



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTORADO EN QUÍMICA

Estrategias analíticas sostenibles para la determinación
de arsénico y metales en muestras ambientales y de
alimentos

Lic. Nicolás A. Nario

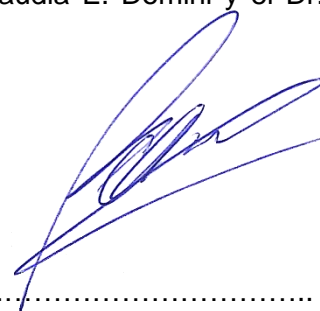
BAHÍA BLANCA

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 18 de septiembre del 2018 y el 31 de julio del 2024, bajo la dirección de la Dra. Claudia E. Domini y el Dr. Marcos Grünhut.



.....
Lic. Nicolás A. Nario



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

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

DEDICATORIA

A mi vieja que sé que siempre me está ayudando desde arriba.

AGRADECIMIENTOS

Trabajar de lo que a uno le gusta es algo muy muy especial. Tengo la suerte de que la investigación y la docencia se entrelacen desde hace ya bastante tiempo y me siento realmente afortunado de que así sea. Sin embargo, para que todo esto fluya de la mejor manera posible necesitamos un entorno que nos impulse a seguir adelante a pesar de todo. Es por esto que a continuación voy a agradecer a un montón de personas que me acompañaron durante este trayecto disculpándome de antemano si me olvido de alguien.

Papá, gracias por romperte el alma por no decir otra cosa para darme todo y estar siempre. Vos y mamá me criaron de la manera más prolija y soy lo que soy gracias a ustedes.

Mari, negra, trompis, sos la mejor hermanita que me pudiera haber tocado, una maravilla de persona y estoy agradecido de tenerte siempre.

Flor, mi compañera de vida. Nuestros caminos se cruzaron hace mucho y desde ese momento "siento en tu mirada el reflejo de mi vida". Soy muy afortunado de tenerte. Gracias por bancarme en absolutamente todas, siendo buenas o malas. Te amo hasta el cielo ida y vuelta.

Sandra y Coco, mi segunda familia. Gracias por quererme y preocuparse siempre. Jorge, sé que me seguís mandando fuerzas desde arriba. Se te extraña una banda.

A mis directores de tesis, Cali y Marcos. Primero que nada, gracias por haber aceptado dirigirme. Le cuento al que lea esto que ellos no sólo me guiaron por este largo y muchas veces sinuoso camino, sino que también se transformaron en personas muy importantes en mi vida. Marcos, además de charlar y matarnos de

risa de un montón de chistes muy malos, me incentivaste a volver al deporte que tan feliz me hizo de chico, el tenis, incluso haciendo de sparring y eso no me lo voy a olvidar nunca. Calita, es muy difícil poner en palabras lo que significás para mí. Me ayudaste y bancaste en todo sin nunca esperar nada a cambio. Estuviste siempre, en las buenas y lamentablemente en las muy malas también. No puedo pedir más de mi madre académica, va, en realidad sí, las empanadas de carne.

Carito, una compañera de docencia increíble con la que compartimos muchos momentos divertidos a pesar de que la he molestado mucho con miles de preguntas.

Nati LL, desde aquella primera vez que nos vimos en una materia me has ayudado siempre tanto en docencia como en la vida. Siempre dándome aliento para seguir adelante y acordándote de mí. Te aprecio mucho.

A los "adultos" de la ofi, Marian y Marcelito. Quimiométricos que siempre respondieron a todas mis dudas. Personas muy divertidas, que me han hecho reír mucho, y no saben lo que suenan las risas en la oficina.

A los "jóvenes" de la ofi, Pacho, Mai, Manu, Cin, Checho, personas con las que todos los días comparto almuerzo, momentos y anécdotas geniales que apuntamos para no olvidar.

Un grupo de compañeros de la uni que se transformaron en grandes amigos que hacen el aguante en todo momento, Anita, Claus, Nati, Dami, se los quiere un montón.

Un par de amigos que me dejó la uni con los que hemos compartido salidas, vacaciones y mucho más. Cintia y Lukitas los quiero mucho.

Mis amigos de la vida, "los cebollas": Paisa, Zurdo, Cari, Zopa, Pela, Popi, Papu, Pepe, Tití, Chupe. Con ellos me pasa algo rarísimo, nos juntamos y nos podemos reír absolutamente de cualquier cosa en todo momento sin hablar nunca de química.

También agradezco a un grupo de españoles que me han recibido con los brazos abiertos durante mi estancia en Alicante. Antonio, Miguel Ángel, Lorena, Montse, Andrea, Iván, Cristina, Carmen, Nacho, espero verlos pronto de nuevo.

Por último, agradezco a mi otra progenitora. Vieja, te fuiste antes de tiempo y pusiste mi vida en standby. No hay día que no te piense y te voy a extrañar siempre. Me encantaría poder abrazarte, pero me tengo que conformar con mirar hacia arriba y decirte: má lo logré, tu negrura va a ser doctor.

RESUMEN

La presencia de arsénico y metales en el agua, el suelo y los alimentos en concentraciones superiores a las recomendadas por organismos oficiales constituye una grave amenaza para el ambiente y la salud pública. Estos contaminantes, provenientes tanto de fuentes naturales como de actividades humanas, pueden acumularse y alcanzar concentraciones peligrosas, afectando directamente la calidad del agua potable, la fertilidad del suelo y la seguridad de los alimentos consumidos. La contaminación por arsénico y metales ha sido vinculada con diversas enfermedades crónicas y condiciones adversas para la salud, incluyendo cáncer y trastornos neurológicos. En este contexto, el desarrollo de métodos analíticos precisos y eficaces para la detección y cuantificación de estos elementos es fundamental.

Esta Tesis se dedicó al desarrollo de nuevos métodos analíticos para la extracción y determinación de arsénico y metales en muestras ambientales y alimentarias. En el primer estudio, se creó un dispositivo impreso en 3D para la determinación cinética de As(III) mediante el análisis de imágenes digitales. El método presentó límites de detección y cuantificación que se ajustan a los valores establecidos como máximos por la Organización Mundial de la Salud. Además, en sólo 15 minutos se pueden analizar 24 muestras y generando como resultado de la miniaturización del método sólo 300 microlitros de residuos por sitio de reacción. A su vez, el método propuesto se ajusta a los principios de la Química Analítica Sostenible resultando 1,7 veces más verde que otros trabajos publicados con similar detección.

El segundo estudio evaluó sistemas eutécticos naturales como extractantes de metales en un material de referencia certificado BCR[®]-701. La optimización del

método de extracción se llevó a cabo mediante un enfoque univariado, obteniendo resultados favorables con el uso de 16,5 mL de extractante y un 45% de agua, en un tiempo de extracción de solo 16 h, un tiempo mucho menor al requerido con el método oficial que fue de 53,5 h para el mismo número de muestras. El método propuesto resultó más rápido y ecológico, y demostró el potencial de los NADES en la preparación de muestras.

En el tercer estudio, se desarrolló un método de microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido para la determinación multielemental utilizando un sistema eutéctico profundo magnético (MDES). La metodología permitió la separación y preconcentración de 15 elementos (Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Ti, V, y Zn) a partir de muestras de aceite comestible previo a su determinación por ICP-OES. El empleo de pequeños volúmenes del extractante MDES (268 μ L) permitió la reducción de reactivos y residuos, y aumentó el carácter ecológico del método.

Los métodos analíticos desarrollados en esta Tesis Doctoral no solo se centraron en alcanzar parámetros analíticos óptimos para los analitos estudiados, sino que también propusieron alternativas respetuosas con el ambiente, mediante el uso de reactivos amigables con el ambiente y la reducción de residuos. En todos los casos, la evaluación de la sostenibilidad se realizó mediante el uso de la métrica AGREE a fin de poder cuantificar de manera más objetiva los criterios establecidos por la Química Analítica Sostenible.

ABSTRACT

The presence of arsenic and metals in water, soil and food at concentrations higher than those recommended by official organizations poses a serious threat to the environment and public health. These contaminants, from both natural sources and human activities, can accumulate to dangerous levels and directly affect the quality of drinking water, soil fertility and the safety of food consumed. Contamination by arsenic and other metals has been linked to several chronic diseases and adverse health effects, including cancer and neurological disorders. In this context, the development of accurate and efficient analytical methods for the detection and quantification of these elements is of vital importance.

This thesis was dedicated to the development of new analytical methods for extraction and determination of arsenic and metals in environmental and food samples. In the first study, a 3D printed device for the kinetic determination of As(III) by digital image analysis was developed. The method showed limits of detection and quantification that were according to the maximum levels set by the World Health Organization. In addition, 24 samples can be analyzed in only 15 minutes and, as a result of the miniaturization of the method, only 300 microlitres of residue were generated per reaction site. Furthermore, the proposed method is according to the principles of Green Analytical Chemistry and is 1.7 times more environmentally friendly than other published work with similar detection.

In the second study, a BCR[®]-701 certified reference material was used to evaluate natural eutectic systems as metal extractants. Optimization of the extraction method was carried out using a univariate approach and optimal results were obtained using 16.5 mL of extractant and 45% water, with an extraction time of only 16 h, much

shorter than the official method which required 53.5 h for the same number of samples. The sustainability of the proposed method was demonstrated by evaluation with the AGREE metric approach and comparison with the modified BCR[®] method. The proposed method is presented as a different, faster and more environmentally friendly alternative, highlighting the potential of using NADES in sample preparation.

In the third study, an ultrasound-assisted dispersive liquid-liquid microextraction method was developed for multi-elemental determination using a magnetic deep eutectic system (MDES). The methodology allowed the separation and preconcentration of 15 metals (Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Ti, V, and Zn) from edible oil samples prior to their determination by ICP-OES. The use of small volumes of MDES extractant (268 microliters) allowed the reduction of reagents and residues, and increased the environmental friendliness of the method.

The analytical methods developed in this thesis not only focused on achieving optimal analytical parameters for the studied analytes, but also proposed environmentally friendly alternatives through the use of environmentally friendly reagents and the reduction of waste. In all cases, in order to quantify more objectively the criteria established by Green Analytical Chemistry, the sustainability assessment was carried out using the AGREE metric.

INDICE GENERAL

Capítulo 1: Introducción	2
1.1 Determinación de arsénico y metales.....	3
1.1.1 Arsénico	3
1.1.2 Metales.....	6
1.2 Química Sostenible (Green Chemistry).....	13
1.2.1 Métricas en Química Sostenible.....	18
1.3 Referencias	22
Capítulo 2: Objetivos.....	33
Capítulo 3: Dispositivo impreso en 3D para la determinación cinética de As(III) en muestras de agua subterránea mediante análisis de imágenes digitales	35
3.1 Introducción.....	36
3.2 Materiales y métodos	43
3.2.1 Reactivos y soluciones.....	43
3.2.2 Aparatos y software.....	44
3.2.3 Condiciones de impresión 3D.....	45
3.2.4 Dispositivo impreso en 3D.....	45
3.2.5 Método de inhibición de la decoloración	46
3.2.6 Captura y procesamiento de imágenes.....	47
3.2.7 Procedimiento	49
3.2.8 Preparación de la muestra	51
3.3 Resultados y discusión.....	51
3.3.1 Optimización.....	51
3.3.2 Procesamiento de imagen.....	54
3.3.3 Performance analítica	57
3.3.4 Análisis de muestras reales.....	58
3.3.5 Validación.....	59
3.3.6 Ensayos de interferencia.....	61
3.3.7 Evaluación del verdor y comparación con otros métodos	62
3.4 Conclusiones parciales.....	64
3.5 Referencias	65
Capítulo 4: Evaluación de sistemas eutécticos naturales en material de referencia certificado de sedimento (BCR [®] -701).....	73
4.1 Introducción	74
4.2 Materiales y métodos	78

4.2.1	Reactivos y soluciones	78
4.2.2	Aparatos, instrumentación y software	78
4.2.3	Preparación de los NADES	80
4.2.4	Procedimiento de extracción secuencial BCR [®] modificado.....	80
4.2.5	Procedimiento de extracción propuesto	83
4.2.6	Optimización del proceso de extracción propuesto	84
4.3	Resultados y discusión.....	84
4.3.1	Caracterización de NADES preparados	84
4.3.2	Análisis de BCR [®] -701 mediante BCR [®] modificado	85
4.3.3	Optimización del método de extracción propuesto.....	87
4.3.4	Evaluación de la sostenibilidad y comparación con el método BCR [®] modificado	97
4.4	Conclusiones parciales.....	99
4.5	Referencias	100
Capítulo 5: Determinación de metales en aceites comestibles mediante ICP-OES empleando microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos con un sistema eutéctico profundo magnético hidrofílico.....		106
5.1	Introducción	107
5.2	Materiales y métodos	110
5.2.1	Reactivos y soluciones	110
5.2.2	Aparatos, instrumentación y software	111
5.2.3	Preparación del MDES	113
5.2.4	Estudios preliminares	113
5.2.5	Optimización del procedimiento de microextracción	114
5.2.6	Preparación de la muestra	119
5.2.7	Procedimiento de microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido (UA-DLLME).....	119
5.3	Resultados y discusión.....	120
5.3.1	Optimización del procedimiento UA-DLLME	120
5.3.2	Performance analítica	133
5.3.3	Análisis de muestras reales.....	135
5.3.4	Evaluación de la sostenibilidad del método propuesto.....	139
5.4	Conclusiones parciales.....	142
5.5	Referencias	143
Conclusiones.....		149
Apéndice I: Productividad.....		152
Artículos publicados		153

Presentaciones a congresos	153
Congresos Nacionales.....	153
Congresos Internacionales	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1.1 Fuentes de contaminación antropogénica de metales en aguas y suelos.....	7
Figura 1.2.1 Los doce principios de la Química Sostenible (el color naranja indica los principios más aplicables a la Química Analítica).....	16
Figura 1.2.2 Consecuencias analíticas de los doce principios de la Química Sostenible.	17
Figura 1.2.3 Métricas frecuentemente utilizadas para la evaluación de la sostenibilidad de un método analítico. NEMI: National Environmental Methods Index; AES: Analytical.Eco-Scale; GAPI: Green Analytical Procedure Index; EAT: Environmental Assessment Tool; AMVI: Analytical Method Volumen Intensity; AMGS: Analytical Method GREENness Score; AGREE: Analytical GREENness.	20
Figura 3.2.1 Detalles de los componentes del dispositivo impreso en 3D.....	46
Figura 3.2.2 Reacciones implicadas en el método propuesto donde X puede ser Cl o Br.....	47
Figura 3.2.3 En la parte superior, se muestra una imagen de los 24 sitios de reacción con diferentes concentraciones de As(III). En la parte inferior, se presenta la secuencia operativa como ejemplo para cinco sitios de reacción. Es importante señalar que las muestras A1 y A2 presentaron el mismo t_{in} aunque la solución de $KBrO_3$ se añadió a tiempos diferentes (0 y 3,5 s, respectivamente). Para una mejor comprensión, el eje temporal se graduó convenientemente para cubrir todo el tiempo de análisis (900 s).	50
Figura 3.3.1 Conversión del espacio de color RGB a YIQ para obtener la señal analítica "d" para una solución patrón de $75 \mu\text{g As(III) L}^{-1}$. Todos los ejes de abscisas se expresan como tiempo en segundos.....	55
Figura 3.3.2 Curva suavizada de la respuesta analítica "d" en función del tiempo y obtención del tiempo de inhibición de la reacción (t_{in}) para una solución patrón de $100 \mu\text{g As(III) L}^{-1}$	57
Figura 3.3.3 Región elíptica de confianza conjunta (EJCR) para las concentraciones de As(III) adicionadas y recuperadas por el método propuesto ($n = 48$). (●) Valor teórico de ordenada al origen y pendiente (0,1). (x) Valores obtenidos para la pendiente y la ordenada al origen.	61
Figura 3.3.4 Evaluación de diferentes cationes y aniones como posibles interferentes. Los valores t (dentro de las barras) se calcularon con 3 réplicas para ambas soluciones con los diferentes interferentes y la solución de control (solución de $100 \mu\text{g As(III) L}^{-1}$). El valor t crítico fue de 2,13 (g.l. = 4; $P = 0,05$).	62
Figura 3.3.5 Análisis comparativo utilizando la métrica AGREE para la determinación de arsénico mediante imágenes digitales. A: método propuesto. B: [41]. C: [42].....	63
Figura 4.2.1 Protocolo experimental del procedimiento de extracción secuencial BCR [®] modificado.....	82
Figura 4.3.1 Determinación de metales en mg kg^{-1} en BCR [®] -701 mediante método BCR [®] modificado.....	86

Figura 4.3.2	Procedimientos empleados en la etapa de elección de extractante. ...	87
Figura 4.3.3	Metales extraídos expresados en mg kg^{-1} mediante los 2 procedimientos (P1 y P2) por diferentes NADES.	90
Figura 4.3.4	Valores de extracción de metales expresados en mg kg^{-1} empleando diferentes porcentajes de agua durante el proceso de extracción.	92
Figura 4.3.5	Valores de extracción de metales expresados en mg kg^{-1} empleando diferentes volúmenes de LGH como extractante.	94
Figura 4.3.6	Valores de extracción de metales expresados en mg kg^{-1} empleando diferentes NADES ácidos.	97
Figura 4.3.7	Evaluación ecológica del método propuesto y del método BCR [®] modificado mediante la métrica AGREE.	99
Figura 5.2.1	Esquematización del procedimiento de extracción de los analitos en estudio.	120
Figura 5.3.1	Variación de la intensidad de señal en ICP-OES para cada metal ($n = 2$) de acuerdo con la técnica de extracción empleada. US: ultrasonido.	122
Figura 5.3.2	Gráficas de Pareto estandarizadas generadas en el estudio de cribado sobre los factores que influyen el método UA-DLLME.	129
Figura 5.3.3	Superficies de respuesta correspondientes al análisis CCD, demostrando la relación entre el volumen de muestra diluida y el volumen de MDES a una temperatura de $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ para cada analito evaluado. Las condiciones experimentales fueron: 1 min de tiempo de microextracción y una concentración de analitos de $50\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$	131
Figura 5.3.4	Gráficos adquiridos al aplicar la función de deseabilidad.	133
Figura 5.3.5	Evaluación de la sostenibilidad del método propuesto por el método AGREE.	140

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Optimización de los parámetros de captura de imagen. Los valores de RSD% se calcularon a partir de tres réplicas.	53
Tabla 2. Determinación de As(III) en muestras de agua subterránea aplicando el método propuesto.....	59
Tabla 3. Condiciones de trabajo y parámetros instrumentales del MIP-OES.	79
Tabla 4. Solventes eutécticos empleados en este estudio.	80
Tabla 5. Concentraciones certificadas (mg kg^{-1}) de 6 elementos traza en material de referencia certificado BCR [®] -701 extraídos mediante el protocolo de BCR [®] modificado de 3 pasos.....	83
Tabla 6. Solventes eutécticos empleados en este estudio.	84
Tabla 7. Propiedades fisicoquímicas de los solventes empleados.	85
Tabla 8. Fracciones determinadas al utilizar las condiciones óptimas del método propuesto.....	95
Tabla 9. Sistemas eutécticos ácidos empleados.	95
Tabla 10. Condiciones de trabajo y parámetros instrumentales del ICP-OES.	112
Tabla 11. Niveles de los factores correspondientes al FFD.	115
Tabla 12. Matriz experimental correspondiente al FFD.	116
Tabla 13. Niveles experimentales empleados en el CCD.	117
Tabla 14. Matriz experimental correspondiente al CCD.	118
Tabla 15. Valores óptimos de los factores volumen de muestra diluida, volumen de MDES y temperatura, para cada elemento analizado.	132
Tabla 16. Condiciones experimentales óptimas para el método UA-DLLME.	133
Tabla 17. Figuras de mérito del método propuesto.	134
Tabla 18. Valores de recuperación relativa obtenidos para las muestras adicionadas (25 y $100 \mu\text{g L}^{-1}$) y valores de las concentraciones encontradas ($\mu\text{g L}^{-1} \pm s^a$) en muestras diluidas de aceite comestible analizadas para la determinación de metales traza. ^a desviación estándar ($n = 3$).....	136
Tabla 19. Criterios de evaluación de la métrica AGREE.	

.....	140
Tabla 20. Informe sobre la sostenibilidad del método propuesto aplicando el método AGREE.....	141

ABREVIATURAS

3D: tres dimensiones

AAS: espectrometría de absorción atómica

AAv: promediado adyacente

AES: Eco Escala Analítica

AFS: espectroscopía de fluorescencia atómica

AGREE: Ecología Analítica

AMGS: Método Analítico de Puntuación Ecológica

AMVI: Método Analítico de Intensidad de Volumen

Arg-Gly: arginina:glicerol

BCR: Oficina Comunitaria de Referencia

CAA: Código Alimentario Argentino

CCD: diseño central compuesto

CE: electroforesis capilar

CGH: ácido cítrico:glucosa:agua

ChCl-Gly: cloruro de colina:glicerol

CRM: material de referencia certificado

DES: solvente eutéctico profundo

DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva

EAT: Herramienta de Evaluación Ambiental

EJCR: región elíptica de confianza conjunta

ET-AAS: espectrometría de absorción atómica electrotérmica

F1: fracción 1 (intercambiable)

F2: fracción 2 (reducible)

F3: fracción 3 (oxidable)

F4: fracción 4 (residual)

FDM: modelado por deposición fundida

FFD: diseño factorial completo

FHD: alta definición

g.l.: grados de libertad

GAC: Química Analítica Sostenible

GAPI: Índice de Procedimientos Analíticos Ecológicos

GC: cromatografía gaseosa

GlyL: glicerol:ácido láctico

HACRE: Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico
HBA: aceptor de enlaces de hidrógeno
HBD: donador de enlaces de hidrógeno
HG-AFS: espectroscopía de fluorescencia atómica por generación de hidruros
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución
IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer
iAs: arsénico inorgánico
ICP-AES: espectroscopía de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
ICP-MS: espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
ICP-OES: espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente
ISO: Organización Internacional de Estándares
IUPAC: Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
LED: diodo emisor de luz
LGH: ácido láctico:glucosa:agua
MDES: solvente eutéctico profundo magnético
MIP-OES: espectrometría de emisión óptica con plasma inducido por microondas
Mpx: megapíxeles
NADES: solvente eutéctico profundo natural
NEMI: Índice Nacional de Métodos Ambientales
OLS: mínimos cuadrados ordinarios
OMS: Organización Mundial de la Salud
P: probabilidad
P1: procedimiento 1
P2: procedimiento 2
PLA: ácido poliláctico
RGB: rojo, verde y azul
ROI: región de interés
RSD%: desviación estándar relativa porcentual
SERS: espectroscopía Raman de superficie aumentada
SLA: esterolitografía
SLS: sinterizado selectivo por láser
SM&T: Programa Europeo de Normas, Medidas y Ensayos
T: Tesla
UA-DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido
UGH: urea:glicerol:agua

US: ultrasonido

USEPA: Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

Capítulo 1: Introducción

1.1 Determinación de arsénico y metales

1.1.1 Arsénico

El arsénico es un metaloide que se encuentra de forma natural en la corteza terrestre y es uno de los contaminantes inorgánicos más tóxicos, presente fundamentalmente en agua subterránea, y detectado en una amplia escala de concentraciones en todo el mundo. La exposición de los seres humanos a este elemento ocurre a través del consumo de agua y alimentos contaminados [1]. La contaminación se puede dar tanto por la liberación de arsénico a suelos y acuíferos debido a procesos naturales como fenómenos volcánicos y desintegración de rocas, así como por actividades humanas como la minería, los procesos industriales, la fundición de metales, producción de pesticidas y preservantes de madera [1–3].

Es importante resaltar la significativa inquietud ambiental generada por la presencia de arsénico en el suministro de agua potable, una preocupación que, a primera vista, podría considerarse redundante. Sin embargo, hasta que no se logre el desarrollo de materiales y técnicas que permitan una remoción eficaz y una medición precisa de las diversas especies de arsénico, su persistencia sobre todo en el agua seguirá siendo un tema de relevancia indiscutible en los campos de la química, la medicina y las ciencias ambientales. El consumo de agua que contiene arsénico representa la causa principal de envenenamiento crónico por arsénico en seres humanos, lo cual constituye un problema de considerables dimensiones en áreas en las cuales la población depende del agua subterránea como fuente primaria de abastecimiento [4]. Este problema ejerce un impacto evidente en los ámbitos socio-sanitarios, ambientales y económicos de las regiones afectadas.

Es importante señalar que el arsénico inorgánico se encuentra de manera

natural en niveles elevados en las aguas subterráneas de varios países, incluyendo Argentina, Bangladesh, Chile, China, Hungría, India, Japón, México, Nueva Zelanda, Polonia, Estados Unidos y Vietnam [5]. Según estudios publicados recientemente, alrededor del 10% de la población en Argentina (equivalente a 4,5 millones de personas) se encuentra expuesta a contaminación por arsénico presente en agua utilizada para consumo, ya sea de red pública o de perforación [6]. La provincia de Buenos Aires es una de las zonas geográficas más afectadas, ya que en muchas regiones de la misma las concentraciones de arsénico se encuentran por encima del valor recomendado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la cual establece un límite de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ [7]. En Argentina los valores límites están en discusión ya que en 2007 el Código Alimentario Argentino (CAA) disminuyó de 50 a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ los niveles de arsénico para agua de consumo, pero en 2012 se anuló la modificación anterior ya que se indicó que dicho cambio debía sustentarse en un estudio epidemiológico.

Por otro lado, la utilización de aguas subterráneas o de pozo contaminadas para el riego de cultivos en áreas agrícolas eleva la concentración de arsénico en suelos y por ende en los alimentos [8].

De esta forma, el consumo de arsénico a través del agua o de los alimentos en cantidades superiores a las recomendadas a lo largo del tiempo puede conducir a la arsenicosis o Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico (HACRE) el cual ya fue descrito a principios del siglo XX en Argentina [9]. Dicha exposición se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas que progresan hacia el deterioro de la función hepática, renal y respiratoria, además de presentar efectos carcinogénicos (cáncer de piel, pulmón, riñón, vejiga, entre otros) [10–12]. Por ello, la USEPA (del inglés,

United States Environmental Protection Agency) clasifica al arsénico como agente carcinogénico en el grupo “A” [13]. A su vez, la IARC (del inglés, *International Agency for Research on Cancer*) incluye a este elemento dentro del grupo “I” [2]. También la exposición crónica a arsénico está directamente relacionada con enfermedades neurológicas y cardiovasculares [14].

Por lo tanto, el análisis de este elemento en muestras de agua, suelo y alimentos es de trascendental importancia, sobre todo en la provincia de Buenos Aires donde vive un tercio de la población del país. Más precisamente, el partido de Bahía Blanca y zonas aledañas (Médanos y Tornquist) se encuentran afectadas por esta problemática. El monitoreo de dichas regiones es un factor clave para implementar programas de prevención y tratamiento de las muestras. Para ello, es necesario contar con métodos analíticos confiables que tengan la capacidad de detectar y cuantificar arsénico a nivel de lo exigido por normas nacionales e internacionales. En este sentido, algunos de los enfoques de cuantificación para la determinación de arsénico han sido la espectrometría de emisión óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES, del inglés *inductively coupled plasma-optical emission spectrometry*) [15,16], la espectroscopía Raman de superficie aumentada (SERS, del inglés *surface-enhanced Raman spectroscopy*) [17,18], la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, del inglés *inductively coupled plasma-mass spectrometry*) [19,20], espectroscopía de fluorescencia atómica por generación de hidruros (HG-AFS, del inglés *hydride generation-atomic fluorescence spectrometry*) [21,22], espectrometría de absorción atómica electrotérmica (ET-AAS, del inglés *electrothermal-atomic absorption spectroscopy*) [23,24], voltamperometría [25,26], espectrofotometría [27,28] y colorimetría [29,30].

1.1.2 Metales

Las actividades humanas como la agricultura, la industria y las actividades domésticas, liberan grandes cantidades de metales en aguas superficiales y subterráneas, suelos y en la biosfera (Fig. 1.1.1) [31].

Los fertilizantes inorgánicos y orgánicos, el estiércol, las cales, los pesticidas, etc., utilizados en la agricultura contienen cantidades variables de Cr, Cd, Ni, Zn, Pb y otros metales [32]. De manera similar, la mayoría de los pesticidas químicos comúnmente utilizados, como la mezcla de Burdeos y el arsenato de plomo, contienen Cu, Hg, Mn, Pb o Zn. Aparte de estos, el uso de aguas residuales municipales e industriales para el riego también es una fuente predominante de metales en el suelo. Además, los procesos industriales como la minería, la fundición y el procesamiento de metales generan principalmente Cr y Ni [33], mientras que el V, Ti y Mn provienen principalmente de actividades relacionadas con el petróleo y el carbón [34]. La minería de carbón también libera niveles significativos de As, Cd y Fe, mientras que la minería de oro aumenta el nivel de Hg en el ambiente [35]. En general, los metales que estén presentes en forma de partículas y vapor pueden combinarse con el agua de la atmósfera, formando aerosoles. Los aerosoles pueden ser esparcidos por el viento (deposición en seco) o precipitados en la lluvia (deposición en húmedo), y causan contaminación de suelos y cuerpos de agua [36]. Además, la combustión de carbón y petróleo, así como las centrales nucleares, liberan metales como Se, Cd, B, Cu, Cs, Zn y Ni a la atmósfera. El procesamiento de plásticos, microelectrónica, preservación de madera, textiles y procesamiento de papel también provoca toxicidad por metales en el ambiente [37]. Finalmente, los efluentes domésticos constituyen la principal fuente de contaminación por metales en los cuerpos de agua. Los efluentes domésticos pueden incluir sustancias de

aguas residuales no tratadas que pasan a través de los filtros en plantas de tratamiento biológico, así como sustancias de desecho que se eliminan por los desagües de alcantarillado. La mayoría de los detergentes enzimáticos ampliamente utilizados contienen trazas de elementos como Fe, Cr, Mn, Zn, Co, Sr y B, contribuyendo así a la contaminación por metales.

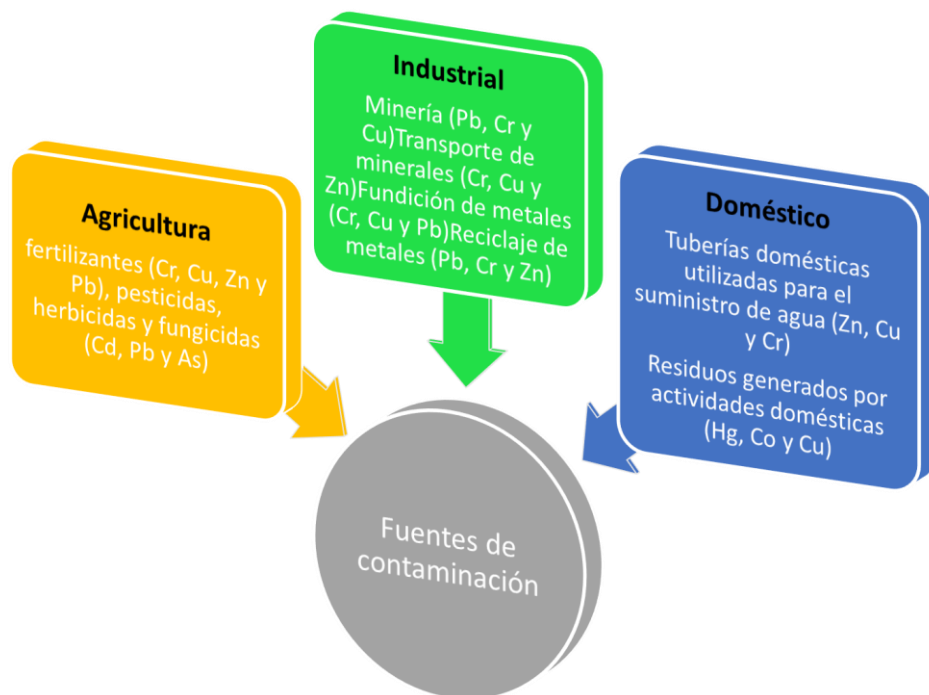


Figura 1.1.1 Fuentes de contaminación antropogénica de metales en aguas y suelos.

Por otro lado, la acumulación de metales en plantas cultivadas es una gran preocupación debido a la probabilidad de contaminación de los alimentos a través de la raíz que está en contacto con el suelo. Por esta razón, la contaminación por metales resulta de gran interés debido a su toxicidad, que amenaza tanto la vida humana como al ambiente. Los altos niveles de metales en sedimentos, lodos,

suelos y, a través de procesos de transferencia, en aguas subterráneas y plantas, pueden tener efectos negativos en la salud de los animales y de los seres humanos.

Aunque ciertos metales como Cd, Pb y Ni no son esenciales para el crecimiento de las plantas, pueden ser absorbidos y acumulados por las mismas en formas tóxicas cuando se emplean aguas contaminadas para el riego o bien se cultivan en suelos contaminados. La concentración de metales en la solución del suelo juega un papel importante en el control de la biodisponibilidad de los metales para las plantas. La mayoría de los estudios muestran que el uso de aguas residuales contaminadas con metales para riego durante largos períodos de tiempo aumenta el contenido de los mismos en los suelos por encima del límite permisible. En última instancia, el aumento del contenido de metales en el suelo también incrementa la absorción de metales por las plantas, dependiendo del tipo de suelo, las etapas de crecimiento de las plantas y las especies vegetales [38]. La ingestión de estos vegetales o bien de productos alimenticios derivados de ellos, como pueden ser los aceites, representan un potencial riesgo para la salud humana.

Los métodos más comunes utilizados actualmente para la determinación de metales en muestras ambientales y alimentos implican técnicas espectrométricas altamente sensibles, como la espectroscopía de emisión atómica y la espectrometría masas, ambas con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES e ICP-MS). Estas técnicas generalmente requieren la destrucción de la matriz de la muestra para obtener una solución del analito lista para el análisis. Las técnicas de digestión de muestras, como la digestión por microondas y la digestión ácida húmeda convencional para la determinación total de metales, se han utilizado ampliamente para la disolución de elementos [39]. Estas técnicas de digestión

requieren el uso de ácidos concentrados y altas temperaturas, y a menudo altas presiones, para lograr la disolución total de los elementos a partir de muestras sólidas [40].

1.1.2.1 Metales en sedimentos

Los metales que se incorporan al ambiente acuático, provenientes de fuentes atmosféricas o terrestres, se fraccionan entre varios compartimientos: una porción está unida a ligandos orgánicos e inorgánicos disueltos en solución mientras que otra fracción permanece asociada con material particulado siguiendo reacciones de adsorción, precipitación o co-precipitación o es captada por organismos vivientes [41]. Una fracción aún mayor de los metales introducidos se encuentra asociada con los sedimentos, donde constituyen la fuente de un potencial daño ecológico dada su alta persistencia y no-degradabilidad. Los sedimentos constituyen un reservorio concentrado de metales; las concentraciones en este compartimiento son órdenes de magnitud más altos que aquellos encontrados en cuerpos acuáticos asociados, donde pueden ser liberados por cambios en las condiciones ambientales tales como pH, potencial redox, oxígeno disuelto y presencia de quelatos orgánicos [42].

Según su forma de asociación, los metales son susceptibles de solubilización o de precipitación durante las modificaciones fisicoquímicas que se producen en los sistemas acuáticos naturales. Como estas diferentes formas de metales generalmente exhiben distintas propiedades físicas y químicas, la medición de la concentración total de metales provee escasa información sobre la potencial interacción de los metales con los componentes bióticos y abióticos presentes en el

ambiente acuático. En la actualidad se acepta generalmente que el papel de los sedimentos asociados con cuerpos acuáticos como fuentes o sumideros de contaminantes no puede establecerse sólo por medición de la concentración total de metales. En particular, la determinación de metales totales no conduce a una estimación exacta del posible impacto ambiental, por ejemplo, cuando esos materiales son dragados e incorporados como relleno de terrenos. En ese contexto, es esencial reunir información sobre la disponibilidad potencial de metales tóxicos para el medio biológico bajo condiciones ambientales muy diversas. Debido a que, como ya se ha mencionado, la disponibilidad depende críticamente de las formas físicas y químicas en las cuales los metales se encuentran presentes en el sedimento, la especiación de elementos traza constituye un tema de considerable atención. Los estudios en los medios acuáticos naturales han alcanzado gran interés en los últimos tiempos, dado el incremento de población en zonas costeras y la creciente industrialización, teniendo presente que las actividades humanas producen distinto tipo de vertidos que incrementan la concentración de metales en los sistemas marino-costeros.

La relevancia del estudio de la especiación o fraccionamiento de los metales se debe además a que algunos de ellos, a pesar de su potencial toxicidad, son necesarios para el desarrollo normal de los organismos vivos. La toxicidad de los metales es proporcional a la facilidad con que son absorbidos por los seres vivos. Es sabido que un metal en forma iónica es incorporado más fácilmente que estando en su forma elemental, y si se encuentra en su forma reducida se incrementan las posibilidades de oxidación y retención en diversos órganos. Los efectos tóxicos de los metales no se detectan fácilmente a corto plazo, aunque su incidencia a mediano y largo plazo es considerable. Los metales son difíciles de eliminar del

medio acuático porque los organismos los incorporan a sus tejidos y de allí se transfieren a sus depredadores, en los que finalmente se manifiestan.

