

UNCUYO

Universidad
Nacional de Cuyo

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Doctorado en Ciencia y Tecnología

Tesis Doctoral

**“Desarrollo de métodos analíticos de
preconcentración con líquidos iónicos magnéticos
para la determinación de elementos traza
contaminantes en productos apícolas”**

Tesista: **Lic. Emiliano Franco Fiorentini**

Director: **Dr. Rodolfo G. Wuilloud**

Mendoza, Argentina – 2022

Instituciones de desarrollo



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO



**FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS
Y NATURALES**
Naturaleza, Ciencia y Humanismo

CONICET



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

I C B

Instituto Interdisciplinario de Ciencias Básicas



Laboratorio de Química Analítica
para Investigación y Desarrollo

Financiamiento

CONICET



AGENCIA
NACIONAL DE PROMOCIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA



UNCUYO
UNIVERSIDAD
NACIONAL DE CUYO

SIIP

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN,
INTERNACIONALES Y POSGRADO

“Equipado con sus cinco sentidos, el ser humano navega por el universo que lo rodea y a sus aventuras las llama ciencia, sin embargo, aun al día de hoy, lo que conoce solo es una gota de agua y lo que ignora es el océano”

Edwin Powell Hubble e Isaac Newton

Dedico esta tesis doctoral a mi familia,
en especial a mi abuela Pía y mis padres,
los cuales me enseñaron que el metal
más fuerte se forja en el fuego más intenso.

A las amistades que me regaló la vida,
las cuales me prestaron sin dudar sus alas
en los momentos que olvide cómo volar.

Y a ese pequeño niño, que desde que tenía uso de razón
busco explicar el porqué de las cosas y que hoy, desde mi interior,
me observa con orgullo al verme como un hombre de Ciencia.

Agradecimientos

El presente trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado en el Instituto Interdisciplinario de Ciencias Básicas (ICB), perteneciente al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (FCEN) de la Universidad Nacional de Cuyo (UNCuyo), específicamente en el Laboratorio de Química Analítica para Investigación y Desarrollo (QUIANID).

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a dichas Instituciones y a las personas que allí desempeñan sus actividades. Agradezco al CONICET, por haber financiado mis estudios doctorales, permitiendo así la concreción del trabajo aquí expuesto. A mi asesor científico, Dr. Rodolfo G. Wuilloud, por haberme permitido trabajar bajo su dirección, por la orientación, apoyo, aportes y estímulo brindados. Me acompañó en mis primeros pasos en la investigación, desde pasantías en el QUIANID, en mi Tesis de Grado y hasta la presente Tesis Doctoral.

A los miembros de la Comisión de Seguimiento del Doctorado, en especial a la Dra. Ofelia Agoglia, por acompañarme gustosamente en cada una de las etapas de la Tesis, por las preguntas, el apoyo y los aportes que realizaron a lo largo de todo el proceso de mi doctorado.

A los excelentes docentes de diversas universidades nacionales, incluida la UNCuyo, que llevaron a cabo el dictado de diversos cursos de posgrado, quienes me señalaron aspectos de la Ciencia y en especial de la Química realmente interesantes, me permitieron profundizar mis conocimientos e inculcaron la vocación por el saber.

A todos mis compañeros de doctorado, en especial a los que integran el QUIANID, por su incondicional colaboración, afecto y amistad brindados en el transcurso del desarrollo de esta Tesis.

De modo muy especial agradezco a mis abuelas, hermanos y queridos padres, Romeo e Hilda, por apoyarme afectivamente y animarme a hacer lo que realmente me gusta. Por transmitirme los valores del esfuerzo, responsabilidad y dedicación, los cuales me han permitido llegar a este punto. Han sido aquellas personas que, a lo largo de la vida, con su amor incondicional, estuvieron presentes en momentos de risa y llanto, y que me brindaron las herramientas necesarias para convertir obstáculos en retos y los cambios en ilusiones.

A mis amistades, por todos los invaluable momentos compartidos, por impulsarme siempre a buscar nuevos retos, por entenderme y aconsejarme, por permitirme crecer día a día juntos, por ayudar a levantarme luego de mis tropiezos y por ser hoy y siempre mi cable a tierra.

Por último, doy gracias a todas y cada una de las personas que en algún momento me preguntaron: “¿Cómo vas con el doctorado?”, y me desearon éxitos en la realización del mismo.

¡Por ello y para ellos!

Prólogo

La miel es una sustancia dulce natural producida por las abejas (*Apis mellifera*) a partir del néctar de las plantas que las abejas recogen, transforman con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan y almacenan en colmenas para su maduración. La miel tiene un papel importante en la alimentación humana y la medicina debido a sus excelentes efectos dietéticos, antibacterianos, antifúngicos y antivirales. Es un alimento complejo que contiene diversos nutrientes, en particular aminoácidos, vitaminas, ácidos orgánicos y enzimas. Presenta un contenido mineral bajo, que varía dependiendo de las condiciones del suelo y del origen botánico de las flores polinizadas.

Las actividades humanas producen contaminantes como consecuencia de su desarrollo, cuyas cantidades y toxicidad suelen colmar la capacidad homeostática del medio ambiente para purificarse. Por lo tanto, el análisis sistemático y la vigilancia del medio ambiente es una cuestión de urgencia. En este sentido, los productos de las abejas, se consideran buenos indicadores de contaminación por sustancias tóxicas, ya que las abejas pueden llevar de vuelta a la colmena los contaminantes depositados en las superficies de las flores y hojas de las plantas visitadas. La presencia de xenobióticos en estos productos puede deteriorar su calidad y propiedades y ponen en riesgo la salud humana.

La producción de miel no incluye el agregado de sustancias y su consumo es elevado en varios países, siendo Argentina uno de los principales productores a nivel mundial y uno de los mayores exportadores. La provincia de Mendoza produce miel de alta calidad que se exporta en un 95%, por lo que es un sector estratégico para el desarrollo socio-productivo de la provincia. Sin embargo, la exportación a mercados internacionales demanda el cumplimiento de los máximos estándares de calidad, que incluye el control de residuos de elementos tóxicos tales como arsénico (As), cadmio (Cd), cromo (Cr) y plomo (Pb) a concentraciones realmente bajas.

Debido a las bajas concentraciones en las que elementos traza contaminantes pueden encontrarse en la miel, y que así son exigidos para su comercialización, la determinación exacta y precisa es un gran desafío analítico que requiere técnicas instrumentales muy sensibles y costosas, las cuales incluso podrían ser insuficientes. Una solución posible es la preconcentración, la cual es una herramienta muy eficiente para incrementar la sensibilidad de los métodos a través de procesos de enriquecimiento de los analitos basados en la extracción líquido-líquido (LLE) o en fase sólida (SPE). En general, en LLE se utilizan solventes orgánicos volátiles debido a su fácil manipulación y alta eficiencia de extracción, pero contaminan el ambiente por su elevada volatilidad. Los Líquidos Iónicos (ILs) son una valiosa alternativa debido a sus especiales propiedades (como volatilidad indetectable), siendo asignado el término "Líquido Iónico" a cualquier sal con punto de fusión menor a 100°C. Ciertos ILs son hidrófobos y forman sistemas de extracción bifásicos con medios acuosos para extraer numerosos analitos, entre ellos, metales pesados y metaloides.

En lo que se refiere a su uso en LLE, y para la determinación de elementos traza, en años recientes se ha observado una marcada evolución hacia la miniaturización, al disminuir el volumen de solventes utilizados mediante técnicas de microextracción líquido-líquido (LLME). Sin embargo, si bien dichos desarrollos con LLME poseen ventajas notorias (como elevada sensibilidad y selectividad, disminución del volumen de ILs y eliminación o reducción de solventes volátiles), existen ciertas limitaciones, tales como la necesidad de utilizar ILs más densos que el agua para facilitar la separación de las fases y la utilización de etapas de centrifugación que consumen mucho tiempo. En años recientes se han desarrollado métodos μ SPE con nanopartículas (NPs) magnéticas (como Fe_3O_4), sin embargo, esto plantea inconvenientes originados por la inestabilidad de los sistemas coloidales (agregación o precipitación de NPs), lo cual se traduce en una precisión analítica

deteriorada y falta de cuantitatividad de los métodos desarrollados ante una extracción menos reproducible.

Una alternativa novedosa para combinar los mayores beneficios de dichas estrategias analíticas, es decir, el uso de fases extractantes de elevada eficiencia pero que además puedan manipularse con un campo magnético, se basa en la utilización de una clase particular de ILs denominados Líquidos Iónicos Magnéticos (MILs), los cuales incorporan en sus estructuras átomos paramagnéticos de metales de transición (Co, Fe, Mn) o de diferentes elementos de las tierras raras (Dy, Gd y Nd) con alto momento magnético que actúan como cationes o aniones en los ILs. La estructura química de los MILs puede modificarse para que posean un alto momento magnético, pero también para incrementar su carácter hidrófobo y habilidad para solvatar distintas moléculas. Esta “sintonización” de sus propiedades puede permitir el desarrollo de tecnologías basadas en magnetismo para ser implementadas en los métodos analíticos con el objeto de generar nuevos procesos de microextracción y preconcentración hacia un analito específico. Sin embargo, debido a su alta novedad, el número de métodos analíticos que han utilizado MILs para la microextracción/preconcentración de diferentes analitos es aún muy limitado.

El objetivo de la presente tesis, consiste en desarrollar métodos analíticos sensibles, selectivos y ambientalmente sustentables basados en solventes de última generación, como los MILs en técnicas LLME, para la determinación y monitoreo de elementos traza contaminantes en alimentos de relevancia estratégica para la actividad socio-productiva de la provincia de Mendoza, como son los productos apícolas.

De esta manera, en la presente Tesis Doctoral, se presenta el desarrollo de diversos métodos analíticos fundamentados en técnicas de microextracción líquido-líquido dispersivas (DLLME) en modo discontinuo. Estas metodologías se aplicaron a la extracción y preconcentración de As, Cd, Cr y Pb, en muestras apícolas, con detección por

Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica (ETAAS). Cabe destacar que las mismas, son de las pocas metodologías MIL-DLLME aplicadas a metales.

Inicialmente, se desarrolló una metodología de preconcentración y determinación de Cd en muestras de miel, donde básicamente diluciones de las muestras fueron acidificadas con HCl, posteriormente el Cd presente fue complejado con dietilditiofosfato (DDTP) y extraído en un MIL, para finalmente determinar el analito mediante retroextracción del mismo en pequeño volumen de solución de HNO₃.

Posteriormente, fue desarrollada una metodología de preconcentración y determinación de As en muestras de miel, donde luego de una etapa de clean-up de las muestras, las mismas fueron acidificadas con HCl, el As presente fue complejado con DDTP, extraído en un MIL y determinado directamente en la fase extractante.

Consecutivamente, se desarrolló una metodología de preconcentración y determinación de Cr en muestras de miel de diferente tonalidad, donde las muestras fueron tratadas mediante un proceso de calcinación, dilución y acidificación con HCl, para luego extraer el cloroacuocomplejo de Cr formado en un MIL, el cual fue retirado de la solución mediante una varilla magnética y finalmente se logró determinar el analito luego de una dilución de la fase extractante en un solvente adecuado.

Por último, fue desarrollada una metodología de preconcentración y determinación de Pb en miel y productos derivados, donde las muestras fueron tratadas por un proceso de digestión, dilución y acidificación con HCl, para luego extraer el Pb presente previamente complejado con 1,5-difenilcarbazida (DFC) en un MIL para su posterior determinación.

La realización del presente trabajo de Tesis Doctoral ha dado origen a la publicación de diversos trabajos de investigación en revistas de prestigio internacional:

- **“Magnetic ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction technique for preconcentration and ultra-trace determination of Cd in honey”**

Emiliano F. Fiorentini, Leticia B. Escudero y Rodolfo G. Wuilloud.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 410 (2018) 4715-4723. Editorial Springer.

<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1050-6>

- **“Determination of As in honey samples by magnetic ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry”**

Emiliano F. Fiorentini, Brenda V. Canizo y Rodolfo G. Wuilloud.

Talanta, 198 (2019) 146-153. Editorial Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.091>

- **“Ultra-trace Cr preconcentration in honey samples by magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry”**

Emiliano F. Fiorentini, María N. Oviedo y Rodolfo G. Wuilloud.

Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 169 (2020) 105879. Editorial Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105879>

- **“A simple preconcentration method for highly sensitive determination of Pb in bee products by magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry”**

Emiliano F. Fiorentini, María B. Botella y Rodolfo G. Wuilloud

Journal of Food Composition and Analysis, 95 (2021) 103661. Editorial Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103661>

Asimismo, la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral ha dado origen a la presentación de diversos trabajos en congresos nacionales e internacionales:

- 9° CONGRESO ARGENTINO DE QUÍMICA ANALÍTICA, 7-10/11/2017, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. (Presentación en formato de póster).

“Determinación de trazas de Cd en miel por microextracción líquido-líquido dispersiva con líquido iónico magnético y espectrometría de absorción atómica electrotérmica”

Emiliano F. Fiorentini, Leticia B. Escudero y Rodolfo G. Wuilloud.

- XXXII CONGRESO ARGENTINO DE QUÍMICA, 12-15/03/2019, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina. (Presentación en formato de póster).

“Líquido Iónico Magnético como fase extractante para el desarrollo de una técnica de microextracción líquido-líquido aplicada a la preconcentración y determinación de trazas de As en miel por espectrometría de absorción atómica”

Emiliano F. Fiorentini, Brenda V. Canizo y Rodolfo G. Wuilloud.

- 15th RIO SYMPOSIUM ON ATOMIC SPECTROMETRY, 6-11/10/2019, Mendoza, Argentina. (Presentación oral).

“Microextraction and preconcentration technique based on Magnetic Ionic Liquid for the determination of chromium by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry applied to honey sample”

Emiliano F. Fiorentini, María N. Oviedo y Rodolfo G. Wuilloud.

- 6th IBEROAMERICAN MEETING ON IONIC LIQUIDS, 24-26/05/2021, Santiago de Chile. (Presentación oral en modo virtual).

“Preconcentration and determination of Pb at ultra-trace levels in bee products by magnetic ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction coupled to electrothermal atomic absorption spectrometry”

Emiliano F. Fiorentini, María B. Botella y Rodolfo G. Wuilloud.

Objetivos generales y específicos de la Tesis Doctoral

El objetivo general de la presente tesis doctoral, consiste en desarrollar métodos analíticos sensibles, selectivos y ambientalmente sustentables basados en solventes de última generación denominados Líquidos Iónicos Magnéticos (MILs), para la determinación de elementos traza contaminantes en alimentos de relevancia estratégica para la actividad socio-productiva de la provincia de Mendoza. Los objetivos específicos son los siguientes:

- 1) Sintetizar MILs constituidos por cationes del tipo fosfonio e imidazolio junto con aniones conteniendo elementos paramagnéticos (ej. Co, Dy, Fe, Mn, etc.).
- 2) Caracterizar las estructuras, propiedades magnéticas y capacidad extractante de los MILs sintetizados.
- 3) Investigar las propiedades de sistemas bifásicos líquido-líquido basados en MILs para la extracción y preconcentración de microcontaminantes elementales.
- 4) Desarrollar metodologías analíticas de elevada sensibilidad, selectivas y ambientalmente sustentables basadas en la implementación de los MILs en técnicas de microextracción líquido-líquido, para la determinación de microcontaminantes elementales de gran importancia ambiental y toxicológica (As, Cd, Cr y Pb).
- 5) Emplear los métodos analíticos desarrollados para el monitoreo de microcontaminantes elementales en mieles de diferentes zonas productivas de la provincia de Mendoza.

Hipótesis general de la Tesis doctoral

Los Líquidos Iónicos Magnéticos son una nueva generación de solventes con propiedades particulares que los plantean como alternativas eficientes y novedosas a los solventes orgánicos moleculares convencionales, para la eficiente microextracción y preconcentración de elementos traza contaminantes y el desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos, que a su vez preserven el medioambiente.

Índice de contenidos

Capítulo 1: Introducción	30
1.1 Generalidades de los metales tóxicos en estudio	30
1.1.1 Antecedentes históricos	31
1.1.2 Ocurrencia y obtención	33
1.1.3 Principales usos	34
1.1.4 Propiedades físico-químicas	35
1.1.5 Toxicología	37
1.1.5.1 Toxicología del Cd	37
1.1.5.2 Toxicología del As	39
1.1.5.3 Toxicología del Cr	41
1.1.5.4 Toxicología del Pb	42
1.2 Principios básicos sobre la miel	45
1.2.1 Generalidades de la apicultura	46
1.2.1.1 Apicultura, polinización y medioambiente	46
1.2.1.2 Historia de la apicultura	47
1.2.2 Características de la miel	49
1.2.2.1 Definición de miel	49
1.2.2.2 Composición química de la miel	49
1.2.2.3 Clasificación de la miel	50
1.2.2.4 Propiedades nutricionales y usos de la miel	52
1.2.3 Producción apícola	53
1.2.3.1 Proceso de elaboración de la miel	53
1.2.3.2 Productos derivados de la miel	55
1.2.3.3 Apicultura en Argentina: Producción y exportación	56
1.2.4 Metales tóxicos en la miel	57
1.2.4.1 Exposición de la miel a metales tóxicos	57
1.2.4.2 Abejas y miel como bioindicadores de contaminación	60
1.2.4.3 Efectos tóxicos en la abeja de los metales en estudio	60
1.2.4.4 Legislaciones de metales tóxicos en la miel	61

1.2.4.5	Determinación analítica de metales tóxicos en la miel	62
1.3	Líquidos Iónicos Magnéticos	64
1.3.1	Generalidades de los líquidos iónicos	65
1.3.1.1	Definición de líquido iónico	65
1.3.1.2	Breve reseña histórica	65
1.3.1.3	Composición química de los líquidos iónicos	66
1.3.1.4	Principales propiedades de los líquidos iónicos	68
1.3.1.5	Síntesis de líquidos iónicos	70
1.3.1.6	Aplicación de líquidos iónicos como agentes de extracción	72
1.3.2	Generalidades de los líquidos iónicos magnéticos	73
1.3.2.1	Introducción a los líquidos iónicos magnéticos	73
1.3.2.2	Historia y usos de los líquidos iónicos magnéticos	74
1.3.2.3	Síntesis de líquidos iónicos magnéticos	74
1.3.2.4	Caracterización de líquidos iónicos magnéticos	76
1.3.2.5	Propiedades críticas de los MILs en extracciones analíticas	79
1.3.2.6	Ventajas de MILs como agentes extractantes	81
1.4	Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva	83
1.4.1	Introducción a la Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva	83
1.4.1.1	Principios de la Extracción Líquido-Líquido	83
1.4.1.2	Fundamentos de DLLME	86
1.4.1.3	Líquidos Iónicos convencionales en DLLME	87
1.4.1.4	Líquidos Iónicos magnéticos en DLLME	88
1.4.2	Parámetros que caracterizan a los métodos de preconcentración	90
1.5	Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica	93
1.5.1	Generalidades de la Espectrometría Atómica	93
1.5.1.1	Reseña histórica	93
1.5.1.2	Principios básicos de la AAS	95
1.5.2	Instrumentación y funcionamiento en ETAAS	96
1.5.2.1	Fuentes de radiación	97
1.5.2.2	Modulación de la fuente	100

1.5.2.3	Atomización de la muestra	101
1.5.2.4	Dispersión y separación de la radiación	104
1.5.2.5	Detección y señal de salida	106

1.6 Diseño experimental y optimización multivariada 108

1.6.1	Introducción al diseño de experimentos y optimización	108
1.6.2	Metodología del diseño experimental	110
1.6.3	Tipos de diseño	113
1.6.3.1	Diseños de screening	113
1.6.3.2	Diseños de optimización	116
1.6.4	Modelado	117
1.6.4.1	Construcción de modelos para screening	117
1.6.4.2	Construcción de modelos para superficie de respuesta	118
1.6.4.3	Evaluación del modelo	120
1.6.4.4	Transformación de la respuesta	121
1.6.4.5	Evaluación de los coeficientes individuales del modelo	122
1.6.4.6	Localización del óptimo	123

Capítulo 2: Materiales y métodos 125

2.1 Instrumentación y materiales 125

2.1.1	Instrumentos	125
2.1.1.1	Espectrómetro de absorción atómica	125
2.1.1.2	Espectrómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier	125
2.1.1.3	Espectrómetro de absorción UV-Vis	125
2.1.1.4	Balanza analítica	126
2.1.1.5	Medidas y ajuste de pH	126
2.1.2	Aparatos	126
2.1.2.1	Sistema de centrifugación	126
2.1.2.2	Estufa de secado	126
2.1.2.3	Horno mufla	127
2.1.2.4	Plancha calefactora	127
2.1.2.5	Rotavapor	127

2.1.2.6	Sistema de agitación	127
2.1.2.7	Medición de microvolúmenes	127
2.1.2.8	Destilador de agua y equipo de agua ultrapura	128
2.1.3	Materiales	128
2.1.3.1	Material de vidrio	128
2.1.3.2	Imanes	128
2.2	Reactivos	128
2.2.1	Agua ultrapura	128
2.2.2	Soluciones patrón de analitos en estudio	128
2.2.3	Reactivos utilizados como modificador de matriz	129
2.2.4	Reactivos utilizados como agentes complejantes	129
2.2.5	Reactivos utilizados para síntesis de MILs	129
2.2.6	Reactivos utilizados para ajuste de la fuerza iónica	130
2.2.7	Reactivos utilizados como diluyentes y dispersantes	130
2.2.8	Reactivos utilizados como agentes reductores	131
2.2.9	Preparación de soluciones de iones interferentes	131
2.2.10	Reactivos generales	131
2.3	Síntesis y caracterización de líquidos iónicos magnéticos	131
2.3.1	Síntesis de líquidos iónicos magnéticos imidazolio	131
2.3.2	Síntesis de líquidos iónicos magnéticos fosfonio	132
2.3.3	Caracterización de líquidos iónicos magnéticos	132
2.4	Recolección y tratamientos de las muestras	138
2.4.1	Recolección de muestras apícolas	138
2.4.2	Clasificación de muestras de miel	138
2.4.3	Procedimiento de dilución de muestras de miel	139
2.4.4	Procedimiento de limpieza de muestras de miel	139
2.4.5	Procedimiento de calcinación de muestras de miel	141
2.4.6	Procedimiento de digestión de muestras apícolas	141

2.5	Metodologías de microextracción líquido-líquido dispersiva basadas en líquidos iónicos magnéticos	142
2.5.1	Determinación de Cd	142
2.5.2	Determinación de As	144
2.5.3	Determinación de Cr	146
2.5.4	Determinación de Pb	148
Capítulo 3: Resultados y discusión		150
3.1	Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Cd en miel	150
3.1.1	Introducción	150
3.1.2	Estudios preliminares para la determinación de Cd por ETAAS en la matriz de MIL	152
3.1.3	Estudios de la formación del complejo	156
3.1.4	Selección del MIL como agente de extracción	158
3.1.5	Determinación de la cantidad de MIL y volumen de muestra	160
3.1.6	Optimización de las condiciones de dispersión	162
3.1.7	Influencia de la fuerza iónica	164
3.1.8	Condiciones de retroextracción de Cd desde la fase de MIL	166
3.1.9	Estudio de potenciales especies interferentes	167
3.1.10	Rendimiento analítico	168
3.1.11	Estudio de exactitud y determinación de Cd en muestras de miel	171
3.1.12	Conclusiones	174
3.2	Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de As en miel	175
3.2.1	Introducción	175
3.2.2	Selección de la fase extractante	177

3.2.3	Influencia de la composición de la matriz de MIL en la detección de As por ETAAS	177
3.2.4	Condiciones de formación del complejo As-DDTP	181
3.2.5	Optimización multivariada de las condiciones de extracción	183
3.2.6	Estudio de reducción de especies de As a As(III)	189
3.2.7	Optimización del procedimiento de tratamiento de muestra y estudio de interferencias	191
3.2.8	Rendimiento analítico	194
3.2.9	Estudio de exactitud y determinación de As en muestras de miel	196
3.2.10	Conclusiones	201

3.3 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Cr en miel

3.3.1	Introducción	202
3.3.2	Selección del MIL como fase de extracción y evaluación de la acidez	204
3.3.3	Optimización del volumen de muestra	207
3.3.4	Estudio de dispersión de la fase de MIL	208
3.3.5	Estudio de reducción de especies de Cr a Cr(III)	210
3.3.6	Evaluación de diluyentes para la fase de MIL	211
3.3.7	Estudios sobre la detección de Cr por ETAAS en la matriz de MIL	213
3.3.8	Influencia de la fuerza iónica y estudio de posibles especies interferentes	217
3.3.9	Rendimiento analítico	221
3.3.10	Estudio de exactitud y determinación de Cr en muestras de miel	225
3.3.11	Conclusiones	228

3.4 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Pb en productos apícolas

3.4.1	Introducción	229
3.4.2	Ensayos preliminares sobre la determinación de Pb en MILs	231
3.4.3	Condiciones para la formación del complejo	233
3.4.4	Optimización multivariada de las condiciones de extracción	236

3.4.4.1	Variables categóricas	236
3.4.4.2	Selección de factores	238
3.4.4.3	Superficie de respuesta	240
3.4.4.4	Robustez	243
3.4.5	Evaluación del efecto de la matriz del MIL sobre la detección de Pb por ETAAS	244
3.4.6	Estudio de interferencias	246
3.4.7	Rendimiento analítico	247
3.4.8	Estudio de exactitud y determinación de Pb en productos apícolas	250
3.4.9	Conclusiones	254
Capítulo 4: Conclusiones y perspectivas futuras		255

Índice de referencias bibliográficas

Capítulo 1: Introducción		259
1.1	Generalidades de los metales tóxicos en estudio	259
1.2	Principios básicos sobre la miel	261
1.3	Líquidos iónicos magnéticos	265
1.4	Microextracción líquido-líquido dispersiva	266
1.5	Espectrometría de absorción atómica electrotérmica	268
1.6	Diseño experimental y optimización multivariada	269
Capítulo 2: Materiales y métodos		270
Capítulo 3: Resultados y discusión		271
3.1	Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Cd en miel	271
3.2	Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de As en miel	275
3.3	Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Cr en miel	277
3.4	Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Pb en productos apícolas	280

Índice de Tablas y Figuras

Tablas

Tabla 1.1.1	Principales propiedades físico-químicas de los analitos en estudio.	36
Tabla 1.2.1	Composición química porcentual de la miel.	50
Tabla 1.6.1	Diseños empleados para la etapa de screening.	114
Tabla 1.6.2	Diseños de superficie de respuesta más utilizados para el paso de optimización.	117
Tabla 2.1	Estructura química y propiedades de los MILs sintetizados.	134
Tabla 2.2	Clasificación de muestras de miel según escala Pfund.	138
Tabla 2.3	Condiciones para la limpieza de muestras de miel previo a la determinación de As.	140
Tabla 2.4	Condiciones de extracción para la determinación de Cd en miel.	144
Tabla 2.5	Condiciones de extracción para la determinación de As en miel.	146
Tabla 2.6	Condiciones de extracción para la determinación de Cr en miel.	147
Tabla 2.7	Condiciones de extracción para la determinación de Pb en productos apícolas.	148
Tabla 3.1.1	Condiciones instrumentales ETAAS para determinación de Cd en miel.	155
Tabla 3.1.2	Parámetros analíticos del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.	170
Tabla 3.1.3	Métodos analíticos reportados en la literatura para preconcentración y determinación de Cd por IL-DLLME-ETAAS.	172
Tabla 3.1.4	Determinación de Cd en miel y estudio de recuperación (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	173
Tabla 3.2.1	Condiciones instrumentales ETAAS para determinación de As en miel.	180
Tabla 3.2.2	Ensayos requeridos en la selección de factores significativos.	186
Tabla 3.2.3	Parámetros analíticos del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.	195
Tabla 3.2.4	Métodos analíticos reportados en la literatura para preconcentración y determinación de As por IL-DLLME-ETAAS.	198

Tabla 3.2.5	Determinación de As en miel y estudio de recuperación (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	199
Tabla 3.3.1	Condiciones instrumentales ETAAS para determinación de Cr en miel.	216
Tabla 3.3.2	Parámetros analíticos del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.	222
Tabla 3.3.3	Métodos analíticos reportados en la literatura para preconcentración y determinación de Cr por IL-DLLME-ETAAS.	224
Tabla 3.3.4	Determinación de Cr en miel y estudio de recuperación (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	226
Tabla 3.4.1	Ensayos requeridos en la selección de factores significativos.	239
Tabla 3.4.2	Ensayos requeridos en la etapa de superficie de respuesta.	241
Tabla 3.4.3	Condiciones instrumentales ETAAS para determinación de Pb.	245
Tabla 3.4.4	Parámetros analíticos del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.	249
Tabla 3.4.5	Métodos analíticos reportados en la literatura para preconcentración y determinación de Pb por IL-DLLME-ETAAS.	251
Tabla 3.4.6	Determinación de Pb en productos apícolas y estudio de recuperación (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	252

Figuras

Fig. 1.1.1	Ubicación en la Tabla Periódica de los analitos bajo estudio.	37
Fig. 1.1.2	Esquema del ciclo toxicológico de los analitos bajo estudio.	44
Fig. 1.2.1	Proceso de polinización realizado por las abejas.	47
Fig. 1.2.2	Pintura rupestre acerca de la recolección de miel de colmenas silvestres.	48
Fig. 1.2.3	Escala Pfund de clasificación de la coloración de la miel.	52
Fig. 1.2.4	Etapas en la elaboración de la miel.	55
Fig. 1.2.5	Diferentes rutas de exposición de las abejas melíferas a metales tóxicos.	58
Fig. 1.3.1	Cationes y aniones más comunes que componen la estructura de los ILs.	67
Fig. 1.3.2	Ejemplo de estructuras de sal cristalina e IL.	68
Fig. 1.3.3	Ejemplo de síntesis de ILs tipo imidazolio y fosfonio.	71

Fig. 1.3.4	Ejemplo de síntesis de MILs con anión tetracloroferrato(III). (a) 1-octil-3-metilimidazolio y (b) trihexil(tetradecil)fosfonio.	76
Fig. 1.3.5	Ejemplos de espectros IR de MILs con anión tetracloroferrato(III).	77
Fig. 1.3.6	Características y ventajas de MILs en metodologías de extracción.	82
Fig. 1.4.1	Esquema de IL-DLLME.	88
Fig. 1.4.2	Esquema de MIL-DLLME.	89
Fig. 1.5.1	Esquema de un espectrómetro de absorción atómica electrotérmico.	96
Fig. 1.5.2	Esquema de lámpara de cátodo hueco.	97
Fig. 1.5.3	Esquema de lámpara de descarga sin electrodos.	99
Fig. 1.5.4	Esquema de lámpara de emisión de espectro continuo de xenón.	100
Fig. 1.5.5	Atomizador utilizado en ETAAS: Horno de grafito.	102
Fig. 1.5.6	Proceso de atomización en el horno de grafito de ETAAS.	102
Fig. 1.5.7	Programa típico de temperatura de horno de grafito.	103
Fig. 1.5.8	Diagramas de dos tipos de monocromadores. (a) Monocromador de red de Czerny-Turner y (b) monocromador de prisma de Busen. (En ambos casos $\lambda_1 > \lambda_2$).	105
Fig. 1.5.9	Esquema de un banco óptico de alta resolución con fuente continua.	106
Fig. 1.5.10	Esquema de fotomultiplicador.	107
Fig. 1.6.1	Objetivos generales del diseño de experimentos.	109
Fig. 1.6.2	Esquema de variables y respuestas en un diseño experimental.	110
Fig. 1.6.3	Etapas de diseño experimental.	111
Fig. 1.6.4	Resolución de diseño según grado de fraccionamiento.	115
Fig. 1.6.5	Diagrama de Pareto.	116
Fig. 1.6.6	Ejemplo de Superficie de Respuesta con su respectiva gráfica de curvas de nivel.	119
Fig. 1.6.7	Ejemplo de gráfico de Box-Cox para transformación de la respuesta y valores de λ .	122

Fig. 2.1	Reacciones de síntesis planteadas para los MILs bajo estudio. (a) Tipo imidazolio y (b) tipo fosfonio.	133
Fig. 2.2	Espectros IR de MILs imidazolio sintetizados. (a) $[C_8mim]_2FeCl_4$, (b) $[C_8mim]FeCl_4$, (c) $[C_8mim]_3Fe(CN)_6$, (d) $[P_{1,1,1,4}]FeCl_4$ y (e) $[P_{6,6,6,14}]_3Fe(CN)_3$.	136
	(Continuación) Espectros IR de MILs fosfonio sintetizados. (a) $[P_{6,6,6,14}]_2FeCl_4$, (b) $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$, (c) $[P_{6,6,6,14}]_2MnCl_4$, (d) $[P_{6,6,6,14}]_2CoCl_4$ y (e) $[P_{6,6,6,14}]_3DyCl_6$.	137
Fig. 2.3	Procedimiento de dilución y acondicionamiento de las muestras de miel.	139
Fig. 2.4	Procedimiento de dilución y limpieza de las muestras de miel.	140
Fig. 2.5	Tratamiento de calcinación de las muestras de miel.	141
Fig. 2.6	Procedimiento de digestión de las muestras apícolas.	142
Fig. 2.7	Metodología MIL-DLLME-ETAAS desarrollada para la determinación de Cd en miel.	143
Fig. 2.8	Metodología MIL-DLLME-ETAAS desarrollada para la determinación de As en miel.	145
Fig. 2.9	Metodología MIL-DLLME-ETAAS desarrollada para la determinación de Cr en miel.	147
Fig. 2.10	Metodología MIL-DLLME-ETAAS desarrollada para la determinación de Pb en productos apícolas.	149
Fig. 3.1.1	Efecto de diferentes cantidades de Fe(III) en la señal de Cd. Se inyectó un volumen de 20 μL de una solución estándar acuosa de 2 $\mu g L^{-1}$ de Cd. Las condiciones instrumentales de ETAAS fueron las indicadas en la Tabla 3.1.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	153
Fig. 3.1.2	Efecto del pH en la eficiencia de extracción de Cd por el método MIL-DLLME. Se utilizaron volúmenes de 80 μL de $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ y 20 mL de solución de muestra (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	157
Fig. 3.1.3	Efecto de la concentración de DDTP en la eficiencia de extracción de Cd por el método MIL-DLLME. Se utilizaron volúmenes de 80 μL de $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ MIL y 20 mL de solución de muestra (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	158
Fig. 3.1.4	Diagrama esquemático de la susceptibilidad magnética presentada por Fe(III) y Fe(II).	160
Fig. 3.1.5	Optimización del volumen de $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.4 y 3.1.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	161

Fig. 3.1.6	Optimización del volumen de muestra. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.4 y 3.1.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	162
Fig. 3.1.7	Efecto del tipo y volumen de dispersante en el rendimiento de extracción de Cd por el método MIL-DLLME.  Metanol,  cloroformo y  acetonitrilo. Las condiciones de extracción fueron las que se observan en la Tabla 2.4 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	163
Fig. 3.1.8	Efecto del tipo y tiempo de agitación en la extracción de Cd.  Vortex y  ultrasonido. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.4 y 3.1.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	164
Fig. 3.1.9	Influencia de la fuerza iónica en la extracción de Cd.  NaNO ₃ y  NaCl. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 3.1.1 y 3.1.2 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	165
Fig. 3.1.10	Señal obtenida luego de la inyección de una solución de 0,05 ng L ⁻¹ de Cd en condiciones óptimas del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.	167
Fig. 3.1.11	Curva de calibración obtenida a partir del análisis de soluciones patrón de Cd(II) con el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto en condiciones óptimas (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	169
Fig. 3.2.1	Efecto de diferentes cantidades de Fe(III) en la señal de As. Se inyectó un volumen de 20 µL de solución estándar acuosa de 100 µg L ⁻¹ de As. Las condiciones instrumentales de ETAAS fueron las indicadas en la Tabla 3.2.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	178
Fig. 3.2.2	Evaluación de curvas de temperatura de pirólisis () y atomización () para inyección de 20 µL de solución de 100 µg L ⁻¹ de As con 50 µL de solución de MIL [P _{6,6,6,14}]FeCl ₄ (50% (p/v) en cloroformo). (I) Etapa de pirólisis 1, (II) etapa de pirólisis 2 y (III) etapa de atomización. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 3.2.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	179
Fig. 3.2.3	Efecto de la concentración de ácido en la eficiencia de extracción de As del método MIL-DLLME propuesto. Se utilizaron concentraciones de HCl () y H ₂ SO ₄ () con volúmenes de 100 µL de la solución del MIL [P _{6,6,6,14}]FeCl ₄ y 5 mL de solución de muestra. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.5 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	182
Fig. 3.2.4	Efecto de la relación molar (As:DDTP) en el método MIL-DLLME propuesto. Se utilizaron 100 µL del MIL [P _{6,6,6,14}]FeCl ₄ y 5 mL de solución de muestra. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.5 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	183
Fig. 3.2.5	Estudio de factores categóricos involucrados en el método MIL-DLLME propuesto. (a) Fuerza iónica: concentración de sal al 2% (p/v) (NaCl, NaClO ₄ y NaNO ₃). (b) Dispersantes: volumen de 100 µL (acetonitrilo, metanol, etanol	185

y cloroformo). (c) Tipo de agitación: 5 minutos (vortex, ultrasonido a 25°C y ultrasonido a 60°C) (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

- Fig. 3.2.6** Gráfico de Pareto obtenido para determinar las variables significativas en la eficiencia de extracción de As por el método propuesto. Efecto positivo  y efecto negativo  en la eficiencia de extracción. 187
- Fig. 3.2.7** Influencia del volumen de muestra en la eficiencia de extracción de As. El resto de las condiciones experimentales utilizadas son las obtenidas por el estudio multivariado anterior (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 188
- Fig. 3.2.8** Efecto de (a) tipo de agente reductor y (b) concentración de KI, sobre la eficiencia de extracción de As en el método MIL-DLLME propuesto. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 2.5 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 190
- Fig. 3.2.9** Evaluación de las variables involucradas en la etapa de limpieza de las muestras de miel. (a) Tipo y volumen de agente de extracción: volumen de cloroformo () y diclorometano (). (b) Concentración de 5-Br-PADAP. (c) Tipo y tiempo de agitación: por vortex () y ultrasonido () (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 192
- Fig. 3.2.10** Señal obtenida luego de la inyección de una solución de 1 µg L⁻¹ de As en condiciones óptimas del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto. 194
- Fig. 3.2.11** Curva de calibración obtenida a partir del análisis de soluciones patrón de As(III) con el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto en condiciones óptimas (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 196
- Fig. 3.3.1** Diagrama esquemático de la susceptibilidad magnética presentada por FeCl₄⁻ y Fe(CN)₆³⁻. 205
- Fig. 3.3.2** Efecto de la concentración de HCl sobre la eficiencia de extracción de Cr en el método MIL-DLLME, se utilizaron 50 µL de [P_{6,6,6,14}]FeCl₄ y 5 mL de solución de muestra. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 206
- Fig. 3.3.3** Influencia del volumen de muestra en la eficiencia de extracción de Cr. Masa () o concentración () de Cr(III) constante. Las condiciones de extracción fueron las observadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 207
- Fig. 3.3.4** Efecto del tipo y volumen de dispersante (acetonitrilo, metanol, etanol) sobre la eficiencia de extracción para 7 mL de muestra y 50 µL de [P_{6,6,6,14}]FeCl₄. Volumen en estudio:  50 µL,  100 µL y  150 µL. Se pueden observar otras condiciones en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 208
- Fig. 3.3.5** Optimización del tipo y tiempo de agitación. Agitación por () vortex y () ultrasonido. Se pueden observar otras condiciones de extracción en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 209

Fig. 3.3.6	Efecto del tipo de agente reductor sobre la eficiencia de extracción de Cr. Reductores evaluados: Fe(II), yoduro y etanol. Relación molar entre analito y reductor:  1:10,  1:100 y  1:1000. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	211
Fig. 3.3.7	Selección del diluyente adecuado (150 µL) para 50 µL del MIL [P _{6,6,6,14}]FeCl ₄ . Disolventes utilizados: acetonitrilo, acetato de etilo, benceno, cloroformo y diclorometano. Otras condiciones son las mencionadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	212
Fig. 3.3.8	Optimización del volumen de cloroformo como diluyente. Otras condiciones son las mencionadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	213
Fig. 3.3.9	Influencia de diferentes concentraciones de Fe(III) en la señal de Cr. Fueron inyectados 10 µL de solución estándar acuosa de 35 µg L ⁻¹ de Cr. Las condiciones instrumentales de ETAAS fueron las indicadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	214
Fig. 3.3.10	Evaluación de las curvas de temperatura de pirólisis (●) y atomización (■) para una solución de 35 µg L ⁻¹ de Cr mezclada con 50 µL de [P _{6,6,6,14}]FeCl ₄ y 150 µL de CHCl ₃ . (I) Etapa de pirólisis 1, (II) Etapa de pirólisis 2 y (III) Etapa de atomización. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 3.3.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	215
Fig. 3.3.11	Influencia de la fuerza iónica en la extracción de Cr. Uso de sales caotrópicas (NaCl, NaNO ₃ , NaClO ₄) y cosmotrópicas (citrato de sodio, NaHCO ₃ , Na ₂ HPO ₄). Concentraciones evaluadas:  1% (p/v),  2% (p/v) y  3% (p/v). Se pueden observar otras condiciones de extracción en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	218
Fig. 3.3.12	Estudio de la variación de la concentración de NaNO ₃ en la eficiencia de extracción. Se pueden observar otras condiciones de extracción en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	219
Fig. 3.3.13	Señal obtenida luego de la inyección de una solución de 0,35 µg L ⁻¹ de Cr en condiciones óptimas del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.	220
Fig. 3.3.14	Curva de calibración obtenida a partir del análisis de soluciones patrón de Cr(III) con el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto en condiciones óptimas (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).	221
Fig. 3.4.1	Diagrama esquemático de la susceptibilidad magnética presentada por Fe(III), Mn(II), Co(II) y Dy(III).	232
Fig. 3.4.2	Efecto del tipo de agente complejante en la extracción de Pb en el método propuesto. Extracción de 3,0 µg L ⁻¹ de Pb(II) en 5 mL de muestra ajustada a 1 mol L ⁻¹ de HCl, con agitación por vortex durante 10 min y 150 µL de MIL.	234

Agentes complejantes utilizados:  APDC,  DDTC,  DDTP,  DFC y  HQ (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

- Fig. 3.4.3** (a) Evaluación del efecto de la relación molar (Pb:DFC) sobre la eficiencia de extracción del método propuesto. (b) Efecto de la concentración de HCl sobre la extracción del complejo Pb-DFC. Otras condiciones se pueden observar en la Tabla 2.7 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 235
- Fig 3.4.4** (a) Efecto del tipo de dispersante (50 µL): acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, etanol y metanol, sobre la eficiencia de extracción para 5 mL de muestra y 150 µL de fase de MIL. (b) Influencia de la fuerza iónica, las sales utilizadas a una concentración del 1% (p/v) fueron: NaClO₄, NaNO₂, NaNO₃, NaCl, KCl, MgCl₂ y CaCl₂ (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 237
- Fig. 3.4.5** Gráfico de Pareto de Pb para determinar los efectos significativos de las variables en la eficiencia de extracción.  Efecto significativo positivo y  efecto significativo negativo. Las condiciones instrumentales y de preconcentración para la determinación de Pb se pueden observar en la Tablas 2.7 y 3.4.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 240
- Fig. 3.4.6** Gráficos de superficie de respuesta en la determinación de Pb para determinar las condiciones óptimas de extracción. Influencia en la eficiencia de extracción variando: (a) concentración de NaCl y volumen de MIL, (b) tiempo de agitación y volumen de MIL, (c) concentración de NaCl y tiempo de agitación. Condiciones experimentales óptimas se pueden observar en la Tabla 2.7 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 242
- Fig. 3.4.7** Evaluación de las curvas de temperatura de pirólisis (■) y atomización (●) para 100 µg L⁻¹ de Pb en 150 µL de solución de MIL (50% (p/v) de [P_{6,6,6,14}]₂MnCl₄ en CHCl₃). (I) Etapa de pirólisis 1, (II) etapa de pirólisis 2 y (III) etapa de atomización. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 2.7 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6). 246
- Fig. 3.4.8** Señal obtenida luego de la inyección de una solución de 0,30 µg L⁻¹ de Pb en condiciones óptimas del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto. 247
- Fig. 3.4.9** Curva de calibración obtenida a partir del análisis de soluciones patrón de Pb(II) con el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto en condiciones óptimas (Intervalo de confianza del 96%, n = 6). 248

Abreviaturas / Abbreviations

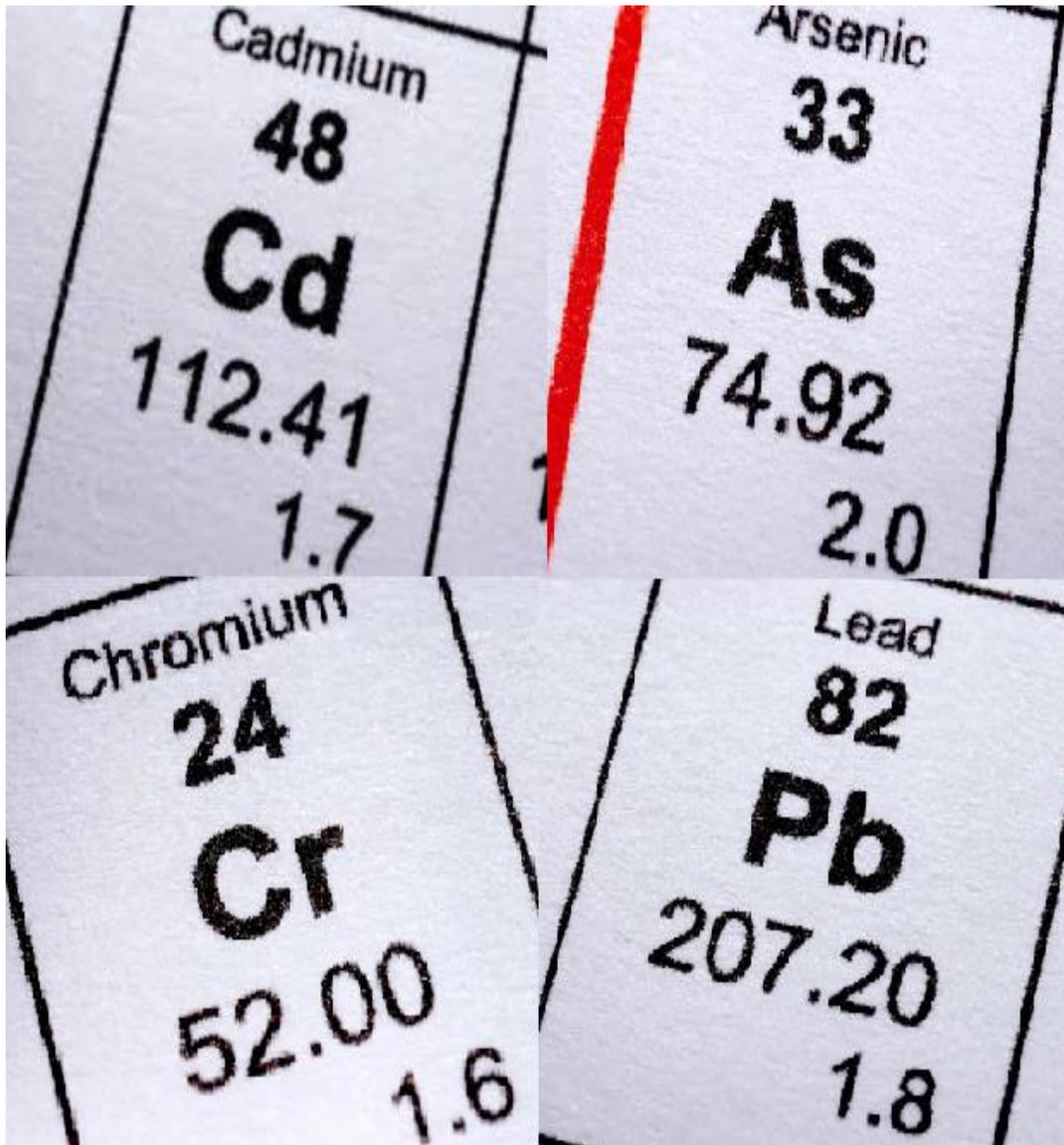
La mayoría de las abreviaciones y acrónimos utilizados a lo largo de esta Tesis derivan de los nombres de las respectivas técnicas, materiales o instrumentos en inglés, ya que aún en idioma castellano suelen ser las más utilizadas.

AAS	Espectrometría de Absorción Atómica / Atomic Absorption Spectrometry
ADN	Ácido desoxirribonucleico / Deoxyribonucleic acid
ANOVA	Análisis de varianza / Analysis of variance
APDC	Pirrolidinditiocarbamato de amonio / Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate
ATP	Adenosin trifosfato / Adenosine triphosphate
ATR	Reflectancia Total Atenuada / Attenuated Total Reflectance
CAA	Código Alimentario Argentino / Argentine Food Code
CE	Eficiencia de concentración / Concentration efficiency
CI	Índice de consumo / Consumption index
CMR	Material de referencia certificado / Certified reference material
COV	Compuesto orgánico volátil / Volatile organic compound
CPE	Extracción en Punto Nube / Cloud Point Extraction
DDTC	Dietilditiocarbamato / Diethyldithiocarbamate
DDTP	Dietilditiofosfato / Diethyldithiophosphate
DFBETAS	Diferencia entre coeficientes de regresión / Difference between regression coefficients
DFC	1,5-difenilcarbazona / 1,5-diphenylcarbazide
DFFITS	Diferencia entre valores predichos / Difference between predicted values
DLLME	Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva / Dispersive Liquid-Liquid Microextraction
DMSA	Ácido dimercaptosuccínico / Dimercaptosuccinic acid
DOE	Diseño multivariado de experimentos / Multivariate design of experiments
EDL	Lámpara de descarga sin electrodos / Electrodeless discharge lamp
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético / Ethylenediaminetetracetic acid
EF	Factor de enriquecimiento / Enrichment factor
ETAAS	Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica / Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry
FAAS	Espectrometría de Absorción Atómica con Llama / Flame Atomic Absorption Spectrometry

FAO	Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la Agricultura / Food and Agriculture Organization of the United Nations
FO-LADS	Espectrometría de Detección de Arreglo Lineal por Fibra Óptica / Fiber Optic Linear Array Detection Spectrometry
FT-IR	Espectrometría Infrarroja por Transformada de Fourier / Fourier Transform Infrared Spectrometry
HACRE	Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico / Regional Endemic Chronic Hydroarsenism
HCL	Lámpara de cátodo hueco / Hollow cathode lamp
HF-LPME	Microextracción en Fase Líquida por Fibra Hueca / Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction
HQ	8-hidroxiquinolina / 8-hydroxyquinoline
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplamiento Inductivo / Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
IL	Líquido Iónico / Ionic Liquid
LIBS	Espectrometría de Plasma Inducida por Láser / Laser-Induced Breakdown Spectrometry
LLE	Extracción Líquido-Líquido / Liquid-Liquid Extraction
LLME	Microextracción Líquido-Líquido / Liquid-Liquid Microextraction
LOD	Límite de detección / Detection limit
LS	Mínimos cuadrados / Least Squares
MERCOSUR	Mercado Común del Sur / Southern Common Market
MIL	Líquido Iónico Magnético / Magnetic Ionic Liquid
NP	Nanopartícula / Nanoparticle
OMS	Organización Mundial de la Salud / World Health Organization
RSD	Desviación estándar relativa / Relative standard deviation
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta / Response Surface Methodology
SDME	Microextracción en Gota Única / Single-Drop Microextraction
SPE	Extracción en Fase Sólida / Solid Phase Extraction
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos / United States Department of Agriculture
UV-Vis	Espectrometría de Absorción Ultravioleta-Visible / Ultraviolet-Visible Absorption Spectrometry

Capítulo 1: Introducción

1.1 Generalidades de los metales tóxicos en estudio



The image shows four labels for toxic metals, arranged in a 2x2 grid. Each label contains the element name, atomic number, chemical symbol, atomic weight, and a numerical value. A vertical red line is drawn between the top two labels.

Cadmium 48 Cd 112.41 1.7	Arsenic 33 As 74.92 2.0
Chromium 24 Cr 52.00 1.6	Lead 82 Pb 207.20 1.8

1.1.1 Antecedentes históricos

El cadmio (Cd) deriva su nombre del latín *cadmia* y del griego *kadmeia*, que significa "calamina", nombre utilizado para denominar al carbonato de zinc (ZnCO_3). Fue descubierto en Alemania en 1817 por Friedrich Strohmeyer, como impureza de algunas muestras de este mineral. Dichas muestras cambiaban de color al calentarlas, lo cual no le ocurría al ZnCO_3 puro. Strohmeyer luego consiguió aislar el elemento mediante el tueste y posterior reducción del sulfuro. Posteriormente, durante parte del siglo XX, Japón estuvo en guerra con Rusia, China y Estados Unidos, lo que generó un aumento en la demanda de metales y por consiguiente de la actividad minera. Durante años, la mina de Kamioka arrojó sus desechos en el río Jinzu, donde los habitantes de la región ingirieron agua contaminada y la utilizaron para riego de campos de arroz. Como consecuencia se produjo la intoxicación de la población, cuyos síntomas se basaban en la deformación de los huesos, disminución de glóbulos rojos y disfunción renal. Se llamó a esta enfermedad Itai-Itai, donde años después se logró determinar que era debido al Cd [1].

Por otro lado, el arsénico (As) es un elemento del cual se tiene información desde la antigüedad, su nombre proviene del griego y significa "oropimente". El filósofo griego Aristóteles, en el siglo IV a.C., se refería al elemento como "sandarach". Se menciona en un papiro del antiguo Egipto como una forma de dar color dorado a los metales. Por su parte, Galeno en el siglo II, estudio acerca de los efectos irritantes, tóxicos, corrosivos y parasitocidas del As, donde observó sus virtudes contra la tos pertinaz, afecciones de la voz y la disnea. Los médicos árabes utilizaron también los compuestos de As en fumigaciones, píldoras y pociones. Por otro lado, los chinos también conocían la existencia de este elemento, lo que se ve reflejado en las escrituras de Pen Tsao Kan-M del 1500, durante la dinastía Ming. El cual señaló la toxicidad asociada con los compuestos de As y mencionó su uso como pesticida en los campos de arroz. Alberto Magno logró aislarlo en el año 1250

y Schroeder lo obtuvo en 1649 por la acción del carbón sobre el ácido arsénico. En el siglo XVIII los compuestos arsenicales consiguieron un puesto de primer orden en la terapéutica hasta que fueron sustituidos por las sulfamidas y los antibióticos [2].

En 1766, el mineralogista alemán Johann Gottlob Lehmann analizó un mineral de color anaranjado rojizo conocido como plomo rojo de Siberia. Pudo determinar que contenía plomo y algún otro elemento, que finalmente no pudo descubrir ya que murió al año siguiente. El mineral molido resultaba ser muy útil en pinturas debido a sus propiedades de estabilidad como pigmento. En 1797 el químico francés Louis Nicolás Vauquelin obtuvo muestras del mineral, y mediante tratamiento con carbonato potásico fue capaz de precipitar el plomo manteniendo en disolución la sustancia desconocida. Posteriormente preparó el óxido de ese elemento, y en 1798 descubrió que se podía aislar en forma metálica calentando el óxido con carbón en polvo. Lo llamó cromo (Cr), del griego *chroma* que significa "color", debido a los distintos colores que presentan sus compuestos. También pudo detectar trazas de Cr en gemas preciosas, como rubíes y esmeraldas. Según un estudio arqueológico sobre las armas que usó el ejército de Qin, datadas hacia los años 210 a.C., se descubrió que estaban recubiertas de Cr, por lo que algunos investigadores piensan que los chinos desarrollaron las tecnologías suficientes para producir un baño de Cr sobre algunos metales [3].

Por último, el plomo (Pb) es uno de los metales más conocidos desde la antigüedad, su nombre proviene del latín *plumbum*. Se han encontrado en Asia Menor cuencas de Pb metálico que datan de 7000-6500 a.C., que representan el primer ejemplo de fundición de metales. En el Imperio Romano se utilizaba Pb para construir tuberías de agua y recipientes para el vino, debido a que confería sabor agradable por la formación de "azúcar de plomo" (acetato plumboso). Algunos autores han sugerido que la intoxicación por Pb (saturnismo) habría contribuido en la decadencia del Imperio Romano, debido a que genera severos problemas mentales. La utilización de Pb para adulterar el vino causó intoxicaciones

masivas hasta fines del siglo XVIII. A su vez, el Pb fue utilizado en cosméticos por la aristocracia de Europa occidental, práctica que se desvaneció con la Revolución Francesa. Una moda similar apareció en Japón en el siglo XVIII con la emergencia de las geishas, práctica que continuó hasta el siglo XX. En la segunda mitad del siglo XVIII, con la llegada de la Revolución Industrial, la clase trabajadora estuvo expuesta al envenenamiento por Pb y los casos se intensificaron. La última exposición humana importante al Pb fue la adición de tetraetilplomo a la gasolina como agente antidetonante, práctica que se originó en Estados Unidos en 1921 y que se eliminó gradualmente a principios del siglo XXI [4].

1.1.2 Ocurrencia y obtención

La presencia natural de metales en el medioambiente se debe principalmente a actividades volcánicas, incendios forestales y erosión de las rocas. Dada la elevada dispersión ambiental, causan efectos tóxicos que modifican los parámetros de calidad del aire, agua y suelo. Por lo tanto, resulta de vital importancia mantener bajo control la concentración de metales en el medioambiente. A su vez, entre los metales que tradicionalmente son considerados tóxicos y dañinos para la salud, y que adicionalmente están fuertemente relacionados con actividades industriales y de combustión, cabe destacar: el As, Cd, Cr y Pb [5].

El Cd no se encuentra en la naturaleza como elemento puro sino en asociación con metales como cobre (Cu), Pb y zinc (Zn). Es un elemento presente en toda la corteza terrestre, aunque generalmente su concentración no supera los $0,02 \text{ mg Kg}^{-1}$ [6]. La extracción de Cd se lleva a cabo a partir de minerales de Zn mediante fusión. La producción mundial de Cd es de más de 20.000 toneladas por año [7].

Por otro lado, el As también se encuentra muy distribuido en el medio ambiente, su concentración promedio en la corteza terrestre es de $3,4 \text{ mg Kg}^{-1}$. Se lo encuentra

principalmente como arseniato, en asociación con sulfuros y en varios minerales [8]. Puede obtenerse a partir de la arsenopirita (FeAsS), mediante calentamiento del mineral, permitiendo la sublimación del As. Sin embargo, la mayoría del As se comercializa bajo la forma de óxido, el cual es obtenido como producto secundario del proceso de fusión de minerales de cobalto (Co), Cu, oro (Au) y Pb [9].

Por su parte, el Cr a pesar de haber sido identificado en más de 40 minerales y de ser el séptimo elemento más abundante en la corteza terrestre, está normalmente presente sólo en pequeñas cantidades (menores a 1000 mg Kg^{-1}). Se encuentra principalmente como el mineral cromita (FeCr_2O_4), que es utilizado para la obtención de ferrocromo y Cr metálico, mediante calentamiento del mineral en presencia de aluminio (Al) o silicio (Si), y posterior tratamiento de reducción [10].

Asimismo, el Pb se encuentra presente de forma natural en la corteza terrestre en cantidades traza, a una concentración promedio de 15 mg Kg^{-1} . La obtención de Pb se lleva a cabo a partir de galena (PbS) y en menor proporción desde otros minerales como anglesita (PbSO_4), cerusita (PbCO_3) y crocoita (PbCrO_4), mediante un procedimiento de calcinación y posterior reducción del óxido obtenido [11].

1.1.3 Principales usos

El principal uso del Cd es como componente activo en las baterías de Ni/Cd. Los compuestos de Cd también se utilizan como pigmentos, estabilizadores de plásticos y en ciertas aleaciones. Asimismo, se utilizan en células solares y fotográficas, como fungicida, mordientes en la tinción de textiles, fabricación de espejos especiales, en semiconductores y en el vitrificado de cerámica [12].

El As inorgánico se utiliza como preservante de maderas, en aleaciones con Pb para la fabricación de perdigones, como semiconductor para circuitos integrados y en la construcción de diodos de láser y LED. Además, se aplica como pigmento para pinturas y

fuegos artificiales y como decolorante en la fabricación del vidrio al eliminar el color verde que producen las impurezas de hierro (Fe) [13].

El Cr y sus compuestos son muy importantes para diversos usos, entre ellos en el curtido de cuero, conservación de la madera, cerámica, pirotecnia y explosivos, electrónica, fabricación de aleaciones metálicas, en colorantes y pigmentos, plaguicidas, cromado electrolítico o galvanoplastia, y mordiente en teñido de telas. Otros usos menores del Cr son en el fotograbado, fabricación de cerillos y linóleo [14].

Entre los principales usos del Pb se encuentran la fabricación de baterías y municiones, fabricación de soldaduras, producción de pinturas, protección contra radiaciones ionizantes, en computadoras y televisores, cerámicas para tecnología de ultrasonido y lentes de alta precisión para láser y fibras ópticas [15].

1.1.4 Propiedades físico-químicas

El Cd es un metal de transición de color blanco plateado, brillante, dúctil, maleable y resistente a la corrosión. Pertenece al Grupo 12 (IIB) de la Tabla Periódica y su configuración electrónica es $[\text{Kr}] 4d^{10} 5s^2$. En sus compuestos actúa normalmente con el número de oxidación +II.

El As es clasificado como metaloide, de diferentes características según su variedad alotrópica. Es un elemento del Grupo 15 (VA) de la Tabla Periódica y su configuración electrónica es $[\text{Ar}] 3d^{10} 4s^2 4p^3$. Cuando está formando compuestos, el As existe bajo los estados de oxidación -III, +III y +V.

El Cr es un metal de transición de color blanco azulado, duro, frágil, brillante y resistente a la corrosión. Forma parte del Grupo 6 (VIB) de la Tabla Periódica y su configuración electrónica es $[\text{Ar}] 3d^5 4s^1$. Sus compuestos más comunes presentan los números de oxidación +II, +III y +VI.

El Pb es un metal representativo de color gris azulado, maleable y resistente a la corrosión. Se encuentra en el Grupo 14 (IVA) de la Tabla Periódica y su configuración electrónica es $[\text{Xe}] 4f^{14} 5d^{10} 6s^2 6p^2$. Forma compuestos en estado de oxidación +II y +IV, siendo el más común de ellos el +II [16].

En la Tabla 1.1.1 se observan las principales propiedades físico-químicas de los analitos en estudio [17], mientras que en la Fig. 1.1.1 se puede observar la ubicación en la Tabla Periódica de los analitos bajo estudio.

Tabla 1.1.1 Principales propiedades físico-químicas de los analitos en estudio.

