por ello, fue necesario además detener el flujo (stop-flow) durante 10 min, logrando así un óptimo tiempo de contacto, lo que favoreció la adsorción de Cr(VI) . Al mismo tiempo, se esperaba obtener mejores resultados cuando se utiliza un caudal bajo para la elución. Sin embargo, se obtuvieron mejores resultados cuando se realizó la elución de Cr(VI) a un mayor caudal. Un punto a destacar es que el volumen de eluyente (0,30 mL) fue significativamente menor que el respectivo volumen de muestra (5,0 mL), logrando, por ende, además de la especiación, la preconcentración de Cr(VI) . Por otro lado, se optimizó la dirección de elución obteniéndose mayores porcentajes de recuperación del

analito cuando se eluyó en dirección contraria al paso de la muestra. Además, esto evitó la aglomeración del adsorbente en la minicolumna.

Tabla 2.3 Rangos estudiados y valores óptimos obtenidos para el proceso de especiación de Cr(III) y Cr(VI).

Variables	Rangos estudiados	Valores óptimos
Caudal de carga (mL min ⁻¹)	0,80-4,04	1,21
Caudal de elución (mL min ⁻¹)	3,03-8,08	7,88
Volumen de muestra (mL)	5,0-15,0	5,0
Volumen de elución (mL)	0,05-0,30	0,30
Tiempo de "stop Flow" (min)	5-15	10

2.4.4.3. Variables físicas y químicas

Por un lado, se estudió la influencia de la masa de material adsorbente. Para ello, se utilizaron columnas de 15 y 30 mm de longitud rellenas con 40,0 y 80,0 mg de material, respectivamente. Se obtuvieron mejores resultados cuando se utilizó la columna con mayor masa de material. Por otro lado, con respecto a la elución se evaluó el pH y el efecto de *salting out*. Este fenómeno también es conocido como "separación de fases inducida por la sal".

Se ha propuesto que el efecto de salinización favorece la hidratación de los iones inorgánicos en solución acuosa, lo que resulta en interacciones desfavorables con los solutos hidrófobos. Como consecuencia, se produce una disminución en la solubilidad

de estos solutos hidrófobos en la solución acuosa y se aumenta su transferencia de masa a la solución hidrófoba del extractante⁸⁸.

En el caso del pH, se estudió esta variable entre 8,0 y 12,0, obteniendo las mejores recuperaciones cuando se trabajó a pH 11,0. Un punto importante a destacar es que a este pH la especie predominante de Cr(VI) se encuentra como ión cromato (CrO_4^-). Dado que para la etapa de detección quimioluminiscente el Cr(VI) cumple la función de oxidante y debe presentarse como ión dicromato (Cr_2O_7^-), una vez eluido el Cr(VI) debió adicionarse al eluato una gota de ácido nítrico concentrado a fin de convertir el ión CrO_4^- en ion Cr_2O_7^- . Por otro lado, se evaluó el efecto de *salting out*, para lo cual se agregaron 0,01 g de NaCl a 10,0 mL de eluyente (BmimCl) obteniéndose mejores resultados de recuperación respecto del eluyente sin el agregado de sal.

Además, se estudió el comportamiento del IL tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio (BmimBF_4) como potencial eluyente bajo las mismas condiciones. Sin embargo, no se obtuvieron buenas recuperaciones de Cr(VI) y, por ello, el IL BmimCl fue seleccionado como eluyente en este trabajo.

2.4.5. Optimización del proceso de detección

El luminol en presencia de un oxidante y en medio alcalino produce una señal de quimioluminiscencia a 425 nm. Por un lado, se determinó la concentración de Cr(VI) a partir de la formación del ion Cr_2O_7^- (tal como se explicó en la sección anterior), el cual actuó como oxidante en la reacción quimioluminiscente. De acuerdo con la literatura,

⁸⁸ Chen, W. S., Chiang, W. C., & Wei, K. M. (2007). Recovery of nitrotoluenes from wastewater by solvent extraction enhanced with salting-out effect. *Journal of hazardous materials*, 147(1-2), 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.12.066>

esta es la primera vez que se determina Cr(VI) por quimioluminiscencia, utilizando al analito en su forma de ion dicromato como oxidante para la reacción de luminol. En general, Cr(VI) se reduce a Cr(III) y se determina como cromo total⁸⁹. Por otra parte, teniendo en cuenta que la reacción quimioluminiscente puede ser catalizada por diferentes metales, la determinación de Cr(III) se realizó utilizando peróxido de hidrógeno como oxidante y éste como catalizador.

2.4.5.1. Variables Químicas

Se optimizaron las concentraciones de todos los reactivos implicados en ambas reacciones, es decir, para Cr(III) y para Cr(VI) (concentración de luminol, peróxido de hidrógeno y EDTA (del inglés, *ethylenediamine tetraacetic acid*)) y el pH del medio. El EDTA fue empleado para complejar los posibles cationes presentes en las muestras de agua que pudiesen interferir en la determinación del analito Cr(III). Asimismo, su concentración fue estudiada y optimizada. La **Tabla 2.4** muestra los intervalos estudiados y los valores óptimos para dichas variables. Como puede verse, en el caso de la determinación de Cr(VI) sólo fue necesario optimizar la concentración de luminol y el pH ya que esta especie actúa como oxidante. Por otro lado, una ventaja importante es que se utilizó la misma concentración de luminol ($5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) y el mismo valor de pH (12,0) para ambas determinaciones, lo que simplificó el procedimiento.

⁸⁹ Fasihi, M., Rajabi, M., Barfi, B., & Sajjadi, S. M. (2020). Deep eutectic-based vortex-assisted/ultrasound-assisted liquid-phase microextractions of chromium species. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 17, 1705-1713. <https://doi.org/10.1007/s13738-020-01890-6>

Tabla 2.4 Resultados de la optimización de variables químicas en la detección por quimioluminiscencia de Cr(III) y Cr(VI).

	Luminol (mol L⁻¹)	pH	H₂O₂ (mol L⁻¹)	EDTA (mol L⁻¹)
Cr(III)				
Rango estudiado	1,0x10 ⁻⁴ -1,0x10 ⁻²	10,0-13,0	1,0x10 ⁻⁴ -3,0x10 ⁻²	1,0x10 ⁻³ -1,0x10 ⁻²
Valor óptimo	5,0x10 ⁻³	12,0	1,0x10 ⁻²	5,0x10 ⁻³
Cr(VI)				
Rango estudiado	1,0x10 ⁻⁴ -1,0x10 ⁻²	10,0-13,0	-	-
Valor óptimo	5,0x10 ⁻³	12,0	-	-

H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) y EDTA (ácido etilendiamino tetra-acético)

2.4.5.2. Variables FBA

Asimismo, las variables relacionadas con el sistema FBA fueron optimizadas a fin de obtener un compromiso entre sensibilidad y reproducibilidad analítica. Se optimizó el orden de agregado de reactivos, los volúmenes añadidos a la CMD y el tiempo de agitación. En cuanto al orden de agregado de los reactivos añadidos, fueron estudiadas tres combinaciones diferentes: luminol y oxidante, oxidante y luminol, y luminol-oxidante, simultáneamente. El orden óptimo fue luminol y oxidante. Por otro lado, el volumen total de reacción fue de 1,50 mL, e incluyó 1,00 mL de luminol, 0,30 mL de peróxido de hidrógeno y 0,20 mL de muestra para la determinación de Cr(III), y 1,20 mL de luminol y 0,30 mL de muestra para la determinación de Cr(VI). Es importante destacar que señales óptimas de quimioluminiscencia fueron obtenidas cuando el oxidante correspondiente (H₂O₂ para Cr(III) y Cr₂O₇⁼para para Cr(VI)) fueron agregados lo más

rápido posible a la CMD. Por lo tanto, los caudales en ambos canales (C3 y C4) fueron mayores ($2,60 \text{ mL min}^{-1}$ para C3 y $2,65 \text{ mL min}^{-1}$ para C4) que para el resto de los canales ($2,30 \text{ mL min}^{-1}$ para C2 y C5, y $2,28$ para C6). En cuanto al sistema de agitación acoplado a la CMD, éste permitió una mezcla rápida y eficiente de las soluciones. Además, como la velocidad de agitación presentaba un efecto significativo en la señal analítica, fue necesario mantener una velocidad de agitación alta y estable (500 rpm) durante la reacción de quimioluminiscencia. Se logró analizar cada muestra incluyendo la etapa de especiación en un tiempo total de 20 min , lo que determinó una frecuencia de muestreo de tres muestras por hora (3 h^{-1}).

2.4.6. Performance analítica

Los parámetros analíticos del método para la determinación de Cr(VI) y Cr(III) se muestran en la **Tabla 2.5**. En ambos casos, se obtuvieron curvas de calibrado con un valor de coeficiente de determinación (R^2) satisfactorio y amplios rangos lineales. Los límites de detección (LOD, del inglés *limit of detection*) y cuantificación (LOQ, del inglés *limit of quantification*) en cada caso son bajos y permitirían detectar la presencia de ambas especies en torno a los niveles exigidos por la legislación nacional, la cual establece un valor máximo de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de Cr(VI) y $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ para Cr total en agua potable⁹⁰. En cuanto a la precisión, la misma se calculó a partir de la medición de la señal quimioluminiscente de ocho réplicas independientes ($n=8$) evaluadas en el mismo día (intradía) y en cinco muestras ($n=5$) evaluadas en tres días diferentes ($k=3$) (interdía), en

⁹⁰ <https://www.argentina.gob.ar/normativa/recurso/12830/texact/htm>

muestras que contenían 0,05 mg L⁻¹ de cada especie. Los valores obtenidos en términos de desviación estándar relativa porcentual (RSD%, del inglés *relative standard deviation*) fueron aceptables en ambos casos, siendo mejor para la determinación de Cr(VI). Finalmente, el factor de preconcentración (FP) obtenido para la especie Cr(VI) fue 16, y se calculó como la relación entre la concentración final del analito en la fase eluyente de IL (C_{FE}) al finalizar la extracción y la concentración inicial del analito en la muestra (C₀), tal como se muestra en la siguiente ecuación (**Ec. 2.1**):

Ec. 2.1
$$FP = \frac{C_{FE}}{C_0}$$

Tabla 2.5 Parámetros estadísticos y performance analítica del método quimioluminiscente propuesto para la determinación de Cr(III) y Cr(VI).

	Cr(III)	Cr(VI)
Ordenada al origen	1254 ± 162	1968 ± 30
Pendiente (L mg ⁻¹)	75250 ± 3088	59396 ± 569
R ²	0,9960	0,9998
Performance Analítica		
Rango lineal (mg L ⁻¹)	0,030 - 0,080	0,008 - 0,080
LOD (mg L ⁻¹)	0,0064	0,0015
LOQ (mg L ⁻¹)	0,0210	0,0050
FP	-	16
Precisión Intradía ^a (RSD%)	7,0	3,8
Precisión Interdía ^b (RSD%)	7,4	4,3

^a n=8; ^b n=5; ^b k=3

2.4.7. Selectividad del método quimioluminiscente

Para evaluar la selectividad del método quimioluminiscente se evaluó el efecto de cationes y aniones comúnmente presentes en muestras de agua.

2.4.7.1. Interferencia de cationes

Ciertos cationes presentes en muestras de agua podrían catalizar la reacción de luminol, tal como lo hace el Cr(III) y por ello fue necesario realizar un estudio de estas posibles interferencias. Para ello, se utilizó una solución estándar de Cr(III) de concentración 0,07 mg L⁻¹ y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2.6**. Como se puede ver, Fe(III) en bajas concentraciones generó interferencia en la determinación de Cr(III). Este hecho se resolvió añadiendo a las muestras una solución de EDTA 5,0x10⁻³ mol L⁻¹. Sin embargo, fue importante controlar la formación del complejo Cr(III)-EDTA ya que, bajo esta forma química, Cr(III) no cataliza la reacción quimioluminiscente. Según estudios, el complejo Cr(III)-EDTA presenta una cinética lenta de formación en comparación con otros cationes que forman complejos con EDTA más rápidamente. Hamm y col. estudiaron el sistema Cr(III)-EDTA y demostraron que la velocidad de formación de este complejo era independiente de la concentración de EDTA y a una concentración más alta de Cr(III) la tasa era proporcional a esta concentración⁹¹. Además, la velocidad de formación del complejo aumentó con el aumento de pH. Por lo tanto, se realizó un estudio teniendo en cuenta estas consideraciones. En primer lugar,

⁹¹ Hamm, R. E. (1953). Complex ions of chromium. IV. The ethylenediaminetetraacetic acid complex with chromium (III). *Journal of the American Chemical Society*, 75(22), 5670-5672. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01118a059>

las muestras se acidificaron con una gota de HNO_3 ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$). Luego, se optimizó la concentración de EDTA entre $1,0 \times 10^{-2}$ y $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Tal como puede observarse en la **Tabla 2.4**, el valor óptimo se obtuvo trabajando con una concentración de EDTA $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ya que, bajo estas condiciones, concentraciones iguales o menores a $6,0 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe(III) no interfirieron en la señal quimioluminiscente. Es importante resaltar que se debe agregar EDTA justo antes del análisis, para evitar la posible formación del complejo Cr(III)-EDTA.

Tabla 2.6 Límites de concentración de cationes que interfieren en la detección quimioluminiscente de Cr(III).

Catión	Límite de tolerancia (mg L^{-1})
Cu(II)	6,0
Fe(III)	0,06
Zn(II)	6,0
Ba(II)	14,0
Ca(II)	10,0
Mg(II)	10,0

2.4.7.2. Interferencia de aniones

Los aniones presentes en muestras de agua podrían adsorberse sobre el material blando junto con Cr(VI), por lo que fue necesario estudiar estas posibles interferencias. Para ello, se utilizó una solución patrón de Cr(VI) de concentración $0,08 \text{ mg L}^{-1}$. De esta manera, fue posible demostrar que el método propuesto tolera concentraciones de $4,0$

mg L⁻¹ de Cl⁻ y NO₃⁻, 3,0 mg L⁻¹ de PO₃⁼ y 2,5 mg L⁻¹ de SO₄⁼. Debido a que las muestras analizadas contienen normalmente mayores concentraciones que 2,5 mg L⁻¹ de SO₄⁼, esta interferencia se resolvió añadiendo a las muestras cloruro de bario (BaCl₂) y filtrando las mismas previo al análisis, con un filtro de nylon de 0,45 μm.

2.4.8. Análisis de muestras reales

El método propuesto para la determinación de Cr(III) y Cr(VI) se aplicó a tres muestras de agua de diferente origen: agua de mesa envasada (A), agua de red domiciliaria (B) y agua de red domiciliaria filtrada con un purificador comercial (C). Las muestras no presentaron niveles detectables de ambas especies de cromo, por ello, las mismas se fortificaron con soluciones estándar en dos niveles de concentración (0,04 y 0,06 mg L⁻¹). Los resultados del estudio de recuperación se muestran en la **Tabla 2.7**. El porcentaje de recuperación relativa se calculó como (Ec. 2.2):

Ec. 2.2
$$RR\% = \left(\frac{C_{cal} - C_{real}}{C_{add}} \right) \times 100$$

donde C_{cal} es la concentración del analito encontrado en la muestra fortificada, C_{real} es la concentración de los analitos en la muestra real y C_{add} es la concentración conocida del estándar agregado a la muestra.

Como se puede observar, se obtuvieron porcentajes de recuperación (RR%) satisfactorios, entre 95 y 107% para Cr(III) y entre 95 y 104% para Cr(VI).

Tabla 2.7. Estudio de recuperación de Cr(III) y Cr(VI) en diferentes muestras de agua aplicando el método de especiación propuesto.

Muestra	Cr(III)			Cr(VI)		
	C _{add} (mg L ⁻¹)	C _{cal} (mg L ⁻¹)	RR%	C _{add} (mg L ⁻¹)	C _{cal} (mg L ⁻¹)	RR%
A	0,04	0,042 ± 0,001	105	0,01	0,010 ± 0,001	100
	0,06	0,058 ± 0,003	97	0,05	0,049 ± 0,002	98
B	0,04	0,038 ± 0,002	95	0,01	0,0102 ± 0,003	102
	0,06	0,062 ± 0,002	103	0,05	0,052 ± 0,005	104
C	0,04	0,043 ± 0,003	107	0,01	0,0095 ± 0,002	95
	0,06	0,058 ± 0,001	97	0,05	0,060 ± 0,004	102

A: agua de mesa envasada; B: agua de red domiciliaria; C: agua de red filtrada (purificador comercial); C_{add}: concentración adicionada del estándar a la muestra; C_{cal}: concentración hallada en la muestra; RR%: recuperación relativa porcentual.

^a Las muestras fueron analizadas por triplicado (n=3) y los valores se indican con su correspondiente desviación estándar.

2.5 Conclusiones

En esta etapa de la tesis, se desarrolló una metodología de especiación de cromo basada en el uso de un material híbrido el cual se empacó en una minicolumna y pudo ser acoplado a un sistema de flujo multiconmutado. El material compuesto por MWCNTs-Ox y IL (BmimCl) permitió la separación de Cr(III) y Cr(VI). Cr(VI) se adsorbió selectivamente en el material híbrido y Cr(III) pasó a través de la minicolumna sin ser retenido. Entonces, ambas especies se detectaron por quimioluminiscencia utilizando

un sistema automático FBA. Según nuestros registros, es la primera vez que se utiliza la técnica quimioluminiscente para determinar ambas especies, Cr(III) y Cr(VI), el primero actuando como catalizador de la reacción entre luminol y peróxido de hidrógeno, y el segundo como oxidante de la reacción del luminol. El sistema presentó una buena frecuencia de muestreo de 3 h^{-1} teniendo en cuenta que permite realizar la especiación de cromo evitando procesos redox que demandan reactivos y mucho tiempo. Además, hizo factible de modo rápido y preciso una metodología luminiscente que suele requerir múltiples pasos y una medición inmediata de la señal analítica, ya que ésta decae significativamente en pocos segundos. La metodología propuesta se aplicó exitosamente a muestras reales de agua y los resultados obtenidos presentaron óptimas recuperaciones, pudiendo resultar una interesante alternativa a métodos oficiales que suelen demandar equipos y recursos más complejos y de mayor costo.

CAPÍTULO 3

Nanoemulsión basada en
líquidos iónicos para la
extracción y
preconcentración de filtros
químicos solares en
muestras de aguas

3.1 Introducción

En la actualidad y principalmente en períodos estivales se manifiestan con mayor incidencia episodios que pueden conducir a enfermedades cutáneas severas y que se asocian a la exposición a la radiación solar ultravioleta (UV). Tal como se conoce desde hace varias décadas, una exposición prolongada a la radiación solar UV puede producir efectos agudos y crónicos en la salud de la piel, los ojos y el sistema inmunitario. Las quemaduras solares y el bronceado son los efectos agudos más conocidos de la exposición excesiva a la radiación UV. A largo plazo, se produce un envejecimiento prematuro de la piel como consecuencia de la degeneración de las células del tejido epitelial, fibroso y de los vasos sanguíneos. Este tipo de radiación puede producir también reacciones oculares de tipo inflamatorio, como la queratitis actínica. Los efectos crónicos comprenden dos grandes problemas sanitarios: los cánceres de piel y las cataratas. Desde comienzos de los años setenta se ha detectado en todo el mundo un pronunciado incremento de la incidencia de cánceres de piel principalmente en poblaciones de piel clara, estrechamente vinculado a las costumbres personales de exposición al sol y a su componente UV, así como a la percepción social de que el bronceado es deseable y saludable. Además, estos efectos se potenciaron por la reducción de la capa de ozono, la cual es responsable de la filtración de rayos UV. Así, cada año se producen en todo el mundo entre dos y tres millones de casos de cáncer de piel no melánico y aproximadamente 132.000 casos de cáncer de piel melánico⁹². En Argentina, de acuerdo con diversos reportes, la región central del país recibe niveles de

⁹² Índice UV solar mundial. Guía Práctica. Organización Mundial de la Salud. <https://www.who.int/es/publications/i/item/9241590076>

radiación solar UV muy altos y extremos, los cuales, si bien no son los más altos en comparación con el noroeste andino, son peligrosos para las personas. Según la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC), el 52,8% de los casos de melanoma en nuestro país pueden ser atribuidos a la exposición a rayos UV, lo cual ubica a Argentina entre los países con riesgo medio, en un rango entre 32,1 y 53,5%. Además, se prevé que para el 2030 los no melanomas incrementarán un 23% y los melanomas un 19%⁹³.

Los tres pilares de la fotoprotección se basan en la modificación del comportamiento que conduce a un exceso de exposición a la radiación UV, el uso de ropa y gafas de protección y el uso adecuado de protector solar. En los últimos años, el uso de bloqueadores o protectores solares se ha incrementado significativamente como resultado de la concientización del cuidado de la piel ante la exposición solar. Estos productos contienen compuestos conocidos como filtros químicos solares y pueden agruparse en dos categorías generales: los *filtros inorgánicos* y los *filtros orgánicos*. Los filtros inorgánicos, antes llamados filtros físicos, son moléculas estables a la radiación, que ejercen su efecto de protección mediante la dispersión, reflexión o absorción de radiación UV. Estas moléculas brindan protección frente a radiaciones de hasta 380 nm de longitud de onda⁹⁴. Los filtros orgánicos o químicos, son moléculas orgánicas con grupos cromóforos que absorben radiación en la región UV⁹⁵. Según el rango de longitud de onda en la cual absorben radiación, los filtros químicos se clasifican en UVB, UVA y

⁹³ Instituto Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud de la Nación. <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/incidencia>

⁹⁴ El-Boury, S., Couteau, C., Boulande, L., Papis, E., & Coiffard, L. J. M. (2007). Effect of the combination of organic and inorganic filters on the Sun Protection Factor (SPF) determined by in vitro method. *International journal of pharmaceutics*, 340(1-2), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.05.047>

⁹⁵ Nohynek, G. J., & Schaefer, H. (2001). Benefit and risk of organic ultraviolet filters. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 33(3), 285-299. <https://doi.org/10.1006/rtp.2001.1476>

de amplio espectro. Generalmente, estos filtros se componen de uno o varios anillos bencénicos conjugados con dobles enlaces y/o grupos carbonilo. Además, su uso se ha extendido a otros campos, como el de la industria textil, pinturas, pigmentos, fotografía, y en la fabricación de productos plásticos, en los cuales se utilizan para prevenir procesos de fotodegradación o pérdida de color⁹⁶.

Los filtros orgánicos UV pueden clasificarse en distintos grupos dependiendo de su estructura química, así tenemos: derivados de la benzofenona, derivados del ácido p-aminobenzoico, salicilatos, metoxicinamatos, derivados del canfor, derivados de la triazina, derivados del benzotriazol, derivados del bencimidazol, entre otros⁹⁷. La **Tabla 3.1** muestra una lista de los distintos filtros orgánicos y la cantidad máxima permitida en productos cosméticos según la normativa de la Unión Europea (83/574/CEE).

Tabla 3.1 Lista de los filtros UV admitidos en productos cosméticos según la directiva 83/574/CEE.

Nombre Químico	Nomenclatura INCI ^a	Cantidad ^b
Ácido 4-aminobenzoico	PABA	5%
Metilsulfato de N,N,N-trimetil-4-(2-oxoborn-3-bornilidin)-metil anilina	Canfor benzalconio metosulfato	6%
Benzoato de 2-hidroxi-, 3,3,5-trimetilciclohexílico/homosalato	Homosalato	10%
2-Hidroxi-4-metoxibenzofenona (oxibenzona)	Benzofenona-3	10%
Ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico y sus sales de potasio, sodio y trietanolamina/ensulizol	Ácido fenilbencimidazol sulfónico	8%
Ácido 3-3'-(1,4-fenilendimetileno) bis(7,7- dimetil-2-oxobiciclo-[2 2 1]hept-1-il-metano sulfónico) y sus sales	Ácido tereftaliden dicanfor sulfónico	10%
1-(4-Tert-butil-fenil)-4'-metoxidibenzoilmetano	Butil metoxidibenzoilmetano	5%
Ácido ?-(2-oxoborn-3-ilideno)-toluen-4- sulfónico y sus sales	Ácido benciliden canfor sulfónico	6%

⁹⁶ Kockler, J., Oelgemöller, M., Robertson, S., & Glass, B. D. (2012). Photostability of sunscreens. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, 13(1), 91-110. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochemrev.2011.12.001>

⁹⁷ Rastogi, S. C. (2002). UV filters in sunscreen products– a survey. *Contact dermatitis*, 46(6), 348-351. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0536.2002.460605.x>

CAPÍTULO 3. NANOEMULSIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE FILTROS QUÍMICOS SOLARES

Ester 2-etilhexílico del ácido 2-ciano-3,3-difenilacrílico	Octocrileno	10%
Polímero de N-((2 y 4)-((2-oxoborn-3-iliden)metil)encil)acrilamida	Poliacrilamidometilenciliden canfor	6%
Octil metoxicinamato /octinoxato	Etilhexil metoxicinamato	10%
Etil-4-Aminobenzoato etoxilado	PEG-25 PABA	10%
Isopentil-4-metoxicinamato/amiloxato	Isoamil metoxicinamato	10%
2,4,6-Triamilino-(p-carbo-2'-etilhexil-1'-oxi)- 1,3,5-triazina	Etilhexil triazona	5%
2-(2H-Benzotriazol-2-il)-4-metil-6-[2-metil-3-(1,3,3,3-tetrametil-1-((trimetilsilil)oxi)disiloxanil)propilo] fenol	Drometizol trisiloxano	15%
Benzoato Bis (2-etilhexil) bis(4,4'-[[6-[[4-[[1,1-dimetiletil)amino] carbonil] fenil]amino]1,3,5-triazina-2,4-diil]diimino]lscotrizinol (USAN)	Dietilhexil butamido triazona	10%
3-(4'-Metilencilideno)-D,L-1 alcanfor/enzacameno	4-Metilenciliden canfor	4%
3 Bencilideno Alcanfor	3-Bencilideno canfor	2%
Salicilato de 2-etilhexilo/octisalato	Etilhexil salicilato	5%
Benzoato de 4-(dimetilamino)-2-etilhexilo/padimato O (USAN: BAN)	Etilhexil dimetil PABA	8%
Ácido 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona-5- sulfónico y su sal de sodio	Benzofenona-4	5%
2,2'-Metilen-bis-6-(2H-benzotriazol-2-il)-4-(1,1,3,3-tetrametil butil)fenol/bisocotrizol	Metilen bisbenzotriazolil tetrametilbutilfenol	10%
Sal sódica de ácido 2,2' bis-(1,4-fenilen)-1H-bencimidazol-4,6-disulfónico/bisdisulizol disódico (USAN)	Ácido fenildibencimidazol tetrasulfónico	10%
2,2'-(6-(4-Metoxifenil)-1,3,5-triazina-2,4- diil)bis[5-((2-etilhexil)oxil)fenol)/bemotrizino	Bis-etilhexiloxifenol metoxifenil triazona	10%
Benzalmalonato de dimeticodietilo	Polisilicona-15	10%
Hexilbenzoato de 2-[4-(dietilamino)-2- hidroxibenzoilo]	Dietilamino hidroxibenzoil hexil benzoato	10%

^a Nomenclatura internacional de ingredientes cosméticos (INCI; del inglés, *International Nomenclature of Cosmetic Ingredients*); ^b Cantidad máxima permitida por la Unión Europea.