Es deseable, por consiguiente, para un sedimento dado, distinguir las formas químicas a las cuales aparecen asociados los metales. El conocimiento del fraccionamiento de un metal es útil para determinar su origen y para comprender su comportamiento geoquímico como la diagénesis (proceso de formación de una roca a partir de sedimentos sueltos que sufren compactación), la movilidad, el transporte y su disponibilidad biológica, ya que la bioacumulación de ciertos metales depende de la fase geoquímica particular con la cual los metales traza están asociados [43].

1.1.2.2 Metales en alimentos

El consumo de alimentos es la principal vía de exposición de la población general a los metales. La contaminación por metales se ha convertido en un problema mundial, degradando el ambiente y planteando una grave amenaza para la salud humana. Las causas subyacentes de este problema persistente parecen ser el aumento de la tasa de urbanización, los cambios en el uso del suelo y la industrialización, especialmente en los países en desarrollo y densamente poblados. La contaminación de los alimentos vegetales por metales como el Pb, el As, Cd y Hg se ha considerado una de las principales vías de exposición a estos elementos y actualmente plantea un enorme desafío para el suministro de una nutrición saludable a una población cada vez mayor. El aumento repentino del crecimiento demográfico y la industrialización ha provocado un cambio inevitable en el uso de la tierra en todas las regiones del mundo. Como se comentó anteriormente, esta

dinámica ha obligado a realizar esfuerzos sostenidos para mejorar la productividad agrícola de áreas geográficas limitadas para producir cantidades adecuadas de alimentos. De esta manera, el uso de fuentes de riego de bajo costo, como aguas residuales, efluentes tratados y lodos contaminados con metales han propiciado una disminución de la calidad de los alimentos. El uso agrícola de fertilizantes y pesticidas químicos o minerales en el mundo también ha aumentado significativamente [8] como factor que contribuye a la perturbación del sistema suelo-planta con metales [9]. Recientemente se ha postulado que, entre las plantas comestibles disponibles para el consumo humano, los cereales, que incluyen trigo, arroz, cebada, maíz, centeno, avena y mijo, han acaparado la mayor parte de la producción agrícola mundial [8] con raíces y tubérculos, frutas y hortalizas, y caña de azúcar también en aumento. Además, los productos derivados de estos vegetales como los aceites comestibles pueden contener diferentes metales. Por ello, los niveles de oligoelementos en los aceites comestibles son criterios importantes para la evaluación de la calidad en cuanto a su frescura, capacidad de almacenamiento y toxicidad [44–46]. Algunos oligoelementos pueden aumentar la tasa de oxidación del aceite, mientras que otros son muy importantes de monitorear debido a su toxicidad y papel en el metabolismo. Los metales se pueden incorporar de forma natural al aceite del suelo donde se cultivaron las materias primas para los aceites de semillas o de oliva o del agua de mar para aceite de pescado. La contaminación de aceites comestibles por As, Hg, Cr, Cd y Pb es muy importante debido a su potencial toxicidad y papel metabólico en humanos [47–49]. El uso de fertilizantes también puede aumentar los niveles de metales en los aceites comestibles. Incluso, se pueden introducir oligoelementos durante el proceso de producción, como en los procesos de extracción o refinación de aceites comestibles

[47].

1.2 Química Sostenible (Green Chemistry)

Los conceptos de "desarrollo sostenible" y "protección ambiental" están estrechamente relacionados, ya que el desarrollo sostenible está asociado con una mayor preocupación por la protección del ambiente. La definición bien conocida de desarrollo sostenible es: *una forma de desarrollo que satisface las necesidades del presente sin comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades*. El desarrollo sostenible, por lo tanto, está centrado en las personas y tiene como objetivo mejorar la calidad de vida humana. El punto de partida está así enfocado en los seres humanos, en contraste con muchos puntos de vista éticos sobre el ambiente. Esto parece correcto, ya que el desarrollo sostenible requiere ciertos límites a las actividades humanas.

Dado que nos preocupa cada vez más el estado del ambiente, sería apropiado examinar aquellas actividades de los profesionales químicos que pueden tener un impacto significativo en el estado del ambiente, tanto a nivel industrial como de laboratorio. La demanda insaciable de diversos productos está siendo satisfecha por desarrollos rápidos en la tecnología de fabricación. Estos pueden explotar el ambiente y sus recursos de manera muy significativa. Alternativamente, pueden ser amigables con el ambiente, utilizando tecnologías de baja generación de residuos y reciclando desechos y subproductos.

Las actividades a pequeña escala de los químicos, como los experimentos de laboratorio, también pueden tener un impacto negativo en el ambiente, por ejemplo,

a través de la eliminación no controlada de desechos químicos y reactivos usados.

Por todas las razones anteriores, la comunidad química ha desarrollado una serie de actividades que pueden considerarse en dos planos:

- La enseñanza de aspectos fundamentales de la ciencia ambiental en todos los niveles de educación, lo que lleva a la producción de especialistas capaces de abordar y resolver problemas ambientales existentes y potenciales, y también a un aumento de la conciencia proambiental del público en general;
- Un nuevo enfoque de las actividades químicas típicas, que lleva a un uso más amigable de las instalaciones con el ambiente. Recientemente, este enfoque se ha vuelto cada vez más generalizado, y se ha acuñado el término "Química Sostenible" para describirlo.

Por lo tanto, la Química Sostenible es el uso de técnicas y metodologías químicas que eliminan o al menos reducen el uso o generación de materias primas, productos, subproductos, solventes, reactivos, etc., que son peligrosos para la salud humana o el ambiente. Debe tenerse en cuenta que los peligros de los productos químicos van más allá de la toxicidad (aguda y crónica) para incluir la carcinogenicidad, mutagenicidad, explosividad, inflamabilidad y corrosividad, así como los impactos ambientales, como el daño atmosférico y el cambio climático global.

Un objetivo importante de la Química Sostenible es, por lo tanto, reducir los peligros asociados con productos y procesos que son esenciales para la economía mundial y mantener la alta calidad de vida que disfrutamos a través de la química. Busca lograr este objetivo reduciendo o eliminando tanto riesgo como sea posible

asociado con los procesos químicos. Si se pueden reducir los peligros químicos, también se reducirán los riesgos derivados del uso o exposición a productos químicos.

Para lograr esto, se han propuesto los llamados "Doce principios de la Química Sostenible". Los doce principios de la Química Sostenible proporcionan un marco para que los científicos e ingenieros lo utilicen al diseñar nuevos materiales, productos, procesos y sistemas. Los principios se centran en diferentes criterios de diseño sostenible y han demostrado ser la fuente de soluciones innovadoras para una amplia gama de problemas. Muchos de estos principios son aplicables a la química analítica. Aquellos que son más relevantes o más comúnmente encontrados en la química analítica están indicados en naranja en la Fig. 1.2.1.



Figura 1.2.1 Los doce principios de la Química Sostenible (el color naranja indica los principios más aplicables a la Química Analítica).

En general, el cumplimiento de los diferentes aspectos analíticos con los 12 principios de la Química Sostenible se relaciona con los reactivos, la energía, los desechos y los métodos en general (Fig. 1.2.2).

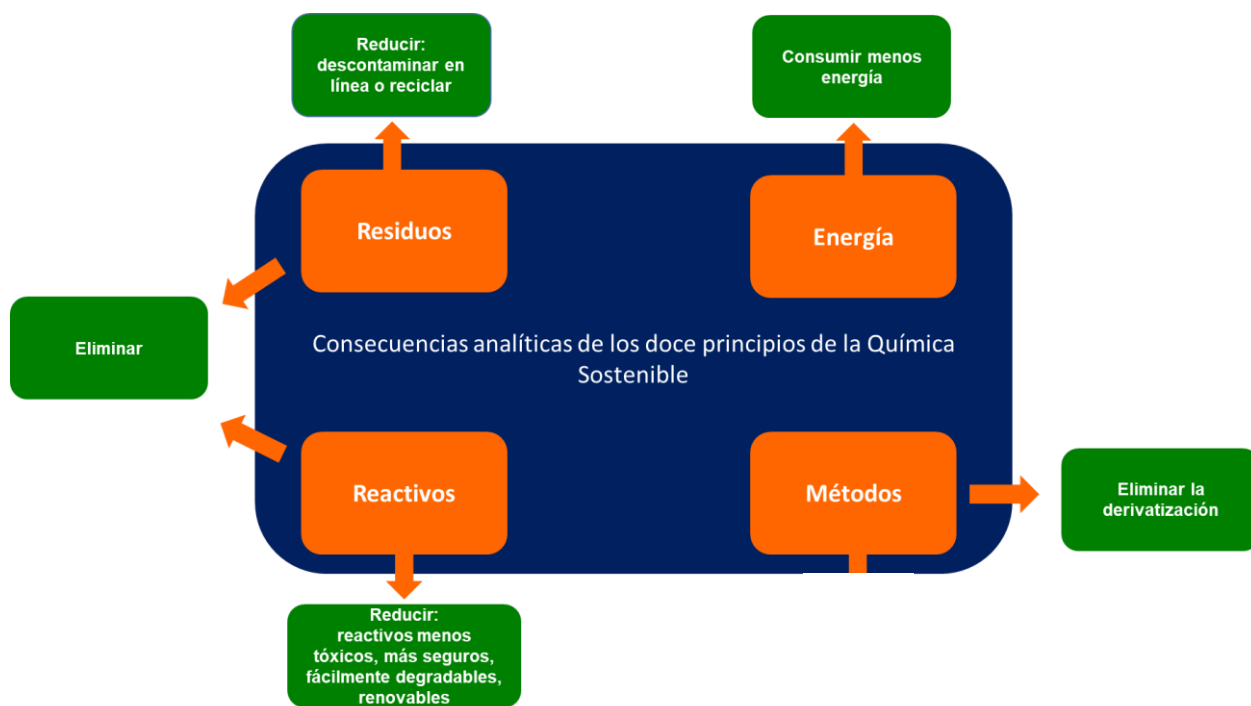


Figura 1.2.2 Consecuencias analíticas de los doce principios de la Química Sostenible.

La Química Analítica Sostenible (GAC, del inglés *Green Analytical Chemistry*) es una derivación de la Química Sostenible. Esta área de actividad relativamente nueva dentro de la Química Sostenible se refiere al papel de los químicos analíticos en hacer que las prácticas de laboratorio sean más respetuosas con el ambiente [50]. Por lo tanto, se deben desarrollar métodos analíticos que eliminen o al menos reduzcan las sustancias peligrosas utilizadas o producidas por el método. El objetivo de la GAC es utilizar procedimientos analíticos que generen residuos menos peligrosos y sean más seguros de usar y menos dañinos para el ambiente. Este objetivo se puede lograr desarrollando nuevas metodologías analíticas o, más a menudo, simplemente modificando un método previo para incorporar procedimientos que eviten el uso de sustancias químicas peligrosas o, al menos, utilicen cantidades menores de ellas.

Por ello, se han propuesto los llamados “12 Principios de la GAC”. Sin embargo, es muy importante tener en cuenta que, en este esfuerzo por diseñar nuevos métodos analíticos más respetuosos con el ambiente, debemos intentar mantener la calidad de los resultados obtenidos con ellos.

1.2.1 Métricas en Química Sostenible

Como hemos mencionado, la Química Sostenible constituye un campo dentro de la química y la ingeniería química dedicado a idear productos y procesos que mitiguen o eliminen la utilización de sustancias químicas nocivas. A diferencia de la química ambiental, que aborda principalmente cuestiones ambientales, la Química Sostenible subraya los resultados ambientales positivos de sus prácticas, incluida una menor dependencia de recursos no renovables y estrategias innovadoras de reducción de la contaminación [51]. Los doce principios de la Química Sostenible proporcionan un marco para mejorar el respeto al ambiente por parte de los materiales y procesos químicos [52,53]. Los esfuerzos para promover procesos químicos más ecológicos generalmente se centran en emplear solventes más limpios, menos peligrosos y más benignos, o en eliminar los solventes por completo, minimizando al mismo tiempo el uso de reactivos. Otras estrategias adicionales implican reducir el consumo de energía empleando condiciones de reacción más suaves, evitando la derivatización y explorando sustratos renovables.

Sin embargo, entre los doce principios, sólo un subconjunto pertenece directamente a los métodos analíticos [51,54,55]. En consecuencia, Gałuszka y colaboradores [50] propusieron doce principios de Química Analítica Sostenible (GAC), que abarcan cuatro principios de Química Sostenible y ocho principios

complementarios.

La GAC ha transformado las metodologías de preparación de muestras mediante la integración de la sostenibilidad, la eficiencia y la seguridad en los principios de los procedimientos, al mismo tiempo que satisface las demandas analíticas y económicas [56]. Esta integración ha impulsado varios avances notables. En primer lugar, facilita la reducción o eliminación de sustancias peligrosas, como los disolventes tóxicos, mitigando así los riesgos para la salud humana y salvaguardando el ambiente. En segundo lugar, mejora la sostenibilidad general al fomentar el desarrollo de la preparación de muestras en línea y la preparación automatizada de muestras, que reducen sustancialmente el tiempo de análisis y los requisitos de mano de obra. En tercer lugar, impulsa la innovación en química analítica mediante la exploración de microfluidos, miniaturización y fuentes de energía más ecológicas. No obstante, lograr un equilibrio entre las métricas de rendimiento analítico (por ejemplo, sensibilidad, selectividad, precisión) y la ecología sigue siendo un desafío persistente [56]. Además, la evaluación cualitativa o cuantitativa de la sostenibilidad requiere criterios bien definidos. En consecuencia, se han ideado numerosas métricas para abordar este desafío (Fig. 1.2.3), entre otros: NEMI (del inglés *National Environmental Methods Index*), Modified NEMI, AES (del inglés *Analytical Eco-Scale*), GAPI (del inglés *Green Analytical Procedure Index*), Complex GAPI, EAT (del inglés *Environmental Assessment Tool*), AMVI (del inglés *Analytical Method Volume Intensity*), AMGS (del inglés *Analytical Method GREENness Score*), AGREE (del inglés *Analytical GREENness*), entre otros [56].



Figura 1.2.3 Métricas frecuentemente utilizadas para la evaluación de la sostenibilidad de un método analítico. NEMI: National Environmental Methods Index; AES: Analytical.Eco-Scale; GAPI: Green Analytical Procedure Index; EAT: Environmental Assessment Tool; AMVI: Analytical Method Volumen Intensity; AMGS: Analytical Method GREENness Score; AGREE: Analytical GREENness.

En particular, la métrica AGREE resulta apropiada para la evaluación de la sostenibilidad de un método analítico ya que es accesible (software libre), completa, flexible, fácil de realizar y de interpretar. Esta metodología fue desarrollada en 2020 por Pena-Pereira y colaboradores [57]. La métrica AGREE se basa en los 12 principios de la Química Analítica Sostenible, y a cada principio se le asigna un peso proporcional a su impacto en las metodologías analíticas [58]. Además, prioriza estrategias como minimizar el tratamiento de muestras, reducir el tamaño y el número de muestras, realizar mediciones in situ, integrar procesos analíticos,

priorizar métodos automatizados y miniaturizados, evitar la derivatización, gestionar los desechos analíticos, minimizar el consumo de energía, utilizar reactivos y fuentes renovables, eliminar o sustituir sustancias tóxicas y mejorar la seguridad del operador [56]. Cada criterio se asigna en una escala de 0 a 1, que culmina en una evaluación general del método analítico [59]. El espectro de colores cambia de verde oscuro a rojo, reflejando la transición de una puntuación de 1 a 0, ofreciendo un indicador visual del alineamiento de un método a los 12 principios de la Química Analítica Sostenible [56–59].

En conclusión, las métricas de Química Analítica Sostenible ofrecen un medio para comparar sistemáticamente varios parámetros y pasos dentro del procedimiento analítico, identificando áreas con mayor impacto ambiental que pueden ser objeto de mejora. Las metodologías de evaluación de la sostenibilidad han encontrado una aplicación significativa en el ámbito de la química analítica, lo que refleja la adopción más amplia de los principios de la Química Sostenible en el último tiempo. Sin embargo, muchas iniciativas destinadas a procesos analíticos más sostenibles no han sido objeto de una evaluación exhaustiva utilizando herramientas adecuadas. En este contexto, se han examinado diversos enfoques métricos los cuales exhibieron ventajas y limitaciones únicas desde una perspectiva ecológica. Por otro lado, sería propicio que estas herramientas influyan en el diseño del método integrándolas en el proceso de análisis en lugar de depender únicamente de la evaluación posterior al análisis. En esencia, la evaluación de los parámetros de la Química Analítica Sostenible debe incorporarse en las fases de análisis de construcción y planificación, asegurando que todas las etapas de desarrollo e implementación del método se alineen con los principios de sostenibilidad desde el principio.

1.3 Referencias

- [1] M. Argos, T. Kalra, B.L. Pierce, Y. Chen, F. Parvez, T. Islam, A. Ahmed, R. Hasan, K. Hasan, G. Sarwar, D. Levy, V. Slavkovich, J.H. Graziano, P.J. Rathouz, H. Ahsan, A Prospective Study of Arsenic Exposure From Drinking Water and Incidence of Skin Lesions in Bangladesh, *Am J Epidemiol* 174 (2011) 185–194. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWR062>.
- [2] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, (2014).
- [3] Some Drinking-water Disinfectants and Contaminants, Including Arsenic - IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, International Agency for Research on Cancer - Google Libros, (n.d.). https://books.google.com.ar/books?hl=es&lr=&id=op79jfMFM9gC&oi=fnd&pg=PA1&dq=IARC,+2004.+Summary+of+Data+Reported+and+Evaluation+vol.+84.+World+Health+Organization,+International+Agency+for+research+on+cancer&ots=iGJCYwI20W&sig=v9EaGcnG_3xRmKjzDr3a3l_h3NA&redir_esc=y#v=onepage&q=IARC%20%202004.%20Summary%20of%20Data%20Reported%20and%20Evaluation%20vol.%2084.%20World%20Health%20Organization%20%20International%20Agency%20for%20research%20on%20cancer&f=false (accessed July 30, 2024).
- [4] P.L. Smedley, D.G. Kinniburgh, A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters, *Applied Geochemistry* 17 (2002) 517–568. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(02\)00018-5](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(02)00018-5).
- [5] B.K. Mandal, K.T. Suzuki, Arsenic round the world: a review, *Talanta* 58 (2002) 201–235. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(02\)00268-0](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(02)00268-0).
- [6] M.I. Litter, A.M. Ingallinella, V. Olmos, M. Savio, G. Difeo, L. Botto, E.M. Farfán

- Torres, S. Taylor, S. Frangie, J. Herkovits, I. Schalamuk, M.J. González, E. Berardozzi, F.S. García Einschlag, P. Bhattacharya, A. Ahmad, Arsenic in Argentina: Occurrence, human health, legislation and determination, *Science of The Total Environment* 676 (2019) 756–766. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.262>.
- [7] WHO chronicle, ed., *Guidelines for Drinking-water Quality*, third, Geneva, 2008.
- [8] J.M. Rosas-Castor, J.L. Guzmán-Mar, A. Hernández-Ramírez, M.T. Garza-González, L. Hinojosa-Reyes, Arsenic accumulation in maize crop (*Zea mays*): A review, *Science of The Total Environment* 488–489 (2014) 176–187. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.04.075>.
- [9] S. Gerstenfeld, A. Jordán, R. Calli, P. Farías, J. Malica, M.L.G. Peña, L. Aguirre, M. Salvatierra, E. Leguizamón, C. Coronel, E.F. Ivaldi, Determinación de zonas de riesgo al agua arsenical y prevalencia de hacre en Villa Belgrano, Tucumán, Argentina, *Rev Argent Salud Publica* 3 (2012) 24–29. <https://www.rasp.msal.gov.ar/index.php/rasp/article/view/359> (accessed July 30, 2024).
- [10] M.N. Bates, O.A. Rey, M.L. Biggs, C. Hopenhayn, L.E. Moore, D. Kalman, C. Steinmaus, A.H. Smith, Case-Control Study of Bladder Cancer and Exposure to Arsenic in Argentina, *Am J Epidemiol* 159 (2004) 381–389. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWH054>.
- [11] J.C. Ng, J. Wang, A. Shraim, A global health problem caused by arsenic from natural sources, *Chemosphere* 52 (2003) 1353–1359. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00470-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00470-3).

- [12] A.A. Duker, E.J.M. Carranza, M. Hale, Arsenic geochemistry and health, *Environ Int* 31 (2005) 631–641. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2004.10.020>.
- [13] U.S. Environmental Protection Agency, *Arsenic in Drinking Water*. United States: US Environmental Protection Agency, 2012.
- [14] O.F. Brouwer, W. Onkenhout, P.M. Edelbroek, J.F.M. de Kom, F.A. de Wolff, A.C.B. Peters, Increased neurotoxicity of arsenic in methylenetetrahydrofolate reductase deficiency, *Clin Neurol Neurosurg* 94 (1992) 307–310. [https://doi.org/10.1016/0303-8467\(92\)90179-7](https://doi.org/10.1016/0303-8467(92)90179-7).
- [15] M.M. El-Ajaily, H.B. Alhaj, A.A. Erdeni, al -, R. Kadhim Mahdi, N. Mahmmoud Najji, S.O. H Al-Mamoori, J.S. Muhammad, K.A. Jasim, A.H. Shaban, H. Al-Salmi, M.H. Al-Douh, K. Al-Hmmadi, A. Al-Alas, Determination of arsenic and cadmium as toxic metals in human blood samples collected from targeted people of Sana'a governorate, *J Phys Conf Ser* 1900 (2021) 012017. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1900/1/012017>.
- [16] O.M. Chechet, S.V. Shulyak, L.V. Shevchenko, V.M. Mykhalska, O.S. Gaidei, K.S. Miahka, O.V. Krushelnytska, N.V. Liniichuk, I.U. Bardyk, M.J. Kryvenok, S.V. Boyarchuk, Effectiveness of inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES) in macro and microelements assessment in water, *Ukr J Ecol* 11 (2021) 197–203. https://doi.org/10.15421/2021_259.
- [17] S. Xu, F.P. Sabino, A. Janotti, D.B. Chase, D.L. Sparks, J.F. Rabolt, Unique Surface Enhanced Raman Scattering Substrate for the Study of Arsenic Speciation and Detection, *Journal of Physical Chemistry A* 122 (2018) 9474–9482. https://doi.org/10.1021/ACS.JPCA.8B09104/SUPPL_FILE/JP8B09104_SI_001.PDF.

- [18] M. Yang, V. Liamsau, C. Fan, K.L. Sylvers, A.J. McGoron, G. Liu, F. Fu, Y. Cai, Arsenic Speciation on Silver Nanofilms by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal Chem* 91 (2019) 8280–8288. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.9B00999/SUPPL_FILE/AC9B00999_SI_001.PDF.
- [19] M.H. Nguyen, T.D. Pham, T.L. Nguyen, H.A. Vu, T.T. Ta, M.B. Tu, T.H.Y. Nguyen, D.B. Chu, Speciation Analysis of Arsenic Compounds by HPLC-ICP-MS: Application for Human Serum and Urine, *J Anal Methods Chem* 2018 (2018) 9462019. <https://doi.org/10.1155/2018/9462019>.
- [20] M. Zhang, X. Ma, J. Li, R. Huang, L. Guo, X. Zhang, Y. Fan, X. Xie, G. Zeng, Enhanced removal of As(III) and As(V) from aqueous solution using ionic liquid-modified magnetic graphene oxide, *Chemosphere* 234 (2019) 196–203. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.06.057>.
- [21] M. Guo, J. Li, S. Fan, W. Liu, B. Wang, C. Gao, J. Zhou, X. Hai, Speciation analysis of arsenic in urine samples from APL patients treated with single agent As₂O₃ by HPLC-HG-AFS, *J Pharm Biomed Anal* 171 (2019) 212–217. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2019.04.014>.
- [22] I.D. Urango-Cárdenas, S. Burgos-Núñez, L.Á. Ospina Herrera, G. Enamorado-Montes, J.L. Marrugo-Negrete, Determination of arsenic chemical species in rice grains using high-performance liquid chromatography coupled to hydride generator with atomic fluorescence detector (HPLC-HG-AFS), *MethodsX* 8 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101281>.
- [23] V. Ashouri, K. Adib, G.A. Fariman, M.R. Ganjali, M. Rahimi-Nasrabadi,

- Determination of arsenic species using functionalized ionic liquid by in situ dispersive liquid-liquid microextraction followed by atomic absorption spectrometry, *Food Chem* 349 (2021) 129115. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129115>.
- [24] R.A. Zounr, M. Tuzen, M.Y. Khuhawar, Ultrasound assisted deep eutectic solvent based on dispersive liquid liquid microextraction of arsenic speciation in water and environmental samples by electrothermal atomic absorption spectrometry, *J Mol Liq* 242 (2017) 441–446. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2017.07.053>.
- [25] K. Pungjunun, S. Chaiyo, I. Jantrahong, S. Nantaphol, W. Siangproh, O. Chailapakul, Anodic stripping voltammetric determination of total arsenic using a gold nanoparticle-modified boron-doped diamond electrode on a paper-based device, *Microchimica Acta* 185 (2018) 1–8. <https://doi.org/10.1007/S00604-018-2821-7/METRICS>.
- [26] C. Sullivan, D. Lu, A. Senecal, P. Kurup, Voltammetric detection of arsenic (III) using gold nanoparticles modified carbon screen printed electrodes: Application for facile and rapid analysis in commercial apple juice, *Food Chem* 352 (2021) 129327. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2021.129327>.
- [27] R. Gürkan, U. Kir, N. Altunay, Development of a simple, sensitive and inexpensive ion-pairing cloud point extraction approach for the determination of trace inorganic arsenic species in spring water, beverage and rice samples by UV–Vis spectrophotometry, *Food Chem* 180 (2015) 32–41. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.01.142>.
- [28] M. Welna, A. Szymczycha-Madeja, P. Pohl, Comparison of strategies for sample preparation prior to spectrometric measurements for determination and speciation of

- arsenic in rice, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 65 (2015) 122–136.
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2014.11.007>.
- [29] A. Motalebizadeh, H. Bagheri, S. Asiaei, N. Fekrat, A. Afkhami, New portable smartphone-based PDMS microfluidic kit for the simultaneous colorimetric detection of arsenic and mercury, *RSC Adv* 8 (2018) 27091–27100.
<https://doi.org/10.1039/C8RA04006K>.
- [30] K. Shrivastava, S. Patel, D. Sinha, S.S. Thakur, T.K. Patle, T. Kant, K. Dewangan, M.L. Satnami, J. Nirmalkar, S. Kumar, Colorimetric and smartphone-integrated paper device for on-site determination of arsenic (III) using sucrose modified gold nanoparticles as a nanoprobe, *Microchimica Acta* 187 (2020) 1–9.
<https://doi.org/10.1007/S00604-020-4129-7/METRICS>.
- [31] D. Goyal, A. Yadav, M. Prasad, T.B. Singh, P. Shrivastava, A. Ali, P.K. Dantu, S. Mishra, Effect of Heavy Metals on Plant Growth: An Overview, *Contaminants in Agriculture: Sources, Impacts and Management* (2020) 79–101.
https://doi.org/10.1007/978-3-030-41552-5_4.
- [32] Z. Yanqun, L. Yuan, C. Jianjun, C. Haiyan, Q. Li, C. Schwartz, Hyperaccumulation of Pb, Zn and Cd in herbaceous grown on lead–zinc mining area in Yunnan, China, *Environ Int* 31 (2005) 755–762. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2005.02.004>.
- [33] A. Alengebawy, S.T. Abdelkhalek, S.R. Qureshi, M.Q. Wang, Heavy Metals and Pesticides Toxicity in Agricultural Soil and Plants: Ecological Risks and Human Health Implications, *Toxics* 2021, Vol. 9, Page 42 9 (2021) 42.
<https://doi.org/10.3390/TOXICS9030042>.
- [34] Q. Guan, F. Wang, C. Xu, N. Pan, J. Lin, R. Zhao, Y. Yang, H. Luo, Source

- apportionment of heavy metals in agricultural soil based on PMF: A case study in Hexi Corridor, northwest China, *Chemosphere* 193 (2018) 189–197. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2017.10.151>.
- [35] Y. Hou, Y. Zhao, J. Lu, Q. Wei, L. Zang, X. Zhao, Environmental contamination and health risk assessment of potentially toxic trace metal elements in soils near gold mines – A global meta-analysis, *Environmental Pollution* 330 (2023) 121803. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2023.121803>.
- [36] R. Riyazuddin, N. Nisha, B. Ejaz, M.I.R. Khan, M. Kumar, P.W. Ramteke, R. Gupta, A Comprehensive Review on the Heavy Metal Toxicity and Sequestration in Plants, *Biomolecules* 2022, Vol. 12, Page 43 12 (2021) 43. <https://doi.org/10.3390/BIOM12010043>.
- [37] S. Mitra, A.J. Chakraborty, A.M. Tareq, T. Bin Emran, F. Nainu, A. Khusro, A.M. Idris, M.U. Khandaker, H. Osman, F.A. Alhumaydhi, J. Simal-Gandara, Impact of heavy metals on the environment and human health: Novel therapeutic insights to counter the toxicity, *J King Saud Univ Sci* 34 (2022) 101865. <https://doi.org/10.1016/J.JKSUS.2022.101865>.
- [38] S. Bravo, J.A. Amorós, C. Pérez-de-los-Reyes, F.J. García, M.M. Moreno, M. Sánchez-Ormeño, P. Higuera, Influence of the soil pH in the uptake and bioaccumulation of heavy metals (Fe, Zn, Cu, Pb and Mn) and other elements (Ca, K, Al, Sr and Ba) in vine leaves, Castilla-La Mancha (Spain), *J Geochem Explor* 174 (2017) 79–83. <https://doi.org/10.1016/J.GEXPLO.2015.12.012>.
- [39] M. das G.A. Korn, E.S. da B. Morte, D.C.M.B. dos Santos, J.T. Castro, J.T.P. Barbosa, A.P. Teixeira, A.P. Fernandes, B. Welz, W.P.C. dos Santos, E.B.G.N. dos

- Santos, M. Korn, Sample Preparation for the Determination of Metals in Food Samples Using Spectroanalytical Methods—A Review, *Appl Spectrosc Rev* 43 (2008) 67–92. <https://doi.org/10.1080/05704920701723980>.
- [40] L. El Hosry, N. Sok, R. Richa, L. Al Mashtoub, P. Cayot, E. Bou-Maroun, Sample Preparation and Analytical Techniques in the Determination of Trace Elements in Food: A Review, *Foods* 2023, Vol. 12, Page 895 12 (2023) 895. <https://doi.org/10.3390/FOODS12040895>.
- [41] L. He, S. Wang, M. Liu, Z. Chen, J. Xu, Y. Dong, Transport and transformation of atmospheric metals in ecosystems: A review, *Journal of Hazardous Materials Advances* 9 (2023) 100218. <https://doi.org/10.1016/J.HAZADV.2022.100218>.
- [42] A.A. de Souza Machado, K. Spencer, W. Kloas, M. Toffolon, C. Zarfl, Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of toxicity, *Science of The Total Environment* 541 (2016) 268–281. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.09.045>.
- [43] U. Förstner, *Inorganic Sediment Chemistry and Elemental Speciation, Sediments:* (2020) 61–105. <https://doi.org/10.1201/9780367810894-3>.
- [44] J.R. Castillo, M.S. Jiménez, L. Ebdon, Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization, *J Anal At Spectrom* 14 (1999) 1515–1518. <https://doi.org/10.1039/A900754G>.
- [45] Y.L. Chu, S.J. Jiang, Speciation analysis of arsenic compounds in edible oil by ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Chromatogr A* 1218 (2011) 5175–5179. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.05.089>.

- [46] R. Manjusha, R. Shekhar, S.J. Kumar, Ultrasound-assisted extraction of Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn from edible oils with tetramethylammonium hydroxide and EDTA followed by determination using graphite furnace atomic absorption spectrometer, *Food Chem* 294 (2019) 384–389. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.04.104>.
- [47] D. Bakircioglu, Y.B. Kurtulus, S. Yurtsever, Comparison of extraction induced by emulsion breaking, ultrasonic extraction and wet digestion procedures for determination of metals in edible oil samples in Turkey using ICP-OES, *Food Chem* 138 (2013) 770–775. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.10.089>.
- [48] A.N. Anthemidis, V. Arvanitidis, J.A. Stratis, On-line emulsion formation and multi-element analysis of edible oils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *Anal Chim Acta* 537 (2005) 271–278. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2005.01.035>.
- [49] F.G. Lepri, E.S. Chaves, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, A.J. Curtius, L.C.C. De Oliveira, R.C. De Campos, Determination of Trace Elements in Vegetable Oils and Biodiesel by Atomic Spectrometric Techniques—A Review, *Appl Spectrosc Rev* 46 (2011) 175–206. <https://doi.org/10.1080/05704928.2010.529628>.
- [50] A. Gałuszka, Z. Migaszewski, J. Namieśnik, The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 50 (2013) 78–84. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2013.04.010>.
- [51] L.P. Kowtharapu, N.K. Katari, S.K. Muchakayala, V.M. Mariseti, Green metric tools for analytical methods assessment critical review, case studies and crucify, *TrAC*

- Trends in Analytical Chemistry 166 (2023) 117196.
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2023.117196>.
- [52] M. Sajid, J. Płotka-Wasyłka, Green analytical chemistry metrics: A review, *Talanta* 238 (2022) 123046. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2021.123046>.
- [53] P.T. Anastas, M.M. Kirchhoff, Origins, current status, and future challenges of green chemistry, *Acc Chem Res* 35 (2002) 686–694.
<https://doi.org/10.1021/AR010065M/ASSET/IMAGES/LARGE/AR010065MF00002.JPEG>.
- [54] P.T. Anastas, Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development, *Crit Rev Anal Chem* 29 (1999) 167–175.
<https://doi.org/10.1080/10408349891199356>.
- [55] S. Armenta, S. Garrigues, M. de la Guardia, Green Analytical Chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008) 497–511.
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2008.05.003>.
- [56] N. Yahaya, A.H. Mohamed, M. Miskam, A.S. Abdul Keyon, S.H. Loh, N.N. Mohamad Zain, M. Sajid, Green analytical chemistry metrics for evaluation of microextraction methods: Fascinating or essential tools in real-world applications?, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 172 (2024) 117587.
<https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2024.117587>.
- [57] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal Chem* 92 (2020) 10076–10082.
https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.0C01887/ASSET/IMAGES/LARGE/AC0C01887_0003.JPEG.

- [58] M.S. Imam, M.M. Abdelrahman, How environmentally friendly is the analytical process? A paradigm overview of ten greenness assessment metric approaches for analytical methods, *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 38 (2023) e00202. <https://doi.org/10.1016/J.TEAC.2023.E00202>.
- [59] A. Cetinkaya, S.I. Kaya, S.A. Ozkan, An overview of the current progress in green analytical chemistry by evaluating recent studies using greenness assessment tools, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 168 (2023) 117330. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2023.117330>.

Capítulo 2: Objetivos

El objetivo general de esta tesis doctoral ha sido diseñar y desarrollar nuevos métodos analíticos para la extracción y determinación de arsénico y metales en muestras ambientales y alimentarias, con el propósito de lograr una mayor simplicidad y rapidez en la obtención de información de calidad. Asimismo, se ha buscado minimizar y/o sustituir el empleo de reactivos tóxicos, reduciendo la producción de residuos peligrosos o contaminantes para el ambiente. Finalmente, se evaluó la sostenibilidad de los diversos métodos propuestos mediante un sistema métrico, con el fin de asegurar su alineación con los principios de la Química Analítica Sostenible.

Capítulo 3: Dispositivo impreso
en 3D para la determinación
cinética de As(III) en muestras de
agua subterránea mediante
análisis de imágenes digitales

3.1 Introducción

Uno de los problemas más comunes en el agua potable natural de todo el mundo es probablemente la presencia de arsénico [1]. Lamentablemente, millones de personas en el mundo están expuestas a concentraciones de As superiores a las recomendadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el agua potable ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) [2]. Entre las regiones más afectadas podemos mencionar India, China, África Central y América Latina [3]. La presencia de arsénico en aguas naturales puede provenir de los minerales presentes en las diferentes capas de la tierra, la escorrentía, el vulcanismo y la lixiviación [4]. Las actividades antropogénicas también pueden aumentar la concentración de este elemento en suelos y acuíferos, constituyendo así un cierto riesgo para la producción de alimentos [5] y el consumo de bebidas. El arsénico presenta cuatro estados de oxidación, siendo el As(III) y el As(V) las especies más comunes en el agua [6]. El As(III) representa un mayor riesgo en las aguas subterráneas que el As(V) debido a su mayor toxicidad [1].