Propiedad	Cd	As	Cr	Pb
Número atómico	48	33	24	82
Masa atómica relativa	112,4	74,9	51,9	207,2
Punto de fusión (°C)	321	614	1857	327
Punto de ebullición (°C)	767	817	2672	1749
Densidad (g mL ⁻¹)	8,64	5,72	7,14	11,3
Radio medio (pm)	155	115	140	180
Electronegatividad	1,69	2,0	1,66	2,33
Conductividad eléctrica (S m ⁻¹)	$13,8 \times 10^6$	$3,45 \times 10^6$	$7,74 \times 10^6$	$4,81 \times 10^6$
Conductividad térmica (W K ⁻¹ m ⁻¹)	96,8	50,0	93,7	35,3

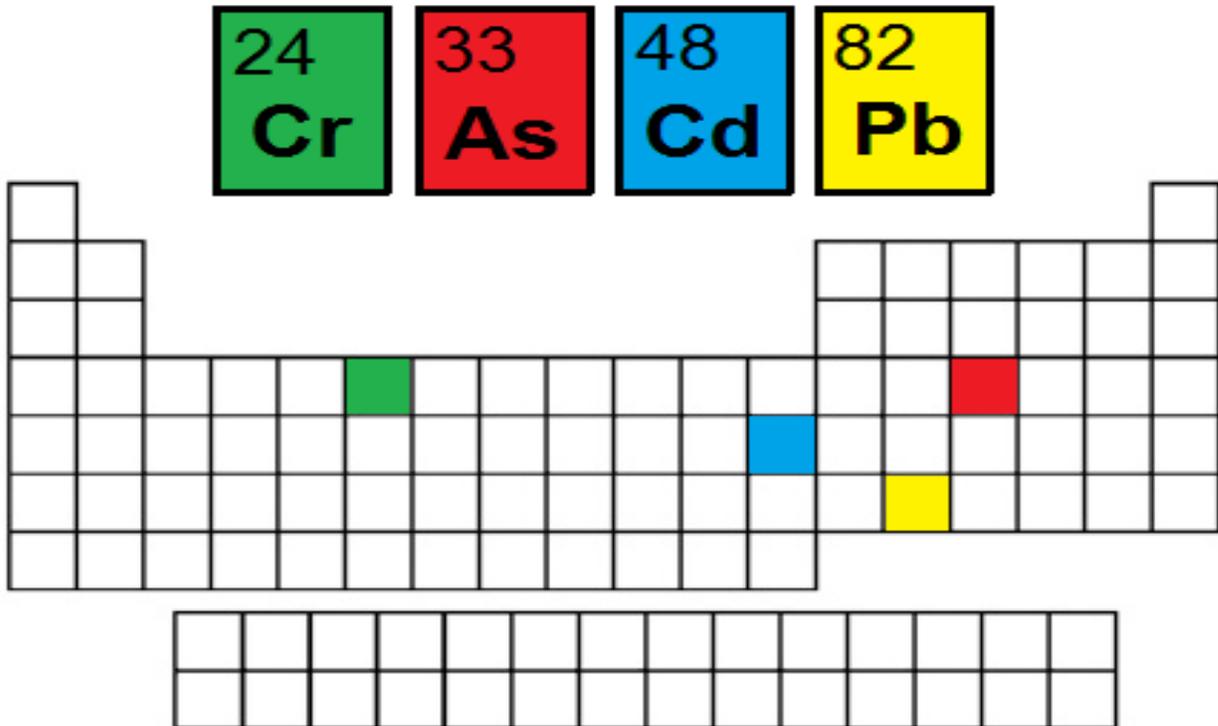


Fig. 1.1.1 Ubicación en la Tabla Periódica de los analitos bajo estudio.

1.1.5 Toxicología

1.1.5.1 Toxicología del Cd

- Fase de exposición: El Cd puede ingresar al organismo a través del aire, el cual se encuentra como óxido de cadmio en forma de pequeñas partículas, que es capaz de viajar grandes distancias antes de regresar al suelo como polvo, lluvia o nieve. La exposición a través de la ingesta se da debido a la aplicación en el suelo de ciertos fertilizantes o excremento de animales en las tierras de cultivo. Al agua sólo pequeñas cantidades llegan procedentes de derrames o fugas en sitios de desechos peligrosos, aguas residuales industriales y domésticas [18].
- Fase toxicocinética: La absorción gastrointestinal del Cd ingerido es de aproximadamente 2-6% en condiciones normales. Las personas que poseen pocas reservas de hierro en su organismo y por lo tanto una baja concentración de ferritina en el suero, pueden presentar

una absorción de Cd mucho mayor, de hasta un 20 % de la dosis ingerida. La absorción por el aparato respiratorio es la más alta, 10-50 % de las partículas inhaladas se depositan en la parte alveolar del pulmón y la mayor parte en el resto de la mucosa traqueobronquial. En fumadores se ve incrementado, ya que el tabaco de un cigarrillo contiene 1,5-2,0 µg de Cd, de los cuales el 70% pasa al humo y cerca del 60% de este llega al torrente sanguíneo. La absorción percutánea ocurre solamente por contacto con los compuestos orgánicos de Cd.

El Cd tras ser absorbido, se transporta al hígado, donde se une a la metalotioneína (proteína rica en residuos de cisteína), se transporta por la sangre hasta el riñón, donde se filtra a través del glomérulo, se reabsorbe por pinocitosis en el túbulo proximal y se cataboliza en los lisosomas, liberándose Cd(II) que induce nuevamente la síntesis de metalotioneína en la célula renal. Asimismo, el Cd atraviesa fácilmente la barrera placentaria y se acumula progresivamente durante el embarazo.

La excreción de Cd es escasa y se da lentamente, es por ello que la concentración de Cd aumenta con la edad y el tiempo de exposición. La mayor parte del Cd ingerido o inhalado no se absorbe y se excreta en las heces. Tras la absorción la principal vía de eliminación del Cd es a través de la orina. Diariamente se elimina 0,007% del contenido corporal de Cd por orina y 0,03% por heces [19].

- Fase toxicodinámica: El riñón es el órgano diana del Cd. Produce la alteración de la filtración glomerular por cambios en la restricción electrostática para la filtración de proteínas polianiónicas, lo que disminuye su reabsorción y conduce a incrementar la excreción urinaria de proteínas (proteinuria) de peso molecular alto [20].
- Efectos tóxicos: La intoxicación aguda por Cd produce náusea, vómito, diarrea, cefalea, mialgia, cólicos abdominales, daño hepático e insuficiencia renal. La inhalación de gases causa sabor metálico en la boca, disnea, dolor torácico, tos con esputo espumoso o sanguinolento, astenia y dolor en las piernas. Por otro lado, la intoxicación crónica por Cd

se caracteriza por lesión pulmonar irreversible, daño de los túbulos renales, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, osteomalacia, hipertensión, carcinogénesis, infertilidad y neurotoxicidad. La concentración crítica de Cd es de 200 mg, mientras que la dosis letal es de 500 mg [21].

- Tratamiento por intoxicación: En caso de inhalación se debe administrar oxígeno humidificado. En caso de ingestión de Cd se administra leche albuminosa (leche con clara de huevo) para aliviar irritación gastrointestinal y un laxante salino. Si la intoxicación es importante y persisten los síntomas, se recomienda la administración de EDTA cálcico sódico (CaNa_2EDTA) en dosis de 50-75 mg Kg^{-1} por día, por vía intramuscular o infusión intravenosa durante 5 días. El monoisoamil-2,3-dimecartosuccinato es un agente quelante eficaz para reducir el Cd en hígado y riñones cuando se administra en forma parental u oral [22].

1.1.5.2 Toxicología del As

- Fase de exposición: El organismo humano puede estar expuesto al As a través del agua, aire y alimentos. En el caso del agua contaminada, puede producirse la exposición por consumo directo de la misma, por su uso en la preparación de comidas, en procesos de riego de cultivos y procesos industriales. El principal aporte de As a la dieta son alimentos de origen marino, peces y crustáceos. En otro tipo de alimentos (hierbas para infusiones, vegetales, semillas, carnes) las concentraciones generalmente son más bajas. Las personas que fuman tabaco pueden estar expuestas a As inorgánico, ya que las plantas de tabaco absorben el As presente de forma natural en el suelo [23].

- Fase toxicocinética: La absorción de As puede producirse en el tracto gastrointestinal, por vía respiratoria y en menor proporción por vía dérmica. La absorción por vía respiratoria dependerá del tamaño de las partículas inhaladas, de su solubilidad y de la estructura química del compuesto. El As se distribuye fácilmente por todo el cuerpo, a través de la formación del complejo α -globulina-As. Se acumula principalmente en el hígado, riñón,

pulmón y bazo, y en menor proporción en el tracto digestivo, huesos y piel. El As inorgánico insoluble inhalado es depositado y retenido en el tejido pulmonar durante un tiempo relativamente largo.

El metabolismo del As se realiza predominantemente en el hígado, intervienen dos procesos: reducción del As(V) a As(III) y posterior reacción de metilación oxidativa. Se ha propuesto al glutatión reducido (GSH) como agente reductor y transportador del As, y a la S-adenosilmetionina como donante de grupos metilo. La capacidad de metilación del As puede estar influida por la dosis, el tiempo de exposición, una dieta rica en metionina y el probable polimorfismo genético de las enzimas involucradas en la metilación.

La principal ruta de excreción del As es a través del riñón, cuya eficiencia puede variar según la forma química, el tiempo de exposición, la dosis y la especie animal expuesta [24].

- Fase toxicodinámica: Los compuestos arsenicales trivalentes tienen gran afinidad por los grupos sulfhidrilos de las proteínas. El As(III) es una especie tóxica protoplasmática que inhibe a varias enzimas, especialmente las del metabolismo y las de la respiración. Mientras que As(V) es capaz de sustituir al grupo fosfato en las reacciones que son catalizadas enzimáticamente, afectando procesos como la producción de adenosintrifosfato (ATP) y la síntesis de ADN [20].

- Efectos tóxicos: Los síntomas que se presentan en una intoxicación aguda por As están asociados a alteraciones gastrointestinales, cardiovasculares, nerviosas, renales y hepáticas. Los síntomas incluyen vómitos, dolor abdominal, diarrea, entumecimiento u hormigueo en manos y pies, calambres musculares y alteraciones del sistema circulatorio. Se producen alteraciones hematológicas caracterizadas por anemias y leucopenia. En casos extremos se da la muerte. Los síntomas de la exposición prolongada a altos niveles de As inorgánico se observan primero en la piel, incluyen cambios de pigmentación, lesiones cutáneas, durezas y callosidades en las palmas de las manos y las plantas de los

pies (hiperqueratosis). Aparecen también problemas relacionados con el crecimiento, diabetes y enfermedades cardiovasculares. Además de cáncer de piel, la exposición prolongada al As puede causar cáncer de vejiga y de pulmón [16]. Se ha observado la enfermedad conocida como “Pie Negro” o HACRE (Hidroarsenicismo Crónico Regional Endémico), cuando la ingesta diaria de As inorgánico se encuentra entre 10 y 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ de peso corporal. Se manifiesta a través de problemas vasculares, que derivan en algunos casos en necrosis y gangrena en manos y pies. Una de las complicaciones más importantes es el desarrollo de neoplasias, principalmente tumores cutáneos [25].

- Tratamiento por intoxicación: Según la gravedad de cada caso, se puede recurrir a estabilización hemodinámica del paciente, lavado gástrico utilizando carbón activado u optarse por el uso de quelantes, como ácido dimercaptosuccínico o D-penicilamina [26].

1.1.5.3 Toxicología del Cr

- Fase de exposición: Para la población general, la ruta más probable de exposición al Cr(III) es el consumo de alimentos contaminados, pues los alimentos ácidos en contacto con latas o utensilios de cocina de acero inoxidable pueden contener niveles de Cr más altos. Niveles bajos de Cr(III) ocurren naturalmente en una variedad de alimentos, tales como, frutas, hortalizas, nueces, bebidas y carnes. Por otra parte, la exposición al Cr(VI) es frecuente en ambientes de trabajo en los que se usa este compuesto: industria de cuero, industria textil, industria petrolera, entre otras [27].

- Fase toxicocinética: La absorción de Cr se lleva a cabo por tres vías: oral, respiratoria y dérmica. Al entrar en el organismo es distribuido a la médula ósea, pulmones, ganglios linfáticos, bazo, riñón e hígado. El compuesto que más fácilmente se absorbe es el Cr(VI), ya que es captado por los eritrocitos e integrado a otras células por el sistema transportador de sulfatos. Se elimina por vía renal el 60%, en menor grado por heces (vía biliar), cabello,

uñas, leche y sudor. En la orina encontramos fundamentalmente Cr(III) formando un complejo con el glutatión [28].

- Fase toxicodinámica: El Cr(VI) se reduce a Cr(III) intracelularmente en las mitocondrias y el núcleo, reductores intracelulares lo degradan en el citoplasma. La reducción intracelular genera intermediarios reactivos como Cr(V), Cr(IV) y Cr(III), así como radicales libres hidroxilo y oxígeno, estas formas reactivas del Cr son susceptibles de alterar el ADN [29].

- Efectos tóxicos: Dependen en gran medida de la valencia del elemento en el momento de la exposición y de la solubilidad del compuesto. Una exposición de corta duración al Cr(III) puede causar irritación en los ojos y en el tracto respiratorio. El Cr(VI) causa varios efectos sobre la salud: erupciones cutáneas, irritación y sangrado de la nariz, úlceras, problemas respiratorios, debilitamiento del sistema inmune, daño en los riñones e hígado, alteración del material genético, cáncer de pulmón y la muerte [30].

- Tratamiento por intoxicación: En caso de ingestión de Cr se recomienda lavado gástrico con solución salina y administración de solución al 1% de tiosulfato de sodio para su complejación, o bien CaNa₂EDTA. A su vez, se recomienda la administración de ácido ascórbico para favorecer la reducción de Cr(VI) a Cr(III). Las lesiones son tratadas con soluciones de hiposulfito de sodio y acetato de aluminio [31].

1.1.5.4 Toxicología del Pb

- Fase de exposición: La principal vía de exposición para la población general es por la ingesta de alimentos y por vía respiratoria, mientras que la exposición ocupacional ocurre en los trabajadores de plantas de esmaltado y refinerías, manufactura de baterías, plásticos y pinturas. Puede haber exposición ambiental cerca de fundiciones que contaminan el aire y el suelo. En menor proporción, se da la exposición por cosméticos con Pb, inhalación de gasolina y contaminación por tuberías de Pb en casas antiguas [32].

- Fase toxicocinética: Luego de la ingestión de Pb, este se absorbe dependiendo del tamaño, tránsito gastrointestinal, estado nutricional y la edad. Se produce mayor absorción de Pb si hay deficiencia de Fe y/o Ca, si hay gran ingesta de grasa o inadecuada ingesta de calorías y es mayor en niños, ya que en ellos la absorción de Pb es de 30 a 50% mientras que en adultos es del 10%. La absorción de Pb de los alveolos a la sangre se da por difusión. La absorción por la exposición a nivel respiratorio es del 50% al 100%. La absorción por la piel solo tiene importancia con el contacto de compuestos orgánicos, como el tetraetilplomo.

En primer lugar, el Pb absorbido circula en sangre unido a los glóbulos rojos, luego se distribuye a los tejidos blandos como hígado, riñón, médula ósea y sistema nervioso central. Luego de 1 a 2 meses el Pb difunde a los huesos (principal lugar de depósito) donde es inerte y no tóxico. El metal puede movilizarse del hueso en situaciones como acidificación del pH sanguíneo, movilización del Ca óseo (acidosis, neoplasias, alteraciones metabólicas, etc.), embarazo, hipertiroidismo y edad avanzada. El Pb atraviesa la placenta y la barrera hematoencefálica.

La excreción de Pb se lleva a cabo por orina en un 76% y en heces 16%, en menores cantidades se puede eliminar por el sudor, saliva y por la leche materna. Se excreta en cantidades mínimas por las uñas y el cabello [33].

- Fase toxicodinámica: El Pb interfiere con el metabolismo del Ca, sobre todo cuando las concentraciones de Ca son bajas. Inhibe la bomba de Na-K-ATPasa, lo que aumenta el Ca intracelular. Esta alteración interfiere en la neurotransmisión y en el tono vascular lo que ocasiona hipertensión y neurotoxicidad. La síntesis de hemo es interferida por concentraciones muy pequeñas de Pb [20].

- Efectos tóxicos: La intoxicación aguda presenta un estado de anorexia con síntomas de dispepsia y estreñimiento, ataque de dolor abdominal generalizado, diarrea, sabor metálico en la boca, náuseas, vómito, insomnio y debilidad. La encefalopatía aguda debido al Pb es

rara en los adultos, pero si se da en niños. La intoxicación crónica por Pb es conocida como saturnismo. Los signos y síntomas pueden dividirse en: gastrointestinales, neuromusculares, del sistema nervioso central, hematológicos y renales. El síndrome del sistema nervioso central por lo regular es más frecuente en niños, en tanto que el gastrointestinal es más prevalente en adultos [19].

- Tratamiento por intoxicación: La intoxicación aguda por Pb debe ser tratada con carbón activado o lavado gástrico, dentro de la hora de la ingestión. Se debe vigilar la función renal y hepática, y controlar las convulsiones. En las intoxicaciones crónicas por Pb se debe reducir la concentración del metal en el organismo por medio de agentes quelantes, entre ellos, CaNa_2EDTA , ácido dimercaptosuccínico (DMSA) y penicilamina [34].

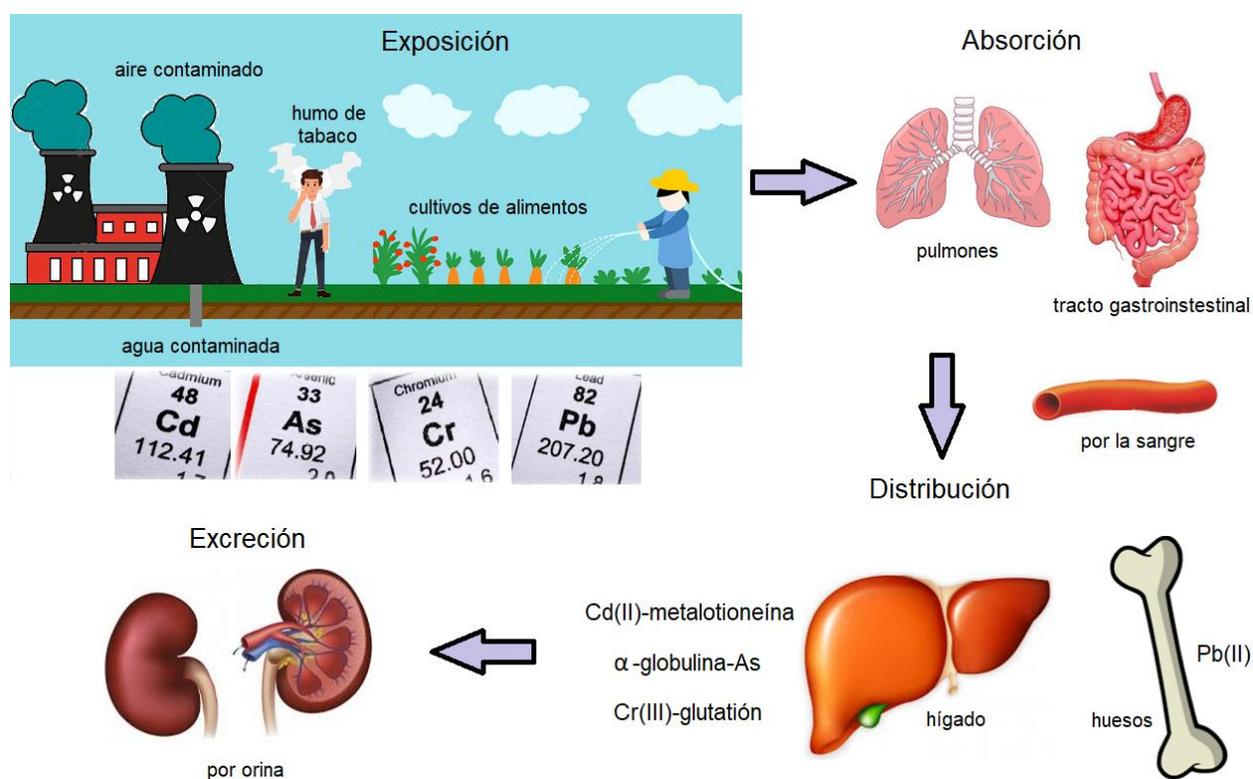


Fig. 1.1.2 Esquema del ciclo toxicológico de los analitos bajo estudio.

1.2 Principios básicos sobre la miel



1.2.1 Generalidades de la apicultura

1.2.1.1 Apicultura, polinización y medioambiente

Si analizamos etimológicamente la palabra “apicultura” observamos que proviene del latín *apis* (abeja) y *cultura* (cultivo), es decir, la ciencia aplicada que se dedica al estudio, cultivo y cría de las abejas melíferas. La apicultura es una actividad ancestral que el hombre ha ejercido en beneficio propio mediante el aprovechamiento de todos los productos que elaboran las abejas [1]. Sin embargo, no ha sido consciente hasta hace relativamente poco tiempo de que el verdadero beneficio medioambiental está en la labor de polinización que realizan las abejas. Gracias a la polinización, se ha evitado la desaparición de muchas especies vegetales y se ha contribuido al mantenimiento de un entorno medioambiental mundial más saludable [2].

La polinización, no solo contribuye al mantenimiento de las especies, también evita que ciertas zonas se desertifiquen. La actividad apícola presenta una relevante importancia socioeconómica por una serie de beneficios, entre ellos [3]:

- Es complementaria con otras producciones agrícolas y ganaderas.
- Se puede desarrollar en zonas poco favorecidas y donde otro tipo de actividad económica es difícil que se desarrolle.
- Aprovecha recursos naturales que otras producciones no pueden utilizar.
- En las economías rurales tiene gran relevancia por la cadena económica que genera.
- Se puede considerar una actividad motriz para las industrias alimentaria, farmacéutica y química.
- Sus productos son totalmente naturales ya que no precisan de ningún tipo de aditivo.

La polinización es el proceso de fecundación de la flor, por el que se transfiere polen desde las células masculinas de una flor (estambres) hasta las células femeninas de otra (pistilos), como puede observarse en la Fig. 1.2.1. La importancia de las abejas en la polinización se

basa en que mientras éstas reciben alimentos para su mantenimiento, van fecundando flores. Por lo tanto, el planeta mantiene una flora que de no ser por las abejas y otros insectos habría desaparecido. Además, está demostrado que la polinización realizada por las abejas en los cultivos incrementa su rendimiento en un 20% aproximadamente [4].

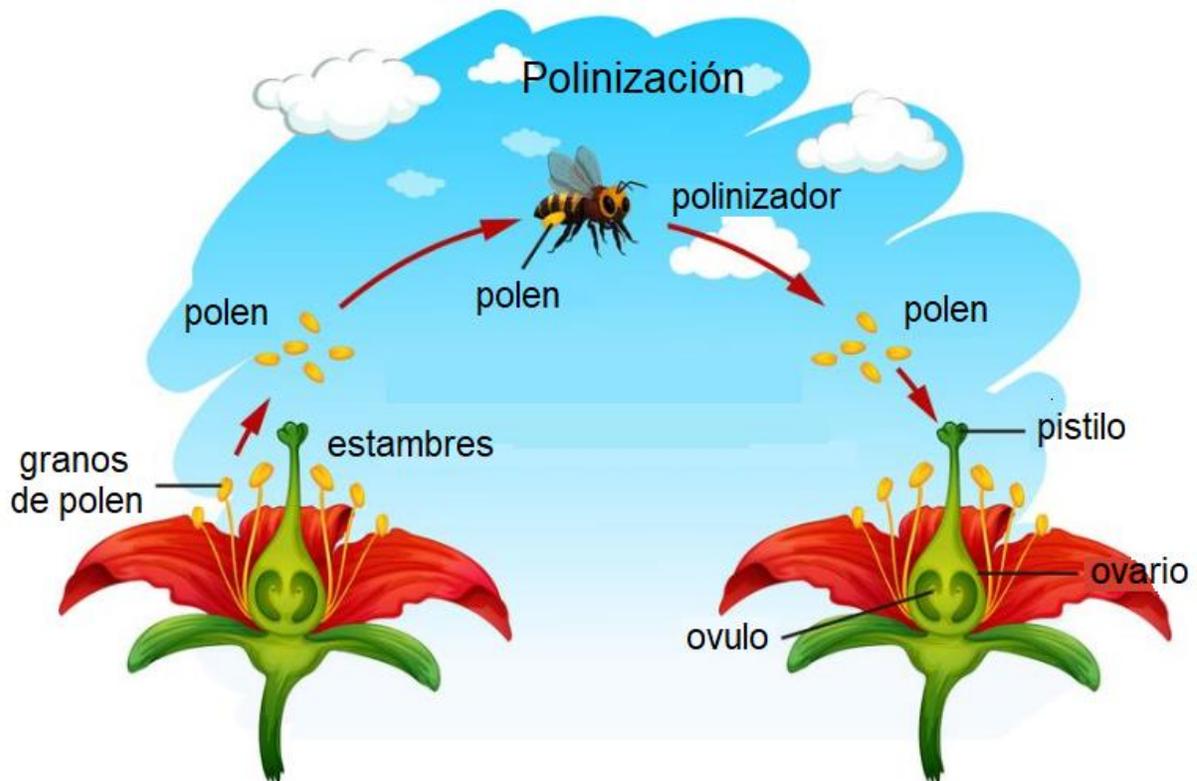


Fig. 1.2.1 Proceso de polinización realizado por las abejas.

1.2.1.2 Historia de la apicultura

La miel es posiblemente el primer alimento natural de origen animal que el ser humano ha recolectado y consumido desde el origen de los tiempos. Existen datos históricos que señalan la existencia de prácticas apícolas a través de distintos períodos, es así que se observan pinturas rupestres que datan de 7000 y 8000 años de antigüedad donde muestran escenas de recolección de miel de colmenas silvestres, como puede observarse en la Fig. 1.2.2. Se cuenta con papiros que datan del año 2400 a.C. donde se puede observar que los egipcios trasladaban sus colmenas en embarcaciones a lo largo

del río Nilo [5]. Los griegos veneraron la apicultura y representaron en su moneda una abeja en los años 480 a.C. Los poetas geórgicos dedicaron obras a la descripción de las costumbres e inteligencia de las abejas. En general, siempre en los relatos de las sociedades más avanzadas de todas las épocas, se han encontrado vestigios del conocimiento de las abejas y de la explotación racional de la miel [6].



Fig. 1.2.2 Pintura rupestre acerca de la recolección de miel de colmenas silvestres.

La apicultura alcanzó su apogeo cuando el único elemento conocido para endulzar, era la miel. Esto cambió después del descubrimiento de América y la producción de caña de azúcar. Con ello la importancia de la apicultura decreció, sin embargo, su práctica no se interrumpió en ningún momento. La apicultura moderna comienza con la creación de los panales y cuadros móviles, que no destruyen los mismos al realizar la cosecha de miel, con las hojas de cera estampada y los extractores mecánicos, alcanzando su auge a fines del siglo XIX y a principios del siglo XX gracias a los trabajos de múltiples estudiosos en el tema [7].

El mayor aporte realizado por las abejas en la evolución de los seres vivos ha sido y es la relación con las flores a través de la polinización. Son variados los productos que se obtienen del trabajo de las abejas, no sólo la producción de un endulzante, sino también su desempeño en la producción de cera, debido a su uso en la fabricación de candiles o velas de cera y otras importantes aplicaciones, como la impermeabilización de maderas, cuerdas, cueros, telas, etc. Más tarde con el desarrollo de nuevas técnicas de conservación, manipulación y mecanismos para su recolección se comenzó a coleccionar el polen, propóleos, jalea real y veneno de abejas (apitoxina) [8].

1.2.2 Características de la miel

1.2.2.1 Definición de miel

Según el Codex, se entiende por “miel” a la sustancia dulce natural producida por abejas obreras (*Apis mellifera*) a partir del néctar de las flores o secreciones de partes vivas de plantas, que las abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias, que luego depositan, deshidratan y almacenan en panales para su maduración [9].

1.2.2.2 Composición química de la miel

La composición química de una miel depende del tipo de flor que la abeja haya libado, de factores climáticos y del estado de la colonia, entre otros factores. Los azúcares son los principales componentes de la miel ya que suponen en torno al 80%, mayoritariamente glucosa y fructosa, siendo esta última generalmente más abundante. Otros azúcares están presentes en menores proporciones. Los ácidos orgánicos presentes en la miel contribuyen al poder bactericida y, por tanto, a la estabilidad de la misma. Las proteínas y aminoácidos presentes no suelen sobrepasar el 1% del total de la miel, siendo lo normal en torno al 0,4-0,5% y proceden del néctar, polen o de las propias abejas. Las vitaminas más importantes presentes son las del complejo B y vitamina C, las cuales

proceden del néctar y del polen. Por otro lado, la miel presenta un contenido mineral a niveles traza el cual varía según la especie vegetal polinizada y aporta a la miel diferentes tonalidades [10]. En la Tabla 1.2.1 se puede observar la composición química porcentual de la miel.

Tabla 1.2.1 Composición química porcentual de la miel.

Composición porcentual de la miel (por cada 100 g)	
Componentes	Porcentaje (%)
Fructosa	38,2
Glucosa	31,2
Otros azúcares	11,6
Agua	17,1
Ácidos libres	0,80
Aminoácidos y proteínas	0,50
Vitaminas	0,30
Minerales	0,30

1.2.2.3 Clasificación de la miel

Diferentes criterios son utilizados a la hora de clasificar muestras de miel, entre los más importantes cabe destacar:

- Según origen botánico: Esta clasificación incluye la “miel de flores” que es aquella producida por las abejas a partir del néctar de las flores, que incluyen mieles monoflorales, es decir predominio del néctar de una especie y mieles multiflorales, del néctar de varias especies vegetales y en proporciones variables. Por otro lado, abarca a la “miel de mielada

o mielato” que es la producida por las abejas a partir de la savia de pinos y plantas arbustivas [11].

- Según método de elaboración: Dentro de esta clasificación cabe destacar la “miel centrifugada”, que es aquella obtenida mediante la centrifugación de los panales desoperculados sin larvas. Por otro lado, la “miel prensada”, obtenida mediante la compresión de panales sin larvas, con o sin la aplicación de calor moderado. Por último, “miel escurrida”, que es la miel obtenida mediante el drenaje de los panales desoperculados sin larvas [9].

- Según presentación: Se clasifican en: “miel convencional” aquella provista en estado líquido o cristalizada o bien una mezcla de ambas, “miel en panal” aquella vendida en panales enteros cerrados o en secciones, “miel en trozos” aquella que contiene uno o más trozos de panales, “cristalizada” aquella que ha experimentado un proceso natural de solidificación y “miel cremosa” aquella que tiene una estructura cristalina fina y que puede haber sido sometida a un proceso físico que le confiera esa estructura y que la haga fácil de untar [12].

- Según coloración: La coloración de la miel depende básicamente del origen botánico, las diferentes especies vegetales aportan diferentes tonalidades a la misma debido a los diferentes contenidos minerales. La coloración de la miel puede ser establecida por diversos criterios, entre ellos la más utilizada es la escala de Pfund, la cual clasifica la tonalidad de una muestra de miel mediante la medición de la absorbancia de una solución preparada de la misma [13]. En la Fig. 1.2.3 se puede observar la escala Pfund de clasificación de la miel según su tonalidad.



Fig. 1.2.3 Escala Pfund de clasificación de la coloración de la miel.

1.2.2.4 Propiedades nutricionales y usos de la miel

Es un endulzante natural sin procesos de refinación (a diferencia del azúcar) y sin conservantes (a diferencia de la mermelada). Por su composición equilibrada la miel resulta de fácil asimilación y aporta importantes nutrientes al organismo. Resulta además de interés por su alto valor energético, ya que la miel tiene la capacidad de endulzar 25 veces más que el azúcar refinado [9].

La miel es aconsejada para deportistas, personas con digestión lenta, adolescentes y tercera edad. Incrementa la resistencia al cansancio psicofísico en períodos de intensa actividad, a su vez mejora la asimilación de Ca y aumenta la producción de glóbulos rojos. Es recomendada para etapas de crecimiento, anemias, fracturas, menopausia y osteoporosis. Asimismo, la miel es el azúcar mejor tolerado por los diabéticos al no provocar sobreabundancia de azúcar en la sangre de dichas personas [14].

La miel es utilizada para diferentes fines [15, 16], entre ellos:

- Gastronómicos: Principalmente en cocina y pastelería, a su vez como aditivo de bebidas, como la cerveza de miel, y es el ingrediente principal de la hidromiel.
- Cicatrizante: Se puede usar externamente debido a sus propiedades antimicrobianas y antisépticas. Así, la miel ayuda a cicatrizar y a prevenir infecciones en heridas o quemaduras superficiales.
- Cosméticos: Es utilizada en cremas, mascarillas de limpieza facial y tónicos, debido a sus cualidades astringentes y suavizantes.
- Terapéuticos: La miel alivia los síntomas del resfrío, es capaz de aliviar las membranas irritadas en la parte posterior de la garganta, tiene efectos antioxidantes y antivirales. Es considerada segura, fuera del periodo de lactancia, para aliviar la tos. Calma el dolor de garganta, sin embargo, no es recomendable su uso en niños menores de un año porque existe el peligro del desarrollo de botulismo.
- Conservante: Es considerada un excelente conservante natural, debido a su bajo contenido de agua y alta concentración de azúcar, lo cual evita la proliferación de microorganismos.

1.2.3 Producción apícola

1.2.3.1 Proceso de elaboración de la miel

Las abejas recogen el néctar de las flores y tras mezclarlo con su saliva y las diversas enzimas que contiene, es sometido a una serie de reacciones químicas transformándolo en miel. La almacenan en unas pequeñas celdillas de los panales que ellas mismas fabrican. Allí se inician los procesos bioquímicos que hacen que la miel pierda humedad. Si este proceso no se produce debido a exceso de humedad ambiental, las abejas se agrupan en determinadas zonas de la colmena y establecen una corriente de aire batiendo sus alas, hasta que se alcance el grado de humedad requerido. Tras alcanzar las

condiciones adecuadas de humedad, proceden a opercular (tapar) las celdillas, con la cera que fabrican [17].

La miel se cosecha al final del proceso de floración de las plantas. Este momento varía dependiendo de las zonas y de las especies vegetales e influyen factores como la meteorología o la estación del año. Entre finales de la primavera y el verano, con temperaturas no excesivamente altas, gran parte de las celdillas de los panales van a estar ya cerradas con el opérculo y suele coincidir con humedades de la miel entorno al 18%. Este es el momento en el que la miel está madura y podemos iniciar el proceso de recogida [18].

Para realizar la extracción se levanta la tapa de la colmena y el apicultor introduce un poco de humo utilizando un ahumador. Con el humo, las abejas no inician el vuelo y quedan adheridas a los marcos de cera, descuidando la defensa de la colmena. El humo se produce con materiales naturales y de combustión lenta, tales como arpillera, mazorcas de maíz, etc. Posteriormente, se retiran los cuadros que contienen la miel, que serán repuestos por otros que ya hayan sido vaciados. Posteriormente, se retiran los opérculos de las celdillas, lo que se conoce como desoperculación, dejando una lámina perfectamente limpia y sin fundir la cera para evitar la contaminación de la miel [19].

La miel que se encuentra en el interior de las celdillas se puede extraer por centrifugación o por prensado de los panales. Una vez que la miel ha sido extraída, debe ser tratada para su posterior envasado mediante licuado, filtrado y homogeneización. Durante el licuado es necesario elevar la temperatura de la miel. Una vez que se alcanzan los niveles de viscosidad buscados, la miel se filtra para eliminar todas las impurezas posibles. Posteriormente, la miel se almacena en bidones autorizados para alimentos, herméticos, resistentes a la rotura y de vaciado fácil, para finalmente ser envasada en frascos que permitan que el producto arribe al mercado con todas sus propiedades [19]. En la Fig. 1.2.4 se puede observar un esquema del proceso de elaboración de la miel.

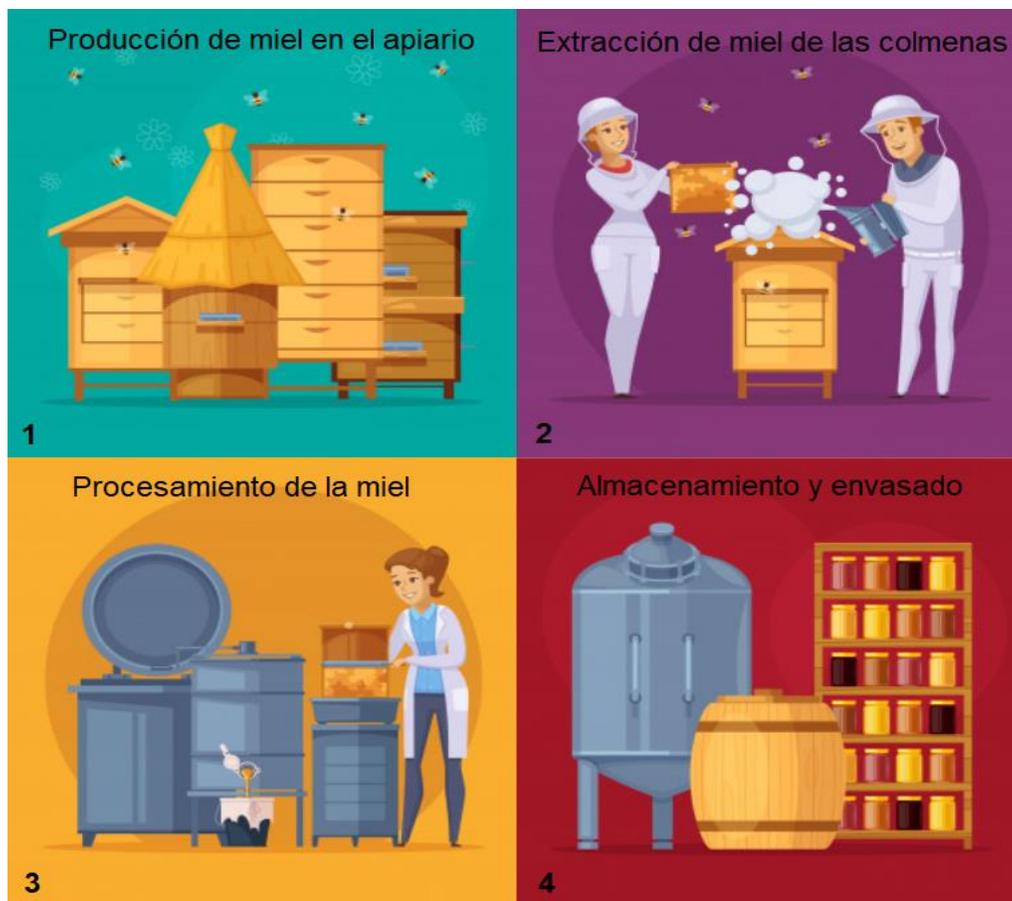


Fig. 1.2.4 Etapas en la elaboración de la miel.

1.2.3.2 Productos derivados de la miel

La miel puede ser aprovechada como materia prima de altísima calidad en la elaboración de productos de mayor valor agregado. En territorios como la Argentina la producción de hidromiel es una alternativa interesante para el apicultor. También conocida como vino de miel o aguamiel, es una bebida procedente de la fermentación alcohólica completa o parcial de una solución de miel y agua producida por levaduras seleccionadas, que contienen entre 8-18% (v/v) de etanol. El aguamiel es la primera bebida alcohólica que se conoce, anterior al vino y probablemente precursora de la cerveza. Se ha mantenido presente desde tiempos ancestrales, en mayor o menor medida, en países de América, Europa, África y Asia, en donde a pesar de ser un producto mayoritariamente artesanal es

valorado por ciertos consumidores. Las hidromieles pueden tener una amplia variedad de sabores y aromas dependiendo de la fuente de miel, el uso de aditivos, el tipo de levadura empleada en la fermentación, la proporción de las materias primas y el tipo de añejamiento [20].

Al ser la hidromiel la bebida alcohólica más antigua que se conoce, el vinagre de miel puede ser considerado el vinagre más antiguo utilizado por el hombre. Según lo establecido en el Código Alimentario Argentino (CAA), es obtenido por fermentación alcohólica, seguida de fermentación acética de soluciones de miel en agua. El alto valor biológico que posee la miel le imprime a este vinagre superioridad sobre otros vinagres que son elaborados a partir de un fruto. El producto obtenido es un vinagre de color ámbar, brillante y muy aromático con ligeras notas dulces que mejora y realza el sabor de los alimentos [21].

Debido a que la miel tiene un alto contenido de azúcares fermentables y sustancias aromáticas, también es ideal como materia prima para la elaboración de cerveza. La miel se puede agregar en la etapa de ebullición, como proveedor de extracto, favoreciendo la esterilización de la cerveza, o bien antes del llenado de la bebida, para endulzarla y aromatizarla. La adición de miel a la cerveza proporciona una bebida con menos cuerpo y aumenta la cantidad de alcohol y a su vez, contribuye de forma importante al aroma de la cerveza, aunque sea utilizada en pequeñas cantidades, aportando un dulzor residual con un sabor agradable y suave [22].

1.2.3.3 Apicultura en Argentina: Producción y exportación

Debido a la diversidad del clima y las grandes extensiones de pastura natural, Argentina cuenta con una gran variedad de recursos florales que hacen posible que la actividad apícola se desarrolle en casi todo el territorio nacional. Por otro lado, esta actividad tiene un alto valor social y económico, de la que dependen aproximadamente 30.000

productores, quienes en conjunto cuentan con alrededor de 5 millones de colmenas. Si bien de la apicultura se pueden obtener diversos productos, la miel es prácticamente el único de ellos que es explotado económicamente. El mercado interno en Argentina, está poco desarrollado debido a que los hábitos de consumo local de miel no son significativos (aproximadamente 200 g/per cápita/año) en comparación con países con gran tradición en consumo, donde el volumen supera 1 Kg/per cápita/año. Este modelo de consumo hace que cerca del 95% de la producción de miel sea destinado a los mercados internacionales como producto a granel. Desde hace más de 25 años Argentina se ha consolidado como uno de los principales productores y exportadores de miel [23].

La miel argentina es valorada en el mundo por sus características organolépticas y fisicoquímicas, demandándose para consumo directo de los mercados más exigentes. En la actualidad la preferencia de los consumidores está dirigida a alimentos sanos, naturales y amigables con el medio ambiente, entre los que la miel no es la excepción. En Argentina, las características que debe cumplir este producto de la colmena, están determinadas por las demandas de los mercados internacionales ya que el principal destino es la exportación. El Plan Estratégico Argentina Apícola 2017 pretendía que nuestro país en el año 2017 se transformara en líder mundial del mercado de productos apícolas altamente valorados sobre la base de un crecimiento y desarrollo organizado, competitivo y sostenible desde la perspectiva económica, social y ambiental. Esto permitió que nuestro país conservara y mejorara su posición en el comercio mundial de la miel [24].

1.2.4 Metales tóxicos en la miel

1.2.4.1 Exposición de la miel a metales tóxicos

Las abejas melíferas están expuestas a una variedad de xenobióticos de fuentes naturales y antropogénicas. Miles de abejas obreras viajan hasta 10 Km de la colmena en el transcurso de la recolección del néctar, polen, agua y propóleos necesarios para

mantener una colonia [25]. De esta manera, las abejas recolectoras pueden transportar esos xenobióticos de regreso a la colmena, debido a que los contaminantes distribuidos en el medioambiente se incorporan a las abejas. Esta contaminación da como resultado una elevación de los niveles de estos contaminantes no deseados en la colmena (Fig. 1.2.5) [26].

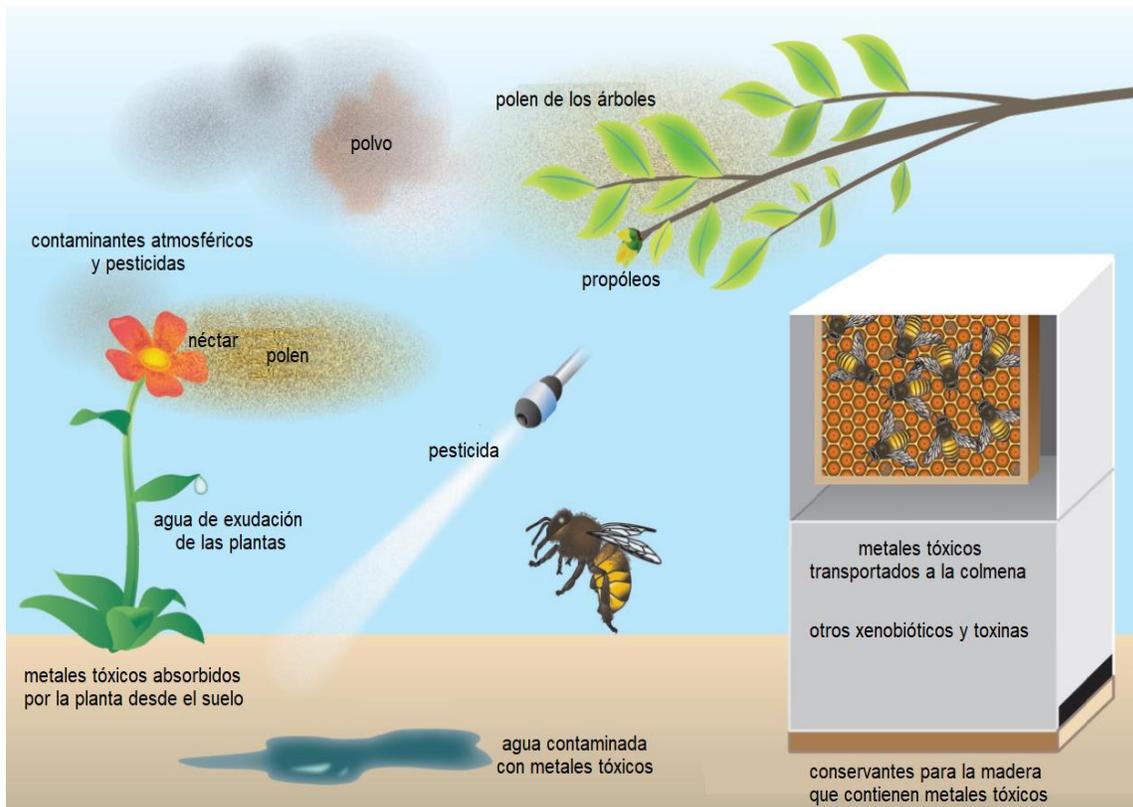


Fig. 1.2.5 Diferentes rutas de exposición de las abejas melíferas a metales tóxicos.

Las abejas recolectan néctar para satisfacer las necesidades de carbohidratos de la colonia, pero esta fuente de alimento no es del todo inocua. Del 9% al 55% de los néctares producidos por las flores también contienen xenobióticos sintetizados por plantas, y en menor proporción metales tóxicos que se han depositado en las plantas por la contaminación atmosférica, o bien que han sido absorbidos por las plantas desde el suelo [27].

Las abejas recolectan polen como su principal fuente de aminoácidos y esteroides, pero la mayoría del polen también contiene xenobióticos fenólicos y metales tóxicos con actividad biológica potencialmente tóxica. El néctar y el polen pueden contener contaminantes ambientales o pesticidas sistémicos extraídos del suelo, o pueden estar contaminados por aplicaciones tópicas de pesticidas o derivar de tales aplicaciones [26].

Las abejas también recogen propóleos de los brotes de los árboles para usarlos como sellador, pegamento y agente antimicrobiano dentro de la colmena, los cuales pueden contener metales tóxicos a niveles traza. Las abejas también recolectan agua de fuentes ambientales para diluir la miel y enfriar la colonia. Entre estas fuentes ambientales, el agua superficial o el agua producida por las plantas en los márgenes de las hojas pueden estar contaminadas con altas concentraciones de insecticidas sistémicos y metales tóxicos a bajas concentraciones [28]. Los apicultores también pueden agregar xenobióticos al ambiente de la colonia para controlar patógenos y parásitos. Los xenobióticos (entre ellos metales tóxicos) y pesticidas agrícolas pueden persistir durante muchos años en la cera [29].

La presencia de metales en productos apícolas puede poner en peligro la salud de los consumidores humanos. Estos metales pueden provenir de fuentes externas, como industrias de fundición, emisiones de fábricas, procesos de metalurgia no ferrosa, emisiones de gasolina con Pb en las carreteras, procedimientos incorrectos durante las etapas de producción y de conservación de la miel, así como productos agroquímicos tales como abonos que contienen Cd y As. Estos metales pueden conducir a un deterioro de la calidad de la vida humana cuando se acumulan a un nivel de concentración tóxica. Elementos esenciales, como el Cr, son seguros y adecuados para el cuerpo si están presentes dentro de un rango específico de la ingesta (dosis diaria recomendada). Más allá de este rango, también se observan efectos tóxicos [30].

En el sector agropecuario también son fuentes contaminantes las aguas residuales utilizadas para riego, compost, plaguicidas y fertilizantes. Debido a que los seres humanos somos incapaces de metabolizar metales tóxicos, estos tienden a bioacumularse en el organismo de acuerdo con la afinidad con el grupo sulfidrilo de las proteínas, hasta alcanzar niveles altos de toxicidad. De esta manera, la ingesta de estos elementos puede generar graves daños a la salud del consumidor [26].

1.2.4.2 Abejas y miel como bioindicadores de contaminación

Las actividades humanas producen contaminantes como consecuencia de su desarrollo, cuyas cantidades y toxicidad suelen colmar la capacidad homeostática del medio ambiente para purificarse. Por lo tanto, el análisis sistemático y la vigilancia del medio ambiente es una cuestión de urgencia. Las abejas, gracias a sus características morfológicas y también los productos de las mismas, se consideran buenos indicadores de contaminación, como por ejemplo de metales tóxicos [31].

Sobre la base de la extensa área que recorren las abejas en busca de alimento, y teniendo en cuenta que la producción de 1 Kg de miel requiere más de 100.000 vuelos de alimentación, está claro que tanto las abejas como la miel podrían ser sustratos de muestra aleatorios apropiados que pueden ser altamente representativos de los niveles promedio de contaminantes biodisponibles en el ambiente. Otros productos diversos de las abejas (como propóleos, cera y polen) se han empleado como materiales de muestreo para controlar la contaminación ambiental, pero las abejas y la miel son las matrices más comúnmente empleadas entre todos los productos de las colmenas [32].

1.2.4.3 Efectos tóxicos en la abeja de los metales en estudio

Los metales tóxicos en estudio (As, Cd, Cr y Pb) pueden ocurrir naturalmente en el medio ambiente, pero a menudo se encuentran con las abejas debido a las actividades

humanas. Estos contaminantes no solo afectan la calidad de la miel y otros productos apícolas, sino que también generan efectos adversos en la propia abeja.

Se ha estudiado que colmenas colocadas a lo largo de un gradiente de contaminación industrial por As y Cd ocasionaban la reducción de la población de abejas en la colmena y la producción de menos miel, donde la carga corporal de dichos contaminantes era superior a $20 \mu\text{g g}^{-1}$. El Cd puede bloquear el canal de Ca^{2+} y afectar de esta manera la función de los músculos en las abejas melíferas [33].

Por otro lado, el As se ha aplicado como insecticida agrícola a principios del siglo XX y es un importante contaminante industrial, el cual causa una mortalidad aguda a concentraciones traza en las abejas, ya que el As interfiere con el metabolismo celular y puede producir estrés oxidativo. Asimismo, una dosis relevante de As y Pb son rociados en huertos bajo la forma de arseniato de plomo durante la floración, lo que afecta a las abejas por la acción tóxica de ambos metales [34].

Las abejas melíferas, a su vez, pueden contener metales de fuentes ambientales externas a la colmena a concentraciones tan altas como $80 \mu\text{g g}^{-1}$, además están expuestas a As y Cr debido a conservantes de la madera utilizados en las mismas. Estos conservantes se han asociado con una mayor mortalidad invernal de las colonias [35].

1.2.4.4 Legislaciones de metales tóxicos en la miel

Con el fin de asegurar el consumo seguro de la miel, es necesario determinar la presencia y concentración de metales tóxicos en la misma. La Normativa de la Comunidad Europea, Codex Alimentarius y Regulación del MERCOSUR [36], al respecto especifican que para poder comercializar las mieles no deben contener metales tóxicos en concentraciones que puedan causar daño para la salud de los seres humanos. Entre los metales de mayor interés en la miel que constituyen un riesgo para el medio ambiente y la salud humana, se pueden mencionar As, Cd y Pb. Hoy en día no se conoce una legislación

nacional o internacional completa que establezca los límites máximos de residuos para ciertos metales tóxicos en miel de abejas y otros productos apícolas, por ejemplo, para Cr. Actualmente se reportan esfuerzos aislados para establecer la normativa en los países consumidores.

A pesar de los múltiples controles que existen para la comercialización de productos apícolas, actualmente la Unión Europea no ha especificado límites máximos de residuos para ciertos metales. Se han sugerido valores para Cd de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$ y para Pb de 1 mg Kg^{-1} [37]. Por su parte, en Argentina la Regulación del MERCOSUR ha establecido un límite máximo permisible para Cd en miel de $0,1 \text{ mg Kg}^{-1}$, mientras que para As y Pb es de $0,3 \text{ mg Kg}^{-1}$ [38].

1.2.4.5 Determinación analítica de metales tóxicos en la miel

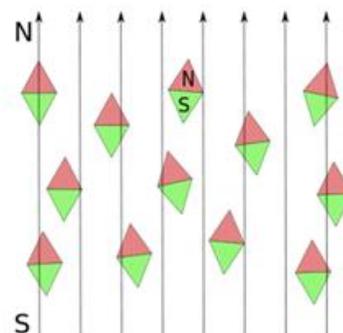
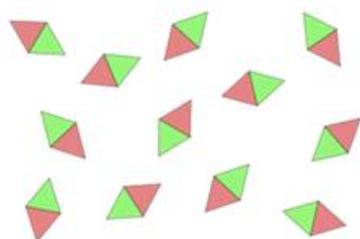
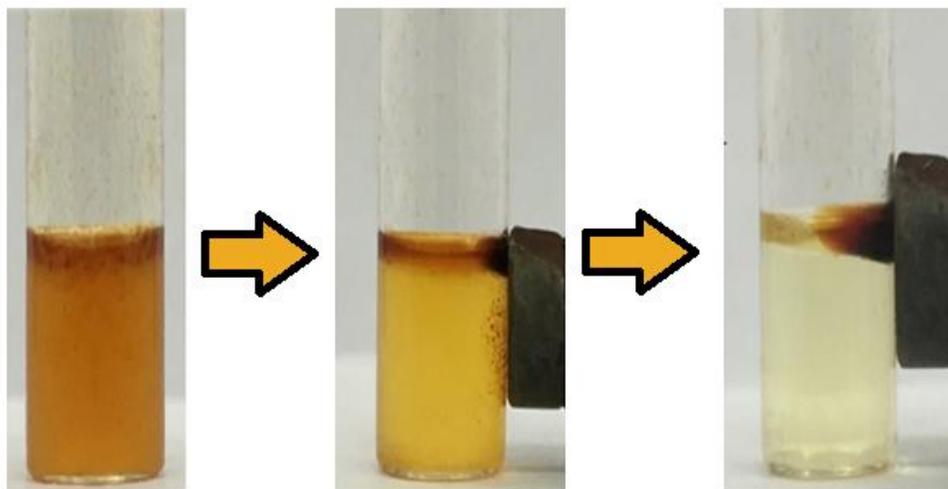
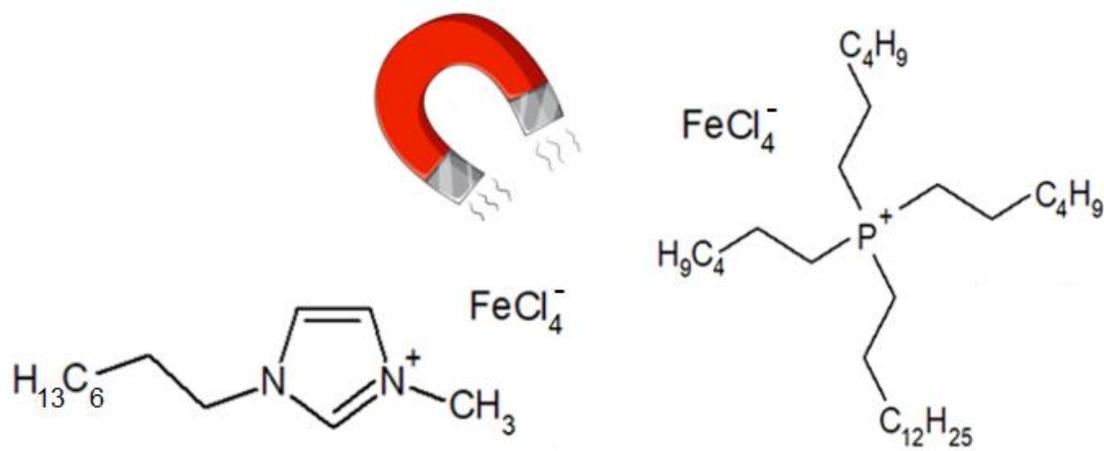
Aunque la miel es soluble en agua y los metales pueden determinarse directamente en soluciones preparadas disolviendo muestras de miel en agua o soluciones ácidas, las muestras generalmente se descomponen antes de las mediciones. Los residuos resultantes (cenizas y digeridos) se redisuelven en agua o soluciones ácidas, y los componentes minerales se transfieren a la solución. Este tratamiento altera la matriz orgánica de la miel y extrae especies metálicas. Además, evita variaciones en las propiedades fisicoquímicas de las soluciones estándar y de muestra, así como numerosas interferencias físicas y químicas que pueden ocurrir en las técnicas de detección [39].

Con respecto al valor nutricional y el posible efecto de la miel en el bienestar humano, el análisis es especialmente significativo para los consumidores porque garantiza la seguridad general y la salud. Además, el control de calidad de la miel y la detección de su adulteración y posible contaminación por metales tóxicos son importantes para los apicultores. De hecho, las determinaciones de trazas de metales esenciales y tóxicos en la

miel son críticas para la salud humana y el monitoreo ambiental. Sin embargo, el análisis de la miel es desafiante debido a la complejidad de la matriz [40].

Mediciones de metales en este tipo de muestra generalmente requiere métodos analíticos precisos, sensibles y robustos. Es evidente que los métodos de espectrometría atómica, incluida la espectrometría de absorción atómica con llama (FAAS) [41], la espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS) y la espectrometría de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES) [42], son las más favorecidas en el análisis de miel para detectar la presencia de metales. La técnica de elección ha resultado ser ETAAS, debido a que permite obtener mejores resultados con respecto a los límites de detección de FAAS y a su vez instrumentación más económica que ICP-OES.

1.3 Líquidos Iónicos Magnéticos



1.3.1 Generalidades de los líquidos iónicos

1.3.1.1 Definición de líquido iónico

Dependiendo del punto de vista desde el cual se pretendan estudiar, los líquidos iónicos (ILs) pueden ser clasificados como una nueva clase de disolventes o como un tipo de materiales con múltiples y muy diversas aplicaciones. Sin embargo, la forma más aceptada de definirlos es como sales con temperatura de fusión por debajo de 100°C, lo que informa de su naturaleza completamente iónica. La principal característica que diferencia a los ILs de las sales fundidas, es el amplio margen de temperaturas en el se encuentran en estado líquido. A su vez, desde una perspectiva química, la composición de los ILs es especialmente consistente, aunque sus propiedades y componentes varían enormemente dentro del mismo tipo de materiales. Sin duda uno de los grandes méritos de los ILs es que puedan ser sintetizados de acuerdo con las necesidades específicas del proceso al que posteriormente se vayan a aplicar. Es lo que se suele llamar síntesis “a medida” o “a la carta” de ILs [1].

1.3.1.2 Breve reseña histórica

Desde la perspectiva histórica, el primer material que encajaría con la definición actual de IL se observó a mediados del siglo XIX, en una reacción de Friedel-Crafts, siendo una interfase líquida de aspecto oleaginoso que acabó designándose “red oil”. Más adelante, con el desarrollo de la espectroscopia de resonancia magnética nuclear, se determinó que lo denominado “red oil” era un compuesto iónico. Durante los primeros años del siglo XX se observó que algunos nitratos de alquilamonio eran líquidos a temperatura ambiente [2].

Sin embargo, la historia real comienza en el ejército estadounidense en 1963, donde se trataba de encontrar sustitutos viables para las sales fundidas de LiCl-KCl, que por entonces se empleaban como electrolitos. Al hondar en la literatura, se encontraron con

una patente de 1948, en la que se describía una mezcla conductiva constituida por AlCl_3 y haluros de 1-etilpiridinio, que se considera en la actualidad la primera muestra de IL. A partir de este hallazgo, químicos e ingenieros de todo el mundo comenzaron a mostrar interés por lo que, en principio, consideraron disolventes totalmente iónicos no acuosos [2].

Sin lugar a dudas, las propiedades de este nuevo material abrían una perspectiva ideal para su aplicación como electrolito en pilas, pero además se empezó a vislumbrar la posibilidad de aplicarlo en reacciones orgánicas como Friedel-Crafts, demostrándose así, que no solo era idóneo para su empleo en electroquímica, sino que además podía comenzar a emplearse en otros ámbitos como catalizador. Luego, a lo largo de los años, el estudio de diferentes combinaciones dio como resultado una cantidad innumerable de ILs con aplicaciones casi infinitas. Hoy en día la posibilidad de crear nuevos ILs, prácticamente no tiene acotaciones y las aplicaciones de éstos están tan solo limitadas por nuestra propia imaginación. En la última década, los ILs han sido uno de los principales protagonistas en el desarrollo de la “química verde”, principalmente como agentes extractantes en metodologías de extracción de analitos de diversa naturaleza, como compuestos orgánicos, biomoléculas y metales [3].

1.3.1.3 Composición química de los líquidos iónicos

Los ILs están constituidos por un catión orgánico voluminoso, combinado con aniones inorgánicos. Las diferentes combinaciones entre cationes y aniones pueden generar un gran número de estos compuestos. Esta gran diversidad permite diseñar solventes para optimizar el rendimiento, selectividad, solubilidad, separación y extracción de diversos compuestos. El catión del IL es el principal responsable del comportamiento químico, mientras que el anión contribuye con la mayor parte de las propiedades físicas [4]. En la Figura 1.3.1 se pueden observar algunos de los cationes y aniones más comúnmente utilizados para la formación de estas sales.

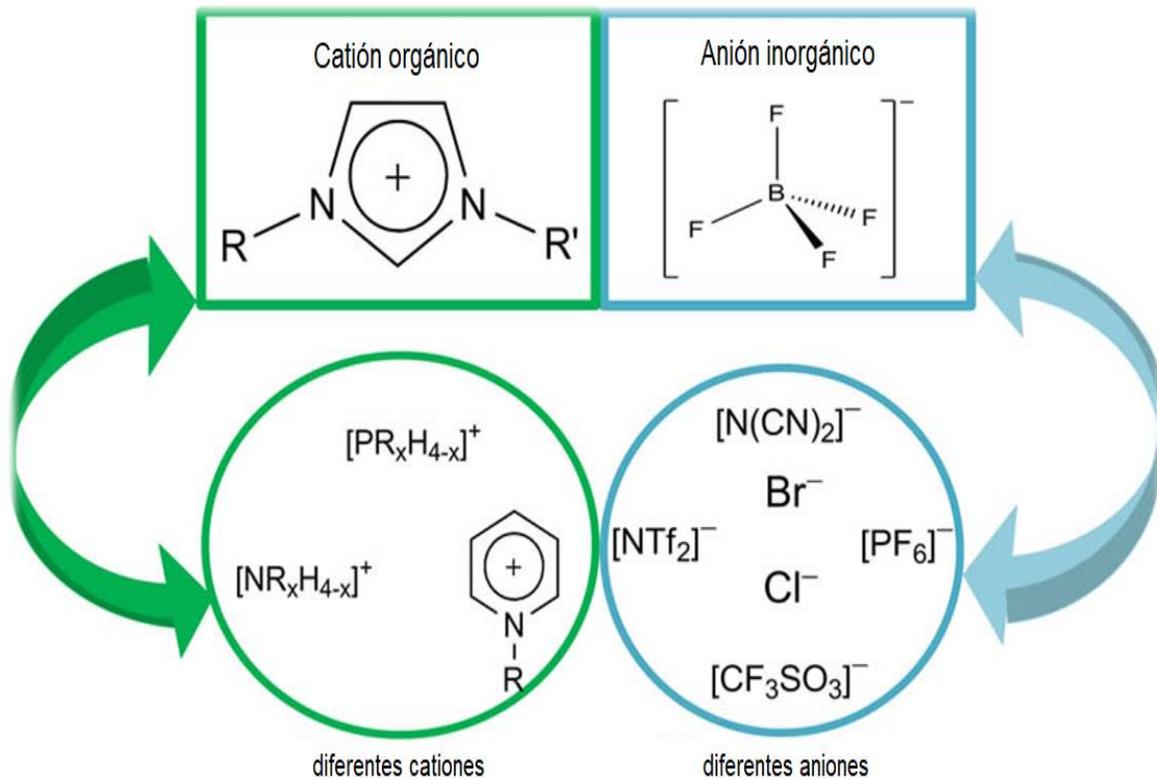


Fig. 1.3.1 Cationes y aniones más comunes que componen la estructura de los ILs.