Sin embargo, el uso creciente de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PFCs) y otros materiales que contienen estos compuestos conduce a su acumulación en el

medio ambiente y en los organismos vivos. Además, varios de estos filtros orgánicos poseen potencial efecto de disrupción endocrina y ecotoxicológico debido a su estructura química y su lipofilicidad y, en general, su baja biodegradabilidad⁹⁸. Los filtros orgánicos UV pueden contaminar diferentes cuerpos de agua como arroyos, ríos y mares como resultado de actividades recreativas acuáticas o por un mal tratamiento de aguas residuales⁹⁹. Es por ello que ese tipo de compuestos son y han sido foco de atención en la comunidad científica y, en el año 2007, han sido identificados como contaminantes orgánicos de relevancia en los ecosistemas acuáticos, según lo señalado por el Parlamento Europeo¹⁰⁰. De esta manera, estos compuestos han sido incluidos en la lista de sustancias a analizar debido a su posible presencia en el medio ambiente acuático. Además, como consecuencia de sus propiedades lipofílicas (con un coeficiente de partición octanol-agua $\log K_{ow}$ superior a 4,30), estas sustancias presentan potencial para acumularse en los organismos vivos¹⁰¹, es decir, bioacumularse. Se ha reportado la presencia de este tipo de contaminantes en diversos cuerpos de aguas¹⁰² y en animales

⁹⁸ Mancebo, S. E., Hu, J. Y., & Wang, S. Q. (2014). Sunscreens: a review of health benefits, regulations, and controversies. *Dermatologic clinics*, 32(3), 427-438. <https://doi.org/10.1016/j.det.2014.03.011>

⁹⁹ Zhao, H., Wei, D., Li, M., & Du, Y. (2013). Substituent contribution to the genotoxicity of benzophenone-type UV filters. *Ecotoxicology and environmental safety*, 95, 241-246. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.05.036>

¹⁰⁰ European Parliament legislative resolution of 22 May 2007 on the proposal for a directive of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC (COM(2006)0397 – C6-0243/2006 – 2006/0129(COD)). Annex X. line 33.

¹⁰¹ Groz, M. P., Bueno, M. M., Rosain, D., Fenet, H., Casellas, C., Pereira, C., ... & Gomez, E. (2014). Detection of emerging contaminants (UV filters, UV stabilizers and musks) in marine mussels from Portuguese coast by QuEChERS extraction and GC-MS/MS. *Science of the total environment*, 493, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.062>

¹⁰² Carstensen, L., Zippel, R., Fiskal, R., Börnick, H., Schmalz, V., Schubert, S., ... & Stolte, S. (2023). Trace analysis of benzophenone-type UV filters in water and their effects on human estrogen and androgen receptors. *Journal of Hazardous Materials*, 456, 131617. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131617>

como peces¹⁰³, crustáceos, moluscos¹⁰⁴ y, por primera vez en el año 2018, en un mamífero marino como el delfín¹⁰⁵.

Como hemos mencionado anteriormente, el concepto de *contaminantes emergentes* abarca de manera amplia a aquellos compuestos químicos, ya sean de origen sintético o natural, así como también a microorganismos, que no se encuentran sometidos a los protocolos de control y regulación habituales en el entorno ambiental. Por ende, estas sustancias pueden conllevar consigo potenciales efectos adversos en lo que respecta tanto a la salud humana como al equilibrio ecológico^{106 107}. En las últimas décadas, varios filtros químicos UV han generado considerables inquietudes al ser reconocidos como una categoría de contaminantes emergentes de alta relevancia. Además, esta preocupación se potencia debido a su constante liberación en los ecosistemas acuáticos. Las consecuencias ecológicas y medioambientales derivadas de esta liberación están intrínsecamente vinculadas a las considerables cantidades en las que son empleados. Adicionalmente, como se mencionó, su naturaleza persistente en ciertas circunstancias, así como su potencial biológicamente activo y capacidad para la bioacumulación, intensifican la magnitud de su impacto¹⁰⁸. Se han reportado efectos de filtros químicos

¹⁰³ Gago-Ferrero, P., Díaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2015). UV filters bioaccumulation in fish from Iberian river basins. *Science of the Total Environment*, 518, 518-525. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.03.026>

¹⁰⁴ Fent, K., Zenker, A., & Rapp, M. (2010). Widespread occurrence of estrogenic UV-filters in aquatic ecosystems in Switzerland. *Environmental Pollution*, 158(5), 1817-1824. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.11.005>

¹⁰⁵ Gago-Ferrero, P., Alonso, M. B., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Barbosa, L., Cremer, M., ... & Barceló, D. (2013). First determination of UV filters in marine mammals. Octocrylene levels in Franciscana dolphins. *Environmental science & technology*, 47(11), 5619-5625. <https://doi.org/10.1021/es400675y>

¹⁰⁶ UNESCO, 2015. 2030 Agenda for Sustainable Development.

<https://en.unesco.org/emergingpollutantsinwaterandwastewater>

¹⁰⁷ Cavero, S. G., García-Gil, A., Cruz-Pérez, N., Rodríguez, L. F. M., Laspidou, C., Contreras-Llin, A., ... & Santamarta, J. C. (2023). First emerging pollutants profile in groundwater of the volcanic active island of El Hierro (Canary Islands). *Science of the Total Environment*, 872, 162204. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162204>

¹⁰⁸ Juliano, C., & Magrini, G. A. (2017). Cosmetic ingredients as emerging pollutants of environmental and health concern. A mini-review. *Cosmetics*, 4(2), 11. <https://doi.org/10.3390/cosmetics4020011>

UV sobre el sistema endocrino de peces y bioacumulación en organismos acuáticos como el pez cebra¹⁰⁹ (*Danio rerio*), arrecifes de coral¹¹⁰, algas¹¹¹, así como en larvas y embriones de invertebrados marinos¹¹².

Por todo lo expuesto, resulta evidente la necesidad de contar con herramientas para identificar y cuantificar la presencia de estos contaminantes en muestras medioambientales. Una de las técnicas más utilizadas para determinar filtros orgánicos UV son las técnicas cromatográficas. En particular, HPLC representa una alternativa satisfactoria para determinar filtros UV en muestras ambientales¹¹³. Sin embargo, se deben realizar pasos de extracción y preconcentración previos al análisis cromatográfico debido a las bajas concentraciones de estos contaminantes en este tipo de muestras¹¹⁴.

La extracción líquido-líquido (LLE) se utiliza ampliamente para la detección de diversos analitos en bajas concentraciones, tanto orgánicos como inorgánicos, debido a su simplicidad, estabilidad, reproducibilidad y bajo costo. Sin embargo, el método

¹⁰⁹ Kinnberg, K. L., Petersen, G. I., Albrektsen, M., Minghlani, M., Awad, S. M., Holbech, B. F., ... & Holbech, H. (2015). Endocrine-disrupting effect of the ultraviolet filter benzophenone-3 in zebrafish, *Danio rerio*. *Environmental toxicology and chemistry*, 34(12), 2833-2840. <https://doi.org/10.1002/etc.3129>

¹¹⁰ Fivenson, D., Sabzevari, N., Qiblawi, S., Blitz, J., Norton, B. B., & Norton, S. A. (2021). Sunscreens: UV filters to protect us: Part 2-Increasing awareness of UV filters and their potential toxicities to us and our environment. *International Journal of Women's Dermatology*, 7(1), 45-69. <https://doi.org/10.1016/j.ijwd.2020.08.008>

¹¹¹ Rodil, R., Moeder, M., Altenburger, R., & Schmitt-Jansen, M. (2009). Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395, 1513-1524. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-009-3113-1>

¹¹² Falfushynska, H., Sokolov, E. P., Fisch, K., Gazie, H., Schulz-Bull, D. E., & Sokolova, I. M. (2021). Biomarker-based assessment of sublethal toxicity of organic UV filters (ensulizole and octocrylene) in a sentinel marine bivalve *Mytilus edulis*. *Science of The Total Environment*, 798, 149171. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149171>

¹¹³ Suárez, R., Clavijo, S., Avivar, J., & Cerdà, V. (2016). On-line in-syringe magnetic stirring assisted dispersive liquid-liquid microextraction HPLC-UV method for UV filters determination using 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate as extractant. *Talanta*, 148, 589-595. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.10.031>

¹¹⁴ Ye, L., Liu, J., Yang, X., Peng, Y., & Xu, L. (2011). Orthogonal array design for the optimization of ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of benzophenone-type UV filters. *Journal of separation science*, 34(6), 700-706. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000552>

tradicional de LLE a menudo requiere el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos potencialmente tóxicos y es un proceso que consume mucho tiempo. Para abordar estas desventajas, se ha desarrollado la microextracción líquido-líquido (LLME) como una versión miniaturizada de la LLE. La LLME ofrece ventajas como facilidad de operación, altos factores de enriquecimiento, bajo costo y reducción en el uso de solventes orgánicos tóxicos¹¹⁵. Considerando los principios de la química verde, el desarrollo de un solvente ambientalmente amigable y no tóxico es esencial en las técnicas de LLME¹¹⁶. En consecuencia, han surgido varios solventes verdes, como los solventes eutécticos profundos (DESs) (del inglés *Deep Eutectic Solvents*)¹¹⁷ y los líquidos iónicos (ILs)¹¹⁸.

Como se mencionó anteriormente, los líquidos iónicos (ILs) son sales orgánicas que se encuentran en estado líquido a temperatura ambiente y representan una alternativa para reemplazar los solventes orgánicos convencionales utilizados para extraer y

¹¹⁵ Xu, X. L., Wang, B., Liu, Y. W., Li, W. X., Wu, J. Y., Yuan, H., ... & Chen, D. (2023). In-pipette-tip natural-feather-supported liquid microextraction for conveniently extracting hydrophobic compounds in aqueous samples: A proof-of-concept study. *Microchemical Journal*, 185, 108274. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.108274>

¹¹⁶ Yang, D., Wang, Y., Peng, J., Xun, C., & Yang, Y. (2019). A green deep eutectic solvents microextraction coupled with acid-base induction for extraction of trace phenolic compounds in large volume water samples. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 178, 130-136. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.04.021>

¹¹⁷ Jouyban, A., Farajzadeh, M. A., Mogaddam, M. R. A., Khodadadeian, F., Nemati, M., & Khoubnasabjafari, M. (2021). In-situ formation of a hydrophobic deep eutectic solvent based on alpha terpineol and its application in liquid-liquid microextraction of three β -blockers from plasma samples. *Microchemical Journal*, 170, 106687. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106687>

¹¹⁸ Akhtar, A., Kazi, T. G., Afridi, H. I., Baig, J. A., & Khan, M. (2020). Simultaneous preconcentration of toxic elements in eye makeup products through single drop ionic liquid based non-dispersive microextraction method using narrow glass column: Multivariate application. *Microchemical Journal*, 157, 104963. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104963>

preconcentrar iones metálicos¹¹⁹ y analitos orgánicos¹²⁰. Estos solventes presentan buenas propiedades como baja volatilidad, alta viscosidad, excelente estabilidad y buena solubilidad de compuestos tanto orgánicos como inorgánicos¹¹³.

Además, la combinación de ILs con tensioactivos para formar micro y/o nanoemulsiones puede mejorar la eficiencia y la selectividad del procedimiento de extracción¹²¹. Las nanoemulsiones (NEs) son dispersiones transparentes y estables de dos fases inmiscibles, la fase oleosa y la fase acuosa, en combinación con moléculas de tensioactivo. Pequeñas partículas o gotitas, con un rango de tamaño de 5 a 200 nm, generalmente comprenden la fase dispersa¹²².

Por otro lado, se ha implementado sonicación para mejorar el proceso de extracción¹²³ debido a que esta energía es capaz de incrementar el contacto entre las gotas tanto de la fase acuosa como del extractante logrando una buena emulsificación y homogeneización del extractante en la muestra. Además, con el uso de esta energía

¹¹⁹ Fernandez, C. J., Domini, C. E., Grünhut, M., & Lista, A. G. (2018). A soft material for chromium speciation in water samples using a chemiluminescence automatic system. *Chemosphere*, 196, 361-367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.12.178>

¹²⁰ Polo-Luque, M. L., Simonet, B. M., & Valcárcel, M. (2013). Functionalization and dispersion of carbon nanotubes in ionic liquids. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47, 99-110. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.03.007>

¹²¹ Arain, S. A., Kazi, T. G., Afridi, H. I., Arain, M. S., Panhwar, A. H., Khan, N., ... & Shah, F. (2016). A new dispersive liquid-liquid microextraction using ionic liquid based microemulsion coupled with cloud point extraction for determination of copper in serum and water samples. *Ecotoxicology and environmental safety*, 126, 186-192. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.035>

¹²² Shah, P., Bhalodia, D., & Shelat, P. (2010). Nanoemulsion: A pharmaceutical review. *Systematic reviews in pharmacy*, 1(1). p24-32.

¹²³ Benedé, J. L., Chisvert, A., Salvador, A., Sánchez-Quiles, D., & Tovar-Sánchez, A. (2014). Determination of UV filters in both soluble and particulate fractions of seawaters by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 812, 50-58. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.12.033>

también se ha observado una mayor transferencia de masa de los analitos a la fase dispersa¹²⁴.

3.2 Objetivo

Este trabajo tuvo por objetivo el desarrollo de un nuevo material del tipo nanoemulsión basado en la combinación de líquidos iónicos para la extracción y preconcentración de filtros orgánicos UV como benzofenona-3, octocrileno, octisalato y octinoxato presentes como contaminantes de diversos cuerpos de agua mediante la técnica de microextracción líquido-líquido asistida por energía de ultrasonido.

¹²⁴ Sajjadi, B., Asgharzadehahmadi, S., Asaithambi, P., Raman, A. A. A., & Parthasarathy, R. (2017). Investigation of mass transfer intensification under power ultrasound irradiation using 3D computational simulation: A comparative analysis. *Ultrasonics sonochemistry*, 34, 504-518. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.026>

3.3 Parte Experimental

3.3.1 Reactivos y soluciones

Todas las soluciones se prepararon utilizando agua ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) y reactivos de grado analítico. Los filtros UV orgánicos benzofenona-3 (BZ3), octinoxato (OMC), octocrileno (OCR) y octisalato (EHS) se obtuvieron de Parafarm (Argentina). Las soluciones patrón (1000 mg L^{-1}) de cada filtro UV se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de cada analito en 5,0 mL de metanol (Dorwil, Argentina). Las soluciones estándar se obtuvieron mediante diluciones apropiadas de la solución patrón con metanol. Los líquidos iónicos hexafluorofosfato de 1-butil-3 metilimidazolio ($[\text{Bmim}]\text{PF}_6$), tetrafluoroborato de 1-butil-3 metilimidazolio ($[\text{Bmim}]\text{BF}_4$), cloruro de 1,3-didecil-2 metilimidazolio ($[\text{DDmim}]\text{Cl}$), cloruro de 1-decil-3 metilimidazolio ($[\text{Dmim}]\text{Cl}$) y el tensioactivo Triton X 100 (TX-100) se adquirieron de Merck (Alemania). Soluciones tampón Britton Robinson (BR) (con valores de pH 2,0-6,0), se obtuvieron mezclando soluciones $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido bórico (Cicarelli, Argentina), $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético (Cicarelli, Argentina) y $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido fosfórico (Cicarelli, Argentina) en proporciones adecuadas. Además, se utilizaron cloruro de sodio (Cicarelli, Argentina) y ácido clorhídrico (Anedra, Argentina) para ajustar la fuerza iónica y el pH de las muestras, respectivamente. Para el procedimiento cromatográfico se utilizó acetonitrilo ultrapuro grado HPLC (UVE, Argentina).

3.3.2. Materiales y métodos

3.3.2.1 Preparación del material extractante

La nanoemulsión a base de líquidos iónicos (ILs-NE) utilizada como material de extracción se preparó mezclando en un frasco color ámbar, 2,0 mL de [DDmim]Cl (2,0 g% (p/v)) con 5,6 mL de una mezcla que contenía [Bmim]PF₆ (4,7 g%(p/v)) y Triton X 100 (6,9 g%(p/v)). Esta mezcla se mantuvo con agitación magnética constante utilizando un agitador magnético Hanna modelo HI 190M (EEUU), a temperatura ambiente (25°C) y durante 5 min.

3.3.2.2 Caracterización del material extractante

El tamaño medio de gota (Z) y el índice de polidispersidad (Pdl) del material obtenido (ILs-NE) se realizó mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS, del inglés *dynamic light scattering*) utilizando un instrumento Malvern modelo Zetasizer Nano Series (Reino Unido). Dichos parámetros se calcularon con el software Zetasizer versión 7.13 (Reino Unido) utilizando la función de correlación de tiempo. Para realizar las mediciones, se llevó a cabo una dilución de 10 veces de la ILs-NE en agua ultrapura. Luego, la muestra se agitó magnéticamente durante 5 min y las mediciones se realizaron a 25°C, en una celda de borosilicato de calidad óptica de 4,0 mL y en un ángulo de 90°. Además, se evaluó la turbidez o separación de fases del material mediante inspección visual durante un período de siete días a temperatura ambiente (25°C).

3.3.2.3 Procedimiento de extracción y preconcentración de filtros UV

La estructura molecular de los cuatro filtros químicos UV estudiados BZ3, OMC, OCR y EHS se puede ver en la **Fig. 3.1**.

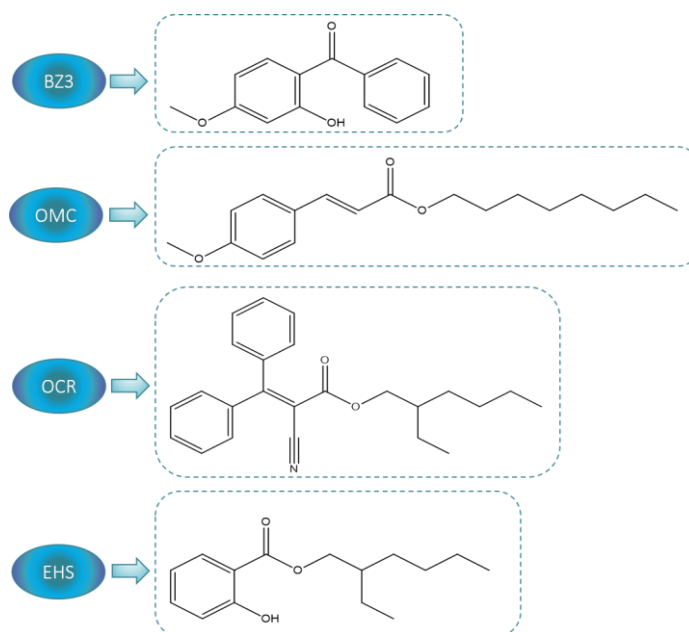


Fig. 3.1 Estructura molecular de los filtros químicos orgánicos benzofenona-3 (BZ3), octinoxato (OMC), octocrileno (OCR) y octisalato (EHS).

Entonces, la extracción y preconcentración de los mismos se realizó mediante una nanoemulsión a base de líquidos iónicos para la microextracción líquido-líquido asistida por energía de ultrasonido (ILs-NE/US-LLME). Para ello, se colocaron 10,0 mL de muestra (o estándar) en un tubo plástico de centrifuga y luego se añadieron 500 μL de solución tampón ($0,20 \text{ mol L}^{-1}$; $\text{pH}=2,0$), 475 μL de ILs-NE y NaCl hasta una concentración final de 1,0% (p/v). Inmediatamente, se sonicó a 117 W durante 150 s (40 s ON y 20 s OFF) insertando en el tubo una sonda Sonics Vibra Cell modelo VCX 130 (EEUU) provista de

una punta de sonda de titanio (9,5 mm de diámetro, 20 kHz de frecuencia y 130 W de potencia nominal). Durante este período de tiempo, se alcanzó el *cloud point* (en español, *punto nube*) y los analitos migraron de la fase acuosa a las gotas finas de la NE. Una vez finalizada la etapa de sonicación, el material de extracción se centrifugó rápidamente a 3500 rpm durante 120 s utilizando una centrífuga Arcano modelo DTL80 (China) y se separaron las fases. Luego, la fase que contiene los analitos se disolvió en metanol hasta alcanzar un volumen final de 100 μL para disminuir la viscosidad y obtener un volumen suficiente para el posterior análisis cromatográfico, sin una dilución significativa de los analitos. Un diagrama esquemático del procedimiento se muestra en la **Fig. 3.2**.

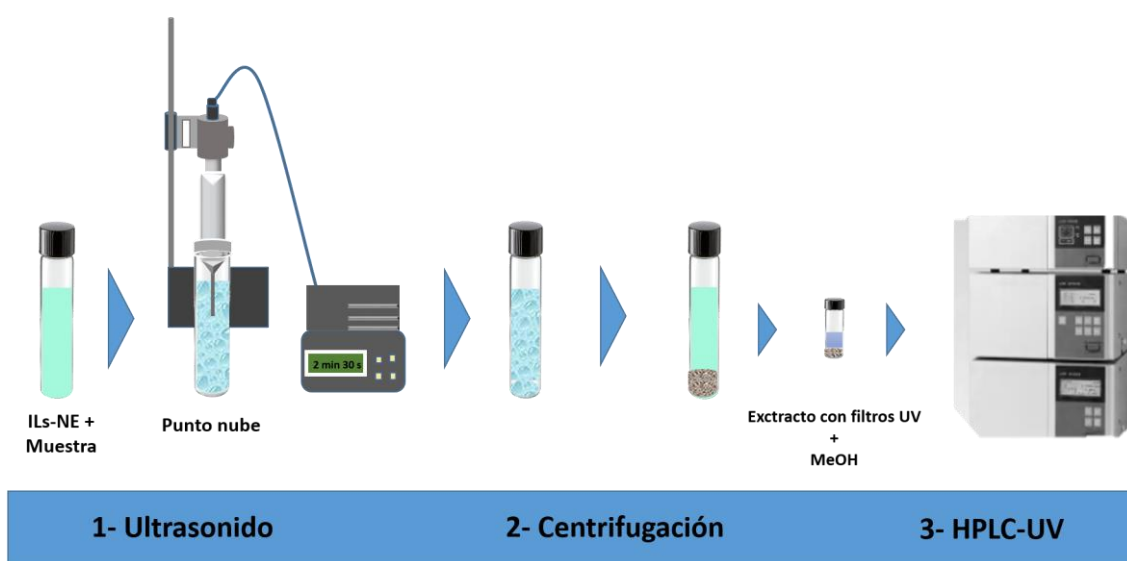


Fig. 3.2 Representación esquemática del procedimiento de extracción, preconcentración y detección mediante HPLC de filtros UV utilizando una nanoemulsión basada en líquidos iónicos para la microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido (ILs-NE/US-LLME).

3.3.2.4 Optimización de variables

Como parte de estudios preliminares se estableció el pH adecuado para realizar la extracción y preconcentración de los filtros químicos UV. Se tomaron 10,0 mL de solución estándar, se colocaron en un vaso de precipitados y se le agregaron bajo agitación magnética constante 0,50 mL de solución tampón BR en un rango de pH de 2,0 a 6,0 el cual fue medido utilizando un pHmetro Orion modelo 710 A (EEUU) con electrodo Orion Ross® modelo 81-02 (EE.UU.). Una vez establecido el pH óptimo, analizando como respuesta los porcentajes de recuperación de extracción (%RE) para todos los analitos en estudio y eligiendo como óptimo el valor de pH correspondiente al mayor valor de %RE, el resto de las variables se estudió mediante un diseño experimental Plackett-Burman saturado¹²⁵. Este diseño permite evaluar hasta N-1 factores, donde N es el número de experimentos, con dos niveles (bajo y alto) para cada variable estudiada. En nuestro caso, se realizó un total de doce experimentos (N=12), de los cuales seis fueron parámetros independientes o factores reales como concentración de NaCl (B), ciclos de ultrasonidos (C), tiempo de ultrasonido (E), potencia de ultrasonido (H), concentración de extractante (I) y tiempo de centrifugado (K), y cinco factores ficticios o *dummies* (A, D, F, G y J). Los experimentos se realizaron aleatoriamente para reducir el efecto de variables desconocidas y/o errores sistemáticos. Los valores de los factores reales estudiados en niveles bajo (-) y alto (+) se pueden ver en la **Tabla 3.2**.