El primer paso en la prevención de enfermedades y el control de la contaminación por arsénico de las aguas subterráneas es monitorear o determinar la concentración de este elemento [7]. Como se comentó en el Capítulo 1, se han utilizado diferentes técnicas analíticas para la determinación de arsénico en muestras ambientales, como ser ICP-OES, ICP-MS y ET-AAS, entre otros. Sin embargo, estas técnicas requieren de equipamiento complejo y costoso, lo que limita su implementación en laboratorios de control de calidad. Por el contrario, los métodos espectrofotométricos se fundamentan en la formación de complejos coloreados del arsénico con ciertos ligandos, involucrando una reacción entre la especie arsenical y un compuesto, que produce un derivado coloreado con

absorbancia en el espectro ultravioleta o visible. Estas metodologías son sencillas y económicas, basadas en reacciones colorimétricas que se aplican selectivamente a As(III) o As(V). Además, pueden utilizarse para la detección de arsénico inorgánico (iAs) o para la detección de arsénico total (inorgánico + orgánico) si se realiza una mineralización previa de la materia orgánica.

Existen dos métodos espectrofotométricos reconocidos para la determinación de arsénico. Uno de ellos se basa en el antiguo método de Gutzeit [8], que implica la generación de arsina (AsH_3) a partir de la reducción del arseniato presente en el agua mediante reacciones sucesivas con yoduro de potasio (KI) y cinc metálico (Zn) en medio ácido. Posteriormente, el gas AsH_3 reacciona con bromuro o cloruro de mercurio, produciendo un producto coloreado que varía de amarillo-naranja a naranja-amarronado, dependiendo de la concentración de arsénico presente.

El otro método es el de Vasak y Sedivek [9], que también se basa en la generación de AsH_3 por reducciones sucesivas de As(V) presente en la muestra mediante la reacción con KI y Zn en medio ácido. Luego, el AsH_3 reacciona cuantitativamente con dietilditiocarbamato de plata en solución piridínica, formando un complejo de color rojo vino.

Una variante de este método es la reacción de la AsH_3 formada con una solución de hipobromito de sodio, donde el arsénico se oxida a su estado pentavalente. Este método, conocido como el del azul de molibdeno [10], tiene mayor sensibilidad y exactitud que el del dietilditiocarbamato. Se basa en la formación de azul de molibdeno por fosfomolibdato de amonio con iones As(V) en un entorno de sulfato de hidracina. La muestra a analizar se mineraliza con ácidos inorgánicos, y luego se extrae yoduro de arsénico mediante una mezcla de

cloroformo con ácido clorhídrico. Los iones As(III) se oxidan con sulfato de cerio a As(V), que participa en la reacción de formación del azul de molibdeno. La clave de esta modificación es que el As(V) y el fosfato forman un complejo con el molibdato reducido que absorbe fuertemente, mientras que el As(III) no lo hace. El arsénico disuelto puede entonces cuantificarse a partir de la diferencia en absorbancias entre una alícuota pretratada para oxidar el As(III) (P + As) y otra alícuota pretratada para reducir As(V) (P solamente).

Por otro lado, los métodos cinéticos de análisis representan alternativas atractivas para la determinación de cantidades traza de arsénico. Estos métodos presentan la ventaja general de combinar una alta sensibilidad con procedimientos relativamente sencillos. Alekseeva y Kurtova lograron determinar As(III) basándose en su efecto sobre el periodo de inducción de la reacción de oxidación del bromuro por el periodato [11]. Sicilia y colaboradores desarrollaron un método para la determinación de As(III) fundamentado en su efecto acelerador sobre la reacción catalizada por Os(VIII) entre yoduro y bromato en medio micelar [12].

Burgess y Ottaway presentaron un método adicional para la determinación de As(III) basado en su efecto sobre la reacción redox entre el bromato y el ion bromuro en medio de ácido sulfúrico [13]. Para medir el tiempo de reacción, emplearon el blanqueo del naranja de metilo con el bromo liberado. Utilizaron diferentes condiciones de trabajo para la determinación de distintas concentraciones de As(III). Sin embargo, en algunas condiciones, el As(III) mostró un efecto inhibitor, mientras que en otras, actuó como catalizador, lo que impidió la determinación de parámetros analíticos específicos. En la misma línea, Afkhami y colaboradores describieron un método espectrofotométrico cinético sencillo para la

determinación de As(III) basado en su efecto inhibitor sobre la reacción decolorante del naranja de metilo en medio ácido [14].

Por otro lado, es extremadamente importante conocer no sólo la concentración total de arsénico, sino principalmente la de As(III). Por este motivo, se han utilizado diferentes estrategias para la especiación de arsénico, utilizando la detección mediante espectrometría de absorción atómica (AAS, del inglés *atomic absorption spectrometry*) [15], espectroscopia de fluorescencia atómica (AFS, del inglés *atomic fluorescence spectroscopy*) [16] y la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS, del inglés *inductively coupled plasma-mass spectrometry*) [17]. En algunos casos a estas técnicas de detección se han acoplado métodos de separación, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, del inglés *high-performance liquid chromatography*) [18], la cromatografía de gases (GC, del inglés *gas chromatography*) [19] y la electroforesis capilar (CE, del inglés *capillary electrophoresis*) [20]. Sin embargo, en este caso también, la aplicación de las técnicas mencionadas es cara, laboriosa y no portátil, lo que dificulta su aplicación para determinaciones de campo. En vista de lo anterior, un método simple y eficiente para la cuantificación de As(III) es un reto para los grupos de investigación en química analítica.

La detección y cuantificación de diferentes analitos mediante sensores colorimétricos basados en teléfonos inteligentes se ha convertido en una alternativa prometedora, ya que resulta accesible y fácil de usar [21]. Lima y colaboradores propusieron un analizador flow-batch que utiliza videos digitales para realizar valoraciones de forma automática [22]. Además, Andrade y colaboradores diseñaron un luminómetro basado en videos digitales para la detección quimioluminiscente de

cobre en una bebida destilada (cachazas) [23].

En los últimos años, las imágenes digitales han emergido como una herramienta prometedora en el campo de la química analítica, facilitando tanto el análisis cuantitativo como cualitativo [24–26]. Generalmente, los sistemas de detección de imágenes se componen de una fuente de iluminación, un dispositivo de captura (como cámaras digitales, cámaras web, escáneres, teléfonos móviles, entre otros) y un software para el procesamiento de datos. Por consiguiente, el análisis de las imágenes digitales se divide en dos etapas: la captura de la imagen y la extracción de la información relevante de las características de interés. Así, el análisis de la información obtenida a través del sensor utilizado para la captura de la imagen permite establecer una relación con la concentración del analito en una muestra. Este proceso implica el uso de modelos de color con el objetivo de especificar los colores de manera estandarizada y universalmente aceptada. Por lo tanto, para obtener una señal analítica característica del sistema bajo estudio, las imágenes digitales se descomponen en histogramas de color, los cuales describen la distribución estadística de los píxeles (número de píxeles) en función de la componente de color registrada. Los histogramas de color obtenidos de las imágenes digitales constituyen así la señal analítica distintiva del sistema en análisis.

Por lo tanto, el procesamiento de imágenes digitales resulta de gran interés en Química Analítica ya que permite obtener una señal basada en la intensidad de los canales rojo, verde y azul (RGB, del inglés *red, green and blue*), relacionándola con la concentración del analito, en lugar de utilizar la señal analítica proporcionada por un instrumento convencional [27]. Sin embargo, el espacio de color RGB trata los

tres colores por igual y sus componentes están muy interrelacionados. Esto supone un reto cuando se intenta predecir qué color de la imagen cambiará si se alteran uno o más de sus componentes. Como solución a este problema, se han desarrollado espacios de color alternativos, como YUV, YIQ, HSV y HSI. Estos espacios de color ofrecen diferentes enfoques para representar el color y pueden ser útiles en diversas tareas de procesamiento de imágenes. El modelo de color YIQ incluye tres elementos en los datos de la imagen. El componente inicial, conocido como luminancia (Y), captura los datos en escala de grises, mientras que los dos componentes restantes, tono (I) y saturación (Q), constituyen la crominancia (datos de color) [28]. Trabajar con el espacio de color YIQ en el análisis químico ofrece la importante ventaja de separar la luminancia (canal Y) de la crominancia (canales I y Q). Esto permite que el análisis se centre únicamente en la crominancia de la imagen, lo que minimiza la influencia de las variaciones en la fuente de luz.

La impresión tridimensional (3D) es una técnica de fabricación que transforma un objeto digital en un objeto físico de tres dimensiones. Este objeto digital es procesado para ser interpretado por la impresora y finalmente creado mediante técnicas como el modelado por deposición fundida (FDM, del inglés *fused deposition modeling*), la estereolitografía (SLA, del inglés *stereolithography*), o el sinterizado selectivo por láser (SLS, del inglés *selective laser sintering*).

Las impresoras más utilizadas a nivel mundial emplean la técnica FDM, en la que el material de impresión se presenta en forma de filamento. Este filamento es fundido por un fusor a una temperatura cercana a los 200°C y es empujado por un extrusor hacia una boquilla de diámetro conocido. Así, se deposita una capa de material fundido sobre una superficie y, una vez completada, el cabezal que

contiene el fusor se eleva una altura determinada para depositar una nueva capa. La acumulación de diversas capas de material genera una pieza con un volumen definido [29].

Inicialmente, el objeto debe estar digitalizado, lo que puede lograrse mediante software de diseño asistido por computadora o mediante un escáner 3D, el cual registra tridimensionalmente un objeto y genera una copia digital del mismo [30]. Una vez que el modelo está en formato digital, se realiza un proceso de laminado, en el cual se delimitan digitalmente capas muy finas superpuestas que, al ser apiladas, conforman el volumen tridimensional de la pieza. Posteriormente, se utiliza un software que adapta toda esta información en un archivo en formato G-Code, el cual contiene las instrucciones para que la impresora ejecute la impresión. Dicho archivo es introducido en la impresora mediante una memoria extraíble y, desde el panel de control de la impresora, se inicia la impresión.

En consecuencia, el uso de la tecnología de impresión 3D para el desarrollo de dispositivos acoplados a teléfonos inteligentes ha atraído la atención de la comunidad científica debido a sus ventajas, como el bajo coste, la ligereza y, sobre todo, la portabilidad que permite realizar determinaciones in situ [31–33].

Por otro lado, tal como se mencionó anteriormente, actualmente es esencial que los nuevos métodos analíticos desarrollados contemplen el concepto de Química Analítica Sostenible, que se centra en la obtención de procedimientos analíticos más respetuosos con el ambiente y más seguros para los operadores. Para ello, es fundamental tener en cuenta factores como la cantidad y toxicidad de los reactivos, la miniaturización y el número de pasos del proceso, entre otros. Para evaluar y apoyar la sostenibilidad de los métodos analíticos, se propusieron

diferentes métricas, como la calculadora Analytical GREENness (AGREE) [34], que ayudan a mantener la objetividad en la opinión sobre el método desarrollado.

En este capítulo se propone la determinación cinética colorimétrica de As(III) basada en el análisis digital de videos. Además, se describe el diseño y la construcción de un dispositivo sencillo y de bajo costo para su determinación utilizando una microplaca con multicubetas. La cuantificación se basó en el efecto de inhibición que ejerce el As(III) en el proceso de decoloración del naranja de metilo y su cambio de color en el tiempo. La sostenibilidad del método propuesto se evaluó mediante la métrica AGREE.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Reactivos y soluciones

Todos los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico. Las soluciones se prepararon utilizando agua ultrapura ($18 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). Se preparó una solución patrón madre de 1000 mg L^{-1} de As(III) disolviendo $0,1320 \text{ g}$ de óxido de arsénico (III) (Merck, Alemania) en agua hasta un volumen de $100,0 \text{ mL}$ y se almacenó en un frasco color caramelo a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Las soluciones patrón de trabajo se prepararon diariamente diluyendo el volumen apropiado de la solución madre con agua. Se preparó una solución de ácido clorhídrico $2,00 \text{ mol L}^{-1}$ (Anedra, Argentina). Se preparó una solución acidificada de naranja de metilo disolviendo $0,0100 \text{ g}$ de naranja de metilo (Merck, Alemania) en la solución de ácido clorhídrico hasta un volumen de $100,0 \text{ mL}$. Se preparó una solución de bromato de potasio (Merck, Alemania) $1,2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ pesando $0,2036 \text{ g}$ de la sal y diluyéndola con agua hasta

un volumen de 100,0 mL.

3.2.2 Aparatos y software

Para la construcción de las piezas se utilizó una impresora 3D Creality modelo Ender 3 (Shenzhen Creality 3D Technology Co., Shenzhen, China). El material de impresión fue ácido poliláctico (PLA, del inglés *polylactic acid*) en filamento negro de 1,75 mm (NTH, Chivilcoy, Argentina). Las piezas fueron diseñadas utilizando el software SolidWorks Premium 2019 (Dassault Systemes SolidWork Corporation, Suresnes, Francia). El software de laminado e impresión fue Ultimaker Cura versión 4.8.0 (Geldermassen, Países Bajos).

Se utilizó un smartphone Motorola Moto G5SPlus con una cámara integrada de 13 Mpx para capturar las imágenes. La cámara se operó con la aplicación móvil Framelapse 5.4 (Neximo Labs). Los vídeos se procesaron con FreeStudio v. 6.7.0.712 (DVDVideoSoft). Las imágenes individuales se procesaron con el programa ImageJ 1.53k de dominio público (Wayne Rasband y col., National Institutes of Health, MD, EE.UU. - <http://imagej.nih.gov/ij>) para extraer los canales del espacio de color RGB. A continuación, los datos se procesaron con una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 365 (Microsoft, Redmont, WA, EE.UU.). Para el procesamiento de datos se utilizó OriginPro 2021 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE. UU.).

Para la evaluación de la sostenibilidad del método, se utilizó el software AGREE, que es libre y de código abierto.

3.2.3 Condiciones de impresión 3D

La técnica de impresión seleccionada para la fabricación de las distintas piezas fue la deposición de material fundido. El color del PLA fue negro para evitar la influencia de la luz externa en el procedimiento analítico. Los parámetros de impresión fueron los siguientes: 0,2 mm de altura de capa, 0,8 mm de espesor de pared, 20% de densidad de relleno, 200 °C de temperatura de la boquilla (fundición del PLA), 60 °C de cama de impresión, ventilador de capa encendido y 50,0 mm s⁻¹ de velocidad de impresión.

3.2.4 Dispositivo impreso en 3D

Se diseñó y desarrolló un dispositivo impreso en 3D para adquirir las imágenes digitales de forma reproducible (Fig. 3.2.1). Las dimensiones fueron 9,2 cm de ancho x 5,6 cm de profundidad x 15,0 cm de alto, y se construyeron varias ranuras a una altura de 4,5-7,5 cm para permitir variar las distancias entre la fuente de luz, las soluciones y el smartphone. Una tapa móvil permitió introducir el recipiente con las soluciones aislándolas de la luz exterior. El smartphone se acopló a la parte superior del dispositivo, y un orificio central de 2 mm de diámetro en su región superior permitió capturar las imágenes en condiciones de iluminación controlada. El dispositivo incluyó en la parte inferior quince diodos emisores de luz blanca fría (LED, del inglés *light emitting diode* - 0,24 W, 5 mm, 6500 K), alimentados por una fuente de corriente continua de 12 V y 3,7 A. Además, en las ranuras laterales del dispositivo se colocó un difusor de luz preparado con un papel adhesivo de vinilo blanco pegado a una lámina de acetato de celulosa para evitar la iluminación directa sobre las muestras. Como recipiente de las soluciones se utilizó una microplaca

transparente de poliestireno de 24 cubetas con una capacidad máxima de 300 μL cada una que se colocó sobre el difusor de luz utilizando este como soporte.



Figura 3.2.1 Detalles de los componentes del dispositivo impreso en 3D.

3.2.5 Método de inhibición de la decoloración

La determinación de As(III) se basó en el efecto inhibitor de esta especie sobre la decoloración de una solución de naranja de metilo causada por los productos de la reacción de oxido-reducción entre el bromato de potasio y el ácido clorhídrico (Fig. 3.2.2) [14].

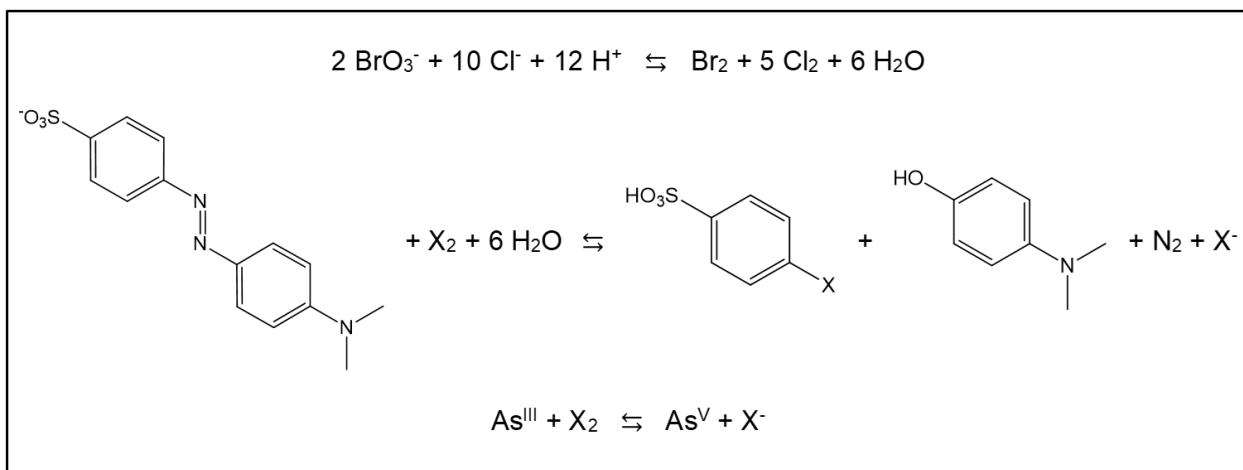


Figura 3.2.2 Reacciones implicadas en el método propuesto donde X puede ser Cl o Br .

Entonces, el bromato es reducido por iones cloruro en un medio ácido, produciendo bromo y cloro, que reaccionan con el naranja de metilo, decolorando la solución. La presencia de As(III) en el medio de reacción inhibe la decoloración del naranja de metilo, ya que reacciona con el bromo y el cloro generados. En consecuencia, la presencia de As(III) en el medio de reacción mantiene el color de la solución de naranja de metilo durante un tiempo determinado, definido como t_{in} . Así, el t_{in} es proporcional a la concentración de As(III) presente en la muestra, y se estima a partir del parámetro "d", que se describe más adelante.

3.2.6 Captura y procesamiento de imágenes

El proceso de decoloración se monitoreó mediante imágenes digitales. Un *framelapse*, definido como una serie de imágenes en función del tiempo que forman un video, se obtuvo utilizando la aplicación Framelapse 5.4. Este programa permitió configurar el tiempo entre dos fotogramas consecutivos de un video, y así, reducir el

tamaño del archivo final obtenido al filmar durante un largo período de tiempo. Las configuraciones de la aplicación fueron: 0,5 s de intervalo entre fotogramas, 15 min de grabación, resolución de video Full High Definition (FHD) 1080p, autoenfoco en modo infinito, balance de blancos luz día-nublado y -2 EV de exposición. A continuación, una vez extraídos los fotogramas del video, las imágenes adquiridas en formato JPG se procesaron con el software ImageJ. Se eligió una región de interés (ROI, del inglés *region of interest*) cuadrada de 900 píxeles situada en el centro de cada cubeta. En esta zona el color de la solución era homogéneo, y se obtuvo la información media de los canales rojo (R), verde (G) y azul (B) de cada ROI en función del tiempo. Posteriormente, los valores medios RGB, previamente normalizados dividiendo cada canal por un factor de 255, se convirtieron al espacio de color YIQ utilizando la siguiente matriz:

$$\begin{bmatrix} Y \\ I \\ Q \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0,299 & 0,587 & 0,114 \\ 0,595716 & -0,274453 & -0,321263 \\ 0,211456 & -0,522591 & 0,311135 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} R \\ G \\ B \end{bmatrix}$$

Los valores medios de I y Q obtenidos se utilizaron en la siguiente ecuación:

$$d = \sqrt{(I - I_0)^2 + (Q - Q_0)^2}$$

donde "I" y "Q" son los valores a un tiempo de reacción determinado, e "I₀" y "Q₀" son los valores derivados de la primera imagen captada por el dispositivo (imagen a 85,0 s). El parámetro "d", seleccionado como respuesta analítica, es una estimación de la diferencia entre el color inicial de la solución y el color a un determinado tiempo de reacción. De este modo, graficando la señal analítica "d" en función del tiempo de reacción, es posible obtener el tiempo de inhibición de la reacción (t_{in}) cuando la señal analítica aumenta significativamente. El t_{in} es proporcional a la

concentración de As(III) presente en las muestras.

3.2.7 Procedimiento

Todas las soluciones se estabilizan a temperatura ambiente. Para la determinación de As(III), se coloca en una de las cubetas de la placa una alícuota de 25 μ L de agua ultrapura. A continuación, se añade 175 μ L de la solución de muestra y 50 μ L de solución acidificada de naranja de metilo. Este procedimiento se repite en cada cubeta (24 en total). A continuación, la grabación del video comienza justo después de la primera adición de los 50 μ L de solución de bromato de potasio en la primera cubeta (Fig. 3.2.3). De esta manera, los primeros 85 s (tiempo necesario para llenar los 24 pocillos e introducir la microplaca en el dispositivo) de la grabación no tienen ninguna información de interés, ya que la microplaca aún no se ha colocado en el dispositivo. Una vez llenos todas las cubetas, se coloca la microplaca en el dispositivo de captura, encima del difusor de luz. Es importante señalar que la solución de bromato de potasio se añade a diferentes tiempos, lo que debe tenerse en cuenta en los cálculos posteriores para obtener la señal analítica "d". El vídeo se guarda con extensión mp4 y, posteriormente, se analizan los fotogramas correspondientes tal y como se ha descrito.

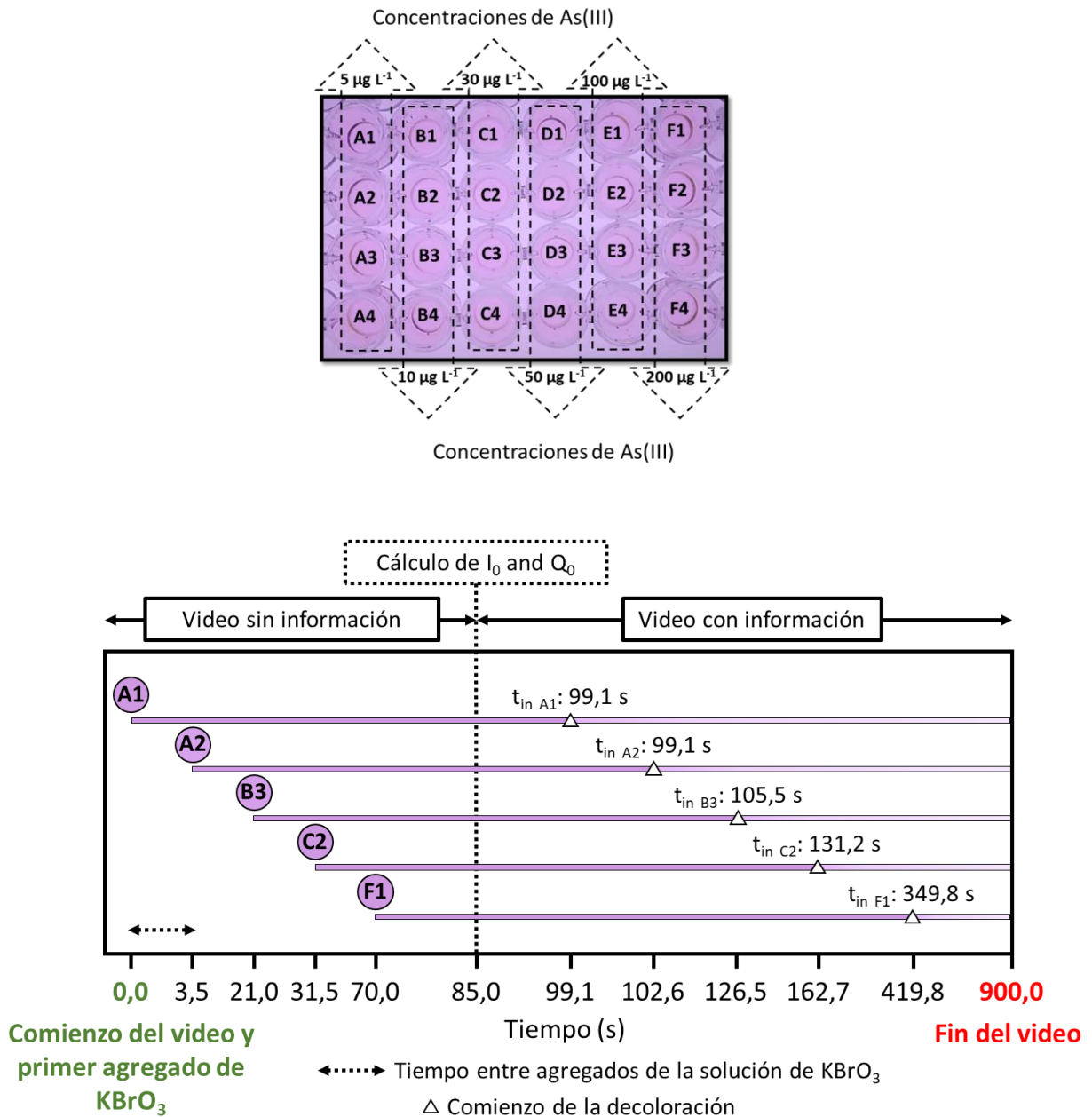


Figura 3.2.3 En la parte superior, se muestra una imagen de los 24 sitios de reacción con diferentes concentraciones de As(III). En la parte inferior, se presenta la secuencia operativa como ejemplo para cinco sitios de reacción. Es importante señalar que las muestras A1 y A2 presentaron el mismo t_{in} aunque la solución de $KBrO_3$ se añadió a tiempos diferentes (0 y 3,5 s, respectivamente). Para una mejor comprensión, el eje temporal se graduó convenientemente para cubrir todo el tiempo de análisis (900 s).

3.2.8 Preparación de la muestra

Se recolectaron cuatro muestras de agua de pozo en botellas de polipropileno, previamente lavadas con una solución de ácido nítrico al 10% (m/m) durante 24 h y enjuagadas minuciosamente con agua ultrapura antes de su uso. Las mismas fueron obtenidas de diferentes sitios de muestreo en la región de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina, en noviembre de 2021. Todas las muestras se filtraron a través de un filtro de membrana de acetato de celulosa de 0,45 μm de tamaño de poro y se almacenaron a 4 °C hasta el análisis de las imágenes digitales.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Optimización

3.3.1.1 Optimización de variables químicas

Como ya se ha mencionado, el cloro y el bromo reaccionan con el grupo azo del naranja de metilo decolorando la solución. Sin embargo, la presencia de As(III) inhibe esta reacción. La concentración de los reactivos se optimizó de forma univariada. Los criterios de optimización se basaron en la repetibilidad (RSD%, del inglés *percentage relative standard deviation*) del t_{in} debido a la variación significativa de este parámetro en diferentes condiciones de reacción. La concentración de ácido clorhídrico se estudió en el intervalo de 0,5 a 3,0 mol L⁻¹, y el valor óptimo fue de 2,1 mol L⁻¹. La concentración de bromato potásico se estudió entre 6,0 x 10⁻³ y 3,0 x 10⁻² mol L⁻¹, y el valor óptimo fue 1,2 x 10⁻² mol L⁻¹. En todos los experimentos se utilizó una solución de naranja de metilo con una concentración de 3,1 x 10⁻⁴ mol L⁻¹. Por otra parte, se varió el orden de adición de la solución

patrón/muestra, el agua y la solución de naranja de metilo acidificada, manteniendo la adición de la solución de bromato de potasio al final. A continuación, se evaluaron los seis posibles órdenes de adición sin observarse diferencias significativas en el t_{in} . Por lo tanto, el orden de adición seleccionado para los experimentos siguientes fue: agua-solución patrón/muestra-solución de naranja de metilo acidificada-solución de bromato de potasio.

3.3.1.2 Optimización de la captura de imagen

Se estudiaron diferentes parámetros del teléfono móvil, como el enfoque automático, el balance de blancos y la exposición, para establecer las mejores condiciones operativas. Como puede observarse en la Tabla 1, el menor RSD% calculado a partir de réplicas del t_{in} ($n = 3$) se obtuvo utilizando el autoenfoco en modo infinito, la luz del día nublado como balance de blancos y -2 EV de compensación de exposición. Además, se evaluaron diferentes distancias entre la fuente de luz y el difusor de luz, obteniéndose mejor repetibilidad cuando el difusor de luz se situaba en la ranura inferior del dispositivo. Por otro lado, la máxima información de cada cubeta para realizar el procesado de la imagen se obtuvo cuando se seleccionó un ROI de 900 píxeles.

Tabla 1. Optimización de los parámetros de captura de imagen. Los valores de RSD% se calcularon a partir de tres réplicas.

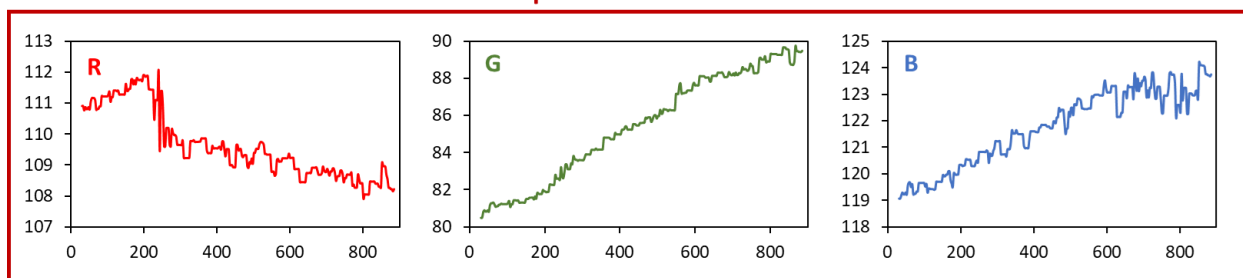
Parámetro	Modo	RSD%
Enfoque	infinito	3,5
	automático	5,5
	macro	7,8
	video continuo	8,2
Balance de blancos	luz de día	2,9
	luz de día-nublado	2,5
	penumbra	3,5
	sombreado	3,1
Compensación de la exposición (EV)	1	3,3
	0	2,8
	-1	3,5
	-2	2,2

3.3.2 Procesamiento de imagen

3.3.2.1 Conversión de RGB a YIQ

Los valores medios normalizados del espacio de color RGB se convirtieron al espacio de color YIQ. De este modo, la luminancia (canal Y) puede separarse de la crominancia (canales I y Q) reduciendo el efecto de la variación que se produce en la fuente de luz. La Fig. 3.3.1 muestra los canales R, G, B, Y, I y Q en función del tiempo (en segundos) al analizar las imágenes correspondientes a una solución patrón de $75 \mu\text{g As(III) L}^{-1}$. Paralelamente, se calculó el parámetro "d" mediante la ecuación correspondiente y se representó gráficamente en función del tiempo (en segundos).

Espacio de color RGB



Espacio de color YIQ

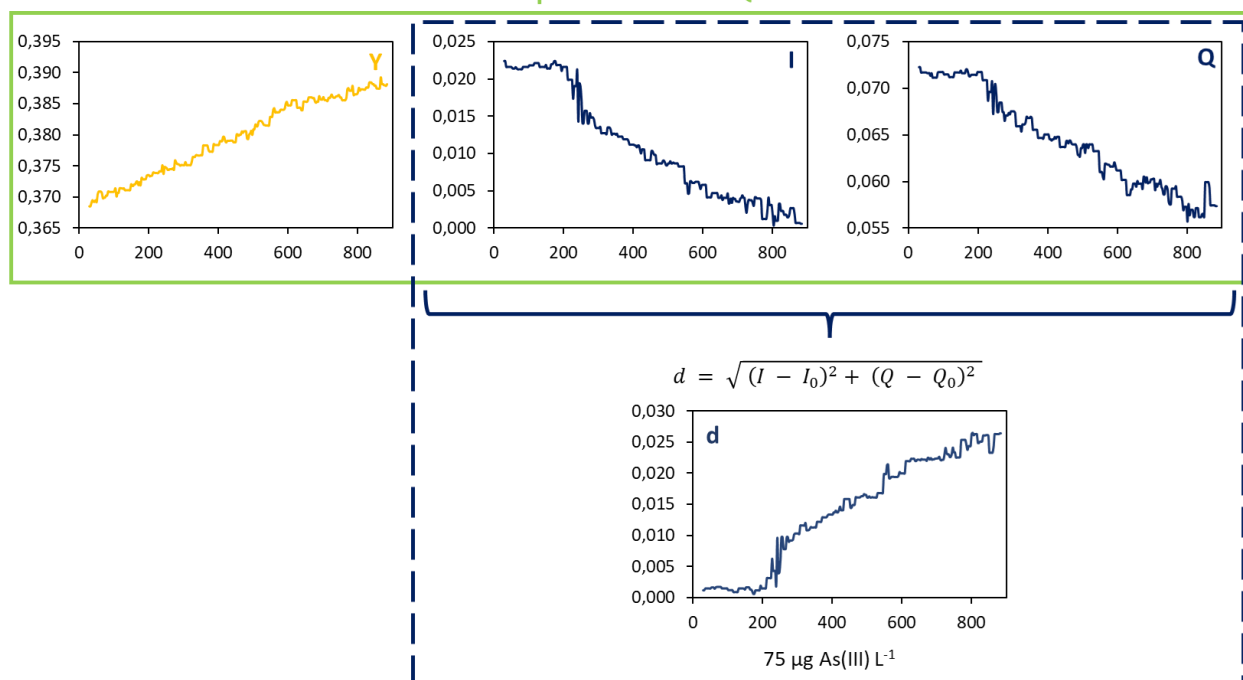


Figura 3.3.1 Conversión del espacio de color RGB a YIQ para obtener la señal analítica "d" para una solución patrón de $75 \mu\text{g As(III) L}^{-1}$. Todos los ejes de abscisas se expresan como tiempo en segundos.

3.3.2.2 Cálculo del tiempo de inhibición

Como se describió anteriormente, el t_{in} se obtuvo a partir de la curva "d". Previamente, la curva "d" se suavizó para reducir el ruido aleatorio con el objetivo de

aumentar la relación señal-ruido. A continuación, se utilizó el método de promediado adyacente (AAv, del inglés *adjacent-averaging*) con una ventana de treinta puntos (Fig. 3.3.2) [35].

Normalmente, el t_{in} puede calcularse igualando las ecuaciones de regresión de las partes lineales del gráfico absorbancia-tiempo [14]. Sin embargo, de esta forma, el tiempo de inhibición depende de cuántos y qué puntos se utilicen en su cálculo. En cambio, cuando se utiliza la segunda derivada, este cálculo es completamente objetivo, ya que se utilizan todos los valores de señal obtenidos en función del tiempo. En este caso, el tiempo de inhibición se calculó utilizando el máximo local de la segunda derivada de la función suavizada en las proximidades del tiempo de inhibición de la reacción, donde la respuesta analítica suavizada "d" aumenta bruscamente (Fig. 3.3.2). Como puede observarse, se obtuvo un máximo a los 226,5 s.

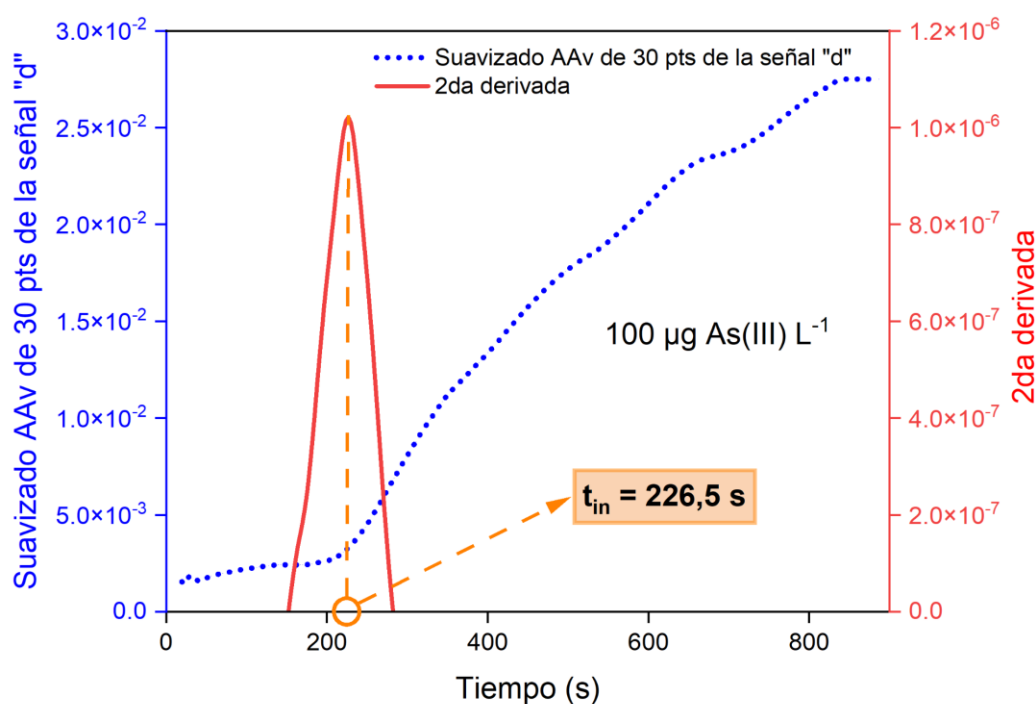


Figura 3.3.2 Curva suavizada de la respuesta analítica "d" en función del tiempo y obtención del tiempo de inhibición de la reacción (t_{in}) para una solución patrón de $100 \mu\text{g As(III) L}^{-1}$.