Los ILs son sales formadas por iones muy asimétricos, el catión usualmente es de gran tamaño con respecto al anión, por lo que las fuerzas atractivas catión-anión son más débiles que las fuerzas que intervienen en las sales iónicas convencionales (sales fundidas), determinando que sean líquidos a temperatura ambiente o que posean puntos de fusión en dicho rango. Mientras que en las sales convencionales se produce un elevado empaquetamiento para formar una estructura cristalina, en los ILs, a partir de dos iones poco uniformes y con el catión orgánico muy asimétrico, no puede lograrse un empaquetamiento que dé lugar a un arreglo cristalino. Con pequeño aporte de energía se separan los aniones y cationes que configuran el sólido y se transforma en un líquido [5]. En la Fig. 1.3.2 se puede observar la diferencia entre la estructura cristalina de una sal cristalina y de un IL.

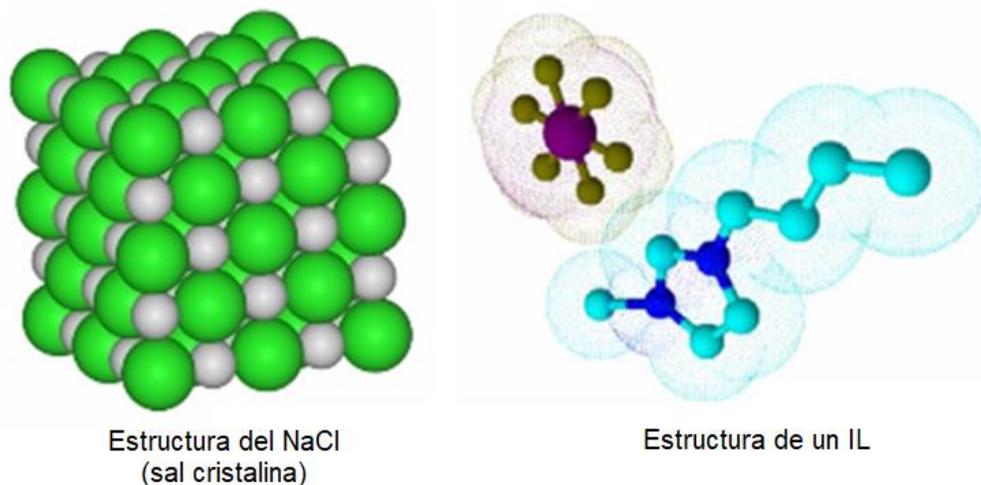


Fig. 1.3.2 Ejemplos de estructuras de sal cristalina y IL.

1.3.1.4 Principales propiedades de los líquidos iónicos

Las principales propiedades de los ILs se detallan a continuación, las cuales son sensibles a la pureza del IL.

- Baja presión de vapor: La débil interacción coulombica que presentan los ILs entre sus iones limita la formación de pares iónicos, necesarios para que se produzca la volatilización, por lo que tienen presión de vapor muy baja o indetectable. Eso los hace fácilmente manipulables al no evaporarse y permite la utilización de la destilación para recuperar los productos o sustratos disueltos en ellos [6].
- Densidad: Puede modificarse cambiando la longitud de las cadenas alquílicas presentes en los ILs. A medida que se incrementa el número de carbonos de la cadena aumenta la densidad.
- Viscosidad: Afecta a la difusión de los solutos y a parámetros prácticos, como la agitación de mezclas y bombeo de fluidos. Son, por su propia naturaleza iónica, mucho más viscosos que los solventes convencionales (entre 10-500 cP). Para un mismo catión, el cambio del anión afecta significativamente a la viscosidad. Los parámetros determinantes de la viscosidad son el tamaño del anión y la basicidad del mismo. La disminución en el tamaño

del anión disminuye las interacciones de tipo van der Waals, incrementando la interacción electrostática a través de puentes de hidrógeno. La influencia del catión en la viscosidad es menor, aunque se ha observado que un aumento en la longitud de las cadenas alquílicas del catión supone un aumento en los valores de viscosidad [7].

- Punto de fusión: Condiciona el límite inferior del intervalo de temperatura en el que puede utilizarse el IL como solvente. Depende principalmente del tamaño del IL, de su carga y de la distribución de la misma. Disminuye al aumentar el tamaño del anión y del catión. Un incremento en la simetría de los iones supone un aumento del punto de fusión, ya que permite un mayor empaquetamiento. Un incremento en la longitud de la cadena alquílica supone una disminución en el punto de fusión por cuestiones de empaquetamiento, mientras que la existencia de puentes de hidrógeno y la deslocalización de la carga conducen a un aumento del punto de fusión [8].

- Solubilidad: Debido a su naturaleza iónica y a su composición orgánica, los ILs son capaces de disolver compuestos orgánicos, inorgánicos e incluso materiales poliméricos.

- Hidrofilicidad/hidrofobicidad: La solubilidad de los ILs depende de la naturaleza del anión, debido a la fuerte interacción de puentes de hidrógeno entre anión y moléculas de agua, mientras que el catión tiene un efecto secundario. La lipoficidad puede verse incrementada mediante el aumento en la longitud de las cadenas alquílicas [9].

- Estabilidad térmica: El intervalo de temperaturas en que los ILs se encuentran en estado líquido es mayor al de los solventes moleculares convencionales. Su temperatura de descomposición térmica se encuentra normalmente entre 350 y 400°C. La naturaleza del catión y anión que conforman cada IL condiciona su temperatura de descomposición. Los ILs que contienen aniones más débilmente coordinados son más estables a la descomposición térmica [8].

- Estabilidad química: La mayoría de los ILs son compuestos no inflamables y químicamente inertes.

- Propiedades electroquímicas: Los ILs son solventes adecuados en procesos electroquímicos, por su gran estabilidad a la oxidoreducción, resistiendo un amplio rango de potenciales y presentan relativamente buena conductividad eléctrica [10].
- Toxicidad: La volatilidad prácticamente nula de los ILs reduce las potenciales vías de exposición, siendo el contacto directo con la piel y la ingestión las únicas vías posibles. Algunos pueden ser tóxicos y otros pueden ser relativamente inofensivos y biodegradables. La mayoría de los ILs presentan una toxicidad menor que la de los solventes orgánicos convencionales. La toxicidad es directamente proporcional a la longitud de la cadena alquílica (lo que incrementa su lipofilicidad).
- Peligrosidad: Algunos ILs son reactivos y corrosivos, entre ellos los obtenidos a partir de $AlCl_3$, pero la mayoría son mucho más seguros que los solventes orgánicos. Su naturaleza no inflamable por su baja presión de vapor hace que disminuya el riesgo de fuegos e incendios que presentan los solventes orgánicos convencionales, lo que resulta de interés para su aplicación en la industria química [11].

1.3.1.5 Síntesis de líquidos iónicos

La síntesis de ILs supone dos etapas: (1) La formación del catión que constituirá el IL (reacciones de cuaternización) y (2) la reacción de intercambio iónico que generará el producto deseado.

- Reacciones de cuaternización: Consisten en la polisustitución de una amina o fosfina hasta convertirla en cuaternaria, mediante una reacción con un haluro de alquilo. Como ventaja transcurren a temperaturas relativamente suaves, siguiendo el orden $Cl < Br < I$, como es de esperar en reacciones de sustitución nucleofílica [12]. Las reacciones de cuaternización son muy simples de llevar a cabo, la amina o fosfina se mezcla con un determinado haloalcano y la mezcla de reacción se agita y calienta (Figura 1.3.3).

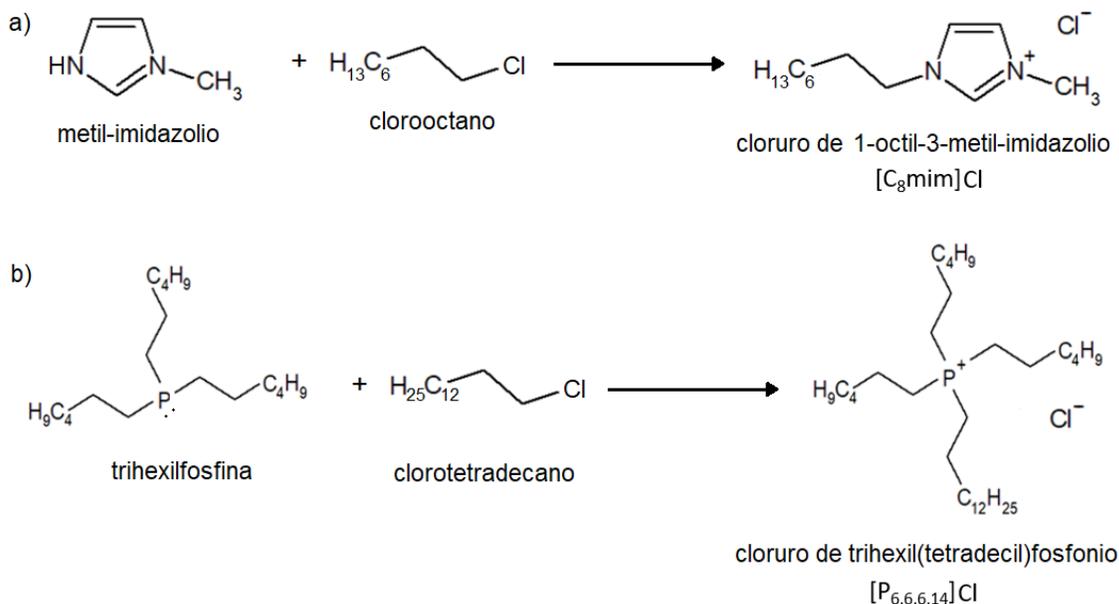


Fig. 1.3.3 Ejemplo de síntesis de ILs tipo imidazolio y fosfonio.

La reactividad de los haloalcanos decrece con el incremento de la longitud de la cadena. La reacción debería llevarse a cabo bajo atmósfera de nitrógeno o algún otro gas inerte para evitar trazas de agua y oxígeno durante la reacción de cuaternización. La sal del haluro es normalmente inmisible con los materiales de partida, facilitando su separación. Los productos deben almacenarse en el interior de un desecador, porque las sales formadas tienden a ser higroscópicas, especialmente cuando los sustituyentes alquílicos son de cadena corta. Las posibles impurezas presentes en las sales obtenidas pueden ser productos de partida y solvente [13].

- Reacciones de intercambio aniónico: Algunas consisten en el tratamiento directo de las sales del haluro con ácidos de Lewis y otras son reacciones de metátesis aniónica. Por su parte, el tratamiento con ácidos de Lewis, se basa en la reacción de haluros de sales cuaternarias con ácidos de Lewis (MX_n), lo que conduce a la formación de diferentes especies aniónicas, según las proporciones entre ambos reactivos. Por la sensibilidad al agua de los reactivos y del IL, la reacción debe llevarse a cabo en ausencia de trazas de agua. Mientras que las reacciones de metátesis, son las más utilizadas para preparar ILs

inmiscibles en agua. Se basa en preparar una solución acuosa de la sal de haluro del catión, se añade el anión en su forma ácida o como sal alcalina, y se presenta la reacción de intercambio aniónico. Cuando se utiliza como fuente del anión la forma ácida del mismo, la reacción se ve favorecida, liberándose al medio HCl, HBr, o HI que puede ser eliminado mediante lavados con agua. Cuando se utiliza la forma ácida como fuente del anión, el lavado de los ILs sintetizados debe continuar hasta la neutralización del agua de lavado, debido a que con el tiempo las trazas de ácido pueden causar la descomposición de los ILs. La elevada viscosidad de los ILs dificulta la purificación mediante lavado, se recomienda la disolución en CHCl_3 para disminuir la viscosidad de los mismos [12].

1.3.1.6 Aplicación de líquidos iónicos como agentes de extracción

La estabilidad térmica y volatilidad extremadamente baja de los ILs son de gran utilidad en el campo de las extracciones líquido-líquido. Las extracciones con ILs como solventes de extracción son más complejas que las realizadas con solventes orgánicos moleculares. Los mecanismos de partición y de intercambio iónico juegan un papel importante en el proceso de extracción con ILs. De hecho, estos dos procesos en general operan juntos para ampliar las aplicaciones y la selectividad de los ILs en la extracción de metales [14].

En general, se cree que el mecanismo de partición que produce la transferencia de los analitos desde la fase acuosa a la fase del IL es similar a la que ocurre en los solventes orgánicos tradicionales. Aunque la extracción de iones metálicos en sistemas bifásicos acuosos/IL a menudo indica una mayor selectividad y eficiencia de extracción que la observada con solventes orgánicos tradicionales, la partición de iones metálicos depende de la naturaleza del IL, del ion metálico y el ligando.

Con el fin de mejorar la afinidad de los iones metálicos por la fase de IL, se utilizan dos estrategias diferentes: el uso de ILs como solventes de extracción en combinación con

reactivos quelantes y el uso de ILs como reactivos complejantes, que han permitido la extracción de metales y el desarrollo de metodologías de preconcentración [15].

1.3.2 Generalidades de líquidos iónicos magnéticos

1.3.2.1 Introducción a los líquidos iónicos magnéticos

Uno de los principales desafíos de la Ciencia de los Materiales es el diseño de nuevos compuestos, así como entender y conocer sus propiedades fisicoquímicas debidas a su composición y estructura. Los sistemas híbridos orgánicos-inorgánicos no solo representan una alternativa creativa para diseñar nuevos materiales con interés básico, sino que sus propiedades fisicoquímicas avanzadas permiten el desarrollo de numerosas aplicaciones. Esto ha llevado en la actualidad a que estos sistemas jueguen un papel importante en el desarrollo de nuevos materiales funcionales, pudiendo combinar las propiedades intrínsecas de ambos componentes.

Los ILs son una clase de este tipo de materiales, los cuales han sido el centro de estudio en las últimas décadas por sus propiedades únicas. Dentro de los ILs, una nueva subclase son los líquidos iónicos magnéticos (MILs) [16]. La investigación en estos materiales ha evolucionado exponencialmente en la última década debido a que estos compuestos pueden modificar sus propiedades fisicoquímicas con campos magnéticos externos y/o pueden ser utilizados en estado líquido como ferrofluidos libres de nanopartículas. Además, pueden combinar las propiedades de los ILs (tales como la estabilidad térmica y presión de vapor insignificante) con otras intrínsecas adicionales formando materiales termocrómicos, magnetocrómicos o luminiscentes en función del ion magnético utilizado [17].

1.3.2.2 Historia y uso de los líquidos iónicos magnéticos

En el año 2004, se observó por primera vez que un IL basado en un anión de hierro (FeCl_4^-) y un catión imidazolio (1-butil-3-metilimidazolio), presentaba una respuesta magnética frente a un imán de neodimio de 0,55 T a temperatura ambiente. A partir de este descubrimiento se realizaron diversos estudios técnico-aplicados de notable relevancia científica [18].

Los primeros MILs desarrollados estaban principalmente basados en cationes de Fe(III) d^5 de alto espín, en la forma de tetracloro o tetrabromoferrato(III), combinados con diferentes cationes orgánicos como alquilimidazolio, tetraalquilamonio o tetraalquifosfonio. En la actualidad, el desarrollo de estos MILs ha llevado a combinar diferentes iones de metales de transición (como Co y Mn), tierras raras (como Dy, Gd y Nd) o cationes quirales como aminoácidos. La síntesis, estudio y aplicación de estos nuevos materiales ha ido creciendo de manera exponencial en los últimos años [16].

En lo que se refiere a las aplicaciones tecnológicas de los MILs, se ha demostrado que estos materiales, al presentar una notable respuesta a campos magnéticos externos, pueden ser utilizados para el transporte y separación de materiales, como absorbente de emisiones del benceno, para procesos de catálisis, como extractante de sulfuros en gasolinas, para reacciones de polimerización, para absorción de gases con efecto invernadero (CO_2 y SO_2), o como nuevos materiales magnéticos aplicados [19]. A su vez, diferentes MILs han comenzado a utilizarse como agentes extractantes de compuestos orgánicos y biomoléculas. Sin embargo, en la actualidad es aun escasa su aplicación para extracción de iones metálicos en desarrollos analíticos [20].

1.3.2.3 Síntesis de líquidos iónicos magnéticos

La síntesis de MILs se ha basado en la utilización de ILs convencionales previamente sintetizados u obtenidos comercialmente, los cuales sufren una reacción de

intercambio iónico, donde básicamente el anión del IL convencional es sustituido por un anión con propiedades magnéticas, el cual está conformado por un ion metálico de transición (como Co, Fe y Mn) o una tierra rara (como Dy y Gd). A su vez, existen reportados en la literatura MILs donde el catión es el que aporta las propiedades magnéticas, sin embargo, han sido menos estudiados [19].

El procedimiento de síntesis simplemente consta de la dilución de un IL convencional en un solvente orgánico (como cloroformo o metanol), lo que permite disminuir la viscosidad del IL y favorece su posterior mezcla con dilución en medio acuoso o ácido de la sal (halogenada o cianurada), que contenga el ion metálico en cantidades estequiométricas. Dicho medio de reacción, es mantenido en constante agitación a lo largo de varias horas, con el fin de permitir la reacción de intercambio iónico con un rendimiento elevado. Posteriormente, se retira de la mezcla de síntesis la fase acuosa y se procede a progresivos lavados con agua ultrapura con el fin de eliminar el exceso de sales disueltas. La fase de MIL sintetizada es sometida luego a alguna estrategia que permita eliminar el solvente orgánico utilizado en la síntesis, como por ejemplo un evaporador rotatorio, y finalmente el MIL es secado por calentamiento gradual para eliminar vestigios de solución acuosa o solvente orgánico [21]. En la Fig. 1.3.4, se pueden observar ejemplos típicos de síntesis de MILs.

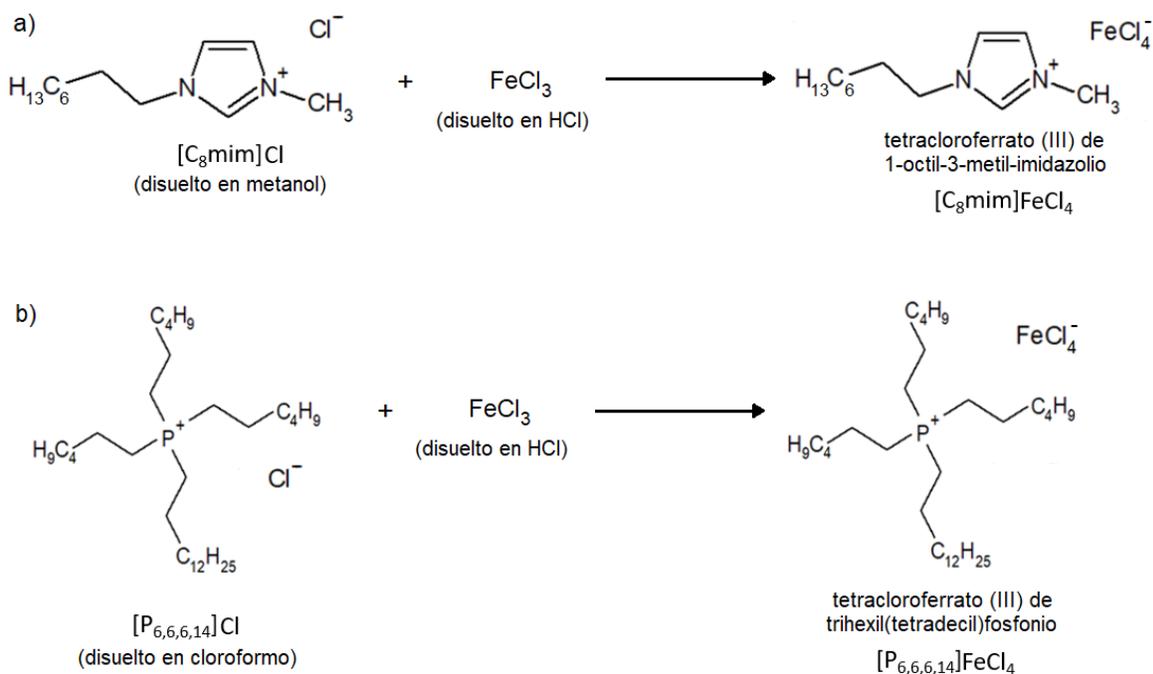


Fig. 1.3.4 Ejemplos de síntesis de MILs con anión tetracloroferrato (III). (a) 1-octil-3-metil-imidazolio y (b) trihexil(tetradecil)fosfonio.

1.3.2.4 Caracterización de líquidos iónicos magnéticos

Una vez sintetizados los MILs, se procede a la caracterización de los mismos, desde un punto de vista fisicoquímico, estructural y magnético.

- Caracterización fisicoquímica

Entre diversas técnicas, es utilizado el análisis químico elemental, que permite obtener el contenido de hidrógeno, carbono, nitrógeno y otros elementos en las muestras. Por otro lado, se ha utilizado la espectroscopia óptica atómica, que permite mediante un proceso de atomización, la conversión de las muestras de MILs en iones gaseosos de los cuales se puede obtener la proporción de un determinado átomo en el compuesto.

Técnicas vibracionales, como espectroscopias Raman e Infrarrojas (IR), permiten identificar los modos de vibración de los aniones y cationes que componen la muestra. Con ello se consigue caracterizar los grupos funcionales específicos [22]. En el caso de los

cationes imidazolio y fosfonio aparece un amplio espectro de modos en la zona de altas energías (cercano a los 3000 cm^{-1}) relacionado con vibraciones C-H de los radicales alquilo, como puede observarse en la Fig. 1.3.5.

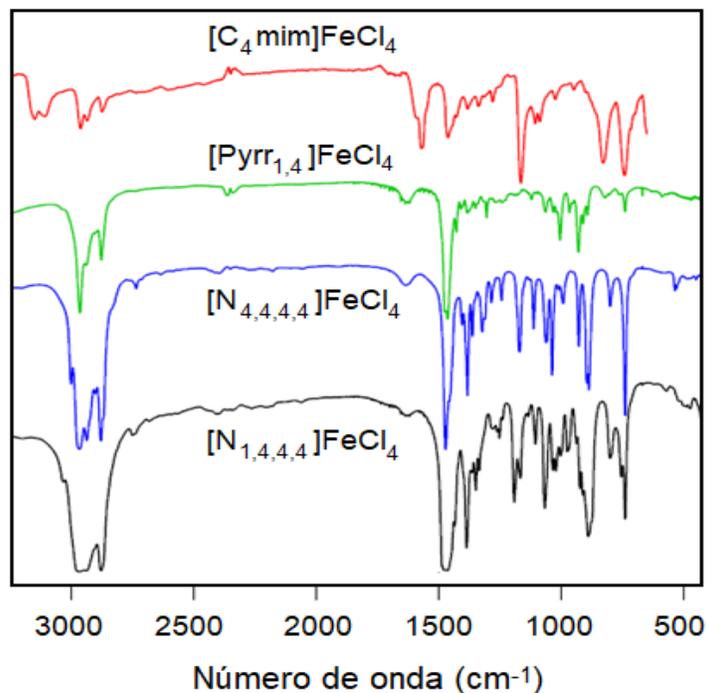


Fig. 1.3.5 Ejemplos de espectros IR de MILs con anión tetracloroferrato (III).

Las vibraciones metal-halógeno son más fuertes, por lo que el anión puede caracterizarse someramente, como en el caso del anión FeCl_4^- . Este anión, debido a su simetría tetragonal, presenta 4 bandas bien definidas activas en un rango de energías entre 100 y 400 cm^{-1} .

- Caracterización estructural

La determinación de la estructura cristalina es fundamental para poder entender las interacciones intermoleculares y las propiedades fisicoquímicas de los compuestos. Para dicho fin, es utilizada la difracción de rayos X, técnica que, si bien permite el estudio cristalográfico de un material, presenta como desventaja la imposibilidad de localizar los

hidrógenos y puede resultar complicado diferenciar átomos próximos en la tabla periódica, debido a que los rayos X son difractados por los electrones de los átomos.

Esto es sobrellevado con la utilización complementaria de la difracción de neutrones, la cual permite localizar los átomos de hidrógeno e inclusive la diferenciación entre isótopos de elementos. Otra ventaja, es que los espines de neutrones interactúan con los momentos magnéticos del material, dando lugar a scattering magnético. Si los materiales poseen orden magnético de largo alcance, el scattering magnético da lugar a picos de difracción que pueden superponerse a los ya existentes o aparecer en nuevas posiciones angulares, dependiendo del tipo de ordenamiento magnético. Es decir, la difracción de neutrones permite obtener la estructura magnética del material [23].

- Caracterización magnética

La magnetometría consiste en una serie de técnicas que permiten llevar a cabo medidas de susceptibilidad magnética e imantación, obteniendo el comportamiento magnético de un material en función de la temperatura o campo magnético. Un proceso típico de medida es el ciclo “zero field cooling-field cooling” (ZFC-FC) que consiste en observar la diferencia de la respuesta magnética al calentar un material en presencia de un campo magnético cuando previamente se ha enfriado con campo (FC) o sin campo magnético (ZFC). El resultado de este proceso nos da una idea del carácter ferromagnético de la muestra, dado que, si ésta presenta ferromagnetismo o ferrimagnetismo, habrá una diferencia en las curvas de susceptibilidad asociadas a la presencia de dominios magnéticos [24].

Otra técnica común es medir la imantación en función del campo magnético a una temperatura constante, lo que permite conocer si el compuesto es ferromagnético al aparecer una irreversibilidad en la curva de imantación, que da lugar a la aparición de un campo coercitivo. A partir de un ajuste de la ley de Curie-Weiss en la zona paramagnética, se puede obtener el momento paramagnético efectivo (μ_{eff}) que presentan los aniones

magnéticos y la temperatura de Curie paramagnética (θ_p) que nos da idea de si las interacciones son de tipo ferro o antiferromagnética [21].

Por otro lado, el estudio del calor específico es una propiedad que da información interesante sobre los comportamientos magnéticos, debido a que permite caracterizar el estado de oxidación del anión metálico. Adicionalmente, la espectroscopía Mössbauer es una técnica que se basa en la emisión y absorción resonante de rayos gamma libres de retroceso de los átomos de un compuesto. Presenta una resolución muy fina de energía pudiendo caracterizar el entorno nuclear de los átomos [25]. En el caso del Fe(III) magnéticamente ordenado, el espectro muestra 6 picos característicos. Cualquier variación, ya sea impurezas magnéticas o desorden de los átomos de Fe, repercuten en el espectro final como contribuciones extra. Esto implica que ajustando el conjunto de picos se puede obtener la concentración de cada estado de oxidación de la muestra.

1.3.2.5 Propiedades críticas de los MILs en extracciones analíticas

Los primeros MILs utilizados como agentes extractantes fueron del tipo imidazolio con aniones tetracloro o tetrabromoferrato (III). Sin embargo, causaron algunos problemas en las extracciones analíticas debido a su hidrólisis en soluciones de muestras acuosas. Posteriormente, se desarrolló el estudio de MILs basados en metales de transición que estuviesen menos sujetos a hidrólisis (Co, Dy, Gd y Mn), manteniendo excelentes propiedades magnéticas.

La susceptibilidad magnética, hidrofobicidad, estabilidad térmica y viscosidad se consideran algunas de las características críticas de los MIL para sus aplicaciones en química analítica como agentes de extracción [16].

- Susceptibilidad magnética: El MIL debe tener suficiente susceptibilidad magnética para que pueda atraerse fácilmente con la aplicación de un campo magnético externo. Esto puede proporcionar la separación de fases deseada después de la extracción. Las

susceptibilidades magnéticas de los MILs pueden variar según las variaciones estructurales en el diseño del MIL, como la naturaleza del metal en el componente aniónico o catiónico, la longitud de los grupos alquilo en los cationes, el propio catión y la naturaleza de los aniones libres de metal [19].

• Hidrofobicidad: Los MILs inicialmente sintetizados eran de naturaleza hidrofílica debido a la inestabilidad hidrolítica del anión paramagnético. Al ser miscibles en agua, no podían retener la propiedad magnética y, por lo tanto, no podían recuperarse utilizando un campo magnético externo, principalmente cuando el volumen de la fase de extracción era mínimo, como en las microextracciones. Sin embargo, tales MILs pueden ser una buena opción para los medios no acuosos y probablemente esta es la razón por la cual las aplicaciones iniciales de los solventes de extracción basados en MILs se enfocaron en medios no acuosos. Como la mayoría de las extracciones se realizan en muestras acuosas, los nuevos estudios se centraron en la síntesis de MILs hidrofóbicos y su aplicación para la extracción de analitos en medios acuosos [26]. Entre las diversas estrategias que se han utilizado para impartir la hidrofobicidad en los MILs, nos encontramos con:

- (a) Uso de largas cadenas de alquilo en el catión.
- (b) Incorporación de aniones débilmente coordinantes y relativamente hidrófobos.
- (c) Emparejar un catión con anión tensioactivo y otro catión con anión paramagnético en un sistema dicatiónico, o bien, un catión con un anión hidrófobo libre de metal y otro catión con un anión paramagnético.
- (d) Manipulación del componente aniónico para impartir tanto carácter paramagnético como hidrofobicidad. Por ejemplo, el uso de aniones hexafluoroacetilacetato como ligandos para centros metálicos paramagnéticos en MILs.
- (e) Introducir un componente paramagnético en el catión y seleccionar un anión relativamente hidrófobo.

- Viscosidad: Puede afectar la cinética de extracción y la facilidad de separación de fases. Por lo tanto, las estrategias de síntesis deben buscar no solo el desarrollo de MILs hidrofóbicos, sino que también presenten viscosidades relativamente bajas que permitan el fácil manejo en sistemas acuosos.
- Estabilidad térmica: Es un factor esencial en las aplicaciones de extracción cuando se requiere calor en el proceso. Por ejemplo, en la dispersión de MILs asistida por temperatura en la solución de muestra, donde el MIL debería ser capaz de resistir la temperatura seleccionada. Aunque tales temperaturas de dispersión no son tan altas como se requieren para el espacio de cabeza o la desorción térmica de los analitos en los sistemas de cromatografía gaseosa, tanto el instrumento de detección como el modo de inyección deben tenerse en cuenta al diseñar el MIL para aplicaciones de extracción. Para algunos MILs, se ha informado una estabilidad térmica razonablemente alta [16].

1.3.2.6 Ventajas de MILs como agentes extractantes

En los últimos años ha crecido exponencialmente la utilización de ILs convencionales como agentes de extracción en reemplazo de compuestos orgánicos volátiles (COVs) debido a sus características únicas, como presión de vapor indetectable [15]. Sin embargo, la mayoría de los métodos de microextracción reportados en la literatura requieren la separación de la fase de extracción por centrifugación y su vez, se requieren ILs con mayor densidad que el agua para una separación eficiente de la fase de extracción y los analitos, lo que consume mucho tiempo. Es por este motivo, que hace unos años se comenzó a utilizar magnetita (Fe_3O_4) como aditivo de la fase de IL para conferirle magnetismo a la fase de extracción, poder separar la fase por la acción de un imán y evitar de esta manera el paso de centrifugación. Sin embargo, esto complejizaba el procedimiento de extracción al requerir de un reactivo adicional y el requerimiento de un procedimiento

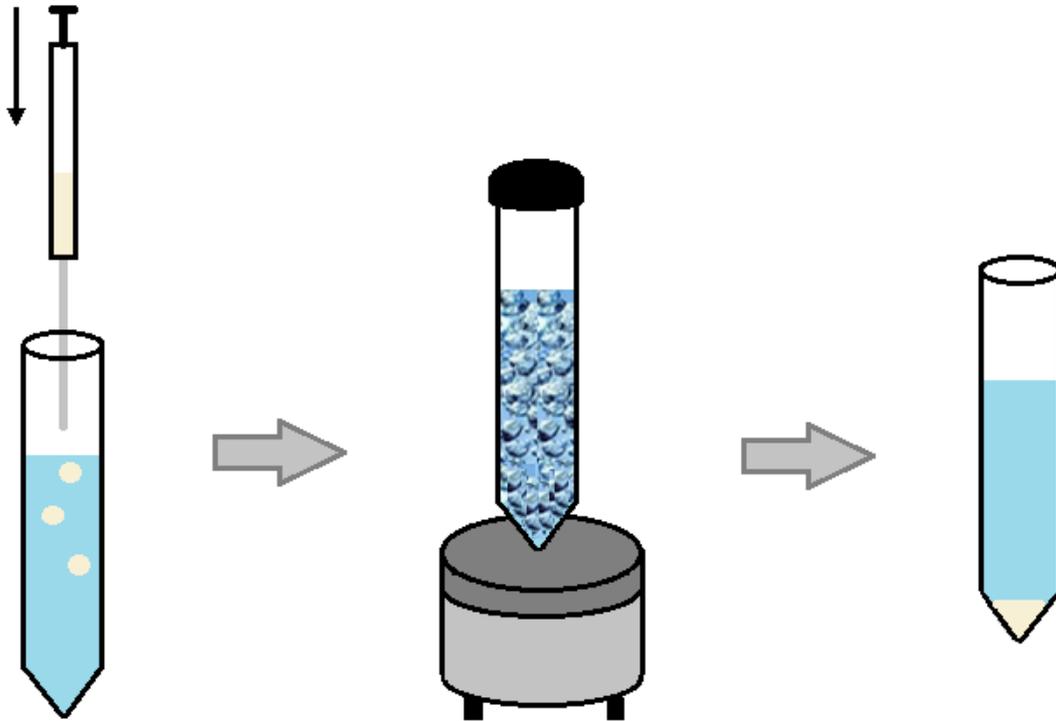
posterior de desorción del IL, debido a que la magnetita interfería en las técnicas de detección posteriores [16].

Por estos inconvenientes planteados por parte de los ILs convencionales y el uso de magnetita, es que adquirieron mayor aplicabilidad los MILs, ya que reúnen las bondades de ambos componentes, es decir, permiten la extracción práctica de los analitos sin importar la densidad de la fase de extracción, pueden ser separados mediante la atracción de un imán y no requieren el agregado de otros componentes a la fase extractante. Es por esto, que al día de hoy van creciendo sustancialmente las metodologías de extracción utilizando MILs en reemplazo de ILs convencionales sin el requerimiento de magnetita [27]. En la Fig. 1.3.6, se pueden observar algunas características y ventajas de los MILs que han fomentado su aplicación en metodologías de extracción.



Fig. 1.3.6 Características y ventajas de MILs en metodologías de extracción.

1.4 Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva

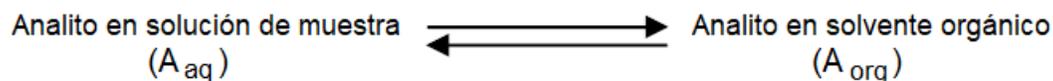


1.4.1 Introducción a Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva

1.4.1.1 Principios de la Extracción Líquido-Líquido

La extracción líquido-líquido (LLE) es una de las técnicas clásicas más utilizadas para la extracción de analitos en muestras acuosas. Esta técnica se emplea desde principios del siglo XIX, sin embargo, todavía es utilizada debido a la simplicidad de su instrumentación y a su amplia aplicabilidad. Esta técnica permite llevar a cabo extracciones rápidas tanto para la separación de vestigios como de macrocomponentes. Sus objetivos fundamentales son la separación de un analito o un grupo de compuestos de interés, de las posibles interferencias presentes en la matriz y la preconcentración de los mismos antes de su medida, aumentando así la sensibilidad [1].

El fundamento de esta técnica se basa en la diferente distribución o reparto de los constituyentes de la muestra entre dos fases inmiscibles. En la mayoría de los casos una de las fases es un medio acuoso y la otra un solvente orgánico, por lo que frecuentemente se denomina a esta técnica como “extracción con solvente orgánico” o simplemente, “extracción con solvente”. El procedimiento experimental en LLE consiste en hacer que la muestra líquida entre en contacto íntimo con un solvente adecuado, período durante el cual se agitan las fases, y luego se dejan reposar produciéndose así la separación de ambas [2]. Durante la agitación y contacto de ambas fases el analito se distribuye entre las mismas hasta alcanzar el equilibrio:



El cual posee una determinada constante de equilibrio conocida como coeficiente de partición:

$$K = \frac{C_{\text{org}}}{C_{\text{aq}}} \quad \text{donde } C_{\text{org}} \text{ es la concentración del analito en la fase orgánica y } C_{\text{aq}} \text{ en la fase acuosa}$$

Cuanto mayor sea el valor del coeficiente de partición más desplazado estará el equilibrio hacia la derecha y, por tanto, aumentará la eficiencia de la extracción. Lógicamente, el coeficiente de partición va a ser diferente para cada analito y para cada par de solventes. Si un analito presenta una baja solubilidad en agua indica que su extracción desde una muestra acuosa a un solvente orgánico apolar esta favorecida. Por tanto, a la hora de desarrollar un método de LLE, y en general cualquier método de extracción de compuestos orgánicos, organometálicos, etc., se debe disponer de una idea inicial de la polaridad de los analitos. Actualmente existen valores tabulados de los coeficientes de partición octanol-agua de gran cantidad de compuestos orgánicos. Si el valor del coeficiente de partición es grande nos indica que el analito presenta una tendencia a concentrarse en la fase orgánica y, nos proveerá una idea preliminar sobre la metodología a seguir [3].

La selectividad y eficiencia del proceso de extracción dependen principalmente de la elección de los dos solventes inmiscibles, pero también de otros factores que pueden afectar al equilibrio, como son el pH, adición de un agente complejante, utilización de un reactivo formador de pares iónicos o modificación de la fuerza iónica mediante adición de sales, entre otros. Cuando se utiliza una fase acuosa y un solvente orgánico, los analitos más polares quedarán preferentemente en la fase acuosa y los más apolares pasarán al solvente orgánico.

La gran cantidad de variables que es posible modificar, tales como la amplia variedad de solventes disponibles y sus mezclas, modificaciones de pH, etc., hace de la LLE una técnica muy útil y versátil. Sin embargo, la formación de emulsiones, el manejo de volúmenes grandes de muestra y solventes, el empleo de solventes tóxicos e inflamables, así como los riesgos de pérdidas o contaminación durante las distintas etapas, hacen de ella una técnica cara, lenta, tediosa y de baja sustentabilidad ambiental. Es por ello que, en los últimos años, la LLE clásica ha sido gradualmente desplazada por técnicas de extracción miniaturizadas, evitando de este modo, todos o al menos la mayor parte de los inconvenientes mencionados anteriormente [4].

La miniaturización se ha desarrollado fundamentalmente mediante dos estrategias, la reducción de las dimensiones de la técnica tradicional a escala de microvolúmenes de solventes y el desarrollo de nuevas modalidades de extracción. Las técnicas de microextracción líquido-líquido (LLME) han adquirido una creciente popularidad debido a que los volúmenes de solventes orgánicos empleados son muy pequeños. Los avances han sido focalizados en la minimización del consumo de muestras y reactivos. Esto trae aparejado la reducción del costo de análisis manteniendo alta selectividad y recuperación, como también acelerar el proceso de tratamiento de las muestras. Estos avances se ven reflejados en el surgimiento de nuevas técnicas de miniaturización, tales como la

microextracción en gota (SDME), microextracción en fibra hueca (HF-LPME) y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) [5].

1.4.1.2 Fundamento de DLLME

La microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) se ha presentado como una alternativa a las técnicas de microextracción en fase líquida que requieren de un gran periodo de tiempo para alcanzar el equilibrio y que además no presenta el inconveniente de la inestabilidad de la gota en SDME. La DLLME se basa en la dispersión de un disolvente (extractante) en una muestra acuosa, mediante la ayuda de un segundo disolvente (dispersante). Esto se lleva a cabo con el objetivo de aumentar la superficie de contacto entre extractante y analitos, alcanzando el equilibrio casi de forma instantánea [6]. El proceso de extracción se realiza siguiendo dos pasos:

- a) La mezcla de disolventes (extractante y dispersante) se inyecta rápidamente en la solución de muestra. El extractante se dispersa en la muestra en forma de microgotas, generando una gran superficie de contacto.
- b) Seguidamente, se separan las fases mediante alguna estrategia (como filtración, centrifugación, etc.) y se recoge el disolvente usado como extractante para su análisis por una técnica instrumental adecuada [7].

El proceso extractivo se ve influenciado por factores como el volumen de muestra y de disolventes, el pH o la fuerza iónica, entre otros. La selección de los disolventes es un paso crucial que se realiza en función de varios requisitos. Por un lado, el dispersante debe de ser miscible con la matriz de la muestra líquida, que generalmente es acuosa, siendo los disolventes más empleados la acetona, el acetonitrilo y el metanol. Por otro lado, el extractante debe de ser capaz de extraer a los analitos y de ser soluble en el dispersante, pero insoluble o poco soluble en la matriz de la muestra. Además, su densidad debe de ser muy diferente a la de la matriz de la muestra para que las dos fases puedan ser separadas.

Los disolventes que han sido más empleados como extractantes han sido disolventes clorados de carácter muy tóxico (como cloroformo y diclorometano), que permitían la extracción de analitos apolares [8].

1.4.1.3 Líquidos iónicos convencionales en DLLME

Debido a la preocupación que origina el empleo de disolventes tóxicos, se comenzaron a emplear también disolventes de menor toxicidad como alcoholes de cadena larga o hidrocarburos. El empleo de estos disolventes, que a diferencia de los clorados poseen una menor densidad que el agua, permitían luego de la centrifugación, poder recoger el extractante flotando en la muestra o bien, si éste tiene una temperatura de fusión menor que la del agua, se podían congelar y retirar fácilmente una vez que hayan solidificado. Algunos de los disolventes que se utilizaban en esta última modalidad eran el undecanol, dodecanol y hexadecano [9].

Posteriormente, se introdujo el empleo de ILs como extractantes seguros y respetuosos con el medio ambiente. Desde entonces, han sido reportados un creciente número de investigaciones en base al uso de ILs en separaciones líquido-líquido, como una alternativa al empleo de los tradicionales solventes orgánicos volátiles (COVs) [10].

Los ILs pueden también ser diseñados combinando diferentes aniones y cationes para realizar extracciones específicas de los analitos desde diferentes medios. Asimismo, a los ILs se les pueden incorporar grupos funcionales para la extracción selectiva de un analito. Consecuentemente, son considerados una potencial alternativa a los COVs, los cuales contribuyen significativamente a la contaminación ambiental. Los ILs no solo pueden ser aplicados sobre metodologías de microextracciones líquidas existentes para mejorar la sensibilidad y selectividad analítica, sino que también ofrecen soluciones originales a desafíos analíticos basados en su singular comportamiento químico y sus propiedades [11]. En la Fig. 1.4.1 se puede observar un esquema de una DLLME basada en un IL (IL-DLLME).

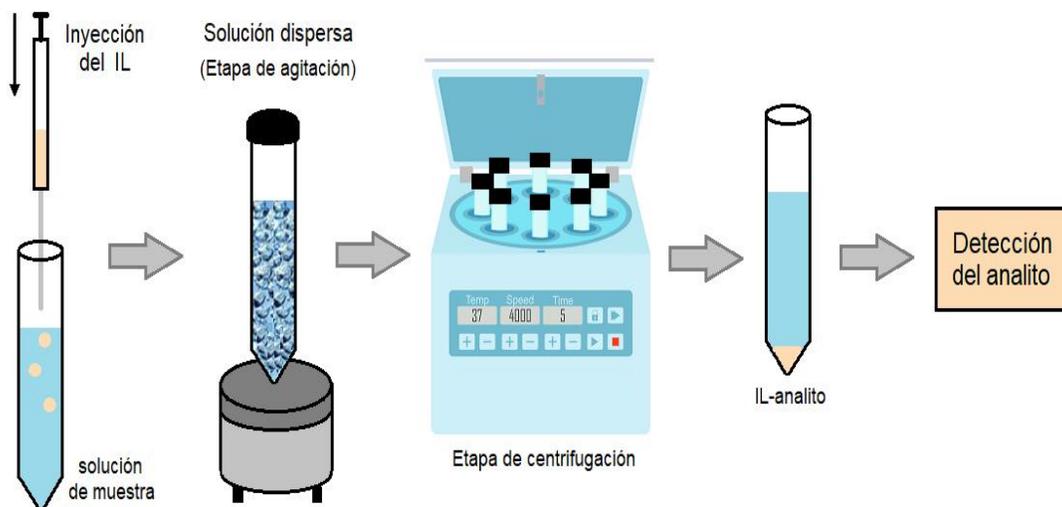


Fig. 1.4.1 Esquema de IL-DLLME.

1.4.1.4 Líquidos iónicos magnéticos en DLLME

Hoy en día, el uso combinado de nanopartículas magnéticas y ILs se ha convertido en un área novedosa en métodos de microextracción. Sin embargo, el desarrollo de MILs ha ido reemplazando esta estrategia. Los MILs proporcionan una excelente respuesta a un campo magnético externo y han atraído el interés como solventes de extracción efectivos para tomar el lugar de los solventes de extracción no magnéticos de rutina en DLLME. Las publicaciones que describen la recuperación magnética de MILs en procedimientos de microextracción son al día de hoy relativamente escasos [12].

A diferencia de DLLME basado en ILs convencionales, no se requiere centrifugación para extraer los analitos y separar la fase de extracción de la fase acuosa. A su vez, no requieren la utilización de nanopartículas magnéticas, como la magnetita, para conferir el magnetismo, sino que es proporcionada por iones complejos de metales [13]. En la Fig. 1.4.2 se puede observar un esquema de una DLLME basada en un MIL (MIL-DLLME).

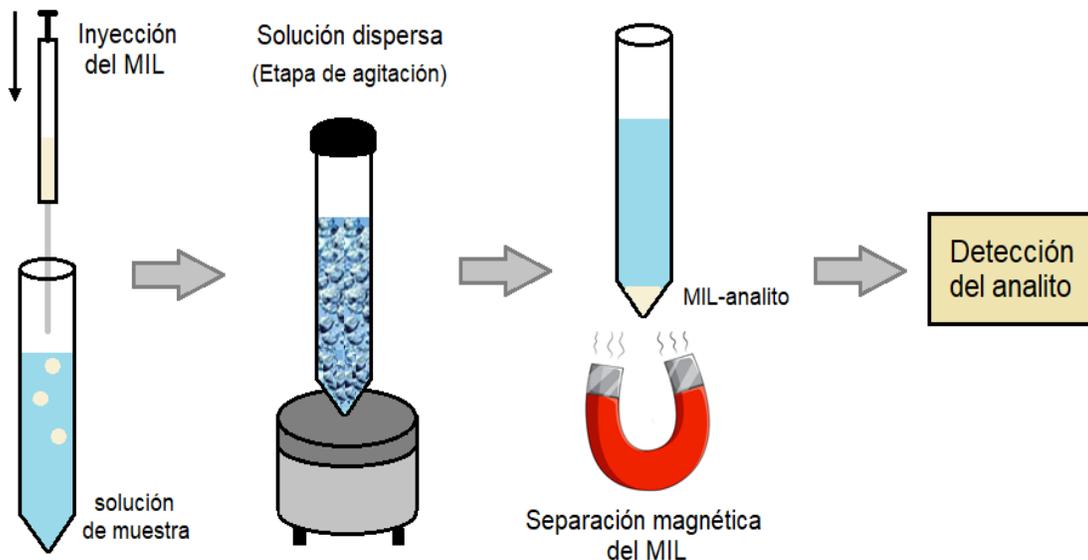


Fig. 1.4.2 Esquema de MIL-DLLME.

La mayoría de los enfoques de extracción basados en MILs se han realizado con la utilización de DLLME. Para extender la aplicación de MILs en medios acuosos, fueron deseables los MILs hidrofóbicos. Las diversas estrategias que se pueden adaptar para inducir el carácter hidrófobo en los MILs incluyen:

- Uso de cationes orgánicos a base de cadena alifática larga. Por ejemplo, MILs a base de amonio y fosfonio con largas cadenas de alquilo y anión FeCl_4^- .
- La sustitución del anión FeCl_4^- susceptible a hidrólisis con otros aniones basados en metales de transición. Una alternativa del anión FeCl_4^- también es necesaria cuando la detección final se lleva a cabo con un detector UV ya que absorbe sustancialmente en esta región. Para superar los problemas asociados con el anión FeCl_4^- , se ha empleado mayoritariamente MILs con MnCl_4^{2-} [14].

Algunas otras dificultades que pueden surgir con el uso de MIL en los procedimientos estándar de DLLME están relacionados con la formación de la gota en la punta de la pipeta, lo que afecta la eficiencia del método DLLME con respecto a la precisión. De esta manera, la adición directa de una cantidad exacta de MIL en la solución de muestra

es bastante tediosa porque debido a la alta viscosidad, el tamaño de la gota de formación no puede controlarse adecuadamente en la punta de la pipeta. Una solución que se ha presentado para resolver este problema es mezclar MILs con un soporte sólido adecuado. De esta manera, se puede pesar una cantidad exacta de mezcla. Además, permite una fácil dispersión y recuperación del MIL de la solución después de la extracción. La selección del soporte sólido debe basarse en consideraciones específicas. Idealmente, debería permitir la adsorción física del MIL en lugar de interacciones químicas y debería separarse fácilmente del MIL tras la dispersión. Además, el soporte sólido en sí mismo no debería adsorber los analitos objetivo [15].

DLLME in situ es otra versión del clásico DLLME que emplea ILs como solventes de extracción. En esta metodología, un IL soluble en agua se mezcla con un reactivo de intercambio aniónico en la solución de muestra, que se somete a una reacción de metátesis in situ para formar un IL inmiscible en agua que actúa como disolvente de extracción. Como resultado, generalmente se pueden lograr factores de preconcentración más altos en contraste con el clásico DLLME. Esta estrategia ha sido recientemente propuesta además para MILs, en donde son aprovechadas sus características magnéticas [16].

1.4.2 Parámetros que caracterizan a los métodos de preconcentración

• **Factor de enriquecimiento (EF):** Es un criterio utilizado muy a menudo para la evaluación de los sistemas de preconcentración. Aunque es utilizado frecuentemente, su significado preciso no está bien definido. Teóricamente, el término está dado por la relación entre la concentración del analito en la solución luego del proceso de preconcentración (C_e) y la concentración del mismo en la muestra original (C_s).

$$EF = \frac{C_e}{C_s}$$

En la práctica, la evaluación del EF no es tan simple como parece, debido a que la concentración del analito en la solución usualmente es desconocida. Por lo tanto, comúnmente se acepta una aproximación del EF definida como la relación entre las dos pendientes de las curvas de calibración antes y después de la preconcentración. La evaluación se realiza entonces en función de la respuesta del detector y no sobre el incremento de concentraciones. Esta definición será válida cuando las condiciones de respuesta del detector se mantengan constantes para las dos curvas de calibración [17].

• **Factor de refuerzo:** En los sistemas de preconcentración, a veces las señales del analito pueden mejorar durante la introducción del concentrado en el detector, lo cual ocurre a través de mecanismos que incrementan la concentración del analito. Por lo tanto, estos efectos de refuerzo deben diferenciarse de los efectos de enriquecimiento, de manera de lograr una evaluación certera del rendimiento de la preconcentración. Así, el factor de refuerzo (N_t), se expresa como el producto de todos los diferentes factores de refuerzo de la sensibilidad independientes entre sí, por el valor del factor de enriquecimiento (EF):

$$N_t = N_1 \cdot N_2 \cdot \dots \cdot N_n \cdot EF$$

Debe destacarse que el valor de N no siempre es mayor a la unidad, puesto que algunas variaciones en las condiciones analíticas pueden tener efectos negativos sobre la sensibilidad [18].

• **Eficiencia de concentración:** El factor de enriquecimiento es indispensable para la evaluación de los sistemas de preconcentración, sin embargo, no provee información sobre la eficiencia del proceso analítico total. El factor de enriquecimiento no está asociado con una eficiencia elevada, ya que un gran factor de enriquecimiento puede ser alcanzado a expensas de largos períodos de tiempo, como horas o incluso días, consumiéndose un volumen importante de muestra. Por lo tanto, se ha sugerido el uso de la eficiencia de

concentración (CE) para la evaluación y comparación de la eficiencia de varios sistemas. CE está definida como el producto del factor de enriquecimiento y la frecuencia de muestreo dada en número de muestras analizadas por hora f:

$$CE = EF \cdot (f / 60)$$

Por lo tanto, la definición indica el factor de enriquecimiento alcanzado por un sistema en un minuto. Esto hace posible el uso de CE no sólo como un criterio para el diseño de los sistemas de preconcentración, también permite la comparación de las eficiencias de preconcentración con principios de separación diferentes [19].

• **Índice de consumo:** La eficiencia en el consumo de muestra es definida a través del índice de consumo como el volumen de muestra necesario para alcanzar un EF determinado:

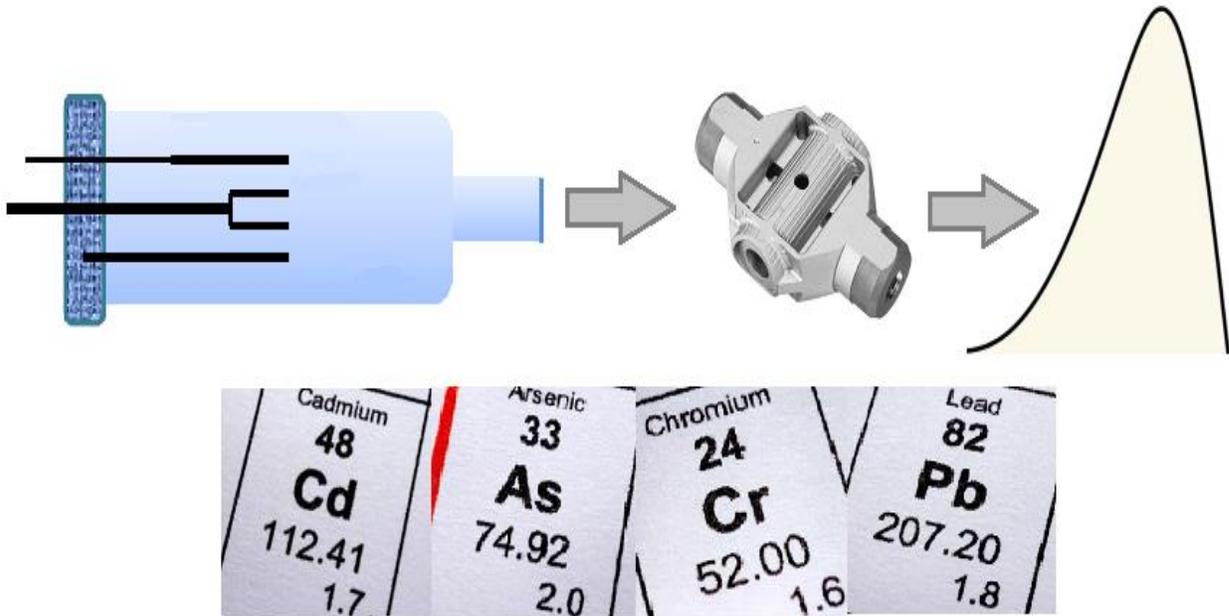
$$CI = \frac{V_s}{EF}$$

Donde V_s es el volumen de muestra requerido para alcanzar el EF. El índice de consumo es importante cuando la cantidad de muestra es limitada [17].

• **Factor de transferencia de fase:** La transferencia completa del analito desde la fase de muestra a la fase del concentrado, como la extracción con solvente, puede ser cuantificado por el factor de transferencia de fase (P), definido como la relación entre la masa del analito en la fase original (m_s), y la masa de analito en el concentrado (m_e) [18]:

$$P = \frac{m_e}{m_s}$$

1.5 Espectrometría de Absorción Atómica Electrotérmica



1.5.1 Generalidades de la Espectrometría Atómica

1.5.1.1 Reseña histórica

El primer registro documentado sobre una serie de luces de colores que se observaron en el suelo, y que provenían de la luz del Sol que cruzaba un vaso con agua puesto en la orilla de una ventana, fue descrito por Leonardo da Vinci en 1497. Pero fue Isaac Newton quien hizo una observación más minuciosa en 1666, al describir la luz del Sol, mientras esta era dispersada en sus diferentes colores al atravesar un prisma. Desarrolló el primer espectroscopio, un aparato con una abertura para permitir el paso de la luz sobre una lente, un prisma y una pantalla. Posteriormente, en 1760, el matemático y científico alemán Johann Heinrich Lambert publicó su “Ley de la absorción” [1].

En 1859 el físico alemán Gustav Robert Kirchoff y el químico Robert Wilhem Eberhard Von Bunsen ampliaron el conocimiento de la naturaleza de este fenómeno al hacer incidir, en un espectroscopio más elaborado, la luz colorida producida por un metal

en una llama. Así pudieron observar que cada metal emite radiación de diferente color y que presenta líneas que aparecen en diferentes posiciones en el campo de observación y esto únicamente depende del metal. Además, concluyeron que la intensidad de la línea está directamente relacionada a la concentración del elemento en solución. De esta manera, consiguieron una forma inequívoca de identificar un elemento (por la posición de las líneas), así como de estimar su concentración (por la intensidad de las líneas producidas). Gracias al desarrollo de este método, se pudo verificar cada vez que se anunciaba el descubrimiento de un elemento nuevo, la veracidad del hallazgo [2].

Las aplicaciones para esta nueva técnica fueron pronto observadas en Astronomía y en Química Analítica. El primer análisis cuantitativo basado en la técnica de emisión fue realizado por Champion, Pellet y Grenier en 1873. Asimismo, las redes de difracción fueron estudiadas por muchos científicos en el siglo XIX. En 1955, Walsh publicó los conceptos básicos de la espectrometría de absorción atómica (AAS) moderna, motivo por el cual se lo considera el año del nacimiento de la técnica. Al mismo tiempo, Alkemade y Milatz diseñaron un espectrómetro de absorción atómica en el cual la llama se empleó como fuente de radiación y atomización. Sin embargo, la fabricación comercial del instrumento de AAS no comenzó sino hasta diez años más tarde. Desde entonces, el desarrollo de AAS ha sido muy rápido y los instrumentos de este tipo se han tornado muy comunes en la mayoría de los laboratorios de todo el mundo. El posterior empleo de óxido nítrico como oxidante y la atomización electrotérmica han permitido y expandido significativamente la utilización de la AAS en diversos campos. Estas técnicas incrementaron el número de elementos a medir y disminuyeron los límites de detección [3].

1.5.1.2 Principios básicos de la AAS

La AAS se basa en la absorción de radiación electromagnética por parte de los átomos presentes en una muestra. En las técnicas de AAS, la muestra se descompone por energía térmica, dando lugar a la formación de átomos en fase gaseosa, incidiendo una radiación de longitud de onda característica a través del vapor atómico. Esta radiación es parcialmente absorbida por los átomos de ese elemento. La cantidad de luz que es absorbida por los átomos es determinada y permite cuantificar la concentración del elemento en la muestra [2].

El intervalo de longitudes de onda apto para trabajar en absorción atómica se presenta en la zona ultravioleta-visible del espectro electromagnético. Por debajo de 190 nm absorben los elementos no metálicos, por lo que no pueden determinarse mediante esta técnica. En AAS, los átomos emplean la energía recibida para excitar los electrones, con el objetivo de producir la transición de los mismos desde el estado basal de energía hacia niveles energéticamente superiores. La absorción selectiva a las diversas longitudes de onda origina el espectro de absorción característico de cada elemento. En esta técnica, se utiliza una fuente de radiación específica para cada elemento a determinar, midiéndose la disminución de intensidad de una línea analítica tras la interacción de la radiación de la fuente con la muestra. Al utilizar fuentes de radiación específicas para cada elemento, el número de interferencias espectrales es mucho menor que en las técnicas de emisión [4]. La AAS es el método más ampliamente utilizado para la determinación de elementos en muestras de variada composición, llegando a alcanzar su uso generalizado en el análisis rutinario. Constituye una técnica instrumental con sensibilidad adecuada para la determinación cuantitativa de más de 60 elementos en minerales, muestras biológicas, metalúrgicas, farmacéuticas, ambientales, alimentos, entre otras [5].

1.5.2 Instrumentación y funcionamiento de ETAAS

El funcionamiento del ETAAS clásico, es decir, con fuente de línea, es el siguiente:

- (a) La fuente de radiación (lámpara de cátodo hueco o lámpara de descarga sin electrodos), emite una línea aguda del espectro característico del analito.
- (b) El haz emitido desde la fuente de radiación es modulado.
- (c) La señal modulada pasa a través del vapor atómico donde los átomos del analito absorben radiación correspondiente a la línea de emisión de la fuente.
- (d) La línea espectral deseada (usualmente la línea de resonancia) es seleccionada por el monocromador.
- (e) La línea aislada del analito incide sobre el detector, donde la señal de luz es convertida en señal eléctrica.
- (f) La señal modulada es amplificada por un amplificador selectivo.
- (g) La señal es finalmente registrada por un dispositivo de lectura o a través del procesamiento de datos a una unidad digital o un graficador [6].

Los componentes básicos de un espectrómetro de absorción atómica se pueden observar en la Figura 1.5.1.

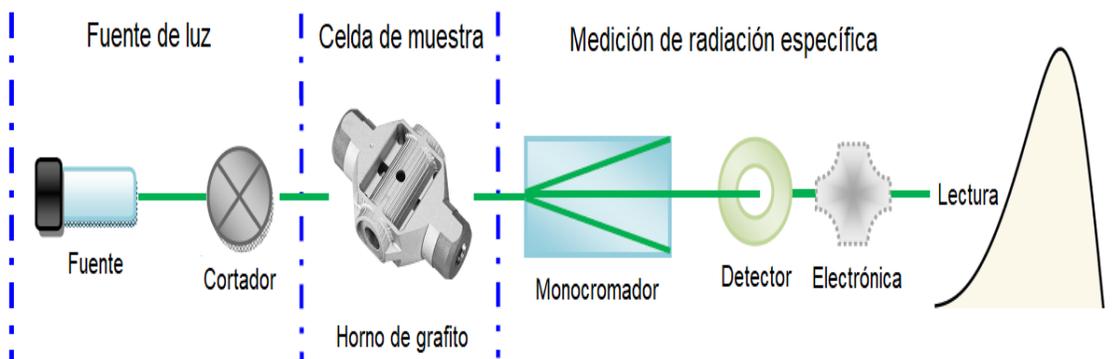


Fig. 1.5.1 Esquema de un espectrómetro de absorción atómica electrotermostático.