¹²⁵ Guo, X., Jiang, W., Du, D., & Shang, X. (2023). Plackett–Burman experimental design of modified wood ceramics for ammonia nitrogen removal from water and response optimization of the modified wood ceramic's comprehensive performance. *Ceramics International*, 49(7), 11612-11622. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.12.008>

Una vez seleccionadas las variables significativas, se realizó un diseño experimental factorial completo para obtener el valor óptimo de cada variable en el proceso de extracción. Todos los experimentos se realizaron utilizando 10,0 mL de una muestra sintética que contenía los filtros UV en una concentración de 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. El procesamiento de datos del diseño experimental se realizó mediante el programa Statgraphics Plus 5.1 (EE.UU.).

Tabla 3.2 Variables y niveles estudiados mediante el diseño experimental de Plackett-Burman.

Variable	Nivel	
	Bajo (-1)	Alto (+1)
B- NaCl (g%)	0	1
C- Ciclos US (s/s)	40/60	59/60
E- Tiempo US (s)	135	210
H- Potencia US (W)	91	117
I- Relación ILs ([DDmim]Cl: ([Bmim]PF ₆))	0,3:1	0,5:1
K- Tiempo de centrifugación (s)	120	300

3.3.2.5 Procedimiento cromatográfico

La cuantificación de los filtros UV en las diferentes muestras analizadas se realizó mediante HPLC utilizando un sistema HPLC Agilent modelo 1260 Infinity (EEUU) con detector UV y equipado con una columna de fase reversa Eclipse Plus C18 (partículas

esféricas de 3,5 μm recubiertas con octadecilsilano, 100 \times 4,6 mm). Se empleó como gradiente de elución una fase móvil de acetonitrilo y agua ultrapura, a partir de una relación de 90:10 (v/v) hasta 10:90 (v/v) a los 7 min y se controló mediante la activación de bombas cuaternarias a 40°C. El caudal fue de 0,50 mL min⁻¹ y el volumen de muestra inyectado fue de 20 μL . El detector del equipo operó a una longitud de onda (λ) de 307 nm. Bajo estas condiciones, se obtuvieron picos cromatográficos sin cola y bien resueltos para cada analito.

3.3.2.6 Muestras

Se analizaron mediante la metodología propuesta muestras de agua de piscina, arroyo, río y mar considerando la probable presencia, como contaminantes de las mismas, los filtros UV estudiados. La muestra A y la muestra B se recolectaron en la región de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. La muestra A se obtuvo de una piscina privada (38° 41' 46" S, 62° 13' 1" O) mientras que la muestra B se obtuvo en un punto de muestreo del arroyo Sauce Chico (38° 42' 8" S, 62° 27' 27" W). Por otro lado, la muestra C y la muestra D fueron recolectadas en la región de Viedma, provincia de Río Negro, Argentina. La muestra C se obtuvo en un punto de muestreo del río Río Negro (40° 47' 59" S, 62° 59' 51" O) mientras que la muestra D se recolectó en un punto de muestreo de la costa del mar del sector El Cóndor (41° 3' 30" S, 62° 50' 12" W). La **Fig. 3.3** muestra la ubicación geográfica de los sitios de muestreo con sus respectivas coordenadas. Pevio al procedimiento propuesto, todas las muestras se filtraron utilizando un filtro de papel cuantitativo Whatman (tamaño de poro: < 2 μm) para eliminar el material sólido suspendido y se almacenaron a 4°C en botellas de vidrio color

ámbar hasta su análisis. Adicionalmente, se preparó en el laboratorio una muestra simulada (muestra E) mediante la aplicación de un protector solar comercial (Dermaglós SOLAR; FPS (factor de protección solar) 50) en las manos de un voluntario y su posterior exposición al sol durante 40 min. Luego, el voluntario se lavó las manos en 1,8 L de agua destilada y la muestra resultante fue conservada en heladera (4°C) hasta su análisis.



Fig. 3.3 Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en las regiones de Bahía Blanca (A y B) y Viedma (C y D). Muestra A: piscina privada; Muestra B: arroyo Sauce Chico; Muestra C: río Río Negro; Muestra D: costa de mar El Cóndor.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Preparación y caracterización del material extractante

Inicialmente, para la obtención del material extractante se estudiaron diferentes ILs como [Bmim]PF₆, [Bmim]BF₄, [DDmim]Cl y [Dmim]Cl. Tal como se observa en la **Fig. 3.4**, los ILs [Bmim]PF₆ y [Bmim]BF₄ presentan cadenas carbonadas cortas (n=4), mientras que [DDmim]Cl y [Dmim]Cl presentan cadenas carbonadas largas (n=10). Sin embargo, [Bmim]PF₆ y [Bmim]BF₄ presentan carácter lipofílico y, por ende, una buena afinidad por los filtros orgánicos UV. Entonces, se combinaron ILs en diferentes proporciones y en presencia de surfactante (TX-100), y se evaluaron teniendo en cuenta la capacidad de formar el punto nube, la posibilidad de separar la fase extractante después de la sonicación y la eficiencia de extracción de los analitos.

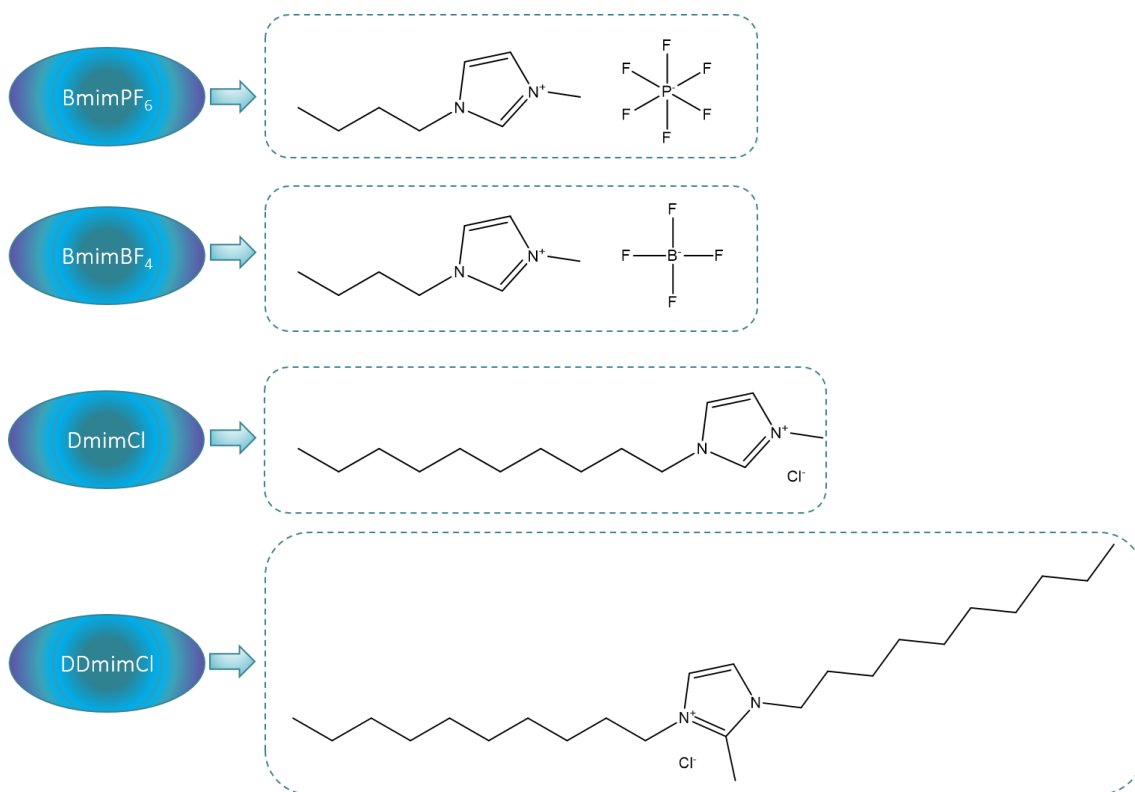


Fig. 3.4 Estructura molecular de los ILs estudiados para la formación de una NE. [Bmim]PF₆: hexafluorofosfato de 1-butil-3 metilimidazolio; [Bmim]BF₄: tetrafluoroborato de 1-butil-3 metilimidazolio; [Dmim]Cl: cloruro de 1-decil-3 metilimidazolio; [DDmim]Cl: cloruro de 1,3-didecil-2 metilimidazolio.

Como puede verse en la **Tabla 3.3**, en total se obtuvieron ocho materiales extractantes (ME1-ME8). Resultó óptimo el material extractante ME-8, el cual estuvo formado por 2,0 g% de [DDmim]Cl (n=10), 4,7 g% de [Bmim]PF₆ (n=4) y 6,9 g% de TX-100, ya que con esta mezcla se formó el punto de nube en un lapso de tiempo relativamente corto (80 s), se logró una buena separación de la fase acuosa respecto de la de extracción y, además, se obtuvieron buenos porcentajes de extracción para todos los filtros UV (RE% > 43). Además, el material extractante ME-8 fue estable en el tiempo, sin evidencia de turbidez o separación de fases, lo que sugirió la presencia de una NE. Este hecho fue confirmado por la técnica DLS, la cual determinó que el material extractante presentó gotas con un valor Z de 14,9 nm (**Fig. 3.5**) y un valor de Pdl de 0,240. Teniendo en cuenta

que valores de Pdl entre 0,100 y 0,250 indican una distribución de tamaño uniforme y valores mayores a 0,500 indican una distribución amplia, en nuestro caso podemos concluir que la ILS-NE tiende a ser un sistema monodisperso y estable debido a la uniformidad en el tamaño de las gotas.

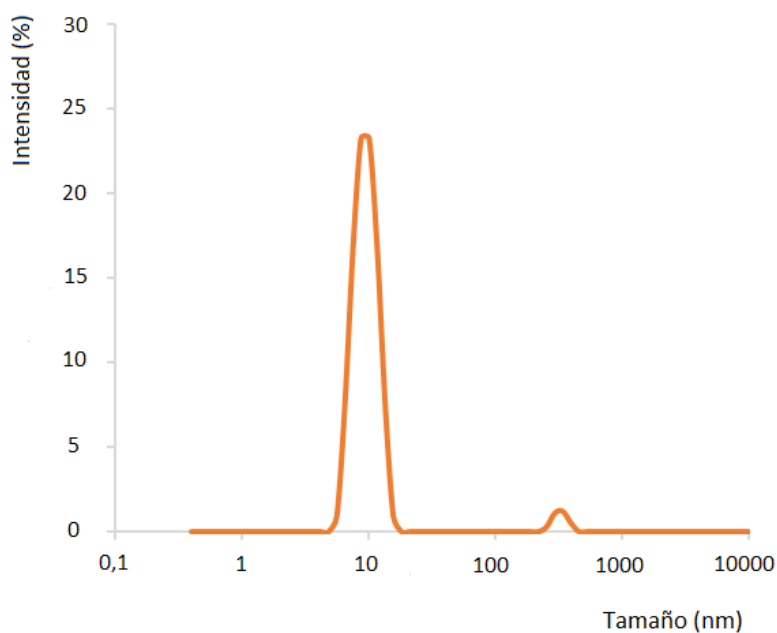


Fig. 3.5 Distribución de tamaño de las gotas de la ILS-NE obtenida (ME-8) para la extracción de filtros orgánicos UV.

CAPÍTULO 3. NANOEMULSIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE FILTROS QUÍMICOS SOLARES

Tabla 3.3 Estudio de diferentes materiales extractantes obtenidos a partir de la combinación de diferentes ILs y surfactante.

	TX-100	[DDmim]Cl	[Bmim]PF ₆	[Dmim]Cl	[Bmim]BF ₄	Punto nube	Separación de fases	RE%
ME 1	0,21	0,02	-	-	-	Si	No	-
ME 2	0,21	-	0,14	-	-	Si	Si	< 25
ME 3	0,21	-	-	0,02	-	No	-	-
ME 4	-	0,02	0,14	-	-	No	-	-
ME 5	0,21	-	-	0,02	0,15	No	-	-
ME 6	0,21	0,02	-	-	0,15	No	-	-
ME 7	0,21	-	0,14	0,02	-	Si	Si	< 30
ME 8	0,21	0,02	0,14	-	-	Si	Si	> 43

ME: material extractante; RE%: recuperación de extracción porcentual. Las concentraciones son expresadas en g%.

3.4.2 Determinación de los filtros químicos UV

En la **Fig. 3.6** se muestra el cromatograma correspondiente a una muestra que contenía los cuatro filtros químicos UV en concentraciones de $80 \mu\text{g L}^{-1}$. Como se puede observar, se obtuvieron tiempos de retención de 1,54 min para BZ3, 3,35 min para OMC, 3,52 min para OCR y 4,72 min para EHS. Es importante señalar que el tiempo de análisis fue inferior a 5 min, lo que contribuyó a minimizar el consumo de energía y solvente. La posterior cuantificación de los analitos se realizó por el método univariado utilizando como señal analítica el área del pico cromatográfico correspondiente.

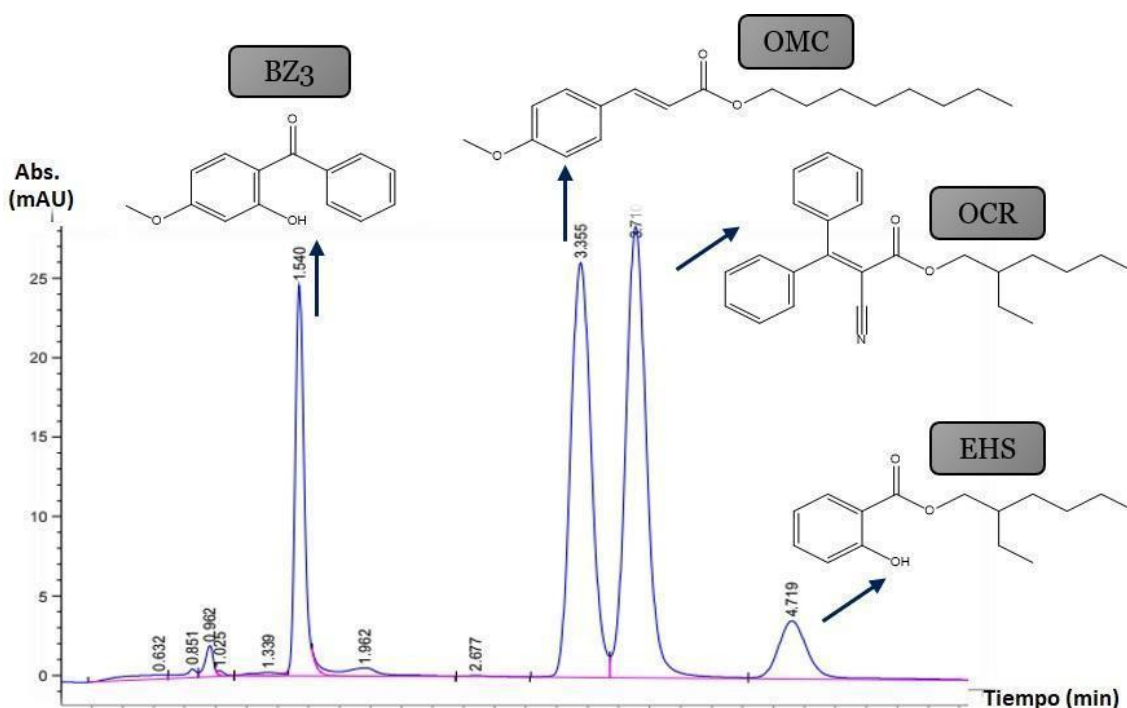


Fig. 3.6 Cromatograma correspondiente a la separación por HPLC de los cuatro filtros químicos UV estudiados. Se obtuvieron tiempos de retención de 1,54 min para BZ3, 3,35 min para OMC, 3,52 min para OCR y 4,72 min para EHS. Además, se indica la estructura molecular de cada filtro químico UV.

3.4.3 Optimización de variables

Una vez establecido el material extractante, se realizó un análisis exploratorio de las variables relacionadas con el proceso de extracción. La optimización de las mismas se realizó utilizando como respuesta la recuperación de extracción porcentual (RE%) la cual se define como (Ec. 3.1):

$$\text{Ec. 3.1} \quad RE\% = \frac{n_{FE}}{n_0} \times 100\% = \left(\frac{C_{FE} \times V_{FE}}{C_0 \times V_0} \right) \times 100\%$$

donde n_0 es la cantidad total del analito y n_{FE} es la cantidad total del analito que se extrajo en la fase extractante, C_{FE} corresponde a la concentración de analito en el material de extracción y V_{FE} al volumen de esta fase, C_0 es la concentración inicial de analito en la muestra y V_0 el volumen de la solución de muestra. C_{FE} se calculó a partir de curvas de calibración obtenidas para cada analito utilizando la metodología HPLC.

3.4.3.1 Estudios preliminares

En primer lugar, se estudió el efecto de la temperatura durante el paso de separación de fases. En particular, se evaluó la extracción a baja temperatura para verificar si se formaba una fase sólida y con ello se facilitaba la separación del material extractante que contenía los analitos de la muestra, tal como fue reportado en la literatura por Ge y col.¹²⁶. En dicho trabajo, luego del proceso de extracción, se centrifugó la emulsión

¹²⁶ Ge, D., Zhong, G., Zhou, X., Dai, E., & Wang, Y. (2020). Elevated temperature-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on solidification of a floating organic drop for the determination of UV filters in water samples by high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 17, 499-506. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13738-019-01785-1>

extractante, formada por microgotas de 1-undecanol formándose una espuma en la parte superior del tubo. Se observó que al colocar el tubo en un baño de hielo el 1-undecanol se solidificaba (como consecuencia de su bajo punto de fusión), facilitando de esta manera la correcta recolección de la fase orgánica. En nuestro caso, se realizó la extracción a baja temperatura (0,5-1,0 °C) en baño de hielo y se comparó con una extracción a temperatura ambiente (25°C). En ambos casos, la fase extractante se separó fácilmente de la muestra y los resultados de recuperación fueron similares. De esta manera, no fue necesario enfriar el extracto durante el proceso de separación.

Por otro lado, se estudió el efecto del pH durante el proceso de extracción entre 3,0-6,0 debido a que en este rango los filtros químicos UV no están ionizados. En particular, BZ3 ($pK_a=7,56$) y EHS ($pK_a=8,13$) son ácidos débiles que migrarían a la fase oleosa del material extractante si se encuentran en su forma neutra^{127 128}. Como se puede ver en la **Fig. 3.7**, se obtuvo una extracción más eficiente para todos los filtros UV a pH 3,0 lo cual estuvo en concordancia con estudios publicados previamente¹²⁹.

¹²⁷ Zhang, P. P., Shi, Z. G., Yu, Q. W., & Feng, Y. Q. (2011). A new device for magnetic stirring-assisted dispersive liquid-liquid microextraction of UV filters in environmental water samples. *Talanta*, *83*(5), 1711-1715. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.11.076>

¹²⁸ Vidal, L., Chisvert, A., Canals, A., & Salvador, A. (2007). Sensitive determination of free benzophenone-3 in human urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, *1174*(1-2), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.07.077>

¹²⁹ Román, I. P., Chisvert, A., & Canals, A. (2011). Dispersive solid-phase extraction based on oleic acid-coated magnetic nanoparticles followed by gas chromatography-mass spectrometry for UV-filter determination in water samples. *Journal of Chromatography A*, *1218*(18), 2467-2475. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.047>

3.4.3.2 Diseño experimental

3.4.3.2.1 Diseño Plackett-Burman

Como se mencionó en la sección 3.3.2.4, concentración de NaCl (B), ciclos de ultrasonido (C), tiempo de sonicación (E), potencia de ultrasonido (H), relación ILs (I) y tiempo de centrifugación (K) se estudiaron en dos niveles (bajo y alto). La significancia de los efectos de las variables analizadas se evaluó mediante una prueba de test-t. El valor del efecto de cada variable se comparó con un valor de efecto crítico (E_{crit}), el cual fue obtenido a partir de un error estándar estimado a partir de los *dummies* y un valor t_{crit} (2,571). Se consideraron significativos los efectos superiores a su E_{crit} correspondiente¹³⁰.

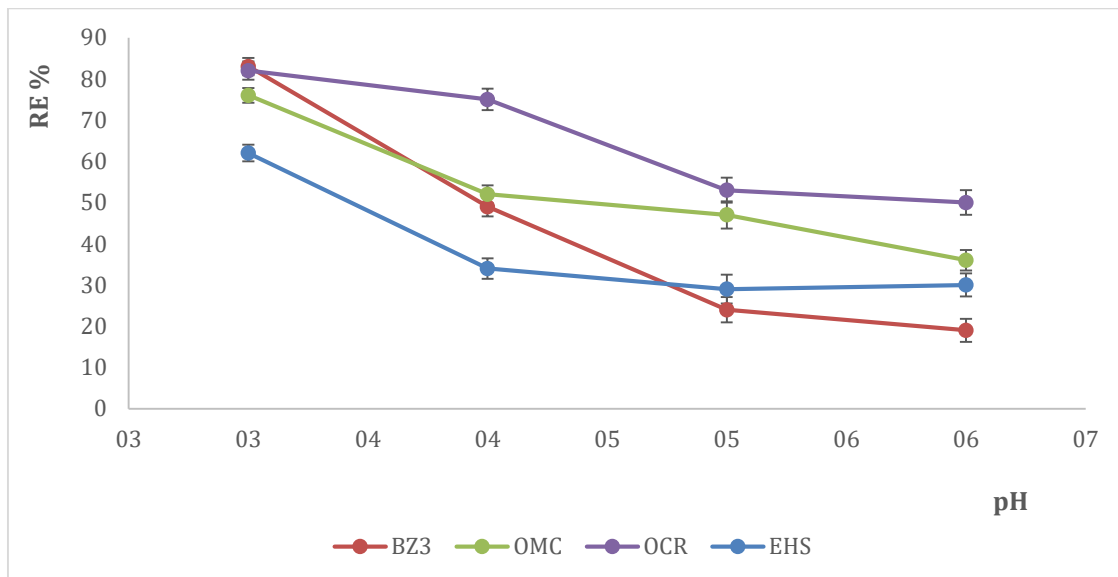


Fig. 3.7 Efecto del pH en el proceso de extracción de BZ3, OMC, OCR y EHS utilizando el material propuesto (ILs-NE).

¹³⁰ Dejaegher, B., & Vander Heyden, Y. (2011). Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 56(2), 141-158. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2011.04.023>

En la Fig. 3.8 se muestran los diagramas de Pareto donde pueden observarse los efectos de las variables (representados por barras) y los valores de E_{crit} (líneas verticales) para cada filtro UV. En el caso de BZ3 ($E_{crit}=22,2$), la única variable significativa fue el tiempo de ultrasonido (E) en el nivel alto (210 s). Para OMC ($E_{crit}=28,7$), OCR ($E_{crit}=20,9$) y EHS ($E_{crit}=3,09$), las variables tiempo (E) y potencia de ultrasonido (H) en el nivel alto (210 s y 117 W, respectivamente) y la relación de ILs (I) en el nivel bajo (0,3:1) fueron significativas. Por otro lado, concentración de NaCl (B), ciclos de ultrasonido (C) y tiempo de centrifugación (K) no fueron significativos en los niveles estudiados.

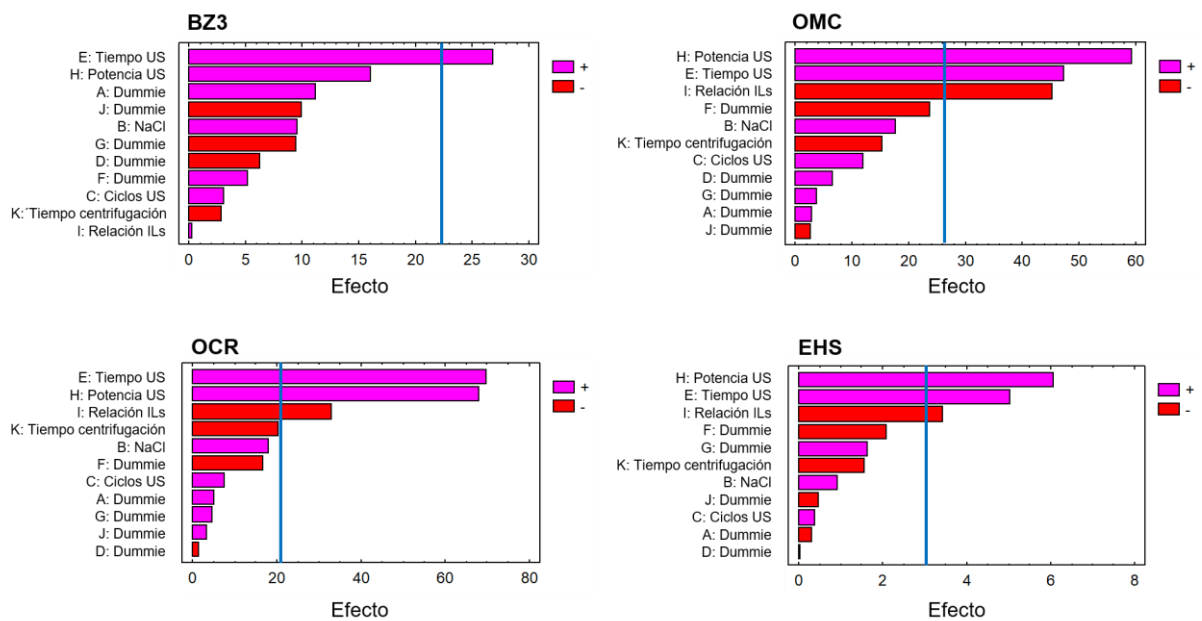


Fig. 3.8 Diagramas de Pareto correspondientes al diseño experimental de Plackett-Burman. B: concentración de NaCl (g%); C: ciclos de ultrasonido (s/s); E: tiempo de ultrasonido (s); H: potencia de ultrasonido (W); I: relación de ILs; K: tiempo de centrifugación (s).