3.3.3 Performance analítica

Se estableció un gráfico de calibración del t_{in} frente a la concentración de As(III) aplicando regresión lineal univariada ($n = 8$; g.l.= 30). El intervalo de concentración fue de 5 a $200 \mu\text{g L}^{-1}$. La ecuación de regresión fue $t_{in} = (1,286 \pm 0,017) [\mu\text{g As(III) L}^{-1}] + (92,637 \pm 1,746)$ con un coeficiente de correlación de 0,9995. El límite de detección (LOD) fue de $1,47 \mu\text{g L}^{-1}$, y el límite de cuantificación (LOQ) fue de $4,44 \mu\text{g L}^{-1}$, ambos estimados como 3,3 y 10 veces la desviación estándar del blanco, respectivamente [36]. La precisión en condiciones de repetibilidad, expresada como RSD% para una concentración de As(III) de $75 \mu\text{g L}^{-1}$, fue del 1,2% ($n = 4$), mientras que el RSD% para la precisión en condiciones precisión intermedia

fue del 2,7% para la misma solución ($n = 4$), medida en cuatro días diferentes.

3.3.4 Análisis de muestras reales

Para evaluar la aplicabilidad del método propuesto, se analizaron las cuatro muestras de agua ambiental citadas anteriormente. Como se puede observar en la Tabla 2, el rango de concentraciones de As(III) en las muestras analizadas varió de 13,4 a 37,8 $\mu\text{g L}^{-1}$, es decir, todas las concentraciones de As(III) fueron superiores a los límites de 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ para agua potable establecidos por la OMS [3]. Estos resultados eran de esperar, ya que las muestras procedían de zonas con altas concentraciones de arsénico.

Tabla 2. Determinación de As(III) en muestras de agua subterránea aplicando el método propuesto.

Muestra	As(III) ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Recuperación (%)
	Añadido	Encontrado ($\bar{X} \pm s$) ^a	
LE1	0	25,3 \pm 1,1	-
	50	72,4 \pm 1,8	94,3
	100	123,8 \pm 1,2	98,5
	150	172,4 \pm 1,7	98,1
LM2	0	13,4 \pm 2,7	-
	50	64,5 \pm 0,9	102,3
	100	111,2 \pm 2,3	97,8
	150	163,9 \pm 1,2	100,4
P11	0	17,1 \pm 1,6	-
	50	65,0 \pm 1,4	95,9
	100	116,5 \pm 1,6	99,4
	150	169,5 \pm 1,0	101,6
P33	0	37,8 \pm 2,9	-
	50	89,8 \pm 1,5	104,0
	100	139,5 \pm 1,7	101,7
	150	186,9 \pm 0,6	99,4

^a Las muestras se analizaron por cuadruplicado (n = 4).

3.3.5 Validación

La veracidad del método propuesto se evaluó mediante un estudio de

recuperación. A continuación, las muestras se enriquecieron ($n = 4$) añadiendo una solución estándar de As(III) a tres niveles de concentración (50, 100, 150 $\mu\text{g As(III) L}^{-1}$) [37]. Como se muestra en la Tabla 2, la recuperación de As(III) estuvo en el rango de 94,3%-104,0%. Además, se realizó una regresión entre las concentraciones añadidas y las concentraciones recuperadas aplicando el método de mínimos cuadrados ordinarios (OLS). La recta de regresión obtenida fue $y = 1,0085 x - 1,0704$ con un coeficiente de correlación de 0,9981. La ordenada al origen y la pendiente estimados se compararon con los valores teóricos de 0 y 1, respectivamente, utilizando la prueba de la región elíptica de confianza conjunta (EJCR, del inglés *elliptical joint confidence region*) [38]. Como puede observarse en la Fig. 3.3.3, la EJCR, centrada en los valores de pendiente y ordenada al origen de la recta de regresión, incluyó al punto teórico (0,1). Estos resultados indican que no existe diferencia estadística significativa entre los valores nominales y los recuperados, considerando un nivel de significación del 5%.

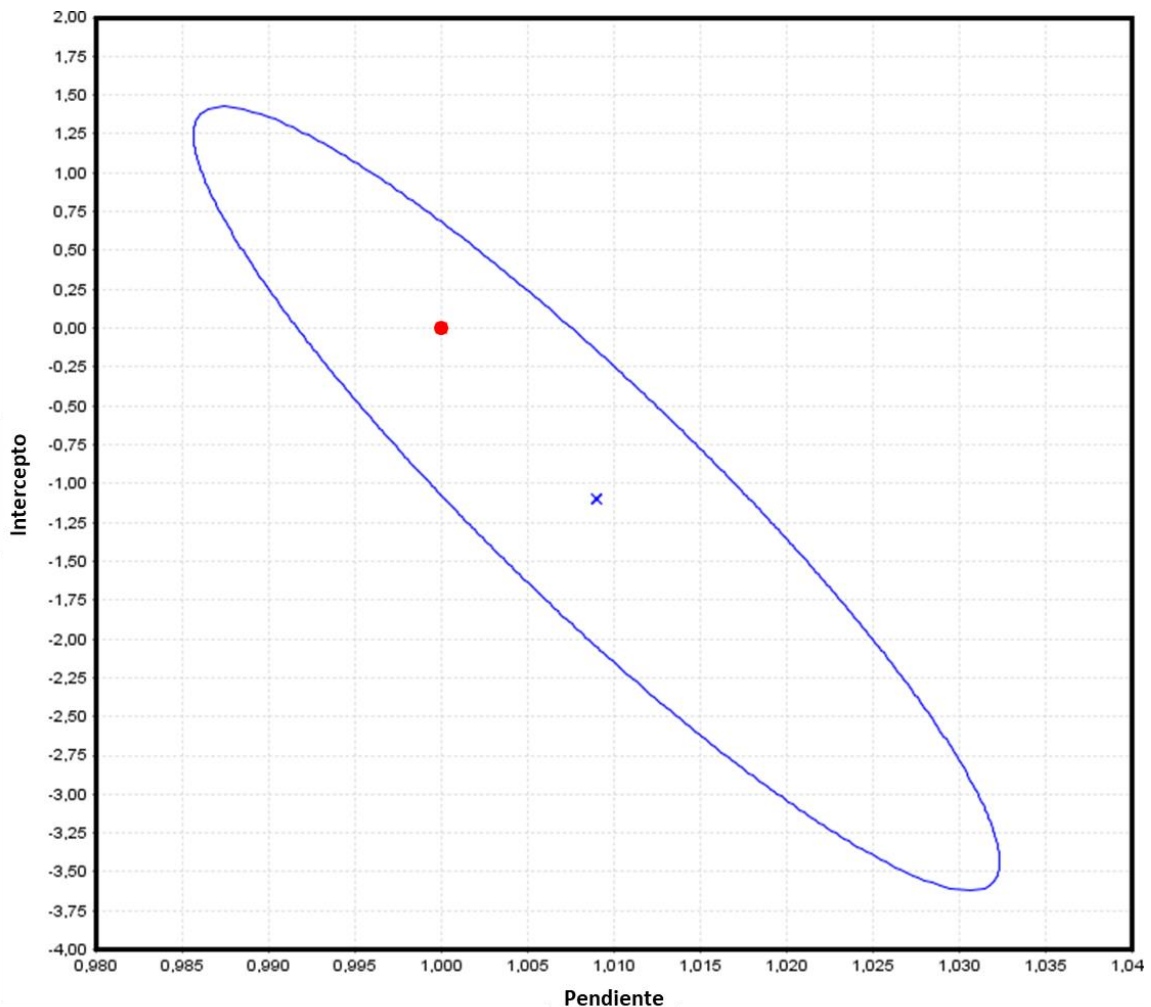


Figura 3.3.3 Región elíptica de confianza conjunta (EJCR) para las concentraciones de As(III) adicionadas y recuperadas por el método propuesto ($n = 48$). (●) Valor teórico de ordenada al origen y pendiente (0,1). (x) Valores obtenidos para la pendiente y la ordenada al origen.

3.3.6 Ensayos de interferencia

La selectividad del método propuesto se estudió evaluando diferentes cationes y aniones que pueden actuar como potenciales interferentes y suelen estar presentes en las muestras de agua analizadas. Los niveles de concentración de los mismos fueron seleccionados considerando los niveles de concentración usuales para estos iones en agua de pozo en la región de Bahía Blanca [39,40]. Así, se

evaluaron cationes como sodio (hasta 5000 mg L⁻¹), amonio (hasta 0,20 mg L⁻¹), potasio (hasta 2000 mg L⁻¹), calcio (hasta 356 mg L⁻¹), magnesio (hasta 200 mg L⁻¹), cobre(II) (hasta 3,2 mg L⁻¹), aluminio (hasta 1,62 mg L⁻¹), arsénico(V) (hasta 1 mg L⁻¹) y cadmio (hasta 0,005 mg L⁻¹). Del mismo modo, se examinaron el sulfato (hasta 400 mg L⁻¹), el fosfato y el bicarbonato (hasta 356 mg L⁻¹), el carbonato (hasta 322 mg L⁻¹), el cloruro (hasta 150 mg L⁻¹), el nitrato (hasta 45 mg L⁻¹) y el fluoruro (hasta 6,6 mg L⁻¹). La concentración de As(III) obtenida analizando una solución de 100 µg L⁻¹ de As(III) en presencia y ausencia de los iones mencionados anteriormente se representó gráficamente y se comparó mediante una prueba t (Fig. 3.3.4). Los valores t obtenidos se muestran dentro de las barras del gráfico de la Fig. 3.3.4, y no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las soluciones de control y los interferentes estudiados en ninguno de los experimentos.

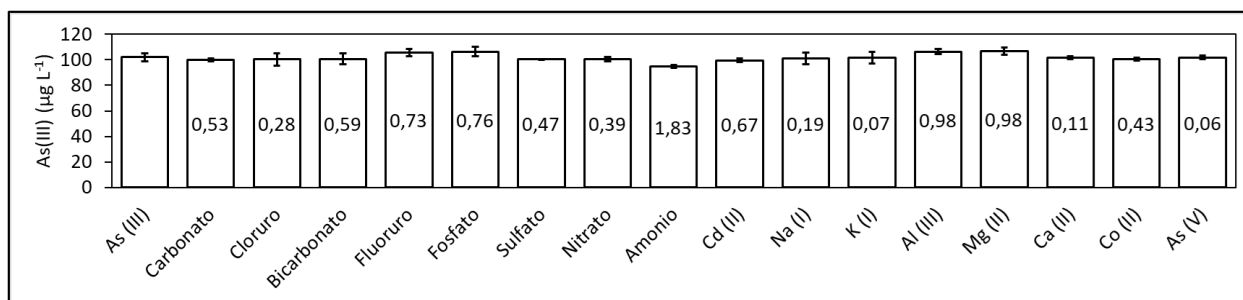


Figura 3.3.4 Evaluación de diferentes cationes y aniones como posibles interferentes. Los valores t (dentro de las barras) se calcularon con 3 réplicas para ambas soluciones con los diferentes interferentes y la solución de control (solución de 100 µg As(III) L⁻¹). El valor t crítico fue de 2,13 (g.l. = 4; P = 0,05).

3.3.7 Evaluación del verdor y comparación con otros métodos

La métrica AGREE se aplicó al método propuesto y a otros métodos que

utilizan imágenes digitales para realizar la determinación de arsénico. En todos los casos, se mantuvieron constantes los pesos asignados a los 12 principios de la Química Analítica Sostenible. Los pictogramas resultantes para los diferentes métodos se representan en la Fig. 3.3.5, alcanzando el método propuesto una puntuación óptima de 0,84, en contraste con las obtenidas por los otros trabajos en los cuales se obtuvo valores menores a 0,50.

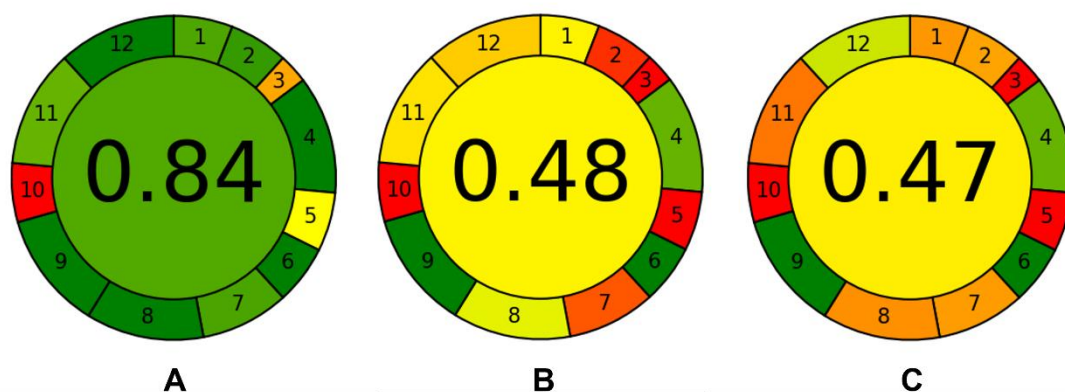


Figura 3.3.5 Análisis comparativo utilizando la métrica AGREE para la determinación de arsénico mediante imágenes digitales. A: método propuesto. B: [41]. C: [42].

La metodología propuesta tiene una puntuación alta en al menos 9 de los 12 principios, como se refleja en el contorno de color del pictograma (Fig. 3.3.5 A). El método propuesto permite el procedimiento de preparación de la muestra en un número reducido de pasos (principio 4) con sólo 300 μL de residuo por análisis (principio 7). Además, se pueden analizar 96 muestras por hora (principio 8). El consumo de energía de un solo análisis fue de solo $1,6 \times 10^{-4}$ kWh (principio 9). Se utilizó una cantidad muy baja ($7,4 \times 10^{-4}$ g) de reactivos tóxicos (principio 11). Por

último, no se presentaron amenazas al utilizar el método, aumentando así la seguridad del operador (principio 12). Por lo tanto, a partir de los resultados mencionados, se puede concluir que el método propuesto es una excelente opción sustentable para la determinación de arsénico en muestras de agua.

3.4 Conclusiones parciales

En este trabajo se llevó a cabo el diseño, desarrollo y optimización de un sistema para la determinación de arsénico (III) en muestras de agua ambiental mediante el análisis de imágenes digitales. El método presenta límites de detección y cuantificación que se ajustan a los valores establecidos como máximos por la Organización Mundial de la Salud. Además, en sólo 15 minutos se pueden analizar 6 muestras por cuadruplicado y generando, como resultado de la miniaturización del método, sólo 300 microlitros de residuos por sitio de reacción.

La combinación de la impresión 3D y el análisis digital de imágenes permitió desarrollar un método sencillo, portátil, económico y respetuoso con el ambiente para la determinación de As(III) en muestras de aguas subterráneas. Las imágenes proporcionadas por un smartphone acoplado a un dispositivo impreso en 3D se procesaron y correlacionaron con éxito con la concentración de As(III) utilizando un nuevo parámetro que considera la crominancia y elimina la luminancia del espacio de color, lo que hizo posible la determinación del tiempo de inhibición de la reacción. Además, se puede fotografiar un elevado número de muestras y, en consecuencia, analizarlas al mismo tiempo utilizando la microplaca de 24 cubetas, lo que genera un volumen mínimo de residuos y reduce el tiempo de análisis. Un punto a destacar es que la especiación se alcanzó a través de la determinación de As(III), que es la

especie más tóxica del arsénico, demostrando la alta selectividad del método. Además, el método propuesto se ajusta a los principios de la Química Analítica Sostenible. Su sostenibilidad fue evaluada aplicando la métrica AGREE resultando 1,7 veces más verde que otros trabajos publicados con similar detección. Este aspecto es de vital importancia ya que los métodos tradicionales producen AsH_3 (altamente tóxico) como residuo de la determinación.

Estas características hacen de este método una excelente oportunidad para ampliar el control del agua en comunidades de bajos ingresos y lugares remotos donde no es posible acceder a laboratorios de control de calidad.

3.5 Referencias

- [1] G. Genchi, G. Lauria, A. Catalano, A. Carocci, M.S. Sinicropi, Arsenic: A Review on a Great Health Issue Worldwide, *Applied Sciences* 2022, Vol. 12, Page 6184 12 (2022) 6184. <https://doi.org/10.3390/APP12126184>.
- [2] D.K. Nordstrom, Worldwide occurrences of arsenic in ground water, *Science* (1979) 296 (2002). <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1072375/ASSET/9AC744CC-B82E-442D-9357-6A8BBA6AEA18/ASSETS/SCIENCE.1072375.FP.PNG>.
- [3] WHO, Guidelines for drinking-water quality, 4th ed., World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2011.
- [4] A.H. Hamidian, N. Razeghi, Y. Zhang, M. Yang, Spatial distribution of arsenic in groundwater of Iran, a review, *J Geochem Explor* 201 (2019) 88–98. <https://doi.org/10.1016/J.GEXPLO.2019.03.014>.

- [5] P. Ziarati, V. Vambol, S. Vambol, Use of inductively coupled plasma optical emission spectrometry detection in determination of arsenic bioaccumulation in *Trifolium pratense* L. from contaminated soil, *Ecological Questions* 31 (2019) 15–22. <https://doi.org/10.12775/EQ.2020.003>.
- [6] Z. Ma, L. Lin, M. Wu, H. Yu, T. Shang, T. Zhang, M. Zhao, Total and inorganic arsenic contents in seaweeds: Absorption, accumulation, transformation and toxicity, *Aquaculture* 497 (2018) 49–55. <https://doi.org/10.1016/J.AQUACULTURE.2018.07.040>.
- [7] A. Aullón Alcaine, C. Schulz, J. Bundschuh, G. Jacks, R. Thunvik, J.P. Gustafsson, C.M. Mörth, O. Sracek, A. Ahmad, P. Bhattacharya, Hydrogeochemical controls on the mobility of arsenic, fluoride and other geogenic co-contaminants in the shallow aquifers of northeastern La Pampa Province in Argentina, *Science of The Total Environment* 715 (2020) 136671. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2020.136671>.
- [8] C.R. Sanger, O.F. Black, The Quantitative Determination of Arsenic by the Gutzeit Method, *Proceedings of the American Academy of Arts and Sciences* 43 (1907) 297. <https://doi.org/10.2307/20022326>.
- [9] V. Vašák, V. Šedivec, Colorimetric determination of arsenic, *Collect Czechoslov Chem Commun* 18 (1953) 64–72. <https://doi.org/10.1135/CCCC19530064>.
- [10] V. Lenoble, V. Deluchat, B. Serpaud, J.C. Bollinger, Arsenite oxidation and arsenate determination by the molybdene blue method, *Talanta* 61 (2003) 267–276. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(03\)00274-1](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(03)00274-1).

- [11] I. Alekseeva, L. V. Kurtova, Kinetic Determination of Trace Amount of Arsenic with Amperometric Reaction Rate Detection, *Zh. Anal. Khim.* 43 (1988) 1149–1452.
- [12] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, Indirect kinetic determination of As(III) based on its accelerating effect on the Os(VIII)-catalysed reaction between iodide and bromate in a micellar medium, *Fresenius J Anal Chem* 342 (1992) 327–332. <https://doi.org/10.1007/BF00322179/METRICS>.
- [13] A.E. Burgess, J.M. Ottaway, A kinetic method for the determination of arsenic(III), antimony(III) and ascorbic acid, *Analyst* 97 (1972) 357–362. <https://doi.org/10.1039/AN9729700357>.
- [14] A. Afkhami, T. Madrakian, A.A. Assl, Kinetic-spectrophotometric determination of trace amounts of As(III) based on its inhibitory effect on the redox reaction between bromate and hydrochloric acid, *Talanta* 55 (2001) 55–60. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(01\)00391-5](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(01)00391-5).
- [15] M. Shirani, S. Habibollahi, A. Akbari, Centrifuge-less deep eutectic solvent based magnetic nanofluid-linked air-agitated liquid–liquid microextraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometry for simultaneous determination of cadmium, lead, copper, and arsenic in food samples and non-alcoholic beverages, *Food Chem* 281 (2019) 304–311. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2018.12.110>.
- [16] M. Zhang, X. Ma, J. Li, R. Huang, L. Guo, X. Zhang, Y. Fan, X. Xie, G. Zeng, Enhanced removal of As(III) and As(V) from aqueous solution using ionic liquid-modified magnetic graphene oxide, *Chemosphere* 234 (2019) 196–203. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.06.057>.

- [17] J.M. Liu, X.Z. Wang, C.Y. Zhao, J.L. Hao, G.Z. Fang, S. Wang, Fabrication of porous covalent organic frameworks as selective and advanced adsorbents for the on-line preconcentration of trace elements against the complex sample matrix, *J Hazard Mater* 344 (2018) 220–229. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.10.013>.
- [18] X. Mao, B. Chen, C. Huang, M. He, B. Hu, Titania immobilized polypropylene hollow fiber as a disposable coating for stir bar sorptive extraction–high performance liquid chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry speciation of arsenic in chicken tissues, *J Chromatogr A* 1218 (2011) 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2010.10.103>.
- [19] A. Namera, A. Takeuchi, T. Saito, S. Miyazaki, H. Oikawa, T. Saruwatari, M. Nagao, Sequential extraction of inorganic arsenic compounds and methyl arsenate in human urine using mixed-mode monolithic silica spin column coupled with gas chromatography-mass spectrometry, *J Sep Sci* 35 (2012) 2506–2513. <https://doi.org/10.1002/JSSC.201200325>.
- [20] H.G. Lee, J.Y. Kwon, D.S. Chung, Sensitive arsenic speciation by capillary electrophoresis using UV absorbance detection with on-line sample preconcentration techniques, *Talanta* 181 (2018) 366–372. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.01.034>.
- [21] S. Di Nonno, R. Ulber, Smartphone-based optical analysis systems, *Analyst* 146 (2021) 2749–2768. <https://doi.org/10.1039/D1AN00025J>.
- [22] R.A.C. Lima, L.F. Almeida, W.S. Lyra, L.A. Siqueira, E.N. Gaião, S.S.L. Paiva Junior, R.L.F.C. Lima, Digital movie-based on automatic titrations, *Talanta* 147

(2016) 226–232. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.09.053>.

[23] R.A.N. Andrade, F.A.S. Cunha, S.I.E. Andrade, P.L.A. Junior, L.A.O. Navarro, W.S. Lyra, A.G.G. Pessoa, R.A.C. Lima, M.C.U. Araujo, A digital capture movie-based robotized Flow-batch luminometer for in-line magnetic nanoparticle solid phase extraction and chemiluminescent measurement, *Microchemical Journal* 153 (2020) 104387. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2019.104387>.

[24] M. Rezazadeh, S. Seidi, M. Lid, S. Pedersen-Bjergaard, Y. Yamini, The modern role of smartphones in analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 118 (2019) 548–555. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2019.06.019>.

[25] K.E. McCracken, J.Y. Yoon, Recent approaches for optical smartphone sensing in resource-limited settings: a brief review, *Analytical Methods* 8 (2016) 6591–6601. <https://doi.org/10.1039/C6AY01575A>.

[26] M. Pohanka, Photography by Cameras Integrated in Smartphones as a Tool for Analytical Chemistry Represented by an Butyrylcholinesterase Activity Assay, *Sensors* 2015, Vol. 15, Pages 13752-13762 15 (2015) 13752–13762. <https://doi.org/10.3390/S150613752>.

[27] V. V. Apyari, M. V. Gorbunova, A.I. Isachenko, S.G. Dmitrienko, Y.A. Zolotov, Use of household color-recording devices in quantitative chemical analysis, *Journal of Analytical Chemistry* 72 (2017) 1127–1137. <https://doi.org/10.1134/S106193481711003X/METRICS>.

[28] H. Ullah, B. Ullah, L. Wu, F.Y.O. Abdalla, G. Ren, Y. Zhao, Multi-modality medical images fusion based on local-features fuzzy sets and novel sum-modified-Laplacian in non-subsampled shearlet transform domain, *Biomed Signal Process*

Control 57 (2020) 101724. <https://doi.org/10.1016/J.BSPC.2019.101724>.

[29] H.N. Chan, M.J.A. Tan, H. Wu, Point-of-care testing: applications of 3D printing, *Lab Chip* 17 (2017) 2713–2739. <https://doi.org/10.1039/C7LC00397H>.

[30] B. Gross, S.Y. Lockwood, D.M. Spence, Recent advances in analytical chemistry by 3D printing, *Anal Chem* 89 (2017) 57–70. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.6B04344/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2016-043443_0008.JPEG.

[31] Z. Liu, Y. Zhang, S. Xu, H. Zhang, Y. Tan, C. Ma, R. Song, L. Jiang, C. Yi, A 3D printed smartphone optosensing platform for point-of-need food safety inspection, *Anal Chim Acta* 966 (2017) 81–89. <https://doi.org/10.1016/J.ACA.2017.02.022>.

[32] K. Danchana, P. Phansi, C. T. de Souza, S. L.C. Ferreira, V. Cerdà, Spectrophotometric system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber as a detection system, *Talanta* 206 (2020) 120250. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2019.120250>.

[33] M. Sargazi, M. Kaykhaii, Application of a smartphone based spectrophotometer for rapid in-field determination of nitrite and chlorine in environmental water samples, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 227 (2020) 117672. <https://doi.org/10.1016/J.SAA.2019.117672>.

[34] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal Chem* 92 (2020) 10076–10082. https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.0C01887/ASSET/IMAGES/LARGE/AC0C01887_0003.JPEG.

- [35] S.W. Choi, B.R. Kim, H.M. Lee, Y. Kim, H.S. Park, A Deformed Shape Monitoring Model for Building Structures Based on a 2D Laser Scanner, *Sensors* 2013, Vol. 13, Pages 6746-6758 13 (2013) 6746–6758. <https://doi.org/10.3390/S130506746>.
- [36] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier Science B. V., Amsterdam, The Netherlands, 1997.
- [37] M. Thompson, S.L.R. Ellison, R. Wood, Resulting from the Symposium on Harmonization of Quality Assurance Systems for Analytical Laboratories, *Pure Appl. Chem* 74 (2002) 4–5.
- [38] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays, *Talanta* 48 (1999) 729–736. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00271-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00271-9).
- [39] S. Farías, J.L. Fernández-Turiel, D. Gimeno, Arsénico en aguas superficiales y subterráneas del partido de Villarino, Provincia de Buenos Aires, Argentina, in: G. Galindo, J.L. Fernández-Turiel, Á. del R. Storniolo (Eds.), *Presencia de Flúor y Arsénico En Aguas Subterráneas*, 1era ed., Santa Rosa, La Pampa, Argentina, 2009: pp. 23–32.
- [40] C. Torres Carbonell, A. Lauric, G. De Leo, Á. Marinissen, C. Cerdá, Evaluación de la calidad de agua en la red intergrupala de extensión de los partidos de Bahía Blanca y Cnel. Rosales para el ajuste a sus diversos usos dentro de los establecimientos, INTA - Ministerio de Agroindustria (2015).
- [41] J.H. Leong, K.K. Ong, W.Y.W.M. Zin, F. Anwar, C.C. Teoh, J.I.A. Rashid, M.

Ahmad, Digital Image-Based Colorimetry for Enhancement of Arsenic(III) Determination, Asian Journal of Chemistry 30 (2018) 1451–1454. <https://doi.org/10.14233/AJCHEM.2018.21132>.

[42] S. Damirchi, T. Heidari, Evaluation of digital camera as a portable colorimetric sensor for low-cost determination of inorganic arsenic (III) in industrial wastewaters by chemical hydride generation assisted-Fe(III) – 1, 10-phenanthroline as a green color agent, Journal of the Iranian Chemical Society 15 (2018) 2549–2557. <https://doi.org/10.1007/S13738-018-1443-7/TABLES/3>.

**Capítulo 4: Evaluación de
sistemas eutécticos naturales en
material de referencia certificado
de sedimento (BCR[®]-701)**

4.1 Introducción

Los metales son constituyentes naturales de la corteza terrestre y si bien se pueden encontrar normalmente en el ambiente, la actividad antropogénica puede incrementar su concentración hasta niveles potencialmente peligrosos para el ser humano y el ambiente. Estos elementos no degradables pueden ser adsorbidos en material particulado y tienen la tendencia de acumularse y depositarse en los sedimentos, incluso pudiendo acumularse en la biota y biomagnificarse a través de la cadena trófica [1,2]. Los metales pueden afectar a los organismos bentónicos y a la cadena alimentaria, generando una amenaza para la salud humana [3]. Los metales se distribuyen a través de las fases del material sedimentario asociándose a este mediante diferentes mecanismos tales como intercambio iónico, adsorción/desorción, precipitación, complejamiento, entre otros. El comportamiento de estos contaminantes metálicos depende en gran medida de las variables fisicoquímicas, la descomposición de materia orgánica, lixiviación, entre otros, ya que se ve modificada la forma en la que el metal se vincula al sedimento [4]. Por ejemplo, los metales más disponibles/movilizables que se encuentran en la fracción intercambiable del sedimento pueden liberarse a la columna de agua con sólo un cambio en la fuerza iónica. En consecuencia, muchas veces la medida de la concentración total de metales en sedimentos para evaluar fuentes de contaminación natural o antropogénicas no es útil para obtener información relevante en estudios ambientales. Debido a esto, es necesario el desarrollo de métodos que evalúen no sólo el contenido total de metales en sedimentos, sino también su movilidad y disponibilidad ya que los efectos tóxicos de los elementos están determinados principalmente por sus especies móviles [5].

Unos de los primeros procedimientos de extracción secuencial (5 pasos) de

metales aplicado a sedimentos de agua dulce fue desarrollado por Tessier y colaboradores [6] y si bien permitió la evaluación de la biodisponibilidad y movilización de metales, la implementación generalizada trajo una serie de inconvenientes tales como la falta de especificidad en la remoción de elementos, la readsorción y posterior redistribución entre fases, la gran variabilidad en los parámetros experimentales, y la contaminación potencial que se vio favorecida con el aumento de pasos y tiempo requerido para realizar la extracción.

En 1987, el Programa Europeo de Normas, Medidas y Ensayos (SM&T, del inglés *European Standards, Measurement and Testing*), anteriormente la Oficina Comunitaria de Referencia (BCR, del inglés *Community Bureau of Reference*), da un paso trascendental al lanzar un proyecto para armonizar las medidas del contenido de metales traza extraíbles en suelos y sedimentos mediante esquemas de extracción secuencial [7]. En estos esquemas, los extractantes se aplican en orden creciente de reactividad de modo que las distintas fracciones sucesivas se corresponden con metales que poseen cada vez una movilidad menor [8]. Recién en 1993 se propuso un proceso de extracción secuencial de 3 etapas que se denominó BCR[®] [9] y permitió el desarrollo de un material de referencia certificado CRM 601 (del inglés, *Certified Reference Material*), sedimento del lago Maggiore, Italia, que constituyó la primera herramienta disponible para la validación de procesos de extracción secuencial [10]. Sin embargo, las fuentes de incertidumbre y gran variabilidad [11] en la aplicación de este procedimiento de extracción secuencial llevaron al desarrollo de un nuevo procedimiento BCR[®] de 3 pasos modificado con la consecuente producción de un material de referencia certificado, el BCR[®]-701, que certifica el valor de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en 3 etapas definidas operacionalmente donde se determinan los metales en las fracciones intercambiable

(F1), reducible (F2) y oxidable (F3), respectivamente [12]. Los metales asociados a estas tres fracciones se consideran provenientes de fuentes antropogénicas [13] mientras que los metales de origen litogénico se relacionan con la fracción residual (F4). Esta última fracción se obtiene digiriendo el último residuo con agua regia, o con una mezcla de ácidos fuertes que puede o no incluir al ácido fluorhídrico y se agregó al esquema a partir del requisito de la Organización Internacional de Estándares (ISO, del inglés *International Standard Organization*) para llevar a cabo la comprobación interna del proceso. De esta manera, la suma del metal extraído en las cuatro fracciones del esquema de extracción secuencial se compara con el contenido de metal obtenido a partir de la digestión de la muestra [14]. Sin embargo, a pesar de que este método optimizado de extracción secuencial brinda buenos resultados y ha sido ampliamente utilizado en estudios ambientales de suelos y sedimentos no deja de ser un método laborioso que requiere al menos 49 h incluyendo pasos de agitación y centrifugación para obtener las fracciones 1, 2 y 3, sin tener en cuenta el tiempo que lleva el posterior análisis mediante la técnica instrumental correspondiente. Es por esto que los esfuerzos de los investigadores se apoyan en diseñar variantes a este método con el objetivo de disminuir principalmente los tiempos de extracción [15–17].

En los últimos años, ha crecido enormemente el empleo de solventes eutécticos profundos naturales (NADES, del inglés *natural deep eutectic solvent*) en la etapa de preparación de muestra. La idea de un método analítico de extracción/preconcentración completamente sostenible empezó a considerarse una realidad alcanzable cuando surgen estos solventes verdes que se destacan por su buena biodegradabilidad, baja presión de vapor, nula volatilidad, baja toxicidad, nula inflamabilidad, buena estabilidad térmica, seguridad de manipulación, bajo costo,

facilidad de preparación, entre otras. Esto hace a los NADES excelentes candidatos para aplicarlos en las diferentes etapas del proceso analítico [18]. Un NADES se forma por la unión de un compuesto donador de hidrógenos y un aceptor, los cuales dan lugar a una superestructura, que al combinarse generan un compuesto con un punto de fusión menor al de los componentes individuales [19,20]. Estos solventes se componen generalmente por una mezcla de constituyentes celulares como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos y derivados de colina, cuyas principales fuerzas impulsoras, los enlaces de hidrógeno, permiten obtener mezclas cuyo punto de fusión es menor que el de sus componentes [21]. Los NADES se consideran solventes de propiedades fisicoquímicas ajustables debido al gran número de combinaciones que se pueden lograr variando sus componentes y proporciones. Esto genera un gran abanico de aplicaciones de estos sistemas eutécticos como agentes extractantes de una amplia variedad de analitos tales como compuestos fenólicos, saponinas, carotenoides, metales, entre otros, en diferentes tipos de muestras [22–25].

En este trabajo se propone el diseño y preparación de diferentes NADES para llevar a cabo la extracción de metales tales como Cd, Cu, Cr, Ni, Pb y Zn en un material de referencia certificado BCR[®]-701. Este método propone una alternativa que utiliza un solvente verde y reduce los tiempos del procedimiento de extracción secuencial BCR[®] modificado. Además, se aplicó el enfoque métrico AGREE a ambos métodos para evaluar de manera objetiva los procedimientos analíticos desde un punto de vista de la Química Analítica Sostenible.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Reactivos y soluciones

Todos los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico y las soluciones acuosas se prepararon con agua ultrapura ($18,0 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$). El ácido láctico (85-90%), la urea (99,0-100,5%) y el glicerol (99%) fueron obtenidos de Anedra (Argentina) mientras que de Cicarelli (Argentina) se adquirieron glucosa (99,0%), acetato de amonio ($\geq 96\%$), clorhidrato de hidroxilamina ($\geq 96\%$) y ácido acético glacial (100%). Cloruro de colina ($\geq 98\%$) y L-arginina ($\geq 98\%$) se adquirieron en Sigma (Alemania).

4.2.2 Aparatos, instrumentación y software

La preparación de los NADES se realizó en una placa calentadora con agitación magnética DLab (DLab Scientific, China) modelo MS-H280-Pro. Por otro lado, las propiedades físicas de los extractantes se midieron usando un viscosímetro Brookfield (Brookfield Engineering Laboratories, Estados Unidos) modelo DV-II+ operado a $23,3 \text{ }^\circ\text{C}$ y 50 rpm, y un conductímetro Adwa As204 (Adwa Instruments, Hungría).