1.5.2.1 Fuentes de radiación

En AAS, se requiere una fuente de ancho de banda estrecha. Este requisito fue inicialmente la limitante en el desarrollo de las técnicas fundamentadas en absorción atómica, puesto que las lámparas empleadas eran de radiación continua y, aunque se seleccionaba un ancho de banda determinado con un monocromador, el ancho de banda de la línea de absorción atómica era tan estrecho ($0,02-0,05 \text{ \AA}$) que resultaba despreciable frente a la cantidad de luz total que llegaba al detector. Fue recién en 1955 cuando Walsh y Alkemade solucionaron el inconveniente, utilizando como fuente de excitación fuentes de líneas atómicas del mismo elemento que se iba a determinar. De esta manera, los átomos del elemento se excitan en la lámpara y emiten radiación a longitudes de onda características, las cuales son absorbidas por el analito proveniente de la muestra. A continuación, se comentarán los principales aspectos de las fuentes de excitación más comúnmente utilizadas en la actualidad [7].

- Lámpara de cátodo hueco

Como se observa en la Fig. 1.5.2, una lámpara de cátodo hueco consta de un ánodo, construido con un hilo de tungsteno, y un cátodo, fabricado con un material que posee el mismo elemento que se va a determinar en las muestras. Estos elementos se encuentran alojados en un cilindro de vidrio con gas inerte (argón o neón), a una presión de 1 a 5 torr. El cilindro posee una ventana de cuarzo, a través de la cual sale la radiación.

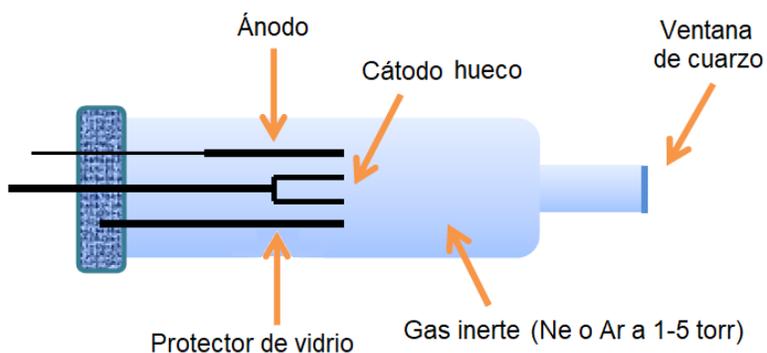


Fig. 1.5.2 Esquema de una lámpara de cátodo hueco.

Al aplicar un potencial de 300 V entre los electrodos, se produce la ionización del gas inerte, lo cual da lugar a una corriente comprendida entre 5 y 15 mA. Los cationes gaseosos adquieren la suficiente energía cinética como para arrancar algunos de los átomos metálicos presentes en la superficie del cátodo y, de esta manera, producir una nube atómica. Una parte de los átomos metálicos desprendidos se encuentran en estado excitado y cuando regresan al estado fundamental emiten su radiación característica. Finalmente, los átomos vuelven a depositarse en la superficie del cátodo o se condensan en las paredes de vidrio del tubo cilíndrico.

Las lámparas de cátodo hueco se fabrican para prácticamente todos los elementos que se pueden determinar por absorción atómica, lo cual puede estar disponible a través de lámparas individuales o multielementales. Además, necesitan poco tiempo de calentamiento, mientras que su tiempo de vida útil es de aproximadamente mil horas [2].

- Lámpara de descarga sin electrodos

La Figura 1.5.3 muestra un esquema de este tipo de lámparas, las cuales están constituidas por un tubo de cuarzo herméticamente cerrado, que contiene un gas inerte (argón o neón) a unos pocos torr y una pequeña cantidad del metal (o su sal) cuyo espectro se desea obtener. No posee electrodos y en su lugar para su activación se utiliza un campo intenso de radiofrecuencia o radiación de microondas. La corriente de radiofrecuencia fluye a través de una bobina y genera un campo magnético, el cual produce la ionización del gas inerte, originándose iones que son acelerados por la componente de radiofrecuencia del campo hasta que adquieren la suficiente energía para excitar a los átomos del metal cuyo espectro se desea obtener.

Las lámparas de descarga sin electrodos solamente se fabrican para elementos individuales y fácilmente vaporizables, tales como As, Hg, Pb, Sb, Sn, etc. Además, producen líneas de emisión de alta intensidad que proporcionan una mayor sensibilidad para estos elementos y requieren de un generador de radiofrecuencia. Este equipo

adicional y el mayor costo de las lámparas es una de las grandes desventajas de esta fuente de radiación. Por otro lado, presentan mayor durabilidad, así como una señal más intensa y estable [2].

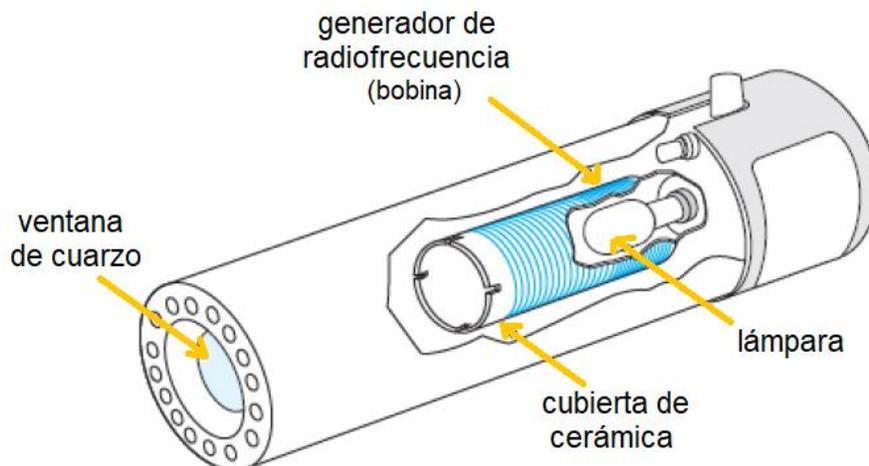


Fig. 1.5.3 Esquema de lámpara de descarga sin electrodos.

- Lámpara de emisión de espectro continuo de xenón

En la actualidad, el desarrollo de AAS de alta resolución con fuentes continuas, ha revolucionado el mercado, ya que es suficiente una sola fuente de radiación para todos los elementos y todas las longitudes de onda disponibles (Figura 1.5.4). De esta manera, se ha eliminado la elevada dependencia de la medición con lámparas de cátodo hueco, eliminando el tiempo de preparación que conllevaba el uso de las mismas (el largo tiempo de calentamiento de la fuente de radiación en los emisores de líneas convencionales, ya no es necesario pues la intensidad de radiación se normaliza simultáneamente).

La utilización de una lámpara de xenón utilizada como fuente de radiación posibilita toda la gama de longitudes de ondas relevante para la AAS (185-900 nm) en un solo paso con una densidad de radiación extremadamente alta. Estas lámparas operan en un modo de "punto caliente" con una temperatura de alrededor de 10.000 K, posibilitando una intensidad de radiación mucho mayor que las fuentes lineales, sobre todo en el ultravioleta lejano. Estas fuentes continuas poseen ventajas como: una sola fuente es suficiente para

todos los elementos, análisis de rutina secuenciales multielementales, corrección de fondo simultánea, permite analizar numerosas muestras por hora, rápida preparación para la medición, fácil de operar, elevada robustez y mejoramiento del rendimiento analítico (los límites de detección obtenidos son generalmente cinco veces mejores con respecto a AAS con fuente lineal) [8].

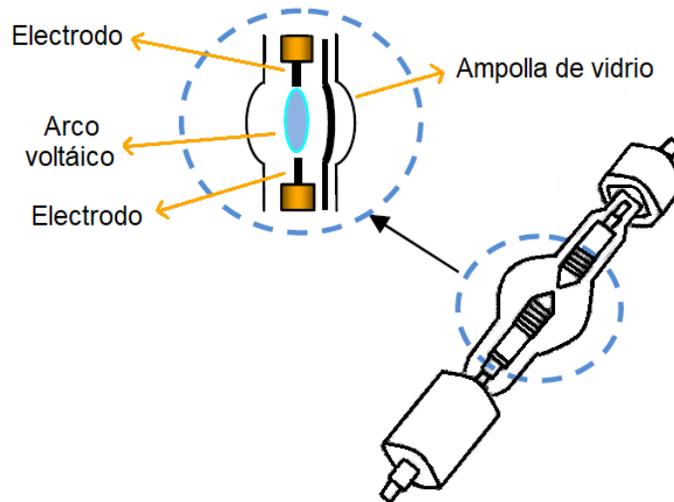


Fig. 1.5.4 Esquema de lámpara de emisión de espectro continuo de xenón.

1.5.2.2 Modulación de la fuente

En un instrumento de absorción atómica típico es necesario eliminar las interferencias producidas por la emisión de radiación en el atomizador. La mayor parte de la radiación emitida es eliminada mediante el monocromador. Sin embargo, la radiación emitida correspondiente a la longitud de onda seleccionada por el monocromador está inevitablemente presente en el atomizador, debido a la excitación y emisión de los átomos del analito. Con la finalidad de eliminar los efectos de la emisión en el atomizador, es necesario modular la salida de la fuente para que su intensidad oscile a una frecuencia constante. De este modo, el detector recibe dos señales, una alternante desde la fuente y otra continua que proviene del atomizador. Estas señales se convierten en las correspondientes respuestas eléctricas [6].

Una forma sencilla y muy efectiva de modular la emisión de la fuente es interponer entre la fuente y el atomizador, un disco metálico circular, o cortador, al que de forma alterna se le han eliminado cuadrantes para permitir el paso de luz. La rotación del disco a velocidad constante conocida proporciona un haz intermitente cortado a la frecuencia deseada. Como alternativa, el alimentador de la fuente puede diseñarse para funcionar con corriente alterna o de manera intermitente, para que la fuente se encienda y se apague a una frecuencia constante deseada [2].

1.5.2.3 Atomización de la muestra

El atomizador es el sistema encargado de producir átomos en su estado fundamental. Esto es de gran importancia, ya que sólo los átomos en este estado absorben la radiación proveniente de la lámpara, por lo que es necesario suministrar a las muestras energía de forma rápida y en cantidad suficiente. Dicha energía es fundamental para que se produzcan diversos procesos que incluyen, la evaporación del solvente de la muestra, la obtención de compuestos moleculares y la disociación de los mismos en átomos libres. Existen dos tipos de atomizadores: continuos y discretos. En el caso de los atomizadores continuos, la muestra es suministrada sin interrupción a una velocidad constante, siendo la señal espectral constante en el tiempo. Por el contrario, en los atomizadores discretos, se introduce una cantidad medida de muestra. La señal espectral en este último caso alcanza un valor máximo en el tiempo y luego decae a su valor basal, por lo que se dice que se trata de una señal transitoria [9]. La energía térmica necesaria para la atomización en ETAAS se lleva a cabo en un horno de grafito (Figura 1.5.5).

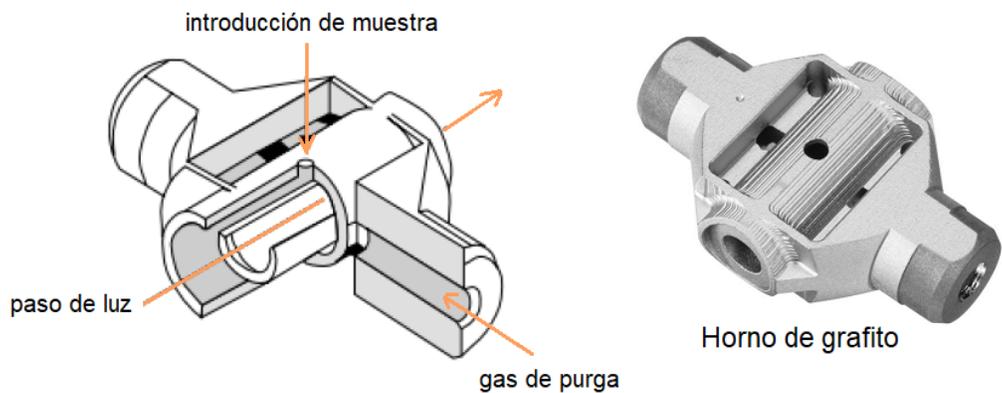


Fig. 1.5.5 Atomizador utilizado en ETAAS: Horno de grafito.

Los atomizadores del tipo electrotérmico son de naturaleza discreta. En ellos, un volumen medido de la solución se introduce en un horno de grafito, el cual se calienta eléctricamente a través de un programa de temperaturas, de modo tal de favorecer la ocurrencia de los procesos de desolvatación, atomización e ionización, ilustrados en la Figura 1.5.6. Estos procesos ocurren durante un breve periodo de tiempo y la señal espectral obtenida tiene la forma de un pico agudo [10].

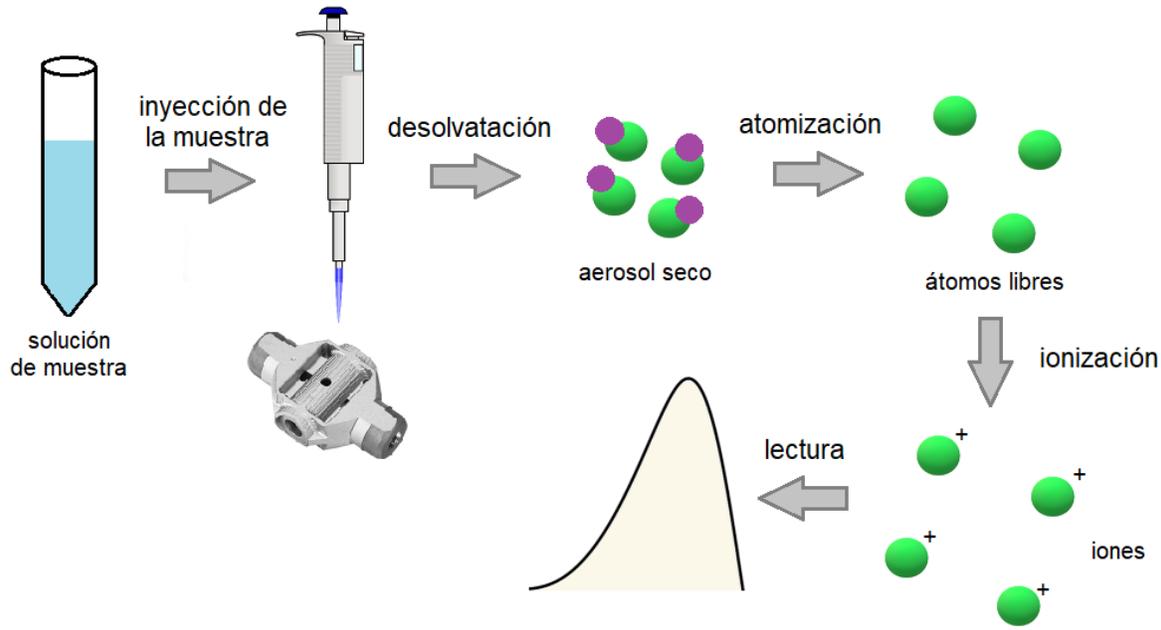


Fig. 1.5.6 Proceso de atomización en el horno de grafito de ETAAS.

En un proceso completo de medición utilizando horno de grafito, la temperatura se aumenta paulatinamente, de modo que pueden separarse los procesos de desolvatación de la muestra (secado), descomposición térmica de la matriz y disociación térmica de las moléculas en átomos libres. En la Fig. 1.5.7 se presenta un perfil típico de temperaturas de trabajo en horno de grafito. Durante las etapas de secado y descomposición térmica se aplica un flujo constante de un gas inerte (argón) a través del tubo para retirar el solvente y los vapores de la matriz. Durante la etapa de atomización, el flujo de argón a través del tubo de grafito se disminuye o directamente se elimina, para que los átomos libres permanezcan en contacto con el haz de luz procedente de la fuente de radiación durante unas décimas de segundo [11].

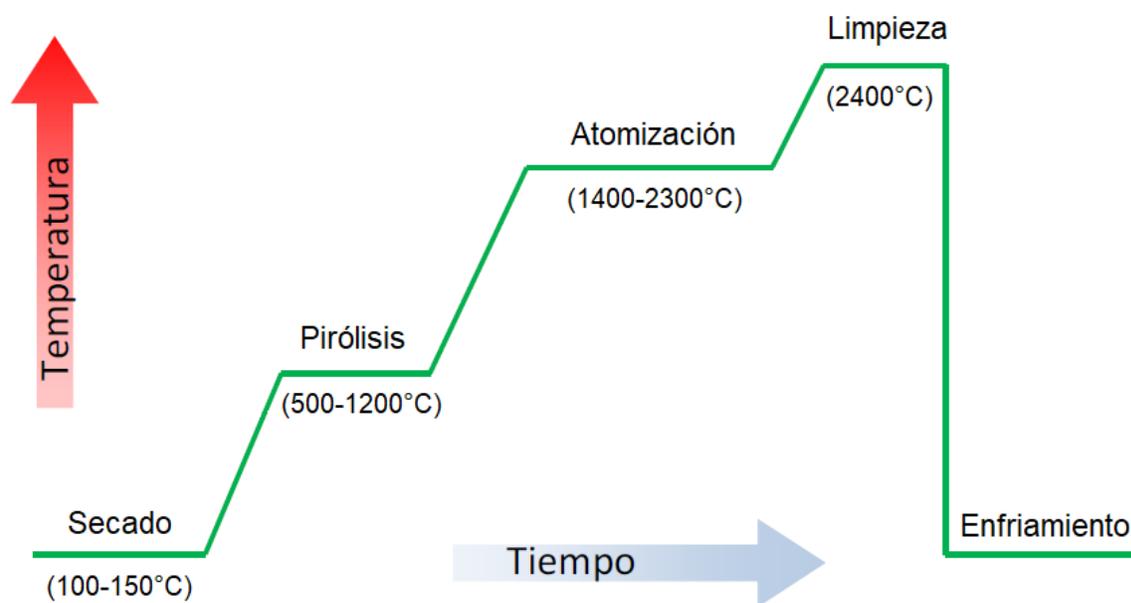


Fig. 1.5.7 Programa típico de temperatura de horno de grafito.

En comparación con la atomización por llama, un número mayor de átomos absorbe radiación, permitiendo el uso de menores cantidades de muestra y detección de menores cantidades absolutas de cada elemento. Las ventajas respecto de la atomización por llama se traducen en una mayor sensibilidad, límites de detección cien a mil veces menores,

disminución de la cantidad de muestra requerida para el análisis (del orden de los μL) y posibilidad de realización de análisis de trazas [2].

1.5.2.4 Dispersión y separación de la radiación

El monocromador tiene como función fundamental aislar la línea medida (radiación de resonancia) de las otras líneas de emisión del material del cátodo, las líneas del gas de llenado y las líneas de emisión que pudieran provenir del atomizador. Como se muestra en la Fig. 1.5.8, consiste en dos rendijas (una de entrada y una de salida) y un componente dispersivo (un prisma o red).

La calidad de un instrumento en otras técnicas espectrométricas, tales como la espectrometría UV-Visible o la de plasma de emisión, depende principalmente de la resolución del monocromador o del ancho de banda espectral. Sin embargo, en AAS el poder de resolución del monocromador no es tan importante. En este caso, el monocromador debería ser capaz de separar dos líneas apartadas por 0,2 nm cuando se opera con un mínimo ancho de rendija efectivo. Por lo tanto, no se requiere un monocromador de elevada resolución. La AAS no pierde su selectividad o especificidad si se utilizan anchos de rendija muy grandes, excepto en el caso de muestras complejas. Generalmente, con la disminución del ancho de banda espectral, se incrementa la sensibilidad y mejora la linealidad [6].

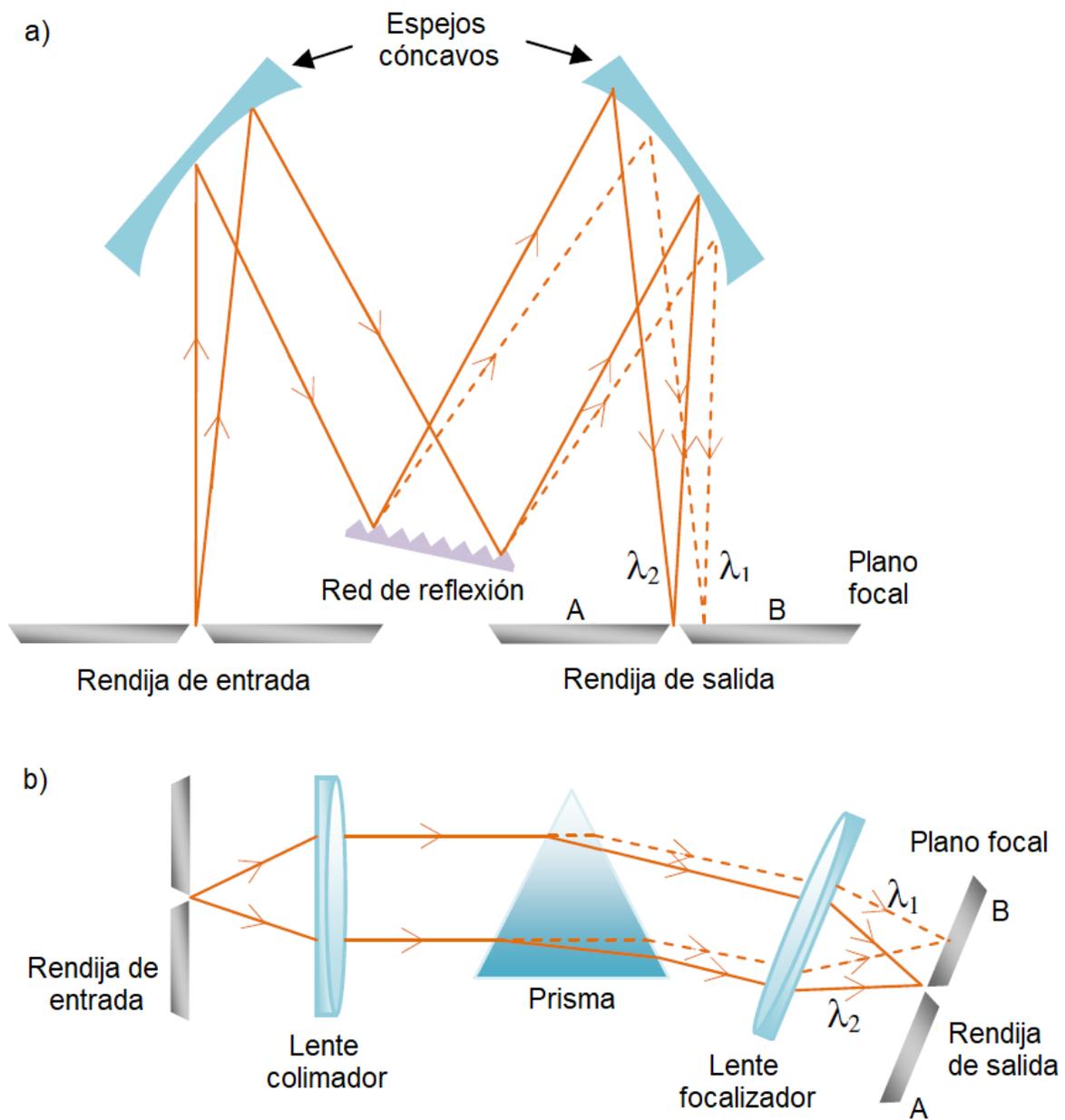


Fig. 1.5.8 Diagramas de dos tipos de monocromadores. (a) Monocromador de red de Czerny-Turner y (b) monocromador de prisma de Busen. (En ambos casos $\lambda_1 > \lambda_2$).

Los dispositivos utilizados generalmente para dispersar la radiación en longitudes de onda individuales son los prismas o las redes de difracción. La dispersión de un prisma depende del índice de refracción del material del prisma y de la longitud de onda de la línea estudiada. La dispersión del prisma es elevada en la región UV, pero disminuye rápidamente con el incremento de la longitud de onda. De esta manera, los prismas son

bastante útiles en AAS, ya que la mayoría de las líneas de resonancia se encuentran en la región UV. Sin embargo, los prismas de vidrio no se pueden utilizar en instrumentos de AAS puesto que no son transparentes a la radiación UV [12].

Para equipos con emisión de espectro continuo, se requiere un monocromador doble de alta resolución (Fig. 1.5.9), el cual consiste en un prisma de 300 mm como pre-monocromador y una red de difracción “echelle” de 400 mm como monocromador. Este monocromador de alta resolución requiere la estabilización de la longitud de onda activa, que se lleva a cabo a través de una lámpara de neón interna, lo cual posibilita una corrección de fondo simultánea para cada tiempo de medición directamente en la línea de análisis [8].

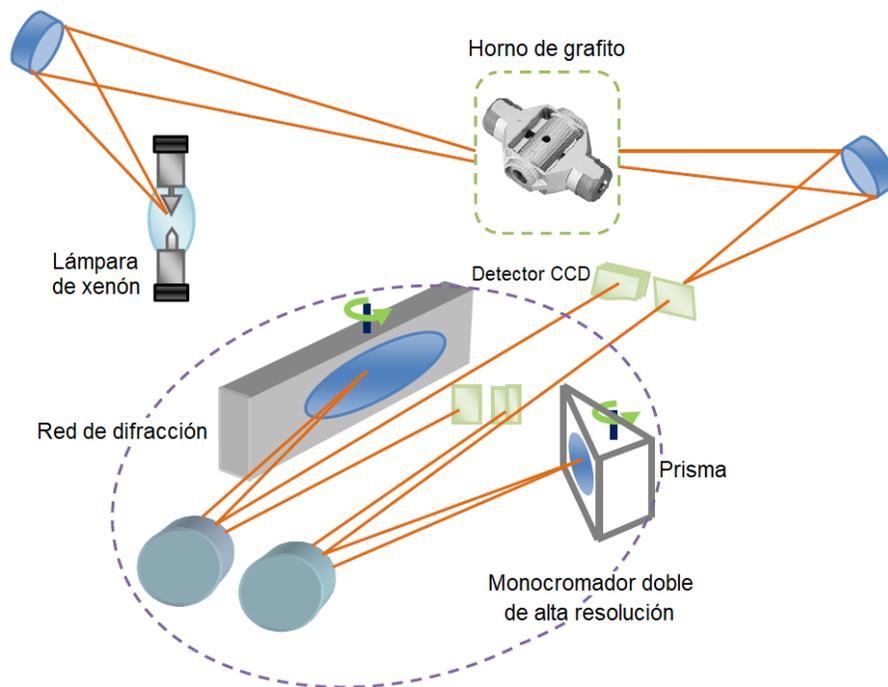


Fig. 1.5.9 Esquema de un banco óptico de alta resolución con fuente continua.

1.5.2.5 Detección y señal de salida

El detector es el dispositivo encargado de captar la señal óptica proveniente del monocromador y transformarlo en una señal electrónica capaz de ser convertida en un valor legible. El más común es el fotomultiplicador (Fig. 1.5.10), tubo de vacío provisto de placas

fotosensibles que recibe los fotones, los convierte en impulsos electricos y multiplica hasta obtener la suficiente intensidad eléctrica.

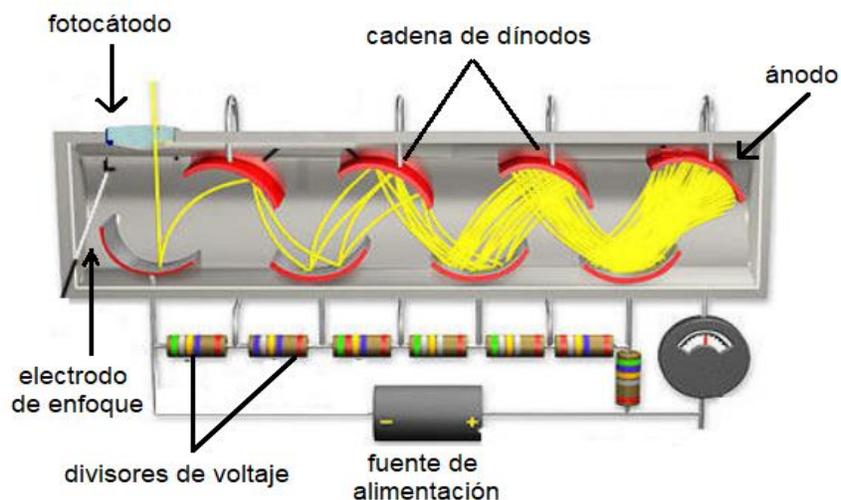
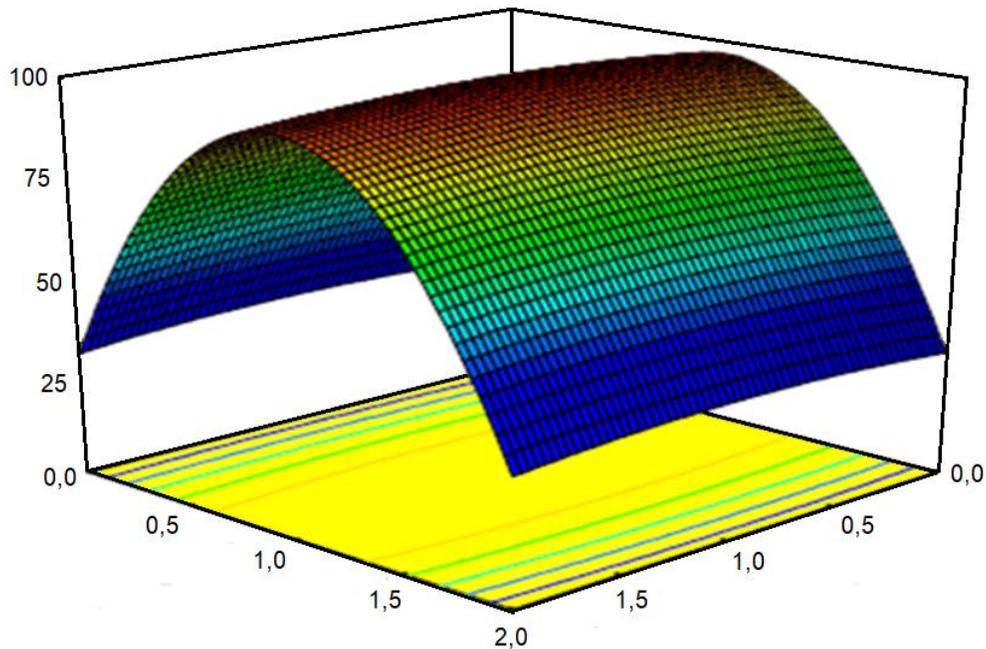


Fig. 1.5.10 Esquema de fotomultiplicador.

A la longitud de onda en la que tiene lugar la absorción, la señal del detector aumenta al máximo algunos segundos después de la ignición y cae rápidamente a cero cuando los productos de la atomización salen del atomizador. El cambio es lo suficientemente rápido (con frecuencia menor a un segundo) como para necesitar un sistema de adquisición de datos de alta velocidad. Los análisis cuantitativos se basan en la medida del área del pico, o bien la altura del mismo [13].

1.6 Diseño Experimental y Optimización Multivariada



1.6.1 Introducción al diseño de experimentos y optimización

El “diseño de experimentos” consiste en planear y realizar un conjunto de ensayos con el objetivo de generar datos que al ser analizados estadísticamente proporcionen evidencias que permitan responder a los interrogantes planteados por el experimentador. De esta manera, con el diseño multivariado de experimentos (DOE), es posible obtener grandes cantidades de información, reduciendo al mínimo el número de experimentos (sin perder necesariamente precisión y exactitud), lo que conlleva al consumo de un mínimo de tiempo y el menor esfuerzo. A diferencia de los diseños univariados, el análisis multivariado permite evaluar la interacción de todas las variables en estudio a diferentes niveles, lo que permite de esta manera obtener resultados más fiables [1]. En la Fig. 1.6.1, se puede observar un esquema de los objetivos generales buscados por el diseño de experimentos.

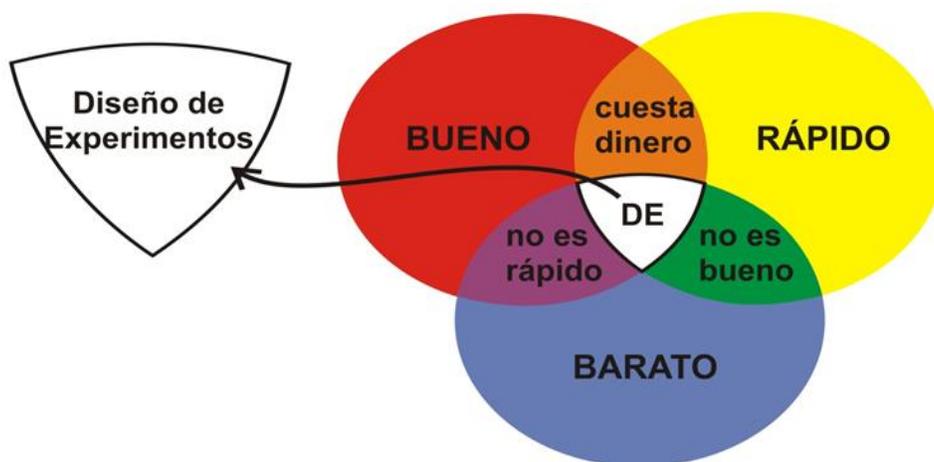


Fig. 1.6.1 Objetivos generales del diseño de experimentos.

Por otro lado, el término "optimización" se refiere a la mejora del rendimiento del proceso analítico, es decir, el descubrimiento de las condiciones en las que se obtiene la mejor respuesta. En química analítica, la optimización es una etapa crítica para encontrar el valor que cada factor debe tener para producir la mejor respuesta posible, procedimiento que se lleva a cabo mediante la metodología de superficie de respuesta (RSM) [2]. La metodología DOE y RSM han demostrado ser útiles para el desarrollo, mejora y optimización de procesos. Han sido ampliamente utilizados en aplicaciones analíticas, como separaciones analíticas y procedimientos de extracción [3], el mundo industrial [4] y en bioprocesos [5].

El planteo de un diseño de experimentos y su posterior optimización, tienen en consideración diferentes términos, que son de interés aclarar y los cuales se encuentran esquematizados en la Fig. 1.6.2, entre ellos:

- Respuesta: Variables a través de las cuales se conoce el resultado de cada prueba experimental.
- Factores controlables: Aspectos de las condiciones experimentales que se considera que pueden afectar a la respuesta y que se pueden fijar en un nivel dado. Los mismos pueden ser clasificados como, cuantitativos (por ejemplo, temperatura, cantidad de reactivo

agregado, pH, fuerza iónica) o cualitativos, entre ellos variables dicotómicas (si/no) y variables categóricas (por ejemplo, agitación por vortex o por ultrasonido).

- Factores incontrolables: Son variables que no pueden controlarse durante el experimento, pueden ser por ejemplo variables ambientales como el ruido, partículas, luz, entre otras [6].

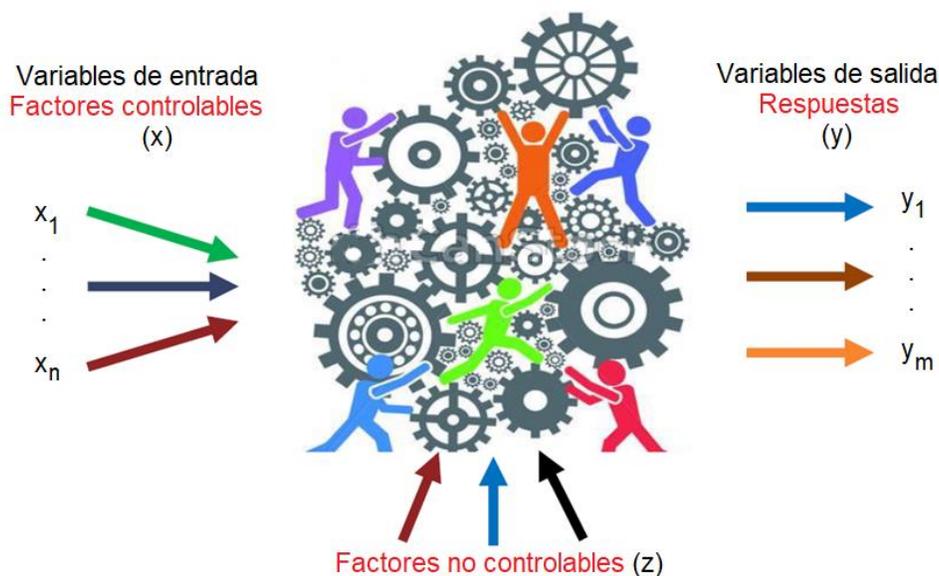


Fig. 1.6.2 Esquema de variables y respuestas en un diseño experimental.

1.6.2 Metodología del diseño experimental

Las etapas consideradas en la optimización del método son: (a) una etapa de screening, donde muchos factores son estudiados para identificar aquellos con efectos significativos sobre las variables críticas, y (b) la optimización, donde los factores son más examinados con el fin de determinar las mejores condiciones analíticas, como puede observarse en la Fig. 1.6.3. Además, el diseño experimental también se utiliza en química analítica para evaluar la robustez del método (para examinar los efectos que pequeños cambios en las condiciones del método de análisis tienen en las respuestas), y la construcción de conjuntos de calibración y validación [7].

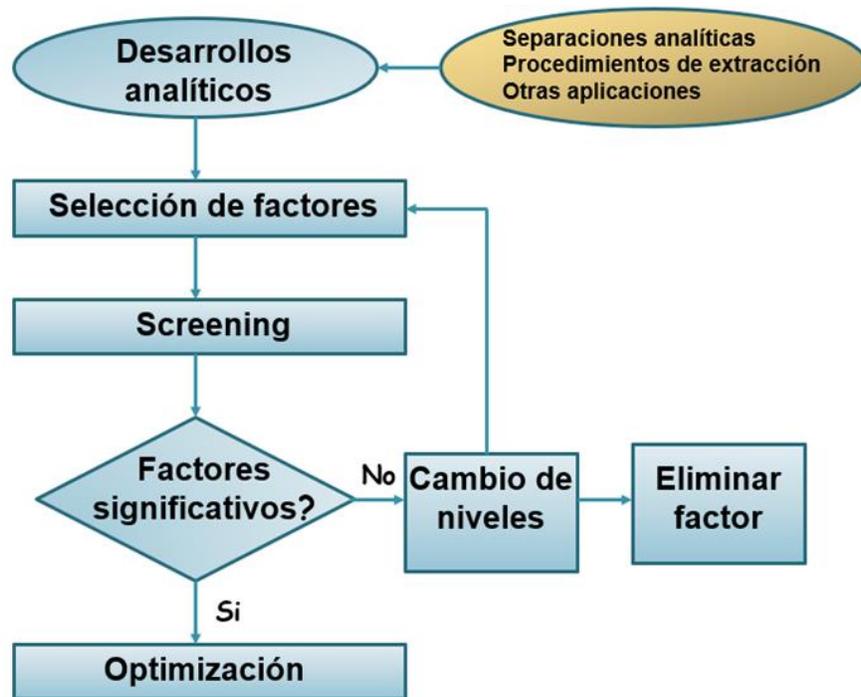


Fig. 1.6.3 Etapas de diseño experimental.

Dos estrategias de optimización se pueden distinguir: el univariado y el multivariado. En el primero, sólo un factor varía a la vez, mientras que los demás factores se mantienen constantes. Este procedimiento clásicamente aplicado no tiene en cuenta interacciones entre los factores. Por otra parte, el número de experimentos es importante cuando el número de factores aumenta, y por lo general, el dominio experimental explorado es más pequeño en comparación con el enfoque multivariado. Por otro lado, en la estrategia multivariada, varios factores se estudian simultáneamente en un número predefinido de experimentos, variando juntos los niveles de todos los factores que intervienen en el proceso [8].

El procedimiento multivariado tiene las siguientes ventajas en relación con la estrategia univariada:

a) Es posible conocer a fondo el sistema estudiado, se obtiene un conocimiento global del mismo en todo el dominio experimental. De los resultados obtenidos, un modelo matemático

puede ser construido para relacionar la respuesta con las condiciones experimentales. La respuesta para cualquier punto del dominio experimental se puede predecir después de una estimación de los coeficientes del modelo.

b) El número de experimentos es más pequeño que el número de experimentos requeridos en el enfoque univariado, reduciendo costo, esfuerzo y tiempo.

c) Es posible estudiar las interacciones entre los factores y las relaciones no lineales con las respuestas.

d) En general, es posible encontrar el óptimo absoluto en el dominio estudiado, mientras que en el enfoque univariado pueden encontrarse máximos locales que dependen de las condiciones iniciales del análisis.

e) Calidad de la información recopilada en cada punto experimental puede ser conocida [8]. Con el fin de realizar un diseño experimental correcto, la mayor parte de los autores recomiendan considerar los siguientes pasos [9]:

- Planteamiento del problema: Es necesario tener una idea clara sobre el tema y sobre los objetivos de optimización. El diseño experimental es una herramienta que permite la búsqueda de soluciones a los problemas analíticos adecuadamente definidos. El objetivo del estudio debe estar claramente identificado y especificado, así como debe ser evaluado el tiempo y el costo de la experimentación.

- Selección de las variables de respuesta: Una variable que pueda proporcionar la información necesaria en la evaluación del rendimiento analítico del método debe ser seleccionada para ser sometida al procedimiento de optimización. Esta variable se llama respuesta y, de acuerdo con el objetivo, puede ser necesario observar más de una respuesta.

- Selección de los factores y sus niveles: Todos los factores (variables) que pueden afectar el proceso deben ser cuidadosamente detectados y examinados. El dominio experimental debe ser definido para cada factor, y también una forma de control y medición debe ser

establecida. Dado que el número de factores a considerar puede ser importante, es necesario determinar las variables experimentales y las interacciones que tienen una influencia significativa en una o varias respuestas. En los diseños de detección, los factores se examinan por lo general en dos niveles (-1, +1). El rango entre los niveles es el intervalo más amplio que el factor se puede variar para el sistema en estudio y es elegido sobre la base de la información de la literatura o conocimiento anterior.

- Selección de un diseño experimental: Las cuestiones a considerar para la selección del mejor diseño experimental para cada etapa son: (a) objetivo: tipo de problema y la información conocida, (b) número de factores e interacciones que se estudian, (c) validez estadística y eficacia de cada diseño, (d) funcionamiento, costo y restricciones de tiempo, y (e) facilidad de comprensión y aplicación de la complejidad de cada diseño.

1.6.3 Tipos de diseños

1.6.3.1 Diseños de screening

Los más ampliamente utilizados en la etapa de selección de factores son factorial completo, factorial fraccional y Plackett-Burman, ya que son económicos y eficientes. El diseño factorial fraccional es uno de los más utilizados para fines de selección, permite la evaluación de un gran número de factores en un pequeño número de experimentos. Diferentes diseños fraccionales se pueden crear para un gran número de factores. Sin embargo, los diseños fraccionales no permiten la estimación de todos los efectos principales y de las interacciones por separado porque algunos de ellos se estiman juntos, es decir, que se confunden. A su vez, a medida que aumenta el número de factores aumenta exponencialmente el número de ensayos, por lo que el diseño de Plackett-Burman es útil cuando existen múltiples factores, el cual permite estudiar el efecto de factores principales, suponiendo que no existe interacción entre los mismos [10]. Las principales características de los diseños de screening se presentan en la Tabla 1.6.1.

Tabla 1.6.1 Diseños empleados para la etapa de screening.

Diseño	Factor		Res ³	N° de experimentos	Efectos estimados	O ⁴	R ⁵
	Tipo	Número					
Factorial completo de 2 niveles	Numérico	$2 \leq k \leq 5$		2^k	$2^k - 1$		
	Categórico			2^{k+1}	Efectos principales	Si	Si
Factorial fraccional de 2 niveles	Numérico	> 4	III o >	2^{k-p}	R III (efectos principales confundidos con 2 factores)		
	Categórico				R IV (efectos principales confundidos con 3 factores)	Si	Si
					R V (efectos principales confundidos con 4 factores)		
Plackett–Burman	Numérico	$N - 1$	III	N (múltiplo 4)	Efectos principales confundidos con interacciones de orden superior	Si	Si
	Categórico						

¹k= número de factores

²p= número de generadores independientes.

³Res = resolución

⁴O = ortogonalidad

⁵R = rotabilidad

La resolución de un diseño nos indica el nivel de confusiones que se presentan en la estimación de efectos, por lo tanto, nos da una idea de la eficacia con que pueden estimarse los efectos potencialmente importantes. De esta manera, en un diseño factorial completo se estiman todos los efectos principales y sus interacciones, logrando que no se presenten confusiones entre las variables. Por otro lado, en un diseño factorial fraccionado, la resolución disminuye en base al grado de fraccionamiento del diseño y de esta manera es posible la confusión entre efectos principales e interacciones dentro del diseño [9]. En la Fig. 1.6.4 se observa un esquema referido a la resolución obtenida de un diseño construido con 6 factores, en base al grado de fraccionamiento del mismo y los inconvenientes que dicho fraccionamiento genera.

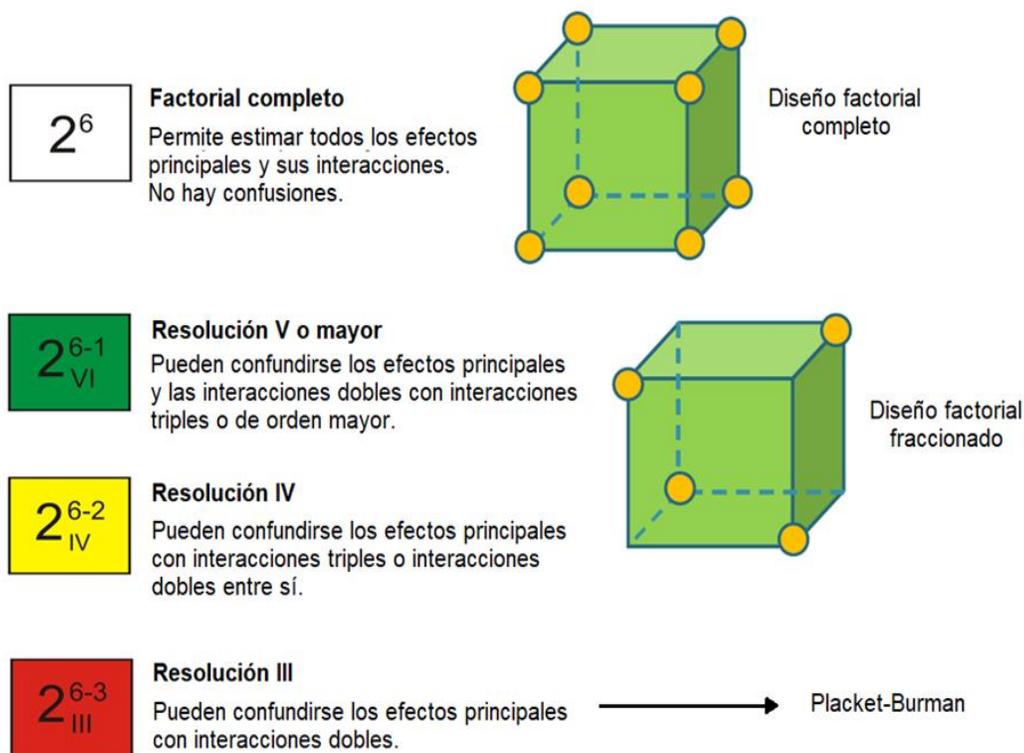


Fig. 1.6.4 Resolución de diseño según grado de fraccionamiento.

Al evaluar los resultados obtenidos luego de aplicar un diseño de screening, se debe analizar el diagrama de Pareto, el cual es una gráfica en donde se organizan diversas

clasificaciones de datos por orden descendente, de izquierda a derecha por medio de barras sencillas después de haber reunido los datos para calificar los factores en estudio, de modo que se pueda asignar un orden de prioridades y de esta manera clasificar los factores. Pareto es una herramienta de análisis de datos ampliamente utilizada, es útil en la determinación de variables significativas de un modelo, permite seleccionar los factores que afectan de modo significativo la respuesta analítica que se busca medir y poder desestimar aquellos factores que no afectan la respuesta analítica de modo significativo [11]. En la Fig. 1.6.5 se puede observar un diagrama de Pareto típico.

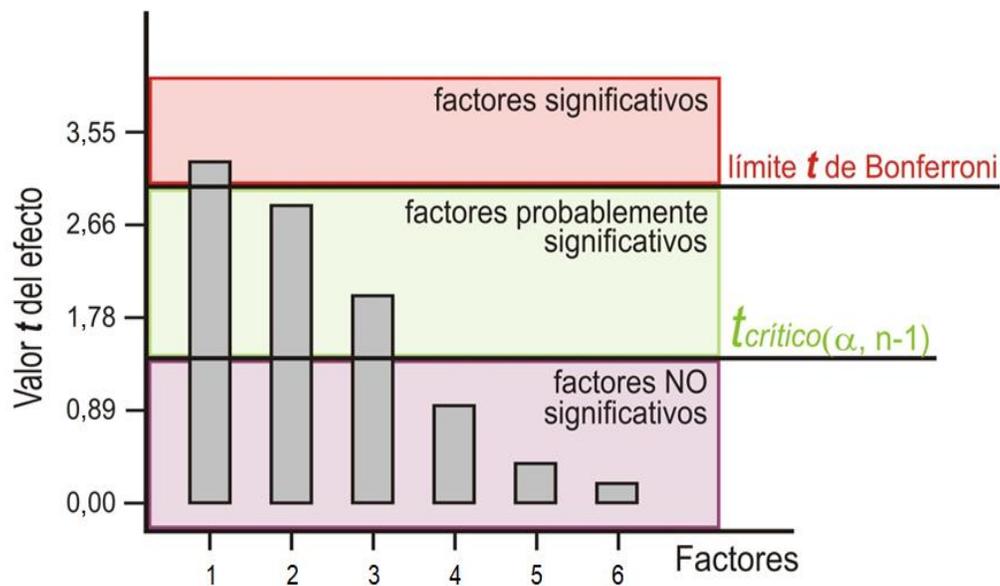


Fig. 1.6.5 Diagrama de Pareto.

1.6.3.2 Diseños de optimización

Los diseños más utilizados en el paso de optimización son: factorial completo a tres niveles, central compuesto, Box-Behnken, D-óptimo y diseños Doehlert. Permiten obtener datos experimentales que luego se estudian mediante modelo polinomial de múltiple regresión lineal con el fin de caracterizar una superficie de respuesta [12]. Las características principales de los diseños más utilizados en la etapa de optimización se presentan en la Tabla 1.6.2.

Tabla 1.6.2 Diseños de superficie de respuesta más utilizados para el paso de optimización.

Diseño	Tipo de factores	Nivel factorial	N° experimentos	O	R
Central compuesto	Numérico	5	$2^k + 2k + Cp^1$		
	Categórico			Si-No	Si-No
Box-Behken	Numérico	3	$2k(k-1) + Cp$		
	Categórico			Si	Si
Factorial completo de 3 niveles	Numérico	3	3^k		
	Categórico			Si	No
Doehlert Matrix	Numérico	Diferente para cada factor	$k^2 + k + Cp$		
	Categórico			No	No
D-Optimal	Numérico	Diferente para cada modelo	Subconjunto seleccionado de todos los posibles combinaciones		
	Categórico			No	Si

¹Cp es el número de puntos centrales

1.6.4 Modelado

1.6.4.1 Construcción de modelo para screening

El enfoque general para el análisis estadístico del diseño de screening para cada respuesta que se analiza incluye:

- (1) La estimación de los efectos de los factores y el examen de sus signos y magnitudes.
- (2) La construcción de un modelo inicial para la respuesta.
- (3) Realizar pruebas estadísticas.

(4) Refinar el modelo con la eliminación de cualquier variable no significativa desde el modelo inicial.

(5) Análisis de residuos para comprobar la adecuación del modelo y las hipótesis [9].

El efecto de cada factor sobre cada respuesta se estima como la diferencia entre la respuesta media de los experimentos con signos positivos y la respuesta promedio de los experimentos con signos negativos. Una alternativa es determinar el efecto de los factores en la estimación de los coeficientes del modelo. Las observaciones o las respuestas pueden ser descritas por un modelo estadístico lineal.

Una de las maneras para evaluar la importancia de los efectos y decidir cuál de ellos debe ser considerado en el modelo final y cuáles deberían incluirse en el error es utilizando parcelas normales y medias normales de probabilidad. Las variables seleccionadas a partir de cualquier análisis gráfico deben examinarse por análisis de varianza (ANOVA) y, si es necesario, el modelo debe reducirse mediante la eliminación de las variables no significativas del modelo inicial.

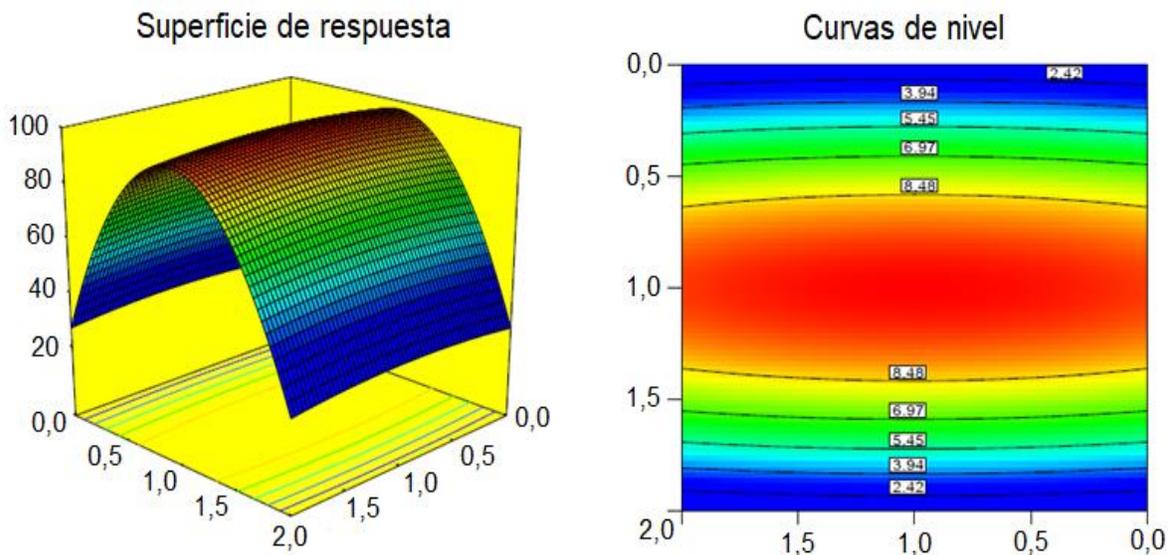
ANOVA es una colección de modelos estadísticos utilizados para analizar las diferencias entre medias de grupos y sus procedimientos asociados. Por último, el analista debe seleccionar todos los factores que afectarán significativamente a cada respuesta. Cuando el número de factores es demasiado grande, el analista debe recurrir a la experiencia para elegir cada factor correctamente y juzgar sus efectos [13].

1.6.4.2 Construcción de modelos de superficie de respuesta

Una vez que los datos correspondientes a las respuestas evaluadas en la etapa de optimización se han recogido, un modelo matemático puede construirse con una función polinomial de segundo orden para cada respuesta. En general, sólo las interacciones de segundo orden se tienen en cuenta porque las interacciones de órdenes más altos no son significativas.

La ecuación del modelo es generalmente provista por la metodología de los mínimos cuadrados (LS), es una técnica de regresión múltiple que se ajusta a un modelo para establecer los datos experimentales y encontrar valores de coeficientes que minimicen los residuos. En todos los casos, el modelo ajustado debe ser capaz de describir correctamente el rendimiento de los datos con el fin de hacer predicciones estadísticas.

En el caso en el que sólo dos factores están optimizados, RSM genera una vista gráfica del sistema, ya que la respuesta puede ser representada como una superficie sólida en un espacio tridimensional. Cuando más de dos factores se optimizan, la representación gráfica se hace para dos de ellos, manteniendo las otras en valores constantes. Además, los mapas de contorno pueden ser representados como otra forma de visualización. Este gráfico de contorno se compone de líneas de respuesta constante, que corresponden a una altura específica de la respuesta [14]. En la Fig. 1.6.6 se puede observar un ejemplo de superficie de respuesta junto con la gráfica de contorno de la misma, es decir gráfico en dos dimensiones de la superficie de respuesta.



1.6.4.3 Evaluación del modelo

Cuando se aplica regresión LS, es habitual asumir que los valores esperados de los errores son cercanos a cero, independientes de la varianza constante y, al menos, una distribución aproximadamente normal. Sin embargo, la respuesta se mide siempre con cierto error.

Para determinar si el ajuste de regresión múltiple es importante para el modelo de segundo orden, una prueba de análisis de ANOVA debe ser aplicado. El modelo se considera satisfactorio cuando la regresión es significativa y se obtiene una no significativa falta de ajuste para el nivel de confianza seleccionado. Sin embargo, la obtención de un modelo significativo no necesariamente significa que explique correctamente la variación en los datos. Por consiguiente, es necesario evaluar los gráficos de residuos, el coeficiente de regresión (R^2) y el coeficiente de regresión ajustado (R^2_{adj}), que representan la varianza explicada por el modelo.

La gráfica de probabilidad normal indica si los residuos siguen una distribución normal, una de las condiciones básicas para la validez de ANOVA. La homogeneidad de la varianza (otro requisito para la validez ANOVA) se puede evaluar por la comparación de los residuos frente a los valores predichos de respuesta. Dos diagnósticos adicionales también son importantes:

- (a) Los residuos frente al orden de ensayo experimental, que permite detectar variables incontroladas que pueden haber influido en la respuesta durante el experimento.
- (b) Los residuos frente a los niveles de factor de cada diagnóstico, que comprueba si la varianza explicada por el modelo es diferente en los diversos niveles de un factor [13].

Además, la evaluación de los residuos “estudentizados” externamente son útiles para detectar puntos de datos que no están bien equipados por el modelo seleccionado (valores extremos). El “leverage” es un parámetro que indica la posibilidad de que un punto de diseño influya en el ajuste del modelo. Altos niveles de leverage no son deseables porque

llevan a errores inesperados, que podrían influir fuertemente en el modelo. Otras formas de evaluar los puntos influyentes anormales son los diagnósticos DFFITs (Diferencia entre valores predichos) y DFBETAs (Diferencia entre coeficientes de regresión) que determinan las diferencias en el ajuste del modelo cuando se suprime el valor de una respuesta. Por último, la distancia de Cook, calculada como el cuadrado de la distancia euclídea entre la estimación de mínimos cuadrados basado en todos los puntos del vector y la estimación obtenida por suprimir el punto i -ésimo, es una medida de la cantidad de cambios en la regresión si no se toma en cuenta ese punto [9].

1.6.4.4 Transformación de la respuesta

Después de una evaluación general del modelo propuesto, puede ocurrir que la aplicación de la transformación de datos permita un mejor ajuste del sistema. Esta condición se encuentra generalmente en dos casos: (a) la respuesta es bastante grande, o (b) en el modelo supuesto, normalidad y homocedasticidad no se cumplen. En la práctica, algunas variables de respuesta siguen distribuciones de Poisson, binomial o gamma, en el que la varianza de la respuesta no es constante, sino que está relacionada de alguna manera a la media. Una distribución anormal del "tipo cuerno" o "en forma de s" se produce en el gráfico de los residuos [15].

Las transformaciones aplican una función matemática a todos los datos de respuesta, lo que genera un nuevo conjunto de datos que cumplen los supuestos que hacen que ANOVA sea válida. A continuación, un nuevo modelo puede ser construido para explicar mejor el comportamiento de los datos.

Un método general y ampliamente utilizado para la transformación de los datos en modelos lineales fue desarrollado por Box y Cox [16]. Esta familia de herramientas de transformación se utiliza ampliamente para lograr una transformación normalizadora. La elección apropiada de una transformación se basa en consideraciones estadísticas de

acuerdo con el tipo de distribución derivada de los residuos. En general, el mejor valor λ se encuentra en el punto mínimo de la curva generada por el logaritmo natural de la suma de cuadrados de los residuos, es decir, el valor λ que genera el conjunto de datos con los residuos inferiores. Es importante tener en cuenta que, el ajuste de un modelo a una respuesta transformada, debe someterse a una transformación posterior (usando la operación matemática inversa de la transformación empleada) para hacer una interpretación adecuada. En la Fig. 1.6.7 se ejemplifica un gráfico de Box-Cox que permite determinar si es necesario aplicar una transformación a la respuesta.

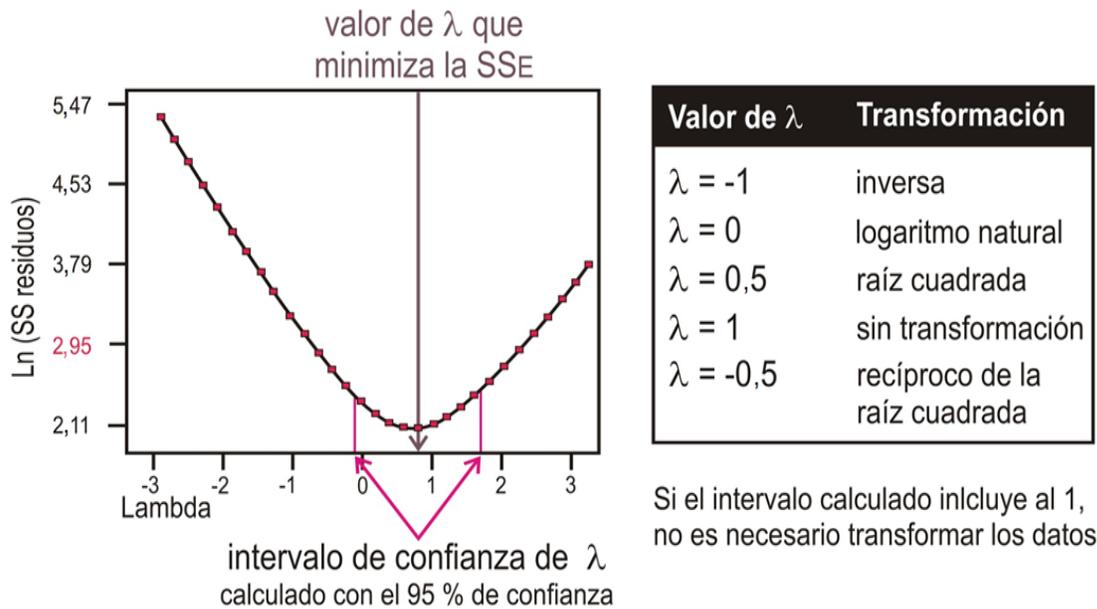


Fig. 1.6.7 Ejemplo de gráfico de Box-Cox para transformación de la respuesta y valores de λ .

1.6.4.5 Evaluación de los coeficientes individuales del modelo

En cada modelo, el significado de los términos debe ser evaluado por ANOVA, que realiza una comparación de la variación en la respuesta con la variación debida a errores aleatorios. En general, los términos que no son significativos en el modelo se eliminan para obtener el modelo más simple que describa al sistema.

Más de una posible estrategia puede ser seguida en esta evaluación. En la estrategia de eliminación hacia atrás, un modelo completo está construido en un principio, a

continuación, cada término se evalúa mediante ANOVA, los términos menos significativos se retiran del modelo [17].

Al hacer la selección hacia adelante, todos los bloques y los términos son forzados a un ajuste de los datos. Los términos restantes son considerados, a partir de un modelo de regresión simple y usando el único término que tiene la mayor correlación con la respuesta. Se añaden los términos con el más bajo valor de probabilidad parcial al modelo. Este algoritmo puede no ser tan robusto debido a que algunos términos no pueden tener la oportunidad de ser incluidos en el modelo.

La regresión por etapas es una combinación de hacia adelante y hacia atrás. En primer lugar, todos los bloques y las condiciones forzadas están equipados a los datos. Luego, se utiliza un simple modelo de regresión, con el término único con la mayor correlación con la respuesta. Después de esto, se añaden términos, se eliminan o cambian, y el procedimiento es detenido cuando no hay una mejora adicional.