En base a estos resultados, solo se seleccionaron las variables tiempo de ultrasonido (E) y relación de ILs (I) para continuar con el estudio de optimización ya que la potencia

de ultrasonido se fijó en 117 W, valor máximo de potencia en el que opera la sonda de ultrasonido. Las superficies de respuesta correspondiente a las variables seleccionadas se muestran en la **Fig. 3.9**.

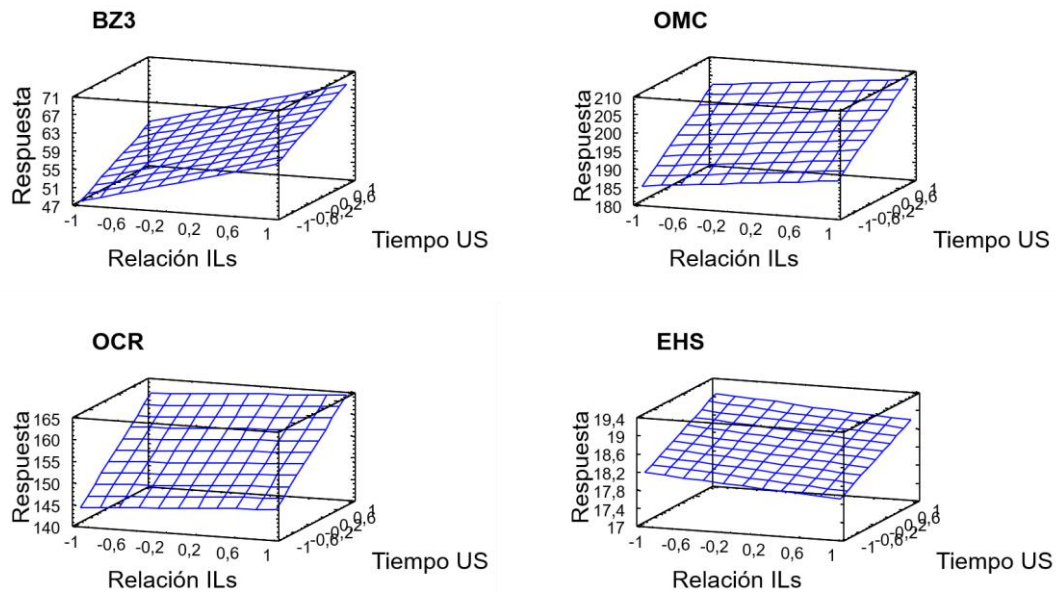


Fig. 3.9 Superficies de respuesta estimadas correspondientes a las variables seleccionadas (tiempo de ultrasonido y relación de ILs) para los cuatro filtros UV mediante la aplicación del diseño experimental de Plackett-Burman.

3.4.3.2.2 Diseño factorial completo

De acuerdo con los resultados obtenidos en el diseño de Plackett-Burman, se estudió el comportamiento de las variables relación de ILs (A) y tiempo de ultrasonido (B) utilizando un diseño factorial completo de dos niveles (2^2). Así, se realizaron un total de cuatro experimentos, cada uno por triplicado. La relación de ILs se evaluó entre 0,2 DDmimCl:1,0 BmimPF₆ (nivel bajo) y 0,36 DDmimCl: 1,0 BmimPF₆ (nivel alto) mientras que el tiempo de ultrasonido se evaluó entre 150 s (nivel bajo) y 240 s (nivel alto). La

Fig. 3.10 muestra el efecto de cada variable y su interacción para los cuatro filtros UV,

siendo el E_{crit} 3,2; 4,25; 3,23 y 3,18 para BZ3, OMC, OCR y EHS, respectivamente. Los valores seleccionados como óptimos para la relación de ILs fue 0,36 DDmimCl: 1,0 BmimPF₆ y para el tiempo de ultrasonido 150 s (**Fig. 3.11**).

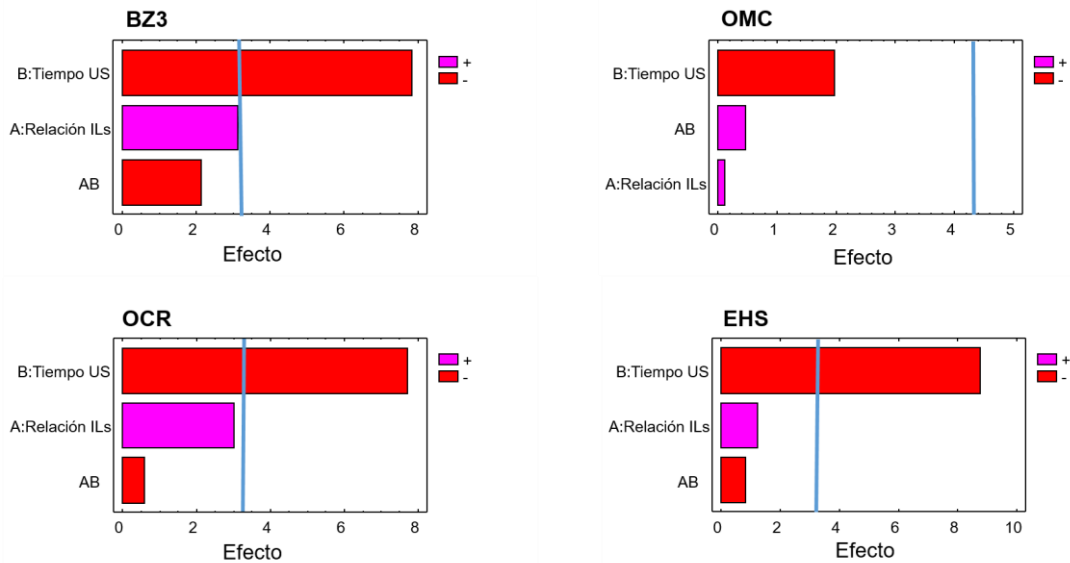


Fig. 3.10 Diagramas de Pareto correspondientes al diseño experimental factorial completo. Las variables analizadas fueron relación de ILs (A) y tiempo de ultrasonido (B), así como su interacción (AB).

En el caso de la relación de ILs, la proporción más alta contiene una mayor cantidad de IL de cadena larga (DDmimCl) lo que contribuye a una mejor extracción de los filtros UV debido, como se comentó anteriormente, al carácter lipofílico de los mismos. Para el tiempo de ultrasonido, un mayor tiempo de uso de la sonda generó un aumento de temperatura que disminuyó la eficiencia de extracción.

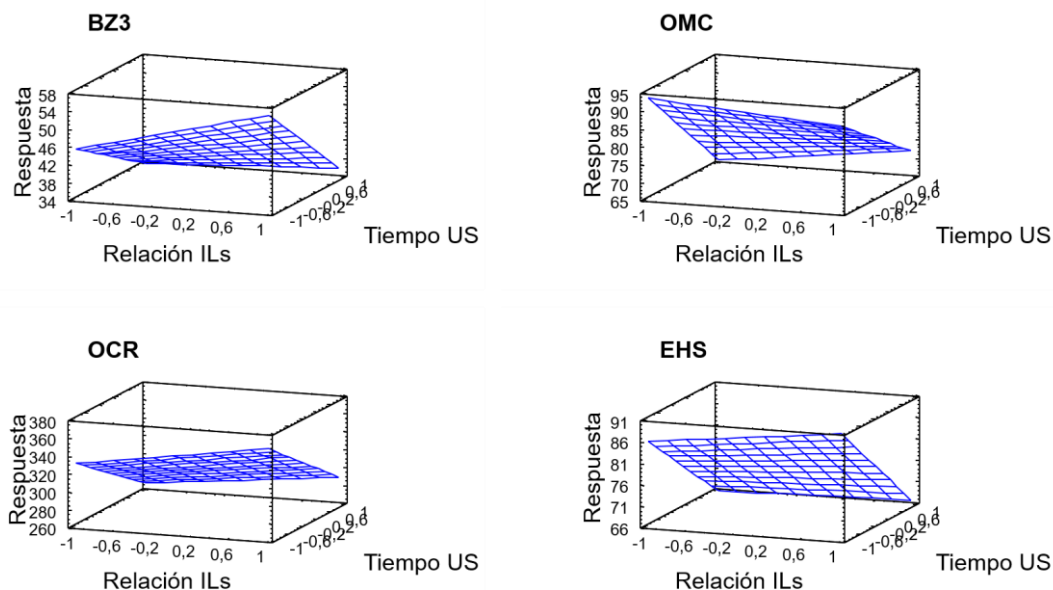


Fig. 3.11 Superficies de respuesta estimadas para las variables relación de ILs (A) y tiempo de ultrasonido (B) para los cuatro filtros UV correspondientes al diseño experimental factorial completo.

3.4.4 Performance analítica

La **Tabla 3.4** muestra los parámetros estadísticos y la performance analítica del método ILs-NE/US-LLME propuesto. Como se puede observar, el intervalo lineal fue amplio y estuvo comprendido entre 2,5 y 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para OMC, 2,5 y 50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para OCR, mientras que para BZ3 y EHS se obtuvo un intervalo ligeramente más acotado (6,0-50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 6,5-50,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente. Además, los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) se calcularon como $3*(s/S)$ y $10*(s/S)$, respectivamente, donde s corresponde a la desviación estándar de la ecuación de regresión y S a su pendiente¹³¹. La precisión intradía y la precisión interdía, se expresaron como porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD%). La La precisión intradía se

¹³¹ Pestana, Y. M., Sousa, É. M., Lima, D. L., Silva, L. K., Pinheiro, J. F., Sousa, E. R., ... & Silva, G. S. (2023). Multivariate optimization of dispersive liquid-liquid microextraction using ionic liquid for the analysis of ultraviolet filters in natural waters. *Talanta*, 259, 124469. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124469>

calculó a partir de cinco réplicas ($n=5$) de soluciones que contenían una concentración de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada filtro químico UV, mientras que la precisión interdía se calculó a partir de cinco réplicas ($n=5$) realizadas en tres días diferentes ($k=3$). En todos los casos, el RSD% fue satisfactorio, siendo inferior al 7,0%. Finalmente, el factor de preconcentración (FP) fue 100 y se calculó como la relación entre la concentración final de cada analito en la fase dispersa de la NE (C_{FE}) al finalizar la extracción y la concentración inicial del analito en la muestra (C_0), tal como se muestra en la siguiente ecuación (**Ec. 3.2**):

Ec. 3.2
$$FP = \frac{C_{FE}}{C_0}$$

Tabla 3.4. Parámetros estadísticos y performance analítica del método ILS-NE/US-LLME propuesto.

	BZ3	OMC	OCR	EHS
Curva de Calibración				
Ordenada al origen	25,786 ± 2,720	1,332 ± 0,680	7,929 ± 2,398	4,958 ± 0,663
Pendiente (L µg ⁻¹)	5,086 ± 0,109	3,160 ± 0,063	14,257 ± 0,082	1,011 ± 0,023
R ²	0,998	0,998	0,999	0,998
Performance Analítica				
Rango lineal (µg L ⁻¹)	6,0 - 50,0	2,5 - 50,0	2,0 - 50,0	6,5 - 50,0
LOD (µg L ⁻¹)	1,6	0,64	0,5	1,9
LOQ (µg L ⁻¹)	5,3	2,1	1,7	6,4
Eficiencia de extracción (%)	93	100	96	94
Factor de Preconcentración			100	
Precisión Intradía ^a (RSD%)	5,1	4,3	4,2	6,5
Precisión Interdía ^b (RSD%)	5,3	5,4	3,7	6,7

^a n = 5

^b n = 5; k = 3

3.4.5 Análisis de muestras reales

Para evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se analizaron cuatro muestras de agua de diferentes orígenes (3.3.2.6). No se encontraron residuos de BZ3, OMC, OCR y

EHS en las muestras seleccionadas teniendo en cuenta los LOD del método propuesto. En el caso de la muestra simulada (muestra E), se encontraron concentraciones de 25,1, 18,6, 26,2 y 22,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BZ3, OMC, OCR y EHS, respectivamente (**Tabla 3.5**). Para hacer esta determinación la muestra tuvo una dilución 1/20 y las concentraciones en la muestra original fueron las siguientes: de 502; 372; 524; y 454 $\mu\text{g L}^{-1}$ de BZ3, OMC, OCR y EHS, respectivamente.

Por otro lado, la veracidad del método propuesto fue evaluada mediante un estudio de recuperación. Por lo tanto, todas las muestras (A-E) se enriquecieron con dos niveles de concentración (7,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 20,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) agregando los volúmenes correspondientes de soluciones estándar de cada filtro UV. Entonces, las muestras fortificadas se trataron como se describió anteriormente y se calculó el porcentaje de recuperación relativa (RR%) como (**Ec. 3.3**):

Ec. 3.3
$$RR\% = \left(\frac{C_{cal} - C_{real}}{C_{add}} \right) \times 100$$

donde C_{cal} es la concentración del analito encontrado en la muestra fortificada, C_{real} es la concentración de los analitos en la muestra real y C_{add} es la concentración conocida del estándar adicionado a la muestra. Como se puede observar en la **Tabla 3.5**, los resultados del estudio de recuperación variaron entre 81,9-110,2% para BZ3; 85,8-118,7% para OMC; 87,1-119,9% para OCR y 83,0-106,8% para EHS, considerando todas las muestras (A-E). Estos valores fueron satisfactorios, demostrando la capacidad y la versatilidad del método para ser aplicable a muestras complejas y de distinto origen, incluso cuando presentan una elevada fuerza iónica, como es el caso de las muestras de agua de mar.

CAPÍTULO 3. NANOEMULSIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE FILTROS QUÍMICOS SOLARES

Tabla 3.5. Resultados del análisis de diferentes muestras de agua (A-E) aplicando el procedimiento ILS-NE/US-LLME propuesto.

Muestra	C _{add} (µg L ⁻¹)	BZ3		OMC		OCR		EHS	
		C _{cal} ^a (µg L ⁻¹)	RR%	C _{cal} ^a (µg L ⁻¹)	RR%	C _{cal} ^a (µg L ⁻¹)	RR%	C _{cal} ^a (µg L ⁻¹)	RR%
A	0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
	7.0	5.9 ± 0.8	84.6	6.5 ± 0.7	92.2	6.4 ± 0.5	91.4	6.1 ± 0.5	87.5
	20.0	20.1 ± 1.8	100.5	20.0 ± 0.8	99.8	21.8 ± 1.3	108.9	16.6 ± 1.9	83.0
B	0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
	7.0	6.5 ± 0.3	92.6	6.2 ± 0.3	88.9	6.8 ± 0.3	97.5	7.0 ± 0.2	100.1
	20.0	21.0 ± 1.7	104.9	17.2 ± 0.7	85.8	19.9 ± 2.2	99.3	18.9 ± 2.5	94.5
C	0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
	7.0	6.3 ± 0.9	90.4	6.2 ± 0.9	88.5	6.1 ± 0.5	87.1	6.9 ± 0.3	99.2
	20.0	18.5 ± 1.3	92.7	19.1 ± 0.2	95.3	20.0 ± 2.4	99.8	19.7 ± 1.0	98.4
D	0	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
	7.0	7.7 ± 0.8	110.2	8.0 ± 1.0	114.5	7.2 ± 1.1	103.2	7.0 ± 0.3	100.2
	20.0	16.4 ± 1.9	81.9	23.7 ± 1.3	118.7	20.8 ± 0.6	104.2	21.4 ± 2.2	106.8
E	0	25.1 ± 1.9	-	18.6 ± 0.6	-	26.2 ± 0.4	-	22.7 ± 1.0	-
	7.0	32.3 ± 5.8	103.5	26.5 ± 3.7	113.1	37.8 ± 0.5	119.9	29.3 ± 1.8	93.6
	20.0	44.6 ± 4.0	97.6	38.4 ± 1.4	99.0	47.7 ± 2.4	107.5	40.2 ± 4.6	87.5

A: piscina privada; **B:** arroyo Sauce Chico; **C:** río Rio Negro; **D:** costa marítima El Cóndor; **E:** muestra simulada; C_{add}: concentración conocida del estándar adicionado a la muestra.; C_{cal}: concentración encontrada en la muestra; RR%: recuperación relativa porcentual; n.d: no detectado.

^a Las muestras fueron analizadas por triplicado (n = 3) y los resultados se acompañan de la correspondiente desviación estándar.

3.4.6 Comparación y ventajas del método propuesto

En la **Tabla 3.6** se presentan diferentes métodos para la extracción y determinación de filtros químicos UV. Para llevar adelante una comparación se tuvieron en cuenta parámetros analíticos, como tiempos de extracción y detección, factor de preconcentración, precisión, porcentajes de recuperación y límites de detección. El método ILs-NE/US-LLME propuesto presentó el menor tiempo de análisis por muestra, el cual fue de 10 min (incluidos los tiempos de extracción y detección) en comparación con los otros trabajos citados, que variaron de 16 a 108 min¹³². Además, el FP (100) fue comparable con otros métodos que utilizan ILs como material extractante¹³³. Aunque otros métodos (no basados en ILs) mostraron FPs más altos, fueron necesarios para el proceso de preconcentración un alto volumen de muestra (50 mL)¹³⁴ y un largo tiempo de análisis (superior a 50 min)^{132 135}. Además, el método propuesto fue preciso (RSD% menor al 7,0%) y se obtuvieron óptimos valores de LOD para todos los analitos estudiados (menor a 2,0 µg L⁻¹). Por otro lado, las recuperaciones fueron comparables a

¹³² An, J., & Anderson, J. L. (2018). Determination of UV filters in high ionic strength sample solutions using matrix-compatible coatings for solid-phase microextraction. *Talanta*, 182, 74-82. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.01.052>

¹³³ Li, S., Cai, S., Hu, W., Chen, H., & Liu, H. (2009). Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of cadmium in water samples. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 64(7), 666-671. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2009.05.023>

¹³⁴ Giokas, D. L., Sakkas, V. A., Albanis, T. A., & Lampropoulou, D. A. (2005). Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography-mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction. *Journal of Chromatography A*, 1077(1), 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.074>

¹³⁵ Tarazona, I., Chisvert, A., León, Z., & Salvador, A. (2010). Determination of hydroxylated benzophenone UV filters in sea water samples by dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(29), 4771-4778. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.05.047>

otros métodos basados en DLLME^{132 135 136} y extracción con punto nube¹³⁴ y resultaron mejores que las recuperaciones obtenidas en trabajos basados en microextracción en fase sólida ¹³².

¹³⁶ Ku, Y. C., Leong, M. I., Wang, W. T., & Huang, S. D. (2013). Up-and-down shaker-assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction of benzophenone-type ultraviolet filters. *Journal of separation science*, 36(8), 1470-1477. <https://doi.org/10.1002/jssc.201201108>

CAPÍTULO 3. NANOEMULSIÓN PARA LA SEPARACIÓN DE FILTROS QUÍMICOS SOLARES

Tabla 3.6 Comparación de diferentes trabajos reportados en la literatura para la determinación de filtros químicos UV en muestras de agua y el método ILS-NE/US-LLME propuesto.

Filtros UV	MA	Volumen (mL)	Método	TE (min)	TD (min)	FP	RR%	Repetibilidad (RSD%)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref.
BZ3, DHB, BZ8, THB	Agua de mar	5	DLLME-GC-MS	3	53	83	65-222	5.6-6.2	0.032-0.050	[135]
BZ, HMB, DHMB	Agua de Piscina, lago, efluente	5	UDSA-IL-DLLM	6	10	125	92-120	1.0-1.8	0.20-1.30	[136]
BZ3, OMC, E232, E6300, E9020	Agua corriente	50	CPE HPLC-UV	30	20	500	95-102	No informado	0.14-1.27	[134]
BZ3, MBC, OCR, EDB, EHS, HMS	piscina y mar	3.5	In-syringe MSA-DLLME-HPLC	5.5	12	25	86-114	4.0-6.0	0.08-12.0	[113]
BZ3, BS, OMC, EDB, EHS, ETO, OCR, HMS, BMDM	Agua envasada, piscina, y lago	10	DI-SPME	75-98	12	200-300	54-124	No informado	0.1-5.0	[132]
BZ3, OCR, OMC, EHS	Agua de piscina, arroyo, río y mar	10	ILs-NE/US-LLME	4.5	5	100	80-118	4.2-6.5	0.64-1.90	Este trabajo

MA: muestra analizada; TE: tiempo de extracción; TD: tiempo de detección; FP: factor de preconcentración; RR%: recuperación relativa; RSD%: desviación estándar relativa; BZ3: 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona; DHB: 2,4 dihidroxibenzofenona; BZ8: 2,2-dihidroxi-4 metoxibenzofenona; THB: 2,3,4-trihidroxibenzofenona; BZ: benzofenona; E232: ácido 2-fenilbencimidazol-5-sulfónico; E6300: 3-(4-metilbencilideno)-alcanfor; OMC: p-metoxicinamato de octilo; E9020: 1-(4-terc-butilfenil)-3-(4-metoxifenil)1,3 propanodiona; MBC: 3-(4metilbenciliden)-alcanfor; EDB: dimetilaminobenzoato de 2-etilhexil-4; EHS:

salicilato de etilhexilo; HMS: homosalato; OCR: 2-etilhexil-2-ciano-3,3-difenilacrilato; BS: salicilato de bencilo; ETO: etocrileno; BMDM: avobenzona; DLLME-GC MS: microextracción líquido-líquido dispersiva acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas; UDSA-IL-DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva a base de líquido iónico asistida por agitador; CPE HPLC-UV: extracción del punto nube acoplada a cromatografía líquida de alta performance con detector UV; MSA-DLLME-HPLC: microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por agitación magnética en jeringa acoplada a cromatografía líquida de alta resolución; DI-SPME: microextracción en fase sólida por inmersión directa; ILS-NE/US-LLME: nanoemulsión a base de líquidos iónicos para la microextracción líquido-líquido asistida por ultrasonido.

3.4.7 Estudio de impacto sobre el medioambiente

El verdor del método propuesto se evaluó aplicando la métrica AGREE¹³⁷. Esta metodología permite estimar el verdor de un método considerando los doce principios de la *Química Analítica Verde* (GAC). La **Fig. 3.12** muestra los pictogramas coloreados correspondientes al método ILs-NE/US-DLLME propuesto y otros métodos cromatográficos. Como se puede observar, se obtuvo un valor de 0,50 para el método propuesto, cumpliendo con 9 de los 12 principios de la GAC. Es importante notar que los puntos 3, 5 y 10 presentan color rojo y este hecho está relacionado con que el equipo de detección opera fuera de línea, el método es manual y no miniaturizado y los reactivos no se obtuvieron de fuentes naturales, respectivamente. Sin embargo, el valor obtenido fue aceptable y superior al de otros métodos cromatográficos para determinar filtros UV en muestras de agua. En tales casos, los valores difieren significativamente del valor ideal de verdor (valor ideal = 1). Esto se debe principalmente a los puntos detallados en la **Tabla 3.7**, que destaca el uso de agentes derivatizantes^{138 139 140}, un

¹³⁷ Pena-Pereira, F., Wojnowski, W., & Tobiszewski, M. (2020). AGREE—Analytical GREEnness metric approach and software. *Analytical chemistry*, 92(14), 10076-10082. <https://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01887>.

¹³⁸ Wu, J. W., Chen, H. C., & Ding, W. H. (2013). Ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction plus simultaneous silylation for rapid determination of salicylate and benzophenone-type ultraviolet filters in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1302, 20-27. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.017>

¹³⁹ Yücel, C., Ertaş, H., Ertaş, F. N., & Karapinar, İ. (2022). Determination of UV Filters in Surface Water by VA-DLLME-SFOD Technique Coupled with GC-MS/MS. *CLEAN—Soil, Air, Water*, 50(8), 2100246. <https://doi.org/10.1002/clen.202100246>

¹⁴⁰ Jeon, H. K., Chung, Y., & Ryu, J. C. (2006). Simultaneous determination of benzophenone-type UV filters in water and soil by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1131(1-2), 192-202. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.036>

mayor número de pasos en el tratamiento de la muestra¹⁴¹, el uso de un cromatógrafo acoplado a un detector de masas¹³⁹, lo que implica un mayor consumo de energía, el uso de una mayor cantidad de reactivos con alta toxicidad y un elevado tiempo de análisis^{142 143}. Además, aunque se obtuvieron LOD bajos y se determinaron varios analitos simultáneamente, se obtuvieron valores de verdor inferiores a 0,34.

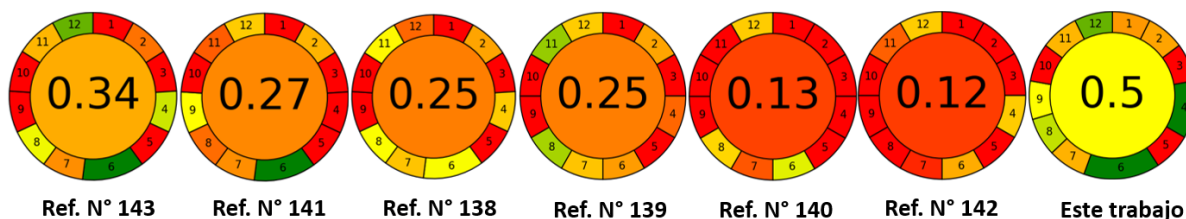


Fig. 3.12 Pictogramas de color obtenidos aplicando la metodología AGREE a diferentes trabajos reportados en la literatura para la determinación de filtros químicos UV y el método ILS-NE/US-LLME propuesto.