El análisis de los elementos Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn, se llevó a cabo por medio de un espectrómetro de emisión óptica con plasma inducido por microondas MIP-OES (del inglés, *microwave induced plasma optical emission spectrometry*) Agilent (Estados Unidos) modelo MP 4100 equipado con un monocromador Czerny-Turner y un detector con un arreglo de dispositivos de acoplamiento de carga VistaChip. El MIP-OES funciona con un generador de nitrógeno, y se utilizó una cámara de

nebulización ciclónica de paso único, un nebulizador inerte One Neb, un sistema automuestreador SPS3 y una antorcha de plasma de cuarzo. Los parámetros operacionales para el instrumento MIP-OES se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. *Condiciones de trabajo y parámetros instrumentales del MIP-OES.*

Analito	Línea de emisión (nm)	Presión del nebulizador (kPa)
Cd	228,802	180
Cr	425,433	240
Cu	324,754	240
Ni	341,476	220
Pb	405,781	80
Zn	213,857	240
Tiempo de lectura (s)		3
Velocidad de toma de muestra (s)		13
Tiempo de lavado (s)		20
Tiempo de estabilización (s)		15
Velocidad de bomba (rpm)		15
Bombeo rápido durante la absorción		Encendido
Cámara de spray		Ciclónica de paso único
Nebulizador		One Neb
Corrección de fondo		Automática

Los datos se analizaron mediante una hoja de cálculo de Microsoft Office Excel 365 (Microsoft, Redmont, WA, EE.UU.). Se evaluó la sostenibilidad el método de

extracción mediante el software libre de código abierto AGREE.

4.2.3 Preparación de los NADES

Los NADES fueron preparados utilizando el método de calentamiento y agitación [26]. Una vez alcanzada la temperatura deseada (aproximadamente 60 °C), se colocó sobre la placa de calentamiento un vaso de precipitados conteniendo una mezcla de los componentes individuales en la relación molar indicada en la Tabla 4. La mezcla se agitó a 300 rpm hasta que se obtiene un líquido translúcido sin partículas en suspensión durante 20 min.

Tabla 4. Solventes eutécticos empleados en este estudio.

Solvente eutéctico	Componentes	Relación molar
LGH	Ácido láctico:glucosa:agua	1:1:5
UGH	Urea:glicerol:agua	1:1,2:1,2
ChCl-Gly	Cloruro de colina:glicerol	1:2
Arg-Gly	Arginina:glicerol	1:13
CGH	Ácido cítrico:glucosa:agua	1:1:5,5
GlyL	Glicerol:ácido láctico	4:1

4.2.4 Procedimiento de extracción secuencial BCR[®] modificado

Este procedimiento de extracción secuencial está dividido en 3 pasos que se esquematizan en la Fig. 4.2.1 [12].

El primer paso consiste en poner en contacto 1,000 g de muestra con 40 mL de ácido acético $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ agitando la mezcla a 30 rpm durante 16 h. Luego se separa el extracto del residuo sólido mediante centrifugación a 3000 rpm durante 20 min decantando el sobrenadante para analizar la fracción intercambiable de metales traza (fracción 1).

El segundo paso consiste en agregar 40 mL de hidroxilamina $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ al residuo sólido del paso 1, agitando la mezcla a 30 rpm durante 16 h. Luego se centrifuga el extracto como en el paso 1 y se separa el sobrenadante para analizar la fracción reducible de metales traza (fracción 2).

El tercer paso consiste en agregar alícuotas de 10 mL de peróxido de hidrógeno $8,8 \text{ mol L}^{-1}$ al extracto del paso 2, cubriendo y digiriendo durante 1 h a temperatura ambiente con agitación manual ocasional. Luego, la mezcla descubierta se calienta en un baño de agua a $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h hasta reducir el volumen a menos de 3 mL. A continuación, se agregan 10 mL más de peróxido $8,8 \text{ mol L}^{-1}$ y se prosigue con el calentamiento a $85 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 h. Seguidamente, se agregan 50 mL de acetato de amonio 1 mol L^{-1} y se agita durante 16 h. Por último, se separa el extracto del residuo sólido por centrifugación, tal y como se hace en el paso 1, y se separa el sobrenadante para analizar la fracción oxidable de metales traza (fracción 3).

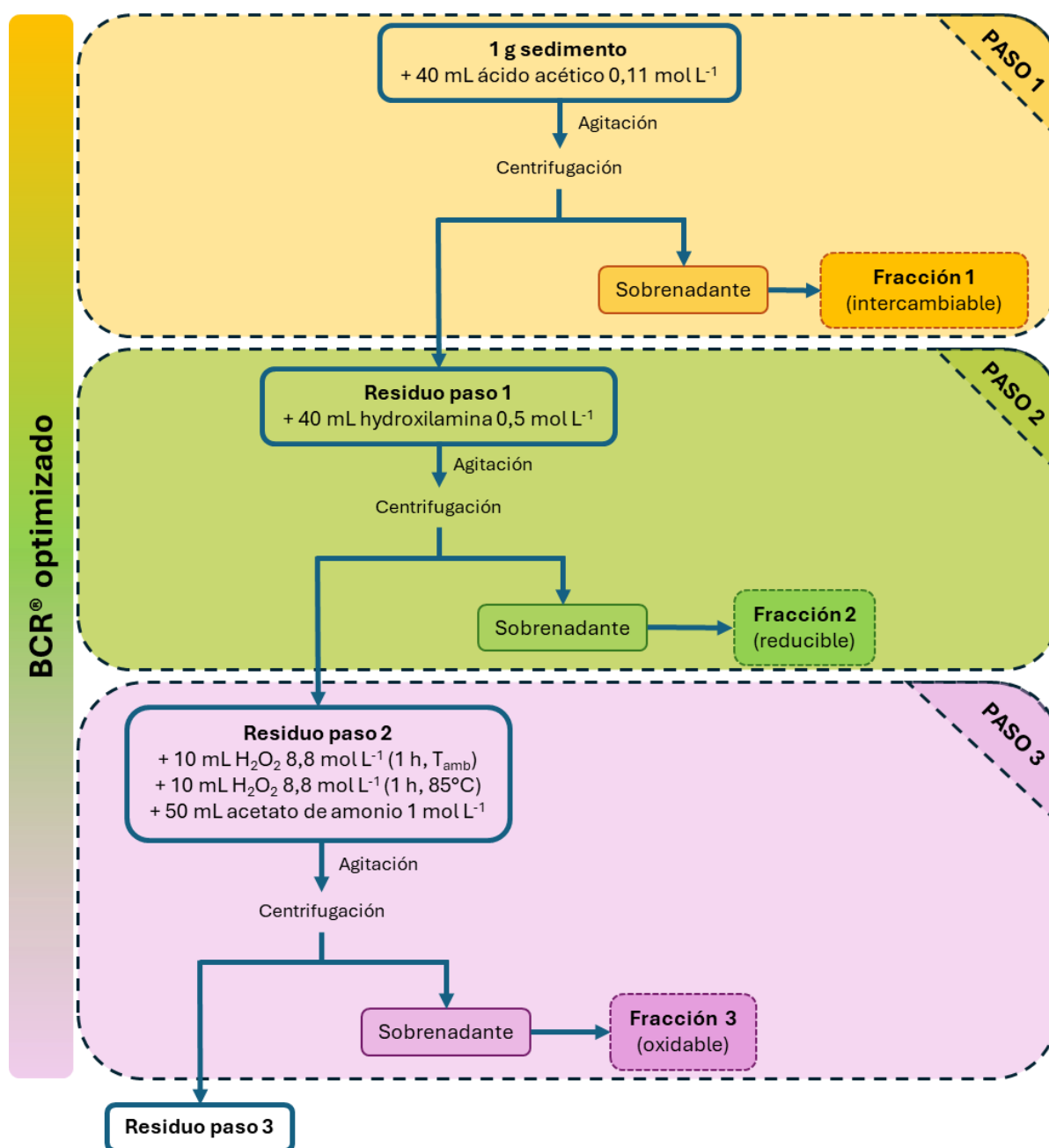


Figura 4.2.1 Protocolo experimental del procedimiento de extracción secuencial BCR® modificado.

Al aplicar el esquema de extracción secuencial BCR® modificado al material de referencia certificado BCR®-701 se pueden determinar las concentraciones certificadas de los metales en cada una de las fracciones de este material (Tabla 5).

La fracción 4 de este material se puede obtener al aplicar un proceso de digestión con agua regia al residuo del paso 3 del esquema de extracción secuencial.

Tabla 5. Concentraciones certificadas (mg kg^{-1}) de 6 elementos traza en material de referencia certificado BCR[®]-701 extraídos mediante el protocolo de BCR[®] modificado de 3 pasos.

Fracción	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
F1	7,3	2,26	49,3	15,4	3,18	205
F2	3,77	45,7	124	26,6	126	114
F3	0,27	143	55	15,3	9,3	46
F4	0,13	63	39	41	11	95
F1 + F2	11,07	47,96	173,3	42	129,18	319
F1 + F2 + F3	11,34	190,96	228,3	57,3	138,48	365
F1 + F2 + F3 + F4	11,47	253,96	267,3	98,3	149,48	460

4.2.5 Procedimiento de extracción propuesto

A una masa de 0,5000 g de CRM BCR[®]-701 se agregaron 16,5 mL de LGH (ácido láctico:glucosa:agua; 1:1:5) agitando la mezcla a 30 rpm durante 16 h. Luego se separó el extracto del residuo sólido mediante centrifugación a 3000 rpm durante 20 min decantando el sobrenadante. Este último se filtró con filtro de membrana 0,45 μm para luego determinar la cantidad de metales extraídos mediante MIP-OES.

4.2.6 Optimización del proceso de extracción propuesto

En primer lugar, se evaluaron NADES de diferente grado de acidez (Tabla 6) para realizar la extracción de metales en el CRM BCR®-701 tomando como criterio de selección aquel que fuera capaz de extraer la mayor cantidad de analitos de interés. Posteriormente, se estudiaron de manera univariada el volumen y el porcentaje de agua empleados durante la extracción.

Tabla 6. Solventes eutécticos empleados en este estudio.

Solvente eutéctico	Componentes	Acidez ^a
LGH	Ácido láctico:glucosa:agua	1
UGH	Urea:glicerol:agua	9
ChCl-Gly	Cloruro de colina:glicerol	7
Arg-Gly	Arginina:glicerol	11

^a Las medidas de acidez se obtuvieron mediante tiras reactivas de pH.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Caracterización de NADES preparados

La eficiencia del proceso de extracción está considerablemente afectada por el grado de disolución del sedimento en el disolvente utilizado. Por esta razón, se evaluaron la densidad, viscosidad y conductividad de cada disolvente individual. Es ampliamente conocido que una menor densidad y viscosidad del disolvente se correlacionan con una mayor conductividad y, en consecuencia, con una mejor capacidad de penetración en la matriz del sedimento [27]. Estas propiedades fueron

medidas a temperatura ambiente, específicamente a 23,3 °C. Según los datos presentados en la Tabla 7, los disolventes UGH, ChCl-Gly y Arg-Gly presentan las densidades más altas. Esto sugiere que, en términos de eficiencia para extraer metales de la estructura del sedimento, estos NADES podrían ser menos efectivos. En contraste, el disolvente NADES LGH mostró la densidad más baja.

Tabla 7. *Propiedades fisicoquímicas de los solventes empleados.*

NADES	Densidad (g mL ⁻¹)	Viscosidad (cP)	Conductividad (mS cm ⁻¹)
LGH	1,04	39	0,12
UGH	1,39	51	0,06
ChCl-Gly	1,30	128	2,71
Arg-Gly	1,41	367	0,04

4.3.2 Análisis de BCR[®]-701 mediante BCR[®] modificado

Con el propósito de constatar el estado y asegurar que el CRM BCR[®]-701 se encuentra en condiciones óptimas se aplica el método de extracción secuencial BCR[®] modificado a este material determinando la concentración de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn en las fracciones intercambiable (F1), reducible (F2) y oxidable (F3).

En la Fig. 4.3.1 pueden compararse las cantidades de metales en las distintas fracciones expresadas en mg kg⁻¹ obtenidas aplicando el BCR[®] modificado por triplicado al BCR[®]-701. Los porcentajes de recuperación se encuentran entre 98,7% y 101,7% demostrando que el material de referencia certificado se encuentra en buenas condiciones para emplearlo en la posterior etapa de optimización del

método de extracción propuesto.

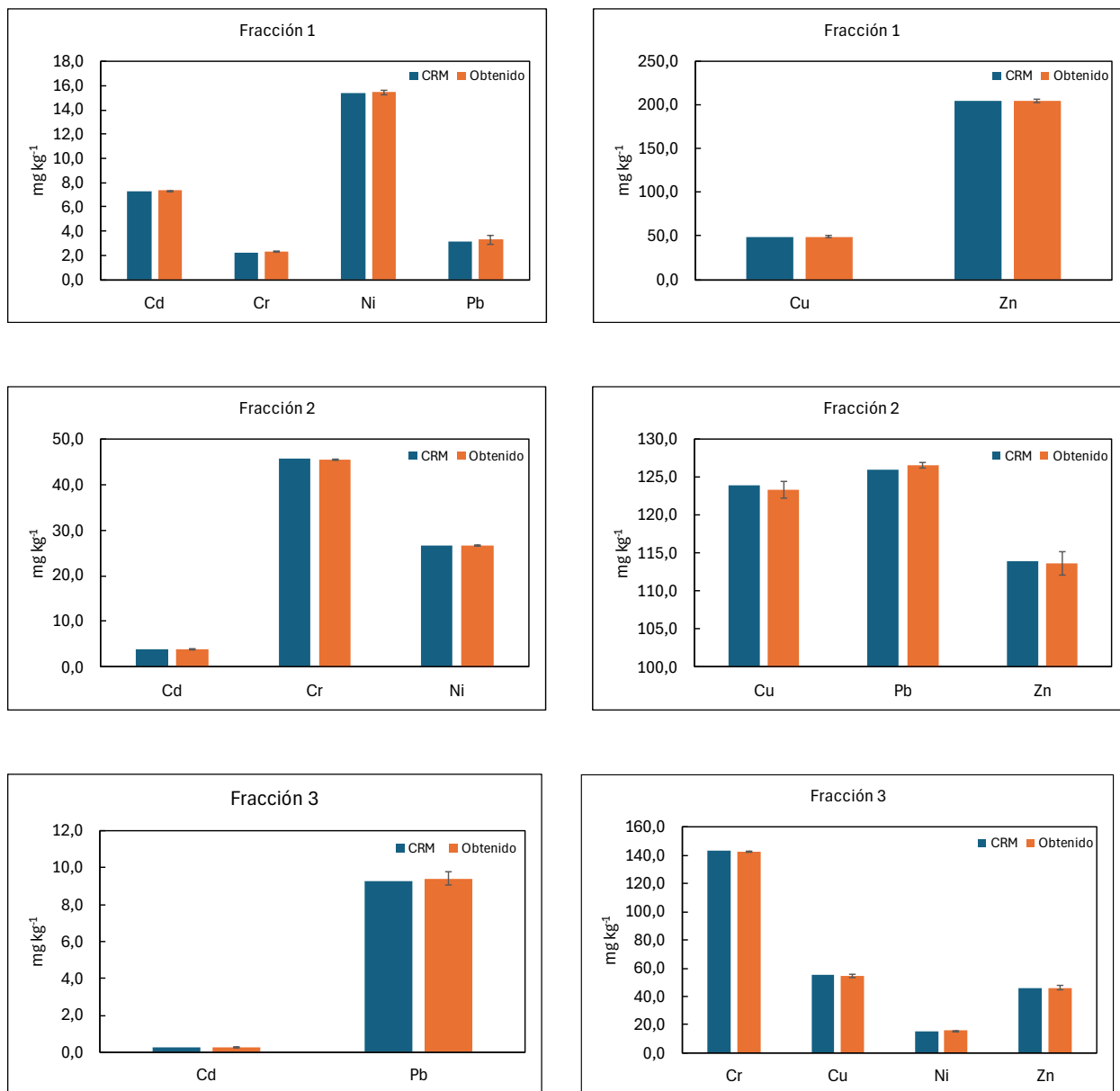


Figura 4.3.1 Determinación de metales en mg kg⁻¹ en BCR[®]-701 mediante método BCR[®] modificado.

4.3.3 Optimización del método de extracción propuesto

4.3.3.1 Elección del tipo de extractante

Se evaluaron distintos tipos de NADES para facilitar la extracción de los metales en el sedimento. Estos se diferenciaron por su acidez como se puede observar en la Tabla 6. Por otro lado, también se evaluó el empleo de agua durante la extracción con el objetivo de ver si la incorporación de esta mejoraba los rendimientos obtenidos. En la Fig. 4.3.2 se observan los 2 tipos de procedimientos empleados para este cometido.

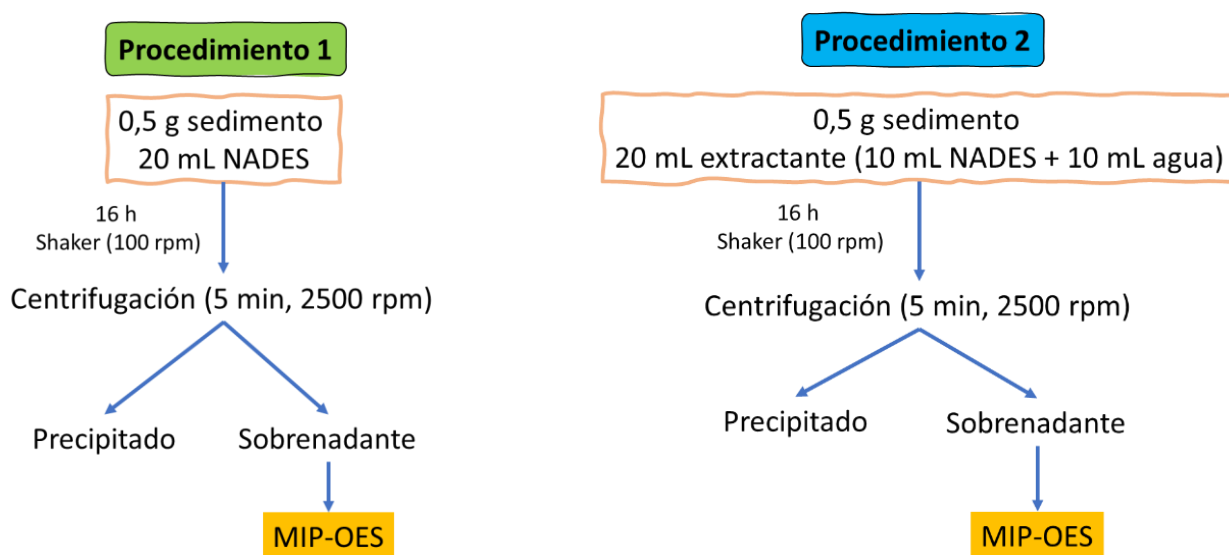
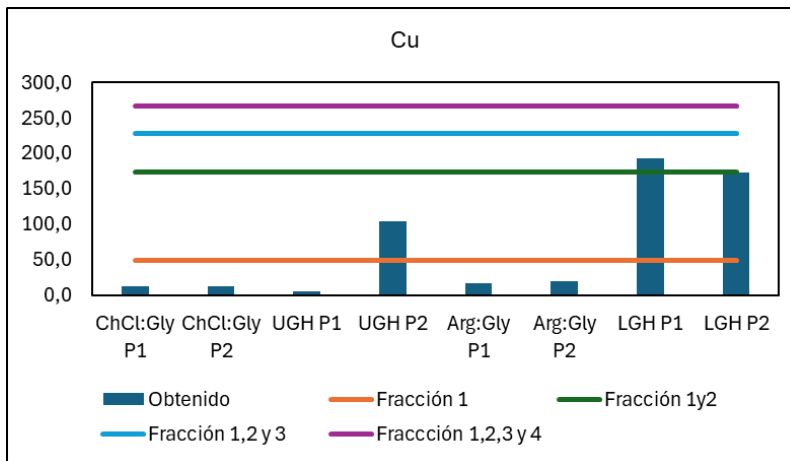
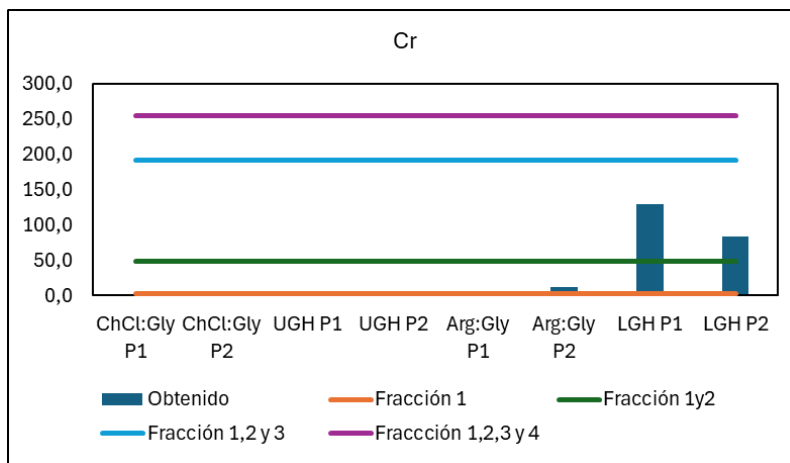
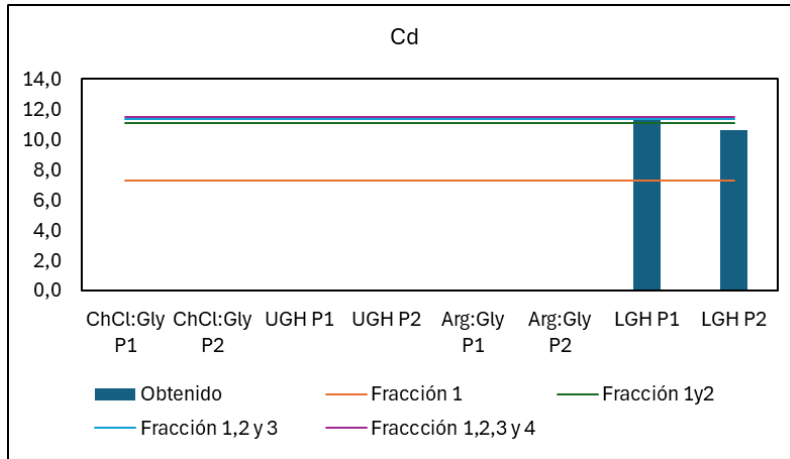


Figura 4.3.2 Procedimientos empleados en la etapa de elección de extractante.

Como puede distinguirse fácilmente, el solvente eutéctico LGH fue el que más cantidad de metales extrajo indistintamente del procedimiento empleado (Fig. 4.3.3). En este tipo de extracciones resulta ser sumamente importante la acidez del extractante para lograr extraer la mayor cantidad de metales posible. Para este

extractante, la fracción 1 es alcanzada para todos los metales en estudio siendo para el Zn, la única fracción extraída. Por el contrario, al utilizar extractantes de menor acidez, se obtienen muy baja extracción de metales empleando cualquiera de los procedimientos.

Por otro lado, observando detenidamente los valores obtenidos por el extractante LGH se observa que el procedimiento 1 (P1) es el que posee mayor extracción de los analitos en estudio. Al comparar los procedimientos 1 y 2, se observa que el procedimiento 1 es capaz de extraer una cantidad de metales entre un 5% y un 29% mayor que el procedimiento 2 (P2). De esta manera, se puede intuir la importancia de la cantidad de NADES empleado durante la extracción. Sin embargo, en el procedimiento 2 no sólo se disminuye la cantidad de NADES, sino que también se añade agua al proceso de extracción. De esta manera, si bien el procedimiento 2 extrae menores cantidades de los analitos en estudio, es importante analizar cómo afecta el agua al proceso de extracción. Además, al emplear el procedimiento 1, se observó que los valores de los metales Cd, Cu, Ni y Pb se encuentran predominantemente sobre las fracciones 1 y 2, mientras que el Zn se concentra principalmente por encima de la fracción 1. En consecuencia, se propone continuar con el estudio de optimización evaluando una cantidad menor de NADES (16,5 mL) con el objetivo de obtener las fracciones mencionadas para estos metales.



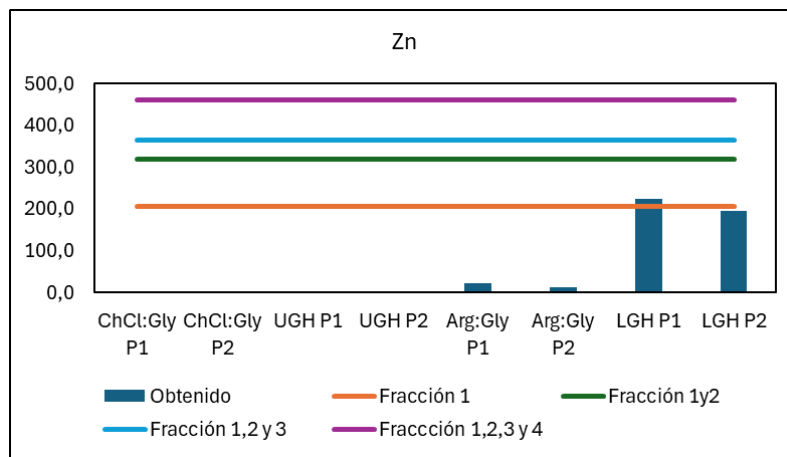
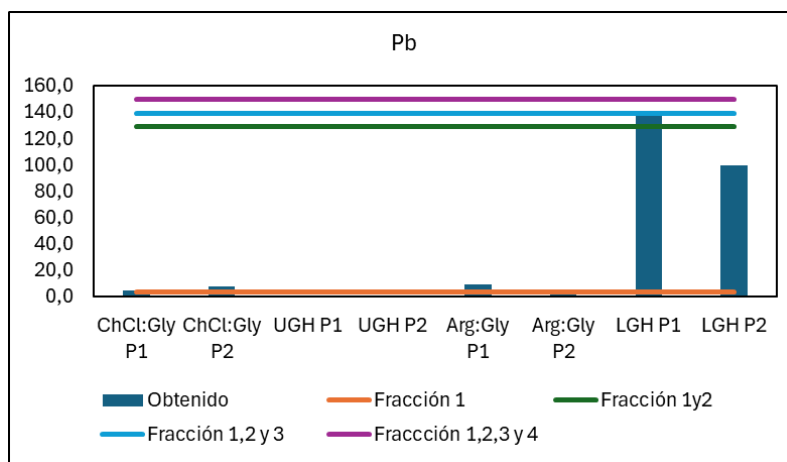
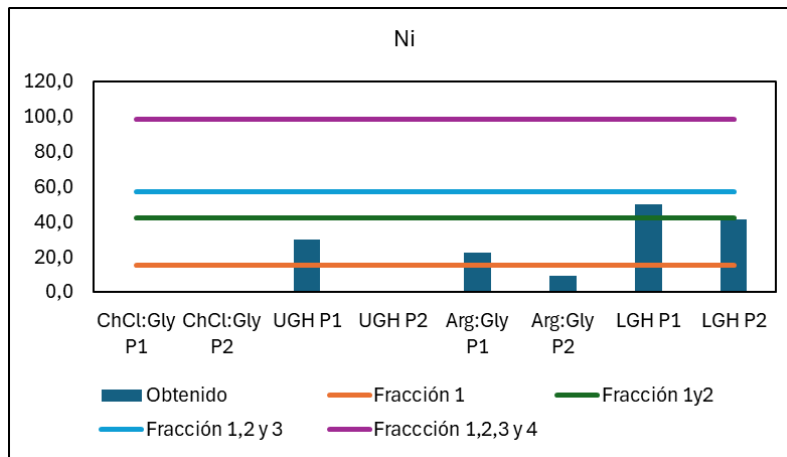


Figura 4.3.3 Metales extraídos expresados en mg kg^{-1} mediante los 2 procedimientos (P1 y P2) por diferentes NADES.

4.3.3.2 Selección del porcentaje de agua empleado durante el proceso de extracción

Con finalidad de obtener un porcentaje adecuado de agua en el proceso de extracción de metales de las diferentes fracciones del CRM se varió el volumen de agua en la extracción de manera univariada. En estos experimentos se realizaron extracciones empleando 0,5000 g de CRM, agregando 16,5 mL de LGH y variando el porcentaje de agua empleando los siguientes porcentajes: 0%, 45% y 90%.

A partir de los resultados obtenidos en la Fig. 4.3.4, se observa de manera generalizada que la cantidad de metales extraídos aumenta cuando se incrementa el porcentaje de agua de 0% a 45%, disminuyendo luego cuando se sigue incrementando el porcentaje de agua a 90%. Esto indica que el agua en el proceso de extracción tiene un rol fundamental. En primera instancia, emplear agua durante el proceso de extracción ayuda a disminuir la viscosidad del extractante permitiendo de esta manera aumentar la superficie de contacto entre este y el CRM. Sin embargo, aumentar demasiado el porcentaje de agua resulta perjudicial debido al efecto de dilución que esta genera. Por lo tanto, se decide tomar el valor de 45% como porcentaje de agua óptimo a emplear durante el proceso de extracción.

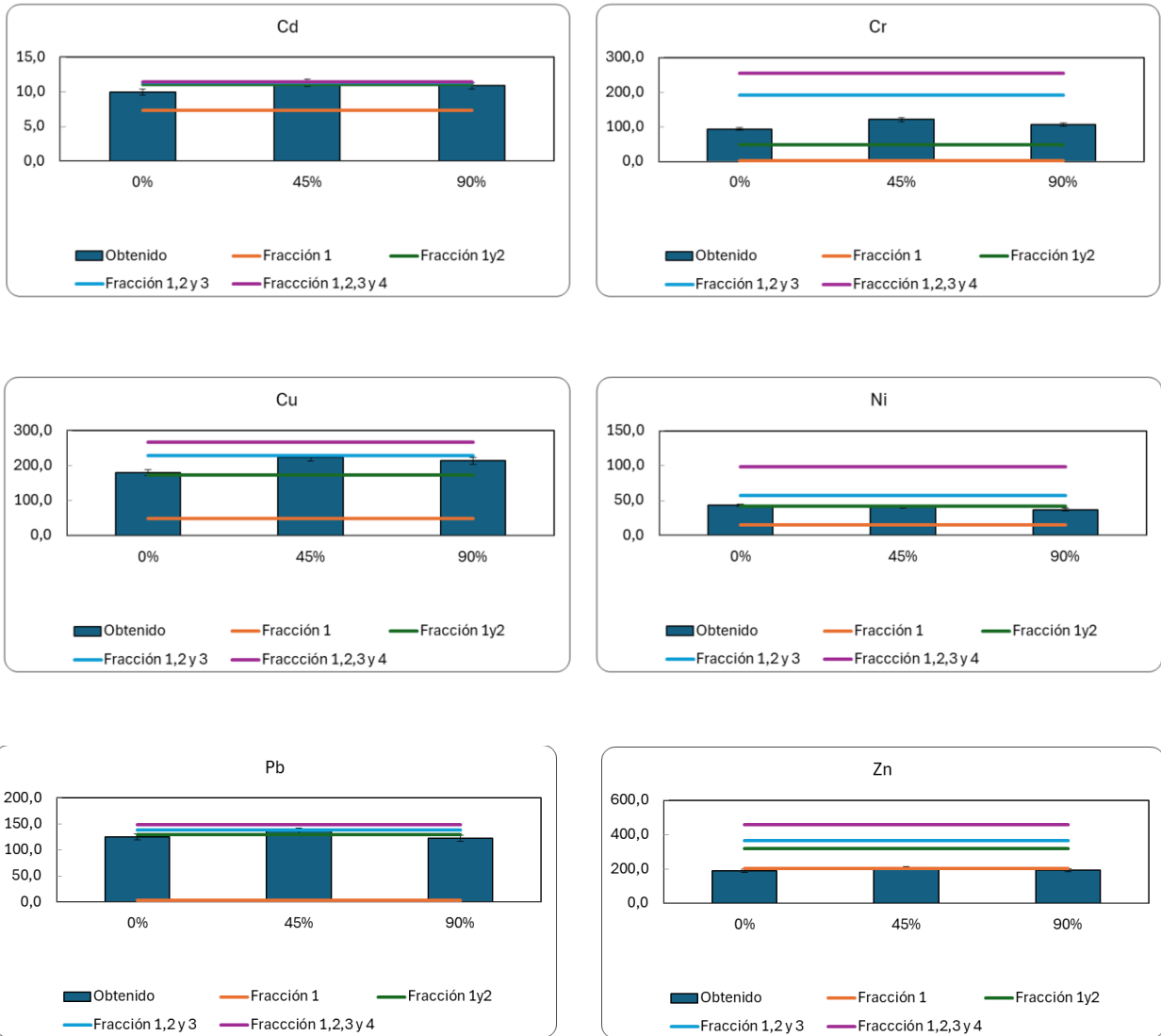


Figura 4.3.4 Valores de extracción de metales expresados en mg kg^{-1} empleando diferentes porcentajes de agua durante el proceso de extracción.

4.3.3.3 Selección del volumen de extractante

Con la finalidad de obtener un volumen apropiado de extractante para realizar la extracción de metales de las diferentes fracciones del CRM se varió el volumen de solvente de extracción de manera univariada. En estos experimentos se realizaron extracciones empleando 0,5000 g de CRM, agregando 3,0, 16,5 y 30,0 mL de LGH manteniendo constante el porcentaje de agua en la extracción con un

valor de 45%.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 4.3.5. Al emplear distintos volúmenes de extractantes es posible llevar a cabo la extracción de diferentes fracciones de los metales en el CRM. En primera instancia es posible verificar que existe una proporcionalidad entre la cantidad de metales extraídos (Cu, Ni, Pb y Zn) y el volumen de extractante empleado.

A la hora de extraer Cd, utilizar 3,0 mL o 16,5 mL de LGH es indistinto para obtener todas las fracciones de este metal. En el caso del Cu, el único volumen que es capaz de obtener un resultado aceptable es el de 16,5 mL recuperando las fracciones 1, 2 y 3. Al emplear 16,5 mL y 30,0 mL de LGH en la extracción de Ni es posible determinar las fracciones 1-2 y 1-2-3, respectivamente. De la misma manera que para el Cu, la extracción de las fracciones 1, 2 y 3 para el Pb es posible al utilizar 16,5 mL de LGH. Con respecto al Zn, al utilizar 16,5 mL de extractante es posible determinar la fracción 1, mientras que si se emplea 30,0 mL de LGH se logra obtener las fracciones 1, 2 y 3. Por último, para el Cr todos los volúmenes de extractante son capaces de extraer la fracción 1 completa pero no llegan a determinar la fracción 2. Por lo tanto, se decide elegir volumen óptimo de extractante 16,5 mL ya que es el que mejores resultados aporta a la hora de extraer distintas fracciones de los analitos en estudio. En la Tabla 8 se resumen las fracciones obtenidas en las condiciones óptimas de extracción.

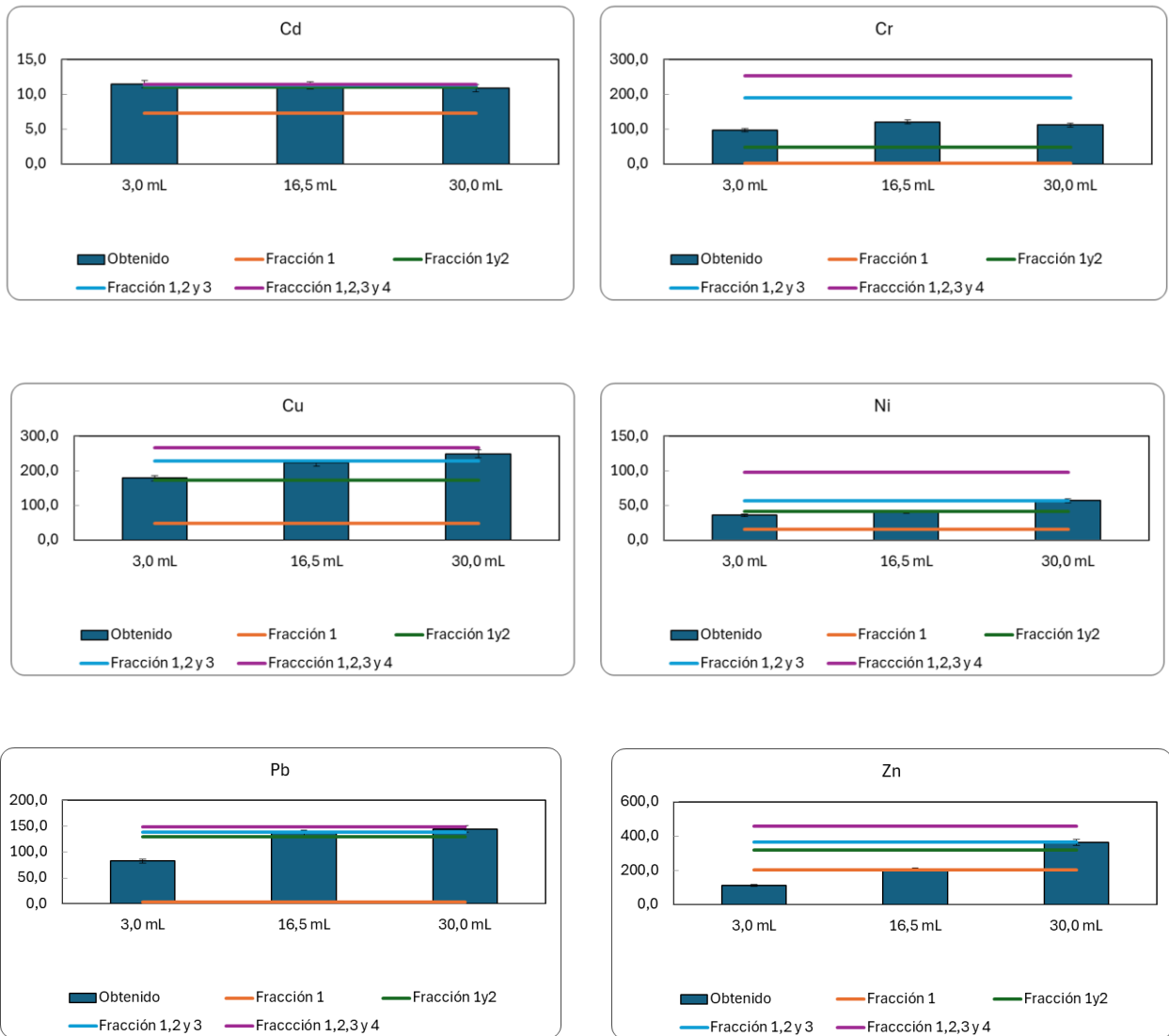


Figura 4.3.5 Valores de extracción de metales expresados en mg kg⁻¹ empleando diferentes volúmenes de LGH como extractante.