La falta de ajuste del modelo resultante, incluyendo términos significativos y los que quedan para mantener la jerarquía, se evalúan de nuevamente por ANOVA. Finalmente, el modelo ajustado puede ser evaluado en forma lineal, lineal con interacción, cuadrática o cúbica [9].

1.6.4.6 Localización óptima

Una forma adecuada para encontrar la ubicación óptima es a través de la representación gráfica del modelo. Dos tipos de gráficos pueden resultar útiles: (a) la superficie de respuesta en tres dimensiones y (b) la gráfica de curvas de nivel que es la proyección de la superficie en un plano, representada como líneas de respuesta constante. Cada contorno corresponde a una altura específica de la superficie. En estos gráficos la respuesta se representa como una función de dos factores.

De acuerdo con el criterio de optimización establecido, el valor óptimo buscado puede corresponder a un máximo, un mínimo o un valor específico, que se puede encontrar por simple inspección visual del gráfico. Cuando se estudian más de dos factores, los que no son trazados deben establecerse en un valor constante, por lo que una parte limitada del dominio experimental se muestra y el óptimo no necesariamente es visto en el gráfico. Por esta razón, el valor de la variable fija se debe seleccionar con mucho cuidado. La superposición de gráficos de contorno construidos con combinación de tres factores permite buscar visualmente la respuesta satisfactoria. Sin embargo, si están siendo más de tres factores analizados, la superposición de gráficos de contorno se vuelve difícil. Por lo tanto, a veces un enfoque analítico más formal a la superficie de segundo orden es necesario cuando se genera en k dimensiones [18].

Hay que notar que una región de confianza para el punto estacionario debe ser calculada. Esta región es útil porque puede proporcionar una idea acerca de la calidad de la estimación del punto estacionario. Permite considerar niveles de los factores que producen una respuesta significativamente igual a la producida por el punto estacionario, y esto puede proporcionar la ventaja para cambiar el nivel de los factores sin afectar la calidad de la respuesta [9].

Capítulo 2: Materiales y métodos

2.1 Instrumentación y materiales

2.1.1 Instrumentos

2.1.1.1 Espectrómetro de absorción atómica

Las determinaciones de los analitos en estudio se llevaron a cabo utilizando un espectrómetro de absorción atómica marca Perkin-Elmer Modelo 5100ZL (Überlingen, Alemania), equipado con atomizador de horno de grafito pirolítico con calentamiento transversal y sistema de corrección de fondo por efecto Zeeman. Como fuente de radiación se utilizaron lámparas de descarga sin electrodo (EDL, PerkinElmer) de As, Cd y Pb. Por otro lado, se utilizó una lámpara de cátodo hueco (HCL, PerkinElmer) de Cr. El monocromador del sistema de detección se estableció con un ancho de banda espectral de 0,7 nm para todas las determinaciones, mientras que la corriente de funcionamiento de cada lámpara y la longitud de onda utilizadas para cada analito se detallan a continuación: As (300 mA; 193,7 nm), Cd (170 mA; 228,8 nm), Cr (25 mA; 357,9 nm) y Pb (360 mA; 283,3 nm).

2.1.1.2 Espectrómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier

La caracterización de todos los MILs sintetizados se realizó utilizando un espectrómetro de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FT-IR), marca Perkin-Elmer modelo Spectrum Two, mediante la configuración de Reflectancia Total Atenuada (ATR).

2.1.1.3 Espectrómetro de absorción UV-Vis

Las muestras de miel fueron clasificadas según su tonalidad en base a la escala de Pfund, mediante la utilización de un espectrómetro de absorción UV-Vis, marca Shimadzu modelo UV-1800 (Kyoto, Japón).

2.1.1.4 Balanza analítica

El pesaje con precisión de los reactivos sólidos utilizados se llevó a cabo con balanza analítica marca Ohaus modelo Pioneer (Nueva Jersey, Estados Unidos), con resolución de 0,0001g.

2.1.1.5 Medidas y ajuste de pH

Las mediciones de pH de las diferentes soluciones fueron realizadas mediante la utilización de un pH-metro marca Horiba modelo F-51 (Kyoto, Japón), provisto de electrodo combinado de vidrio modelo 9611-10D, con solución interna de KCl de concentración 3 mol L⁻¹. Para su calibración diaria se utilizaron soluciones estándar (Merck, Darmstadt, Alemania) de pH 4 (ácido cítrico/hidróxido de sodio/ácido clorhídrico), pH 7 (fosfato ácido de sodio/fosfato diácido de potasio) y pH 10 (ácido bórico/cloruro de potasio/hidróxido de sodio).

2.1.2 Aparatos

2.1.2.1 Sistema de centrifugación

El desarrollo de la etapa de limpieza de las muestras de miel requirió la separación de fases mediante la utilización de centrífuga marca Luguimac modelo LC 15 (Buenos Aires, Argentina), de revolución variable, con capacidad para dieciséis tubos de centrifuga de 15 mL, rango de programación de 0 a 99 minutos (resolución de 1 minuto) y variador electrónico de velocidad con rango de programación de 0 a 3600 rpm (resolución de 1 rpm).

2.1.2.2 Estufa de secado

La vaporización de vestigios de cloroformo presentes en la solución de síntesis de los MILs requirió de la utilización de estufa de secado marca San Jor serie SL SBD (Buenos Aires, Argentina), cuyo rango de temperaturas abarca de los 50 a los 200°C (resolución de 0,1°C).

2.1.2.3 Horno mufla

Las muestras de miel fueron colocadas en crisoles de porcelana y calcinadas en un horno mufla marca Indef modelo 273 (Córdoba, Argentina), cuya temperatura máxima es de 1300°C.

2.1.2.4 Plancha calefactora

La digestión de muestras apícolas requirió la utilización de planchas calefactoras marca Thorbell línea Mercurio, cuyo rango de temperatura abarca desde los 25 a los 450°C.

2.1.2.5 Rotavapor

La síntesis de los MILs propuestos requirió la utilización de un rotavapor marca Senco modelo R206B (Shanghai, China). Cuenta con un matraz de evaporación de 100 mL, velocidad de rotación máxima de 200 rpm y temperatura máxima de 99°C.

2.1.2.6 Sistema de agitación

La agitación de las soluciones de muestra y estándares se realizó utilizando un agitador vortex marca Boeco modelo Bio Vortex V1 (Hamburgo, Alemania) y unidad de ultrasonido marca Testlab (Buenos Aires, Argentina) con control de temperatura. Por otro lado, se utilizó un agitador magnético marca Thorbell (Santa Fe, Argentina) como parte de la síntesis de los MILs propuestos.

2.1.2.7 Medición de microvolúmenes

Las mediciones de microvolúmenes para la preparación de soluciones se realizaron con micropipetas automáticas de succión de volumen variable. Para volúmenes de 2-20 µL se utilizó una micropipeta marca Dragon Lab (Beijing, China), para volúmenes de 20-100 µL micropipeta marca Gilson (Wisconsin, Estados Unidos), mientras que para volúmenes de 100-1000 µL micropipetas marca Dragon Lab, Gilson y Eppendorf (Hamburgo, Alemania).

2.1.2.8 Destilador de agua y equipo de agua ultrapura

La destilación de agua se realizó mediante un destilador marca Figmay (Córdoba, Argentina) y posteriormente el agua destilada obtenida fue purificada en un equipo de agua ultrapura marca Apema modelo Osmoion-U-0.5 (Buenos Aires, Argentina).

2.1.3 Materiales

2.1.3.1 Material de vidrio

Se emplearon materiales de vidrio tanto volumétrico como de uso general, los cuales fueron lavados antes de su utilización mediante inmersión durante 24 horas en solución al 10% (v/v) de HNO₃ seguido de agua destilada y finalmente agua ultrapura.

2.1.3.2 Imanes

La atracción magnética de los MILs utilizados se llevó a cabo mediante el uso de imanes de neodimio (50 (largo) × 30 (alto) × 10 mm (ancho)) con campo magnético de 1,17 T y varillas magnéticas de neodimio (4 mm (diámetro) × 12 cm (largo)) con campo magnético de 0,25 T. Por otro lado, se utilizaron buzos magnéticos para la agitación de las soluciones de síntesis.

2.2 Reactivos

2.2.1 Agua ultrapura

Se utilizó agua ultrapura obtenida en el laboratorio para la preparación de todas las soluciones acuosas requeridas. La calidad de la misma fue comprobada mediante la medición de resistividad igual o menor a 18 MΩ cm.

2.2.2 Soluciones patrón de analitos en estudio

Se prepararon soluciones patrón de 1 mg L⁻¹ de As(III), Cd(II), Cr(III) y Pb(II) mediante disolución de soluciones estándar Perkin-Elmer de 1000 mg L⁻¹ de As(NO₃)₃, Cd(NO₃)₂, Cr(NO₃)₃ y Pb(NO₃)₂ de pureza del 99,0% al 5%(v/v) de HNO₃. Se prepararon

concentraciones menores diluyendo la solución previa con solución 0,1 mol L⁻¹ de HNO₃ (Merck, Darmstadt, Alemania).

2.2.3 Reactivos utilizados como modificadores de matriz

- Se prepararon soluciones de Mg(II) de 150, 300 y 750 mg L⁻¹ mediante la disolución con agua ultrapura de Mg(NO₃)₃·6H₂O (Merck) de 99,9% de pureza al 5%(v/v) de HNO₃.
- Se preparó una solución de Ni(II) de 250 mg L⁻¹ mediante la disolución con agua ultrapura de Ni(NO₃)₂·4H₂O (Sigma-Aldrich, Milwaukee, EE.UU.) de 99,9% de pureza al 5%(v/v) de HNO₃.
- Se preparó una solución de Pd(II) de 500 mg L⁻¹ mediante la disolución con agua ultrapura de Pd(NO₃)₂·2H₂O (Fluka, Buchs, Suiza) de 99,9% de pureza al 5%(v/v) de HNO₃.
- Se preparó una solución de H₂PO₄⁻ de 2500 mg L⁻¹ mediante disolución con agua ultrapura de NH₄H₂PO₄ (Merck) de 99,9% de pureza.

2.2.4 Reactivos utilizados como agentes complejantes

Se prepararon soluciones madre de 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ de pirrolidinditiocarbamato de amonio al 99,0% (APDC), dietilditiocarbamato de amonio al 99,0% (DDTC), dietilditiofosfato de amonio al 99,0% (DDTP), 8-hidroxiquinolina al 99,0% (HQ), 1,5-difenilcarbazida al 99,0% (DFC) y 2-(5-bromo-5-piridazol)-5-dietilamino-fenol al 99,0% (5-Br-PADAP) de Sigma-Aldrich, a partir de los reactivos sólidos que fueron disueltos en metanol. Concentraciones menores fueron preparadas mediante la disolución de la solución madre con metanol.

2.2.5 Reactivos utilizados para síntesis de MILs

Los siguientes ILs convencionales fueron utilizados como reactivos de partida para la síntesis de los MILs bajo estudio: Cloruro de 1-octil-3-metilimidazolio ([C₈mim]Cl) sintetizado previamente a partir de 1-metilimidazolio (99,0%) y 1-clorooctano (99,0%) de Sigma-Aldrich, cloruro de trihexil(tetradecil)fosfonio ([P_{6,6,6,14}]Cl) (95,0%) y metilsulfato de

trimetilbutilfosfonio ($[P_{1,1,1,4}]CH_3SO_4$) (95,0%) de Sigma-Aldrich. Asimismo, se utilizaron metanol (99,8%) de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina) y cloroformo (99,0%) de JT Baker (Leicestershire, Inglaterra) como disolventes de los ILs.

Por otro lado, las siguientes sales de Sigma-Aldrich fueron utilizadas como reactivos de partida para la síntesis de MILs: cloruro férrico hexahidratado ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) y cloruro ferroso tetrahidratado ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) al 98,0% de pureza, hexacianoferrato de potasio ($K_3Fe(CN)_6$), cloruro manganoso monohidratado ($MnCl_2 \cdot H_2O$) y cloruro cobaltoso hexahidratado ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$) al 99,0% de pureza, y cloruro de disprosio hexahidratado ($DyCl_3 \cdot 6H_2O$) al 99,9% de pureza.

2.2.6 Reactivos utilizados para ajuste de la fuerza iónica

Las siguientes sales fueron utilizadas para ajustar la fuerza iónica de las soluciones de muestra y estándares en los procedimientos de microextracción bajo estudio: cloruro de sodio ($NaCl$) al 99,9% de Anedra, cloruro de calcio ($CaCl_2$), cloruro de magnesio ($MgCl_2$) y carbonato ácido de sodio ($NaHCO_3$) al 99,0% de Biopack, nitrato de sodio ($NaNO_3$) al 99,0% y citrato de sodio (99,5%) de Sigma-Aldrich, perclorato de sodio ($NaClO_4$) y nitrito de sodio ($NaNO_2$) al 99,0% de Merck, y fosfato ácido de sodio (Na_2HPO_4) al 99,0% de JT Baker.

2.2.7 Reactivos utilizados como diluyentes y dispersantes

Los siguientes solventes orgánicos fueron utilizados como diluyentes y/o dispersantes de la fase de MIL dentro de las metodologías de microextracción desarrolladas: acetonitrilo (99,9%) y cloroformo (99,0%) de JT Baker, acetato de etilo (99,8%) y diclorometano (99,8%) de Sigma-Aldrich, benceno (99,0%) de Merck, metanol (99,8%) y etanol (99,0%) de Sintorgan (Buenos Aires, Argentina).

2.2.8 Reactivos utilizados como agentes reductores

Los siguientes reactivos Sigma-Aldrich fueron utilizados como agentes reductores: yoduro de potasio (KI), FeCl_2 y tiourea al 99,0% de pureza, ácido ascórbico (99,7%), ácido cítrico (99,5%) y cisteína (97,0%).

2.2.9 Preparación de soluciones de iones interferentes

Para los estudios de potenciales interferentes, las soluciones de aniones y cationes fueron preparadas a partir de reactivos de elevada calidad analítica y desde soluciones patrones de 1000 mg L^{-1} , procediéndose en cada caso a realizar las diluciones correspondientes para obtener las concentraciones requeridas en cada experimento.

2.2.10 Reactivos generales

Otros reactivos Merck utilizados en las metodologías propuestas fueron: HCl 37,0%(v/v) y H_2SO_4 97,0%(v/v) para ajuste del grado de acidez de soluciones de muestra y estándares. Tetraborato de sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) al 99,5% como reactivo buffer en procedimiento de limpieza de muestras de miel y NaOH (98,0%) para ajuste del pH. Digestión de muestras apícolas con H_2O_2 al 30%(v/v).

2.3 Síntesis y caracterización de líquidos iónicos magnéticos

2.3.1 Síntesis de líquidos iónicos magnéticos tipo imidazolio

$[\text{C}_8\text{mim}]_2\text{FeCl}_4$ y $[\text{C}_8\text{mim}]\text{FeCl}_4$ fueron sintetizados en base al método reportado por Wang [1]. Básicamente, fueron preparadas mezclas estequiométricas de solución de $[\text{C}_8\text{mim}]\text{Cl}$ (50%(v/v) disuelto en metanol) con $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ o $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (disueltos en solución de HCl 5 mol L^{-1}) y se mantuvieron bajo atmósfera de nitrógeno con agitación durante 4 horas. Luego se evaporó el solvente y los productos fueron lavados con agua desionizada para eliminar el exceso de FeCl_3 o FeCl_2 que quedaban en los MILs sintetizados. Finalmente, los MILs fueron secados al vacío a 90°C durante 48 horas.

Asimismo, el MIL $[\text{C}_8\text{mim}]_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ fue sintetizado según el método reportado por Jiang [2], donde se lleva a cabo el mismo procedimiento, pero con la utilización de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ disuelto en agua desionizada. Obteniéndose MILs solubles en agua. La estructura química y propiedades de los MILs tipo imidazolio sintetizados se pueden observar en la Tabla 2.1. Mientras que en la Fig. 2.1a, se puede observar un esquema de la reacción de síntesis.

2.3.2 Síntesis de líquidos iónicos magnéticos tipo fosfonio

$[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{FeCl}_4$, $[\text{P}_{1,1,1,4}]\text{FeCl}_4$, $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$, $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{MnCl}_4$, $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{CoCl}_4$ y $[\text{P}_{6,6,6,14}]_3\text{DyCl}_6$, fueron sintetizados siguiendo el método informado por Del Sesto [3]. Básicamente, se mezclaron cantidades estequiométricas de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{DyCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (disueltos en solución de HCl 5 mol L^{-1}) con solución clorofórmica al 50%(v/v) de $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{Cl}$ o $[\text{P}_{1,1,1,4}]\text{Cl}$. Se dejaron reaccionar durante 24 horas a temperatura ambiente bajo agitación constante. Posteriormente, el exceso de cloroformo se eliminó mediante un evaporador rotatorio y el producto obtenido se secó durante 12 horas a 60°C . Asimismo, el MIL $[\text{C}_8\text{mim}]_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ fue sintetizado según el método reportado por Doherty [4], donde se lleva a cabo el mismo procedimiento, pero con la utilización de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ disuelto en agua desionizada. Obteniéndose MILs insolubles en agua. La estructura química y propiedades de los MILs tipo fosfonio sintetizados se pueden observar en la Tabla 2.1 y en la Fig. 2.1b se puede observar un esquema de la reacción de síntesis.

2.3.3 Caracterización de líquidos iónicos magnéticos

Los MILs sintetizados fueron caracterizados por FTIR-ATR. Los principales grupos funcionales se confirmaron en cada MIL. Asimismo, la información espectral fue comparada con la reportada por otros autores. En la Fig. 2.2 se pueden observar los espectros obtenidos para los MILs tipo imidazolio y fosfonio sintetizados. Las frecuencias de absorción de grupos funcionales encontradas fueron: C-H (cadenas carbonadas), C-N (grupo ciano) y N-C (enlace de N imidazolio con cadena de carbono).

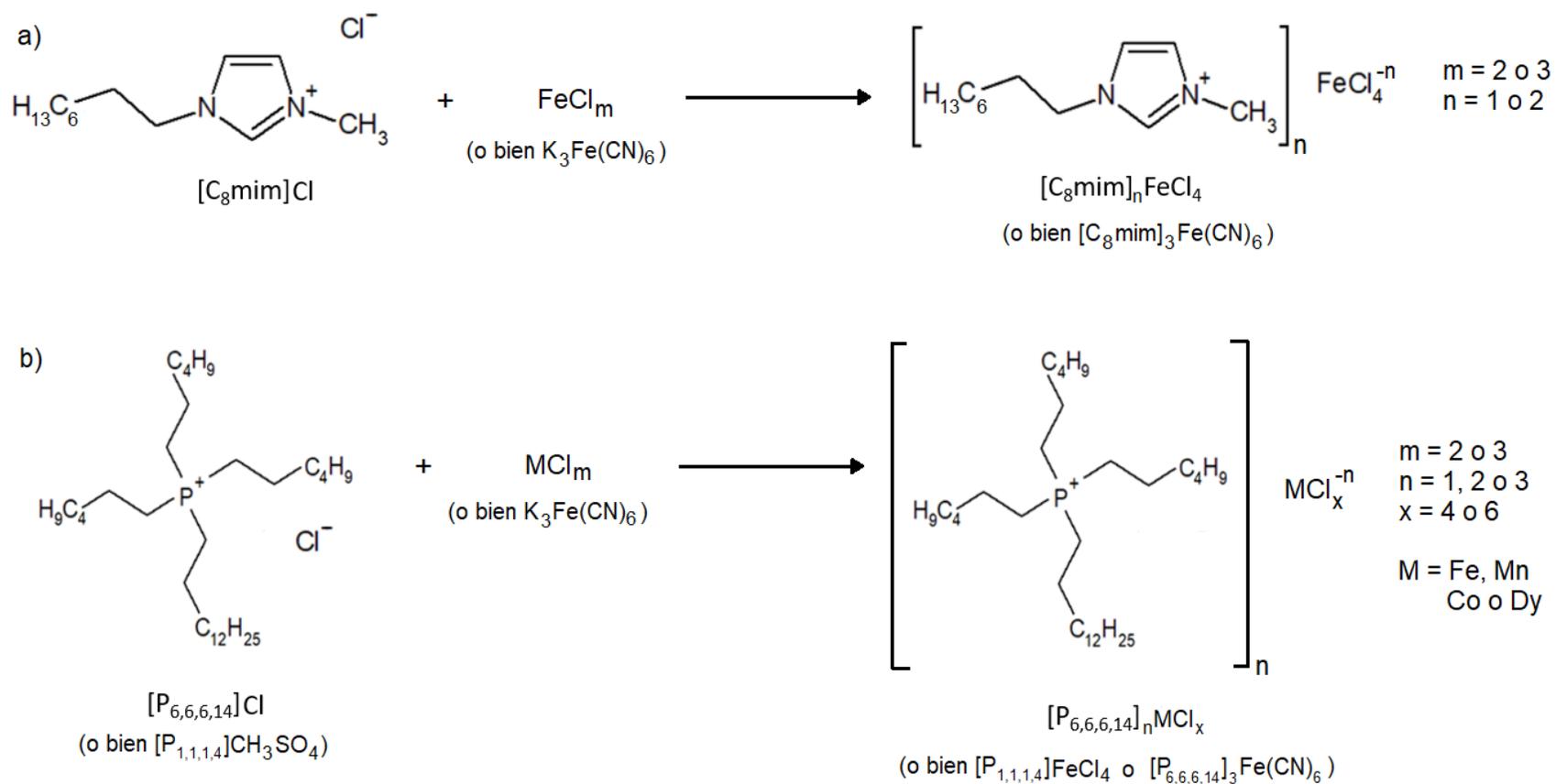
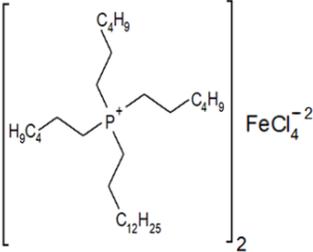
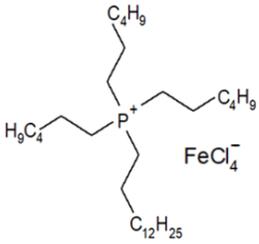
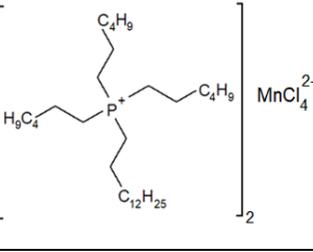
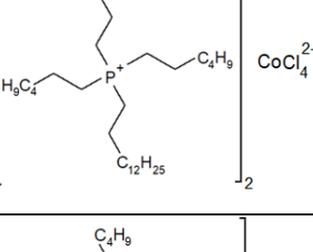
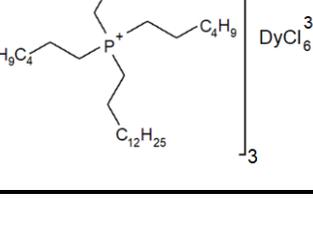


Fig. 2.1 Reacciones de síntesis planteadas para los MILs bajo estudio. (a) Tipo imidazolio y (b) tipo fosfonio.

Tabla 2.1 Estructura química y propiedades de los MILs sintetizados.

Nombre y fórmula química	Estructura química	Propiedades (25°C) [3, 5]		
		Susceptibilidad magnética (emu K mol ⁻¹)	Densidad (g mL ⁻¹)	Viscosidad (cP)
Tetracloroferrato (II) de 1-octil-3-metilimidazolio [C ₈ mim] ₂ FeCl ₄		< 4,01	~ 1,39	~ 77
Tetracloroferrato (III) de 1-octil-3-metilimidazolio [C ₈ mim]FeCl ₄		4,01	1,39	77
Hexacianoferrato (III) de 1-octil-3-metilimidazolio [C ₈ mim]Fe(CN) ₆		< 4,01	~ 1,39	~ 77
Tetracloroferrato (III) de trimetilbutil fosfonio [P _{1,1,1,4}]FeCl ₄		< 4,29	No reportado	Sólido
Hexacianoferrato (III) de trihexil(tetradecil)fosfonio [P _{6,6,6,14}] ₃ Fe(CN) ₆		< 4,29	0,942	5790

Tabla 2.1 Estructura química y propiedades de los MILs sintetizados (continuación).

Nombre y fórmula química	Estructura química	Propiedades (25°C) [6, 7]		
		Susceptibilidad magnética (emu K mol ⁻¹)	Densidad (g mL ⁻¹)	Viscosidad (cP)
Tetracloroferrato (II) de trihexil(tetradecil)fosfonio [P _{6,6,6,14}] ₂ FeCl ₄		< 4,29	~ 1,008	~ 4145
Tetracloroferrato (III) de trihexil(tetradecil)fosfonio [P _{6,6,6,14}] ₁ FeCl ₄		4,29	1,008	4145
Tetracloromanganato (II) de trihexil(tetradecil)fosfonio [P _{6,6,6,14}] ₂ MnCl ₄		4,23	0,949	75230
Tetraclorocobaltato (II) de trihexil(tetradecil)fosfonio [P _{6,6,6,14}] ₂ CoCl ₄		2,48	0,962	83450
Hexaclorodisprosiato (III) de trihexil(tetradecil)fosfonio [P _{6,6,6,14}] ₃ DyCl ₆		6,51	0,981	18390

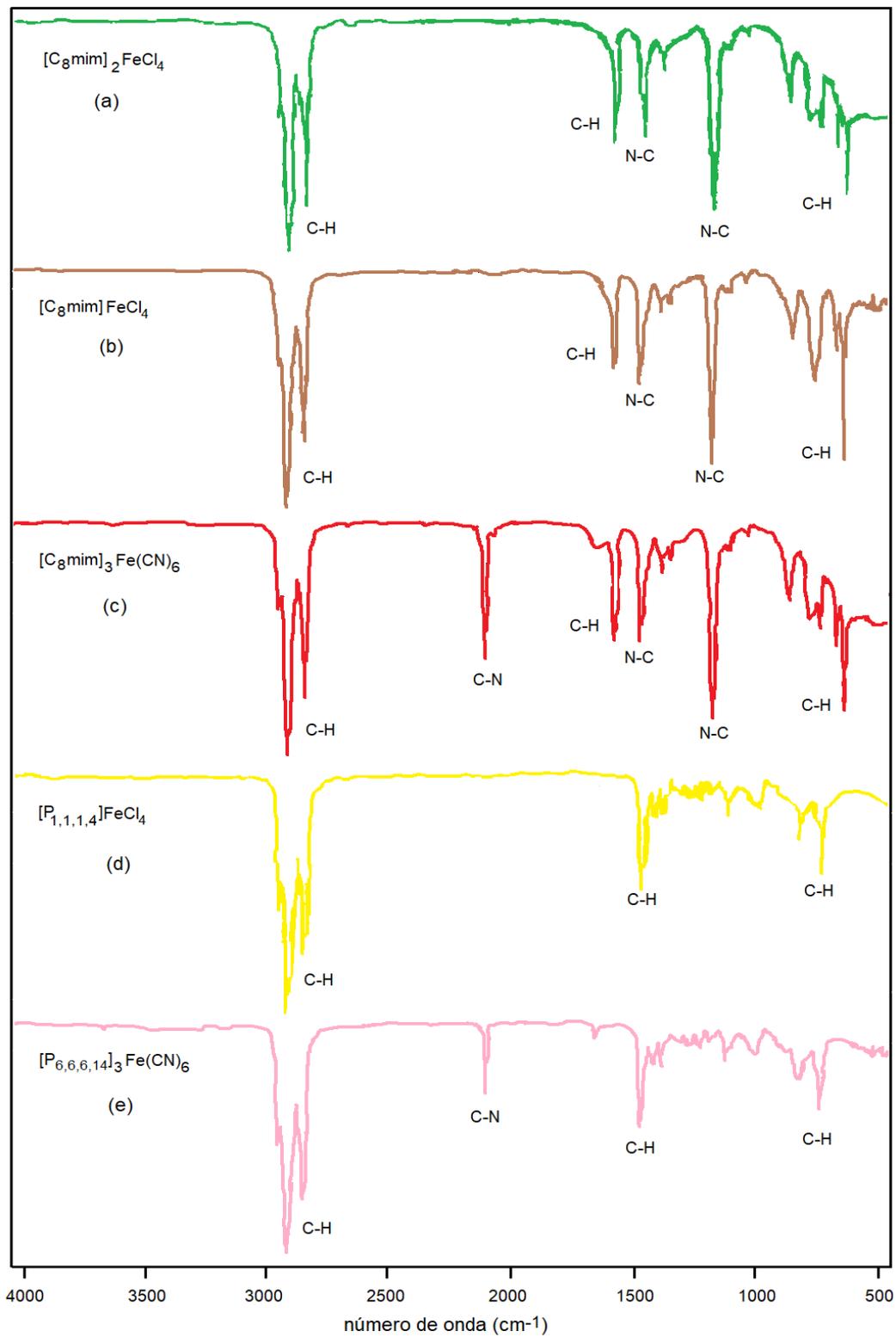


Fig. 2.2 Espectros IR de MILs imidazolio sintetizados. (a) $[\text{C}_8\text{mim}]_2\text{FeCl}_4$, (b) $[\text{C}_8\text{mim}]\text{FeCl}_4$, (c) $[\text{C}_8\text{mim}]_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, $[\text{P}_{1,1,1,4}]\text{FeCl}_4$ y $[\text{P}_{6,6,6,14}]_3\text{Fe}(\text{CN})_3$.

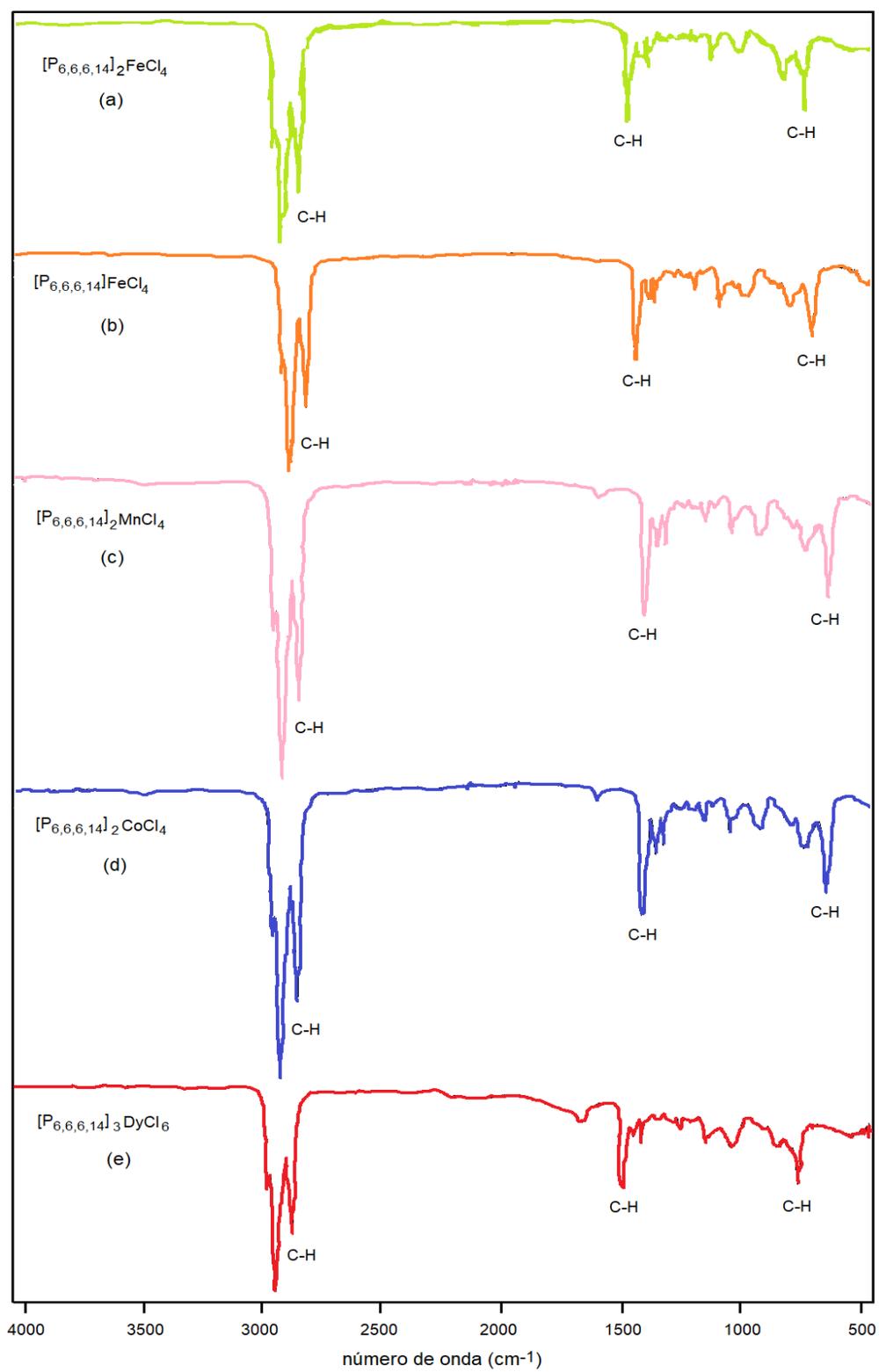


Fig. 2.2 (Continuación) Espectros IR de MILs fosfonio sintetizados. (a) $[P_{6,6,6,14}]_2FeCl_4$, (b) $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$, (c) $[P_{6,6,6,14}]_2MnCl_4$, (d) $[P_{6,6,6,14}]_2CoCl_4$ y (e) $[P_{6,6,6,14}]_3DyCl_6$.

2.4 Recolección y tratamiento de las muestras

2.4.1 Recolección de muestras apícolas

Los productos apícolas fueron comprados en mercados locales de la provincia de Mendoza (Argentina), mientras que otro conjunto de muestras de miel se obtuvieron de colmenas de diferentes regiones de la provincia, ubicadas lejos de plantas industriales o actividades antropogénicas intensas. Las muestras fueron almacenadas a 4°C en ausencia de luz hasta su análisis.

2.4.2 Clasificación de muestras de miel

Las muestras de miel difieren en su tonalidad debido a la diferente coloración del néctar de las flores que recolectan las abejas [8]. Para la clasificación de las muestras recolectadas, se propuso la escala de Pfund [9], la cual puede observarse en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Clasificación de muestras de miel según escala Pfund.

Nombre de la miel	Coloración	Escala Pfund (mm)	Densidad óptica
Blanca agua		0 - 8	0,095
Extra blanca		8 - 16	0,189
Blanca		16 - 34	0,378
Ámbar extra claro		34 - 50	0,595
Ámbar claro		50 - 85	1,389
Ámbar		85 - 114	3,008
Ámbar oscuro		114 - 140	-

El procedimiento consistió en el calentamiento de porciones de las muestras a 50°C para disolver los cristales de azúcar, posteriormente se prepararon soluciones de miel al

50% (p/v) y se determinó su tonalidad mediante espectrofotometría de absorción UV-Vis a 635 nm.

2.4.3 Procedimiento de dilución de muestras de miel

Para disminuir la viscosidad de las muestras de miel, fueron preparadas soluciones al 1% (p/v) de miel en HNO₃ al 1% (v/v) antes del análisis. Posteriormente, las muestras diluidas fueron utilizadas para la determinación de Cd. En la Fig. 2.3 se observa un esquema del tratamiento de muestra planteado.

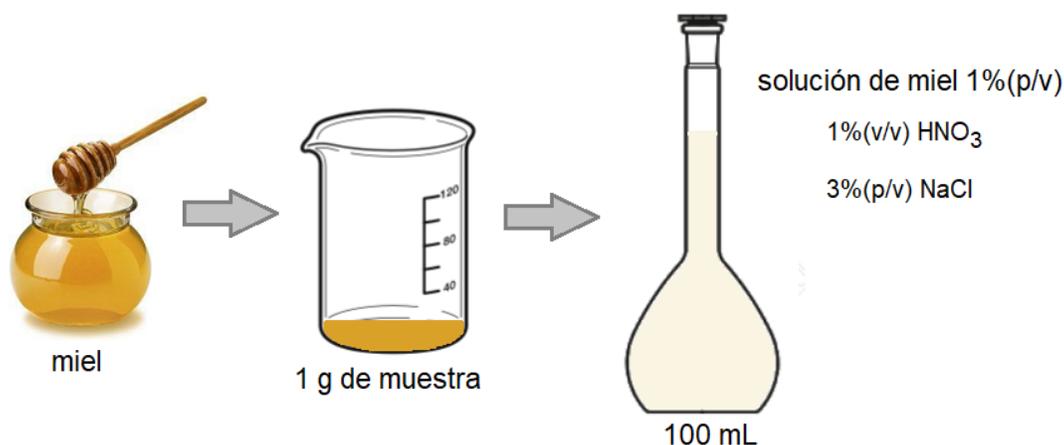


Fig. 2.3 Procedimiento de dilución y acondicionamiento de las muestras de miel.

2.4.4 Procedimiento de limpieza de muestras de miel

Se prepararon soluciones de miel al 1% (p/v) diluyendo las muestras en agua ultrapura. A alícuotas de 8 mL se les agregaron 100 μ L de solución buffer de Na₂B₄O₇ 1 mol L⁻¹ para ajustar el pH a 9,5 junto con 500 μ L de metanol como dispersante y 400 μ L de 1,6 x 10⁻³ mol L⁻¹ de 5-Br-PADAP como agente complejante para la separación de interferencias que pueden encontrarse en las muestras. La mezcla se dejó reposar durante 3 minutos y se añadieron 500 μ L de cloroformo, seguido de agitación vigorosa en vortex durante 4 minutos. Finalmente, se recogió el sobrenadante para continuar con la microextracción de As. En la Tabla 2.3 se pueden observar las condiciones de limpieza de las muestras,

mientras que un esquema del tratamiento de las muestras de miel se puede observar en la Fig. 2.4.

Tabla 2.3 Condiciones para la limpieza de muestras de miel previo a la determinación de As.

Condiciones de clean-up de las muestras	
Solución de muestra	8 mL (miel al 1%(p/v))
Concentración de buffer	$12,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$
Volumen de dispersante	500 μL de metanol
Volumen y concentración de quelante	$8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de 5-Br-PADAP
Volumen de agente extractante	500 μL de cloroformo
Tipo y tiempo de agitación	Vortex, 4 min

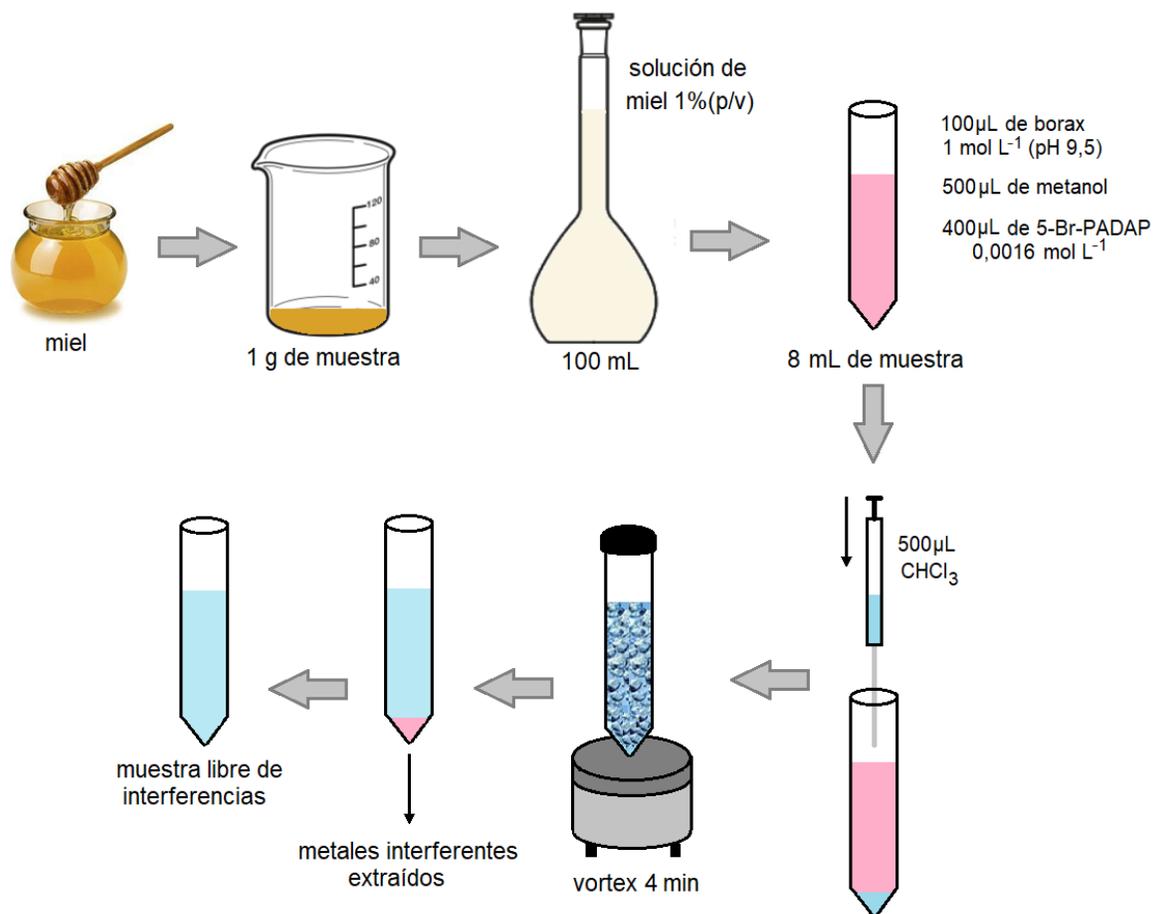


Fig. 2.4 Procedimiento de dilución y limpieza de las muestras de miel.

2.4.5 Procedimiento de calcinación de muestras de miel

Las muestras de miel fueron calcinadas de acuerdo a procedimiento reportado en la literatura [10]. Se pesaron 2 g de miel húmeda en crisoles de porcelana y se añadieron 2 mL de H_2SO_4 al 50% (v/v). La calcinación de las muestras en un horno mufla se realizó gradualmente: 120°C durante 1 h, 350°C durante 1 h y 750°C durante 6 h. Las cenizas se disolvieron con 50 mL de solución 1 mol L^{-1} de HCl. Posteriormente, las muestras de miel calcinadas fueron utilizadas para la determinación de Cr. En la Fig. 2.5 se puede observar un esquema del tratamiento de muestra planteado.

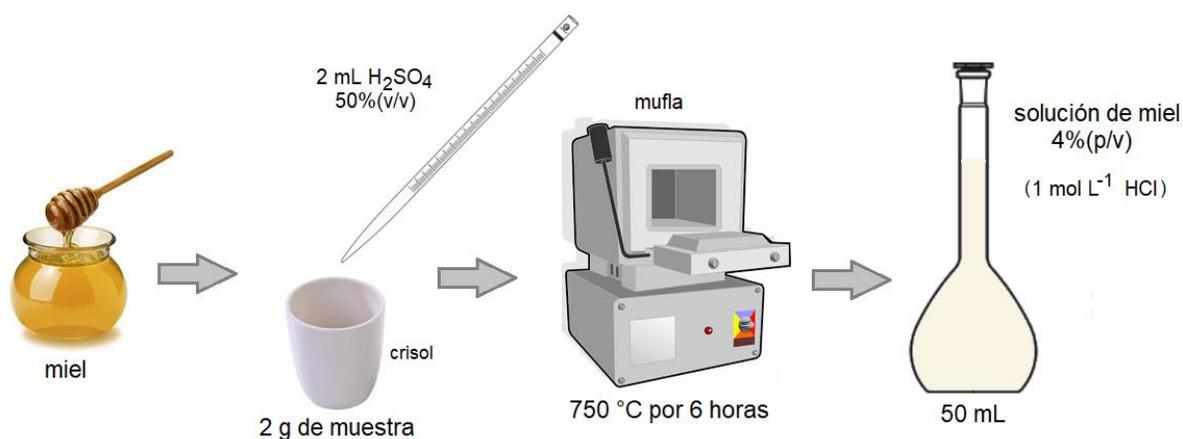


Fig. 2.5 Tratamiento de calcinación de las muestras de miel.

2.4.6 Procedimiento de digestión de muestras apícolas

Las muestras apícolas fueron digeridas de acuerdo a un procedimiento reportado en la literatura [11]. A 1 g de miel (o bien 1 mL de hidromiel, vinagre de miel y cerveza de miel) se le añadieron 6 mL de HNO_3 al 63% (p/v) y 2 mL de H_2O_2 al 30% (v/v), en vaso de precipitado. La digestión de las muestras se llevó a cabo gradualmente hasta casi sequedad y finalmente el volumen obtenido se diluyó a 50 mL con agua ultrapura. Posteriormente, las muestras apícolas digeridas fueron utilizadas para la determinación de Pb. En la Fig. 2.6 se puede observar un esquema del procedimiento de digestión.

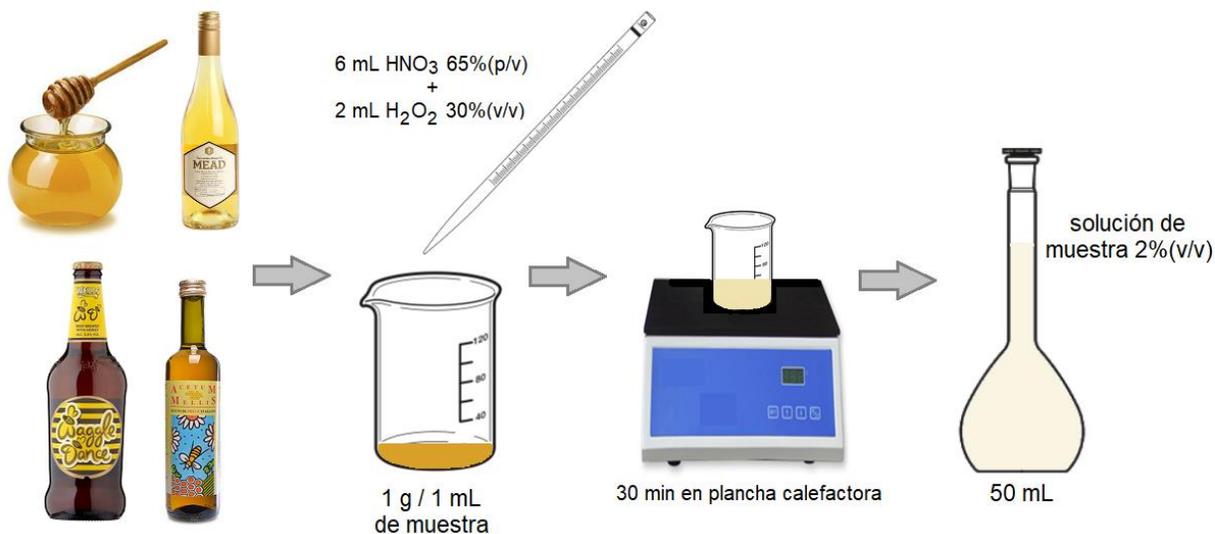


Fig. 2.6 Procedimiento de digestión de las muestras apícolas.

2.5 Metodologías de microextracción líquido-líquido dispersiva basadas en líquidos iónicos magnéticos

2.5.1 Determinación de Cd

Un volumen de 30 mL de solución de muestra (1% (p/v) de miel en 1% (v/v) de HNO₃) o solución estándar de 2 µg L⁻¹ de Cd(II) (para optimización), se colocaron en tubos de centrifuga graduados de 50 mL junto con 60 µL de 1 x 10⁻³ mol L⁻¹ de DDTP y 420 µL de HCl al 37% (v/v) para ajustar el pH a 0,5. La mezcla se agitó durante 1 minuto y se dejó reposar durante 2 minutos para asegurar la formación completa del complejo Cd-DDTP. Luego, se añadieron 100 µL de fase de extracción (50% (p/v) de [P_{6,6,6,14}]FeCl₄ en cloroformo) y 300 µL de acetonitrilo (dispersante). La mezcla se agitó durante 15 minutos con un agitador vortex. Posteriormente, se usó un imán para separar la fase de MIL de la fase acuosa. Finalmente, se añadieron 500 µL de HNO₃ al 1% (v/v) para retroextraer el analito de la fase de MIL, con agitación por ultrasonido durante 15 minutos. Se inyectó un volumen de 20 µL de la fase que contenía el analito en el horno de grafito de ETAAS para la determinación de Cd. La calibración se realizó contra estándares acuosos y soluciones

blanco. En la Fig. 2.7 se observa un esquema del procedimiento de microextracción utilizado y en la Tabla 2.4 las condiciones para una óptima extracción.

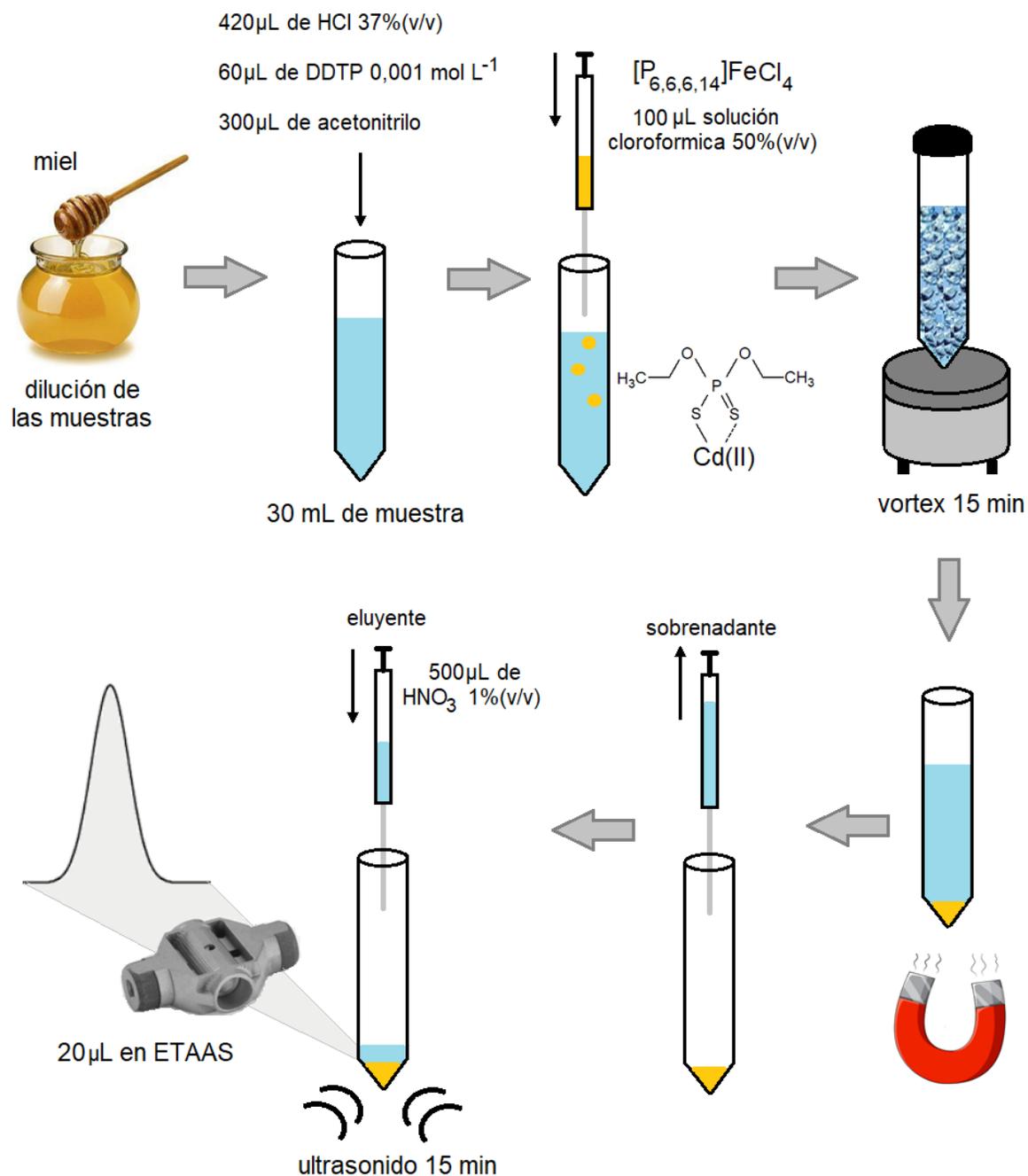


Fig. 2.7 Metodología MIL-DLLME-ETAAS desarrollada para la determinación de Cd en miel.

Tabla 2.4 Condiciones de extracción para la determinación de Cd en miel.

Condiciones de extracción	
Solución de muestra	30 mL (miel al 1%(p/v) en HNO ₃ al 1%(v/v))
pH	0,5 (ajustado con HCl 37%(v/v))
Concentración de DDTP	$2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$
Concentración de sal	3% (p/v) de NaCl
Volumen de dispersante	300 μL de acetonitrilo
Volumen de MIL	100 μL de [P _{6,6,6,14}]FeCl ₄
Tipo y tiempo de agitación	Vortex, 15 min
Condiciones de retro-extracción	
Agente de retro-extracción	500 μL de HNO ₃ al 1%(v/v)
Tipo y tiempo de agitación	Ultrasonido, 10 min
Volumen de inyección	20 μL

2.5.2 Determinación de As

Al sobrenadante obtenido luego del tratamiento de limpieza de la muestra (5 mL) se le añadieron 1,25 mL de HCl al 37% (v/v) para acidificación y 170 μL de KI al 30% (p/v) para reducir las especies de As a As(III). La mezcla se dejó reposar durante 3 minutos para asegurar la reducción de las especies de As y se añadieron 50 μL de solución de DDTP $6,7 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ junto con 100 μL de acetonitrilo como dispersante. Se dejó reposar nuevamente durante 3 minutos para asegurar la formación del complejo As(III)-DDTP. Posteriormente, se añadieron 50 μL de la fase de extracción (50% (p/v) de [P_{6,6,6,14}]FeCl₄ en cloroformo) y la mezcla se agitó por ultrasonido durante 8 minutos. Luego de la agitación, la fase de MIL se recogió con la ayuda de un imán de neodimio. El sobrenadante fue

eliminado mediante una pipeta de transferencia y se inyectaron 20 μL de la fase de extracción en el horno de grafito del instrumento ETAAS para la determinación de As. La calibración se realizó con estándares acuosos preparados en esas condiciones y sometidos al mismo procedimiento de extracción que las muestras en estudio. En la Fig. 2.8 se puede observar un esquema del procedimiento MIL-DLLME-ETAAS propuesto y en la Tabla 2.6 las condiciones de extracción óptimas.

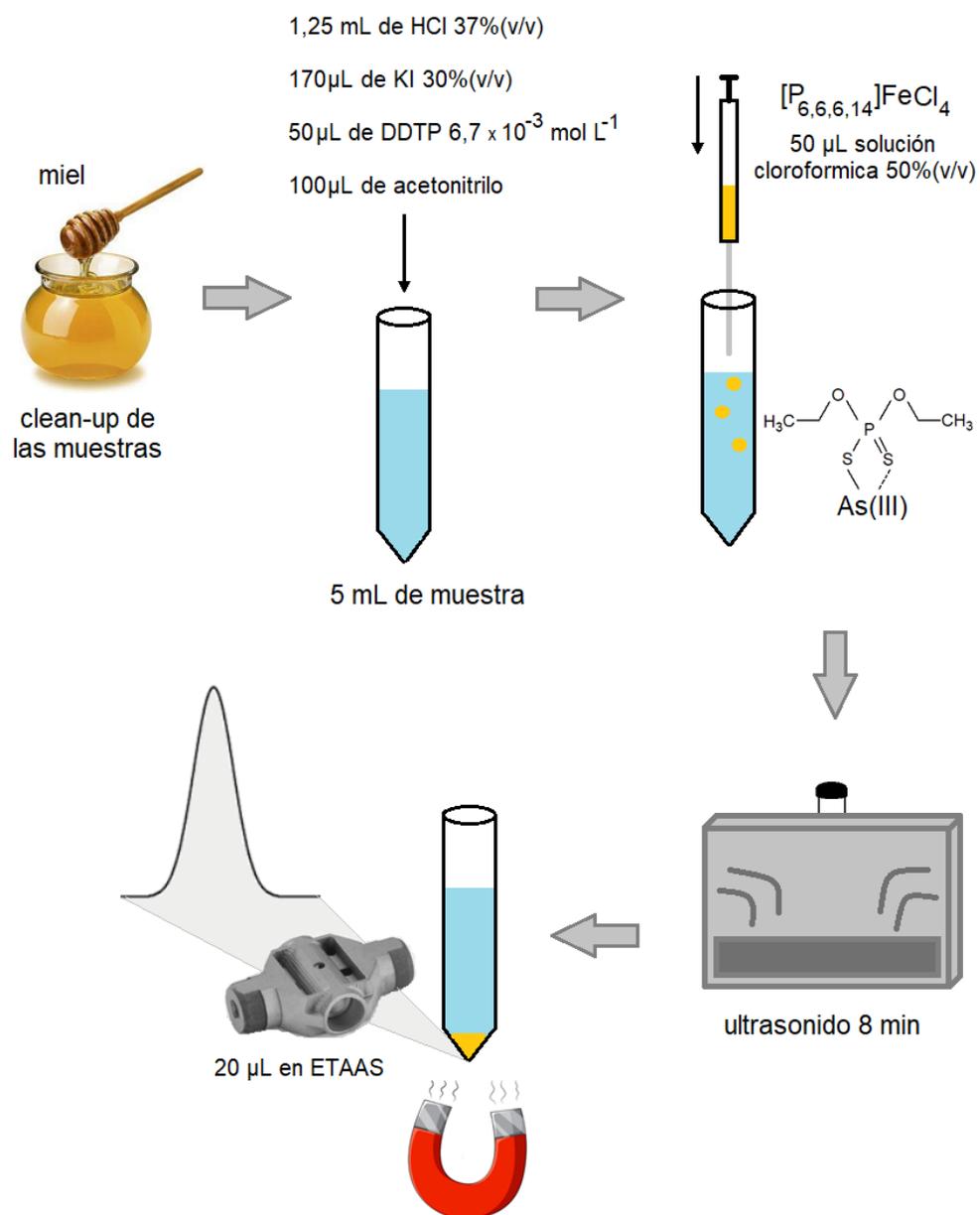


Fig. 2.8 Metodología MIL-DLLME-ETAAS desarrollada para la determinación de As en miel.

Tabla 2.5 Condiciones de extracción para la determinación de As en miel.

Condiciones de extracción	
Solución de muestra	5 mL (miel al 1%(p/v))
Concentración de HCl	3 mol L ⁻¹
Concentration de agente reductor	1% (p/v) de KI
Concentration de DDTP	6,7 x 10 ⁻⁵ mol L ⁻¹
Concentración de sal	2% (p/v) de NaClO ₄
Volumen de dispersante	100 µL de acetonitrilo
Volumen de MIL	50 µL de [P _{6,6,6,14}]FeCl ₄
Tipo y tiempo de agitación	Ultrasonido, 8 min
Volumen de inyección de MIL	20 µL

2.5.3 Determinación de Cr

A alícuotas de 6 mL de las soluciones de muestras de miel previamente calcinadas se le adicionaron 585 µL de HCl al 37% (v/v) para acidificar el medio, seguido de la adición de 110 µL de Fe(II) 1 mg L⁻¹ como agente reductor para evitar la oxidación de Cr(III), 140 µL de NaNO₃ al 50% (p/v) para ajustar la fuerza iónica y 50 µL de acetonitrilo como dispersante. Posteriormente, se añadieron 50 µL de [P_{6,6,6,14}]FeCl₄ y la mezcla se agitó en vortex durante 10 minutos. Luego de la agitación, la fase de MIL se recogió completamente sumergiendo una varilla magnética en la solución y posteriormente fue diluida en 150 µL de CHCl₃. Se inyectó una alícuota de 10 µL de la mezcla resultante en el horno de grafito del instrumento ETAAS para la determinación de Cr. La calibración se realizó con estándares acuosos preparados en condiciones idénticas a las de la muestra en estudio. En la Fig. 2.9 se observa un esquema de la metodología planteada y en la Tabla 2.6 las condiciones de extracción óptimas.

Tabla 2.6 Condiciones de extracción para la determinación de Cr en miel.

Condiciones de extracción	
Solución de muestra	7 mL (miel al 1%(p/v))
Concentración de HCl	1 mol L ⁻¹
Concentración de agente reductor	1% (p/v) de FeCl ₂
Concentración de sal	1% (p/v) de NaNO ₃
Volumen de dispersante	50 µL de acetonitrilo
Volumen de MIL	50 µL de [P _{6,6,6,14}]FeCl ₄
Tipo y tiempo de agitación	Vortex, 10 min
Volumen de inyección de MIL	10 µL

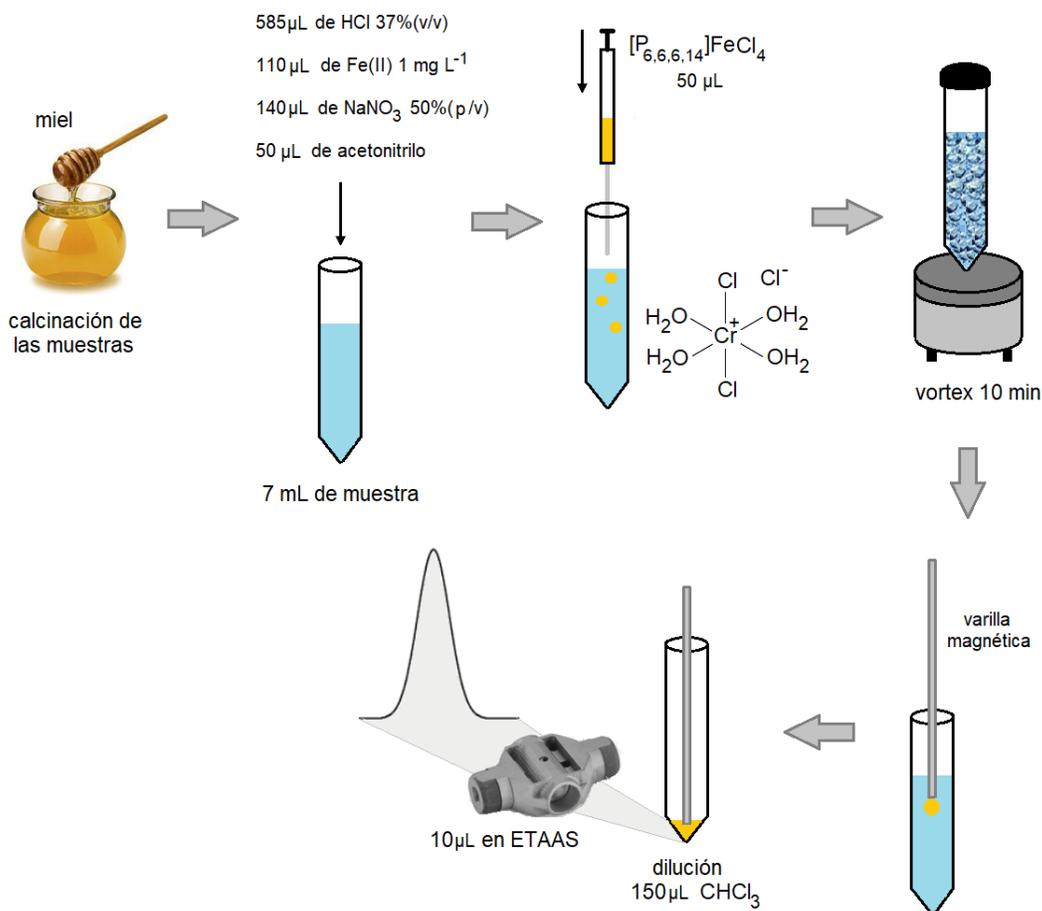


Fig. 2.9 Metodología MIL-DLLME-ETAAS desarrollada para la determinación de Cr en miel.