¹⁴¹ Çabuk, H., & Kavaracı, O. (2022). Magnetic retrieval of a switchable hydrophilicity solvent: fast homogeneous liquid–liquid microextraction for the determination of benzophenone-type UV filters in environmental waters. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 102(11), 2569-2585. <https://doi.org/10.1080/03067319.2020.1757088>

¹⁴² Pintado-Herrera, M. G., González-Mazo, E., & Lara-Martín, P. A. (2013). Environmentally friendly analysis of emerging contaminants by pressurized hot water extraction–stir bar sorptive extraction–derivatization and gas chromatography–mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 401-411. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-012-6453-1>

¹⁴³ Celeiro, M., Acerbi, R., Kabir, A., Furton, K. G., & Llompert, M. (2020). Development of an analytical methodology based on fabric phase sorptive extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry to determine UV filters in environmental and recreational waters. *Analytica Chimica Acta*: X, 4, 100038. <https://doi.org/10.1016/j.acax.2019.100038>

Tabla 3.7 Comparación del verdor calculado con la métrica AGREE para diferentes métodos cromatográficos publicados en la literatura y el método ILS-NE/US-LLME propuesto.

Principio de la GAC	Ref. [143]	Ref. [141]	Ref. N° [138]	Ref. [139]	Ref. [140]	Ref. [142]	Este trabajo
4. Número de pasos	5	≥ 8	6	7	8	6	3
6. Derivatización	No	No	BSTFA	BSTFA + TMCS (99:1)	MSTFA	MTBSTFA	No
7. Desecho (mL)	> 15	> 15	> 15	< 15	> 15	> 15	< 15
8. Número de analitos	11	3	5	10	7	8	4
8. Frecuencia de muestreo (h⁻¹)	1	1	2	2	2	0.1	4
9. Detección	GC-MS/MS	HPLC-UV	GC-MS	GC-MS/MS	GC-MS	GC-MS	HPLC-UV

BSTFA: N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida; TMCS: trimetilclorosilano; MSTFA: N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida; MTBSTFA: N (tercbutildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida; GC-MS: cromatografía de gases-detector de masas; GC-MS/MS: cromatografía de gases-detector masa-masa; HPLC-UV: cromatografía líquida de alta performance-detector UV.

3.5 Conclusiones

La combinación de dos líquidos iónicos con diferentes polaridades y un surfactante en baja concentración permitió la síntesis de una nanoemulsión capaz de extraer y preconcentrar satisfactoriamente cuatro filtros químicos UV de carácter lipofílico de muestras de agua de diferente origen, donde los mismos podrían encontrarse como contaminantes considerados emergentes. El material extractante se preparó fácilmente y el procedimiento cromatográfico para la separación y detección de los analitos fue sencillo y rápido. La performance analítica del método fue satisfactoria y se mejoraron algunos aspectos como menores volúmenes de reactivos y tiempos de análisis por muestra, con respecto a otros métodos reportados. El método fue apropiado para el análisis de diferentes tipos de muestras de agua, incluidas piscina, arroyo, río y mar. Un punto a destacar es que, en base a lo expuesto anteriormente, en comparación con otras metodologías que utilizan técnicas de preconcentración y separación cromatográfica, el método propuesto presentó un menor impacto ambiental

CAPÍTULO 4

Monitoreo enzimático de la
fotodegradación de catecol
(1,2-dihidroxibenceno)
empleando nanopartículas
de óxido de zinc (ZnO) como
catalizador

4.1 Introducción

Existe una gran variedad de compuestos fenólicos que pueden contaminar distintos cuerpos de agua potencialmente útiles para consumo y comprometer su potabilización. La coloración, la modificación del gusto y la alteración del aroma representan los tres problemas más frecuentes que surgen como consecuencia de elevadas concentraciones de materia orgánica, incluyendo fenoles, presentes en el agua¹⁴⁴. En los últimos años, la monitorización de fenoles y sus compuestos análogos ha suscitado un creciente interés, impulsado por su potencial toxicidad hacia animales, plantas y organismos acuáticos. En este contexto, se destaca el 1,2 dihidroxibenceno, más conocido como pirocatecol (PCT), un compuesto que se caracteriza por su limitada capacidad de degradación en medios acuosos destacándose su persistencia y consiguiente peligrosidad, una vez que ingresa al medio ambiente^{145 146}. El PCT se introduce principalmente en cuerpos de agua dulce a través de vertidos provenientes de sectores industriales como producción de pesticidas, fabricación de antioxidantes, fabricación de colorantes, industria farmacéutica, cosmética, y olivícola entre otros¹⁴⁷. En Argentina, la industria olivícola es

¹⁴⁴ Burttschell, R. H., Rosen, A. A., Middleton, F. M., & Ettinger, M. B. (1959). Chlorine Derivatives of Phenol Causing Taste and Odor. *Journal (American Water Works Association)*, 51(2), 205–214. <http://www.jstor.org/stable/41254261>

¹⁴⁵ Palanisamy, S., Ramaraj, S. K., Chen, S. M., Chiu, T. W., Velusamy, V., Yang, T. C., ... & Selvam, S. (2017). One pot electrochemical synthesis of poly (melamine) entrapped gold nanoparticles composite for sensitive and low level detection of catechol. *Journal of colloid and interface science*, 496, 364-370. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.12.062>

¹⁴⁶ Boopathy, G., Keerthi, M., Chen, S. M., Umopathy, M. J., & Kumar, B. N. (2020). Highly porous nickel molybdate@ graphene oxide nanocomposite for the ultrasensitive electrochemical detection of environmental toxic pollutant catechol. *Materials Chemistry and Physics*, 239, 121982. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2019.121982>

¹⁴⁷ Zhang, H., Huang, Y., Hu, S., Huang, Q., Wei, C., Zhang, W., ... & Hao, A. (2015). Self-assembly of graphitic carbon nitride nanosheets–carbon nanotube composite for electrochemical simultaneous determination of catechol and hydroquinone. *Electrochimica Acta*, 176, 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2015.06.119>

una de las industrias más importantes en cuanto a residuos que contienen este tipo de contaminante, debido a la producción masiva de aceite y la correspondiente generación de desechos asociados a este proceso.

En los últimos años, se ha observado un incremento importante en la producción nacional de aceite de oliva, lo que ha conllevado una notable redistribución geográfica de los olivares. Este crecimiento se ha traducido en una expansión de la superficie cultivada, una intensificación de la gestión de las áreas boscosas, una transición hacia variedades de olivas de mayor calidad y la instalación de numerosas plantas de procesamiento de aceite. En la actualidad, Argentina ostenta el título de ser el principal productor y exportador de aceite de oliva de América del Sur, y se encuentra en el décimo puesto a nivel mundial en esta industria. Las provincias líderes en producción son Catamarca, La Rioja, San Juan, Mendoza y Córdoba, que aportan conjuntamente más del 95% del volumen total producido en el país.¹⁴⁸ Sin embargo, en los últimos años se ha incrementado significativamente la producción de este aceite en el sudoeste bonaerense, más específicamente la región que comprende el partido de Bahía Blanca y la zona.

A pesar de que existen diversas metodologías para la extracción de aceite de oliva, en Argentina se da preferencia al método continuo de dos fases, que resulta en la obtención de una fase oleosa, de la cual se extrae el aceite, y un residuo semisólido compuesto por restos de carozo y pulpa de aceitunas, comúnmente conocido como alperujo y que se encuentra en una fase acuosa. Esta fase es denominada agua residual de lavado o agua residual de alperujo (ARA) y plantea importantes desafíos relacionados

¹⁴⁸ Paroldi, H., Pierantozzi, P., & Monetta, P. M. (2019). *Utilización de residuos olivícolas crudos como enmiendas de suelos de olivares*. <https://core.ac.uk/download/335290857.pdf>

con su disposición debido a su alta carga orgánica, su acidez, la presencia de compuestos fenólicos y la posible presencia residual de aceite¹⁴⁹. Esto llevó a que su vertido en cuerpos de aguas esté prohibido en virtud de la ley Nacional 25.612 y decreto 2107 de la provincia de Buenos Aires¹⁵⁰. Por otro lado, se desaconseja su almacenamiento en depósitos, dado que su alto contenido de humedad impide la adecuada aireación, lo que propicia fermentaciones anaeróbicas indeseadas que emiten olores desagradables.

Los métodos de descontaminación de ARA más comúnmente utilizados son los procesos biológicos anaeróbicos y aeróbicos. Los tratamientos que hacen uso de microflora anaeróbica exhiben una eficacia restringida en cuanto a la erradicación de compuestos aromáticos, demandando, en su proceso de degradación metabólica, la colaboración de diversas poblaciones microbianas en una secuencia específica¹⁵¹. Los procesos aeróbicos, por su parte, no demuestran ser efectivos en grado suficiente para la remediación de estas aguas residuales, ya que con frecuencia se requiere una etapa inicial de pretratamiento, que puede implicar dilución y tratamiento térmico, entre otras^{152 153}.

Para abordar estos desafíos, se han desarrollado diversas metodologías con el fin de eliminar o reutilizar el ARA. Entre las soluciones más destacadas se incluyen las plantas de extracción de aceite residual mediante solventes, las plantas de cogeneración de

¹⁴⁹Papazy A, Pappas I, Kotzabasis K, J. *Biotechnol.* 306 (2019) 47-53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.09.009>

¹⁵⁰Ley Nacional 25.612 y la Ley Provincial 5.824/87, decreto 2107

¹⁵¹ Mechichi, T., & Sayadi, S. (2005). Evaluating process imbalance of anaerobic digestion of olive mill wastewaters. *Process Biochemistry*, 40(1), 139-145. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.050>

¹⁵² Jaouani, A., Sayadi, S., Vanthourhout, M., & Penninckx, M. J. (2003). Potent fungi for decolourisation of olive oil mill wastewaters. *Enzyme and microbial technology*, 33(6), 802-809. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00210-2](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00210-2)

¹⁵³ Pinto, G., Pollio, A., Previtiera, L., Stanzione, M., & Temussi, F. (2003). Removal of low molecular weight phenols from olive oil mill wastewater using microalgae. *Biotechnology Letters*, 25, 1657-1659.

energía mediante la combustión del alperujo y las plantas de compostaje del alperujo en combinación con otros residuos agroindustriales. Estas alternativas han arrojado resultados prometedores, aunque los costos elevados asociados a su implementación han llevado a los productores a buscar opciones más económicas, destacándose la utilización del alperujo fresco como abono agrícola. A través de esta práctica, los residuos de la industria olivícola se reintegran en la misma región de su producción o en áreas circundantes. Sin embargo, esta última alternativa de disposición acrecenta su acumulación en suelos, lo cual tiene un impacto negativo en las características fisicoquímicas del terreno, ya que la presencia de materia orgánica soluble, nitratos y compuestos fenólicos en los lixiviados constituye un potencial riesgo de contaminación de acuíferos subsuperficiales.

Químicamente el ARA está compuesto por diversas sustancias orgánicas, tales como azúcares, ácidos orgánicos (ácido cinámico, ácido p-hidroxibenzoico, etc.)¹⁵⁴ ¹⁵⁵ y polifenoles en cantidades significativas¹⁵⁶. Dentro de estos últimos podemos encontrar taninos, hidroxitirosol y catequinas. Sin embargo, uno de los principales compuestos fenólicos en el ARA es el PCT. Como se ha mencionado anteriormente, la elevada toxicidad de este compuesto para numerosas especies biológicas, junto con su limitada capacidad de degradación en el entorno ambiental, plantean un interesante desafío desde el punto de vista químico y ecológico. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) ha ubicado a los fenoles en el undécimo lugar dentro de su lista de

¹⁵⁴ Loffredo, C. M., Dennehy, M., & Alvarez, M. (2023). Fe-Mn/ZrO₂ catalysts: Sulfate-based-advanced oxidation process for the degradation of olive oil industry model pollutants. *Catalysis Communications*, 174, 106578.

¹⁵⁵ Deeb, A. A., Fayyad, M. K., & Alawi, M. A. (2012). Separation of polyphenols from Jordanian olive oil mill wastewater. *Chromatography Research International*, 2012, 1-8.

¹⁵⁶ Cassano, A., Conidi, C., Galanakis, C. M., & Castro-Muñoz, R. (2016). Recovery of polyphenols from olive mill wastewaters by membrane operations. In *Membrane technologies for biorefining* (pp. 163-187).

126 sustancias químicas consideradas altamente tóxicas y designadas como contaminantes prioritarios¹⁵⁷. La EPA junto con la Unión Europea (UE) han categorizado al PCT como un contaminante ambiental y está incluido en las listas de contaminantes prioritarios a ser monitoreados en el medio acuático¹⁵⁸. Cabe destacar que el PCT muestra una toxicidad aún más acentuada en comparación con el fenol, al provocar modificaciones en la función de los eritrocitos a dosis tan bajas como 50 $\mu\text{g L}^{-1}$, en contraste con los 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ requeridos para el fenol¹⁵⁹. De manera concomitante, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha categorizado al PCT dentro del Grupo 2B, lo cual implica que existe una posibilidad sustancial de que pueda actuar como un agente carcinógeno en seres humanos¹⁶⁰. Por estas razones, resulta de gran importancia desarrollar métodos efectivos, sencillos y de costo accesible, para el análisis cuantitativo de PCT.

Por otro lado, también es prioritario el desarrollo de metodologías de remediación que permitan descontaminar muestras que contengan este contaminante. En este sentido, se han presentado diversos procesos tales como degradación biológica¹⁶¹,

¹⁵⁷ Shakir, K., Ghoneimy, H. F., Elkafrawy, A. F., Beheir, S. G., & Refaat, M. (2008). Removal of catechol from aqueous solutions by adsorption onto organophilic-bentonite. *Journal of hazardous materials*, 150(3), 765-773.

¹⁵⁸ Xie, T., Liu, Q., Shi, Y., & Liu, Q. (2006). Simultaneous determination of positional isomers of benzenediols by capillary zone electrophoresis with square wave amperometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1109(2), 317-321.

¹⁵⁹ Bukowska, B., & Kowalska, S. (2004). Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology letters*, 152(1), 73-84.

¹⁶⁰ Palanisamy, S., Thangavelu, K., Chen, S. M., Thirumalraj, B., & Liu, X. H. (2016). Preparation and characterization of gold nanoparticles decorated on graphene oxide@ polydopamine composite: application for sensitive and low potential detection of catechol. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233, 298-306.

¹⁶¹ Monisha, T. R., Ismail, M., Masarbo, R., Nayak, A. S., & Karegoudar, T. B. (2018). Degradation of cinnamic acid by a newly isolated bacterium *Stenotrophomonas* sp. TRMK2. *3 Biotech*, 8, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1390-0>

adsorción¹⁶², ozonización catalítica¹⁶³ y fotocátalisis¹⁶⁴, entre otros. Indudablemente, entre estas tecnologías, la adsorción mediante carbón activado se presenta como el método más preponderantemente empleado en la eliminación de PCT y otros contaminantes de naturaleza fenólica, particularmente cuando se trata de aguas que contienen niveles moderados o bajos de estos contaminantes. No obstante, es necesario resaltar que el empleo de carbón activado conlleva ciertas restricciones derivadas de su costosa implementación, limitándose en consecuencia a circunstancias particulares¹⁶⁵.

Por otro lado, el tratamiento fotocatalítico emerge como un destacado proceso de oxidación avanzada empleado en la actualidad en las unidades de tratamiento terciario, con el propósito de degradar una amplia variedad de compuestos orgánicos presentes en aguas residuales. Como se ha comentado anteriormente (Capítulo 1), este proceso se fundamenta en la utilización de radiación ultravioleta (UV) y catalizadores conformados por óxidos metálicos (semiconductores) para la generación del potente radical hidroxilo ($\text{OH}\bullet$)¹⁶⁶ ¹⁶⁷ el cual actúa como agente oxidante. Como resultado, los

¹⁶² Sun, Y., Yang, C., & Gu, Y. (2022). Adsorption of catechol on a weak-base anion exchanger prepared by a novel template-induced method: Batch tests. *Reactive and Functional Polymers*, 175, 105263.

¹⁶³ Kermani, M., Kakavandi, B., Farzadkia, M., Esrafil, A., Jokandan, S. F., & Shahsavani, A. (2018). Catalytic ozonation of high concentrations of catechol over $\text{TiO}_2@ \text{Fe}_3\text{O}_4$ magnetic core-shell nanocatalyst: optimization, toxicity and degradation pathway studies. *Journal of Cleaner Production*, 192, 597-607.

¹⁶⁴ Mandal, A., Ojha, K., De Asim, K., & Bhattacharjee, S. (2004). Removal of catechol from aqueous solution by advanced photo-oxidation process. *Chemical engineering journal*, 102(2), 203-208.

¹⁶⁵ Jain, A. K., Gupta, V. K., Jain, S., & Suhas. (2004). Removal of chlorophenols using industrial wastes. *Environmental science & technology*, 38(4), 1195-1200.

¹⁶⁶ El-Kemary, M., El-Shamy, H., & El-Mehasseb, I. (2010). Photocatalytic degradation of ciprofloxacin drug in water using ZnO nanoparticles. *Journal of Luminescence*, 130(12), 2327-2331.

¹⁶⁷ Kamani, H., Zehi, M. H., Panahi, A. H., Abdipour, H., & Miri, A. (2023). Sonocatalyst degradation of catechol from aqueous solution using magnesium oxide nanoparticles. <https://doi.org/10.30955/gnj.004550>

productos de reacción que se obtienen tras la mineralización del contaminante orgánico son dióxido de carbono y agua¹⁶⁸.

Por otro lado, dentro del ámbito de la nanotecnología, se han observado importantes avances en la producción de nanomateriales y sus aplicaciones prácticas en el ámbito del medio ambiente. En la última década, la investigación ha puesto un énfasis notable en las nanopartículas (NPs) con actividad fotocatalítica como una estrategia destacada para abordar la remediación de compuestos orgánicos persistentes altamente tóxicos y promover la gestión ecológica. Recientemente, se ha observado la exitosa aplicación de diversos materiales, como catalizadores metálicos¹⁶⁹, tanto naturales como sintéticos y de bajo costo. En este sentido, las nanopartículas de óxido de zinc (NPs-ZnO) se destacan como una de las alternativas más recurrentes para su aplicación como catalizador en reacciones fotocatalíticas¹⁷⁰. Entre sus principales ventajas, se destacan su capacidad de absorción de un amplio espectro de ondas electromagnéticas, su disponibilidad, bajo costo, ausencia de volatilidad y toxicidad, elevada capacidad de absorción y notable estabilidad química y reactividad^{171 172}. Además, dada su baja solubilidad en agua, es posible controlar la morfología superficial, ajustar el tamaño de las partículas y su

¹⁶⁸ Shiraz, A. D., Takdastan, A., & Borghei, S. M. (2018). Photo-Fenton like degradation of catechol using persulfate activated by UV and ferrous ions: Influencing operational parameters and feasibility studies. *Journal of Molecular Liquids*, 249, 463-469. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.11.045>

¹⁶⁹ Wang, C. C., Li, J. R., Lv, X. L., Zhang, Y. Q., & Guo, G. (2014). Photocatalytic organic pollutants degradation in metal-organic frameworks. *Energy & Environmental Science*, 7(9), 2831-2867. <https://doi.org/10.1039/C4EE01299B>

¹⁷⁰ Bazrafshan, E., Al-Musawi, T. J., Silva, M. F., Panahi, A. H., Havangi, M., & Mostafapur, F. K. (2019). Photocatalytic degradation of catechol using ZnO nanoparticles as catalyst: Optimizing the experimental parameters using the Box-Behnken statistical methodology and kinetic studies. *Microchemical Journal*, 147, 643-653. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.03.078>

¹⁷¹ Rana, S. B., Bhardwaj, V. K., Singh, S., Singh, A., & Kaur, N. (2014). Influence of surface modification by 2-aminothiophenol on optoelectronics properties of ZnO nanoparticles. *Journal of Experimental Nanoscience*, 9(9), 877-891. <https://doi.org/10.1080/17458080.2012.736640>

¹⁷² Kong, J. Z., Li, A. D., Zhai, H. F., Gong, Y. P., Li, H., & Wu, D. (2009). Preparation, characterization of the Ta-doped ZnO nanoparticles and their photocatalytic activity under visible-light illumination. *Journal of Solid State Chemistry*, 182(8), 2061-2067. <https://doi.org/10.1016/j.jssc.2009.03.022>

estructura cristalina¹⁷³. Las NPs-ZnO se han empleado como catalizadores en reacciones fotocatalíticas para la degradación de varios contaminantes tales como pesticidas¹⁷⁴, colorantes¹⁷⁵, clorofenoles¹⁷⁶, y diversos compuestos orgánicos¹⁷⁷, entre ellos PCT¹⁷⁰.

Por otro lado, se han implementado diversas técnicas analíticas para la detección de fenoles, incluido PCT, destacándose principalmente la cromatografía líquida¹⁷⁸, la electroquímica¹⁷⁹ y la fluorescencia¹⁸⁰. Sin embargo, si bien estas metodologías son capaces de lograr una detección precisa y en bajas concentraciones de PCT, su utilización involucra equipos costosos y procedimientos analíticos complejos.

La posibilidad de detectar compuestos fenólicos a través de enzimas ha demostrado ser una alternativa eficaz y con un alcance considerable¹⁸¹. Se han desarrollado

¹⁷³ Droepenu, E. K., Wee, B. S., Chin, S. F., Kok, K. Y., & Maligan, M. F. (2022). Zinc oxide nanoparticles synthesis methods and its effect on morphology: A review. *Biointerface Res. Appl. Chem*, 12, 4261-4292. <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.42614292>

¹⁷⁴ Khan, S. H., & Pathak, B. (2020). Zinc oxide based photocatalytic degradation of persistent pesticides: A comprehensive review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 13, 100290. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100290>

¹⁷⁵ Weldegebriael, G. K. (2020). Synthesis method, antibacterial and photocatalytic activity of ZnO nanoparticles for azo dyes in wastewater treatment: A review. *Inorganic Chemistry Communications*, 120, 108140. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.108140>

¹⁷⁶ Wang, D., Liu, H., Ma, Y., Qu, J., Guan, J., Lu, N., ... & Yuan, X. (2016). Recycling of hyper-accumulator: synthesis of ZnO nanoparticles and photocatalytic degradation for dichlorophenol. *Journal of Alloys and Compounds*, 680, 500-505. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.04.100>

¹⁷⁷ Hariharan, C. J. A. C. A. G. (2006). Photocatalytic degradation of organic contaminants in water by ZnO nanoparticles: Revisited. *Applied Catalysis A: General*, 304, 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.apcata.2006.02.020>

¹⁷⁸ Hai, X., Zhu, Y., Ma, L., Yang, Z., Li, X., Chen, M., ... & Wang, L. (2023). Determination of catechol in water with deep eutectic supramolecular solvents-assisted magnetic κ-carrageenan nanoparticles. *Chemosphere*, 338, 139508. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139508>

¹⁷⁹ Alshahrani, L. A., Liu, L., Sathishkumar, P., Nan, J., & Gu, F. L. (2018). Copper oxide and carbon nano-fragments modified glassy carbon electrode as selective electrochemical sensor for simultaneous determination of catechol and hydroquinone in real-life water samples. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 815, 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.03.004>

¹⁸⁰ Yuan, X., Wang, B., Yan, C., Lv, W., Ma, Q., Zheng, B., ... & Xiao, D. (2020). A rapid and simple strategy for discrimination and detection of catechol and hydroquinone by fluorescent silicon nanoparticles. *Microchemical Journal*, 158, 105263. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105263>

¹⁸¹ Gul, I., Hussain, A., Sami, A., Ahmad, Z., Naqvi, S. M. S., Ilyas, N., & Ahmad, M. S. (2017). Detection of phenolic compounds by colorimetric bioassay using crude polyphenol oxidase. *The Nucleus*, 54(2), 105-113.

estrategias para la detección de compuestos fenólicos mediante el empleo de diversas enzimas, tales como, lacasa¹⁸², peroxidasa¹⁸³ y tirosinasa¹⁸⁴.

Las tirosinasas y catecol oxidasas, ambas clasificadas como polifenol oxidasas (PFO), pertenecen a la familia de las proteínas de cobre tipo III. La principal diferencia entre ellas radica en que mientras que las tirosinasas catalizan la teohidroxilación y la oxidación de compuestos fenólicos, las catecol oxidasas carecen de actividad de hidroxilación (excepto auronas sintasas)¹⁸⁵, y sólo catalizan la oxidación de compuestos o-difenólicos a o-quinonas. Esta valiosa cualidad en términos de especificidad, así como eficiencia y sustentabilidad, han sido los principales focos de interés en metodologías enzimáticas¹⁸⁶. Por otro lado, los bioensayos que se fundamentan en enzimas resultan invaluable en ubicaciones remotas donde el acceso a laboratorios es limitado. No obstante, es importante destacar que existen reportes limitados sobre bioensayos portables para la detección de PCT¹⁸⁷.