Tabla 8. Fracciones determinadas al utilizar las condiciones óptimas del método propuesto.

Volumen de extractante (mL)	% de agua en la extracción	Metal extraído	Fracción extraída
16,5	45	Cd	F1, F2, F3 y F4
		Cu	F1, F2 y F3
		Ni	F1 y F2
		Pb	F1, F2 y F3
		Zn	F1

4.3.3.4 Análisis de otros extractantes ácidos

Como se mencionó en la sección 4.3.3.1 los NADES con carácter ácido presentan mejores eficiencias de extracción. Por este motivo se decide comparar la extracción de metales empleando otros extractantes ácidos (Tabla 9). En esta etapa se realizaron las extracciones por triplicado empleando 0,5000 g de CRM y 16,5 mL de extractante agregando un 45% de agua.

Tabla 9. Sistemas eutécticos ácidos empleados.

Solvente eutéctico	Componentes	Acidez ^a
LGH	Ácido láctico:glucosa:agua	1
CGH	Urea:glicerol:agua	2
GlyL	Glicerol:ácido láctico	3

^a Las medidas de acidez se obtuvieron mediante tiras reactivas de pH.

Como puede observarse en la Fig. 4.3.6 con el extractante de mayor acidez se obtienen los mejores resultados. Particularmente, el extractante CGH es capaz de extraer sólo Cr, Cu y Zn siendo sólo satisfactorio para extraer las fracciones 1, 2 y 3 de Cu. El extractante GlyL si bien extrae los analitos en estudio, no es capaz de extraer ninguna de las fracciones de interés de manera apropiada.

En vistas de estos resultados se selecciona al extractante LGH como el más apropiado para llevar a cabo la determinación de metales en sedimentos.

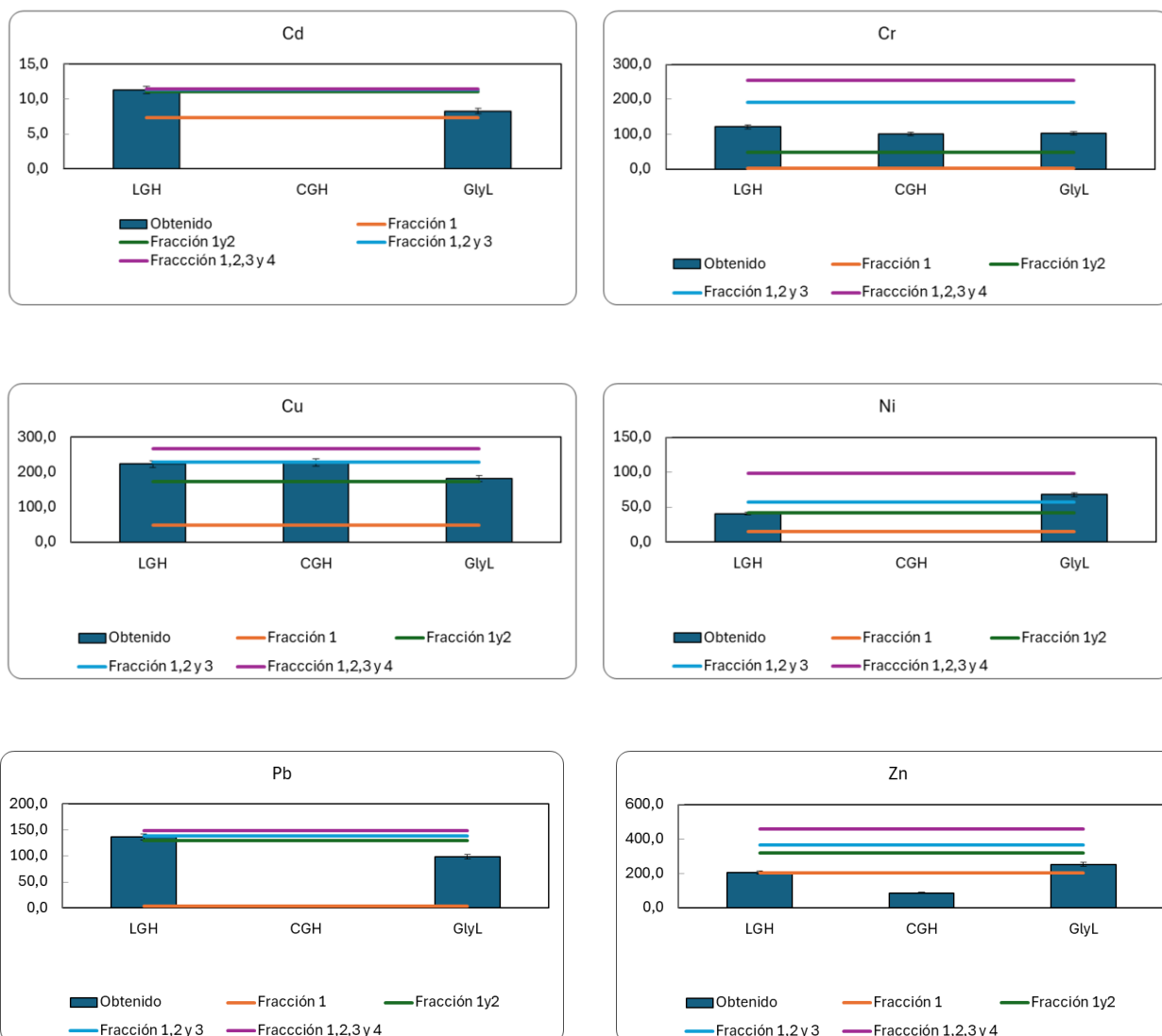


Figura 4.3.6 Valores de extracción de metales expresados en mg kg⁻¹ empleando diferentes NADES ácidos.

4.3.4 Evaluación de la sostenibilidad y comparación con el método BCR[®] modificado

Para evaluar y comparar el método propuesto con el método de extracción secuencial BCR[®] modificado para el análisis de metales, se utilizó la métrica AGREE. Los pictogramas generados mediante el software AGREE para esta evaluación se muestran en la Fig. 4.3.7. Este software permite asignar diferentes pesos (de 1 a 4) a los diversos criterios de evaluación; en este caso, se asignó un

peso de 2 para todos los criterios excepto el criterio 7, que se fijó en 1 para el método propuesto mientras que se fijó en 3 para el método BCR[®] modificado. Esta decisión se fundamenta en el hecho de que el solvente utilizado en el método propuesto es biodegradable.

En relación con el procedimiento de tratamiento de la muestra (principio 1), ambos métodos realizaron un análisis fuera de línea. Considerando el tamaño de la muestra (principio 2), el método propuesto utilizó 0,5000 g de muestra, mientras que el método BCR[®] modificado utilizó 1,000 g. Ninguno de los métodos permitió mediciones in situ, por lo que las mediciones se realizaron fuera de línea (principio 3). El número de pasos principales en la preparación de la muestra fue de 3 o menos para el método propuesto y de 6 pasos para el método BCR[®] modificado (principio 4). Ambos métodos fueron manuales y no miniaturizados (principio 5) y no requirieron agentes de derivatización (principio 6). La cantidad de residuos generados fue de 16,5 mL para el método propuesto y de 75 mL para el método BCR[®] optimizado (principio 7). En términos de rendimiento (principio 8), ambos métodos se consideraron multianalito permitiendo al método propuesto analizar 25 muestras en 16 h, mientras que el método BCR[®] modificado requiere 53,5 h para el mismo número de muestras. La cuantificación de la energía utilizada se basó en la técnica más intensiva en energía empleada durante el procedimiento (principio 9). En ambos métodos, el instrumento MIP-OES fue el más demandante de energía. En cuanto a los reactivos, se prefieren aquellos de fuentes renovables (principio 10). El método propuesto utiliza un NADES (LGH) como disolvente extractante, cumpliendo completamente con este principio. Asimismo, se debe evitar el uso de reactivos tóxicos (principio 11). Para este principio, el método propuesto no emplea reactivos tóxicos, a diferencia del método BCR[®] modificado, que utiliza 75 mL de reactivos

tóxicos. Por último, se consideraron la seguridad del operador y los riesgos ambientales, evaluando el número de peligros no evitados (principio 12). Los reactivos del método BCR[®] modificado son tóxicos, inflamables, oxidantes, corrosivos y explosivos.

El análisis de los resultados del informe AGREE demuestra que el método propuesto es más ecológico, obteniendo la puntuación más alta (0,62). La sustitución de disolventes tóxicos por NADES en la extracción de metales conduce a un procedimiento analítico más sustentable. Así, no solo se confirma la sostenibilidad del método propuesto, sino también la reducción en la producción de residuos y el consumo de energía, disminuyendo el impacto ambiental.

Método propuesto



Método BCR[®] modificado

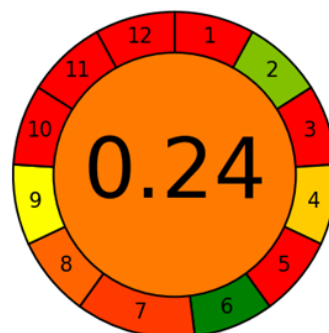


Figura 4.3.7 Evaluación ecológica del método propuesto y del método BCR[®] modificado mediante la métrica AGREE.

4.4 Conclusiones parciales

Se ha desarrollado y aplicado un innovador método de extracción utilizando un

NADES, específicamente LGH, como disolvente extractante para la extracción de metales en material de referencia certificado BCR[®]-701. La optimización del método de extracción se llevó a cabo mediante un enfoque univariado, obteniendo resultados favorables con el uso de 16,5 mL de extractante y un 45% de agua, en un tiempo de extracción de solo 16 h. Desde la perspectiva de la Química Sostenible, el empleo de NADES como disolvente extractante, en contraste con los disolventes tradicionalmente utilizados en el método de extracción secuencial BCR[®] modificado, proporciona una alternativa más sostenible. La sostenibilidad del método propuesto fue demostrada mediante la evaluación con el enfoque métrico AGREE y su comparación con el método BCR[®] modificado. El método propuesto se presenta como una alternativa diferente, más rápida y ecológica, enfatizando el potencial del uso de NADES en la preparación de muestras. Sin embargo, cabe aclarar que el método propuesto, al menos por el momento, no permite llevar a cabo un análisis completo como el BCR[®] modificado.

4.5 Referencias

- [1] Q. Liu, Y. Sheng, M. Jiang, G. Zhao, C. Li, Attempt of basin-scale sediment quality standard establishment for heavy metals in coastal rivers, *Chemosphere* 245 (2020) 125596. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125596>.
- [2] H.A. Ghrefat, Y. Abu-Rukah, M.A. Rosen, Application of geoaccumulation index and enrichment factor for assessing metal contamination in the sediments of Kafra Dam, Jordan, *Environ Monit Assess* 178 (2011) 95–109. <https://doi.org/10.1007/S10661-010-1675-1/METRICS>.

- [3] B. Lourião-Cabana, L. Lesven, A. Charriau, G. Billon, B. Ouddane, A. Boughriet, Potential risks of metal toxicity in contaminated sediments of Deûle river in Northern France, *J Hazard Mater* 186 (2011) 2129–2137. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2010.12.124>.
- [4] A. V. Filgueiras, I. Lavilla, C. Bendicho, Chemical sequential extraction for metal partitioning in environmental solid samples., *Journal of Environmental Monitoring* 4 (2002) 823–857. <https://doi.org/10.1039/B207574C>.
- [5] S.M. Álvarez, N.E. Llamas, A.G. Lista, M.B. Álvarez, C.E. Domini, Ionic liquid mediated extraction, assisted by ultrasound energy, of available/mobilizable metals from sediment samples, *Ultrason Sonochem* 34 (2017) 239–245. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.05.044>.
- [6] A. Tessier, P.G.C. Campbell, M. Bisson, Sequential Extraction Procedure for the Speciation of Particulate Trace Metals, *Anal Chem* 844 (1979) 8. <https://pubs.acs.org/sharingguidelines> (accessed July 30, 2024).
- [7] P. Quevauviller, G. Rauret, H. Muntau, A.M. Ure, R. Rubio, J.F. López-Sánchez, H.D. Fiedler, B. Griepink, Evaluation of a sequential extraction procedure for the determination of extractable trace metal contents in sediments, *Fresenius J Anal Chem* 349 (1994) 808–814. <https://doi.org/10.1007/BF00323110/METRICS>.
- [8] C. Gleyzes, S. Tellier, M. Astruc, Fractionation studies of trace elements in contaminated soils and sediments: a review of sequential extraction procedures, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 21 (2002) 451–467. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(02\)00603-9](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(02)00603-9).
- [9] H. Muntau, P. Quevauviller, B. Griepink, Speciation of Heavy Metals in Soils and

Sediments. An Account of the Improvement and Harmonization of Extraction Techniques Undertaken Under the Auspices of the BCR of the Commission of the European Communities, *Int J Environ Anal Chem* 51 (1993) 135–151. <https://doi.org/10.1080/03067319308027619>.

- [10] J.F. López-Sánchez, A. Sahuquillo, H.D. Fiedler, R. Rubio, G. Rauret, H. Muntau, P. Quevauviller, CRM 601, A stable material for its extractable content of heavy metals, *Analyst* 123 (1998) 1675–1677. <https://doi.org/10.1039/A802720J>.
- [11] A. Sahuquillo, J.F. López-Sánchez, R. Rubio, G. Rauret, R.P. Thomas, C.M. Davidson, A.M. Ure, Use of a certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure, *Anal Chim Acta* 382 (1999) 317–327. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00754-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00754-5).
- [12] M.S. Dundar, H. Altundag, V. Eyupoglu, S.C. Keskin, C. Tutunoglu, Determination of heavy metals in lower Sakarya river sediments using a BCR-sequential extraction procedure, *Environ Monit Assess* 184 (2012) 33–41. <https://doi.org/10.1007/S10661-011-1944-7/METRICS>.
- [13] A. Sungur, M. Soylak, S. Yilmaz, H. Özcan, Determination of heavy metals in sediments of the Ergene River by BCR sequential extraction method, *Environ Earth Sci* 72 (2014) 3293–3305. <https://doi.org/10.1007/S12665-014-3233-6/FIGURES/4>.
- [14] G. Rauret, J.F. López-Sánchez, A. Sahuquillo, R. Rubio, C. Davidson, A. Ure, P. Quevauviller, Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of new sediment and soil reference materials, *Journal of Environmental Monitoring* 1 (1999) 57–61. <https://doi.org/10.1039/A807854H>.

- [15] K. Nemati, N.K.A. Bakar, M.R. Abas, E. Sobhanzadeh, Speciation of heavy metals by modified BCR sequential extraction procedure in different depths of sediments from Sungai Buloh, Selangor, Malaysia, *J Hazard Mater* 192 (2011) 402–410. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2011.05.039>.
- [16] M. Pueyo, J. Mateu, A. Rigol, M. Vidal, J.F. López-Sánchez, G. Rauret, Use of the modified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element dynamics in contaminated soils, *Environmental Pollution* 152 (2008) 330–341. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2007.06.020>.
- [17] D.T. Cuong, J.P. Obbard, Metal speciation in coastal marine sediments from Singapore using a modified BCR-sequential extraction procedure, *Applied Geochemistry* 21 (2006) 1335–1346. <https://doi.org/10.1016/J.APGEOCHEM.2006.05.001>.
- [18] M. Espino, M. de los Ángeles Fernández, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Natural designer solvents for greening analytical chemistry, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 76 (2016) 126–136. <https://doi.org/10.1016/J.TRAC.2015.11.006>.
- [19] Q. Zhang, K. De Oliveira Vigier, S. Royer, F. Jérôme, Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications, *Chem Soc Rev* 41 (2012) 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/C2CS35178A>.
- [20] A.P.R. Santana, J.A. Mora-Vargas, T.G.S. Guimarães, C.D.B. Amaral, A. Oliveira, M.H. Gonzalez, Sustainable synthesis of natural deep eutectic solvents (NADES) by different methods, *J Mol Liq* 293 (2019) 111452. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2019.111452>.
- [21] Y. Liu, J.B. Friesen, J.B. McAlpine, D.C. Lankin, S.N. Chen, G.F. Pauli, Natural Deep

Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives, *J Nat Prod* 81 (2018) 679–690.

https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.7B00945/ASSET/IMAGES/LARGE/NP-2017-00945G_0006.JPEG.

- [22] Y. Dai, G.J. Witkamp, R. Verpoorte, Y.H. Choi, Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *carthamus tinctorius* L., *Anal Chem* 85 (2013) 6272–6278.

https://doi.org/10.1021/AC400432P/SUPPL_FILE/AC400432P_SI_003.PDF.

- [23] B.D. Ribeiro, M.A.Z. Coelho, I.M. Marrucho, Extraction of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*) with cholinium-based ionic liquids and deep eutectic solvents, *European Food Research and Technology* 237 (2013) 965–975.

<https://doi.org/10.1007/S00217-013-2068-9/FIGURES/8>.

- [24] H. Zhang, B. Tang, K.H. Row, A Green Deep Eutectic Solvent-Based Ultrasound-Assisted Method to Extract Astaxanthin from Shrimp Byproducts, *Anal Lett* 47 (2014) 742–749. <https://doi.org/10.1080/00032719.2013.855783>.

- [25] A. Elik, A. Demirbas, N. Altunay, Developing a new and simple natural deep eutectic solvent based ultrasonic-assisted microextraction procedure for determination and preconcentration of As and Se from rice samples, *Analytical Methods* 11 (2019) 3429–3438. <https://doi.org/10.1039/C9AY00916G>.

- [26] M. de los Á. Fernández, M. Espino, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products, *Food Chem* 239 (2018) 671–678. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.06.150>.

- [27] A.P.R. Santana, D.F. Andrade, T.G.S. Guimarães, C.D.B. Amaral, A. Oliveira, M.H. Gonzalez, Synthesis of natural deep eutectic solvents using a mixture design for extraction of animal and plant samples prior to ICP-MS analysis, *Talanta* 216 (2020) 120956. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.120956>.

Capítulo 5: Determinación de metales en aceites comestibles mediante ICP-OES empleando microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonidos con un sistema eutéctico profundo magnético hidrofílico

5.1 Introducción

Los aceites vegetales comestibles, incluyendo aceites de girasol, sésamo, soja y colza, son extensivamente usados en aplicaciones culinarias y poseen una función importante en la nutrición del ser humano. Estos aceites y grasas adquiridos en la dieta funcionan como moduladores biológicos, brindan elementos esenciales necesarios para la síntesis de estructuras celulares y son una fuente vital de energía para el cuerpo humano. Además, facilitan la absorción de vitaminas liposolubles como la A, D, E y K, las cuales desempeñan un rol fundamental en el mantenimiento de la salud [1,2].

El análisis de elementos traza en aceites comestibles es sumamente importante tanto desde un punto de vista nutricional como toxicológico. La presencia de especies inorgánicas como Cu, Ca, Co, Mn, Ni, y Zn en aceites pueden impactar en su calidad, frescura, estabilidad, y preservación, reduciendo su vida media [3–5]. Además, dependiendo de su concentración, elementos tales como Cu, Zn, P, y Mn son esenciales para reacciones enzimáticas en el metabolismo, mientras que otros elementos como el Al, Ba, Cd, Cr, Pb y Ti pueden inhibir estas reacciones y potencialmente causar intoxicaciones agudas o crónicas [6].

Como se comentó en el Capítulo 1, la presencia de metales en aceites comestibles puede provenir de fuentes diversas, incluyendo suelos contaminados, la proximidad de caminos con alto tránsito vehicular o industrias a las plantaciones donde la materia prima es cultivada, el uso de fertilizantes o pesticidas durante el crecimiento de la planta, y los procesos involucrados en la producción, refinado y almacenamiento del aceite [7–9]. En consecuencia, el desarrollo de métodos eficientes para la cuantificación de metales traza en aceites comestibles resultan de

gran interés para el control de calidad de este tipo de alimentos y representa un desafío para los químicos analíticos.

La baja concentración de metales en aceites comestibles requiere el uso de técnicas instrumentales sensibles como la espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-MS, del inglés *inductively coupled plasma mass spectrometry*) o la espectrometría de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES, del inglés *inductively coupled plasma optical emission spectrometry*). Sin embargo, no es posible realizar el análisis directo de una muestra de aceite debido a su elevada viscosidad, lo que complica su introducción en el instrumento. Además, este tipo de muestra posee una matriz compleja con un alto contenido orgánico lo que aumenta la posibilidad de interferencias durante el análisis [10]. Por lo tanto, la preparación de la muestra es de trascendental importancia. Se han desarrollado varios métodos de pretratamiento de la muestra incluyendo digestión, emulsificación, y dilución [11]. Además, se han implementado diferentes modalidades de microextracción en fase líquida, como la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, del inglés *dispersive liquid-liquid microextraction*), la cual preconcentra analitos en un extractante dispersado en finas gotas a través de la muestra por adición de un agente dispersante, generalmente tetrahidrofurano. Para evitar el empleo de solventes dispersivos tóxicos, la microextracción puede ser asistida mediante la energía de ultrasonido (US), lo que también incrementa la recuperación de analitos [12].

En la última década, los solventes eutécticos profundos (DES, del inglés *deep eutectic solvents*) han ganado reconocimiento como solventes amigables con el ambiente debido a su sostenibilidad, baja volatilidad, buena estabilidad térmica, alta

conductividad, y elevada eficiencia de extracción [13]. Una de sus características más atractivas y prometedoras es la habilidad de ajustar sus propiedades fisicoquímicas basándose en la naturaleza y proporción de sus componentes. Estos solventes se preparan fácilmente mediante calentamiento y agitación de una mezcla de un donador de enlaces de hidrógeno (HBD, del inglés *hydrogen bond donor*) – como ácidos orgánicos, urea, alcoholes, aminas, o amidas – y un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA, del inglés *hydrogen bond acceptor*), normalmente una sal de amonio cuaternario. Esta interacción forma una mezcla eutéctica con un punto de fusión más bajo que cualquiera de los componentes individuales [14]. A pesar de su gran eficiencia de extracción, separar las microgotas de DES dispersas en la muestra presenta un desafío que generalmente se resuelve empleando centrifugación. Para abordar este problema, se han introducido los solventes eutécticos profundos magnéticos (MDES, del inglés *magnetic deep eutectic solvents*) como una nueva clase de solventes de extracción. Estos solventes incorporan propiedades paramagnéticas debido a que incluyen haluros metálicos en su composición como cloruro de cobalto (II), cloruro de manganeso, y cloruro de níquel, entre otros. Esta característica les permite ser eficientemente separados usando un campo magnético externo, eliminando la necesidad del tedioso paso de centrifugación [15].

Hoy en día, el desarrollo de nuevas metodologías analíticas no sólo demanda una alta performance analítica, sino que también se enfatiza el alineamiento con los principios de la Química Analítica Sostenible (GAC, del inglés *Green Analytical Chemistry*). Por lo tanto, los enfoques analíticos eficientes y sostenibles priorizan consideraciones como el uso de solventes amigables con el ambiente, la simplificación de los procedimientos de preparación de muestra, y la reducción de la

cantidad y toxicidad de los reactivos empleados, entre otros factores [18]. Para asegurar la imparcialidad en la evaluación de estas metodologías, varias métricas, incluyendo la métrica AGREE (del inglés *Analytical GREENness*), se han introducido para evaluar y soportar la sostenibilidad de las nuevas técnicas analíticas [19].

En esta parte de la tesis se propone el diseño, preparación y caracterización de un nuevo MDES ternario empleado en un método DLLME asistido por energía de ultrasonido para llevar a cabo la determinación de metales (Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Ti, V, y Zn) en diferentes muestras de aceite comestible por ICP-OES. Además, la sostenibilidad del método propuesto se evaluó usando la métrica AGREE.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Reactivos y soluciones

En todos los experimentos se emplearon reactivos de grado analítico. Una solución patrón madre de Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Ti, V y Zn con una concentración de 1 mg mL⁻¹ se preparó por dilución de un aceite estándar multielemental Conostan S-21 (500 mg kg⁻¹, SCP Science, Baie D'Urfe, Canadá) y se almacenó a 4 °C. Las soluciones patrón de trabajo se prepararon diariamente a partir de la dilución apropiada de la solución patrón madre. Para la optimización de las condiciones de extracción, se usó una solución patrón conteniendo 27,5 µg L⁻¹ de todos los analitos. Todas las muestras y soluciones patrón fueron preparadas usando n-Hexano (95%, AppliChem, Darmstadt, Alemania).

Para llevar a cabo la preparación del solvente eutéctico magnético se empleó

cloruro de colina (pureza \geq 98%, Sigma-Aldrich, Alemania), ácido láctico (pureza \geq 97%, Sigma-Aldrich, Alemania) y cloruro de hierro (III) anhidro (pureza \geq 97%, Sigma-Aldrich, Alemania).

5.2.2 Aparatos, instrumentación y software

Para realizar la dispersión del sistema en el procedimiento de extracción se utilizaron un agitador vortex Reax Top (Heidolph, Schwabach, Alemania), un agitador mecánico multivortex (Heidolph, Schwabach, Alemania), y un baño de ultrasonido de 50/60 Hz y 280 V (Elmasonic, Singen, Alemania). La separación de fases se llevó a cabo utilizando un imán de neodimio (Nd) con un campo de fuerza de 1,32-1,37 T (Supermagnete, Gottmadingen, Alemania). Un espectrómetro de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) Agilent 5800 (Agilent Technologies, Melbourne, Australia) se empleó para llevar a cabo la cuantificación de los analitos Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Ti, V, y Zn. Los parámetros operacionales para el instrumento ICP-OES se detallan en la Tabla 10. Para todas las medidas se empleó gas argón con una pureza mínima del 99,992% (Carbuos Metálicos, Barcelona, España).

El procesamiento de datos del diseño experimental se llevó a cabo usando Statgraphics® Centurion (Statpoint Technologies, Warrenton, VA, Estados Unidos).

El solvente eutéctico profundo magnético se preparó usando una placa calentadora con agitación magnética (J.P. Selecta Agimatic ED, Barcelona, España), bajo una atmósfera inerte de gas nitrógeno (Carbuos Metálicos, Barcelona, España) a una presión de 1000 mbar controlada por un manómetro

(Digitron 2026P, Torquay, Inglaterra).

Tabla 10. Condiciones de trabajo y parámetros instrumentales del ICP-OES.

Parámetro instrumental	Valor
Potencia de radiofrecuencia aplicado (kW)	1,2
Caudal de gas para plasma (L min ⁻¹)	12
Caudal de gas auxiliar (L min ⁻¹)	1,0
Caudal de gas nebulizador (L min ⁻¹)	0,7
Velocidad de toma de muestra (L min ⁻¹)	100
Nebulizador	MicroMist
Cámara de spray	Ciclónica de doble paso
Número de réplicas	3
Modo de visualización	Axial
Tiempo de lectura (s)	1
Elemento	Línea de emisión (nm)
Al	396,152
Ba	455,403
Ca	396,847
Cd	214,439
Cr	267,716
Cu	327,395
Fe	238,204
Mg	279,553
Mn	257,610
Mo	202,032
Ni	231,604

P	213,618
Pb	220,353
Ti	336,122
V	292,401
Zn	213,857

5.2.3 Preparación del MDES

El MDES hidrofílico se preparó utilizando el método de calentamiento y agitación [20]. Una vez alcanzada una temperatura de 60°C, se colocó sobre la placa de calentamiento un balón de fondo redondo conteniendo una mezcla de cloruro de colina, ácido láctico, y cloruro de hierro (III) anhidro en una relación molar 2:20:1, respectivamente. La mezcla se agitó durante 15 min a 300 rpm bajo atmósfera de nitrógeno hasta que se obtuvo un líquido traslúcido amarillento.

5.2.4 Estudios preliminares

Para determinar la eficacia de diferentes métodos de extracción se realizaron ensayos preliminares en los que se compararon diferentes métodos. Para ello se prepararon soluciones patrón en n-hexano con un volumen de 5,00 mL y una concentración de 27,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los elementos estudiados. A continuación, se agregaron 100 μL de extractante y se realizó la microextracción durante 5 min asistida por 3 técnicas diferentes: vórtex, multivórtex y baño de ultrasonido. Tanto el vórtex como el multivórtex se emplearon a 2500 rpm mientras que el baño de ultrasonido se empleó a 25 y 44 °C.

5.2.5 Optimización del procedimiento de microextracción

Por otro lado, el diseño experimental es una herramienta valiosa utilizada para optimizar métodos analíticos. De esta manera se incrementa el rendimiento del proceso de extracción y se determinan las condiciones óptimas para la aplicación del mismo [16]. Para lograr esto, diferentes variables fueron estudiadas y optimizadas usando dos metodologías, un diseño factorial completo (FFD, del inglés *full factorial design*) y un diseño central compuesto (CCD, del inglés *central composite design*) [17].

Los procedimientos de preparación de muestra generalmente utilizan experimentos de un factor (método de optimización univariada) para optimizar parámetros que afectan la extracción y preconcentración de los analitos en estudio. Sin embargo, este método tiene grandes limitaciones, ya que ignora las interacciones entre las variables investigadas, dificultando la obtención de condiciones óptimas. Por el contrario, el enfoque del diseño de experimentos facilita un número mínimo de experimentos y al mismo tiempo considera adecuadamente las interacciones entre las variables. En consecuencia, se obtienen resultados más eficientes y apropiados [21].

Inicialmente, se seleccionó un diseño factorial completo de dos niveles (FFD, del inglés *full factorial design*) para cribar e identificar las variables que afectan significativamente la intensidad de la señal de cada analito analizado por ICP-OES. Las variables estudiadas fueron: volumen de muestra diluida, volumen de MDES, tiempo de extracción y temperatura, y se estudiaron cada una en dos niveles elegidos considerando tanto la miniaturización del procedimiento de

microextracción, así como las limitaciones experimentales e instrumentales (Tabla 11). Como puede verse en la Tabla 12, el diseño incluyó 16 experimentos.

Tabla 11. Niveles de los factores correspondientes al FFD.

	Factores experimentales			
	Volumen de muestra diluida (mL)	Volumen de MDES (μ L)	Tiempo de extracción (min)	Temperatura ($^{\circ}$ C)
Nivel bajo (-)	5	100	1	40
Nivel alto (+)	10	300	5	60

Tabla 12. Matriz experimental correspondiente al FFD.

	Factores experimentales			
	Volumen de muestra diluida (mL)	Volumen de MDES (μ L)	Tiempo de extracción (min)	Temperatura ($^{\circ}$ C)
Experimento 1	10	100	5	60
Experimento 2	5	300	5	60
Experimento 3	10	300	1	40
Experimento 4	5	100	1	40
Experimento 5	10	100	1	40
Experimento 6	10	100	5	40
Experimento 7	5	300	1	40
Experimento 8	5	100	1	60
Experimento 9	5	300	5	40
Experimento 10	10	100	1	60
Experimento 11	10	300	5	60
Experimento 12	5	100	5	40
Experimento 13	10	300	1	60
Experimento 14	5	300	1	60
Experimento 15	5	100	5	60
Experimento 16	10	300	5	40

Luego de establecer las variables significativas se determinaron los valores óptimos de las mismas mediante un diseño central compuesto (CCD, del inglés *central composite design*), el cual incluyó un total de 18 experimentos. Los niveles de los factores y los experimentos realizados en el CCD se muestran en las Tablas 13

y 14, respectivamente.

Tabla 13. Niveles experimentales empleados en el CCD.

Factores	Nivel				
	$-\alpha$ (-1,68)	-1	0	+1	$+\alpha$ (+1,68)
Volumen de muestra diluida (mL)	5,00	6,00	7,50	9,00	10,00
Volumen de MDES (μ L)	100	140	200	260	300
Temperatura ($^{\circ}$ C)	40	44	50	56	60

Tabla 14. Matriz experimental correspondiente al CCD.

Experimento	Volumen de muestra diluida (mL)	Volumen de MDES (μ L)	Temperatura ($^{\circ}$ C)
1	9,00	140	56
2	7,50	100	50
3	7,50	200	50
4	6,00	140	44
5	9,00	260	44
6	6,00	140	56
7	6,00	260	44
8	10,00	200	50
9	6,00	260	56
10	9,00	260	56
11	7,50	200	50
12	7,50	200	40
13	9,00	140	44
14	5,00	200	50
15	7,50	300	50
16	7,50	200	60
17	7,50	200	50
18	7,50	200	50

Tanto en los experimentos del FFD como del CCD, se usó una solución patrón con una concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ conteniendo los elementos evaluados con la presente metodología. Además, para garantizar la independencia de las respuestas y disminuir la influencia de variables no controladas, los experimentos de ambos

diseños se ejecutaron en un orden aleatorio.

Debido a que cada variable significativa tiene un valor óptimo para cada analito analizado, se usó la función de deseabilidad para identificar un conjunto único y eficiente de condiciones adecuadas para el análisis simultáneo de todos los elementos.

5.2.6 Preparación de la muestra

Las muestras de aceite comestible (girasol, soja, colza, sésamo) de distintas marcas fueron adquiridas de locales comerciales de la ciudad de Alicante (Alicante, España) y almacenadas en la oscuridad antes del análisis. Con el objetivo de disminuir la viscosidad de las muestras, estas se diluyeron 1:1 en n-hexano antes de aplicar el procedimiento de microextracción.

5.2.7 Procedimiento de microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por ultrasonido (UA-DLLME)

Un volumen de 9,78 mL de la muestra diluida se colocó en un tubo de ensayo. Las muestras se diluyeron 1:1 en n-hexano para reducir la alta viscosidad de las mismas y facilitar el paso de extracción con dispersión en el baño de ultrasonido. A continuación, se utilizó una micropipeta para añadir 268 μ L del disolvente extractante MDES (cloruro de colina:ácido láctico:cloruro de hierro (III) anhidro; 2:20:1). Tras la adición del MDES, la mezcla se sonicó durante 1 min a 60 °C en un baño de ultrasonido. A continuación, la solución turbia obtenida se sometió a la presencia de un imán de Nd para reunir el extractante en el fondo del tubo. A

continuación, se eliminó el sobrenadante y el disolvente extractante que contenía los analitos de interés permaneció en el fondo del tubo del cual se recogieron aproximadamente 200 μL del extracto. Finalmente, el extracto se introdujo directamente en el instrumento ICP-OES de acuerdo con la configuración experimental indicada en la Tabla 10. Un esquema del proceso general optimizado se muestra en la Fig. 5.2.1.

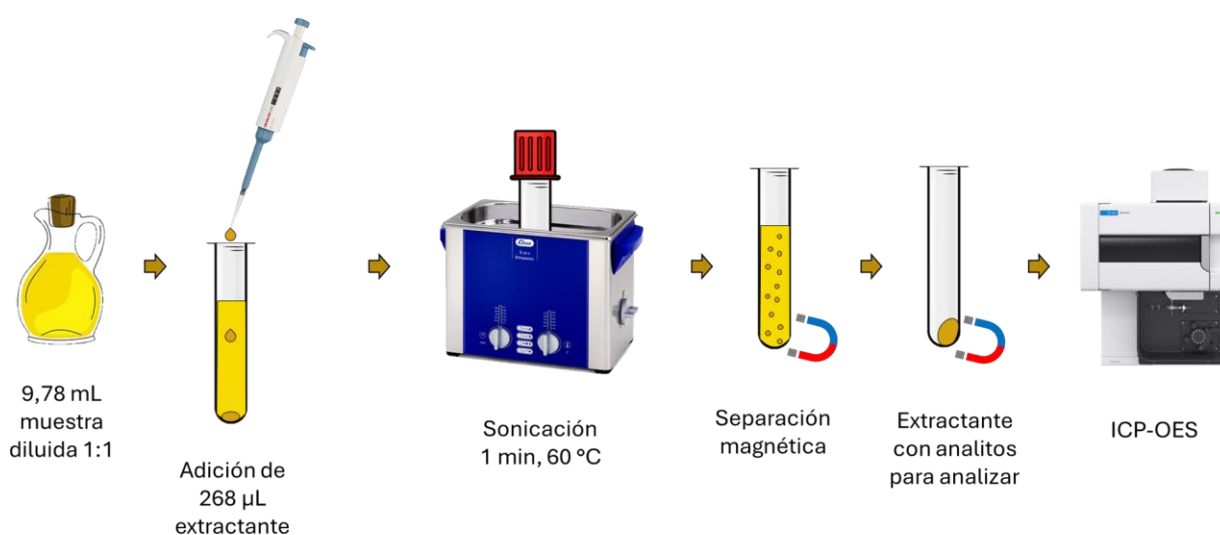


Figura 5.2.1 Esquemización del procedimiento de extracción de los analitos en estudio.