2.5.4 Determinación de Pb

A alícuotas de 8 mL de las soluciones de muestras apícolas previamente digeridas se les adicionaron 1335 μL de HCl al 37%(v/v) para acidificar el medio, seguido de la adición de 50 μL de 50 mg L^{-1} de DFC como agente complejante, 135 μL de NaCl al 30%(p/v) para ajustar la fuerza iónica y 35 μL de acetonitrilo como dispersante. Posteriormente, se añadieron 150 μL de fase extractante (50% (p/v) de $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{MnCl}_4$ en cloroformo) y la mezcla se agitó por vortex durante 8 minutos. Posteriormente, la fase de MIL se separó de la solución utilizando un imán y se inyectó una alícuota de 20 μL en el horno de grafito del instrumento ETAAS para la determinación de Pb. Un esquema del procedimiento desarrollado se puede observar en el Fig. 2.10 y en la Tabla 2.7 las condiciones óptimas de extracción.

Tabla 2.7 Condiciones de extracción para la determinación de Pb en productos apícolas.

Condiciones de extracción	
Solución de muestra	8 mL (miel al 2%(p/v), hidromiel, vinagre y cerveza de miel al 2% (v/v))
Concentración de HCl	2 mol L^{-1}
Concentración de DFC	0,3125 mg L^{-1}
Concentración de sal	0,5% (p/v) de NaCl
Volumen de dispersante	35 μL de acetonitrilo
Volumen de MIL	150 μL de $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{MnCl}_4$
Tipo y tiempo de agitación	Vortex, 8 min
Volumen de inyección de MIL	20 μL

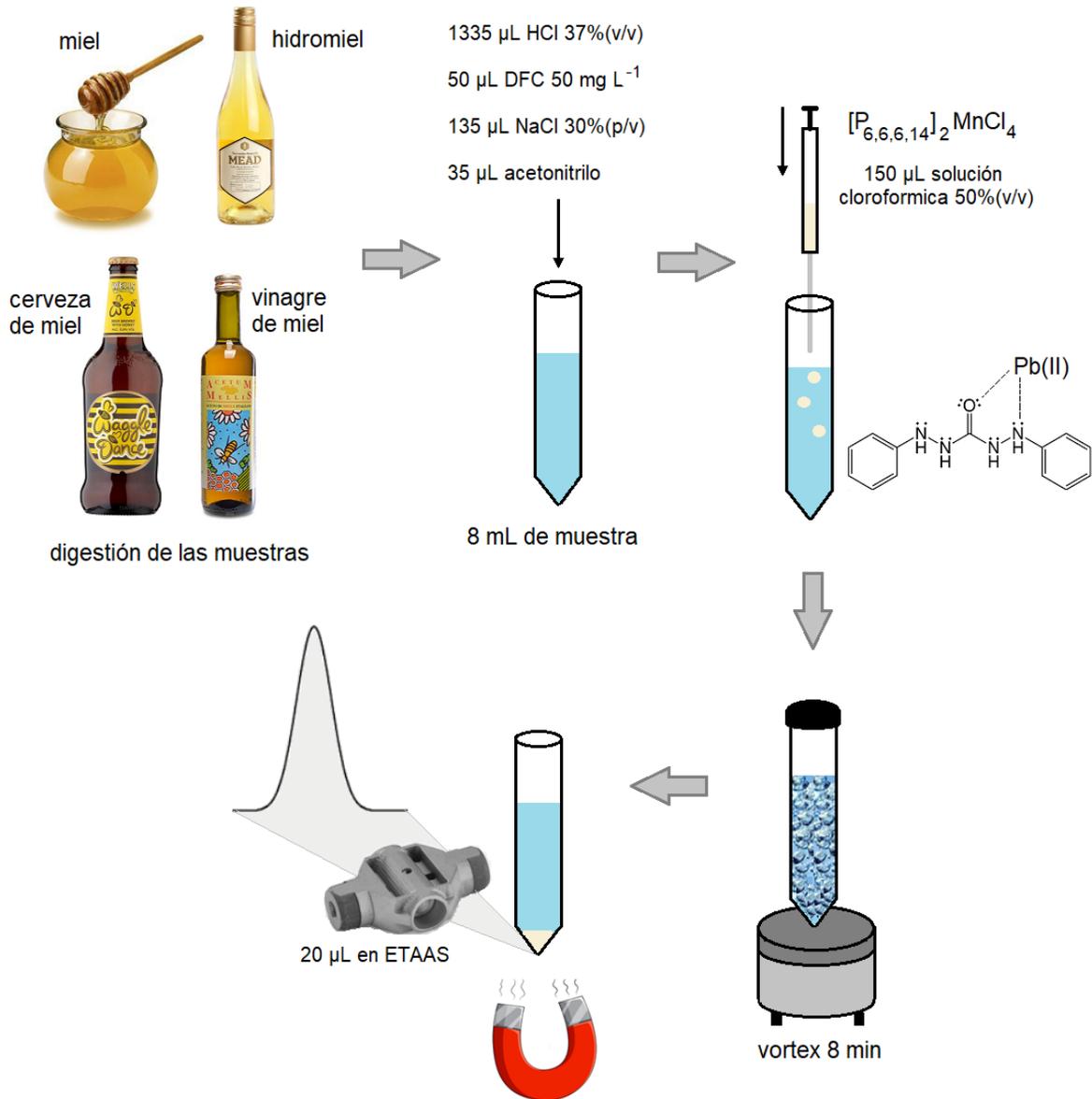
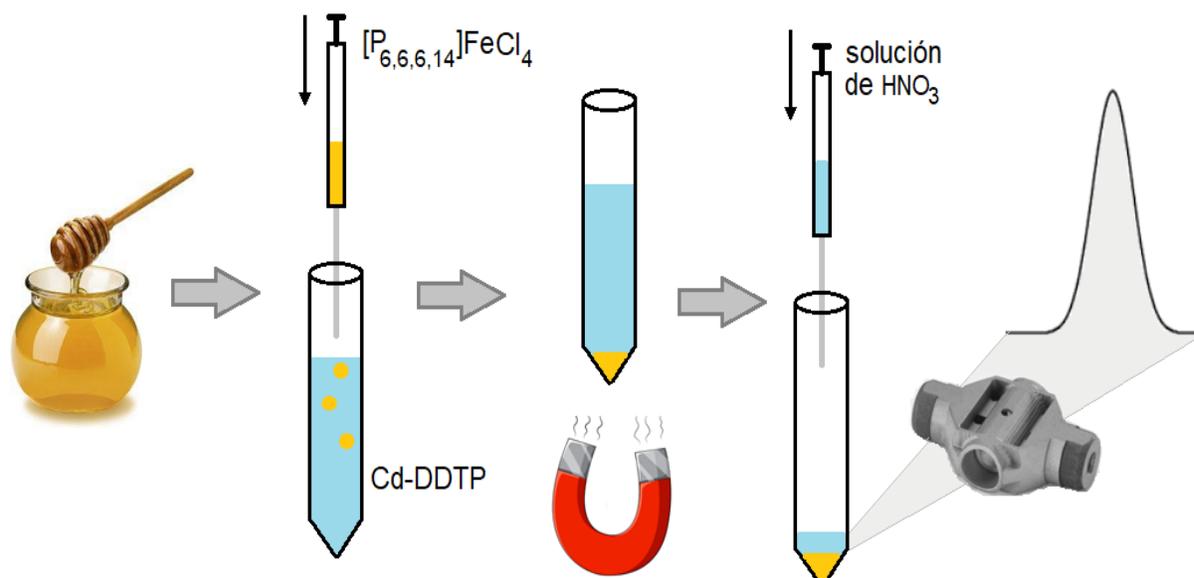


Fig. 2.10 Metodología MIL-DLLME-ETAAS desarrollada para la determinación de Pb en productos apícolas.

Capítulo 3: Resultados y discusión

3.1 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Cd en miel



3.1.1 Introducción

El Cd es un elemento altamente tóxico que se encuentra normalmente en la naturaleza a bajas concentraciones. Sin embargo, las actividades industriales pueden contribuir a aumentar la abundancia de Cd en el medio ambiente, principalmente debido a aguas residuales contaminadas y la combustión de carbones y aceites [1]. La acumulación de Cd en humanos puede provocar hipertensión, osteoporosis, trastornos pulmonares, hepáticos y renales [2]. Es por ello que el Comité Conjunto FAO/OMS sobre Aditivos Alimentarios establece una ingesta diaria máxima tolerable de Cd de $1,0-1,2 \mu g Kg^{-1}$ de

masa corporal [3], por lo que es necesario regular su concentración en todo tipo de alimentos y otros tipos de muestras que podrían representar rutas de exposición.

El control de las concentraciones de Cd en la miel y en los alimentos que incorporan miel en su formulación adquiere especial atención no solo para adultos sino también para bebés y niños pequeños que son consumidores frecuentes de miel y productos derivados. De esta manera, la regulación del MERCOSUR ha establecido un límite máximo permisible para Cd en miel de solo $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ [4].

La determinación exacta y precisa es un gran desafío analítico que requiere técnicas instrumentales muy sensibles y costosas, tales como ICP-MS, las cuales incluso podrían ser insuficientes para la cuantificación de trazas de Cd en miel. Una solución posible en dichos casos es la preconcentración, la cual es una herramienta muy eficiente para incrementar la sensibilidad de los métodos a través de procesos de enriquecimiento de los analitos. Hasta la fecha, se han informado diferentes técnicas de extracción para la preconcentración de Cd en muestras de miel, incluida la extracción en fase sólida (SPE) [5], extracción en punto nube (CPE) [6] y la microextracción líquido-líquido (LLME) [7].

Los ILs han demostrado ser agentes de extracción exitosos en LLME o pueden combinarse con técnicas de preconcentración basadas en SPE para la determinación de Cd en varias muestras de alimentos [8, 9]. Sin embargo, la separación de la fase sedimentada de la fase líquida se realiza por centrifugación, lo que causa un efecto negativo en el costo y la frecuencia del análisis. Del mismo modo, se requieren ILs más densos que el agua para lograr una separación efectiva de las fases después de la extracción del analito. Estos inconvenientes podrían resolverse completamente utilizando MILs, que ofrecen características sobresalientes, incluida una buena capacidad para la extracción de analitos inorgánicos y orgánicos, como también propiedades magnéticas [10]. Estas propiedades les confieren a los MIL la posibilidad de separar la fase sedimentada de la fase superior usando simplemente un imán, evitando así el paso de centrifugación clásico que

lleva mucho tiempo involucrado en la mayoría de los procedimientos LLME. Por ejemplo, el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ se ha sintetizado, caracterizado y aplicado en LLME para la extracción de compuestos orgánicos y biomoléculas [11]. Sin embargo, este MIL ha sido poco explorado para la extracción de iones metálicos tanto en desarrollos analíticos como tecnológicos [12].

El objetivo del presente trabajo fue el desarrollo de una técnica DLLME sin la utilización de centrifugación. Para ello, se investigó la implementación del MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ para la eficiente extracción y preconcentración de Cd. El elemento fue inicialmente quelado con DDTP y posteriormente se realizó la optimización de todas las variables experimentales que influyen en la microextracción, incluidos pH, agente complejante, volumen de MIL, tiempo de agitación, volumen de muestra y condiciones de retroextracción. El método propuesto se aplicó con éxito para la determinación de Cd a niveles ultratrazas en muestras de miel mediante la técnica MIL-DLLME y detección por ETAAS. Los efectos de la matriz y las posibles especies interferentes se estudiaron cuidadosamente para la determinación precisa de Cd. Cabe destacar que el método DLLME utilizando el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$, se reporta por primera vez en el campo analítico para la preconcentración y determinación de Cd.

3.1.2 Estudios preliminares para la determinación de Cd por ETAAS en la matriz de MIL

El objetivo principal de este trabajo fue realizar la extracción de Cd con un MIL seguido de la determinación de este elemento por ETAAS en presencia de la compleja matriz de este tipo de agente extractante en el horno de grafito. Por lo tanto, inicialmente se realizaron diferentes experimentos para evaluar la viabilidad de la determinación de Cd en presencia del MIL. Debido a la alta viscosidad de los MILs, fue necesario disolverlos en un solvente apropiado (50 μ L de metanol) antes de su inyección en el horno de grafito, con

el objetivo de superar los inconvenientes en la reproducibilidad. El disolvente seleccionado fue metanol debido a que se observó una solubilización apropiada de los MILs en este medio. Desafortunadamente, se observó que la detección de Cd se vio afectada negativamente por la matriz de MIL, con señales del analito no reproducibles y una notable señal de fondo. Por lo tanto, se realizaron experimentos para explicar este comportamiento inyectando 20 μL de solución patrón de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd(II) en presencia de diferentes concentraciones de Fe. Los resultados mostraron que el Fe interfería fuertemente en la señal de Cd a partir de 2 μg de Fe (Fig. 3.1.1). Este efecto se ha asignado a la interferencia espectral causada por el Fe sobre Cd en mediciones por AAS [13].

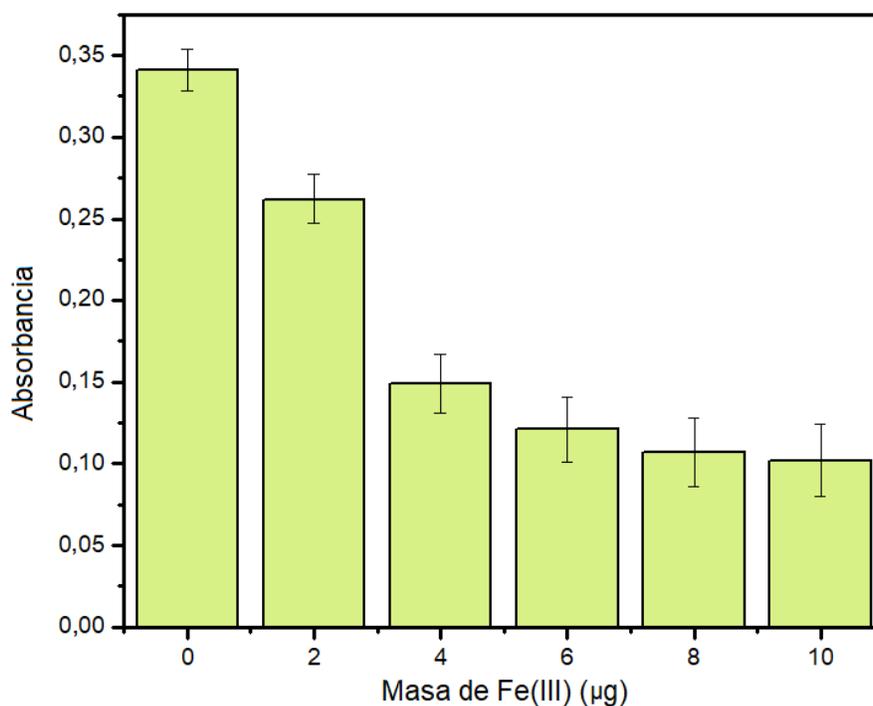


Fig. 3.1.1 Efecto de diferentes cantidades de Fe(III) en la señal de Cd. Se inyectó un volumen de 20 μL de una solución estándar acuosa de 2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cd. Las condiciones instrumentales de ETAAS fueron las indicadas en la Tabla 3.1.1 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Sin embargo, es importante destacar que el efecto interferente fue notorio aun cuando la masa de Fe fue significativamente menor que la contribución realizada mediante

la inyección de la fase de extracción de MIL (4,11 μg de Fe en 100 μL de fase de extracción de $[\text{P}_{6,6,6,14}\text{FeCl}_4]$). Por lo tanto, las altas concentraciones de Fe presentes en los MILs fueron la principal causa de interferencia severa en la determinación de Cd por ETAAS. Además, aunque se analizaron diferentes rampas de calentamiento y temperatura durante los pasos de pirólisis y atomización, lo que permitió la eliminación gradual de la matriz orgánica y evitó la pérdida del analito, no fue posible superar la interferencia causada por el Fe.

Por lo tanto, en este trabajo se necesitó de un procedimiento de retroextracción para separar el analito de la fase de extracción de MIL antes de su determinación por ETAAS. Para la evaluación de las condiciones de extracción de Cd con el método MIL-DLLME propuesto, se usaron 500 μL de una solución de HNO_3 al 1% (v/v) para la retroextracción y se inyectaron 20 μL de esta solución en el horno de grafito. Este volumen y concentración del agente de retroextracción se confirmaría experimentalmente mediante estudios de optimización adecuados.

La optimización del programa del horno de grafito se realizó inyectando la fase de retroextracción. La influencia de la temperatura de pirólisis y atomización sobre la absorbancia se estudió en el rango de 300-700°C y 1200-1600°C, respectivamente. La temperatura óptima de pirólisis fue de 500°C, temperaturas mayores causaron una pérdida significativa del analito y se observó que la señal analítica disminuía. Una vez que se seleccionaron las condiciones de pirólisis, se evaluó el efecto de la temperatura de atomización. Se encontró que el tiempo y la temperatura de atomización óptimos eran 4 segundos y 1400°C, respectivamente.

Para reducir las posibles interferencias de matriz y aumentar la precisión, se estudió el uso de diferentes modificadores de matriz y su combinación. Se analizaron cantidades individuales de cada modificador (5 μg de Pd, 3 μg de Mg y 50 μg de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) y las mezclas (5 μg de Pd + 3 μg de Mg y 3 μg de Mg + 50 μg de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Estos modificadores

fueron elegidos para este estudio, ya que generalmente proporcionan una buena estabilización térmica de Cd en el horno de grafito [13]. Además, la mezcla compuesta de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ y $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ se ha utilizado con frecuencia como un modificador de matriz para la determinación de Cd en miel [14]. En base a los experimentos realizados en este trabajo, la mejor relación señal/fondo para la determinación de Cd por ETAAS se alcanzó con 3 μg de Mg + 50 μg de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (otras condiciones se describen en la Tabla 3.1.1).

Tabla 3.1.1 Condiciones instrumentales ETAAS para determinación de Cd en miel.

Condiciones instrumentales				
Longitud de onda				228,8 nm
Ancho de banda espectral				0,7 nm
Corriente de lámpara EDL				170 mA
Modificadores de matriz				50 μg $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$
				(20 μL 2500 mg L^{-1})
				3 μg Mg [$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$] (20 μL 150 mg L^{-1})
Programa de temperatura del horno de grafito				
Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de meseta (s)	Flujo de argón (mL min^{-1})
Secado 1	110	10	30	250
Secado 2	130	10	30	250
Pirólisis	500	20	20	250
Atomización	1400	0	4	0
Limpieza	2400	1	2	250

3.1.3 Estudios de la formación del complejo

La extracción de elementos con ILs hidrófobos normalmente se realiza mediante la formación de un complejo de baja polaridad formado con un reactivo quelante orgánico que hace más eficiente su extracción en estos medios [15]. Por lo tanto, en este trabajo se estudió la complejación de Cd con un reactivo apropiado. Dado que las especies de Cd^{2+} pueden presentarse bajo esta forma química hasta pH 8, pero Fe^{3+} de la fase de MIL solo es estable hasta pH 2 [16], se anticipó la necesidad de formar un complejo con Cd(II) a pH inferior a 2 para evitar una posible descomposición química del MIL. Además, es bien sabido que Cd(II) forma un complejo estable con DDTP a valores de pH inferiores a 3 [17], lo que hizo de este reactivo una excelente opción para la formación de un quelato hidrófobo en condiciones muy ácidas. Otros reactivos orgánicos típicos como el dietilditiocarbamato (DDTC) y el pirrolidinditiocarbamato (APDC) que se han aplicado ampliamente para la extracción de elementos en solventes orgánicos se descartaron debido a la falta de estabilidad de sus complejos con Cd(II) a pH por debajo de 2.

Se estudió el efecto del pH sobre la formación del complejo Cd-DDTP y la eficiencia de extracción en el rango de 0,2 a 2, el cual fue ajustado con HCl. El MIL utilizado para este estudio fue $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$. Se obtuvo una eficiencia de extracción de aproximadamente el 70% para los valores de pH en el rango de 0,2 a 0,5; seguido de una disminución marcada en el rango de pH de 0,5 a 2 (Fig. 3.1.2). Por lo tanto, se seleccionó 0,5 como pH óptimo para el resto de los experimentos.

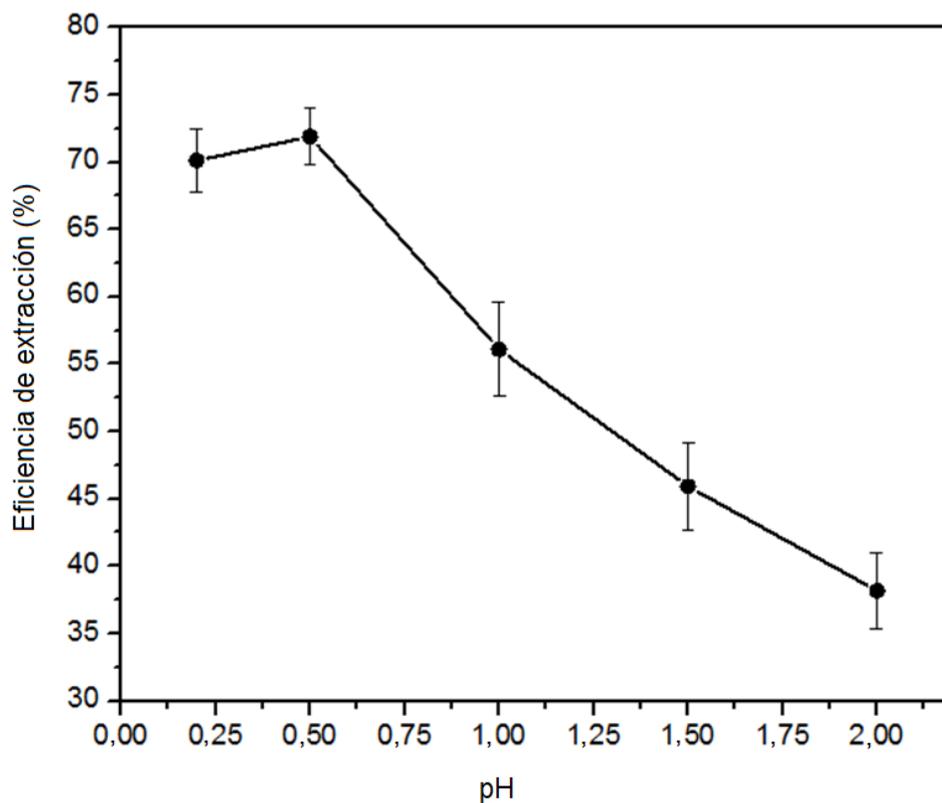


Fig. 3.1.2 Efecto del pH sobre la eficiencia de extracción de Cd por el método MIL-DLLME. Se utilizaron volúmenes de 80 μ L de $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ MIL y 20 mL de solución de muestra (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Posteriormente, se estudió el efecto de la concentración de DDTP, ya que era importante establecer una concentración mínima de reactivo para garantizar tanto la formación total del complejo como la mayor eficiencia de extracción posible. Se evaluaron diferentes relaciones molares de Cd:DDTP de 1:0 a 1:1000. La extracción de Cd no fue eficiente en ausencia de DDTP, lo que confirma que el reactivo era necesario para formar un complejo metálico de baja polaridad y lograr una eficiencia de extracción óptima. Asimismo, se observó que una relación molar de 1:10 era óptima para alcanzar la mayor eficiencia de extracción (Fig. 3.1.3). Por esta razón, fue seleccionada para experimentos posteriores.

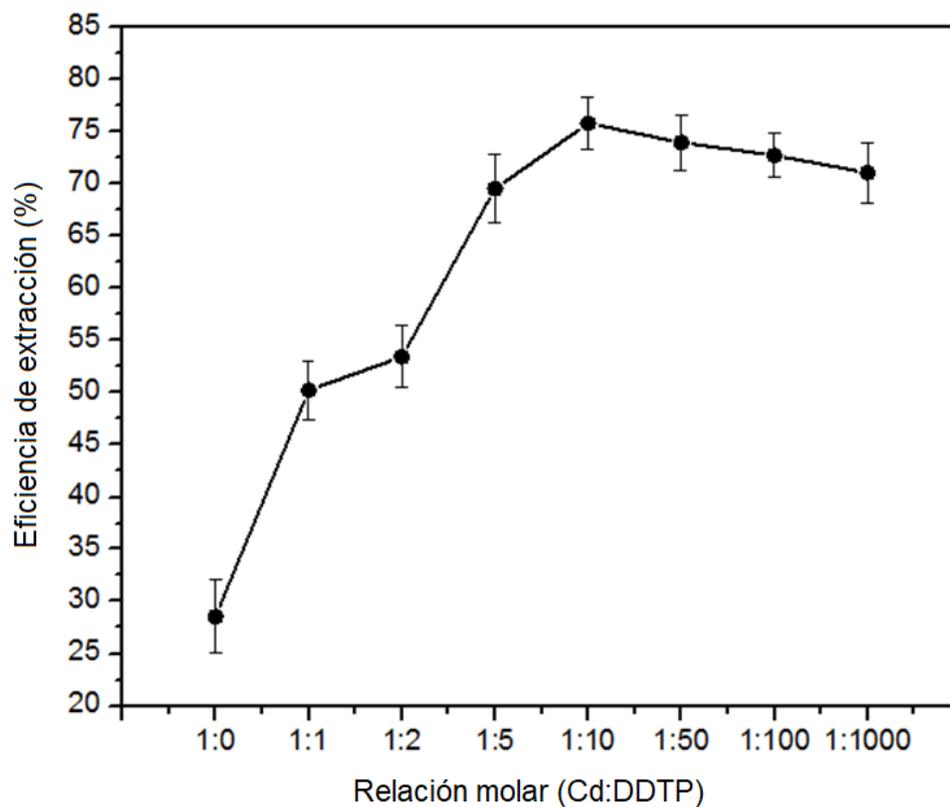


Fig. 3.1.3 Efecto de la concentración de DDTP en la eficiencia de extracción de Cd por el método MIL-DLLME. Se utilizaron volúmenes de 80 μ L de $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ MIL y 20 mL de solución de muestra (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.1.4 Selección del MIL como agente de extracción

En esta parte del trabajo de tesis, se evaluaron MILs de la familia imidazolio y fosfonio como agentes de extracción durante el desarrollo del método DLLME propuesto debido a su relativa hidrofobicidad y la posibilidad de evitar la etapa de centrifugación mediante la simple aplicación de un campo magnético proporcionado por un imán externo. En este trabajo, la fase de MIL se separó de la solución acuosa usando un imán de neodimio (50 (largo) \times 30 (alto) \times 10 mm (ancho)) con una inducción de campo magnético de 1,17 T [18].

Los MILs $[\text{C}_8\text{mim}]\text{FeCl}_4$ y $[\text{C}_8\text{mim}]_2\text{FeCl}_4$ se evaluaron como fases de extracción en el trabajo propuesto; sin embargo, mostraron un notable grado de solubilidad en la fase acuosa y se obtuvieron eficiencias de extracción insatisfactorios debido a una pérdida significativa de la fase extractante. Además, se estudió el uso del MIL $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$. Este MIL formó un sistema bifásico como consecuencia de su inmiscibilidad con el agua, lo que condujo a una mayor extracción de Cd que la obtenida con MILs imidazolio (alrededor del 36%).

Por otro lado, en este trabajo se estudió un MIL formado con el catión $[\text{P}_{6,6,6,14}]^+$ y el anión FeCl_4^{2-} ya que el Fe(II) puede ser más estable que el Fe(III) dentro de un rango de pH más amplio [16]. Sin embargo, $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{FeCl}_4$ fue atraído débilmente por el imán y, por lo tanto, la separación de la fase de extracción no fue satisfactoria. Este fenómeno puede explicarse por la susceptibilidad magnética más débil del $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{FeCl}_4$ en comparación con $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$, ya que el complejo FeCl_4^{2-} presenta 4 electrones no apareados en su orbital d más externo, mientras que 5 electrones no apareados presenta el complejo FeCl_4^- , como puede observarse en la Fig. 3.1.4. Por lo tanto, Fe(III) es una especie más paramagnética que Fe(II) [19]. Como la separación de la fase $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{FeCl}_4$ resultaba dificultosa con un imán, se aplicó centrifugación para separar completamente la fase de MIL. Sin embargo, se obtuvo una eficiencia de extracción relativamente baja (48%) con $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{FeCl}_4$. Por lo tanto, $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$ fue seleccionado como fase de extracción para desarrollar el método MIL-DLLME.

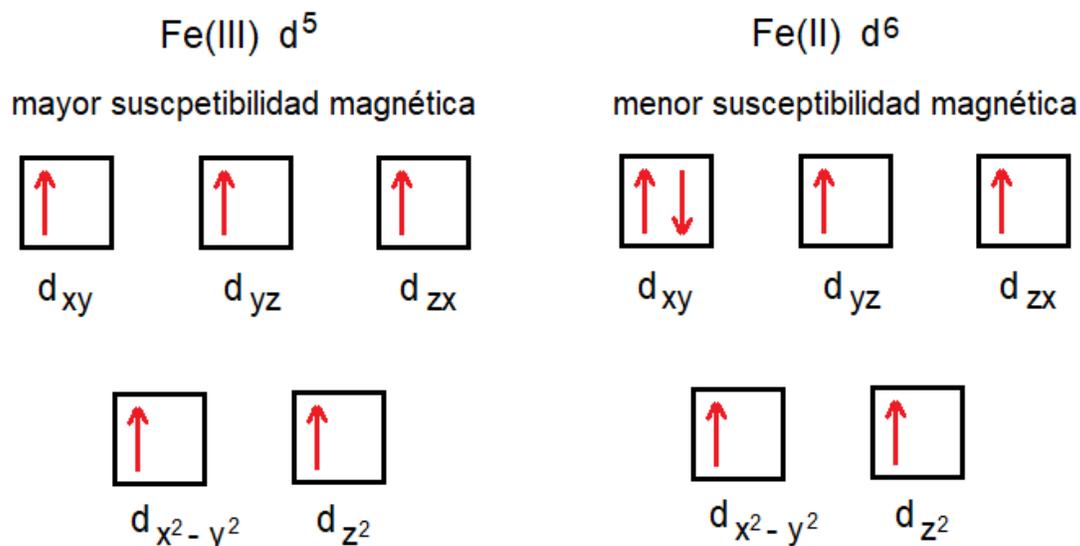


Fig. 3.1.4 Diagrama esquemático de la susceptibilidad magnética presentada por Fe(III) y Fe(II).

3.1.5 Determinación de la cantidad de MIL y volumen de muestra

Debido a su alta hidrofobicidad e inmiscibilidad con agua, el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ se consideró como un buen disolvente para formar sistemas bifásicos [20]. Sin embargo, fue necesario evaluar la cantidad mínima de MIL que permite obtener la mayor eficiencia de extracción. Del mismo modo, era deseable una proporción alta de muestra con respecto a la fase de extracción para lograr un factor de preconcentración lo más alto posible, mientras que una recuperación óptima del analito también podría depender de la cantidad del MIL. En este trabajo se analizaron diferentes volúmenes (20-120 μ L) de la fase extractante (50% (p/v) de MIL disuelto en cloroformo) y los resultados se observan en la Fig. 3.1.5. La eficiencia de extracción del sistema propuesto aumentó significativamente con el aumento del volumen de MIL. Un volumen de 100 μ L de MIL fue suficiente para alcanzar la mayor eficiencia de extracción.

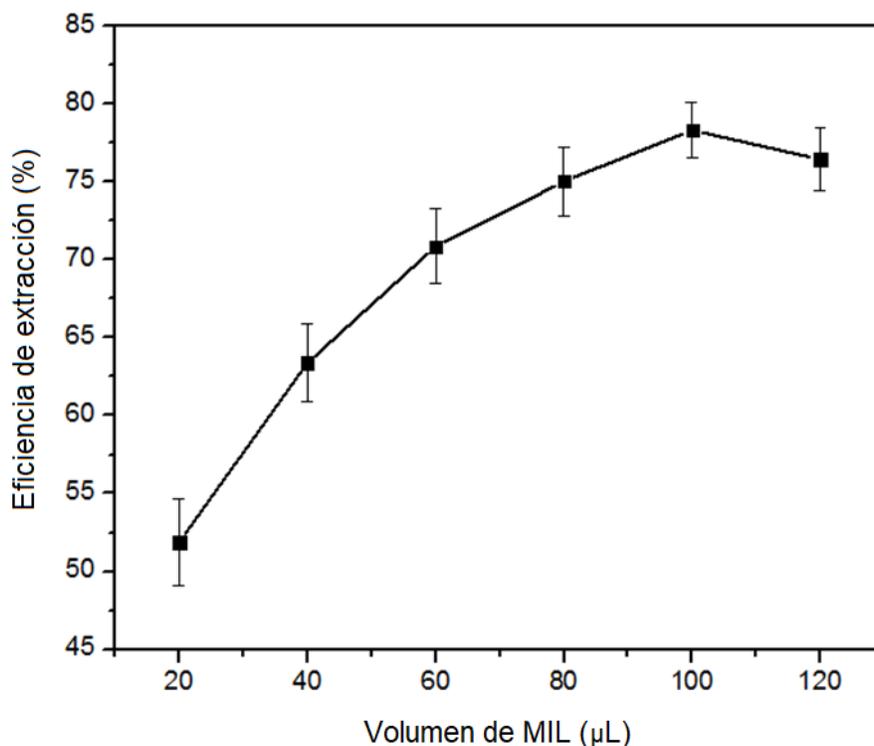


Fig. 3.1.5 Optimización del volumen de $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.4 y 3.1.1 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

El efecto del volumen de muestra en la extracción de Cd también fue estudiado. En este trabajo, los experimentos se realizaron con diferentes volúmenes de solución estándar $0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd. Se esperaba que cuanto mayor fuera el volumen de la muestra, más afectada se vería la eficiencia de extracción debido a la mayor solubilización del MIL en la fase acuosa. Sin embargo, la eficiencia de extracción no disminuyó significativamente para volúmenes de muestra de hasta 30 mL, ya que la fase de MIL permaneció inmisible en la fase acuosa. Como se muestra en la Fig. 3.1.6, la mayor eficiencia de extracción se obtuvo para 5 y 10 mL de muestra; sin embargo, estos volúmenes arrojarían factores de preconcentración bajos en base a la relación de volumen de fase de muestra y extractante más baja que la obtenida con 30 mL. Por lo tanto, se seleccionó un volumen de 30 mL de solución de muestra como óptimo, ya que mostraría el mayor compromiso entre la eficiencia de extracción y el factor de preconcentración.

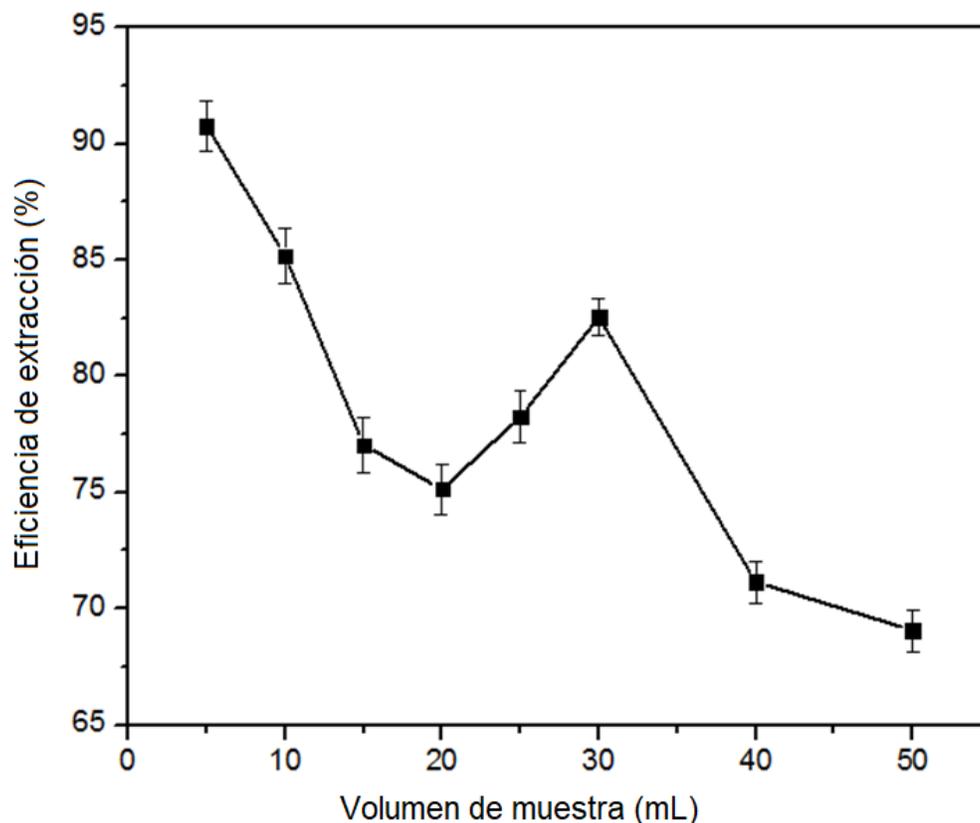


Fig. 3.1.6 Optimización del volumen de muestra. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.4 y 3.1.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.1.6 Optimización de las condiciones de dispersión

En este trabajo se evaluaron como dispersantes de la fase extractante: metanol, cloroformo y acetonitrilo. Se analizó el efecto de 100-500 μL de solventes en la extracción de Cd. Como se puede observar en la Fig. 3.1.7, la eficiencia de extracción fue baja para todos los volúmenes evaluados de cloroformo, debido a la alta solubilidad del MIL en este solvente, mientras que la eficiencia de extracción se incrementó usando acetonitrilo hasta 300 μL y luego se redujo ligeramente para volúmenes más altos, probablemente debido a una mayor solubilización de la fase de MIL en la solución acuosa. Se seleccionaron 300 μL de acetonitrilo como el volumen óptimo para obtener una dispersión satisfactoria.

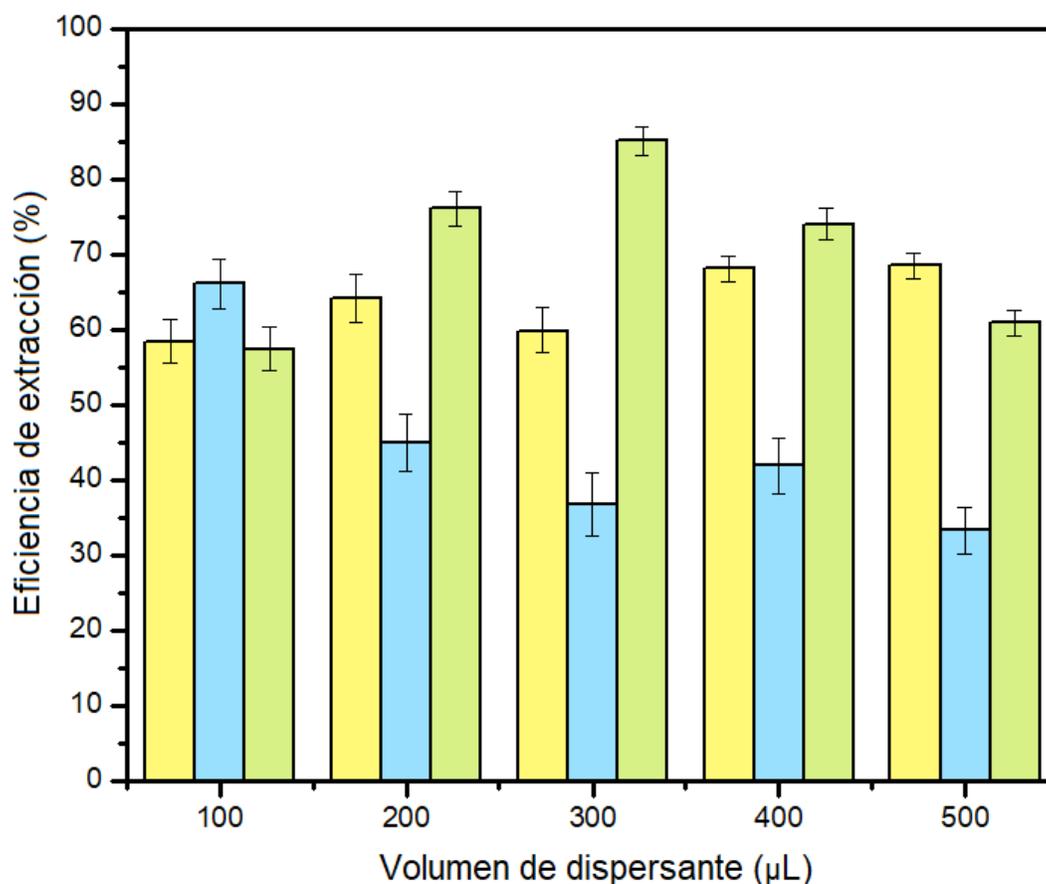


Fig. 3.1.7 Efecto del tipo y volumen de dispersante en el rendimiento de extracción de Cd por el método MIL-DLLME. ■ Metanol, ■ cloroformo y ■ acetonitrilo. Las condiciones de extracción fueron las que se observan en la Tabla 2.4 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

La mezcla eficiente de la fase de extracción y la solución de muestra suele ser uno de los pasos más largos en los métodos de extracción. Por esta razón, es importante establecer cuál es el tiempo mínimo de agitación para alcanzar la mayor eficiencia de extracción y a su vez la mayor frecuencia analítica. Por lo tanto, el efecto del tipo y tiempo de agitación en la extracción de Cd se evaluó usando agitación por vortex y ultrasonido de 0 a 25 min. Entre estos dos enfoques, se encontró que la agitación por vortex resultaba más efectiva (Fig. 3.1.8). De hecho, se obtuvo una eficiencia de extracción cercana al 50% con solo 1 minuto de agitación por vortex, lo que significa que la distribución del analito entre las fases ocurre muy rápidamente. La eficiencia de extracción se incrementó hasta el 89%

con 15 minutos y luego se redujo progresivamente. Este efecto podría explicarse considerando una descomposición parcial del complejo Cd-DDTP durante un tiempo de agitación prolongado, lo que podría favorecer la transferencia de Cd libre desde el MIL hacia la fase acuosa. En base a estos resultados, se seleccionó la agitación por vortex durante 15 minutos para estudios adicionales.

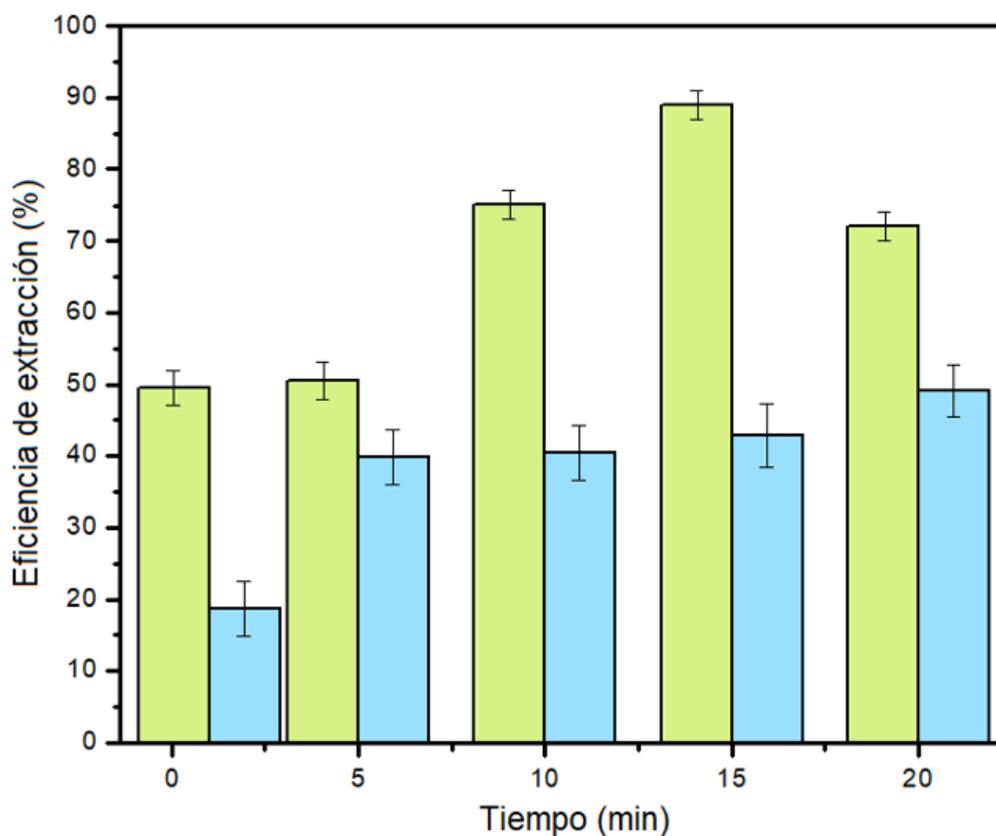


Fig. 3.1.8 Efecto del tipo y tiempo de agitación en la extracción de Cd. ■ Vortex y ■ ultrasonido. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.4 y 3.1.1 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.1.7 Influencia de la fuerza iónica

La adición de sal en los procedimientos de LLE puede aumentar el rendimiento de extracción debido al efecto “salting-out” [21]. Este efecto se estudió mediante la adición de NaCl y NaNO₃ en un rango de concentración de 0-5% (p/v). La eficiencia de extracción

aumentó de 89 a 93% cuando la concentración de NaCl aumentó hasta un 3% (p/v) y permaneció constante hasta un 5% (p/v) (Fig. 3.1.9). Por otro lado, el NaNO₃ mostró una menor eficiencia de extracción en comparación con el NaCl en todas las concentraciones analizadas en este trabajo. Esto puede explicarse considerando que el Cl⁻ según la serie de Hofmeister, favorece más eficientemente la interacción hidrófoba del complejo Cd-DDTP con la fase de MIL, produciendo una mayor eficiencia de extracción que la obtenida en presencia de NO₃⁻. Finalmente, se seleccionó NaCl al 3% (p/v) para experimentos posteriores.

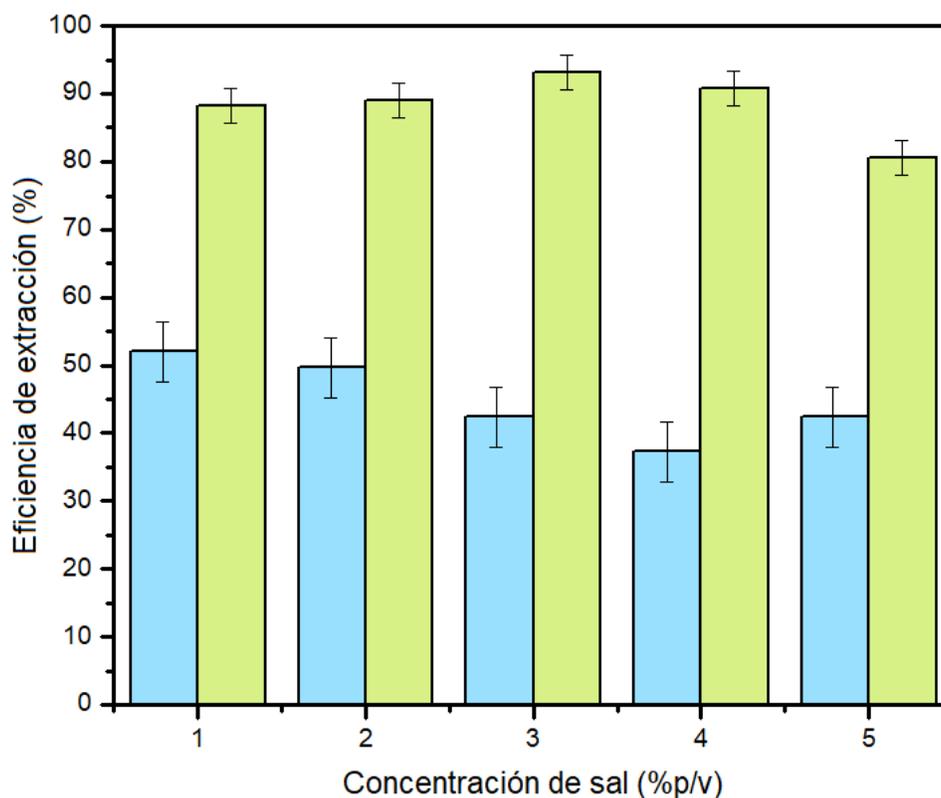


Fig. 3.1.9 Influencia de la fuerza iónica en la extracción de Cd. ■ NaNO₃ y ■ NaCl. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 3.1.1 y 3.1.2. (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.1.8 Condiciones de retroextracción de Cd desde la fase de MIL

Debido a que la determinación directa de Cd en la fase de MIL no fue factible a causa del fuerte efecto de interferencia causado por el Fe, se propuso una etapa de retroextracción para recuperar completamente el analito de la fase de MIL luego de la extracción. Se analizaron diferentes concentraciones y volúmenes de H₂O₂, HNO₃, HCl y H₂SO₄ con la aplicación de ultrasonido durante 5 a 30 minutos para la retroextracción de Cd con el objetivo de descomponer el complejo Cd-DDTP. En este estudio en particular, se ensayaron soluciones con concentraciones de estos reactivos en el rango de 1 a 5% (v/v) y volúmenes entre 100 y 500 µL. La mayor eficiencia de retroextracción de Cd se obtuvo utilizando 500 µL de HNO₃ al 1% (v/v). Estas condiciones fueron compatibles para la determinación de Cd por ETAAS, ya que se prefiere la medición de analitos por ETAAS en solución de HNO₃ diluido para obtener resultados reproducibles y precisos. Debe mencionarse que cuando los volúmenes de HNO₃ fueron inferiores a 100 µL, el Cd no se recuperó completamente de la fase de MIL, debido a la mezcla insuficiente de las fases incluso con la aplicación de ultrasonido. Un volumen de 500 µL de HNO₃ al 1% (v/v) y ultrasonido durante 10 minutos fueron las condiciones utilizadas para la extracción.

En la Fig. 3.1.10 se puede observar la señal obtenida en las condiciones óptimas de extracción y retroextracción para una solución estándar de 0,05 ng L⁻¹ de Cd.

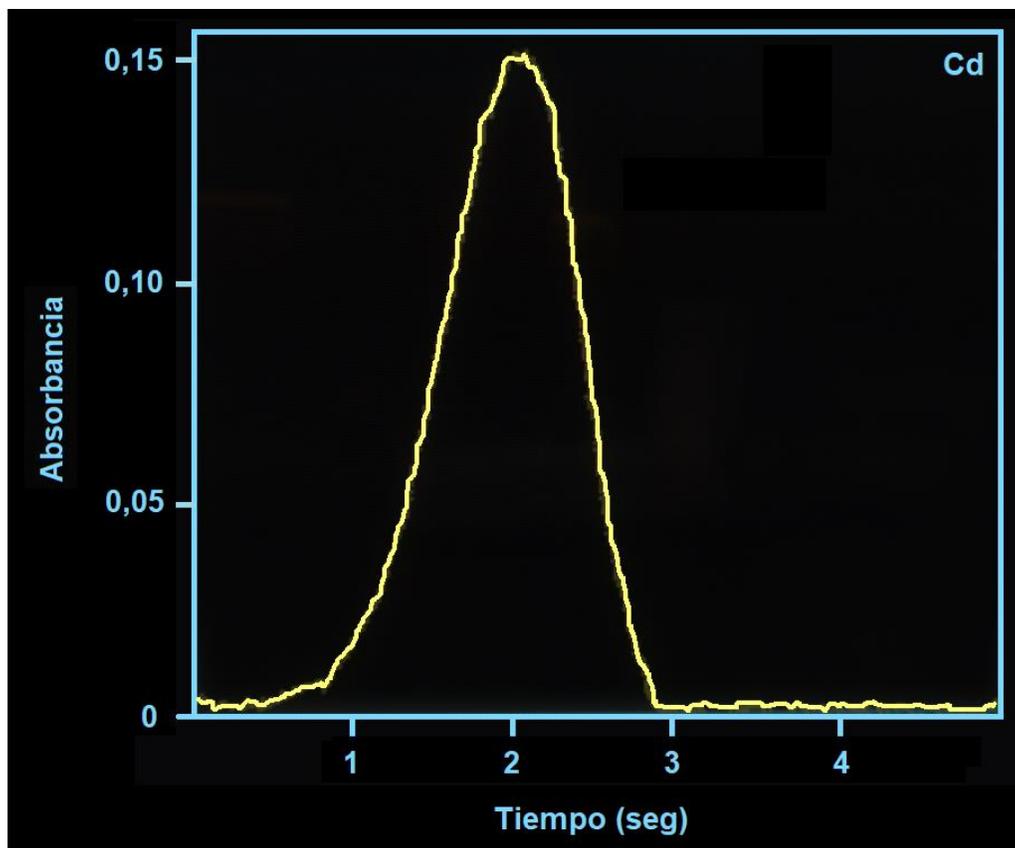


Fig. 3.1.10 Señal obtenida luego de la inyección de una solución de $0,05 \text{ ng L}^{-1}$ de Cd en condiciones óptimas del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.

3.1.9 Estudio de potenciales especies interferentes

Varios cationes como Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+ y Zn^{2+} , elementos tóxicos que incluyen Al^{3+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} , así como aniones comunes como Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} , son regularmente encontrados en muestras de miel [22]. Por esta razón, se evaluó su influencia en la determinación de Cd por el método propuesto. El estudio se llevó a cabo analizando una solución estándar de $0,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Cd que contenía cada ion concomitante a niveles de concentración en los que pueden estar presentes comúnmente en las muestras. En este caso, se consideró que un ion concomitante interfería cuando producía una variación de la señal analítica en $\pm 5\%$. Los resultados mostraron que los iones analizados no generaron efectos de interferencia hasta $300 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ en el caso de elementos

tóxicos y hasta 1000 mg L^{-1} para cationes esenciales y aniones comunes. Los iones generalmente presentes en las muestras en estudio no produjeron ninguna interferencia significativa en el rango analizado.

Además, se evaluó el efecto de los compuestos orgánicos típicos que se encuentran en la matriz de miel para la extracción y preconcentración de Cd. La miel contiene carbohidratos como componentes principales, que representan alrededor del 75% de su masa total [22]. Dado que la glucosa y fructosa se pueden encontrar como componentes principales, se realizó un estudio de interferencia con estos carbohidratos en concentraciones comúnmente encontradas en la miel. No se observaron efectos de interferencia significativos en el rango estudiado, lo que indica que los componentes mayoritarios y minoritarios de la miel no deterioraron la señal de absorbancia de Cd en las condiciones mencionadas en la Tabla 2.4 y 3.1.1.

3.1.10 Rendimiento analítico

El gráfico de calibración obtenido luego de la aplicación del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto para la determinación de Cd en muestras de miel fue lineal desde niveles cercanos al límite de detección (LOD) hasta al menos 240 ng L^{-1} , con un coeficiente de correlación de 0,9983 (Fig. 3.1.11). El LOD obtenido fue de $0,4 \text{ ng L}^{-1}$ de Cd ($0,04 \text{ } \mu\text{g}$ de Cd por Kg de miel), calculado en función de la señal en la intersección más 3 veces la desviación estándar en la regresión de la curva de calibración [23]. La desviación estándar relativa (RSD) fue del 3,8%, calculada en base a la medición de diez réplicas de $0,05 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de solución de Cd(II).

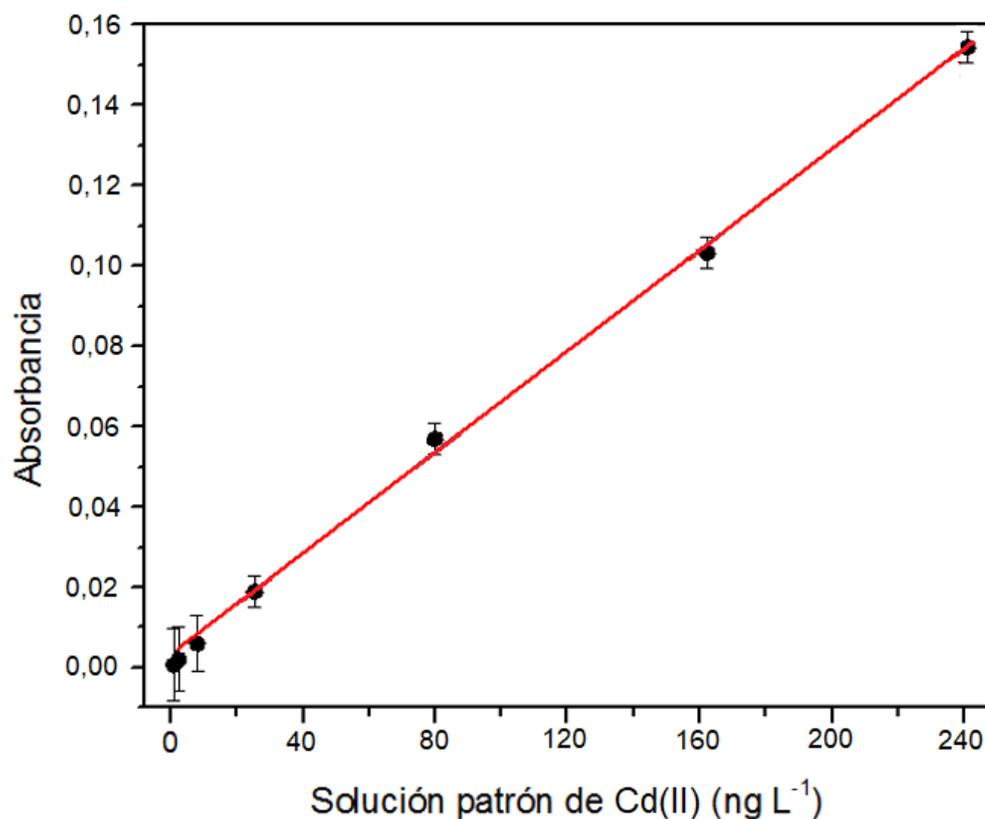


Fig. 3.1.11 Curva de calibración obtenida a partir del análisis de soluciones patrón de Cd(II) con el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto en condiciones óptimas (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

Asimismo, se evaluaron posibles efectos matriciales. Las pendientes de diferentes gráficos de calibración obtenidos para muestras de miel diluidas al 1, 5 y 10% (p/v) (al 1% (v/v) de HNO₃) y enriquecidas a diferentes concentraciones de Cd se compararon con el gráfico de calibración de los estándares acuosos. Se observó que solo cuando las muestras de miel se diluyeron al 1% (p/v), la pendiente del gráfico de calibración fue similar a la obtenida con los estándares acuosos, lo que significa que el efecto de matriz no se produjo en esa condición.

El factor de refuerzo de la sensibilidad (EF) se obtuvo de la relación de las pendientes de los gráficos de calibración antes y después de la aplicación del procedimiento MIL-DLLME. El EF obtenido con un volumen de muestra de 30 mL fue de 112. La eficiencia

de extracción se definió como la relación de masa total de Cd originalmente presente en la fase acuosa con respecto a la extraída en la fase de MIL y posteriormente retroextraída de la misma [24]. Se obtuvo una eficiencia de extracción del 93% cuando el procedimiento se desarrolló en condiciones experimentales óptimas (Tabla 2.4). En cuanto al tiempo de análisis, el procedimiento de preconcentración podría tomar aproximadamente 35 minutos por muestra. Sin embargo, es posible tratar muchas muestras simultáneamente si se utilizan varios imanes. Por lo tanto, la frecuencia de análisis está determinada principalmente por la velocidad de las mediciones ETAAS en lugar del tiempo transcurrido para la extracción. Consecuentemente, fue posible analizar al menos 10 muestras por hora con el método MIL-DLLME propuesto. A continuación, en la Tabla 3.1.2 se pueden observar los distintos parámetros que permiten evaluar el rendimiento analítico de la metodología desarrollada.

Tabla 3.1.2 Parámetros analíticos del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.

Parámetros	
Rango lineal	1,2-240 ng L ⁻¹
LOD	0,4 ng L ⁻¹
RSD	3,8 %
EF	112
Eficiencia de extracción	93,0 %
Frecuencia analítica	10 muestras h ⁻¹

Un estudio comparativo sobre el rendimiento analítico del método propuesto con respecto a otros trabajos ya informados en la literatura se puede observar en la Tabla 3.1.3. El método propuesto muestra un LOD y EF que son comparables o incluso mejores que otros métodos DLLME en la determinación de Cd basados en la aplicación de ILs y

determinación por ETAAS. A su vez, el método propuesto presenta un rango lineal comparable con otros métodos. Además, el uso del magnetismo intrínseco de los MILs simplifica el método DLLME porque evita el típico paso de centrifugación que requiere de mucho tiempo. Por otro lado, la etapa de retroextracción permitió la determinación de ultratrazas de Cd desde una matriz compleja como la fase de MIL.

3.1.11 Estudio de exactitud y determinación de Cd en muestras de miel

El método propuesto MIL-DLLME-ETAAS se aplicó para la determinación de Cd en muestras de miel. Debe mencionarse que dos candidatos para material de referencia certificado (CRM) para oligoelementos en miel han sido probados previamente [25]. Sin embargo, un CRM todavía no se comercializa, probablemente debido a problemas con la homogeneidad de la miel. Por esta razón, se propuso un estudio de recuperación a tres niveles de concentración como una estrategia alternativa para demostrar la determinación de Cd en presencia de la matriz de la muestra. Los valores de recuperación se encontraron en el rango de 95,5-102% (Tabla 3.1.4) lo que indicó que el método MIL-DLLME fue adecuado para la determinación de Cd en las muestras en estudio. Las concentraciones encontradas en las muestras de miel estaban en el rango de 5,3-16,4 ng g⁻¹ de Cd. Estos valores de concentración se encontraron por debajo de los límites máximos permisibles establecidos por la regulación del MERCOSUR y mantienen similitudes cercanas con los reportados en otros trabajos sobre determinación de Cd en miel [26].

Tabla 3.1.3 Métodos analíticos reportados en la literatura para preconcentración y determinación de Cd por IL-DLLME-ETAAS.

Extractante (cantidad)	Agente quelante	Dispersante (volumen)	LOD (ng L⁻¹)	RSD (%)	EF^a	Rango lineal (ng L⁻¹)	Muestra (cantidad)	Ref.
[C ₄ mim]PF ₆ ^b (0,7 g)	5-Br-PADAP	Etanol (1 mL)	2,0	3,5	40	6 - 5000	Agua (20 mL)	[27]
[C ₆ mim]PF ₆ ^c (73 µL)	DDTC	-	7,4	3,3	67	20 - 150	Agua (10 mL)	[28]
[C ₈ mim]NTf ₂ ^d (100 µL)	APDC	-	0,2	7,3	280	0,7 - 20	Agua y juguetes plásticos (10 mL)	[29]
TOMATS ^e (0,15 g)	TOMATS	Acetona (400 µL)	5,0	2,3	10	20 - 1420	Fluidos del cuerpo humano (10 mL)	[30]
[P _{6,6,6,14}]FeCl ₄ (100 µL)	DDTP	Acetonitrilo (300 µL)	0,4	3,8	112	2 - 250	Miel (30 mL)	Método propuesto

^aEF: Factor de refuerzo de la sensibilidad. Relación de las pendientes de las curvas de calibración para Cd con y sin el paso de preconcentración.

^bhexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio, ^chexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio

^dbis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metil imidazolio, ^etiosalicilato de trioctilmetilamonio

Tabla 3.1.4 Determinación de Cd en miel y estudio de recuperación (Intervalo de confianza del 95%; n = 6).