¹⁸² Casero, E., Petit-Domínguez, M. D., Vázquez, L., Ramírez-Asperilla, I., Parra-Alfambra, A. M., Pariente, F., & Lorenzo, E. (2013). Laccase biosensors based on different enzyme immobilization strategies for phenolic compounds determination. *Talanta*, 115, 401-408. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.05.045>

¹⁸³ Yang, S., Li, Y., Jiang, X., Chen, Z., & Lin, X. (2006). Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 114(2), 774-780. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.07.035>

¹⁸⁴ Abd Manan, F. A., Hong, W. W., Abdullah, J., Yusof, N. A., & Ahmad, I. (2019). Nanocrystalline cellulose decorated quantum dots based tyrosinase biosensor for phenol determination. *Materials Science and Engineering: C*, 99, 37-46. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.082>

¹⁸⁵ Molitor, C., Mauracher, S. G., & Rompel, A. (2016). Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), E1806-E1815. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523575113>

¹⁸⁶ Jiang, X., Wang, M., Hou, L., & Lin, T. (2022). An ordered one-step colorimetric sensor for the selective determination of catechol based on the polyacrylic acid-coated cerium oxide with laccase-like activity. *New Journal of Chemistry*, 46(46), 22412-22418. <https://doi.org/10.1039/D2NJ04149A>

¹⁸⁷ Dabhade, A., Jayaraman, S., & Paramasivan, B. (2020). Colorimetric paper bioassay by horseradish peroxidase for the detection of catechol and resorcinol in aqueous samples. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 50(8), 849-856. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1760883>

En años recientes, se ha dirigido la investigación hacia el desarrollo de herramientas analíticas simples, económicas y portátiles¹⁸⁸. Desde este punto de vista, la detección colorimétrica de compuestos fenólicos es prometedora, ya que el analito y la imagen puede escanearse o grabarse con una cámara de teléfono para su transferencia a una computadora personal o portátil, permitiendo un análisis basado en software. La última generación de enfoques de detección con *smartphones* o teléfonos inteligentes, presenta ventajas sustanciales en comparación con las plataformas convencionales en términos de velocidad de prueba, control, costo reducido, facilidad de operación, gestión eficiente de datos y requisitos mínimos de equipo y participación del usuario. Estas tecnologías de detección con dispositivos móviles posibilita el desarrollo de robustas plataformas de laboratorio para diversas aplicaciones analíticas, que abarcan desde diagnósticos médicos y monitoreo ambiental ^{189 190}, hasta análisis de seguridad alimentaria¹⁹¹.

Existen diversos sistemas colorimétricos, tales como RGB (del inglés, *red, green and blue*), CMYK (del inglés, *cyan, magenta, yellow and key*), entre otros, por medio de los cuales cualquier color puede desglosarse matemáticamente como la suma de tres componentes linealmente independientes.

¹⁸⁸ Parolo, C., & Merkoçi, A. (2013). based nanobiosensors for diagnostics. *Chemical Society Reviews*, 42(2), 450-457. <https://doi.org/10.1039/C2CS35255A>

¹⁸⁹ Springer, V., Avila, F., & Avena, M. (2020). A simple strategy for methylene blue determination in human and veterinary dosage forms by digital imaging. *Journal of Analytical Chemistry*, 75, 958-964. <https://doi.org/10.1134/S1061934820070151>

¹⁹⁰ Nario, N. A., Vidal, E., Grünhut, M., & Domini, C.E. (2023). 3D-printed device for the kinetic determination of As (III) in groundwater samples by digital movie analysis. *Talanta*, 261, 124625. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124625>

¹⁹¹ Rateni, G., Dario, P., & Cavallo, F. (2017). Smartphone-based food diagnostic technologies: A review. *Sensors*, 17(6), 1453. <https://doi.org/10.3390/s17061453>

Los métodos de análisis mediante colorimetría digital son bastante variados, aunque generalmente comprenden dos etapas. Por un lado, el registro instrumental de las propiedades cromáticas de la radiación, ya sea reflejada, absorbida o emitida, el cual se lleva a cabo mediante un sistema analítico digital. Este sistema incluye un dispositivo de grabación digital (cámara digital, teléfono móvil, etc.), así como un sistema de iluminación de la muestra. Por otro lado, tenemos el procesamiento de las imágenes digitales el cual implica el uso de algoritmos específicos. Estos algoritmos pueden formar parte de editores gráficos disponibles comercialmente o haber sido desarrollados específicamente para la tarea y el dispositivo de grabación en cuestión. Durante el proceso matemático de una imagen digital, suele ser necesario definir el área de análisis, que puede ser un producto de reacción analítica coloreado inmovilizado o una solución coloreada. Esta selección puede realizarse de forma manual o mediante herramientas de programación que permitan distinguir el área de análisis del fondo. Posteriormente, utilizando la información recopilada sobre el color del área de análisis, se calcula un parámetro analítico que está vinculado a las características espectrales y la concentración del analito. A partir de este valor, se extrae información cualitativa o cuantitativa sobre la composición de la muestra mediante curva de calibración, reconocimiento de patrones o análisis de regresión múltiple¹⁹².

¹⁹² Ivanov, V. M., & Ol'ga, V. K. (2001). Chemical chromaticity: potential of the method, application areas and future prospects. *Russian Chemical Reviews*, 70(5), 357-372.
<https://doi.org/10.1070/RC2001v070n05ABEH000636>

4.2 Objetivo

Desarrollar un sistema en flujo para la fotodegradación de PCT en muestras de agua y ARA. Evaluar la eficiencia del proceso utilizando como catalizador NPs-ZnO y bajo diversas condiciones experimentales. Desarrollar un método colorimétrico basado en el empleo de la enzima PFO obtenida de una fuente natural y análisis de imágenes digitales para el monitoreo del proceso fotocatalítico.

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Reactivos y soluciones

Todas las soluciones se prepararon utilizando agua ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$) y se emplearon reactivos de grado analítico.

El PCT (1,2-dihidroxibenceno) fue obtenido de Merck (Alemania). A partir del mismo se preparó una solución $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ disolviendo $137,6 \text{ mg}$ de PCT en $25,00 \text{ mL}$ de solución reguladora de buffer fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=6,9$), la cual se utilizó para medir la actividad enzimática de la enzima PFO. A su vez, para la calibración, se preparó una solución patrón de PCT de 1000 mg L^{-1} , disolviendo $25,0 \text{ mg}$ de PCT en $25,00 \text{ mL}$ de agua ultrapura. Las soluciones de trabajo fueron preparadas por dilución apropiada de la solución patrón con agua. Luego, se ajustaron las soluciones de trabajo, al igual que las muestras a diferentes pHs de estudio ($\text{pH}=3,00$ y $\text{pH}=8,30$), con soluciones de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ y ácido clorhídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, las cuales fueron preparadas a partir de los respectivos reactivos (Anedra, Argentina).

La solución de buffer fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ se preparó mezclando $50,0 \text{ mL}$ de solución $0,066 \text{ mol L}^{-1}$ de KH_2PO_4 (Anedra, Argentina) y $50,0 \text{ mL}$ de solución $0,066 \text{ mol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 (Anedra, Argentina).

Una resina aniónica (Dowex, EEUU) fue utilizada para la obtención en el laboratorio de la enzima PFO. La enzima PFO comercial (EC 1.14.18.1) fue obtenida de Sigma-Aldrich (Alemania).

Las NPs-ZnO comerciales ($< 100 \text{ nm}$) fueron obtenidas de Merck (Alemania). Para el procedimiento cromatográfico se empleó metanol ultrapuro grado HPLC (UVE, Argentina).

4.3.2 Materiales y métodos

4.3.2.1 Determinación de PCT utilizando PFO e imágenes digitales

La cuantificación de PCT presente en las muestras analizadas durante el proceso fotocatalítico se realizó colorimétricamente utilizando un extracto natural conteniendo la enzima PFO, el cual se obtuvo a partir de batatas (*Ipomoea batatas*). Tal como se aprecia en la **Fig. 4.1**, la reacción de PCT (1,2-dihidroxibenceno) y la enzima PFO, en presencia de oxígeno da lugar a la formación de una ortoquinona (1,2-benzoquinona) y agua. Este producto es un compuesto coloreado, que presenta absorción en la región visible del espectro electromagnético¹⁹³. La detección colorimétrica se realizó mediante el análisis de imágenes digitales obtenidas con un teléfono móvil (*smartphone*).

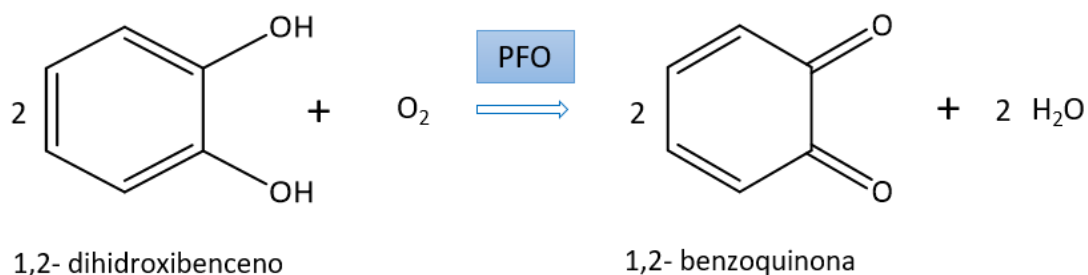


Fig. 4.1 Reacción de oxidación de PCT catalizada por la enzima PFO.

¹⁹³ Whitaker, J. R. (1995). Polyphenol oxidase. In Food enzymes: structure and mechanism (pp. 271-307). Boston, MA: Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-2349-6_9

4.3.2.1.1 Obtención del extracto natural

Las batatas fueron adquiridas de un comercio local de la ciudad de Bahía Blanca (Argentina). Las mismas fueron peladas y congeladas a -18°C hasta el momento de su utilización. Entonces, se trozó la batata en pequeños fragmentos, se pesaron 25,0 g y se agregaron 100,0 mL de solución buffer fosfato ($\text{pH}=6,9$). Se mezclaron los componentes con la ayuda de una minipimer de cocina (Ranser, Argentina). Una vez procesada la muestra, se adicionaron 2,50 g de resina aniónica y se agitó manualmente la mezcla durante 3 min empleando una varilla de vidrio. Todo el proceso se realizó a 4°C utilizando un baño de hielo. A continuación, la mezcla fue rápidamente filtrada utilizando un filtro de tela doble y centrifugada en una centrífuga marca ANNITA modelo ALC PK120 (EEUU) a 6000 rpm durante 30 min. Finalmente, se procedió a la separación del extracto (fase superior) mediante el uso de una pipeta pasteur. El mismo fue fraccionado en frascos de vidrio color ámbar y almacenado a -18°C hasta su utilización. La **Fig. 4.2** muestra un esquema del procedimiento de obtención de PFO junto con una imagen del extracto natural obtenido.

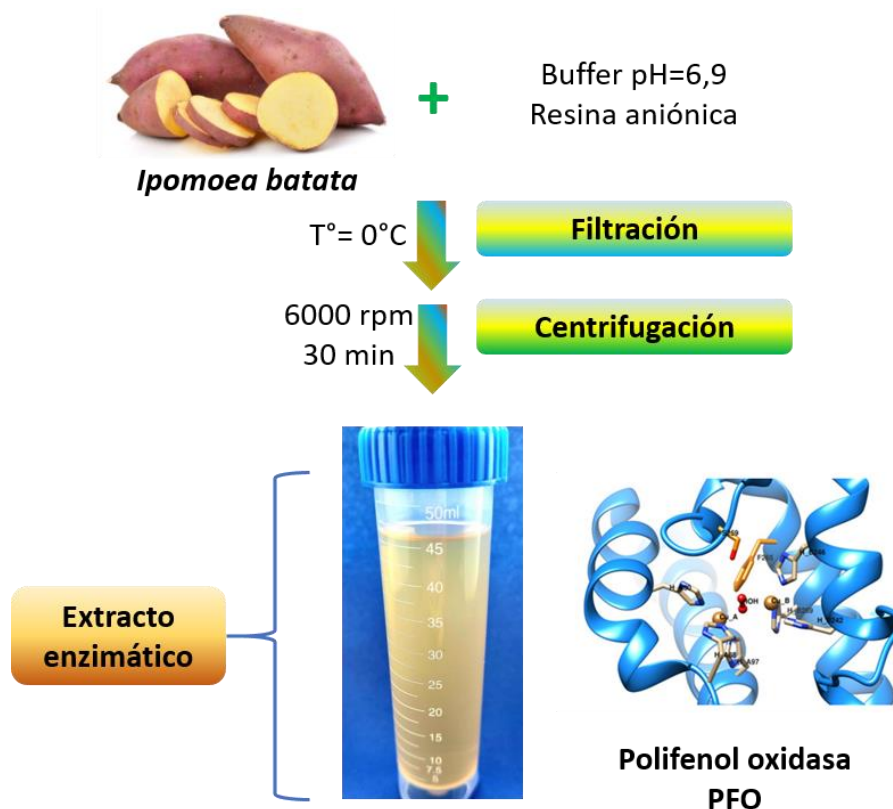


Fig. 4.2 Esquema del procedimiento de obtención de PFO a partir de batatas (*Ipomoea batatas*) e imagen del extracto final obtenido.

4.3.2.1.2 Determinación de la actividad enzimática en el extracto natural

Una vez obtenidos los extractos naturales se procedió a determinar en los mismos la actividad enzimática (AE) de PFO. Para ello, se colocaron en tubos de ensayo volúmenes desde 0,025 hasta 0,200 mL del extracto enzimático y se les adicionó 2,80 mL de una solución de PCT 0,05 mol L⁻¹ llevando a un volumen final de 5,0 mL con solución buffer fosfato (pH=6,9). Finalmente, se midió espectrofotométricamente la absorción de radiación a una longitud de onda de 487 nm de las o-quinonas generadas en la reacción catalizada por PFO utilizando un espectrofotómetro Biotraza modelo 722 (China), a 25°C

y a un tiempo de reacción de 1 min en cada caso¹⁹⁴. Se entiende por *unidad enzimática* (U_{ENZ}) de PFO a la cantidad de enzima que causa un incremento de 0,001 unidades de absorbancia por minuto en las condiciones descritas previamente.

4.3.2.1.3 Optimización de variables para la determinación enzimática de PCT

Diversas variables tales como temperatura, volumen de extracto enzimático (EE) y tiempo de reacción fueron optimizadas a fin de obtener un compromiso entre sensibilidad y reproducibilidad analítica en la determinación de PCT. En la **Tabla. 4.1** se muestran las variables y los rangos estudiados en cada caso. En el caso de la temperatura, para mantener la misma se utilizó un baño termostatzado Arcano modelo PS-10A (China).

Tabla 4.1 Parámetros estudiados en la optimización de la reacción enzimática de PFO sobre PCT.

Parámetro	Intervalo de estudio
Tiempo de reacción (min)	0-30
Temperatura de reacción (°C)	20-40
Volumen de EE (μl)	50-600
Volumen final (mL)	0-5,0

EE: extracto enzimático

¹⁹⁴ Grünhut, M., Palomeque, M. E., Lista, A. G., & Band, B. S. F. (2007). Enzymatic reverse FIA method for total phenols determination in urine samples. *Talanta*, 71(4), 1520-1523. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.07.032>

4.3.2.1.4 Cuantificación de PCT mediante imágenes digitales

La determinación de PCT se realizó en modo *off line* al final del tiempo de reacción ($t_f = 12,0$ min), utilizando un smartphone Samsung modelo Galaxy S21 FE al que se le acopló un soporte portacelda construido en ácido poliláctico (PLA) con una impresora 3D Creality modelo Ender 3 (China) que se ubicó en la zona de cámaras del dispositivo móvil (Fig 4.3). Entonces, se llenó una celda de poliestireno (2,5 mL) con 1,0 mL de muestra y se ubicó en el soporte portacelda. Se procedió a capturar las imágenes digitales empleando la cámara trasera gran angular con sensor de 12MP del smartphone. La celda estuvo retroiluminada con iluminación ambiente difusa. Los parámetros de captura de las imágenes digitales se detallan en la **Tabla 4.2**.

Tabla 4.2 Parámetros de captura de imágenes digitales del smartphone.

Parámetros de captura	Valor
Foco	centrado
Balance de blancos (WB)	5900 K
Medición	Ponderada al centro
Relación de aspecto	09:16
Retraso	2 s
Velocidad de captura	1/180
ISO	100
EV	2,0

ISO: organización internacional de estandarización (del inglés *international organization for standarization*); EV: valor de exposición (del inglés *exposition value*).

Posteriormente, se analizaron las imágenes adquiridas utilizando el software de código abierto Image J, midiendo los valores promedio de intensidad lumínica percibida en el espacio de color RGB a partir de una región de interés (ROI, del inglés *region of interest*) de 50x50 píxeles (2500 píxeles cuadrados) ubicada en el centro de la imagen, donde el color es uniforme. Además, a fin de validar la metodología propuesta, se realizaron mediciones espectrométricas a una longitud de onda de 278 nm utilizando un espectrofotómetro UV-Vis Agilent 8452 modelo Cary 60 (EEUU) y una celda de cuarzo Hellma (Alemania) de 1 cm de paso óptico. Estas mediciones se llevaron a cabo tanto en las soluciones estándar de PCT como en las muestras.

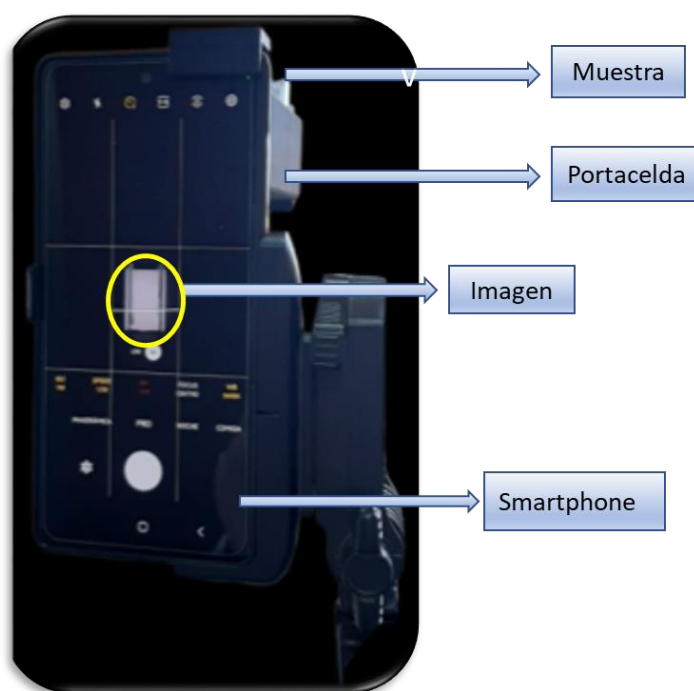


Fig. 4.3 Representación gráfica del dispositivo para la captura de imágenes digitales utilizado para la determinación de PCT.

4.3.2.2 Nano-fotocatálisis de PCT

La fotodegradación de PCT se realizó en un sistema de flujo y en presencia de NPs-ZnO como agente fotocatalítico. En primer lugar, se caracterizó el material nanoparticulado a fin de conocer sus propiedades fisicoquímicas y luego se desarrolló y optimizó un sistema de flujo para la nano-fotocatálisis de PCT.

4.3.2.2.1 Caracterización de las NPs-ZnO

Microscopía electrónica de transmisión. Según lo informado por el fabricante, las NPs utilizadas presentan un tamaño de partícula menor a 100 nm. Sin embargo, se consideró importante corroborar dicho parámetro y además analizar la morfología del material. Se obtuvieron micrografías mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM, del inglés *transmission electronic microscopy*) utilizando un microscopio JEOL 100 CX II (Japón) que operó a un voltaje de aceleración de 100 kV. La preparación de la muestra consistió en dispersar el material particulado en agua bidestilada, y la dispersión resultante se llevó a baño de ultrasonidos por 15 min. Una vez concluido el tiempo, unas gotas de la solución se colocaron sobre una grilla de cobre de 200 mesh provista de un film de Formvar, para su posterior observación. El procesamiento digital de las imágenes y la medición del tamaño de partícula se realizó mediante el software Fiji. La distribución de tamaños se realizó sobre las imágenes tomadas a una magnificación de 140.000X, y la misma se basó en una población total de 210 partículas contabilizadas.

Banda prohibida. La banda prohibida (en inglés, *bandgap*) es una banda que está presente en aislantes y semiconductores y representa la diferencia de energía entre la parte superior de la banda de valencia y la parte inferior de la banda de conducción. Entonces, el bandgap fue determinado en un espectrofotómetro UV-Vis Thermo Scientific modelo Evolution 220 (EE.UU.) con esfera integradora. Para ello, se colocaron las NPs-ZnO en el portamuestra cubriendo toda la superficie del mismo. El espectro se obtuvo en modo reflectancia, en las condiciones operacionales que se presentan en la

Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Parámetros operacionales para la obtención del espectro UV-Vis de NPs-ZnO

Parámetros	Valor
Rango λ (nm)	200-1100
Ancho de banda (nm)	1,0
Tiempo de integración (s)	0,05
Intervalo de datos (nm)	1,0
Velocidad de barrido (nm min ⁻¹)	1200

La energía de la banda prohibida (E_g) de las muestras se determinó mediante el ajuste de los datos de absorción en el espectro UV-Vis utilizando la relación de Tauc que se indica en la **Ec. 4.1**:

Ec. 4.1
$$\alpha h\nu = k(h\nu - E_g)^2$$

donde $h\nu$ es la energía del fotón, E_g es la banda prohibida directa, k es la constante independiente de la energía y α es el coeficiente de absorción óptica. Se graficó $(\alpha h\nu)^2$

en función de la energía del fotón. La energía de la banda prohibida se determinó dibujando la línea tangente en la curva cuando $\alpha = 0$ y fijando el punto que intercepta el eje X.

Movilidad electroforética. El potencial Z (ζ) es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción electrostática (o de carga) entre las partículas, y es uno de los parámetros fundamentales que se sabe que afectan la estabilidad. Para determinar dicho parámetro se utilizó un equipo Malvern Zetasizer Nano Series ZS90 (Reino Unido), equipado con un láser gaseoso HeNe, de longitud de onda $\lambda=663$ nm. Entonces, se preparó una dispersión acuosa de concentración $0,10$ mg NPs-ZnO mL⁻¹. Las medidas se realizaron a 25°C y entre pH=5,5 y pH=10,5.

4.3.2.2 Sistema de fotodegradación en flujo

El sistema en flujo estuvo conformado por un tubo fotorreactor de PTFE (0,5 mm d.i.; 5 m de longitud) con un volumen de 1,0 mL, el cual estuvo enrollado sobre una lámpara UVC de mercurio (Philips) de 15 W. Previo al ingreso al sistema, se adicionaron a la muestra conteniendo PCT, las NPs-ZnO en una relación 1,0 mg: 1,0 mL. Entonces, la mezcla se mantuvo bajo agitación constante mediante un agitador magnético Hanna modelo HI190M (EE.UU.), y se procedió a llenar el fotorreactor mediante una bomba peristáltica Gilson modelo Minupuls3 la cual operó a un caudal de $0,65$ mL min⁻¹. A continuación, se encendió la lámpara UV durante diferentes tiempos (0 a 60 min). Al cabo de cada período, la muestra fue recolectada en un tubo eppendorf para la posterior determinación de la concentración de PCT. La **Fig. 4.4** muestra un diagrama del sistema en flujo utilizado para la fotodegradación de PCT.

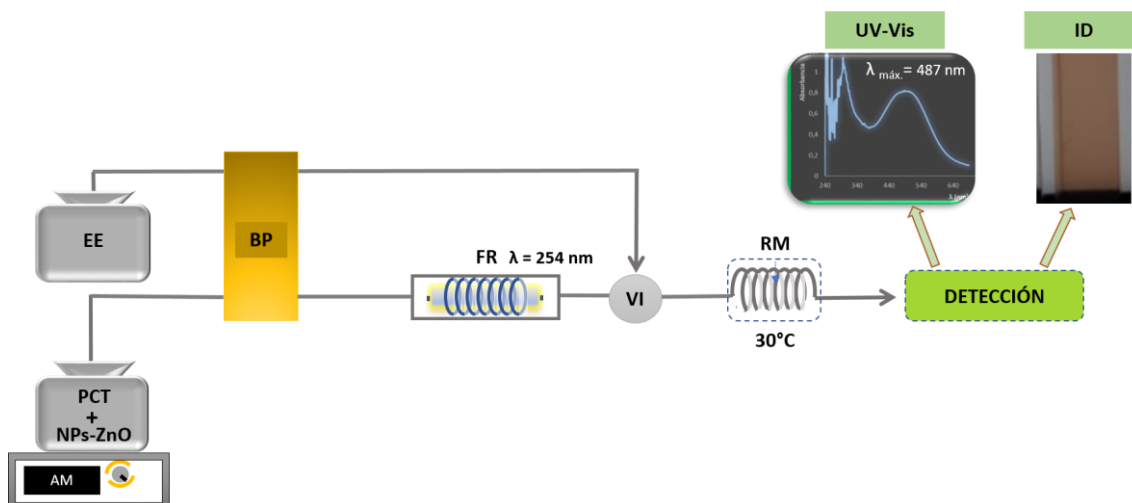


Fig. 4.4 Diagrama del sistema en flujo utilizado para la fotodegradación de muestras conteniendo PCT y su determinación mediante la reacción enzimática con PFO; AM: agitador magnético, PCT: solución de PCT; NPs: nanopartículas de ZnO; BP: bomba peristáltica; FR: fotorreactor; VI: válvula de inyección; EE: extracto enzimático; RM: reactor de mezclado; ID: detección por imágenes digitales; UV: detección por espectrometría UV-Vis.

4.3.2.2.3 Estudio de variables en el proceso de fotodegradación

La eficiencia del proceso de fotodegradación de PCT puede verse afectada por diversas variables, entre ellas pH, la concentración de fotocatalizador (NPs-ZnO) y el tiempo de reacción. En la **Tabla 4.4** se muestran los rangos estudiados para cada variable analizada.