5.3 Resultados y discusión

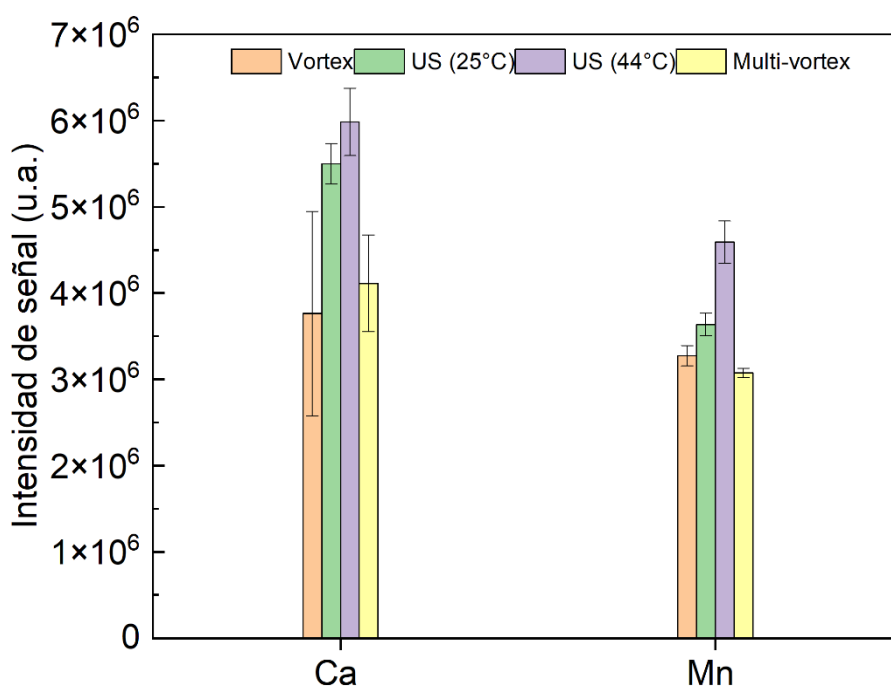
5.3.1 Optimización del procedimiento UA-DLLME

5.3.1.1 Estudio preliminar

En los ensayos preliminares se evaluaron cuatro técnicas diferentes para facilitar la microextracción de los metales usando el MDES. Estas técnicas

incluyeron la microextracción asistida por vórtex, la microextracción asistida por multivórtex, y la microextracción asistida por baño de ultrasonido a dos temperaturas distintas, 25 y 44 °C. Los análisis se llevaron a cabo por duplicado y consistieron en microextracciones con una duración de 5 min empleando una solución conteniendo $27,5 \mu\text{g L}^{-1}$ de todos los metales y $100 \mu\text{L}$ de extractante.

Como se esperaba, la cavitación resultante del colapso implosivo de las burbujas, inducida por la aplicación de la energía de ultrasonido durante el proceso de microextracción produjo gotas finas de líquidos inmiscibles. Este fenómeno incrementó el área de contacto interfacial entre los dos medios, aumentando de esta manera la transferencia de masa entre las fases y, en consecuencia, mejorando la eficiencia del proceso de microextracción. Como se muestra en la Fig. 5.3.1, la microextracción asistida por ultrasonido a ambas temperaturas demuestra la mayor eficiencia de extracción de metales. Contrariamente, la microextracción asistida por vórtex tuvo la menor eficiencia de extracción de metales.



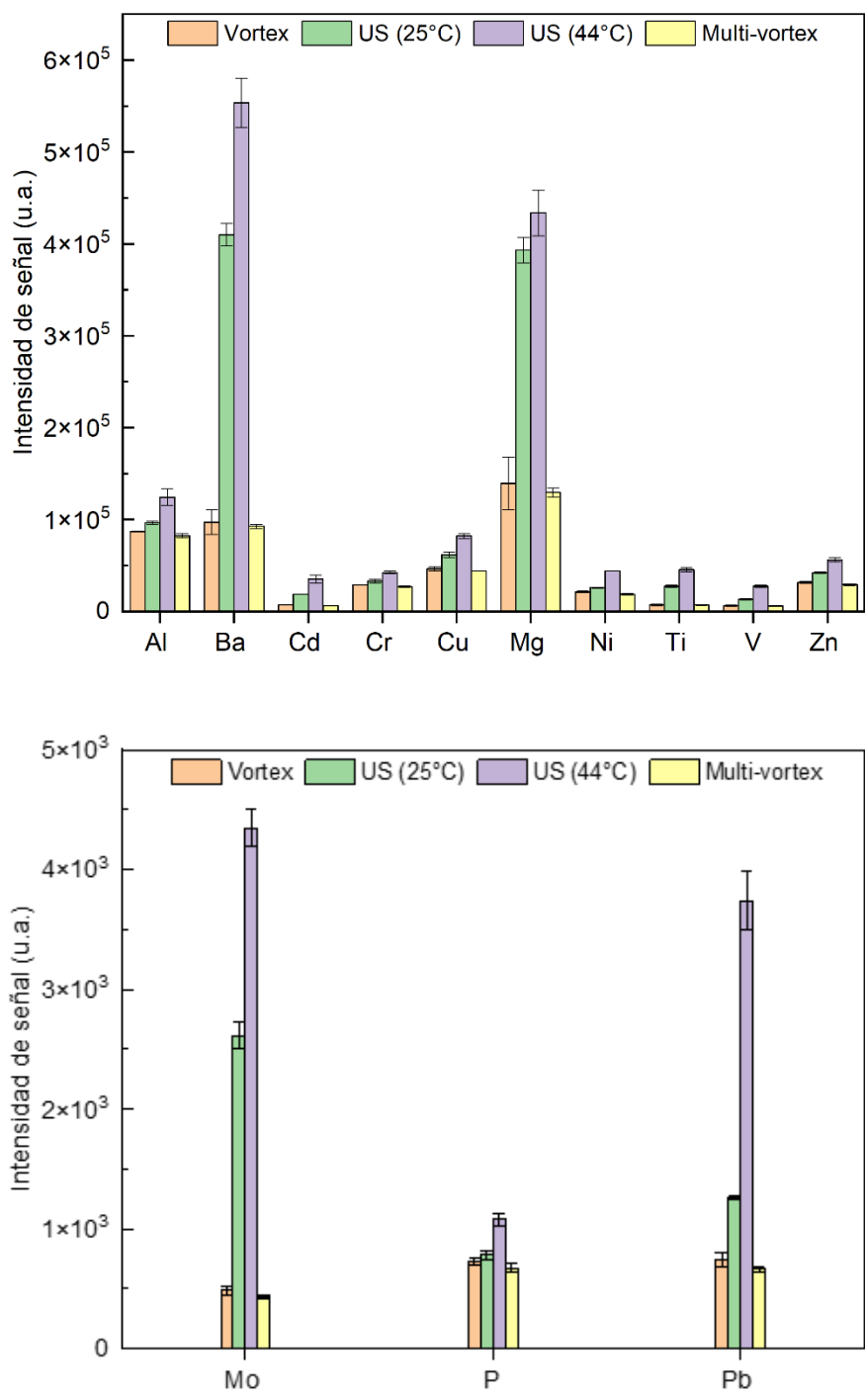


Figura 5.3.1 Variación de la intensidad de señal en ICP-OES para cada metal ($n = 2$) de acuerdo con la técnica de extracción empleada. US: ultrasonido.

La eficiencia de extracción de metales, por cantidad, fue la siguiente: Ca, Mn, Ba, Al, Cu, Zn, Ti, Ni, Cr, Cd, V, Mo, Pb, y P. Cabe destacar que la cuantificación de

Fe no se realizó ya que este elemento es componente del extractante empleado y por lo tanto satura las señales de emisión obtenidas. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, la técnica de asistencia mediante energía de ultrasonido fue seleccionada para las siguientes optimizaciones del método propuesto.

5.3.1.2 Diseño factorial completo (FFD)

Para llevar a cabo el estudio de cribado se seleccionaron cuatro factores que potencialmente pueden influir en el método UA-DLLME. Dentro de los factores continuos evaluados en el FFD se incluyeron el volumen de muestra diluido, el volumen de MDES, el tiempo de extracción y la temperatura.

Las señales obtenidas para cada uno de los experimentos fueron incorporadas en el FFD facilitando la obtención de las gráficas de Pareto estandarizadas. En estas gráficas, la longitud de cada barra representa la significancia relativa de cada factor en el análisis, mientras que el color de la barra denota si el factor tiene un efecto positivo (barra gris) o negativo (barra azul) sobre la respuesta. Además, el factor es considerado significativo con un 95% de nivel de confianza si la barra correspondiente sobrepasa el límite de referencia indicado por la línea vertical azul.

De acuerdo con los resultados presentados en la Fig. 5.3.2, el volumen de muestra diluida afecta significativamente a la microextracción de todos los metales. Además, el volumen de MDES también afecta la microextracción de la mayoría de los metales a excepción de Al y Mn. Ambos factores junto con su interacción exhiben un gran impacto en el procedimiento. Por otro lado, el factor temperatura afecta significativamente sólo la microextracción de cinco analitos: Ca, Cd, Mg, Mo y

Ni. Cabe destacar que los efectos de los tres factores presentados hasta el momento tienen un efecto positivo en la respuesta indicando que un aumento en sus valores se corresponde con un aumento en la señal de los analitos determinados. Esta idea se basa en que un aumento en el volumen de muestra diluida eleva la cantidad de analitos presentes durante la microextracción incrementando la respuesta. Similarmente, una mayor cantidad de extractante se dispersa de mejor manera a través de la muestra aumentando la eficiencia de la microextracción. Además, un incremento en la temperatura aumenta la energía cinética del sistema facilitando la transferencia de los analitos desde la fase orgánica a la fase del extractante hidrofílico. Por último, el tiempo de extracción no fue un factor significativo para la microextracción de ningún metal por lo que se decidió emplear el menor tiempo de extracción (1 min) en los siguientes experimentos con el objetivo de maximizar el análisis de muestras por tiempo.

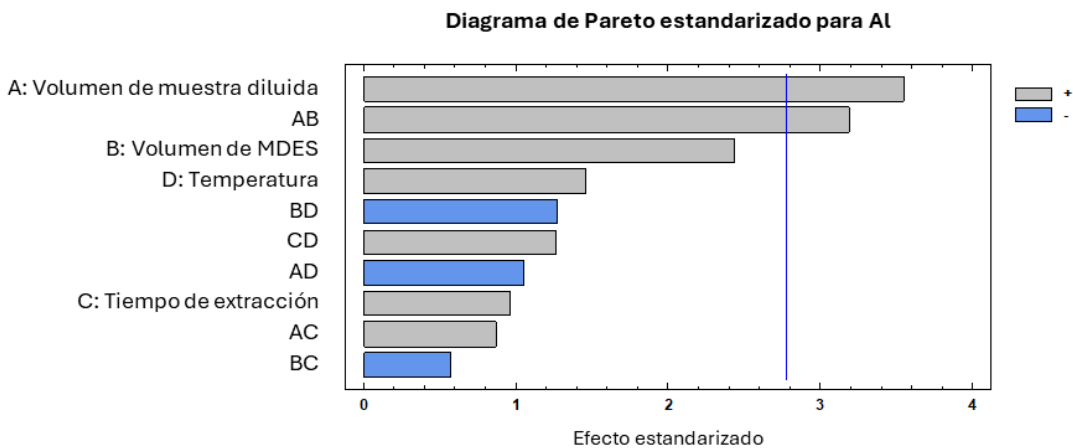


Diagrama de Pareto estandarizado para Ba

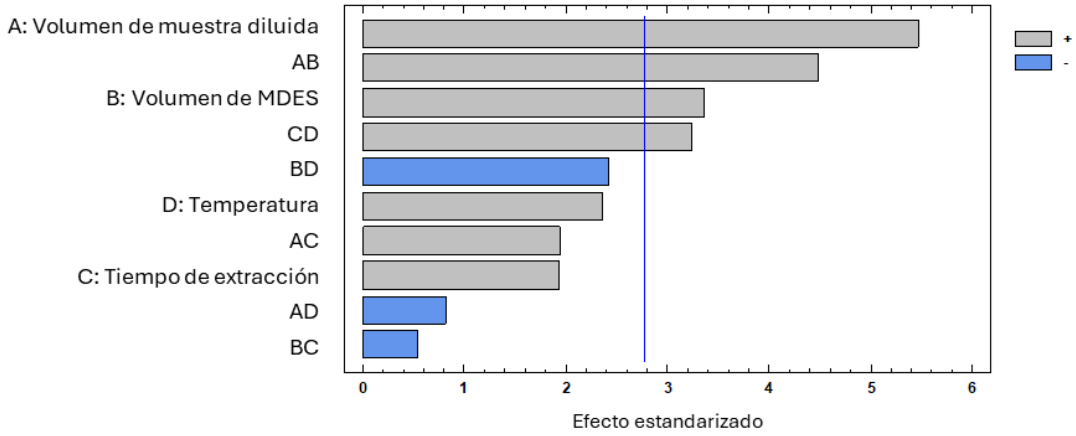


Diagrama de Pareto estandarizado para Ca

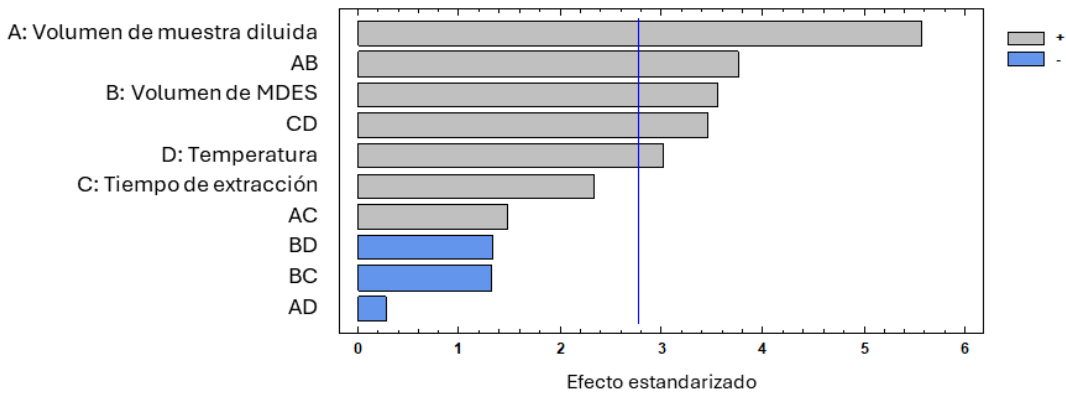


Diagrama de Pareto estandarizado para Cd

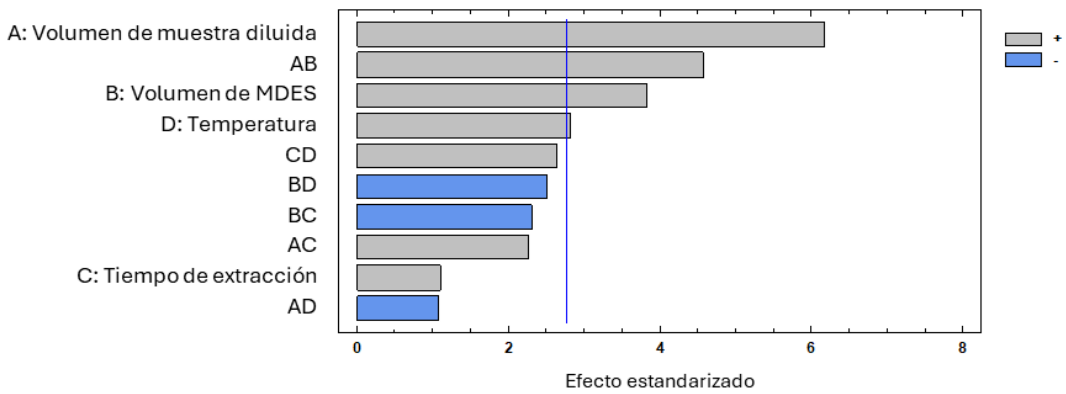


Diagrama de Pareto estandarizado para Cr

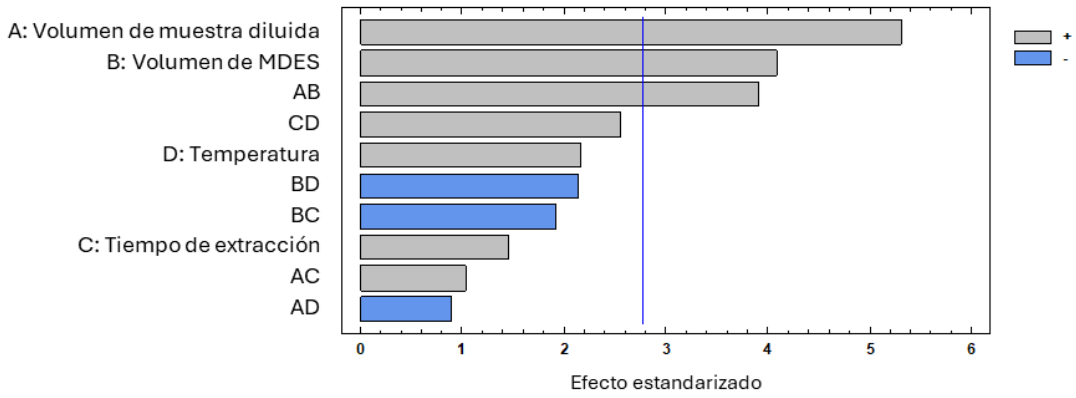


Diagrama de Pareto estandarizado para Cu

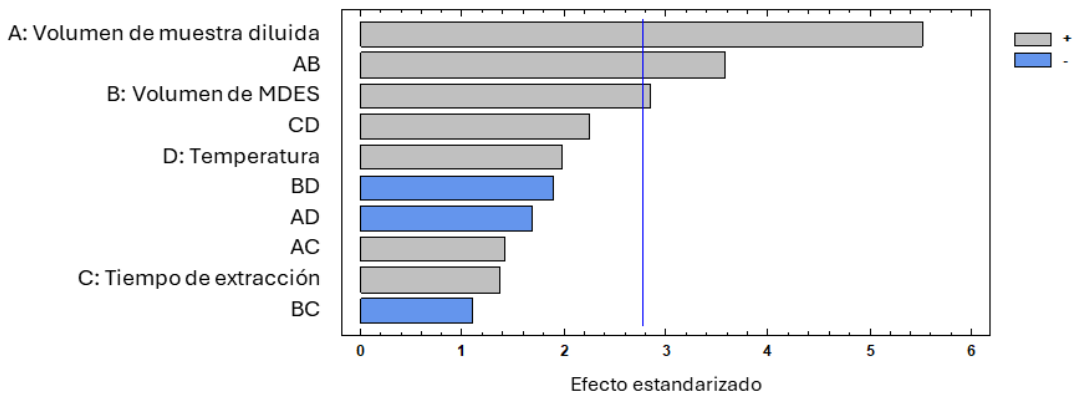


Diagrama de Pareto estandarizado para Mg

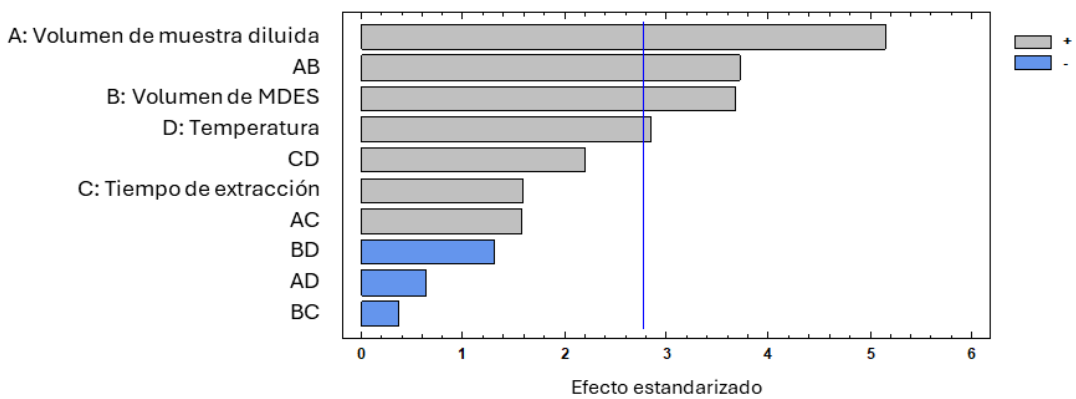


Diagrama de Pareto estandarizado para Mn

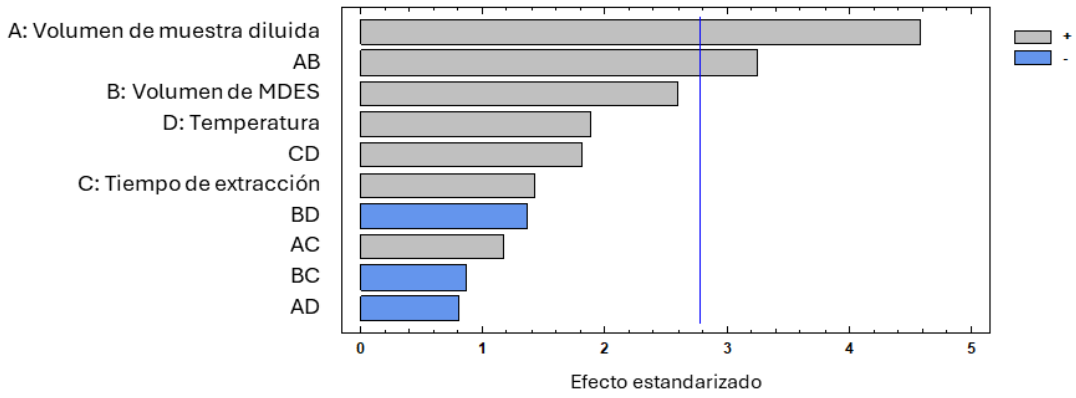


Diagrama de Pareto estandarizado para Mo

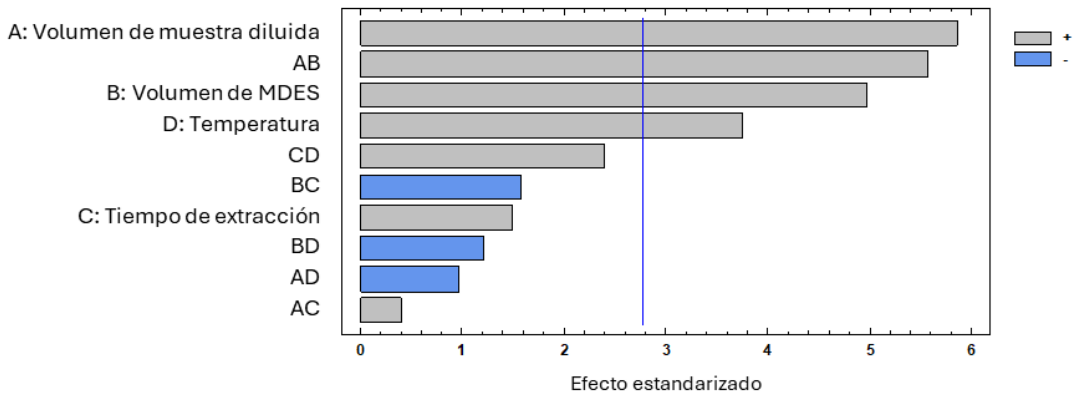


Diagrama de Pareto estandarizado para Ni

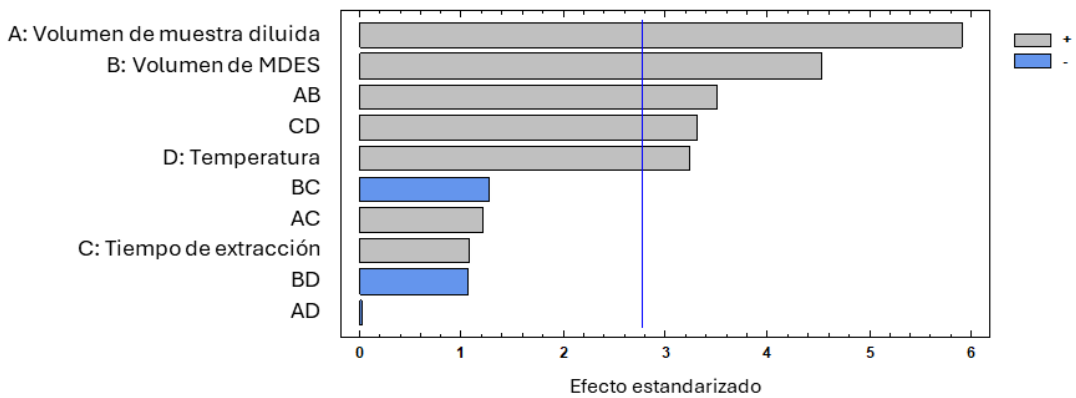


Diagrama de Pareto estandarizado para P

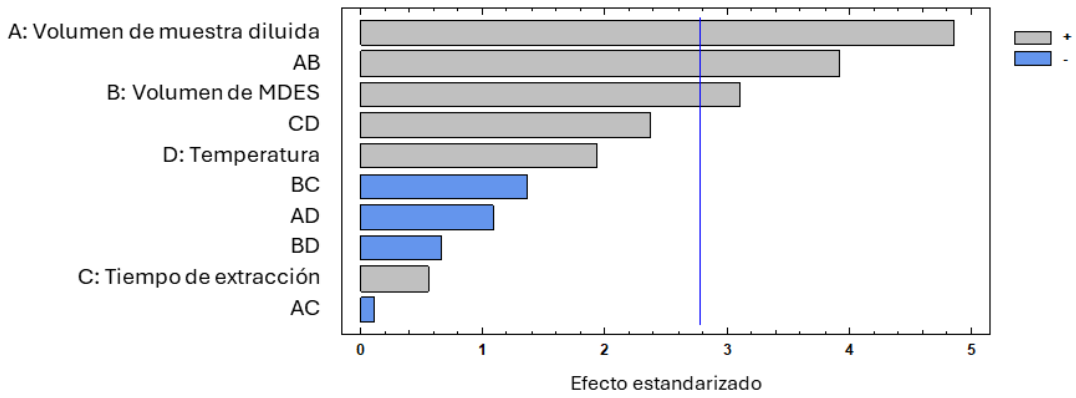


Diagrama de Pareto estandarizado para Pb

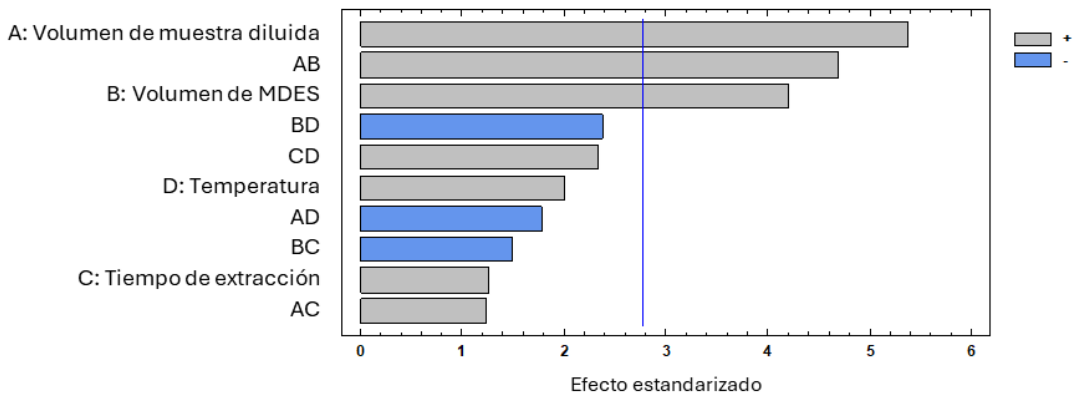


Diagrama de Pareto estandarizado para Ti

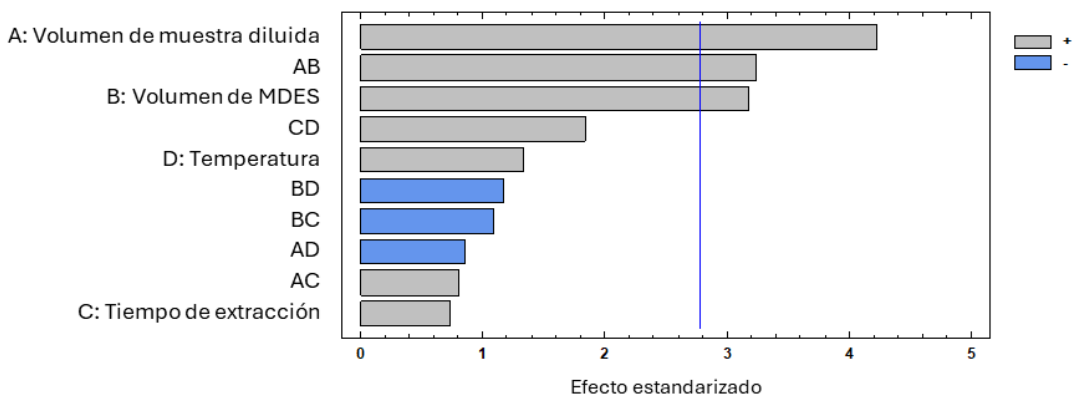


Diagrama de Pareto estandarizado para V

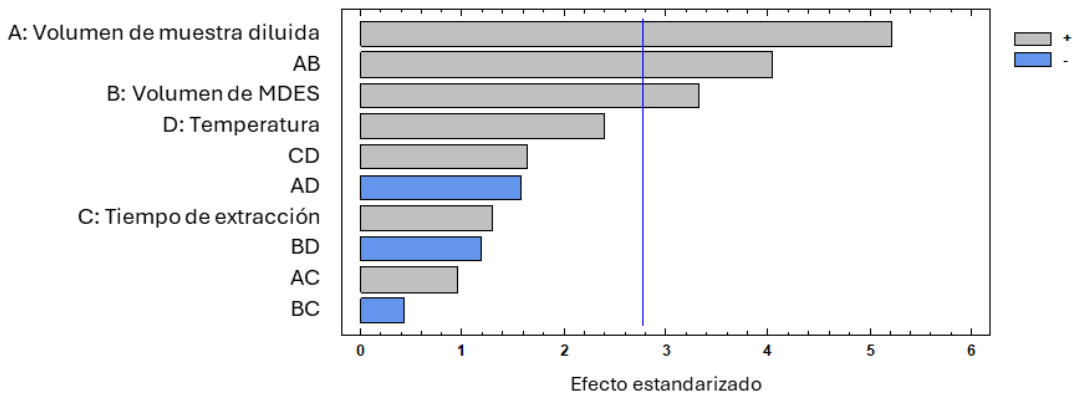


Diagrama de Pareto estandarizado para Zn

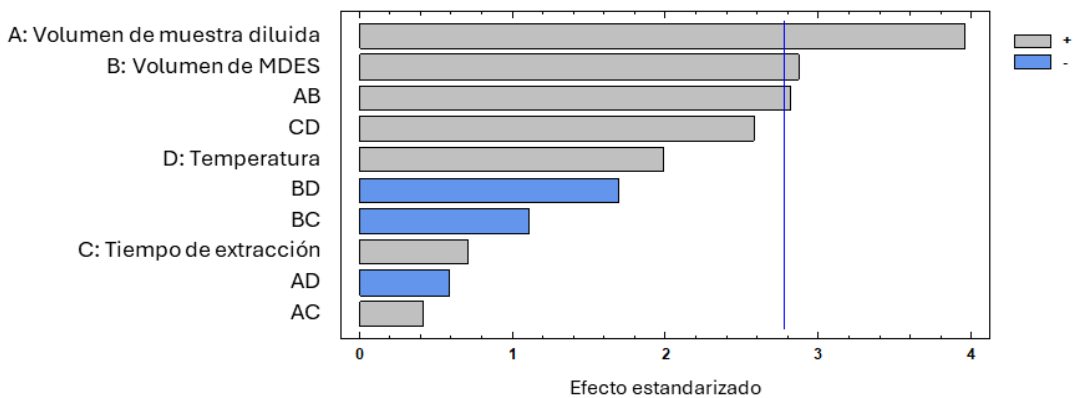
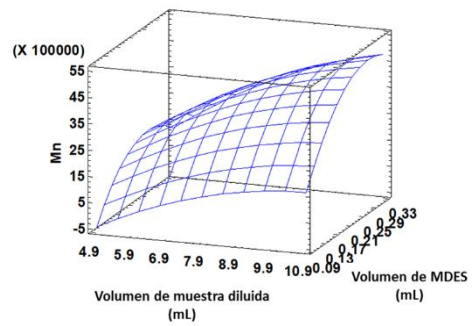
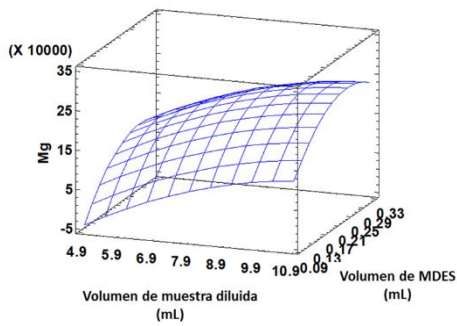
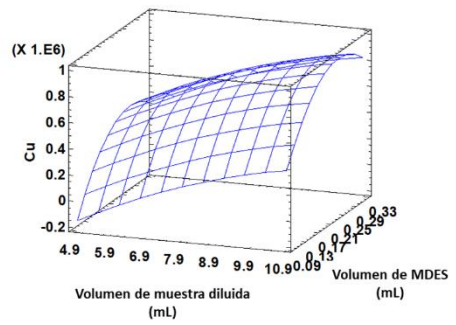
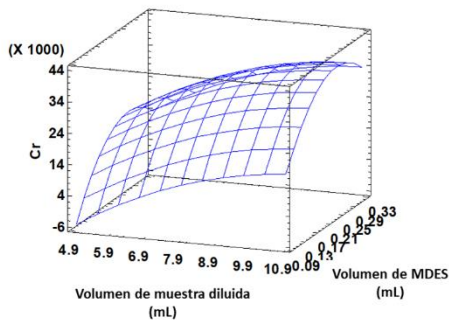
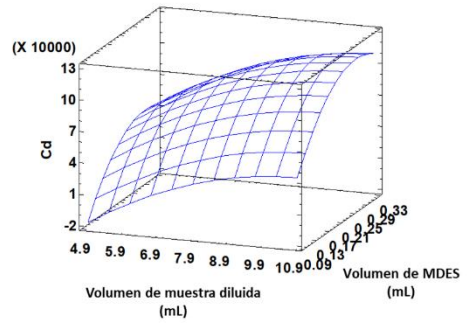
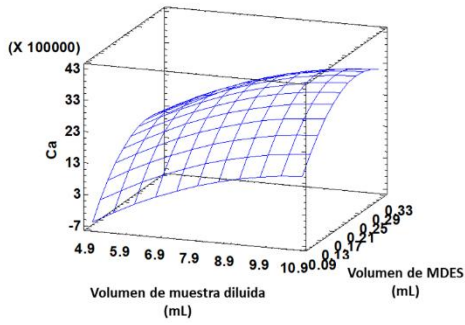
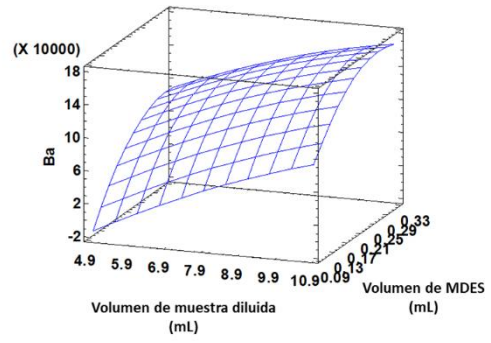
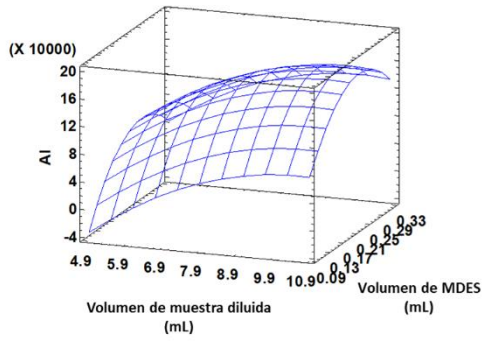


Figura 5.3.2 Gráficas de Pareto estandarizadas generadas en el estudio de cribado sobre los factores que influyen el método UA-DLLME.