Muestra de miel	Añadido (ng L ⁻¹)	Encontrado (ng L ⁻¹)	Recuperación (%) ^a
1	0	163,6 ± 5,3 (16,4) ^b	-
	10	173,4 ± 5,4	98,0
	20	182,7 ± 5,7	95,5
	50	212,8 ± 4,7	98,4
2	0	107,1 ± 4,8 (10,7) ^b	-
	10	117,0 ± 4,7	99,0
	20	126,4 ± 5,1	96,5
	50	156,2 ± 4,1	98,2
3	0	129,4 ± 5,0 (12,5) ^b	-
	10	139,1 ± 5,5	97,0
	20	148,5 ± 5,7	95,5
	50	179,9 ± 4,9	101
4	0	53,4 ± 4,1 (5,3) ^b	-
	10	63,6 ± 4,0	102
	20	72,8 ± 4,6	96,9
	50	102,3 ± 3,7	97,8
5	0	92,1 ± 4,5 (9,2) ^b	-
	10	101,7 ± 4,9	96,2
	20	112,5 ± 5,2	102
	50	141,5 ± 4,3	98,8
6	0	74,5 ± 4,4 (7,4) ^b	-
	10	84,3 ± 4,5	97,7
	20	93,7 ± 4,6	95,9
	50	125,0 ± 3,8	101

^a(Encontrado-Base)/Añadido × 100

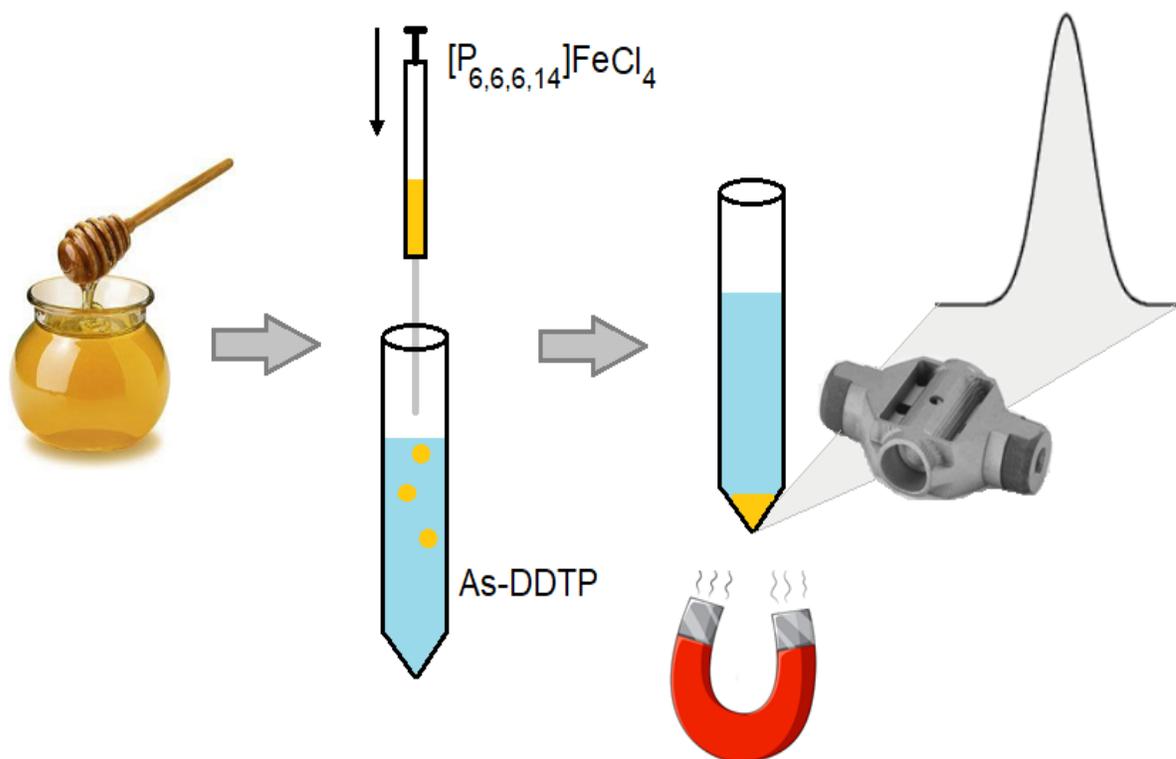
^bConcentración de Cd expresada como ng de Cd por g de miel (ng g⁻¹)

3.1.12 Conclusiones

Se ha demostrado que el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ es una excelente fase de extracción, que junto a la aplicación del agente quelante DDTP, permiten la extracción y determinación altamente eficiente de Cd a niveles ultratrazas en muestras de miel. Sin embargo, la aplicación de MIL para la preconcentración de analitos inorgánicos debe estudiarse cuidadosamente, principalmente porque el alto contenido de Fe u otros elementos paramagnéticos incluidos en su composición pueden causar efectos de interferencia durante la determinación elemental por espectrometría atómica.

El uso de la fase de MIL tiene como principal ventaja la posibilidad de separar las fases por medio de un imán, lo que simplifica el procedimiento DLLME al evitar los pasos de centrifugación. Se obtuvo un LOD muy bajo, del orden de los $ng L^{-1}$, con una buena recuperación analítica en base a la complejidad de la matriz analizada. Estas características hacen que el método propuesto pueda considerarse una herramienta valiosa para la determinación de Cd a niveles ultratrazas en miel y una opción atractiva para laboratorios de rutina dedicados al control de calidad de alimentos.

3.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de As en miel



3.2.1 Introducción

El As se considera un elemento altamente tóxico que usualmente está presente en bajas concentraciones en el agua, el aire, el suelo y los alimentos. Sin embargo, las actividades industriales contribuyen a aumentar la abundancia de As en el ambiente [1]. El As es tóxico para la mayoría de los organismos, pero el órgano diana más sensible es el riñón. Se considera un carcinógeno y conduce principalmente a cánceres de piel, riñón, pulmón, vejiga e hígado [2]. La mayoría de los alimentos presentan niveles bajos de As, generalmente por debajo de $0,25 \mu\text{g g}^{-1}$. Sin embargo, debido a su alta tasa de acumulación en el cuerpo, es necesario regular la concentración de As en todo tipo de alimentos que representan posibles vías de exposición [3].

El control de las concentraciones de elementos altamente tóxicos, como el As, en la miel y otros alimentos que incorporan miel en su formulación adquiere especial atención, ya que afecta la calidad y las propiedades del producto y ponen en riesgo la salud humana [4]. La regulación del MERCOSUR, con respecto a los límites máximos de contaminantes inorgánicos, ha establecido un límite máximo permitido para As en miel de solo $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ [5]. La determinación exacta y precisa de concentraciones tan bajas representa un gran desafío analítico, el cual requiere de técnicas instrumentales sensibles y costosas, como ICP-MS, que pueden resultar aún insuficientes para la cuantificación de trazas de As en miel. Como hemos mencionado previamente, una posible solución se basa en la preconcentración, la cual permite incrementar la sensibilidad de los métodos mediante el enriquecimiento de los analitos.

Se ha demostrado que los ILs son agentes de extracción exitosos para LLME [6] y se han aplicado en combinación con técnicas SPE para la determinación de As en muestras de alimentos de diferente complejidad [7]. Sin embargo, en la mayoría de los métodos de microextracción reportados hasta ahora, la separación de la fase de extracción se realizó por centrifugación, lo cual se puede resolver utilizando MILs que permiten la separación de fases por un campo magnético proporcionado por un simple imán [8].

El objetivo de esta parte de la tesis doctoral fue el desarrollo de una técnica DLLME con el MIL $[\text{P}_{6,6,6,14}\text{FeCl}_4]$ para la extracción eficiente y la preconcentración de As en una muestra compleja como la miel. La formación de un complejo estable entre As y DDTP junto con su transferencia a la fase de MIL se estudió en detalle. La optimización de todas las condiciones experimentales que influyen en el rendimiento del método DLLME se desarrolló mediante métodos univariados y multivariados. El método propuesto se aplicó con éxito para la determinación de As a niveles de concentración ultratrazas en muestras de miel con detección por ETAAS. Los efectos de matriz y las posibles especies interferentes se estudiaron cuidadosamente para la determinación precisa de As.

3.2.2 Selección de la fase extractante

Se evaluaron diferentes MILs como agentes de extracción durante el desarrollo del método DLLME propuesto en este trabajo. Se decidió evaluar MILs que contienen Fe(III) debido a que presentan una mayor susceptibilidad magnética que los conformados por Fe(II). Este fenómeno puede explicarse considerando que Fe(III) forma un complejo de alto spin cuando está bajo la forma de FeCl_4^- con 5 electrones no apareados, mientras que Fe(II), como FeCl_4^{2-} , solo tiene 4 electrones en su orbital d más externo. Por lo tanto, Fe(III) resulta ser más paramagnético que Fe(II) y sus compuestos también siguen este patrón [9]. Las extracciones se realizaron en condiciones ácidas a 1 mol L^{-1} de HCl. El MIL $[\text{C}_8\text{mim}]\text{FeCl}_4$ mostró cierto grado de solubilidad en la fase acuosa y se obtuvo un porcentaje de extracción insatisfactorio (31%) debido a la pérdida parcial de la fase extractante. Por otro lado, $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$ formó un sistema bifásico como consecuencia de su inmiscibilidad con el agua, lo que condujo a una mayor extracción de As (65%). Además, se ensayó $[\text{P}_{4,4,4,1}]\text{FeCl}_4$ en este trabajo, sin embargo, su alta viscosidad hizo que la utilización de este MIL no fuera práctica ya que no se atrajo significativamente con el imán, dando lugar a una eficiencia de extracción del 35%. Como la separación de fases de los MIL $[\text{P}_{4,4,4,1}]\text{FeCl}_4$ y $[\text{C}_8\text{mim}]\text{FeCl}_4$ resultó dificultosa con el imán, se debió aplicar una etapa de centrifugación para la separación completa de la fase de MIL. En base a estos resultados, se seleccionó el MIL $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$ en este trabajo como fase de extracción para desarrollar el método MIL-DLLME propuesto.

3.2.3 Influencia de la composición de la matriz de MIL en la detección de As por ETAAS

El objetivo principal de este trabajo fue realizar la extracción de As en la fase de MIL para su preconcentración, seguido de la determinación por ETAAS del analito directamente en la matriz de MIL. Las inyecciones preliminares de $20 \mu\text{L}$ de la fase extractante mostraron

que era posible detectar As en presencia de la matriz de MIL, aunque la señal de absorbancia del analito se vio afectada. Este efecto se atribuyó a la alta masa de Fe que presenta la fase de MIL. Por lo tanto, se realizaron diferentes experimentos para explicar este comportamiento inyectando 20 μL de una solución estándar acuosa de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) en presencia de diferentes cantidades de Fe (similar a las inyectadas en 20 μL de fase de MIL). Los resultados mostraron que el Fe interfirió fuertemente en la señal de As desde 0,2 mg de Fe (Fig. 3.2.1).

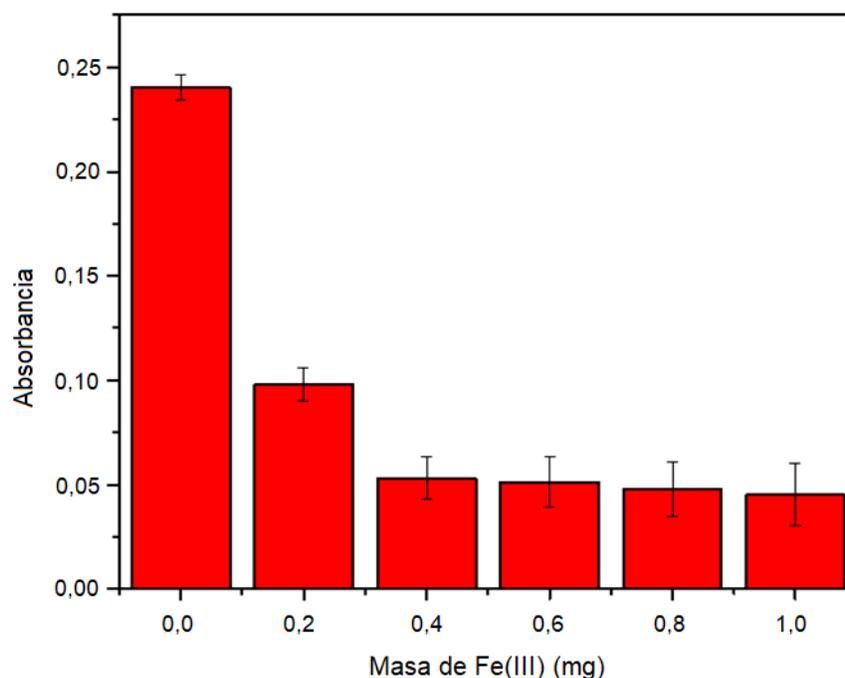


Fig. 3.2.1 Efecto del Fe(III) sobre la señal de As. Se inyectó un volumen de 20 μL de solución estándar acuosa de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As. Las condiciones instrumentales de ETAAS fueron las indicadas en la Tabla 3.2.1 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Este efecto se ha asignado a la interferencia espectral causada por el Fe en la señal de As en las mediciones por AAS [10]. Sin embargo, esa masa de Fe (0,2 mg) fue significativamente menor que la contribución realizada cuando se inyectó la fase de MIL (0,8 mg de Fe en 20 μL solución al 50% (p/v) de $[\text{P}_{6,6,6,14}\text{FeCl}_4]$). Una posible explicación a estos hallazgos se debe a un comportamiento térmico diferente de la fase de MIL en

comparación con una solución acuosa de Fe, debido a que los ILs tienen la propiedad de volatilizarse en forma de pares iónicos estables [11].

Posteriormente, se evaluaron diferentes temperaturas y rampas para las etapas de pirólisis y atomización, lo que permitió la eliminación gradual de la matriz orgánica y evitó la pérdida de As. La optimización del programa del horno de grafito se realizó evaluando temperaturas en el rango de 450-600°C y 1200-1350°C para las etapas de pirólisis, y en el rango 2150-2300°C para la etapa de atomización. Las temperaturas óptimas para la pirólisis gradual de la fase de MIL fueron 500°C y 1250°C (Fig. 3.2.2). Las temperaturas inferiores a las óptimas no eliminaron eficientemente la matriz de MIL del horno de grafito, mientras que temperaturas más altas causaron la pérdida de analito debido a la descomposición repentina de la matriz. Por otro lado, 2200°C resultó la temperatura de atomización más adecuada para la determinación de As (Fig. 3.2.2).

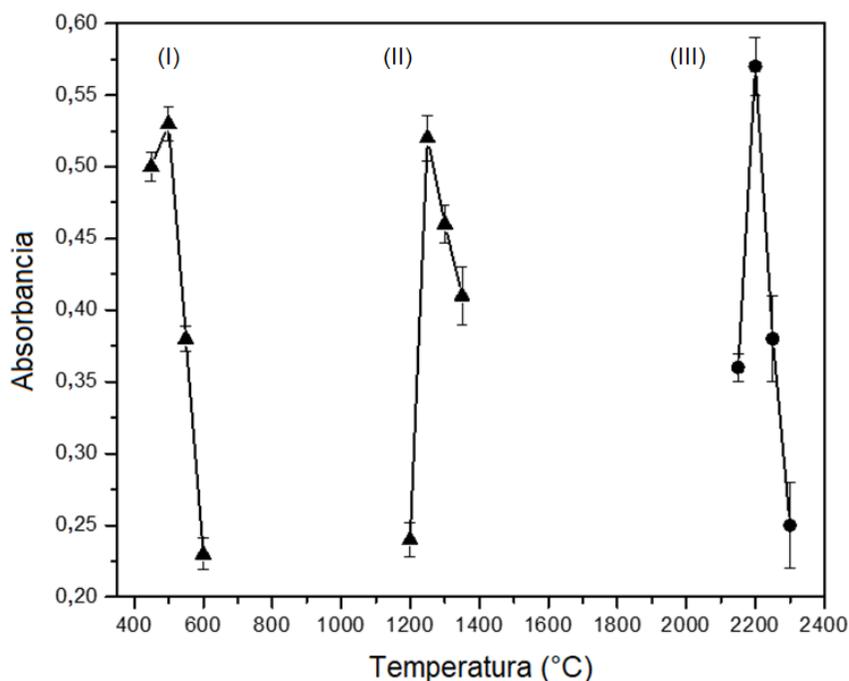


Fig. 3.2.2 Evaluación de curvas de temperatura de pirólisis (▲) y atomización (●) para inyección de 20 μL de solución de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de As con 50 μL de solución de MIL $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$ (50% (p/v) en cloroformo). (I) Etapa de pirólisis 1, (II) etapa de pirólisis 2 y (III) etapa de atomización. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 3.2.1 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Además, se estudió el uso de diferentes modificadores de matriz y su posible combinación. Se analizaron cantidades individuales de cada modificador (5 µg Pd, 3 µg Mg y 5 µg Ni) y una mezcla compuesta de 5 µg Pd y 3 µg Mg. Estos modificadores fueron elegidos en este estudio, ya que normalmente proporcionan una buena estabilización térmica de As en el horno de grafito [10]. La mejor relación señal/fondo para la determinación de As por ETAAS se obtuvo con 5 µg de Pd + 3 µg de Mg. Otras condiciones de detección fueron las descritas en la Tabla 3.2.1. Basados en estos estudios, fue posible reducir la interferencia de Fe presente en la matriz.

Tabla 3.2.1 Condiciones instrumentales ETAAS para determinación de As en miel.

Condiciones instrumentales				
Longitud de onda	193,7 nm			
Ancho de banda espectral	0,7 nm			
Corriente de lámpara EDL	300 mA			
Modificadores de matriz	50 µg Pd [Pd(NO ₃) ₂] (10 µL 500 mg L ⁻¹) 3 µg Mg [Mg(NO ₃) ₂] (10 µL 300 mg L ⁻¹)			
Programa de temperatura del horno de grafito				
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de meseta (s)	Flujo de argón (mL min ⁻¹)
Secado 1	110	15	30	250
Secado 2	130	15	15	250
Pirólisis 1	500	15	20	250
Pirólisis 2	1250	10	20	250
Atomización	2200	0	3	0
Limpieza	2400	1	2	250

3.2.4 Condiciones de formación del complejo As-DDTP

La extracción de elementos con ILs hidrofóbicos normalmente se lleva a cabo mediante la formación de un complejo no polar o de baja polaridad del analito con un agente quelante orgánico que permite la extracción del analito de forma más eficiente [12]. Por lo tanto, en este trabajo se estudió la complejación de As(III) con un reactivo apropiado. Sin embargo, se tuvieron que tomar precauciones especiales considerando los altos niveles de Fe(III) en la fase de MIL y su estabilidad en solución hasta pH 2 [13]. En consecuencia, fue necesario formar un complejo con especies de As(III) a un pH inferior a 2 de manera de mantener estable la fase de MIL. Además, se sabe que As(III) forma un complejo estable con DDTP en condiciones ácidas fuertes [14], lo que hace de este reactivo una excelente opción para la formación de un quelato hidrófobo. Otros agentes quelantes orgánicos típicos como el APDC se han utilizado ampliamente para la extracción de varios elementos, incluido el As, en disolventes orgánicos [15]. Sin embargo, los estudios realizados con APDC mostraron extracciones del analito cercanas al 50%, mientras que DDTP mostró resultados más prometedores (alrededor del 65%).

Se estudió el efecto del pH sobre la formación del complejo As-DDTP y la eficiencia de extracción en el rango de 0 a 2 (ajustado con HCl), sin embargo, se obtuvieron eficiencias de extracción bajas a medida que el pH se incrementó dentro de este intervalo. Por lo tanto, se desarrolló un estudio en condiciones ácidas fuertes utilizando altas concentraciones de HCl o H₂SO₄. Se obtuvo una eficiencia de extracción de aproximadamente el 85% ajustando el medio a 3 Eq L⁻¹ de HCl, mientras que a 2 Eq L⁻¹ de H₂SO₄ se alcanzó un 75% de extracción (Fig. 3.2.3). Se establecieron condiciones ácidas a 3 Eq L⁻¹ HCl para los siguientes experimentos.

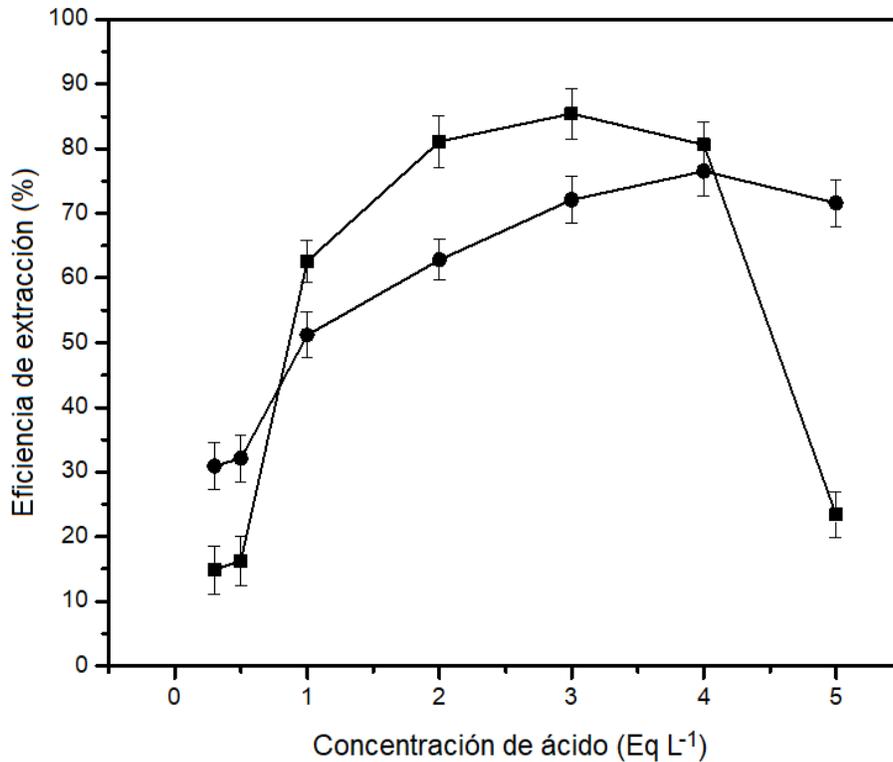


Fig. 3.2.3 Efecto de la concentración de ácido en la eficiencia de extracción de As del método MIL-DLLME propuesto. Se utilizaron concentraciones de HCl (■) y H₂SO₄ (●) con volúmenes de 100 µL de la solución del MIL [P_{6,6,6,14}]FeCl₄ y 5 mL de solución de muestra. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.5 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

Posteriormente, se estudió el efecto de la concentración de DDTP para establecer una concentración mínima de agente quelante que garantice la formación total del complejo As-DDTP y la mayor eficiencia de extracción. Se analizaron diferentes concentraciones de DDTP, relativa a relaciones molares de analito y complejante entre 1:0 y 1:1000 (As:DDTP). Se observó que la relación molar 1:3, que corresponde a la relación estequiométrica del complejo As-DDTP, no condujo a la mayor eficiencia de extracción, mientras que con la relación molar 1:50 se obtuvo el óptimo de extracción (87,5%), como puede observarse en la Fig. 3.2.4.

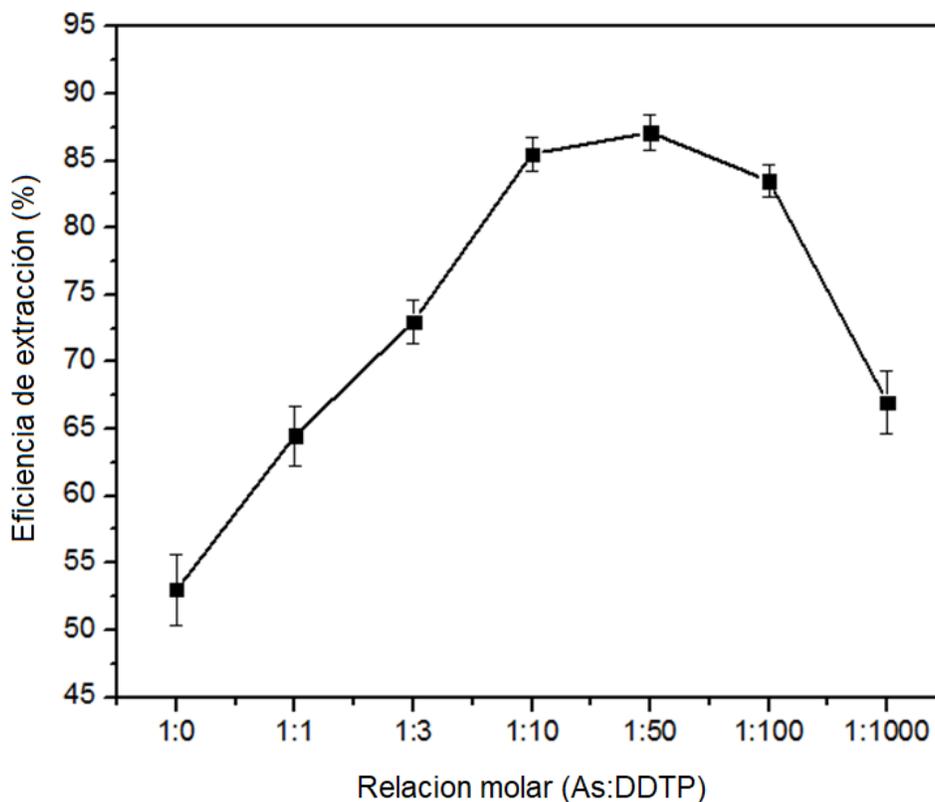


Fig. 3.2.4 Efecto de la relación molar (As:DDTP) en el método MIL-DLLME propuesto. Se utilizaron 100 μ L del MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ y 5 mL de solución de muestra. Otras condiciones fueron las mencionadas en las Tablas 2.5 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

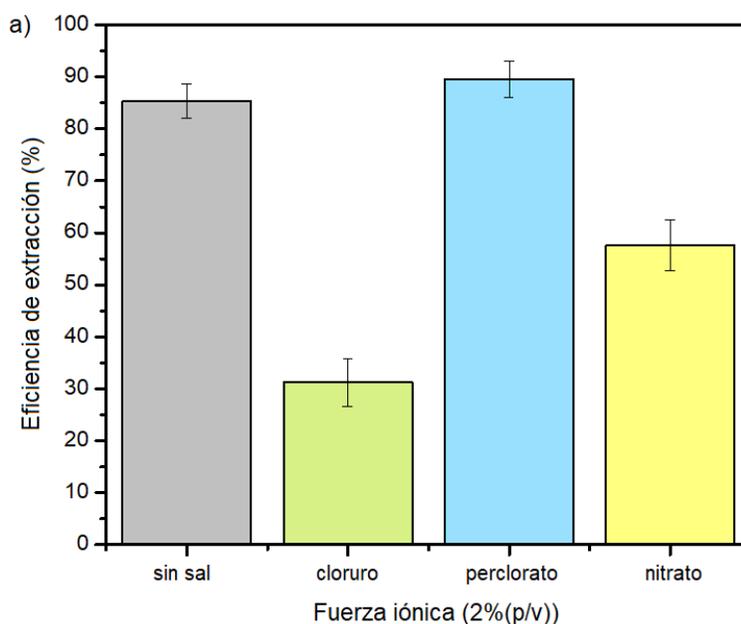
La extracción del analito permaneció relativamente constante hasta una relación 1:100. Por otro lado, cuando la relación molar fue de 1:1000, el exceso de DDTP causó un deterioro de la señal de As, lo que puede atribuirse al aumento en el contenido de materia orgánica de la matriz inyectada en ETAAS. Por esta razón, se seleccionó una relación molar 1:50 para experimentos posteriores.

3.2.5 Optimización multivariada de las condiciones de extracción

En el presente trabajo, se realizó una optimización multivariada de las principales variables que determinan la eficiencia de extracción de As en la fase de MIL. Se utilizó el software Design Expert® 7.0 (StatEase Inc., Minneapolis, EE. UU.) para procesar todos los

resultados. Se aplicó un diseño experimental Plackett Burman para determinar las principales variables que afectan la eficiencia de extracción.

En una primera etapa, se realizaron diferentes pruebas para preseleccionar variables categóricas del procedimiento de extracción. Se evaluó la influencia de la fuerza iónica en la eficiencia de extracción, ya que la adición de sal en los métodos de LLE puede aumentar el rendimiento de extracción de algunos analitos debido al efecto “salting out” [16]. Se desarrollaron diferentes experimentos sin sal y con la adición de diferentes sales (NaCl, NaClO₄ y NaNO₃) a una concentración final del 2% (p/v) (Fig. 3.2.5 a). Posteriormente, se estudiaron varios dispersantes para establecer cuál sería el más eficiente, en este caso, se analizaron 100 µL de acetonitrilo, metanol, etanol y cloroformo (Fig. 3.2.5 b). Finalmente, se estudió la influencia de diferentes modos de agitación durante 5 minutos (sin agitación, vortex, ultrasonido a 25°C, ultrasonido a 60°C) (Fig. 3.2.5 c). Los factores óptimos que se obtuvieron con estos estudios fueron: 2% (p/v) de NaClO₄ para ajustar la fuerza iónica, 100 µL de acetonitrilo como dispersante y 5 minutos de ultrasonido a 25°C para agitación. En esta serie de estudios fue posible mejorar la eficiencia de extracción del 87,5 al 92,0%.



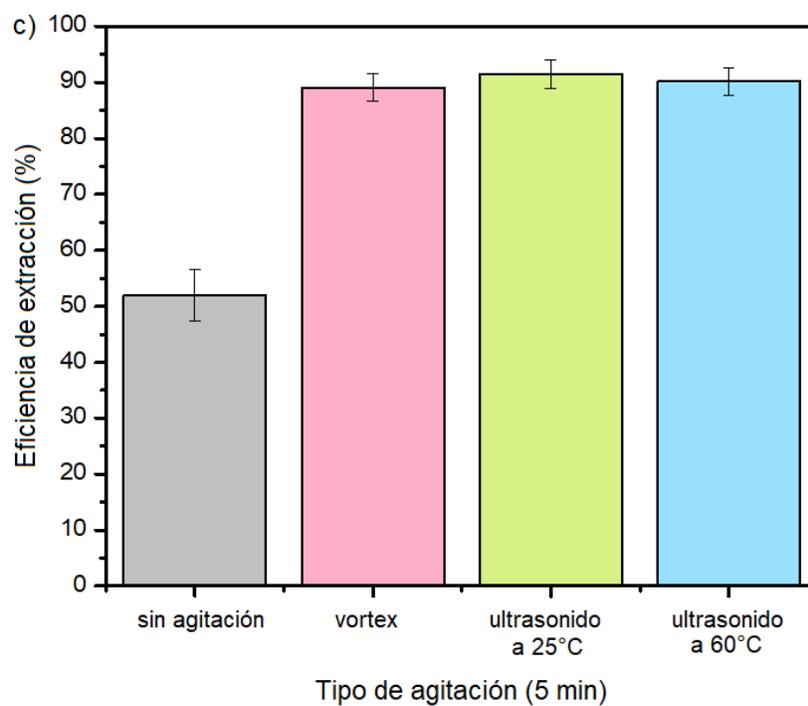
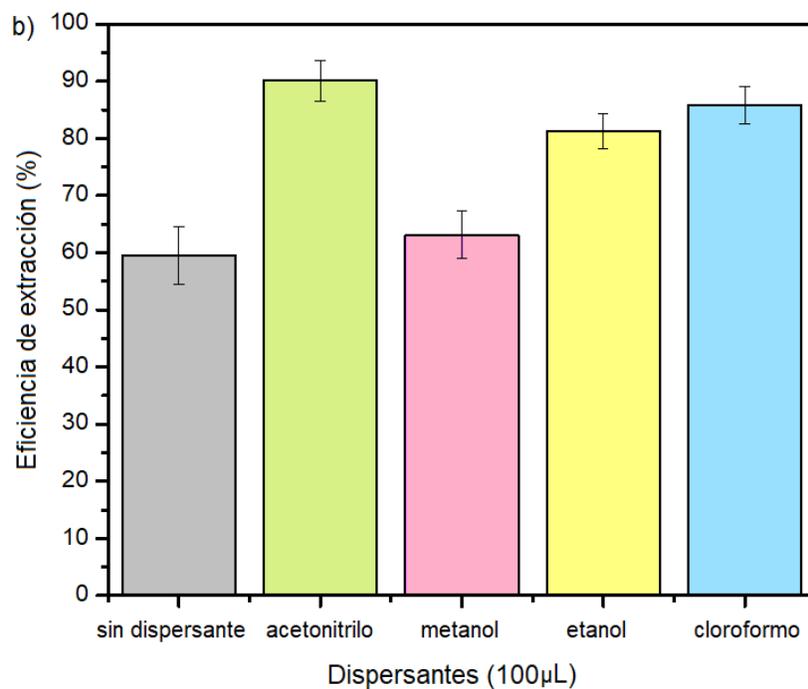


Fig. 3.2.5 Estudio de factores categóricos involucrados en el método MIL-DLLME propuesto. (a) Fuerza iónica: concentración de sal al 2% (p/v) (NaCl, NaClO₄ y NaNO₃). (b) Dispersantes: volumen de 100 µL (acetoniitrilo, metanol, etanol y cloroformo). (c) Tipo de agitación: 5 minutos (vortex, ultrasonido a 25°C y ultrasonido a 60°C) (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

La siguiente etapa consistió en la evaluación de las variables numéricas del sistema a través de un proceso multivariado. Los factores e intervalos analizados fueron: concentración de NaClO₄ (1-3% (p/v)), volumen de acetonitrilo (50-150 µL), tiempo de agitación (2-8 min), volumen de MIL (30-70 µL) y volumen de muestra (5-10 mL). La evaluación se realizó midiendo la altura máxima de las señales de absorbancia de As obtenidas luego de la preconcentración de una solución de 1 µg L⁻¹ de As(III). Fueron requeridos un total de 15 experimentos, como puede observarse en la Tabla 3.2.2.

Tabla 3.2.2 Ensayos requeridos en la selección de factores significativos.

Ensayo	NaClO₄ %(p/v)	Dispersante (µL)	Agitación (min)	MIL (µL)	Muestra (mL)	Eficiencia de extracción (%)
1	3	50	2	30	10	75,1
2	2	100	5	50	7,5	93,7
3	1	150	2	70	10	77,5
4	3	50	8	70	10	83,3
5	3	50	8	70	5	87,2
6	2	100	5	50	7,5	94,1
7	1	150	8	70	5	87,4
8	1	150	8	30	10	78,9
9	3	150	2	30	5	80,8
10	2	100	5	50	7,5	94,5
11	1	50	2	70	5	81,4
12	1	50	2	30	5	79,3
13	1	50	8	30	10	77,6
14	3	150	8	30	5	79,7
15	3	150	2	70	10	78,1

Se utilizó el gráfico de Pareto para seleccionar las variables con efectos significativos. Después del análisis estadístico proporcionado por el software, solo el volumen de muestra resultó significativo (Fig. 3.2.6), por lo que no fue necesaria la optimización con un modelo de superficie de respuesta (RSM).

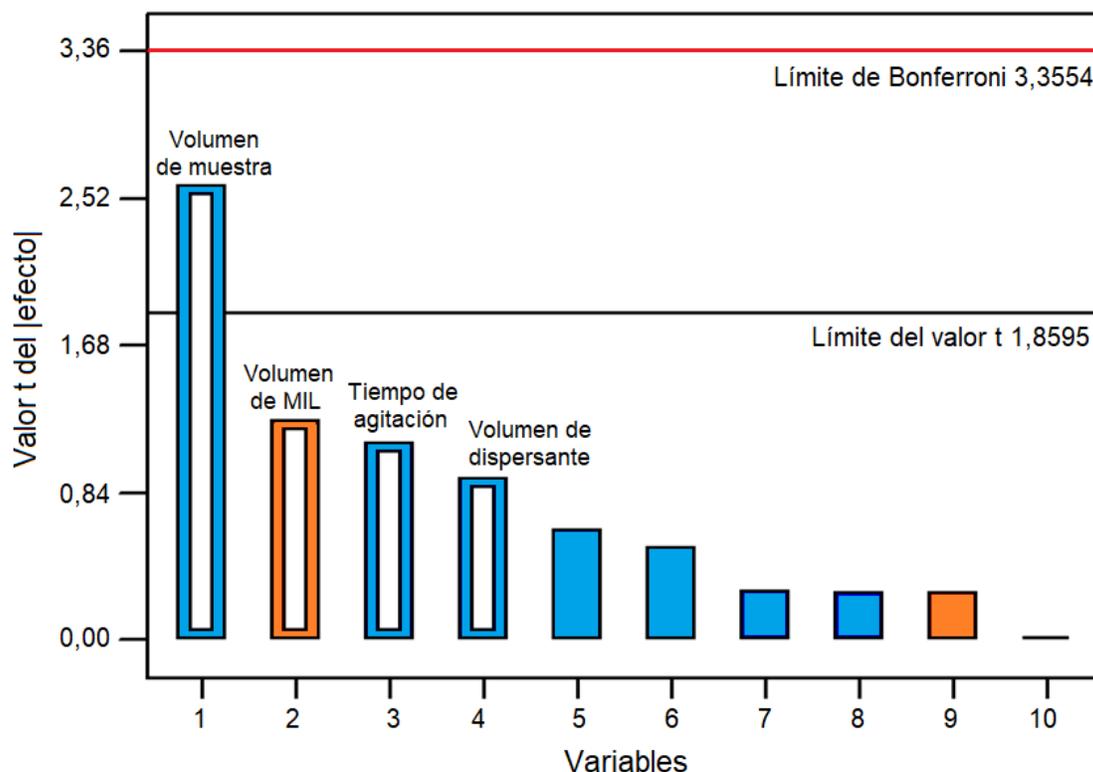


Fig. 3.2.6 Gráfico de Pareto obtenido para determinar las variables significativas en la eficiencia de extracción de As por el método propuesto. Efecto positivo ■ y efecto negativo ■ en la eficiencia de extracción.

Las variables fueron evaluadas mediante análisis de varianza (ANOVA) y se obtuvo un modelo significativo para la respuesta con una regresión aceptable (R^2 de 0,975), lo que indica una buena correlación entre los datos experimentales y el modelo ajustado.

Además, los resultados obtenidos de las variables no significativas se verificaron para corroborar que las predicciones del modelo establecido por el software eran correctas. Se desarrollaron estudios univariados para evaluar estos factores dentro de los rangos en

estudio, los cuales no modificaron significativamente la eficiencia de extracción, esto confirmo que el sistema de extracción era robusto. Las condiciones óptimas seleccionadas para variables no significativas fueron las siguientes: NaClO_4 al 2% (p/v), 100 μL de acetonitrilo, 8 min de ultrasonido y 50 μL de MIL.

Finalmente, el efecto del volumen de muestra (la única variable significativa) sobre la extracción de As se analizó en el rango de 4 a 10 mL en las condiciones óptimas obtenidas por el modelo. La mayor eficiencia de extracción (95%) se obtuvo en el rango de 4-5 mL de fase de MIL, mientras que volúmenes de muestra mayores no agregaron una mejora adicional, probablemente debido a la agitación ineficiente y la dispersión limitada de la fase de extracción (Fig. 3.2.7).

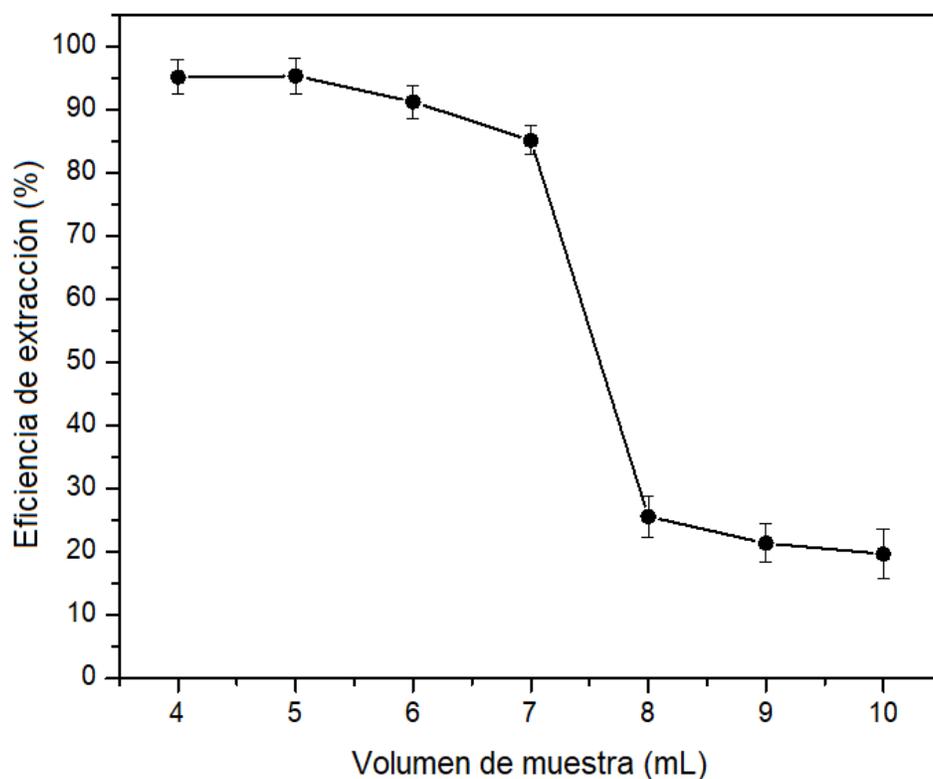


Fig. 3.2.7 Influencia del volumen de muestra en la eficiencia de extracción de As. El resto de las condiciones experimentales utilizadas son las obtenidas por el estudio multivariado anterior (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Se seleccionó un volumen de 5 mL de muestra como óptimo para garantizar la mayor eficiencia de extracción, lo cual favorecería el incremento del factor de preconcentración con respecto a un volumen de 4 mL, dado que, si se alcanzará una extracción del 100%, en relación al volumen de MIL (50 μ L) y el volumen de muestra óptimo (5 mL), se obtendría un factor de preconcentración de 100 [17].

3.2.6 Estudio de reducción de especies de As a As(III)

Una vez optimizadas las condiciones de extracción, se evaluaron diferentes agentes reductores con el fin de reducir el As(V) presente en la muestra a As(III), para asegurar la posterior formación del complejo As(III)-DDTP [14]. Para este estudio, se utilizaron soluciones de 1 μ g L⁻¹ de As(V) en el método MIL-DLLME propuesto. Fueron evaluados 5 agentes reductores, incluidos KI, ácido cítrico, ácido ascórbico, cisteína y tiourea a una concentración del 1% (p/v). Los resultados evidenciaron que los agentes reductores orgánicos no permitían obtener una eficiencia de extracción elevada. Por otro lado, KI permitió obtener un 96% de eficiencia de extracción de As (Fig. 3.2.8 a). Luego, se evaluó el efecto de la concentración de KI en el rango de 0 a 1,25% (p/v) y se verificó que con concentración del 1% (p/v) de KI se obtenía el óptimo para la correcta reducción, extracción y detección del analito. (Fig. 3.2.8 b).

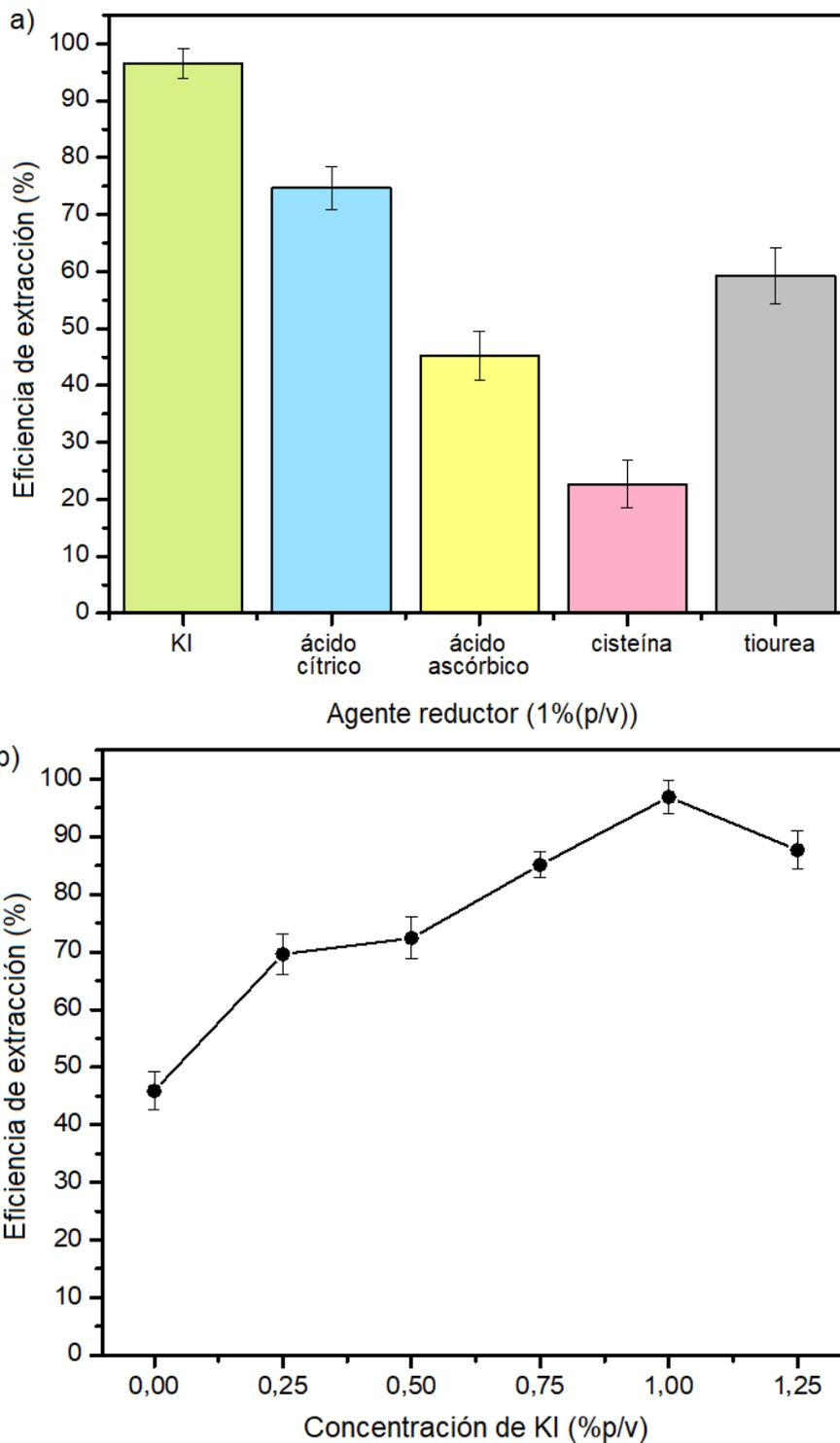
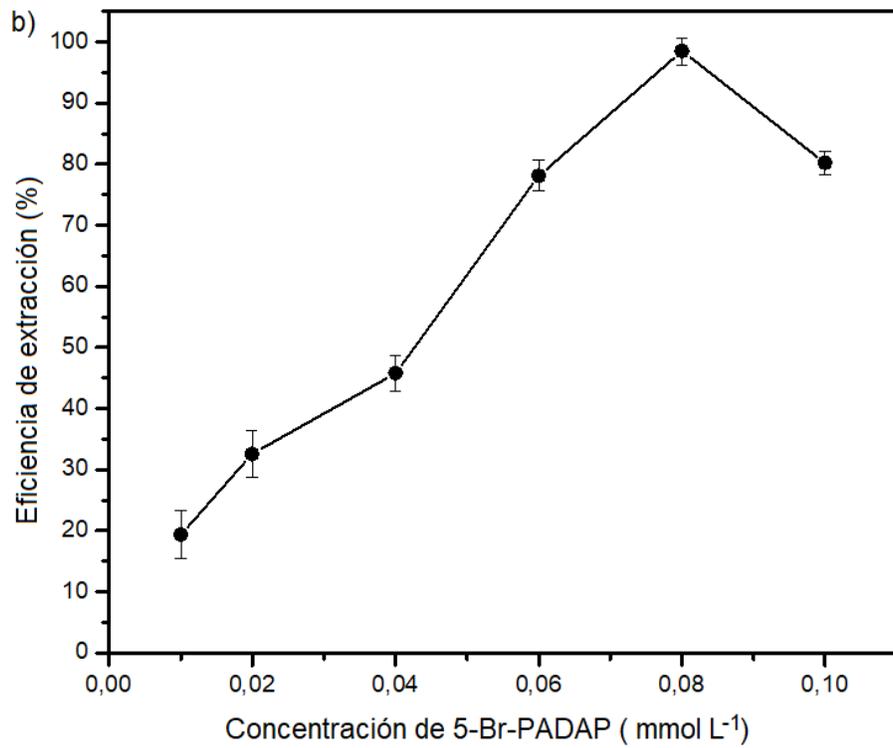
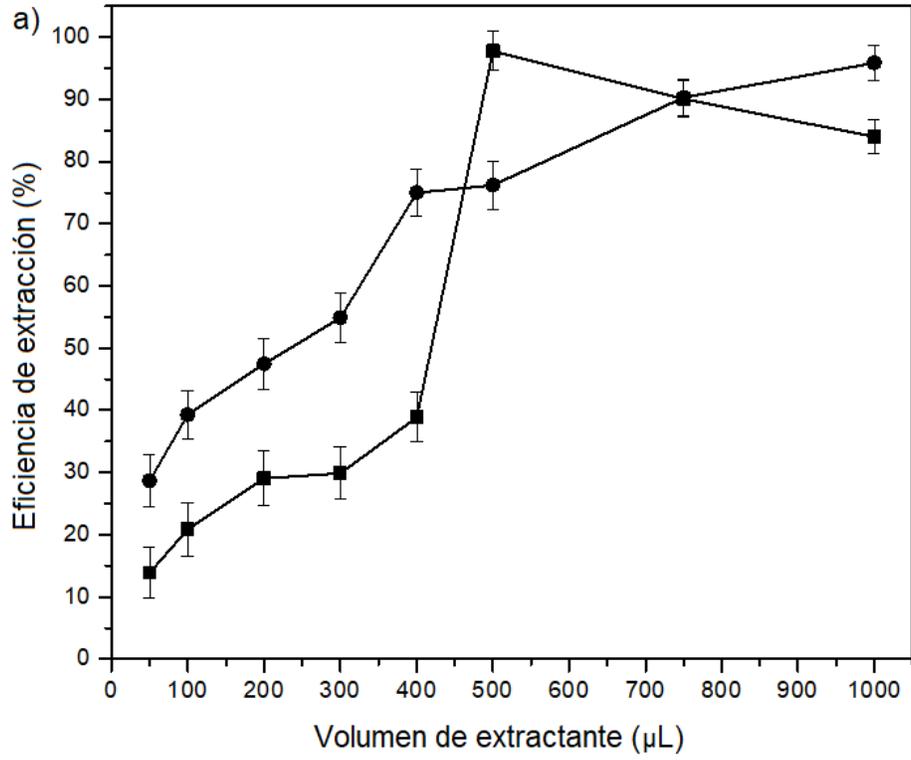


Fig. 3.2.8 Efecto de (a) tipo de agente reductor y (b) concentración de KI, sobre la eficiencia de extracción de As en el método MIL-DLLME propuesto. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 2.5 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.2.7 Optimización del procedimiento de tratamiento de muestra y estudio de interferencias

La metodología de extracción propuesta se aplicó a soluciones de muestras que contenían miel al 1% (p/v) preparadas en agua ultrapura. Sin embargo, se obtuvo una eficiencia de extracción baja (alrededor del 46%) en esas condiciones. Por lo tanto, fue necesario aplicar un procedimiento de limpieza (clean-up) antes de la extracción del analito, de manera de extraer las interferencias de metales que pueden encontrarse a altas concentraciones (por ejemplo, Cu, Fe, Mn, etc.) en la muestra. En este estudio, se utilizaron 8 mL de solución de muestra de miel con el agente quelante 5-Br-PADAP para la complejación inicial y extracción de las interferencias en un pequeño volumen de disolvente orgánico. El reactivo 5-Br-PADAP se propuso debido a su capacidad y selectividad para formar complejos estables con varios metales en condiciones alcalinas, pero no con As(III) [18]. Por lo tanto, el pH de la muestra se ajustó a 9,5 con 100 μL de 1 mol L^{-1} de solución buffer de tetraborato de sodio. Además, se evaluó el tipo y volumen de disolvente extractante (cloroformo y diclorometano) entre 50 y 1000 μL . La extracción óptima de las interferencias de la matriz se realizó con 500 μL de cloroformo. Luego se optimizó la concentración del agente quelante. En estos ensayos, se varió la concentración de 5-Br-PADAP en el rango de 0 a 0,1 mmol L^{-1} . La concentración óptima fue de 0,08 mmol L^{-1} . Finalmente, se evaluó el tipo y tiempo de agitación, durante el período de 0 a 5 min con agitación por vortex y ultrasonido. La mayor extracción de interferencias se logró con 4 min de agitación por vortex, evidenciado por el aumento de la sensibilidad de la señal de As(III). Todos los resultados se pueden observar en la Fig. 3.2.9.



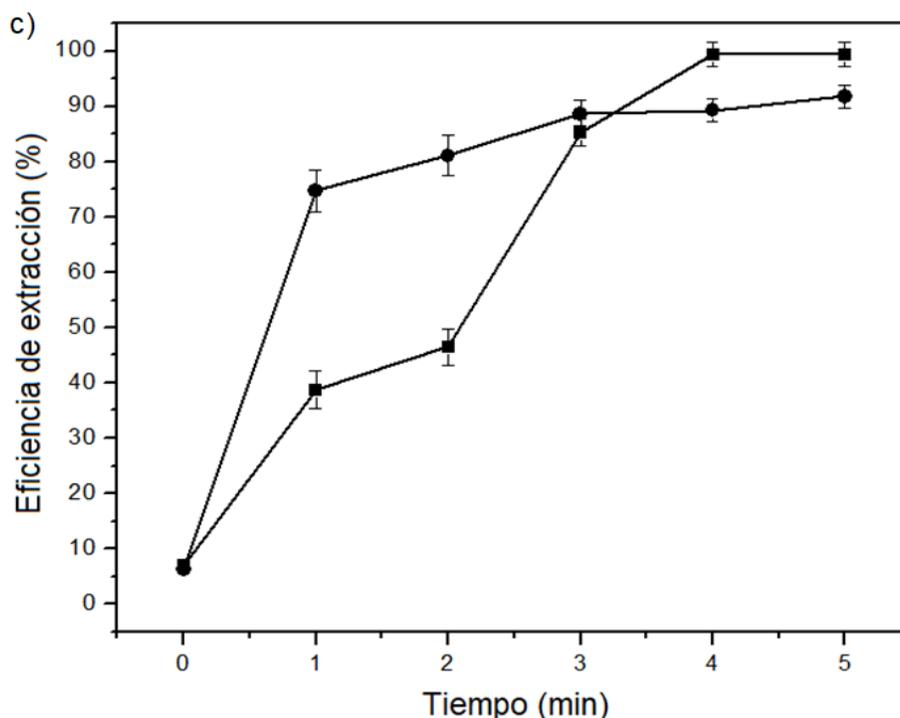


Fig. 3.2.9 Evaluación de las variables involucradas en la etapa de limpieza de las muestras de miel. (a) Tipo y volumen de agente de extracción: volumen de cloroformo (■) y diclorometano (●). (b) Concentración de 5-Br-PADAP. (c) Tipo y tiempo de agitación: por vortex (■) y ultrasonido (●) (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

Luego de los estudios de limpieza de las muestras, se realizó un estudio sistemático de posibles interferencias inorgánicas en la determinación de As por el método MIL-DLLME. En las muestras de miel se puede encontrar una variedad de cationes a niveles traza o altas concentraciones, incluyendo Al^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ , K^+ y Zn^{2+} , y aniones comunes como Cl^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} [19]. El estudio se realizó analizando una solución estándar de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de As(III) que contenía cada ion concomitante a los niveles de concentración que se encuentran normalmente en las muestras de miel. Se consideró que un ion concomitante interfiere cuando causa una variación de la señal analítica en $\pm 5\%$. Los resultados mostraron que los iones analizados no generaron efectos de interferencia en hasta $300 \mu\text{g L}^{-1}$ para Al^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} , 500 mg L^{-1} para cationes y hasta 800 mg L^{-1} para aniones comunes.

Además, se estudió el efecto de los principales compuestos orgánicos presentes en la matriz de miel en la extracción de As. En este caso, glucosa y fructosa se consideraron especialmente ya que representan alrededor del 75% del peso total de la miel [19]. No se observaron efectos de interferencia significativos a las concentraciones encontradas en la miel. En la Fig. 3.1.10 se puede observar la señal obtenida en las condiciones óptimas de extracción y tratamiento de muestra para una solución estándar de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de As.

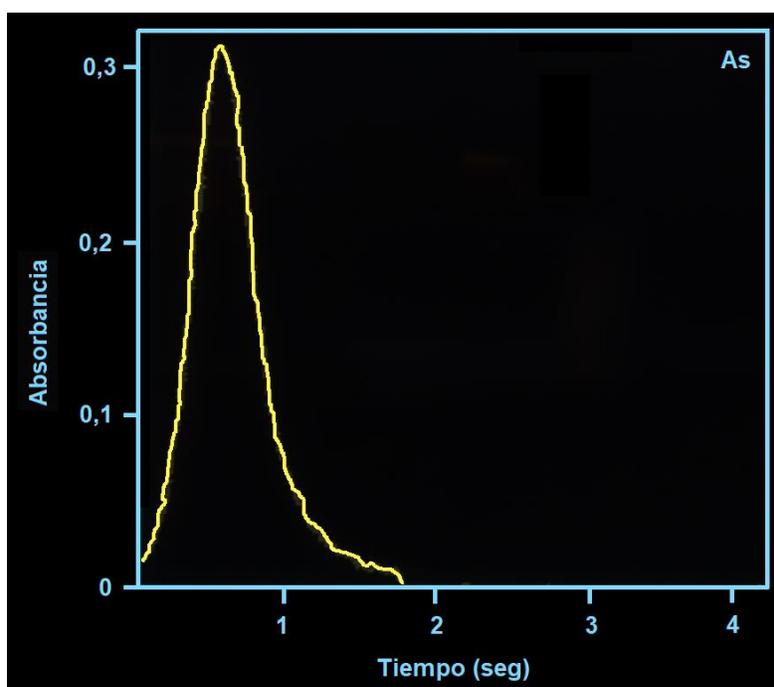


Fig. 3.2.10 Señal obtenida luego de la inyección de una solución de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de As en condiciones óptimas del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.

3.2.8 Rendimiento analítico

El gráfico de calibración obtenido después de la aplicación del método MIL-DLLME propuesto para la determinación de As en muestras de miel fue lineal desde niveles cercanos al límite de detección (LOD) y hasta al menos $4,5 \mu\text{g L}^{-1}$, con un coeficiente de correlación de 0,9989 (Fig. 3.2.11). El LOD obtenido fue de 12 ng L^{-1} de As ($1,2 \text{ ng}$ de As por g de miel) y se calculó en base a la señal en la intersección más tres veces la desviación estándar sobre la regresión de la curva de calibración [20]. La desviación estándar relativa

(RSD) obtenida fue del 3,9%, calculada en base a la medición de diez réplicas de muestra de miel a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de As.

El factor de refuerzo de la sensibilidad analítica (EF) obtenido fue de 110 para un volumen de muestra de 5 mL y se calculó a partir de la relación de pendiente de los gráficos de calibración antes y después de la aplicación del método MIL-DLLME propuesto [1]. La eficiencia de extracción se definió como la relación de masa total de As originalmente presente en la fase acuosa con respecto a la extraída en la fase de MIL [21]. Se obtuvo una eficiencia de extracción del 99% con la metodología optimizada (Tabla 2.5). Es importante mencionar que, si bien el procedimiento completo de preconcentración podría tomar aproximadamente 21 minutos por muestra, dado que es posible tratar muchas muestras simultáneamente si se usan varios imanes, la frecuencia del análisis está determinada principalmente por el tiempo necesario para las mediciones ETAAS en lugar del tiempo transcurrido para la extracción. En ese caso, se pueden analizar al menos 15 muestras por hora con el método MIL-DLLME propuesto. A continuación, en la Tabla 3.2.3 se pueden observar los distintos parámetros que permiten evaluar el rendimiento analítico de la metodología desarrollada.

Tabla 3.2.3 Parámetros analíticos del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.

Parámetros	
Rango lineal	35-4500 ng L^{-1}
LOD	12,0 ng L^{-1}
RSD	3,9 %
EF	110
Eficiencia de extracción	99,0 %
Frecuencia analítica	15 muestras h^{-1}

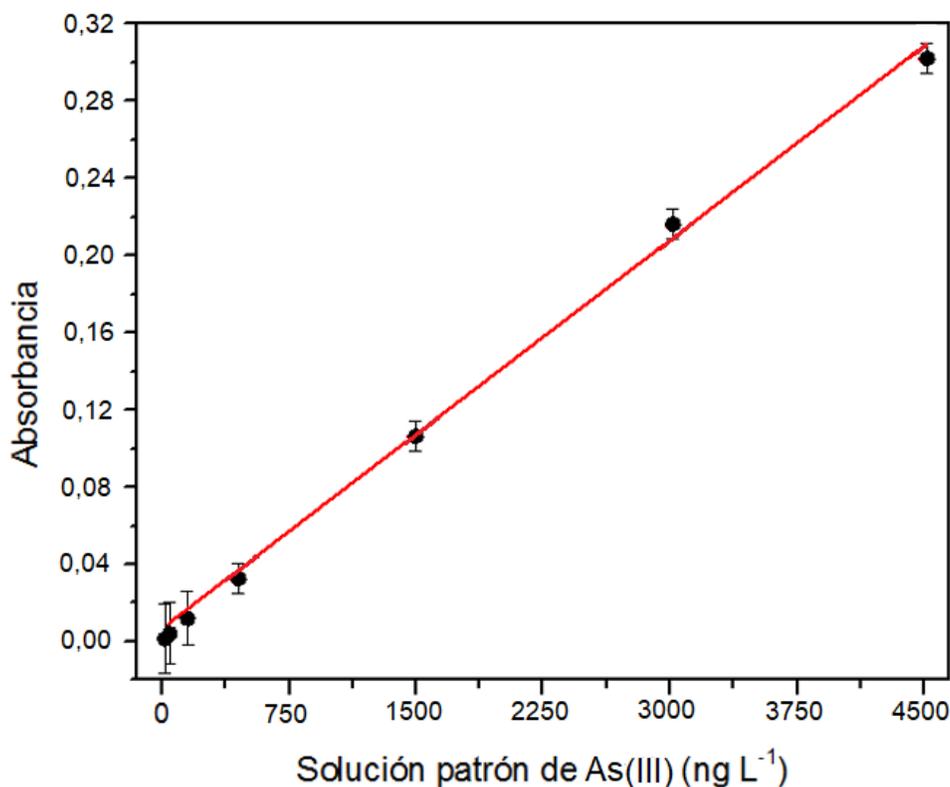


Fig. 3.2.11 Curva de calibración obtenida a partir del análisis de soluciones patrón de As(III) con el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto en condiciones óptimas (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

En la Tabla 3.2.4 se puede observar un estudio comparativo sobre el rendimiento analítico del método DLLME propuesto con respecto a otros trabajos ya informados, utilizando IL como fase extractante y determinación por ETAAS. El método propuesto muestra LOD, EF y rango lineal que son comparables a otros métodos DLLME para la determinación de As. Por su parte, el uso del paramagnetismo intrínseco de los MIL simplifica la técnica DLLME porque evita la etapa de centrifugación.