Tabla. 4.4 Parámetros estudiados en el proceso de fotodegradación.

Parámetro	Intervalo de estudio
Tiempo de fotodegradación (min)	0-90
Cantidad de NPs-ZnO (mg)	0-50
pH	3,0-8,3

Entonces, la eficiencia del proceso de fotodegradación de PCT fue calculada como porcentaje ($D_{PCT}\%$) según la **Ec. 4.2**:

$$\text{Ec. 4.2} \quad D_{PCT}\% = \frac{(C_0 - C_t) \times 100}{C_0}$$

donde C_0 es la concentración de PCT inicial y C_t es la concentración de PCT luego del proceso de fotodegradación.

4.3.2.3 Determinación de carbono orgánico total

Se realizó la determinación de carbono orgánico total (TOC, del inglés *total organic carbon*) en una muestra conteniendo PCT (100 mg L^{-1}) luego de ser irradiada a distintos tiempos (5, 10, 15, 30 y 45 min), con el fin de constatar el grado de mineralización de PCT en las condiciones previamente establecidas. Para ello, se utilizó un analizador de carbono orgánico total Shimadzu modelo TOC-L (Japón). La muestra fue sometida a un pretratamiento que consta en la eliminación del carbono inorgánico (IC, del inglés *inorganic carbon*) por acidificación de la misma a $\text{pH}=3,0$ con HCl y posterior remoción del CO_2 generado, mediante burbujeo (sparging) con aire. Entonces, se cuantificó el TOC en la muestra, utilizando una curva de calibrado en un rango de concentraciones de NPOC (del inglés, *Non-Purgeable Organic Carbon*) entre $1,0\text{-}50,0 \text{ mg L}^{-1}$. El porcentaje de mineralización de PCT ($M_{PCT}\%$) en cada caso se calculó mediante la **Ec. 4.3**:

$$\text{Ec. 4.3} \quad M_{PCT}\% = \left(\frac{TOC_0 - TOC_t}{TOC_0} \right) \times 100$$

donde TOC_0 (mg L^{-1}) es el carbono orgánico total en la solución inicial y TOC_t (mg L^{-1}) es la concentración de TOC en el tiempo de reacción t .

4.3.2.4 Análisis cromatográfico

El monitoreo del proceso de fotodegradación de PCT bajo las condiciones establecidas se realizó también mediante HPLC a fin de corroborar la posible formación de productos de fotodegradación a distintos tiempos de exposición a la radiación UV (5, 10, 15, y 30 min). Para ello, se utilizó un cromatógrafo con detector UV-Vis Thermo Scientific modelo Ultimate 3000 (EEUU) equipado con una columna Zorbax Eclipse Plus C18 (partículas esféricas de 5,0 μm recubiertas con octadecilsilano, 150x4,6 mm) proporcionada por Agilent (EEUU). En la **Tabla 4.5** se presentan las condiciones de la corrida cromatográfica para la determinación de PCT mediante HPLC.

Tabla. 4.5. Parámetros de trabajo establecidos para realizar la determinación de PCT por HPLC.

Parámetros	Valor
λ detector (nm)	278
Solvente (%)	MeOH/H ₂ O (70:30)
Flujo (mL min⁻¹)	0,40
Temperatura de columna (°C)	30,0
Tiempo corrida (min)	13,0

4.3.2.5 Análisis de muestras

Se analizó una muestra de ARA obtenida del emprendimiento regional “Productos vegetales Pampa Verde” ubicado en la localidad de Coronel Dorrego, provincia de Buenos Aires, Argentina. Previo al proceso de fotodegradación, la muestra se filtró en

primer lugar utilizando un filtro de papel (Whatman) para separar el material sólido suspendido y luego con un filtro de jeringa de nylon de 0,45 μm de poro. Entonces, la muestra filtrada se almacenó a 4°C en una botella de vidrio color ámbar hasta el momento de su utilización.

4.4 Resultados y Discusión

4.4.1 Determinación enzimática de PCT

4.4.1.1. Extracto de PFO

Los extractos enzimáticos obtenidos presentaron una AE media de (1577 ± 35) UE mL⁻¹ calculado a partir de cinco extractos (n=5) obtenidos en diferentes días y a partir de diferentes batatas. Por otro lado, se determinó la AE de enzima PFO comercial pura obteniendo un valor de (1724 ± 22) UE mL⁻¹, resultando comparable con el extracto natural obtenido a partir de batatas.

En cuanto a la estabilidad de los extractos, se estudió la AE a lo largo del tiempo y bajo diferentes condiciones de conservación. Se comprobó que los extractos mantenían su AE durante 3 días luego de su obtención cuando eran preservados a 4°C y hasta 30 días cuando fueron conservados a -18°C.

4.4.1.2 Optimización del método enzimático

Como se mencionó en la sección 4.3.2.1.3, los valores óptimos para cada variable se seleccionaron en función de parámetros analíticos como sensibilidad y reproducibilidad analítica. De esta manera, se estableció como óptima una temperatura de reacción de

30°C, lo que se correlaciona según lo reportado por Rasmussen y col.¹⁹⁵, un volumen de 100 µL de extracto enzimático y un volumen final de reacción de 1000 µL. Además, a partir de un estudio cinético se pudo establecer el tiempo óptimo de reacción, el cual fue 12 min. Tal como puede observarse en la Fig. 4.5, aunque la señal de absorbancia medida a 487 nm se hace constante para soluciones con distinta concentración de PCT a un tiempo cercano a los 30 min, a un tiempo de 12 min se obtiene una apropiada señal de absorbancia, reduciendo así el tiempo de análisis.

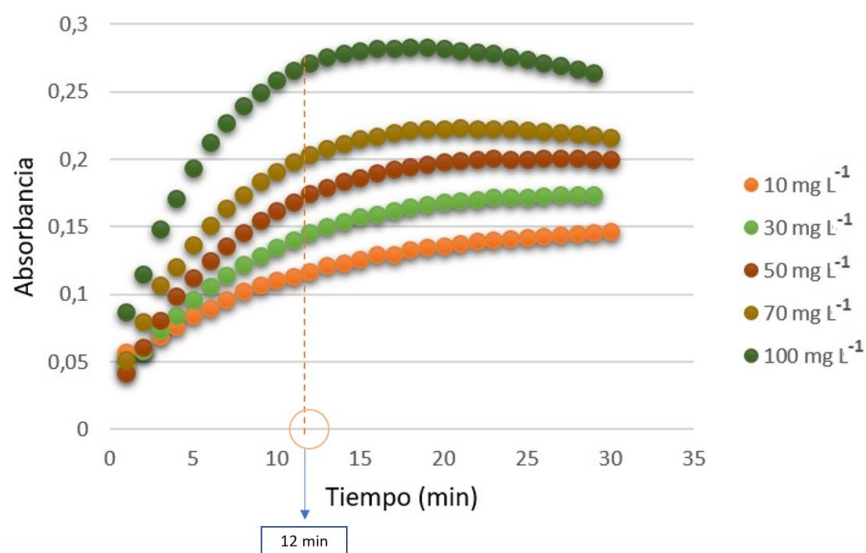


Fig. 4.5 Estudio de la variación de la señal analítica (A) en función del tiempo (min) para soluciones de PCT a distintas concentraciones (10 a 100 mg L⁻¹).

4.4.1.3. Determinación espectrofotométrica

En la Fig. 4.6 se muestran los espectros de absorción molecular obtenidos de una serie de testigos de PCT luego de su reacción con PFO bajo las condiciones óptimas. A

¹⁹⁵ Rasmussen, C. B., Enghild, J. J., & Scavenius, C. (2021). Identification of polyphenol oxidases in potato tuber (*Solanum tuberosum*) and purification and characterization of the major polyphenol oxidases. *Food Chemistry*, 365, 130454. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130454>

partir de los mismos se obtuvieron las señales de absorbancia a 487 nm y se construyó la correspondiente curva de calibrado (Fig. 4.7). Los parámetros analíticos del método espectrofotométrico (MEF) se presentan en la **Tabla 4.6**.

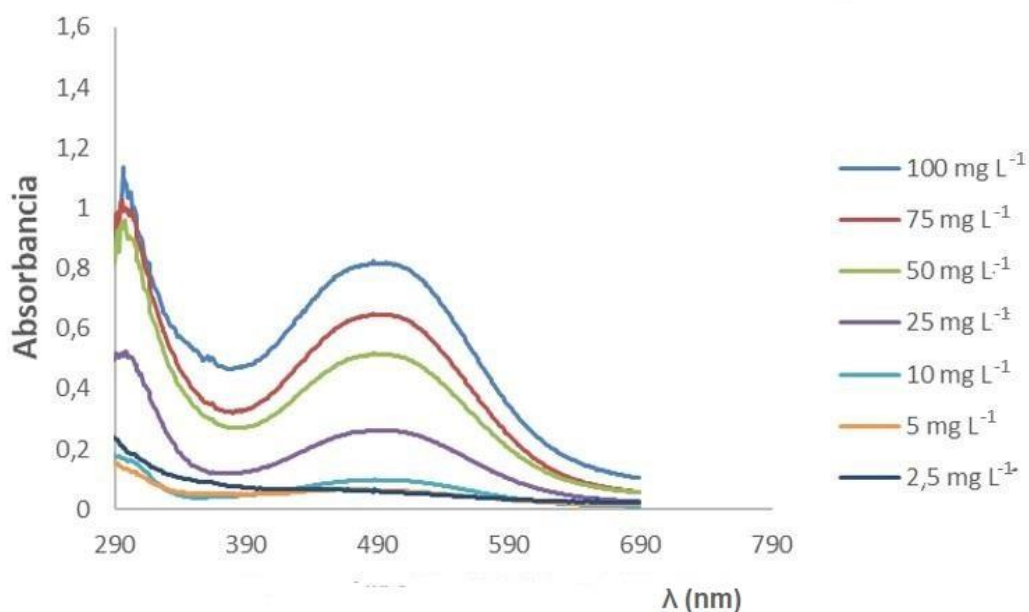


Fig. 4.6 Espectros de absorción molecular de soluciones testigo con distintas concentraciones de PCT luego de la reacción con PFO bajo las condiciones óptimas establecidas.

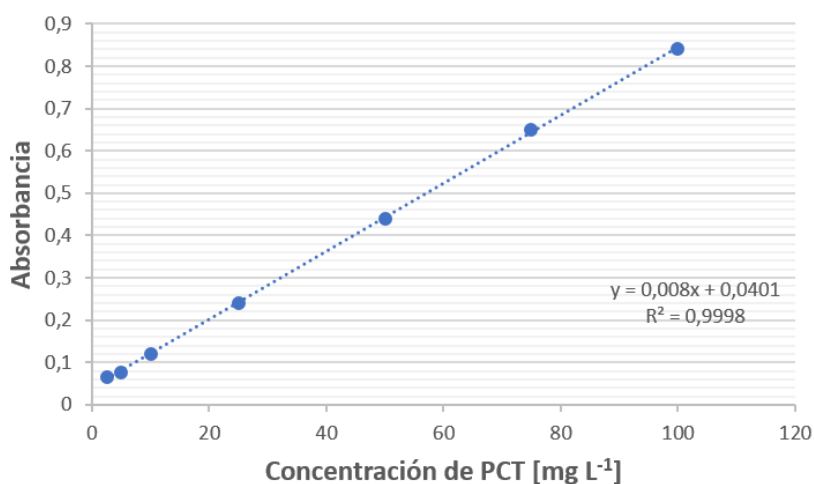


Fig. 4.7 Curva de calibrado de PCT obtenida mediante el método enzimático empleado.

4.4.1.4. Detección mediante imágenes digitales

En la Fig. 4.8 se muestran las regiones de interés (ROIs) obtenidas a partir de las imágenes digitales de las soluciones testigo de PCT en orden creciente de concentración de izquierda a derecha. En la parte superior, se observa la secuencia de ROIs en el espacio de color sRGB y, en la parte inferior, la misma secuencia en escala de grises GSV (del inglés, *grayscale value*), una escala de valores que relaciona únicamente la intensidad lumínica percibida (luminosidad o brillo) por el sensor de la cámara del smartphone. Los valores en esta escala fueron contrastados con la concentración de PCT para obtener así la curva de calibrado.

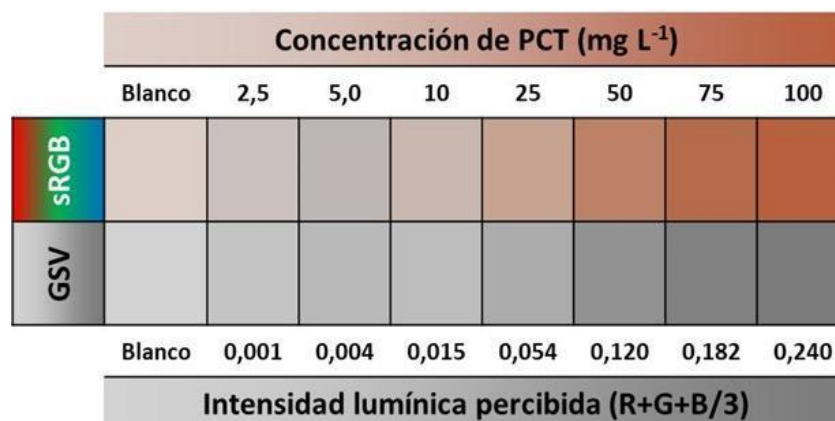


Fig. 4.8 Comparación entre los valores de intensidad lumínica percibida en cada uno de los canales del espacio de color sRGB y GSV.

En la Fig. 4.9 se puede observar la curva de calibrado y en la **Tabla 4.6** los parámetros analíticos del método por imágenes digitales. Como puede apreciarse, si bien el método

espectrofotométrico tiene una mayor sensibilidad analítica, el resto de los parámetros analíticos fueron aceptables en ambas metodologías.

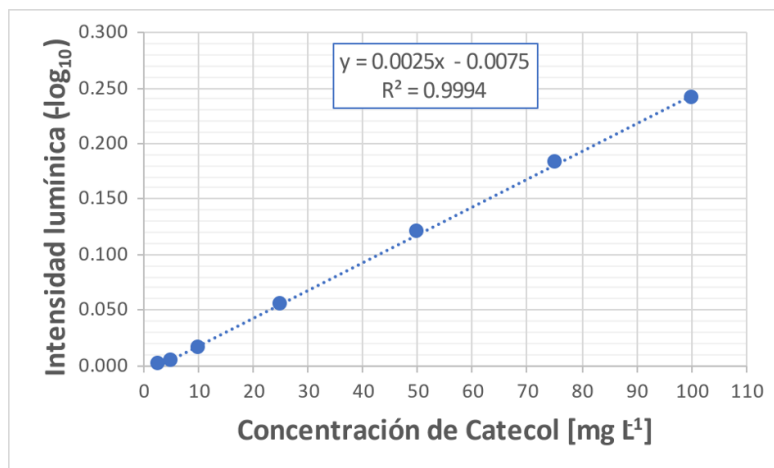


Fig. 4.9 Curva de calibrado para PCT obtenida mediante análisis por imágenes digitales.

Tabla 4.6 Parámetros analíticos correspondientes al método espectrofotométrico (MEF) y por imágenes digitales (ID).

	MEF	ID
Pendiente (L mg ⁻¹)	0,0082	0,0025
S pendiente (L mg ⁻¹)	0,0001	0,0002
Ordenada al origen	0,0389	0,0075
S ordenada	0,0030	0,0010
LOD (mg L ⁻¹)	1,207	1,320
LOQ (mg L ⁻¹)	3,650	4,000
Coficiente de determinación (R²)	0,9996	0,9994

4.4.2 Nano-fotocatálisis de PCT

4.4.2.1 Caracterización de NPs-ZnO

Microscopía electrónica de transmisión. En la Fig. 4.10 se muestra una micrografía correspondiente a una muestra de NPs-ZnO utilizadas para el estudio fotocatalítico. Como puede observarse, las partículas presentaron diversidad de formas y tamaños y una apariencia lisa. En el caso del tamaño, dado que se observó un alejamiento de la circularidad se consideró como descriptor para realizar la distribución de tamaño la longitud de cada partícula. La longitud media encontrada fue de 79,68 nm, con una longitud mínima de 16,69 nm y una máxima de 224,70 nm.

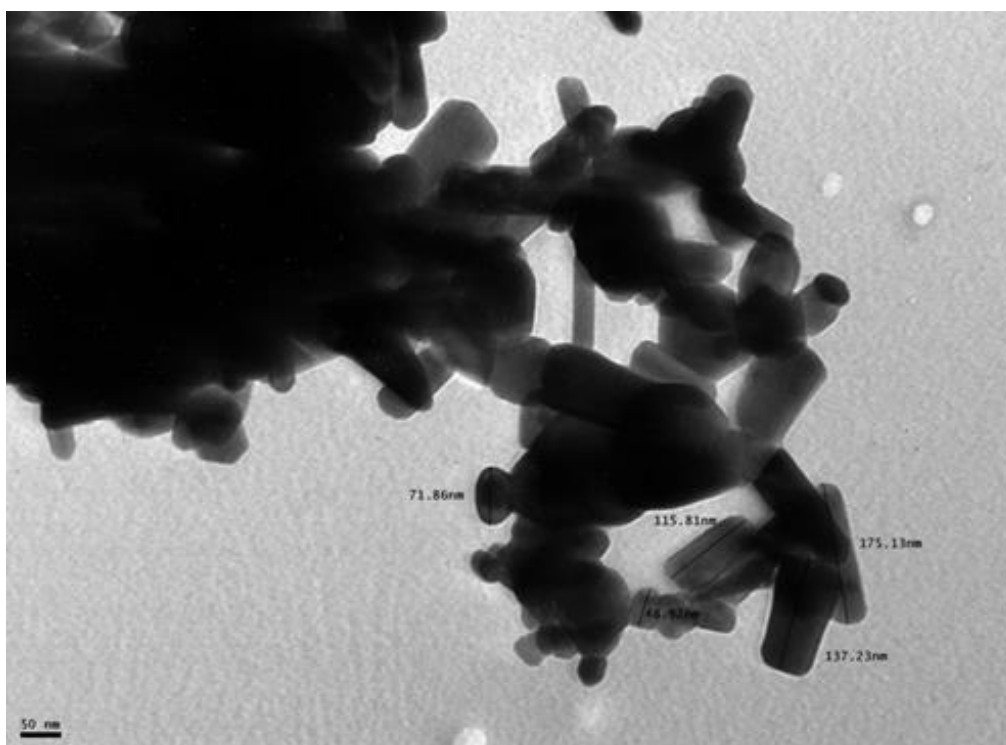


Fig. 4.10 Micrografía TEM de la muestra de NPs-ZnO estudiada con una amplificación de 140.000X.

En la **Fig. 4.11** se presenta el histograma correspondiente a las clases clasificadas por tamaño de partícula y las frecuencias encontradas en cada caso.

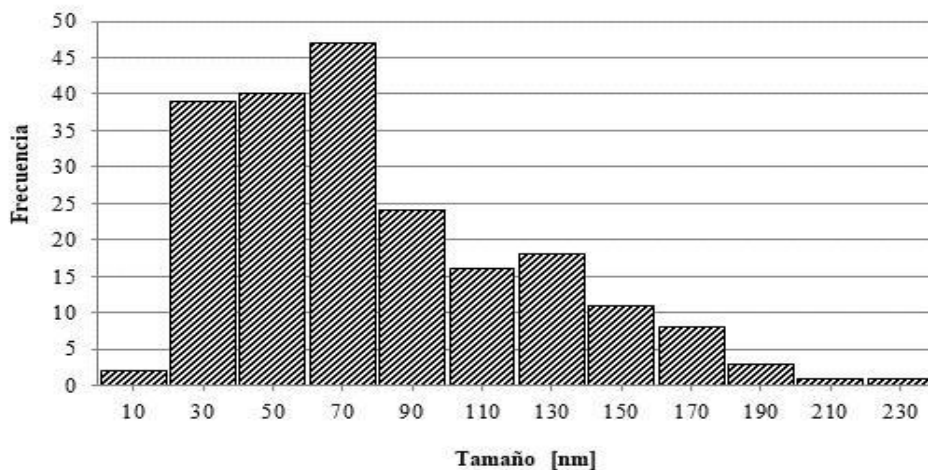


Fig. 4.11 Histograma de frecuencias de tamaño obtenido correspondiente a la muestra de NPs-ZnO analizadas por TEM.

Como puede observarse, la mayor cantidad de partículas contabilizadas corresponde a la clase 4, cuyos valores estuvieron entre 60,57 y 79,45 nm. De esta manera se pudo corroborar que las partículas de NPs-ZnO utilizadas presentaron un tamaño nanométrico y en el orden declarado por el fabricante (menor a 100 nm).

Asimismo, la imagen indicó que dichas nanopartículas exhiben una dispersión uniforme, lo que resulta en una baja tendencia a aglomerarse. Este hallazgo denota una respuesta favorable y una propiedad catalítica inherente a las NPs-ZnO.

Banda prohibida. En la **Fig. 4.12** se observa el espectro de absorción molecular correspondiente a las NPs-ZnO. El valor de bandgap calculado a partir de dicho espectro fue $E_g = 3,13$ eV el cual resultó muy próximo respecto del valor reportado

en literatura ($E_g = 3,3 \text{ eV}$)¹⁹⁶. Esta diferencia podría atribuirse al tamaño de las NPs-ZnO. Asimismo, es importante destacar que el material de síntesis y las condiciones experimentales pueden influir en los niveles de agregación y por ende generar diversas distribuciones de tamaño de las partículas lo que puede hacer variar su “bandgap”¹⁹⁷.

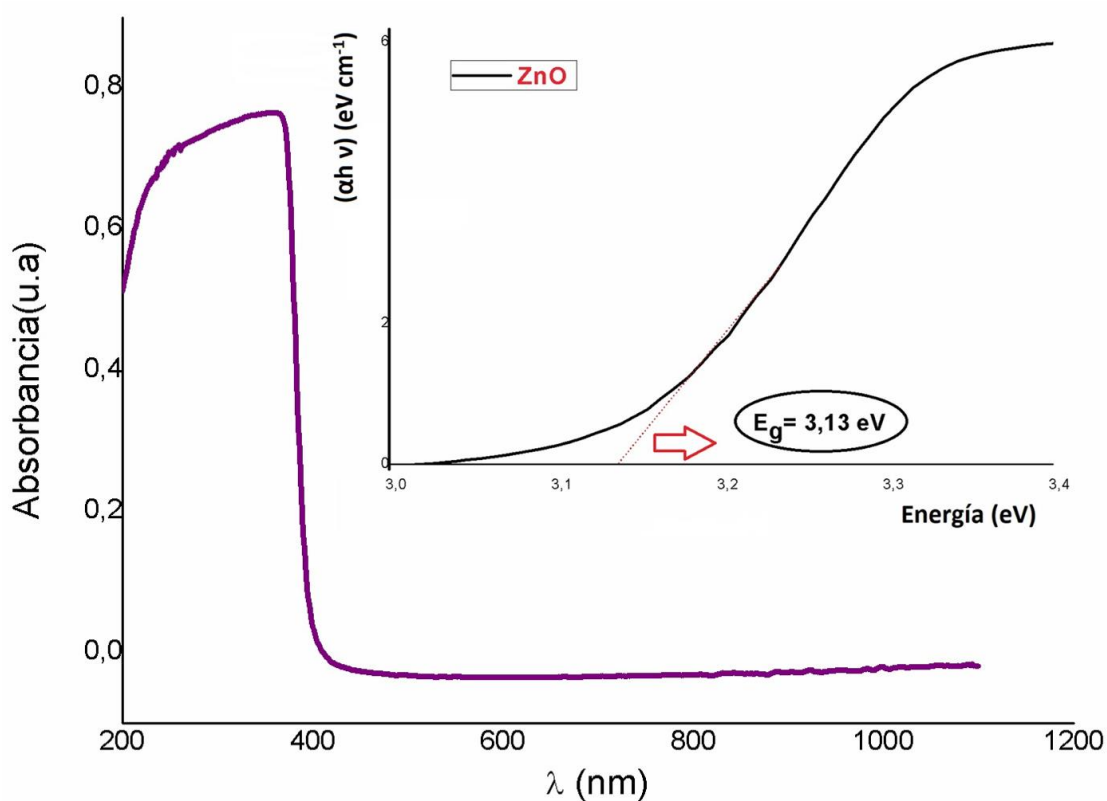


Fig. 4.12 Espectro de absorción molecular de NPs-ZnO. En la parte superior se observa el gráfico de $(\alpha h \nu)^2$ en función de la energía del fotón.

Movilidad electroforética. En la **Fig. 4.13** se muestra como varía el potencial Z de las NPs-ZnO en función del pH. Como puede observarse, en todo el rango de pH se

¹⁹⁶ Berger, L. I. (2020). *Semiconductor materials*. CRC press. <https://doi.org/10.1201/9780138739966>

¹⁹⁷ Mansur, H. S. (2010). Quantum dots and nanocomposites. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 2(2), 113-129. <https://doi.org/10.1002/wnan.78>

exhibe un valor de potencial Z negativo. En particular, se puede apreciar que a un pH=8,30 las NPs-ZnO exhiben una mayor estabilidad, ya que sistemas con valores de potencial Z superiores a -15 mV o 15 mV se consideran estables¹⁹⁸. A dicho pH las NPs-ZnO presentaron un $\zeta = -20,9$ mV, sugiriendo una adecuada estabilidad a temperatura ambiente debido a una efectiva repulsión entre las partículas¹⁹⁹.