5.3.1.3 Diseño central compuesto (CCD)

Luego de determinar los parámetros que afectan significativamente el proceso de UA-DLLME, se llevó a cabo un CCD para determinar el valor óptimo de volumen de muestra diluido, volumen de MDES, y temperaturas correspondientes al proceso de extracción. Las superficies de respuesta obtenidas se pueden ver en la Fig. 5.3.3 y las condiciones óptimas para cada elemento se encuentran en la Tabla 15.



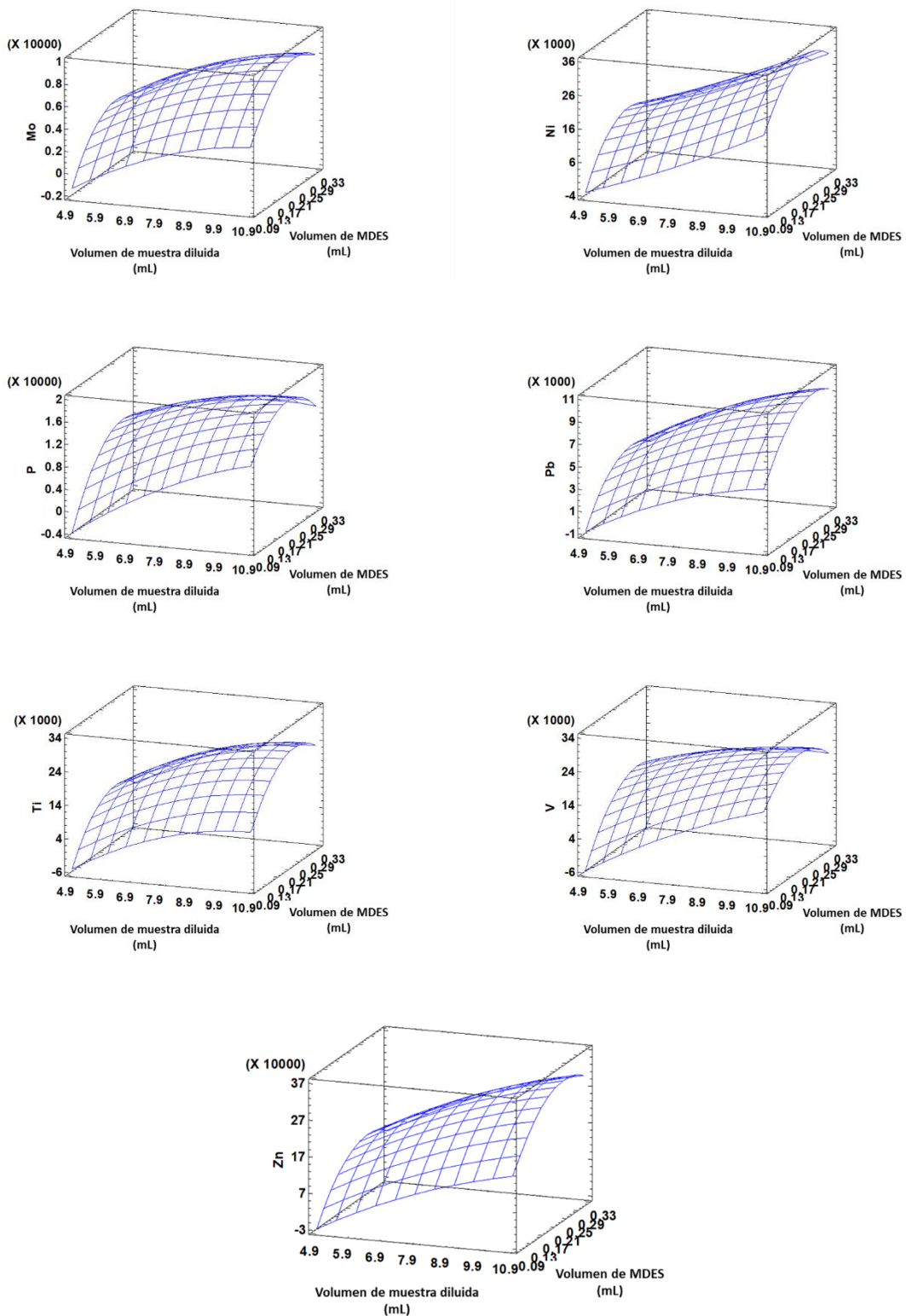


Figura 5.3.3 Superficies de respuesta correspondientes al análisis CCD, demostrando la relación entre el volumen de muestra diluida y el volumen de MDES a una temperatura de 50 °C para cada analito evaluado. Las condiciones experimentales fueron: 1 min de tiempo de microextracción y una concentración de analitos de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla 15. Valores óptimos de los factores volumen de muestra diluida, volumen de MDES y temperatura, para cada elemento analizado.

Elemento	Volumen de muestra diluida (mL)	Volumen de MDES (µL)	Temperatura (°C)
Al	10,00	238	58,2
Ba	10,00	265	59,9
Ca	10,00	255	60,0
Cd	10,00	281	59,2
Cr	10,00	244	58,9
Cu	10,00	252	58,1
Mg	10,00	271	60,0
Mn	10,00	271	57,7
Mo	10,00	258	60,0
Ni	10,00	265	58,4
P	10,00	244	60,0
Pb	10,00	275	59,9
Ti	10,00	261	60,0
V	10,00	243	58,5
Zn	10,00	254	58,5

5.3.1.4 Función de deseabilidad

Con el objetivo de facilitar el procedimiento experimental del método propuesto, las condiciones óptimas para todos los analitos analizados fueron identificadas empleando la función de deseabilidad. En los gráficos generados utilizando esta función, aquellos resultados que se aproximen a la unidad indican el

mejor ajuste para todos los elementos [22]. Luego de aplicar esta función, los resultados para las 3 variables analizadas se presentan en la Fig. 5.3.4, y en la Tabla 16 se resumen las condiciones optimizadas para la microextracción simultánea de todos los elementos evaluados.

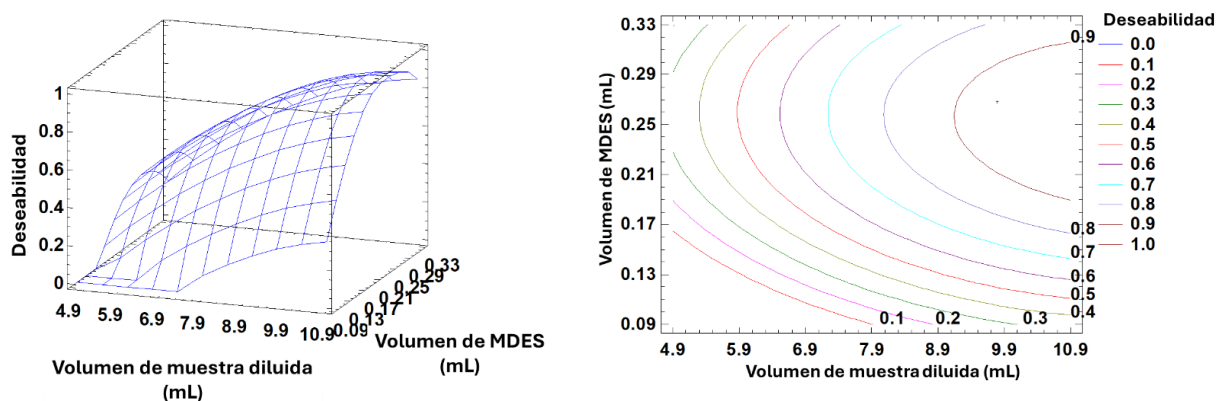


Figura 5.3.4 Gráficos adquiridos al aplicar la función de deseabilidad.

Tabla 16. Condiciones experimentales óptimas para el método UA-DLLME.

Factor	Valor
Volumen de muestra diluida (mL)	9,78
Volumen de MDES (μ L)	268
Temperatura ($^{\circ}$ C)	60
Tiempo de extracción (min)	1

5.3.2 Performance analítica

Todas las cifras de mérito analíticas que se muestran en la Tabla 17 se obtuvieron utilizando las condiciones de extracción optimizadas.

Tabla 17. Figuras de mérito del método propuesto.

Elemento	Rango lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetibilidad 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ (RSD%)	Repetibilidad 250 $\mu\text{g L}^{-1}$ (RSD%)
Al	5-500	0,9982	1,48	4,93	4,8	5,7
Ba	5-500	0,9989	1,06	3,54	5,9	5,8
Ca	5-500	0,9989	1,33	4,43	6,4	5,5
Cd	5-500	0,9961	0,19	0,62	7,0	4,2
Cr	5-500	0,9986	0,51	1,69	6,8	3,8
Cu	5-500	0,9996	0,80	2,67	6,9	4,3
Mg	25-500	0,9952	2,88	9,59	5,8	3,5
Mn	5-500	0,9984	0,09	0,31	6,0	7,7
Mo	5-500	0,9991	0,37	1,22	8,2	5,8
Ni	5-500	0,9958	0,49	1,63	3,9	4,9
P	5-500	0,9984	1,28	4,27	5,9	6,6
Pb	5-500	0,9991	1,05	3,50	4,0	1,4
Ti	5-500	0,9988	0,54	1,80	5,8	7,2
V	5-500	0,9965	0,37	1,23	5,0	4,4
Zn	5-500	0,9986	0,75	2,49	4,4	8,8

Para calcular el límite de detección (LOD, del inglés *limit of detection*) y de cuantificación (LOQ, del inglés *limit of quantification*), se siguieron las recomendaciones de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC, del inglés *International Union of Pure and Applied Chemistry*) [23]. El LOD se calculó como 3 veces la desviación estándar de la señal del blanco dividida por la pendiente de la curva de calibrado, y el LOQ se calculó como 10/3 el LOD. En ambas

situaciones, la desviación estándar de la señal del blanco se calculó a partir de un total de 10 mediciones. Se evaluó la linealidad para todos los analitos investigados utilizando soluciones estándar de 5, 25, 50, 100, 250, y 500 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se alcanzó un intervalo lineal con un coeficiente de determinación (R^2) entre 0,9952 y 0,9996 para todos los elementos analizados.

Por otro lado, se investigó la repetibilidad del método analítico propuesto mediante la realización de cinco extracciones de cada analito a 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ y a 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. Se calculó la desviación estándar relativa porcentual (RSD%, del inglés *percentage relative standard deviation*) para ambas concentraciones y se obtuvieron valores de RSD% inferiores al 8,8% para todos los elementos evaluados.

5.3.3 Análisis de muestras reales

Se analizaron muestras reales de aceite comestible y se realizaron estudios de recuperación para evaluar la aplicabilidad del método propuesto. A las muestras reales se les adicionó dos niveles de concentración de analitos diferentes (25 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) y se las analizó por triplicado. Todas las mediciones de la muestra real se realizaron en las condiciones óptimas. Como puede observarse en la Tabla 18, los resultados muestran valores de recuperación que oscilan entre 75,7 y 107,4%, con RSD% del 0,3 al 9,3%, lo que demuestra que el método desarrollado es válido para aplicaciones en la realización de análisis de muestras reales de aceites comestibles.

Tabla 18. Valores de recuperación relativa obtenidos para las muestras adicionadas (25 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) y valores de las concentraciones encontradas ($\mu\text{g L}^{-1} \pm s^a$) en muestras diluidas de aceite comestible analizadas para la determinación de metales traza. ^a desviación estándar ($n = 3$).

Aceite Girasol			
Elemento	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Recuperación 25 $\mu\text{g L}^{-1}$	% Recuperación 100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Al	124,8 \pm 11,7	80,3	78,8
Ba	< LOD	87,7	84,7
Ca	82,5 \pm 3,6	76,3	83,5
Cd	< LOD	105,1	82,8
Cr	5,1 \pm 0,2	80,9	84,0
Cu	22,3 \pm 0,2	84,3	84,4
Mg	< LOD	96,4	86,7
Mn	187,9 \pm 7,7	81,4	78,4
Mo	< LOD	81,0	77,9
Ni	< LOD	80,6	75,7
P	1115 \pm 6	77,4	84,1
Pb	< LOD	82,9	79,7
Ti	< LOD	77,8	76,1
V	< LOD	80,7	72,0
Zn	212,0 \pm 14,6	72,0	82,0

Aceite Soja			
Elemento	Concentración encontrada (µg L ⁻¹)	% Recuperación 25 µg L ⁻¹	% Recuperación 100 µg L ⁻¹
Al	48,4 ± 3,8	79,9	77,5
Ba	< LOD	82,5	82,4
Ca	474,3 ± 10,7	85,9	79,8
Cd	< LOD	99,4	83,2
Cr	< LOD	99,7	80,6
Cu	< LOD	86,8	89,1
Mg	588,6 ± 5,9	86,6	86,1
Mn	17,5 ± 0,3	77,0	78,3
Mo	< LOD	103,3	98,3
Ni	< LOD	83,9	96,2
P	1332 ± 4	87,6	78,5
Pb	< LOD	107,4	103,5
Ti	< LOD	100,3	81,3
V	< LOD	88,1	81,9
Zn	13,6 ± 0,8	77,9	83,4

Aceite Colza			
Elemento	Concentración encontrada (µg L ⁻¹)	% Recuperación 25 µg L ⁻¹	% Recuperación 100 µg L ⁻¹
Al	14,3 ± 0,6	79,5	79,8
Ba	< LOD	88,3	88,7
Ca	310,7 ± 11,6	84,6	84,0
Cd	< LOD	101,0	87,7
Cr	5,9 ± 0,4	85,7	77,4
Cu	< LOD	85,1	78,3
Mg	7,6 ± 0,5	85,1	83,9
Mn	37,7 ± 3,2	86,4	79,3
Mo	< LOD	105,5	96,8
Ni	< LOD	81,8	97,9
P	842,8 ± 5,5	81,4	96,8
Pb	< LOD	106,0	99,1
Ti	< LOD	97,7	90,2
V	< LOD	88,1	84,7
Zn	23,0 ± 0,5	85,2	86,5

Aceite Sésamo			
Elemento	Concentración encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Recuperación 25 $\mu\text{g L}^{-1}$	% Recuperación 100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Al	92,6 \pm 6,3	77,1	77,8
Ba	< LOD	87,9	87,3
Ca	834,6 \pm 6,3	86,0	81,9
Cd	< LOD	101,0	88,3
Cr	5,7 \pm 0,3	78,0	94,1
Cu	26,5 \pm 1,9	83,2	84,6
Mg	847,1 \pm 6,1	78,0	74,6
Mn	86,6 \pm 6,2	75,2	78,8
Mo	< LOD	108,7	101,1
Ni	< LOD	81,2	93,5
P	1280 \pm 8	83,8	82,7
Pb	< LOD	103,0	100,5
Ti	< LOD	105,7	80,1
V	< LOD	87,8	74,8
Zn	106,6 \pm 7,2	86,2	85,4

5.3.4 Evaluación de la sostenibilidad del método propuesto

La métrica AGREE se aplicó al método propuesto para evaluar la sostenibilidad y la descripción de cada criterio se puede encontrar en la Tabla 19.

Tabla 19. Criterios de evaluación de la métrica AGREE.

Criterio	Descripción del criterio
1	Tratamiento de la muestra.
2	Cantidad de muestra.
3	Posicionamiento del dispositivo.
4	Preparación de la muestra. Etapas.
5	Automatización, miniaturización.
6	Derivatización.
7	Residuos.
8	Rendimiento del análisis.
9	Ahorro de energía.
10	Fuente de reactivos.
11	Toxicidad.
12	Seguridad del operador.

El pictograma resultante utilizando el software AGREE se representa en la Fig. 5.3.5, mientras que un informe detallado del trabajo se puede ver en la Tabla 20.

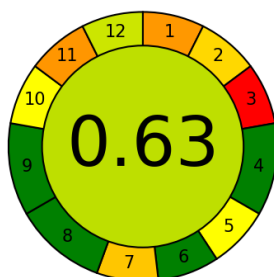


Figura 5.3.5 Evaluación de la sostenibilidad del método propuesto por el método AGREE.

Tabla 20. Informe sobre la sostenibilidad del método propuesto aplicando el método AGREE.

Criterio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Puntaje	0,3	0,42	0,0	1,0	0,5	1,0	0,39	1,0	1,0	0,5	0,3	0,6
Peso	2	2	2	3	2	2	2	3	3	2	2	2

La metodología propuesta tiene una puntuación alta en al menos 7 de los 12 principios, como se refleja en el límite de color del pictograma. Como puede observarse en la Fig. 5.3.5, el criterio que ha resultado favorecido en el método propuesto ha sido el criterio 8 correspondiente a la maximización del rendimiento de la muestra teniendo en cuenta el número de muestras analizadas por hora (60 muestras). El criterio fue favorecido porque el método de extracción propuesto utiliza tiempos de extracción cortos (1 min) y el uso del baño de ultrasonido con capacidad de hasta 10 muestras simultáneas favorece el análisis de un gran número de muestras en poco tiempo. El criterio 9, que se refiere a minimizar el consumo energético del proceso, también se vio favorecido en la métrica porque el equipo utilizado en el proceso de extracción (baño de US) junto al instrumento empleado en la detección (ICP-OES) requiere poca cantidad de energía por muestra ($6,3 \times 10^{-3}$ kWh muestra⁻¹). Por último, los criterios 4 y 6, referidos a la integración de procesos y operaciones analíticas y a la derivatización del analito de interés, también se vieron favorecidos ya que el procedimiento de preparación de muestras posee 3 pasos diferenciados (dilución de la muestra, extracción/sonicación y separación magnética) y en este método no se derivatizan los analitos de interés.

Por otro lado, los puntos intermedios de la evaluación corresponden a los

criterios 5 y 10, que se refieren a la automatización/miniaturización y a la preferencia de reactivos obtenidos de fuentes renovables, respectivamente. Si bien el método propuesto no se encuentra automatizado el tratamiento de la muestra sólo consiste en diluir la misma. Por otro lado, a pesar de utilizar n-hexano como diluyente, el extractante empleado posee dos componentes (cloruro de colina y ácido láctico) que provienen de fuentes renovables.

Por último, el criterio más penalizado en la evaluación del método fue el criterio 3 relativo a la preparación in situ de las muestras porque se realizó ex situ en el laboratorio; y, el criterio 11 correspondiente a la utilización de reactivos seguros por la cantidad de n-hexano utilizada (4,89 g). Considerando el valor obtenido en cada uno de los criterios comentados, la puntuación final de la evaluación fue de 0,63 en una escala de 0 a 1, considerando método sostenible valores superiores a 0,5. Por lo tanto, a partir de los resultados mencionados, se puede concluir que el método propuesto es una excelente opción ecológica para la determinación de metales traza en muestras de aceite comestible. Sin embargo, es necesario tener en cuenta algunos aspectos para mejorar la puntuación final. Por ejemplo, mejorar la automatización del procedimiento, reducir la cantidad de residuos generados o sustituir el n-hexano por otros disolventes menos nocivos para conseguir un método aún más respetuoso con el ambiente.

5.4 Conclusiones parciales

Se presenta una nueva metodología DLLME basada en MDES asistida por ultrasonido para la separación y preconcentración de 15 elementos (Al, Ba, Ca, Cd, Cr, Cu, Mg, Mn, Mo, Ni, P, Pb, Ti, V, y Zn) a partir de muestras de aceite comestible

previo a su determinación por ICP-OES. La sostenibilidad del método propuesto se ha evaluado objetivamente utilizando la métrica AGREE.

El empleo de pequeños volúmenes del extractante MDES permite la reducción de reactivos y residuos, y aumenta el carácter ecológico del método. Además, el uso del baño de ultrasonido como sistema de dispersión supone una reducción de reactivos al sustituir los disolventes dispersantes y mejora el rendimiento de las muestras al tiempo que reduce el tiempo de análisis. En cuanto a la técnica ICP-OES, las cifras de mérito fueron adecuadas para la determinación elemental en muestras de aceite comestible. Cabe señalar que esta técnica es valiosa ya que se pueden analizar una gran cantidad de elementos simultáneamente a diferencia de instrumentos que emplean espectroscopía de absorción atómica.

Por lo tanto, el método analítico propuesto es rápido, sencillo, económico y presenta una métrica cuantitativa ecológica aceptable. Sin embargo, aún existen algunas limitaciones y aspectos que deberían considerarse para mejorar el método propuesto, como la sustitución del n-hexano por un disolvente de menor toxicidad.

Finalmente, las cifras de mérito justificaron la adecuación de la nueva metodología propuesta para el tipo de matriz y analitos evaluados, mostrando buenos límites de detección y cuantificación para permitir la determinación de estos analitos.

5.5 Referencias

- [1] A.S.N. Trindade, A.F. Dantas, D.C. Lima, S.L.C. Ferreira, L.S.G. Teixeira, Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu,

- Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, *Food Chem* 185 (2015) 145–150. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.03.118>.
- [2] R. Hu, T. He, Z. Zhang, Y. Yang, M. Liu, Safety analysis of edible oil products via Raman spectroscopy, *Talanta* 191 (2019) 324–332. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2018.08.074>.
- [3] Y.L. Chu, S.J. Jiang, Speciation analysis of arsenic compounds in edible oil by ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry, *J Chromatogr A* 1218 (2011) 5175–5179. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.05.089>.
- [4] D. Kara, A. Fisher, S. Hill, Detergentless ultrasound-assisted extraction of trace elements from edible oils using lipase as an extractant, *Talanta* 144 (2015) 219–225. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.05.056>.
- [5] R. Manjusha, R. Shekhar, S.J. Kumar, Ultrasound-assisted extraction of Pb, Cd, Cr, Mn, Fe, Cu, Zn from edible oils with tetramethylammonium hydroxide and EDTA followed by determination using graphite furnace atomic absorption spectrometer, *Food Chem* 294 (2019) 384–389. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2019.04.104>.
- [6] A.F. Carneiro, C.N. Carneiro, L. de N Pires, L.S.G. Teixeira, S.M. Azcarate, F. de S Dias, D-optimal mixture design for the optimization of extraction induced by emulsion breaking for multielemental determination in edible vegetable oils by microwave-induced plasma optical emission spectrometry, *Talanta* 219 (2020) 121218. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2020.121218>.
- [7] M. Savio, M.S. Ortiz, C.A. Almeida, R.A. Olsina, L.D. Martinez, R.A. Gil,

- Multielemental analysis in vegetable edible oils by inductively coupled plasma mass spectrometry after solubilisation with tetramethylammonium hydroxide, *Food Chem* 159 (2014) 433–438. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.03.041>.
- [8] D. Bakircioglu, N. Topraksever, Y.B. Kurtulus, Determination of zinc in edible oils by flow injection FAAS after extraction induced by emulsion breaking procedure, *Food Chem* 151 (2014) 219–224. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.11.069>.
- [9] A.S.N. Trindade, A.F. Dantas, D.C. Lima, S.L.C. Ferreira, L.S.G. Teixeira, Multivariate optimization of ultrasound-assisted extraction for determination of Cu, Fe, Ni and Zn in vegetable oils by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, *Food Chem* 185 (2015) 145–150. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.03.118>.
- [10] D. Kara, A. Fisher, S. Hill, Extraction of trace elements by ultrasound-assisted emulsification from edible oils producing detergentless microemulsions, *Food Chem* 188 (2015) 143–148. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2015.04.057>.
- [11] F.G. Lepri, E.S. Chaves, M.A. Vieira, A.S. Ribeiro, A.J. Curtius, L.C.C. De Oliveira, R.C. De Campos, Determination of Trace Elements in Vegetable Oils and Biodiesel by Atomic Spectrometric Techniques—A Review, *Appl Spectrosc Rev* 46 (2011) 175–206. <https://doi.org/10.1080/05704928.2010.529628>.
- [12] X. Jing, H. Xue, X. Sang, X. Wang, L. Jia, Magnetic deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction for enantioselectively determining chiral mefentrifluconazole in cereal samples via ultra-high-performance liquid chromatography, *Food Chem* 391 (2022) 133220. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.133220>.

- [13] A.S. Lorenzetti, M.J. Lo Fiego, M.F. Silva, C. Domini, F.J.V. Gomez, Water behavior study for tailoring fructose-citric acid based natural deep eutectic solvent properties towards antibiotics solubilization, *J Mol Liq* 363 (2022) 119917. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2022.119917>.
- [14] M. Karimi, S. Dadfarnia, A.M.H. Shabani, F. Tamaddon, D. Azadi, Deep eutectic liquid organic salt as a new solvent for liquid-phase microextraction and its application in ligandless extraction and preconcentration of lead and cadmium in edible oils, *Talanta* 144 (2015) 648–654. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2015.07.021>.
- [15] T. Khezeli, A. Daneshfar, Synthesis and application of magnetic deep eutectic solvents: Novel solvents for ultrasound assisted liquid-liquid microextraction of thiophene, *Ultrason Sonochem* 38 (2017) 590–597. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2016.08.023>.
- [16] L.A. Meira, F. de Souza Dias, Application of constrained mixture design and Doehlert matrix in the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction assisted by ultrasound for preconcentration and determination of cadmium in sediment and water samples by FAAS, *Microchemical Journal* 130 (2017) 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2016.07.013>.
- [17] C. Zapater, M.Á. Aguirre, N. González-Gallardo, D.J. Ramón, L. Vidal, A. Canals, Determination of Fe, Cu, and Pb in edible oils using choline chloride:ethylene glycol deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction associated with microwave-induced plasma optical emission spectrometry, *Talanta* 274 (2024) 125939. <https://doi.org/10.1016/J.TALANTA.2024.125939>.

- [18] A.S. Lorenzetti, E. Vidal, M.F. Silva, C. Domini, F.J.V. Gomez, C. Domini, Native Fluorescent Natural Deep Eutectic Solvents for Green Sensing Applications: Curcuminoids in Curcuma longa Powder, ACS Sustain Chem Eng 9 (2021) 5405–5411.
https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.1C00406/ASSET/IMAGES/LARGE/SC1C00406_0005.JPEG.
- [19] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software, Anal Chem 92 (2020) 10076–10082.
https://doi.org/10.1021/ACS.ANALCHEM.0C01887/ASSET/IMAGES/LARGE/AC0C01887_0003.JPEG.
- [20] M. de los Á. Fernández, M. Espino, F.J.V. Gomez, M.F. Silva, Novel approaches mediated by tailor-made green solvents for the extraction of phenolic compounds from agro-food industrial by-products, Food Chem 239 (2018) 671–678.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.06.150>.
- [21] J. Cao, L. Shi, Y. Wang, Y. Liu, B. Zeng, F. Zhao, Novel ferrofluid based on water-based deep eutectic solvents: application in dispersive liquid-liquid microextraction of naphthalene-derived plant growth regulators in edible oil, J Hazard Mater 465 (2024) 133234. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2023.133234>.
- [22] S.J. Abellán-Martín, D. Villalgorido-Hernández, M.Á. Aguirre, E. V. Ramos-Fernández, J. Narciso, A. Canals, Enhancing Trace Metal Extraction from Wastewater: Magnetic Activated Carbon as a High-Performance Sorbent for Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry Analysis, Separations 10 (2023) 563. <https://doi.org/10.3390/SEPARATIONS10110563/S1>.

- [23] L.A. Currie, Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities: (IUPAC Recommendations 1995), *Anal Chim Acta* 391 (1999) 105–126. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(99\)00104-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(99)00104-X).

Conclusiones

Esta tesis doctoral presenta un avance significativo en el campo de la Química Analítica Sostenible a través del desarrollo y optimización de métodos innovadores para la determinación de contaminantes en diversas matrices, destacando la sostenibilidad y eficiencia del método. A lo largo de la tesis, se han desarrollado tres métodos analíticos, en cada uno se demostró la viabilidad y los beneficios de enfoques analíticos respetuosos con el ambiente.

En primera instancia, se diseñó un sistema para la determinación de arsénico (III) en muestras de agua ambiental utilizando el análisis de imágenes digitales. Este método no sólo cumple con los límites de detección y cuantificación establecidos por la Organización Mundial de la Salud, sino que también es rápido, miniaturizado y genera mínimos residuos. La combinación de impresión 3D y análisis digital de imágenes, utilizando un smartphone acoplado a un dispositivo impreso en 3D, permitió desarrollar un método sencillo, portátil y económico. La alta selectividad y el enfoque en la química analítica sostenible se evidenciaron a través de la métrica AGREE, destacando la reducción de residuos tóxicos en comparación con métodos tradicionales.

En segundo lugar, se desarrolló un método innovador de extracción utilizando disolventes eutécticos naturales profundos (NADES), específicamente LGH, para la extracción de metales en material de referencia certificado. Este enfoque, optimizado mediante un análisis univariado, demostró ser más sostenible y rápido que los métodos tradicionales, según la métrica AGREE. El uso de NADES como disolvente extractante destaca como una alternativa ecológica, subrayando el potencial de estos disolventes en la preparación de muestras.

Finalmente, se introdujo una nueva metodología de extracción en fase líquida

dispersiva asistida por ultrasonido (UA-DLLME) para la separación y preconcentración de 15 elementos en muestras de aceite comestible, seguida de su determinación por ICP-OES. Esta metodología, evaluada mediante la métrica AGREE, utiliza pequeños volúmenes de extractante y reduce significativamente el uso de reactivos y residuos. El método es rápido, sencillo y económico, aunque se identificaron áreas de mejora, como la sustitución del n-hexano por un disolvente menos tóxico.

En conjunto, los métodos desarrollados en esta tesis representan un avance hacia prácticas analíticas más ecológicas y sostenibles, proporcionando soluciones eficaces y respetuosas con el ambiente para la determinación de contaminantes. Estos enfoques no sólo ofrecen beneficios ambientales, sino que también son accesibles y aplicables en contextos con recursos limitados, contribuyendo significativamente al campo de la Química Analítica Sostenible.

Apéndice I: Productividad

Artículos publicados

- Nario, N. A., Insausti, M., Domini, C. E., & Grünhut, M. (2019). Free Glycerol Sensing in Biodiesel: Automatic System Based on Sequential Enzymatic Reactions Using a Fit-for-Purpose Chemiluminescence Detection Chamber. *Energy & Fuels*, 33(10), 9925-9933. <https://doi.org/10.1021/acs.energyfuels.9b02303>
- 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*, 124625. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2023.124625>

Presentaciones a congresos

Congresos Nacionales

- **Nicolás Nario**, Eliana Durante, Daniela Rodríguez-Zentner, Mónica B. Álvarez, Mariano Garrido y Claudia E. Domini. Profundización del conocimiento de técnicas analíticas a través de prácticas avanzadas y mayor grado de participación del alumno en el laboratorio. X Jornadas Nacionales y VII Jornadas Internacionales de Enseñanza de la Química Universitaria, Superior, Secundaria y Técnica; Buenos Aires, Argentina; 6-

10 de octubre de 2015. Página 319-322. Link:
<https://www.aqa.org.ar/pdf102/cd/JEQUSSST%C2%AD2015-ISSN1852-1207.pdf>

- **Nario, N. A.**; Insausti, M.; Domini, C. E.; Grünhut M. Método automático con detección quimioluminiscente para la determinación enzimática de glicerol libre en biodiesel. 9° Congreso Argentino de Química Analítica, Río Cuarto, Argentina; 7-10 de noviembre de 2017. Página 91. Link:
<https://www.unrc.edu.ar/unrc/comunicacion/editorial/repositorio/978-987-688-238-5.pdf>

- **Nario, N. A.**; Grünhut, M.; Domini, C. E. Determinación de arsénico (III) basada en la inhibición de la decoloración de heliantina. Automatización mediante un sistema de propulsión con múltiples jeringas. 10° Congreso Argentino de Química Analítica, Santa Rosa, Argentina; 17-20 de septiembre de 2019. Página 94. Link:
<https://drive.google.com/file/d/1BjN9SHefxldQ6CHbwe3eRKeRVXJQ7han/view>

- **Nario, N. A.**; Vidal, E. I.; Grünhut, M.; Domini, C. E. Diseño y desarrollo de un dispositivo basado en el análisis de imágenes digitales para la determinación de arsénico (III) en aguas mediante la reacción de inhibición de la decoloración de heliantina. 11° Congreso Argentino de Química

Análítica (modalidad virtual), Corrientes, Argentina; 30 de noviembre al 3 de diciembre 2021. Página 171. Link: https://www.aaqa.org.ar/web/wp-content/uploads/2022/06/Libro-XI_CAQA-2021_ISBN.pdf

- **Nario, N. A.**; Insaurrealde Vazquez, M.; Heggulustoy, C.; Del Rosso, P.; Grunhut, M.; Domini, C.; Almassio, M. Síntesis – caracterización de nanopartículas de zeína con aplicaciones analíticas. XXI Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados, Río Cuarto, Córdoba, Argentina; 9-11 de agosto de 2022. Página 289. <https://drive.google.com/file/d/1L3qFRk-ZBY1eWc0zgzsXn8eT-mfCoeRP/view>.

- **Nario, Nicolás**; Insaurrealde Vazquez, Marcos; Pecini, Eliana; Grunhut, Marcos; Heggulustoy, Claudia; Del Rosso, Pablo; Domini, Claudia; Almassio, Marcela. Nanopartículas de zeína como base para la remoción de colorantes. XXII Encuentro de Superficies y Materiales Nanoestructurados, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina; 6-8 de septiembre de 2023.

- Fuente, Silvia; Morgade, Cecilia; **Nario, Nicolás**; Ulacco, Sandra; Cabeza Gabriela. Estudio teórico-experimental de la influencia de la naturaleza de la superficie del fotocatalizador TiO₂ en el estado de oxidación del arsénico y su remoción. XXII Encuentro de Superficies y Materiales

Nanoestructurados, Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina; 6-8 de septiembre de 2023.

- **N. A. Nario**; A.S. Lorenzetti; C. Samuelsen Lucea; N.A. Gomez; M. Grünhut; F. Cora Jofré; M. Savio; S.M. Azcarate; J.M. Camiña; M.F. Silva; F.J.V. Gomez; C.E. Domini. Desarrollo de un método de extracción de metales en sedimentos empleando nuevos sistemas eutécticos naturales. 12° Congreso Argentino de Química Analítica, San Juan, Argentina; 12 al 15 de septiembre de 2023.
- Santiago Bernardini; **Nicolás A. Nario**; Sebastián A. Costa; Claudia E. Domini; Marcos Grünhut. Estudio de la dinámica del proceso fermentativo de kéfir de agua mediante métodos enzimáticos y detección por imágenes digitales. 12° Congreso Argentino de Química Analítica, San Juan, Argentina; 12 al 15 de septiembre de 2023.

Congresos Internacionales

- González N., Ripari F., Limbozzi F., Lorenzetti A., **Nario N.**, Springer V., Di Nezio M. S., Llamas N. Propuesta metodológica para la comparación de dos métodos analíticos en la determinación de NaCl en muestras farmacéuticas. 1° Reunión Conjunta, 5° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 50° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de

Farmacología Experimental (SAFE), La Punta, San Luis, Argentina; 14-16 de noviembre de 2018. Página 9. Link: <http://c0950460.ferozo.com/wp-content/uploads/2018/12/Certificados.pdf>

- **Nario, N.**; Lorenzetti, A.; González, N.; Ripari, F.; Limbozzi, F.; Llamas, N.; Di Nezio, M. S.; Springer, V. Introducción al aprendizaje por investigación en análisis farmacéutico: determinación de ácido acetilsalicílico en comprimidos mediante volumetría ácido-base. 1° Reunión Conjunta, 5° Reunión Internacional de Ciencias Farmacéuticas (RICiFa), 50° Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología Experimental (SAFE), La Punta, San Luis, Argentina; 14-16 de noviembre de 2018. Página 10. Link: <http://c0950460.ferozo.com/wp-content/uploads/2018/12/Certificados.pdf>

- **Nario, N.**; Samuelsen Lucea, C; Lorenzetti, A.; Gomez, N.A.; Grünhut, M.; Cora Jofré, F.; Savio, M.; Azcarate, S.; Camiña, J.; Silva, M.F.; Vicente Gomez, F.J.; Domini, C.E. Tailoring a new Natural Deep Eutectic Solvent to assist the extraction of metals from sediments. 11th World Congress of Chemical Engineering (WCCE11 – CIBIQ2023 – GS03 – Global symposium on Ionic Liquids), Buenos Aires, Argentina; 4-8 de junio de 2023.

- Morgade C.; Ulacco, S.; **Nario, N.**; Meier, L.; Fuente, S.; Vidal, E.; Grünhut, M.; Domini, C.E. Removal of fluoride and arsenic from waters with acidic

pH. 11th World Congress of Chemical Engineering (WCCE11 – Materials and Nanotechnology Global symposium on Ionic Liquids), Buenos Aires, Argentina; 4-8 de junio de 2023.