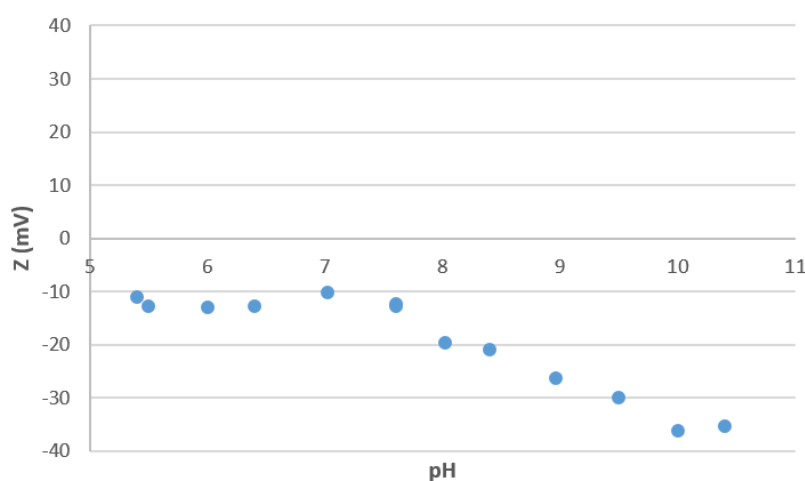


Fig. 4.13 Gráfico de potencial Z en función del pH para las NPs-ZnO utilizadas como fotocatalizador.

4.4.3. Sistema de fotodegradación en flujo

El sistema en flujo propuesto presentó la ventaja de poder realizar la fotodegradación de las muestras en línea, lo que representa una ventaja respecto de métodos en batch

¹⁹⁸ Patel, V. R., & Agrawal, Y. K. (2011). Nanosuspension: An approach to enhance solubility of drugs. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 2(2), 81–87. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.82950>

¹⁹⁹ Chaudhuri, S. K., & Malodia, L. (2017). Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using leaf extract of *Calotropis gigantea*: characterization and its evaluation on tree seedling growth in nursery stage. *Applied Nanoscience*, 7(8), 501-512. <https://doi.org/10.1007/s13204-017-0586-7>

publicados¹⁷⁰, ya que en este caso se puede realizar un tratamiento continuo de las muestras. El sistema propuesto presentó un caudal de tratamiento de muestra de 0,066 mL min⁻¹ para el tiempo de fotodegradación seleccionado (15 min). Además, la configuración conformada por el reactor enrollado en la lámpara permitió una óptima exposición de la muestra a la radiación UV, haciendo más eficiente el proceso. Esto puede resultar particularmente útil para el escalado a nivel de planta de tratamiento, donde podría tratarse eficientemente y de forma segura un flujo continuo de muestra, el cual podría aumentarse significativamente. Por otro lado, la presencia de un filtro de bajo costo, como es el caso de algodón, ubicado a la salida del fotorreactor permitió la recuperación del catalizador nanoparticulado.

4.4.4 Optimización del proceso de fotodegradación de PCT

En esta etapa se estudió el efecto del pH sobre la fotodegradación de PCT y posteriormente la actividad fotocatalítica de las NPs-ZnO en dicho proceso empleando en ambos casos el sistema de flujo propuesto.

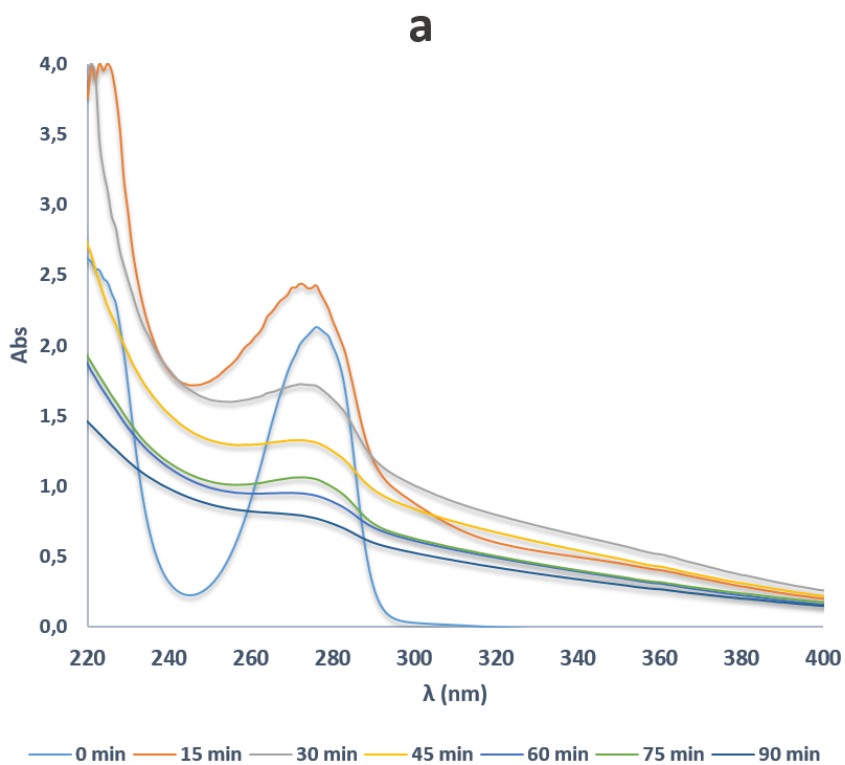
4.4.4.1 Efecto del pH

En la **Tabla 4.8** se muestran los porcentajes de fotodegradación ($D_{PCT}\%$) alcanzados para soluciones de PCT (100 mg L⁻¹) expuestas a la radiación UV a los dos niveles de pH estudiados (6,00 y 8,30). Como puede observarse, los valores de $D_{PCT}\%$ fueron mayores en un menor tiempo de exposición cuando el pH fue 8,30, por lo que se seleccionó este pH para posteriores estudios. En la **Fig. 4.14a** y **4.14b** se muestran los espectros registrados entre 220 y 400 nm a diferentes tiempos de fotodegradación (TFD). Cuando se analizó el comportamiento al máximo de absorción ($\lambda_{max}=278$ nm) se pudo percibir claramente que la tasa de fotodegradación es mayor al pH seleccionado. Incluso,

durante los primeros minutos, no se observaron cambios cuando se fotodegrada la muestra a pH 6,00.

Tabla 4.7 Resultados de los $D_{PCT}\%$ obtenidos a distintos valores de pH y durante diferentes TFD.

TFD (min)	0	5	10	15	30	45	60	75	90
pH = 6,00	-	-	-	0	20	36	43	51	64
pH = 8,30	-	35	42	42	59	78	79	81	80



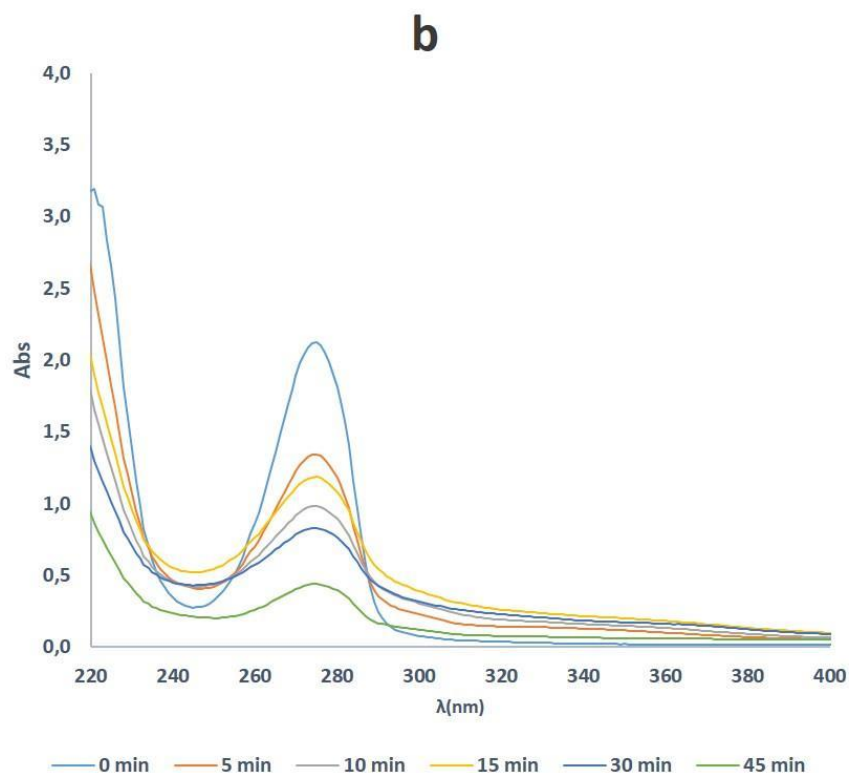


Fig. 4.14 Espectros de absorción molecular UV-Vis correspondientes a la fotodegradación de PCT durante distintos tiempos a pH=6,00 (a) y pH=8,30 (b).

4.4.4.2. Efecto de la presencia y concentración de NPs-ZnO

En primer lugar, se compararon los resultados obtenidos luego de realizar el proceso de fotodegradación con el agregado y sin el agregado de NPs-ZnO y al pH elegido previamente (8,30). Como puede observarse en la **Fig. 4.15**, la concentración de PCT se redujo en mayor proporción cuando la fotodegradación estuvo catalizada por NPs-ZnO en todo el intervalo de tiempo estudiado (60 min). En la **Tabla 4.9** se muestran los resultados en términos del $D_{PCT}\%$, y puede observarse que se alcanzó hasta un 96% de degradación de PCT en una solución de 100 mg L^{-1} luego de 45 min de exposición a la radiación UV y en presencia de NPs-ZnO. Por el contrario, al mismo tiempo de fotodegradación se alcanzó sólo un $D_{PCT}\%$ de 36%, lo que evidencia la importancia del

efecto catalítico de las NPs-ZnO. Entonces, se optimizó la concentración de NPs-ZnO adecuada para el proceso. Para ello, y basándonos en la bibliografía, se seleccionaron dos niveles: 0,25 g L⁻¹ y 1,00 g L⁻¹. La concentración más alta de catalizador (1,0 g L⁻¹) proporcionó los mejores D_{PCT}% y por este motivo se eligió como concentración de catalizador óptima en nuestro estudio.

Tabla 4.8 Resultados de los D_{PCT}% obtenidos con el agregado y sin el agregado de NPs-ZnO a diferentes TFD de una solución de PCT (100 mg L⁻¹).

TFD (min)	0	5	10	15	30	45	60
Sin NPs-ZnO	-	38	41	42	60	77	80
Con NPs-ZnO	-	33	62	88	90	96	96

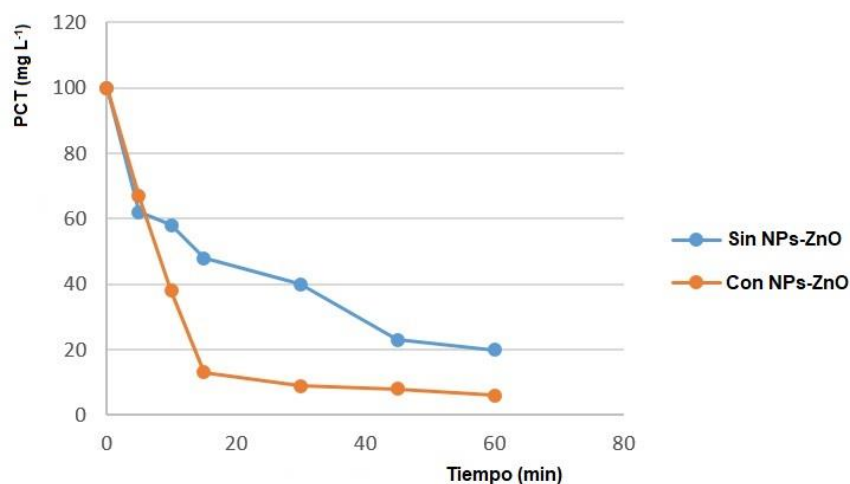


Fig. 4.15 Concentración de PCT remanente (mg L⁻¹) a diferentes TFD (pH=8,30) sin NPs-ZnO (curva azul) y con NPs-ZnO (curva roja).

4.4.5 Estudio de la eficiencia catalítica

4.4.5.1 Análisis de carbono orgánico total

Los valores de porcentaje de mineralización de PCT ($M_{PCT}\%$) a distintos TFD se muestran en la **Tabla 4.10**.

Tabla 4.9 Resultados de los $M_{PCT}\%$ obtenidos mediante el análisis de TOC a muestras sometidas a distintos tiempos de fotodegradación.

TFD (min)	$M_{PCT}\%$
5	40
10	62
15	$\geq 78\%$
30	$\geq 78\%$
45	$\geq 78\%$

Como se puede observar, a un TF de 10 min se obtuvo un $M_{PCT}\%$ de 62,0% lo que resultó altamente coincidente con el $D_{PCT}\%$ obtenido al mismo tiempo de exposición a la radiación UV (62,0%). Esto indica que el PCT fotodegradado a ese tiempo se transformó efectivamente en dióxido de carbono y agua. No obstante, no se pudo corroborar lo sucedido a tiempos mayores a los 10 min ya que los valores de concentración de PCT remanente estuvieron por debajo del límite de detección del método TOC.

4.4.5.2. Análisis por HPLC-UV

Mediante esta técnica separativa se intentó establecer la posible presencia de fotoproductos. La **Fig. 4.16** muestra el cromatograma obtenido luego de la inyección de una solución de PCT de 100 mg L^{-1} fotodegradada durante 5 y 15 min. Como se puede observar, el pico a un tiempo de retención de 7,91 min corresponde a PCT mientras que el pico a 10,2 min podría corresponder a productos intermedarios formados durante el proceso de fotodegradación. No obstante, se puede apreciar que dicho pico aparece sólo al tiempo inicial de fotodegradación de 5 min.

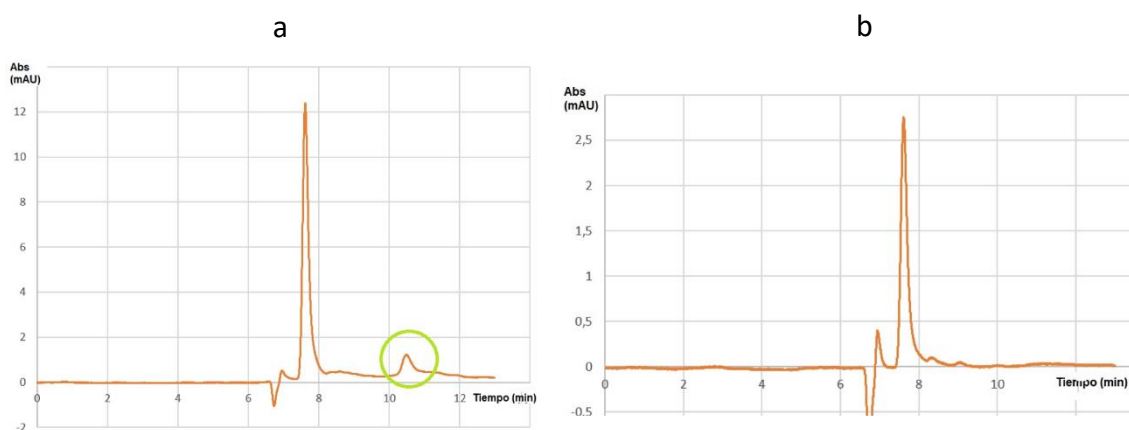


Fig. 4.16 Cromatogramas de PCT (100 mg L^{-1}), fotodegradado a. 5 min y b. 15 min

Aunque estos fotoproductos no pudieron ser caracterizados, según estudios publicados²⁰⁰ podemos asumir que el mecanismo de fotodegradación sería (**Fig. 4.17**):

²⁰⁰ Zhang, G., Dai, T., Meng, Y., Zhang, L., Yang, C., Pan, G., ... & Xia, S. (2020). Z-Scheme heterojunction ZnO-Au-ZnAl₂O₄: bridge-type hot carrier transfer and reaction kinetics in the photodegradation of catechol. *Applied Surface Science*, 532, 147456.

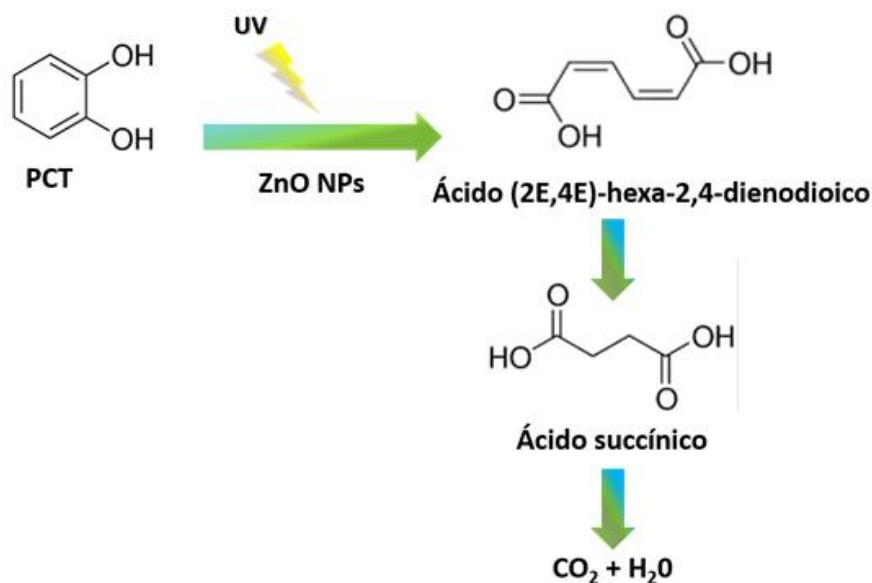


Fig. 4.17 Mecanismo de fotodegradación de PCT propuesto por Zhang. y col. en ref. 200

Sin embargo, la concentración de estos productos intermedios es muy baja respecto de la concentración de PCT, por lo que la determinación de esta especie es un parámetro óptimo para el monitoreo del proceso de fotodegradación.

4.4.6 Análisis de muestras

En primer lugar, se determinó la concentración original de PCT en la muestra de ARA analizada mediante el método enzimático con detección a 487 nm y mediante imágenes digitales. En ambos casos, no se encontró PCT en la muestra por lo que se procedió a realizar un agregado conocido a fin de evaluar la aplicabilidad de la metodología propuesta. Entonces, se procedió a realizar la fotodegradación de la muestra fortificada durante 15 min y se comprobó que el $D_{\text{PCT}}\%$ fue 89,0 lo que se aproxima a los valores

obtenidos para soluciones estándar de PCT, demostrando que la matriz de la muestra no afectó la eficiencia de fotodegradación en las condiciones establecidas y para el tipo de muestra analizada.

4.5 Conclusiones

Se desarrolló un eficiente sistema de flujo para la degradación de PCT contenido en aguas residuales provenientes de la producción olivícola. La eficiencia del proceso fotocatalítico fue optimizada y mejorada mediante el uso de un catalizador nanoparticulado basado en óxido de zinc. De esta manera, la fotodegradación catalizada con NPs-ZnO permitió una reducción en la concentración de PCT mayor al 89,0% en tan solo 15 min de exposición a la radiación UV y utilizando una concentración de 1 mg mL^{-1} catalizador. Además, el sistema de flujo permitió tratar de forma continua la muestra a una velocidad de $0,066 \text{ mL min}^{-1}$. Por otro lado, se logró poner a punto un método para el monitoreo de la fotodegradación utilizando un catalizador biológico de bajo costo y obtenido de una fuente natural, y un sistema de detección portátil y económico como es la detección por imágenes digitales.

Conclusiones generales

Se presentan a continuación las principales conclusiones de acuerdo a los resultados alcanzados durante la realización de los diversos trabajos de investigación descritos en esta tesis:

- Se desarrollaron exitosamente métodos analíticos de extracción y preconcentración de metales y contaminantes emergentes presentes en diversos cuerpos de agua, particularmente cromo y filtros químicos UV mediante la aplicación de las técnicas de microextracción en fase sólida y microextracción líquido-líquido.
- Se desarrolló una metodología en flujo para la remediación de muestras de residuos generados en la industria olivícola, de gran desarrollo en Bahía Blanca y la región utilizando nanopartículas de óxido de zinc. Además, fue posible optimizar un método de detección de pirocatecol basado en el uso de un catalizador biológico obtenido de una fuente natural e imágenes digitales, facilitando esto último y de manera significativa la portabilidad del método.
- En las investigaciones, se priorizó el desarrollo de sistemas miniaturizados, con el mayor grado de automatización posible, y el empleo de reactivos sostenibles, con el propósito de reducir la generación de residuos tóxicos, de manera tal de cumplir con los lineamientos propuestos por la Química Analítica Verde.
- Un aporte significativo de este trabajo de tesis fue el desarrollo y el estudio de las propiedades de nuevos materiales a escala nanométrica, como un nanomaterial híbrido basado en nanotubos de carbono y líquidos iónicos y una nanoemulsión compuesta por líquidos iónicos. Esto permitió reemplazar el uso de solventes orgánicos tóxicos, principalmente en la etapa de especiación y extracción.

- Además, se evaluó la capacidad fotocatalítica de un material nanoestructurado, y se demostró que su utilización en un sistema en flujo continuo permite reducir los tiempos de fotodegradación de un importante contaminante fenólico como el pirocatecol. Estos resultados permiten proyectar a futuro un escalado del sistema de remediación con el fin de poder tratar de manera eficiente un mayor volumen de desechos.
- Todos los métodos desarrollados presentaron óptimos parámetros analíticos y permitieron la determinación de los contaminantes analizados en concentraciones menores a los límites máximos establecidos por las normativas nacionales e internacionales vigentes.

Apéndice 1

Productividad

ARTÍCULOS PUBLICADOS

- “A soft material for chromium speciation in water samples using a chemiluminescence automatic system”. Cintia J. Fernandez, Claudia E. Domini, Marcos Grünhut, Adriana G. Lista, Chemosphere, 2018, 196, 361–367. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.12.178

ARTÍCULOS ENVIADOS PARA SU PUBLICACIÓN

- “Ionic liquids-based nanoemulsion for assisted by ultrasound liquid-liquid microextraction of UV-filters in water samples”. Cintia J. Fernandez, Natalia A. Gomez, Gerardo M. Oresti, Claudia E. Domini, Marcos Grünhut.

TRABAJOS PRESENTADOS EN CONGRESOS

PRESENTACIONES EN CONGRESOS NACIONALES

- ***XII Congreso Argentino de Química Analítica- 12 al 15 de septiembre de 2023- San Juan, Argentina.***

Presentación: Póster

Título: Extracción y preconcentración de filtros químicos solares en muestras de aguas empleando líquidos iónicos y surfactante

Autores: Cintia J. Fernandez, Natalia A. Gomez, Gerardo M. Oresti, Claudia E. Domini, Marcos Grünhut

- ***XII Congreso Argentino de Química Analítica- 12 al 15 de septiembre de 2023- San Juan, Argentina.***

Presentación: Póster

Título: Estudio de la fotodegradación en línea de catecol empleando nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) como catalizador. Monitoreo enzimático del proceso mediante detección por imágenes digitales

Autores: Cintia J. Fernandez, Francisco D. Ávila Orozco, Verónica L. Lassalle, Marcos Grünhut

- **XXI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados** – 09 al 11 de agosto de 2022 – Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Presentación: Póster Flash

Título: Monitoreo enzimático de la fotodegradación de catecol (1,2-dihidroxifenol) empleando nanopartículas de óxido de zinc (ZnO) como catalizador

Autores: C. J. Fernandez, B. Pérez Adassus, C.V. Speter, V. Lassalle, M. Grünhut

- **10° Congreso Argentino de Química Analítica** – 17 al 20 de septiembre de 2020 – Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

Presentación: Póster

Título: Nanopartículas magnéticas funcionalizadas con ácido oleico para la extracción preconcentración de salicilato de 2-etilhexilo y su determinación en aguas

Autores: C. J. Fernandez, M. Agotegaray, V. Lassalle, M. Grünhut

- **10° Congreso Argentino de Química Analítica** – 17 al 20 de septiembre de 2020 – Santa Rosa, La Pampa, Argentina.

Presentación: Póster

Título: Nanotubos de carbono funcionalizados con 3-aminopropil-trietoxisilano para la extracción-preconcentración de octil p-metoxicinamato

Autores: C. J. Fernandez, V. Volpe, D.S. Nascimento, M. Grünhut

- **9° Congreso Argentino Química Analítica** – 7 al 10 de Noviembre de 2017 – Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Presentación: Oral

Título: Especiación de cromo utilizando un material blando basado en la combinación de un líquido iónico con MWCNTs. Sistema de análisis flow-batch con detección quimioluminiscente.

Autores: Cintia J. Fernandez, C.E. Domini, M. Grünhut, Adriana G. Lista

- **8° Congreso Argentino Química Analítica** – Noviembre de 2015 – La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Presentación: Póster

Título: Especiación de cromo empleando una minicolumna rellena con nanotubos de carbono modificados con líquidos iónicos.

Autores: Cintia Fernandez, Mónica Alvarez, Adriana G. Lista

- **VII Congreso Argentino de Química Analítica** – 1 al 4 de Octubre de 2013 - Mendoza, Argentina.

Presentación: Póster

Título: Empleo de Nanotubos de Carbono y Líquido Iónico para Extraer y Preconcentrar Cr (VI).

Autores: Cintia Fernandez, Claudia E. Domini, Adriana G. Lista

PRESENTACIONES A CONGRESOS INTERNACIONALES

- **XXV Jornadas de Jóvenes Investigadores AUGM 2017** – 18 al 20 de octubre de 2017 – Encarnación, Paraguay.

Presentación: Oral

Título: Especiación de cromo utilizando un material blando basado en la combinación de un líquido iónico con MWCNTs. Sistema de análisis automático de flujo para la detección quimioluminiscente

Autores: Cintia J. Fernandez; Marcos Grünhut; Adriana G. Lista