3.2.9 Estudio de exactitud y determinación de As en muestras de miel

El método propuesto MIL-DLLME-ETAAS se aplicó para la determinación de As en diferentes tipos de muestras de miel. Cabe mencionar que dos candidatos para material de referencia certificado (CRM) para oligoelementos en miel han sido probados previamente

[22]. Sin embargo, aún no se comercializa un CRM para la miel, debido a problemas con la homogeneidad de la miel en las diferentes áreas de producción. Por esta razón, se propuso un estudio de recuperación a tres niveles de concentración como una estrategia alternativa para demostrar la factibilidad de la determinación de As en presencia de la matriz de miel. Los valores de recuperación se encontraron en el rango de 95,2-102% (Tabla 3.2.5), lo que indicó que el método MIL-DLLME era adecuado para la determinación de As en las muestras bajo estudio. Las concentraciones encontradas en las muestras de miel estuvieron en el rango de 82,1-181,2 ng de As por g de miel (ng g^{-1}) para miel ámbar clara, 289,4-522,2 (ng g^{-1}) para miel ámbar y 399,2-1005 (ng g^{-1}) para miel oscura. Estos resultados indican que a medida que aumenta la coloración de las muestras de miel, el contenido de As podría aumentar. Se han reportado resultados similares con respecto al contenido mineral total encontrado en la miel en base a su coloración [19]. Además, debe mencionarse que los valores de concentración de As encontrados en este trabajo estuvieron por debajo de los límites establecidos por la regulación del MERCOSUR.

Tabla 3.2.4 Métodos analíticos reportados en la literatura para la preconcentración y determinación de As por IL-DLLME-ETAAS.

Extractante (cantidad)	Agente quelante	Dispersante (volumen)	LOD (ng L ⁻¹)	RSD (%)	EF ^a	Rango lineal (ng L ⁻¹)	Muestra (volumen)	Ref.
[C ₄ mim]NTf ₂ ^b (50 µL)	APDC	Metanol (500 µL)	13	4,9	255	100 - 7500	Agua (5 mL)	[23]
[C ₆ mim]PF ₆ ^c (45 µL)	Molibdato de amonio	Metanol (500 µL)	4,0	3,7	-	40 - 5000	Arroz (5 mL)	[24]
[C ₈ mim]PF ₆ ^d (40 mg)	DDTC	Metanol (100 µL)	5,0	4,7	46	5 - 6000	Vino (4 mL)	[1]
[P _{6,6,6,14}]Cl (10 µL)	Heteropoliácido de molibdato	Cloroformo (80 µL)	2,0	4,9	125	10 - 38000	Agua (5 mL)	[25]
[C ₄ mim]FeCl ₄ ^e (75 µL)	APDC	Asistido por aire	29	2,5	-	40 - 10000	Agua, sedimento y suelo (10 mL)	[26]
[C ₄ mim]FeCl ₄ (65 µL)	Molibdato de amonio	Asistido por tableta efervescente	7,0	2,9	167	20 - 10000	Vegetales (10 mL)	[27]
[P _{6,6,6,14}]FeCl ₄ (50 µL)	DDTP	Acetonitrilo (100 µL)	12	3,9	110	20 - 5000	Miel (5 mL)	Método propuesto

^aEF: Factor de refuerzo de la sensibilidad. Relación de las pendientes de las curvas de calibración para As con y sin el paso de preconcentración.

^bbis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metil imidazolio, ^chexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio

^dhexafluorofosfato de 1-octil-3-metil imidazolio, ^etetracloroferrato(III) de 1-butil-3-metil imidazolio.

Tabla 3.2.5 Determinación de As en miel y estudio de recuperación (Intervalo de confianza del 95%; n = 6).

Muestra de miel	Añadido (ng L ⁻¹)	Miel ámbar clara		Miel ámbar		Miel oscura	
		Encontrado (ng L ⁻¹)	Recuperación (%) ^a	Encontrado (ng L ⁻¹)	Recuperación (%) ^a	Encontrado (ng L ⁻¹)	Recuperación (%) ^a
1	0	154,6 ± 3,3 (15,46) ^b	-	289,4 ± 5,0 (28,94) ^b	-	591,9 ± 5,2 (59,19) ^b	-
	50	203,5 ± 3,9	97,8 ± 1,8	338,1 ± 4,8	97,4 ± 1,4	640,7 ± 5,5	97,6 ± 0,8
	100	253,9 ± 4,1	99,3 ± 1,6	388,9 ± 4,9	99,5 ± 1,2	690,5 ± 5,8	98,6 ± 0,8
	200	354,0 ± 4,4	99,7 ± 1,2	487,8 ± 5,2	99,2 ± 1,0	792,2 ± 5,7	100 ± 0,7
2	0	115,3 ± 3,8 (11,53) ^b	-	434,9 ± 5,8 (43,49) ^b	-	1005 ± 6,1 (100,5) ^b	-
	50	164,1 ± 2,9	97,6 ± 1,7	483,5 ± 5,4	97,2 ± 1,1	1053 ± 6,0	96,0 ± 0,5
	100	214,0 ± 3,2	98,7 ± 1,5	533,2 ± 5,6	98,3 ± 1,0	1102 ± 6,4	97,0 ± 0,6
	200	313,7 ± 3,5	99,2 ± 1,1	682,3 ± 5,9	99,4 ± 0,9	1201 ± 6,5	98,0 ± 0,5
3	0	82,1 ± 2,9 (8,21) ^b	-	472,7 ± 6,5 (47,27) ^b	-	581,5 ± 5,5 (58,15) ^b	-
	50	132,0 ± 3,0	99,8 ± 2,2	522,1 ± 6,0	98,8 ± 1,1	629,1 ± 5,4	95,2 ± 0,8
	100	183,5 ± 3,3	101 ± 1,8	570,9 ± 6,2	98,2 ± 1,1	680,2 ± 5,3	98,7 ± 0,8

	200	281,3 ± 3,7	99,6 ± 1,3	669,3 ± 6,5	98,3 ± 0,9	778,3 ± 6,0	98,4 ± 0,8
4	0	99,5 ± 3,0 (9,95) ^b	-	440,2 ± 5,4 (44,02) ^b	-	473,6 ± 4,9 (47,36) ^b	-
	50	148,4 ± 2,6	97,8 ± 1,7	491,3 ± 5,0	102 ± 1,0	523,1 ± 4,6	99,0 ± 0,9
	100	197,8 ± 2,9	98,3 ± 1,4	538,5 ± 5,3	98,3 ± 1,0	571,4 ± 4,8	97,8 ± 0,8
	200	295,3 ± 3,2	97,9 ± 1,1	636,0 ± 5,4	97,9 ± 0,8	670,6 ± 5,1	98,5 ± 0,7
	0	181,2 ± 3,5 (18,12) ^b	-	522,2 ± 5,8 (52,23) ^b	-	399,2 ± 4,1 (39,92) ^b	-
5	50	230,3 ± 3,4	98,2 ± 1,6	570,8 ± 5,6	97,2 ± 0,9	448,3 ± 4,3	98,2 ± 0,9
	100	279,5 ± 3,7	98,3 ± 1,3	622,0 ± 5,5	99,8 ± 0,9	498,1 ± 4,8	98,9 ± 0,9
	200	376,7 ± 4,0	97,7 ± 1,0	723,1 ± 5,8	100 ± 0,8	598,0 ± 4,9	99,4 ± 0,8

^a(Encontrado-Base)/Añadido × 100

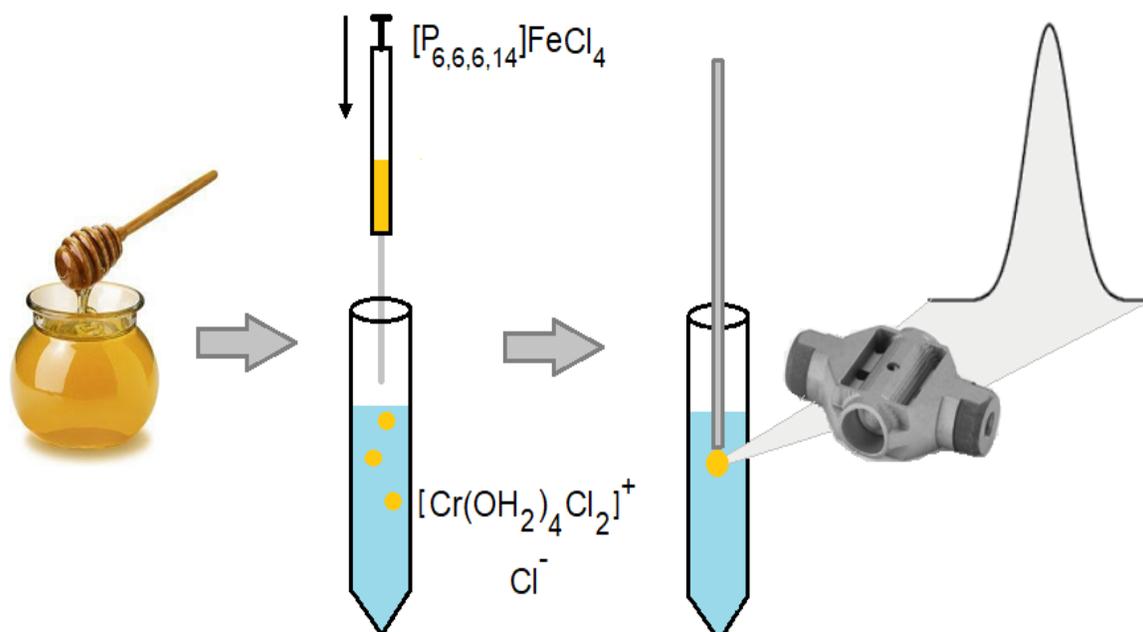
^bConcentración de As expresado como ng de As por g de miel (ng g⁻¹)

3.2.10 Conclusiones

En este trabajo, se ha demostrado que el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ puede ser un excelente extractante que conduce a una eficiente extracción y determinación de As a niveles traza en muestras complejas como la miel. Sin embargo, la aplicación de MILs conformados por Fe en DLLME para la preconcentración de analitos inorgánicos debe estudiarse cuidadosamente debido al alto contenido de Fe, lo que podría causar fuertes efectos de interferencia al utilizar ETAAS en la detección.

La principal ventaja de la aplicación de MILs es la posibilidad de separar las fases mediante la atracción de la fase de extracción por el campo magnético de un imán, lo que simplifica el procedimiento DLLME al evitar los pasos de centrifugación que consumen mucho tiempo. Además, la metodología propuesta hizo posible determinar directamente el analito en la matriz compleja de MIL. Se obtuvo un LOD del orden de los $ng L^{-1}$ y se logró una excelente recuperación analítica a pesar de la alta complejidad de la matriz analizada. Por lo tanto, el método propuesto MIL-DLLME puede considerarse una herramienta valiosa para la determinación de trazas de As en muestras de miel y una herramienta atractiva para laboratorios de rutina dedicados al control de calidad de este tipo de alimentos debido a la simplicidad del procedimiento de preconcentración y baja necesidad de adquirir nuevo equipamiento para resolver las necesidades de determinación de alta sensibilidad.

3.3 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Cr en miel



3.3.1 Introducción

Algunos metales, como el Cr, son esenciales para el cuerpo humano, pero al mismo tiempo pueden causar deterioro en la calidad de la vida humana cuando se acumulan a un nivel de concentración tóxico. En la literatura, se informa que el contenido de Cr en la miel varía desde niveles indetectables a 370 ng g^{-1} [1]. Por otro lado, se sabe que la dosis diaria recomendada de Cr(III) se encuentra en el rango de 50-200 mg, mientras que cantidades superiores resultan perjudiciales [2].

El control del contenido de metales potencialmente tóxicos en la miel requiere una atención especial para garantizar el consumo sin comprometer la salud humana ni afectar la calidad del producto [3]. El Reglamento de la Comunidad Europea y el Codex

Alimentarius especifican que, para comercializar miel, la misma no debe contener metales pesados en concentraciones que puedan dañar la salud de los seres humanos. Sin embargo, no existe una legislación nacional o internacional completa que establezca los límites máximos de residuos de Cr en la miel y otros productos apícolas [4].

Se han informado varios métodos analíticos sobre técnicas de preconcentración de Cr basadas en DLLME utilizando diferentes detectores, incluida la espectrometría de absorción atómica de llama (FAAS) [5], ETAAS [6], espectrometría UV-Vis [7], espectrometría de plasma inducida por láser (LIBS) [8] y espectrometría de detección de arreglo lineal por fibra óptica (FO-LADS) [9]. Por otro lado, se ha demostrado que los ILs pueden ser agentes de extracción eficaces para utilizarse junto con técnicas DLLME para la determinación de Cr en muestras de diferente complejidad [10]. Sin embargo, la mayoría de los métodos de microextracción reportados en la literatura requieren la separación de la fase de extracción por centrifugación. Una alternativa posible consiste en el uso de MILs que pueden separarse fácilmente por un imán [11]. El tetracloroferrato (III) de trihexil(tetradecil)fosfonio ($[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$) se ha aplicado en LLME principalmente para la extracción de compuestos orgánicos y biomoléculas [11], mientras que su aplicación como extractante de iones metálicos apenas se ha explorado [12, 13].

En esta sección del trabajo de tesis, se presenta el desarrollo de una técnica LLME dispersiva asistida por MIL (MIL-DLLME) para la extracción y preconcentración de Cr en muestras de miel, utilizando el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$. En este caso, se propone que la formación del par iónico $[CrCl_2(OH_2)_4]Cl$ en medio de HCl fundamenta el mecanismo de extracción involucrado en el sistema. La optimización de todas las condiciones experimentales que influyen en el método MIL-DLLME se realizó utilizando técnicas univariadas. Los efectos de matriz causados por la fase de MIL y las muestras de miel se estudiaron en detalle para la determinación precisa del analito. El método propuesto se

aplicó con éxito para la determinación de Cr a niveles ultratrazas en muestras de miel mediante ETAAS.

3.3.2 Selección del MIL como fase de extracción y evaluación de la acidez

Se evaluaron diferentes MILs que contienen cationes imidazolio y fosfonio, como agentes de extracción durante el desarrollo del método DLLME propuesto. Aquellos MILs conformados por Fe(III) se evaluaron debido a su mayor susceptibilidad magnética en comparación con los formados por Fe(II) [14]. Este fenómeno puede explicarse sobre la base de que los compuestos formados con Fe(III) muestran un mayor paramagnetismo que los formados con Fe(II) porque presentan 5 y 4 electrones en su orbital d más externo, respectivamente. Por lo tanto, se puede esperar que FeCl_4^- presente una mayor atracción hacia un campo magnético que FeCl_4^{2-} .

Por otro lado, también se evaluaron MILs imidazolio y fosfonio conformados por el anión $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$. Debe tenerse en cuenta que, según la teoría del campo cristalino, la separación del campo octaédrico depende no solo de la naturaleza del ion metálico y su carga, sino también de la naturaleza de los ligandos [14]. Por lo tanto, fue posible evaluar que los MILs que contenían CN^- como parte del anión presentaban una baja susceptibilidad magnética, debido a que el CN^- como ligando, genera una alta diferencia de energía octaédrica que determina que menos electrones queden desapareados al ubicarse la mayoría en el nivel inferior de energía, lo que resulta en un compuesto paramagnético débil. Por otro lado, los MILs que contienen Cl^- mostraron una mayor susceptibilidad magnética, debido a que el Cl^- genera una baja diferencia de energía octaédrica y, de esta forma, un mayor número de electrones quedan desapareados al encontrarse en ambos niveles de energía, lo que se traduce en compuestos altamente paramagnéticos (Fig. 3.3.1).

Las extracciones se realizaron en condiciones ácidas (1 mol L^{-1} de HCl), establecidas en base a la experiencia previa del grupo de investigación en el uso de medios

ácidos para la extracción de metales con MILs [12, 13]. Los MILs formados por el catión imidazolio que se evaluaron, mostraron un importante grado de solubilidad en la fase acuosa, por lo que su aplicación como fase extractante no fue factible. Por otro lado, los MILs con catión fosfonio formaron un sistema bifásico como resultado de su inmiscibilidad en agua. El MIL $[P_{6,6,6,14}]_3Fe(CN)_6$ no pudo ser recogido efectivamente por la varilla magnética y se requirió centrifugación. En este caso la eficiencia de extracción obtenida fue del 54%. Se observó un comportamiento diferente para $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$, el cual, en base al fuerte paramagnetismo, pudo ser recogido completamente por la varilla magnética y esto permitió obtener un 85% de extracción. En base a estos resultados, se seleccionó el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ para el desarrollo del método propuesto.

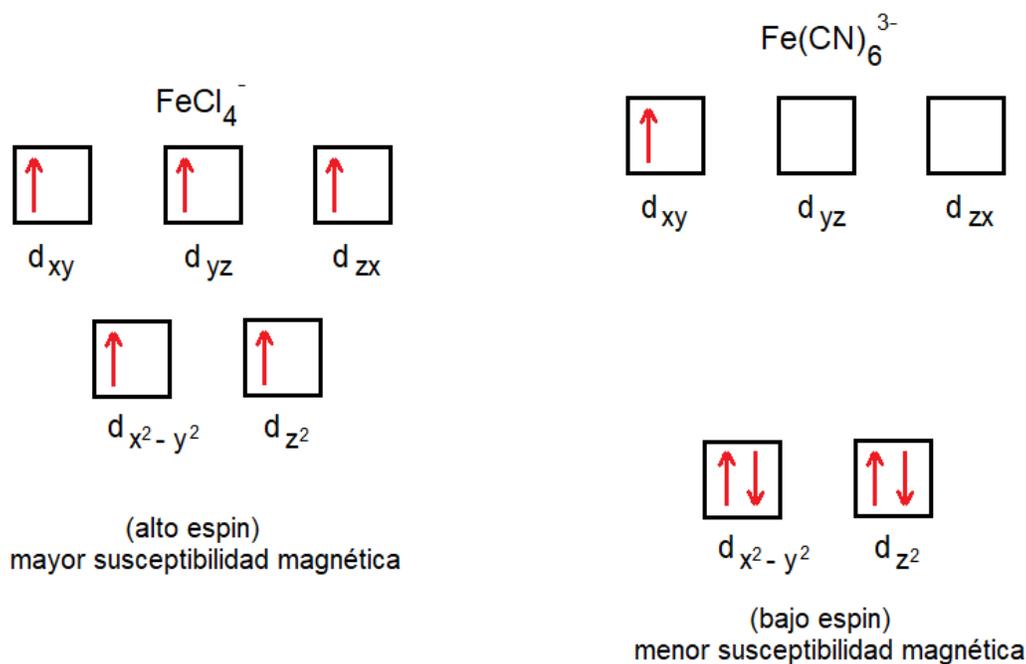


Fig. 3.3.1 Diagrama esquemático de la susceptibilidad magnética presentada por $FeCl_4^-$ y $Fe(CN)_6^{3-}$

Posteriormente, se realizó un estudio preliminar para establecer la concentración óptima de HCl para la extracción en el rango de 0,1-2,5 mol L⁻¹ (Fig. 3.3.2). La concentración que permitió lograr la mayor eficiencia de extracción fue 1 mol L⁻¹ de HCl, por lo que esta concentración se estableció como óptima para los experimentos restantes en este trabajo.

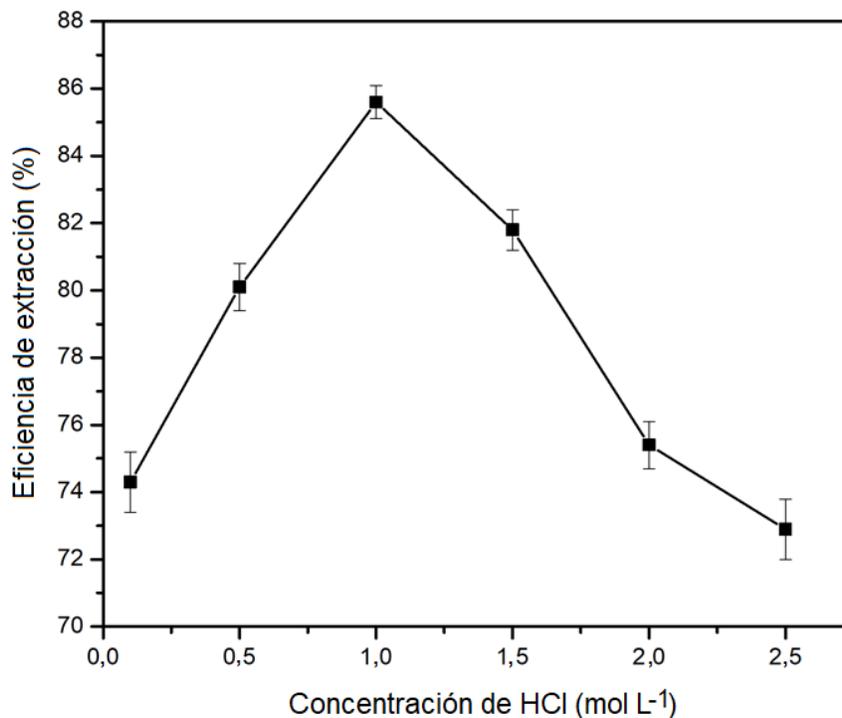
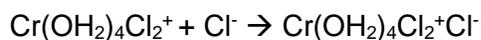


Fig. 3.3.2 Efecto de la concentración de HCl sobre la eficiencia de extracción de Cr en el método MIL-DLLME, se utilizaron 50 μ L de $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ y 5 mL de solución de muestra. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

En lo que se refiere al posible mecanismo de extracción de Cr con el sistema propuesto, los estudios previamente publicados en la literatura reportan que el complejo acuoso de Cr(III) en HCl forma otro complejo al reemplazarse los ligandos de agua con los cloruros presentes en el medio. Posteriormente, el exceso de cloruros en solución conduce a la formación de un par iónico [15], como se pueden observar en las siguientes reacciones:



De esta manera, el par iónico formado que tiene carga neutra se extrae de manera más eficiente en la fase de MIL que el Cr libre, siendo destacable en este sistema que no es necesario utilizar un agente complejante como en los métodos desarrollados

previamente en la presente tesis doctoral para otros elementos y como de hecho también es habitual en las metodologías de extracción de metales.

3.3.3 Optimización del volumen de muestra

El efecto del volumen de muestra sobre la extracción de Cr se estudió en el rango de 4-10 mL. Para este estudio, la masa de Cr se mantuvo fija mientras se modificaba el volumen de muestra. Como se puede observar en la Fig. 3.3.3, la eficiencia de extracción permaneció relativamente constante de 4 a 6 mL, mientras que se obtuvo una extracción máxima (92%) con 7 mL de muestra. Por otro lado, los volúmenes de muestra mayores afectaron significativamente la eficiencia de extracción. Este efecto podría explicarse considerando que volúmenes de muestra mayores requieren condiciones más exigentes de agitación que permitan la alta dispersión de la fase de extracción [16], lo cual reduce la eficiencia de extracción.

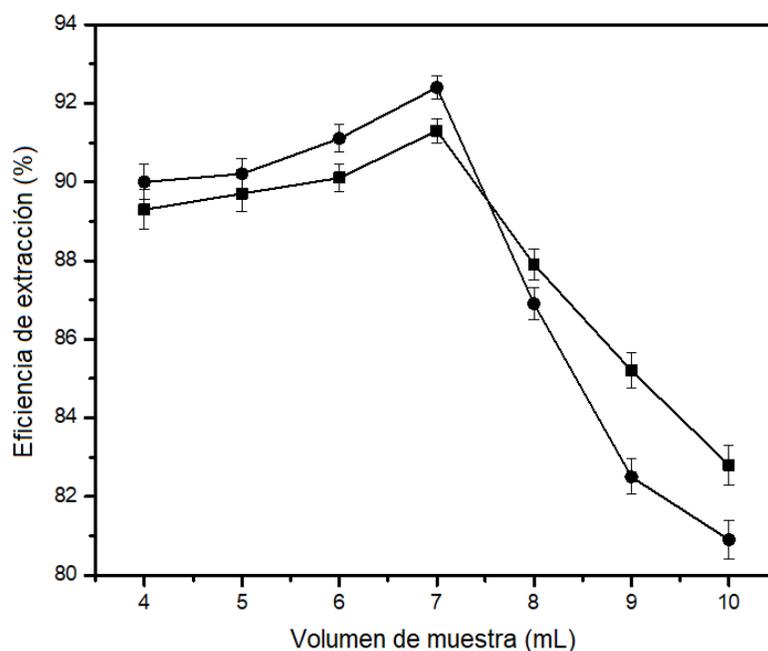


Fig. 3.3.3 Influencia del volumen de muestra en la eficiencia de extracción de Cr. Masa (●) o concentración (■) de Cr(III) constante. Las condiciones de extracción fueron las observadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

En un experimento diferente, se estudió el efecto del volumen de muestra sobre la eficiencia de extracción manteniendo constante la concentración de Cr. Por lo tanto, no solo se modificó el volumen de muestra sino también la masa del analito. Se observaron resultados similares al estudio anterior (Fig. 3.3.3), donde se pudo concluir que la eficiencia de extracción del sistema es independiente de la concentración de analito, pero se ve afectada por la relación entre el volumen de muestra y de MIL.

3.3.4 Estudio de la dispersión de la fase de MIL

Se evaluaron tres solventes como dispersantes: acetonitrilo, metanol y etanol. El efecto causado en la extracción de Cr se evaluó en el rango de 50-150 μ L para cada solvente. Como se observa en la Fig. 3.3.4, la mayor eficiencia de extracción se logró al utilizar 50 μ L de acetonitrilo como dispersante, mientras que volúmenes más elevados generaron una menor eficiencia de extracción, presumiblemente debido a la sobredispersión de la fase de MIL y la consiguiente dificultad para recolectar la fase de MIL con la varilla magnética.

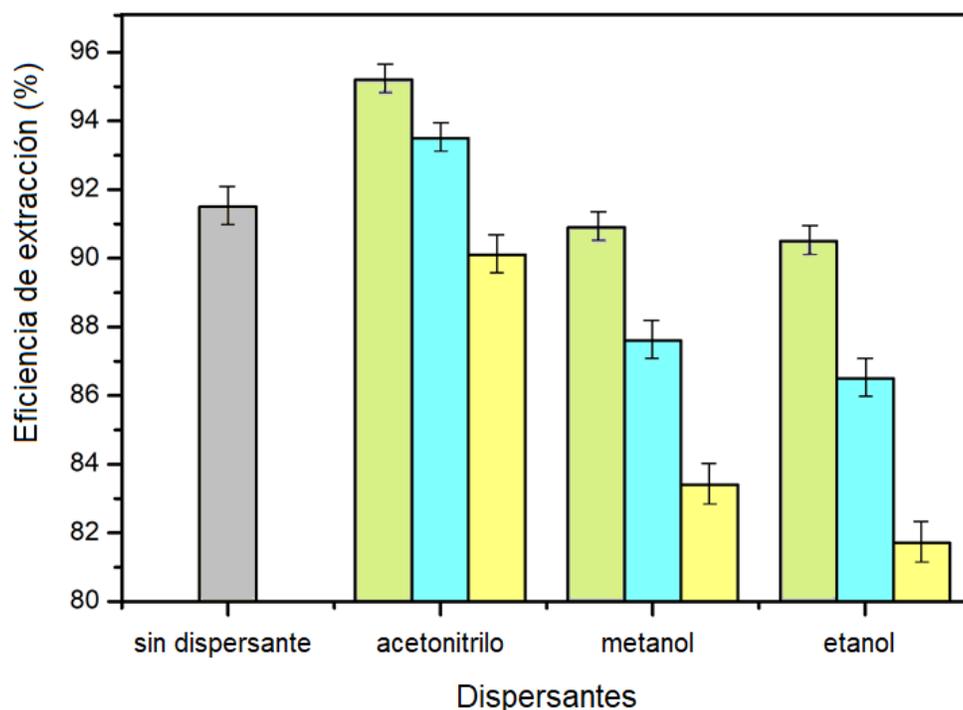


Fig. 3.3.4 Efecto del tipo y volumen de dispersante (acetonitrilo, metanol, etanol) sobre la eficiencia de extracción para 7 mL de muestra y 50 μL de $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$. Volumen en estudio: ■ 50 μL , ■ 100 μL y ■ 150 μL . Se pueden observar otras condiciones en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Asimismo, se observó un aumento de la solubilización de la fase de MIL en la solución acuosa cuando el volumen de dispersante era mayor. Por otro lado, el uso de alcoholes como dispersantes deterioró la eficiencia de extracción incluso a bajos volúmenes.

Es bien sabido que la mezcla eficiente de la fase de extracción y la solución de muestra suele ser uno de los pasos que consume más tiempo en los métodos de extracción. Por esta razón, es necesario establecer un tiempo mínimo de agitación para lograr una alta eficiencia de extracción y la mayor frecuencia analítica posible. Por lo tanto, el efecto del tipo y tiempo de agitación sobre la extracción de Cr se evaluó usando agitación por vortex o ultrasonido en el rango de 0 a 12 min. La agitación por vortex demostró ser más efectiva, logrando una eficiencia de extracción superior al 95% en 10 minutos (Fig. 3.3.5).

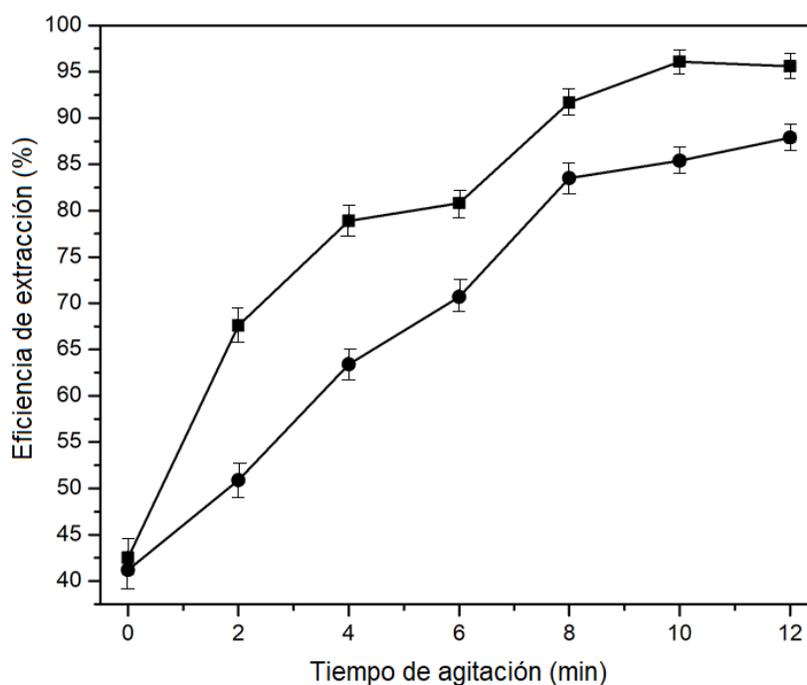
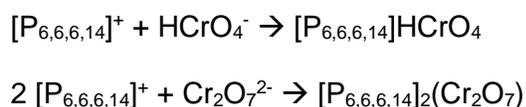


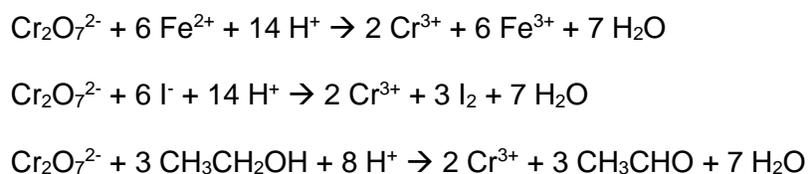
Fig 3.3.5 Optimización del tipo y tiempo de agitación. Agitación por (■) vortex y (●) ultrasonido. Las otras condiciones de extracción se pueden apreciar en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.3.5 Estudio de reducción de especies de Cr a Cr(III)

Se observó que la fase de MIL no extrajo selectivamente las especies de Cr(III) y Cr(VI). La extracción de Cr(III) fue alta en condiciones óptimas, pero la de Cr(VI) fue solo del 30%, lo cual puede explicarse al considerar la formación de un par iónico entre el catión fosfonio y la especie Cr(VI) [17]:



La composición de este par iónico formado con Cr(VI) es diferente a la de Cr(III) y por ende su eficiencia de extracción, por lo que, para extraer completamente el Cr, se estudiaron diferentes agentes reductores para reducir todo el Cr(VI) presente en la muestra a Cr(III). Este estudio fue útil para evaluar el poder reductor de tres agentes reductores típicos utilizados para transformar Cr(VI) en Cr(III) [18]. Además, se estudió el efecto de la concentración de estos reactivos sobre la eficiencia de extracción de Cr y la señal de absorbancia. Las ecuaciones químicas propuestas involucradas en esta reducción se muestran a continuación:



Para este estudio, se prepararon soluciones de 0,35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(VI) y se llevó a cabo el método MIL-DLLME propuesto. Se estudiaron diferentes relaciones molares de analito:reductor (1:10, 1:100 y 1:1000). Los resultados indicaron que se logró una extracción del 97% de Cr(VI) cuando se utilizó Fe(II) en una relación molar con Cr de 1:10 (Fig. 3.3.6),

el cual se seleccionó como óptimo. Por otro lado, la reducción de Cr(VI) realizada a diferentes concentraciones de yoduro y etanol no condujo a resultados satisfactorios.

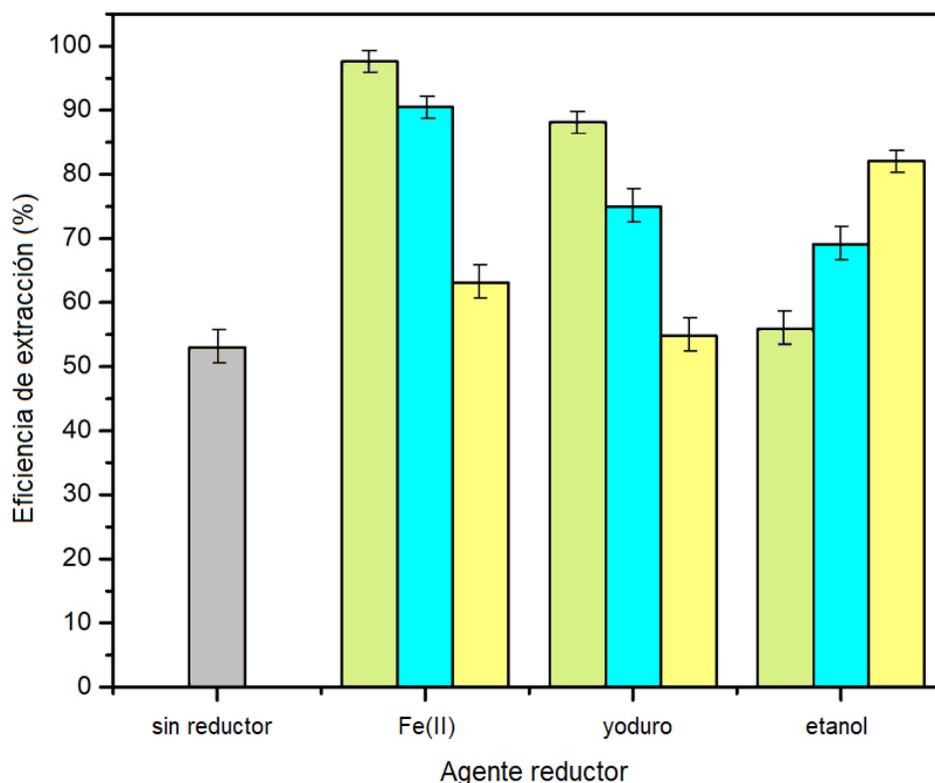


Fig. 3.3.6 Efecto del tipo de agente reductor sobre la eficiencia de extracción de Cr. Reductores evaluados: Fe(II), yoduro y etanol. Relación molar entre analito y reductor: ■ 1:10, ■ 1:100 y ■ 1:1000. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.3.6 Evaluación de diluyentes para la fase de MIL

La determinación directa de Cr en la fase de MIL no fue posible debido a la interferencia de matriz, por lo tanto, después de la recolección de la fase de MIL con una varilla magnética, se requirió la dilución de la fase de extracción en un disolvente apropiado. De esta manera, se evaluó la dilución de 50 µL de la fase extractante en diferentes solventes orgánicos. Pero incluso en presencia de 150 µL de metanol, isopropanol y butanol, no fue posible disolver completamente la fase de MIL. Por otro lado, si fue posible la disolución

completa en acetona, pero este disolvente se evaporó rápidamente. La dilución eficiente del MIL solo fue posible con 150 μL de acetonitrilo, acetato de etilo, benceno, cloroformo y diclorometano.

Se realizó la extracción y preconcentración de $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) en las condiciones establecidas en la Tabla 2.6. La fase extractante se retiró de la solución utilizando una varilla magnética y se colocó en diferentes tubos de ensayo que contenían los solventes en estudio. Los resultados obtenidos durante estos experimentos se pueden observar en la Fig. 3.3.7, donde la utilización de acetonitrilo, acetato de etilo y benceno afectaron la señal obtenida. Por otro lado, cuando se utilizó cloroformo y diclorometano, se obtuvieron las mayores señales de absorción. Por lo tanto, se seleccionó cloroformo como el disolvente óptimo para la dilución de la fase de extracción.

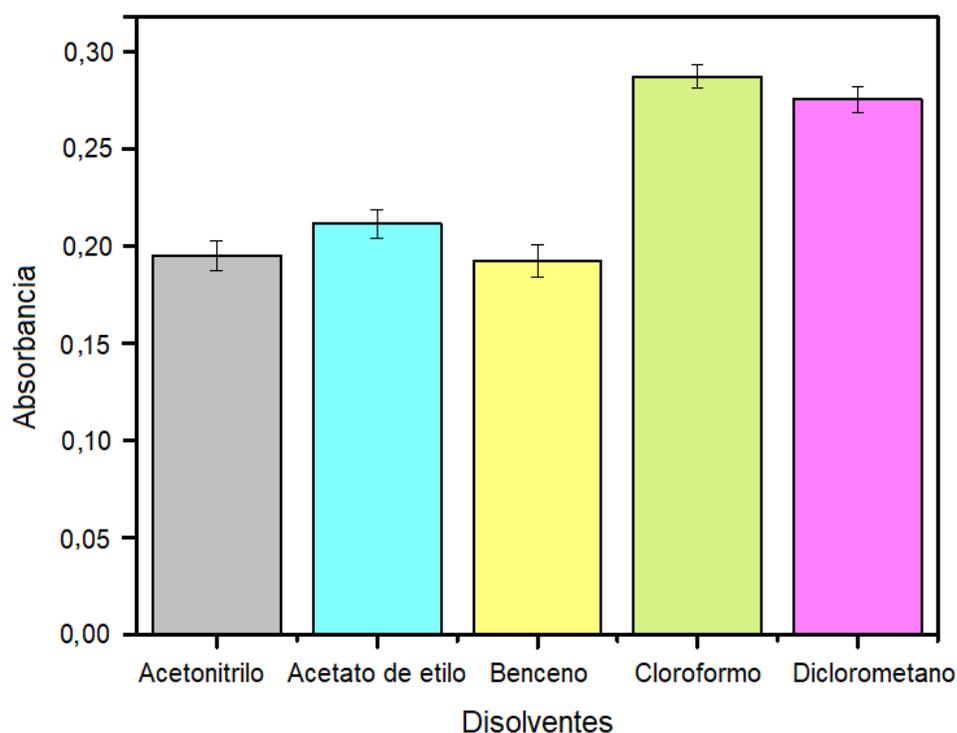


Fig. 3.3.7 Selección del diluyente adecuado ($150 \mu\text{L}$) para $50 \mu\text{L}$ del MIL $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$. Disolventes utilizados: acetonitrilo, acetato de etilo, benceno, cloroformo y diclorometano. Otras condiciones son las mencionadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Posteriormente, se realizó un estudio sobre el volumen de cloroformo utilizado como diluyente en el rango de 50 a 200 μL , para un volumen de 50 μL de MIL. La Fig. 3.3.8 permite observar que 150 μL de cloroformo permitieron maximizar la señal de absorbancia. Volúmenes menores deterioraron la señal de Cr debido a la interferencia de matriz, mientras que volúmenes mayores no mejoraron significativamente la señal de Cr en comparación con el volumen óptimo.

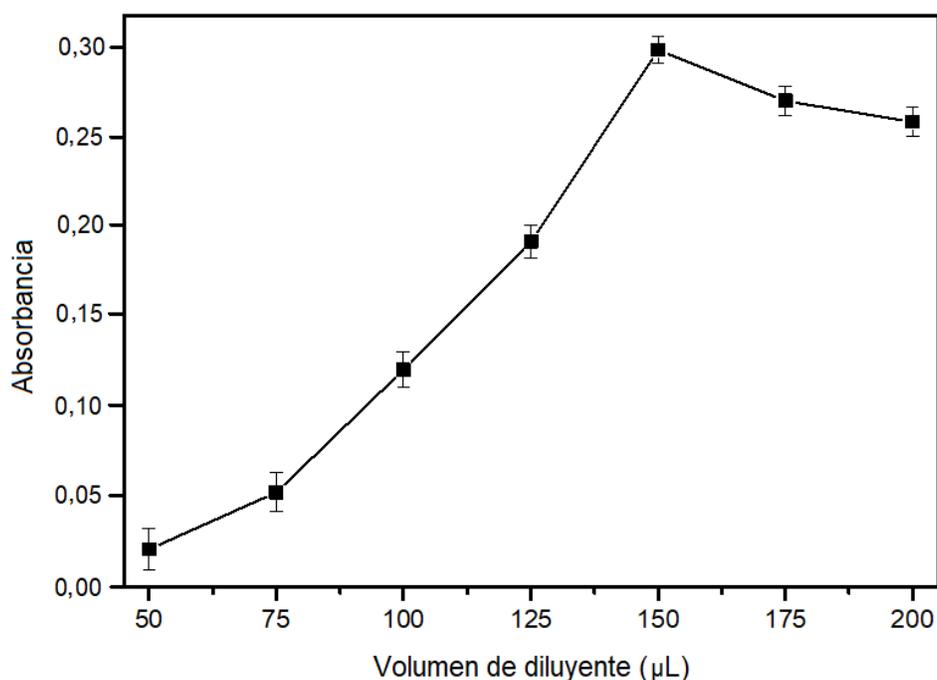


Fig. 3.3.8 Optimización del volumen de cloroformo como diluyente. Otras condiciones se mencionan en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

3.3.7 Influencia de la matriz de MIL sobre la detección de Cr por ETAAS

En primer lugar, se evaluaron diferentes volúmenes de inyección de la fase de MIL diluida en CHCl_3 . Se observó que solo era posible inyectar 10 μL de la fase de extracción, mientras que volúmenes mayores generaban una reproducibilidad pobre y un fondo espectral considerable. Este efecto se atribuyó a la interferencia espectral causada por el Fe inyectado en el horno de grafito de la matriz de MIL [19].

Se inyectó un volumen de 10 μL de una solución acuosa estándar de 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) con diferentes concentraciones de Fe (similar a las inyectadas en 10 μL de fase de MIL). Los resultados mostraron que el Fe interfirió en la señal de Cr desde 5 mg L^{-1} de Fe (Fig. 3.3.9).

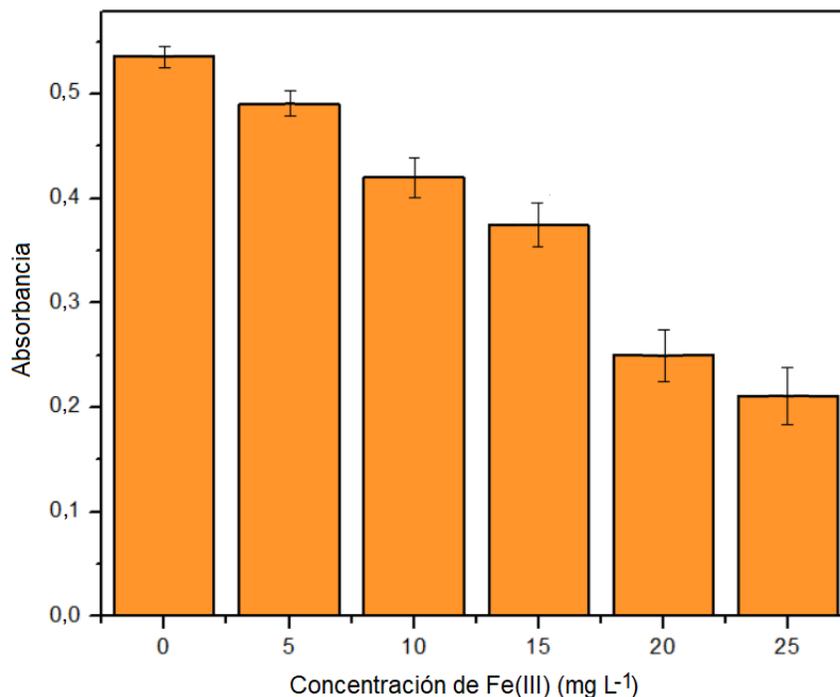


Fig. 3.3.9 Influencia de diferentes concentraciones de Fe(III) en la señal de Cr. Fueron inyectados 10 μL de solución estándar acuosa de 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr. Las condiciones instrumentales de ETAAS fueron las indicadas en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Esta concentración de Fe fue significativamente menor que la contribución realizada por la fase de MIL inyectada (es decir, 18 mg L^{-1} de Fe en 10 μL de MIL). Por otro lado, el efecto de matriz causado por la fase de MIL fue remediado luego de una cuidadosa optimización del programa de temperatura del horno de grafito. Estos hallazgos podrían explicarse considerando un comportamiento térmico diferente del Fe cuando se inyecta junto con la fase de MIL en comparación con una solución acuosa de Fe, probablemente porque los ILs tienen la propiedad de volatilizarse a altas temperaturas en forma de pares de iones estables [20]. Por lo tanto, la volatilización de la fase de MIL durante la etapa de

pirólisis del programa de temperatura ETAAS podría ser responsable de la eliminación parcial del Fe y la determinación de Cr con menos interferencia.

Posteriormente, se realizó un estudio del comportamiento térmico en el horno de grafito mediante el trazado de curvas de pirólisis-atomización. Para ello, se evaluaron diferentes temperaturas para las etapas de pirólisis y atomización, con lo que se procuró la eliminación gradual de la matriz orgánica y evitó la pérdida de Cr. La optimización del programa del horno de grafito se estudió en el rango de 400-600°C y 1150-1350°C para las etapas de pirólisis, y el rango de 2150-2350°C para la etapa de atomización. Las temperaturas óptimas para la pirólisis gradual de la fase de MIL fueron 550°C y 1300°C, mientras que las temperaturas de atomización inferiores y superiores a 2300°C no permitieron la atomización eficiente (Fig. 3.3.10).

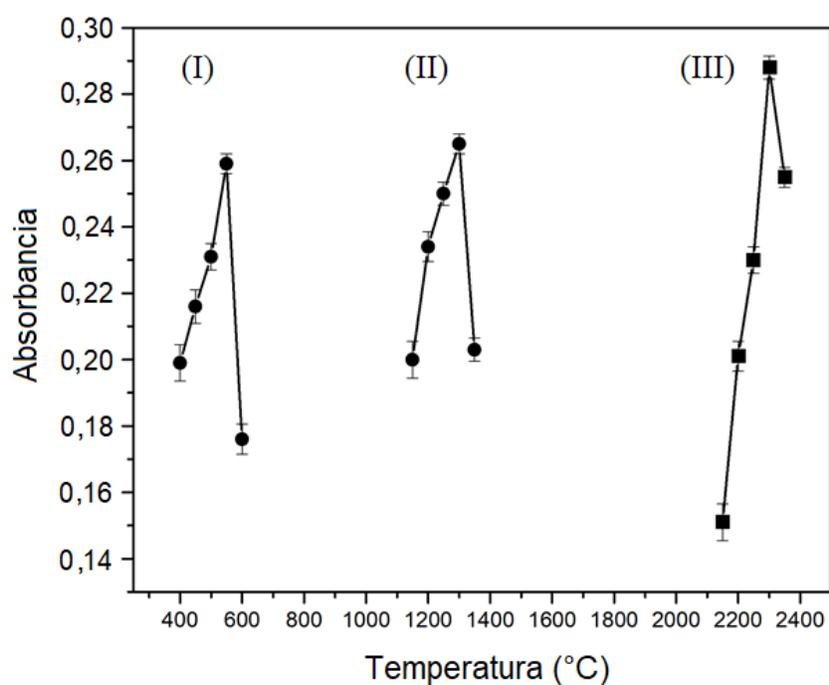


Fig. 3.3.10 Evaluación de las curvas de temperatura de pirólisis (●) y atomización (■) para una solución de 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cr mezclada con 50 μL de $[\text{P}_{6,6,6,14}]\text{FeCl}_4$ y 150 μL de CHCl_3 . (I) Etapa de pirólisis 1, (II) Etapa de pirólisis 2 y (III) Etapa de atomización. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 3.3.1 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Finalmente, se realizaron inyecciones de 10-40 μL de diferentes modificadores de matriz (750 mg L^{-1} de Mg, 300 mg L^{-1} de Mg + 500 mg L^{-1} de Pd y 300 mg L^{-1} de Mg + 2500 mg L^{-1} de H_2PO_4^-) y se evaluaron sus efectos sobre las señales obtenidas en ETAAS. El Mg se usa comúnmente como un modificador de matriz, el cual proporciona una buena estabilización térmica de Cr en el horno de grafito [19] y permitió obtener la mejor relación señal/fondo para la determinación de Cr por ETAAS cuando se inyectaron 40 μL . Otras condiciones de detección se describen en la Tabla 3.3.1.

Tabla 3.3.1 Condiciones instrumentales ETAAS para la determinación de Cr en miel.

Condiciones instrumentales				
Longitud de onda				357,9 nm
Ancho de banda espectral				0,7 nm
Corriente de lámpara HCL				25 mA
Modificador de matriz				30 $\mu\text{g Mg [Mg(NO}_3)_2]$ (40 $\mu\text{L 750 mg L}^{-1}$)
Programa de temperatura del horno de grafito				
Etapa	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de meseta (s)	Flujo de argón (mL min^{-1})
Secado 1	110	15	30	250
Secado 2	130	15	15	250
Pirólisis 1	550	15	20	250
Pirólisis 2	1300	10	20	250
Atomización	2300	0	3	0
Limpieza	2400	1	2	250

3.3.8 Influencia de la fuerza iónica y estudio de posibles especies interferentes

El efecto salino está relacionado con la caotropicidad y cosmotropicidad de los iones presentes en solución. Cuando una sal con iones caotrópicos se disuelve en agua, modifican la estructura interna de las moléculas de agua rompiendo los enlaces de hidrógeno, mientras que los iones cosmotrópicos estabilizan los enlaces de hidrógeno y, por lo tanto, favorecen el aumento de las agregaciones de moléculas de agua. En otras palabras, los iones caotrópicos favorecen el desorden de la solución (aumento de entropía), mientras que los iones cosmotrópicos conducen a un alto orden molecular en las soluciones (disminución de entropía). El efecto salino está relacionado con el cambio en la solubilidad de los solutos no ionizados en presencia de una sal disuelta en el mismo disolvente. La adición de una sal caotrópica puede aumentar la solubilidad (salting-in), mientras que una sal cosmotrópica puede disminuir la solubilidad (salting-out) [21].

En el caso de la técnica LLME y cuando se utiliza un IL en solución acuosa, se plantea como hipótesis de que cuando se disuelve una sal, existe una competencia entre el IL y la sal inorgánica por las moléculas de agua. Los iones inorgánicos tienen mayor afinidad por el agua, por lo tanto, hay una migración de moléculas de agua fuera del IL, lo cual disminuye la hidratación del mismo y reduce su solubilidad. Por lo tanto, en estas circunstancias, el efecto salino se correlaciona con la fuerza de hidratación de los iones de la sal inorgánica, permitiendo que el IL no esté hidratado para interactuar con el analito que se extrae y, a su vez, se separe fácilmente de la solución acuosa [22].

En este trabajo, la influencia de la fuerza iónica en la extracción de Cr, mediante el uso de sales caotrópicas y cosmotrópicas, se estudió dentro de un rango de concentración de sal del 1 al 3% (p/v). Para este estudio, las sales seleccionadas contenían el mismo catión (Na^+) pero diferentes aniones, modificando así el carácter caotrópico o cosmotrópico. En el caso de las sales caotrópicas en estudio (NaCl , NaNO_3 y NaClO_4) se esperaba que hubiera un aumento en la eficiencia de extracción. Este efecto se observó cuando se usó

NaNO₃ al 1% (p/v) (extracción del 98%), mientras que concentraciones superiores perjudicaron la eficiencia de extracción. Se observó un comportamiento similar con NaCl, pero se lograron eficiencias de extracción menores, mientras que el uso de NaClO₄ mostró extracciones significativamente menores porque provocó la solubilización parcial del MIL. Al estudiar las sales cosmotrópicas (citrato de sodio, NaHCO₃ y Na₂HPO₄) se observó un deterioro de la eficiencia de extracción. Los resultados mencionados anteriormente se exponen en la Fig. 3.3.11.

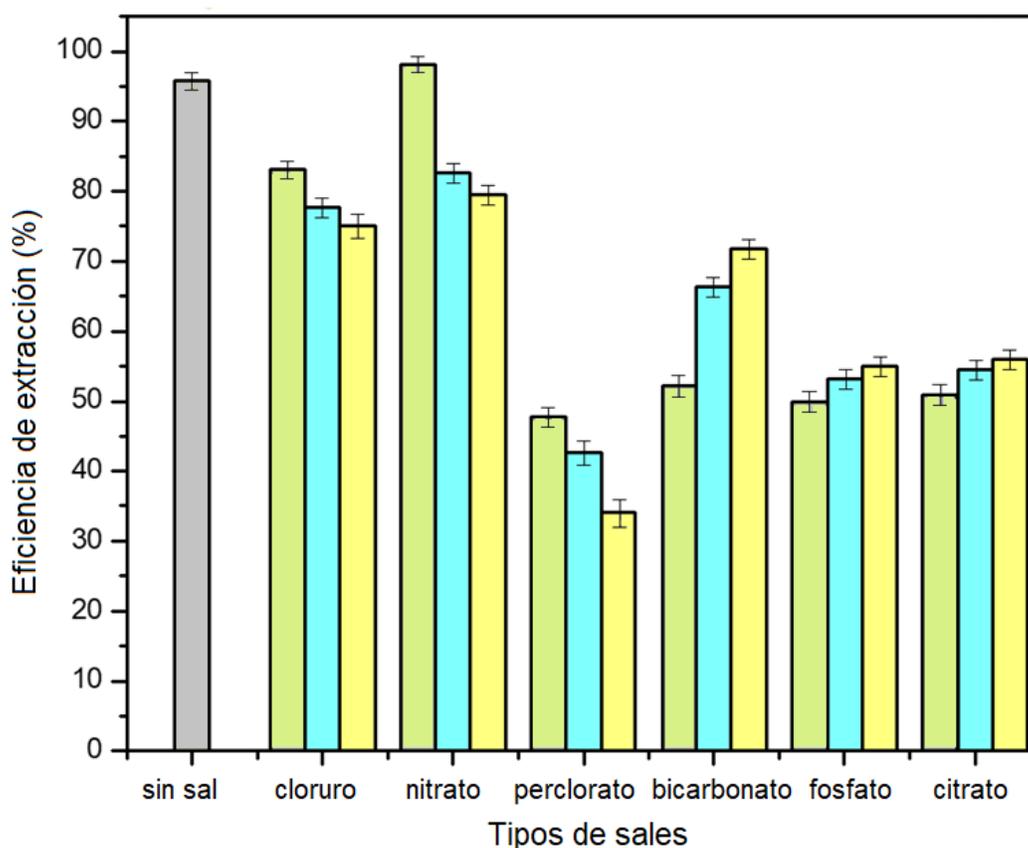


Fig. 3.3.11 Influencia de la fuerza iónica en la extracción de Cr. Uso de sales caotrópicas (NaCl, NaNO₃, NaClO₄) y cosmotrópicas (citrato de sodio, NaHCO₃, Na₂HPO₄). Concentraciones evaluadas: 1% (p/v), 2% (p/v) y 3% (p/v). Se pueden observar otras condiciones de extracción en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

Una vez que se definió el uso de NaNO_3 para ajustar la fuerza iónica, se realizó un estudio más exhaustivo para establecer el efecto de su concentración en el rango de 0 a 2% (p/v) (Fig. 3.3.12). Se confirmó que la extracción óptima se logró al 1% (p/v) de NaNO_3 .

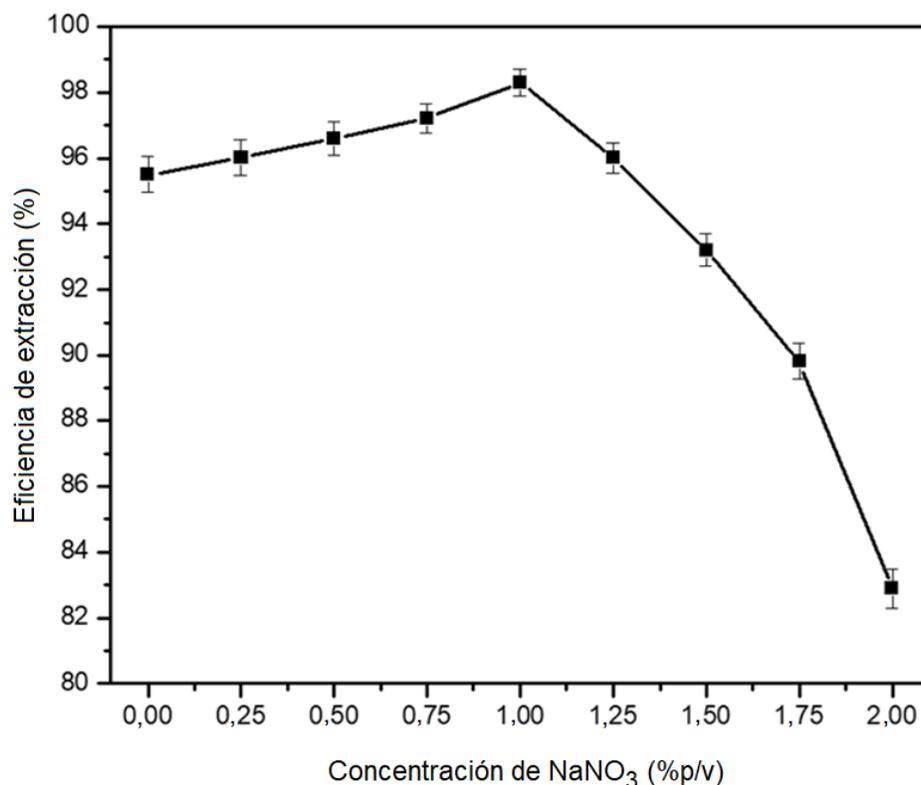


Fig. 3.3.12 Estudio de la variación de la concentración de NaNO_3 en la eficiencia de extracción. Se pueden observar otras condiciones de extracción en la Tabla 2.6 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Posteriormente, se desarrolló un estudio sistemático de posibles interferencias inorgánicas en la determinación de Cr por el método MIL-DLLME propuesto. Varios cationes pueden estar presentes en la miel en concentraciones altas o trazas, incluyendo Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ , así como aniones Cl^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} [23]. El estudio se realizó analizando una solución estándar de $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr(III) en presencia de cada ion concomitante a los niveles de concentración a los que normalmente se encuentran en la miel. Se consideró que un ion concomitante interfiere cuando causa una variación de la

señal analítica en $\pm 5\%$. Los resultados mostraron que los iones analizados no generaron efectos de interferencia hasta $250 \mu\text{g L}^{-1}$ para As^{3+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} y Pb^{2+} , 400mg L^{-1} para Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ , y hasta 650mg L^{-1} para Cl^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . Además, se estudió el efecto sobre la extracción de Cr de los principales compuestos orgánicos presentes en la matriz de miel. Los carbohidratos (glucosa y fructosa) se consideraron especialmente ya que representan alrededor del 75% del peso total de la miel [23]. Estos compuestos no generaron efectos de interferencia significativos a las concentraciones encontradas en la miel.

En la Fig. 3.3.13 se puede observar la señal obtenida en las condiciones óptimas de extracción para una solución estándar de $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr.

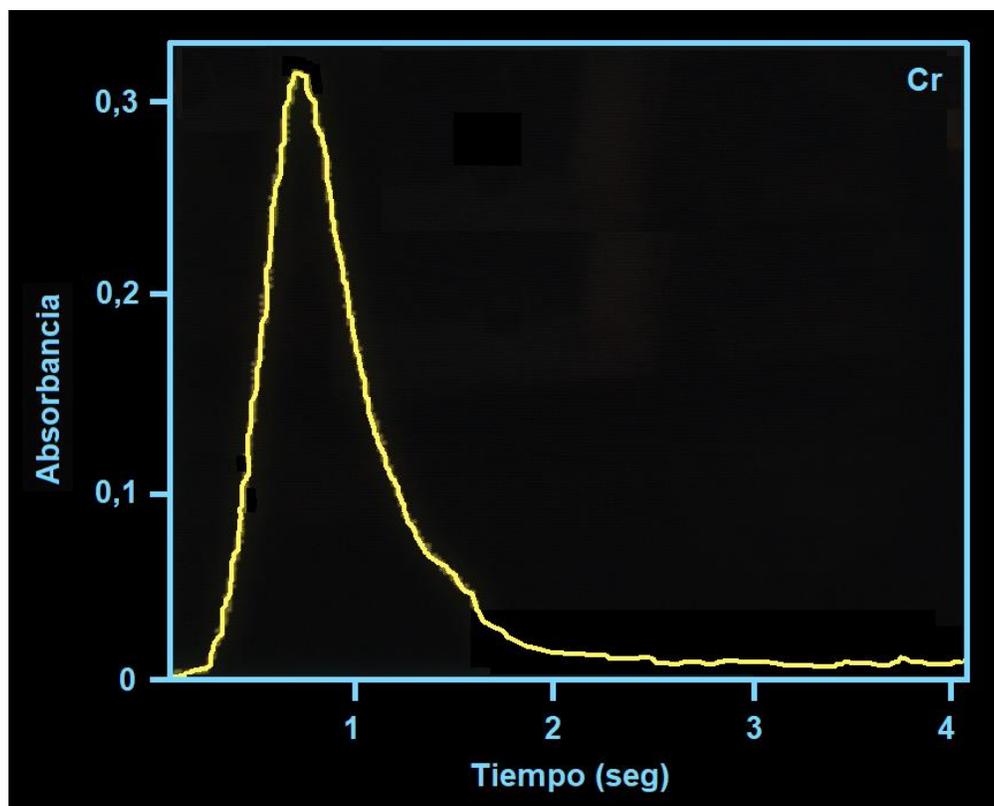


Fig. 3.3.13 Señal obtenida luego de la inyección de una solución de $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cr en condiciones óptimas del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.

3.3.9 Rendimiento analítico

El gráfico de calibración obtenido después de aplicar el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto para la determinación de Cr en muestras de miel mostró un rango lineal desde niveles cercanos al límite de detección (LOD) y hasta al menos 180 ng L^{-1} , con un coeficiente de correlación de 0,9987 (Fig. 3.3.14). El LOD obtenido fue de 5 ng L^{-1} de Cr ($0,125 \text{ ng Cr por g de miel}$) y se calculó en función de la señal en la intersección más tres veces la desviación estándar en la regresión de la curva de calibración [24]. La desviación estándar relativa (RSD) obtenida fue de 3,5%, calculada en base a la medición de diez réplicas de solución de muestra a $0,35 \mu\text{g L}^{-1}$ Cr.

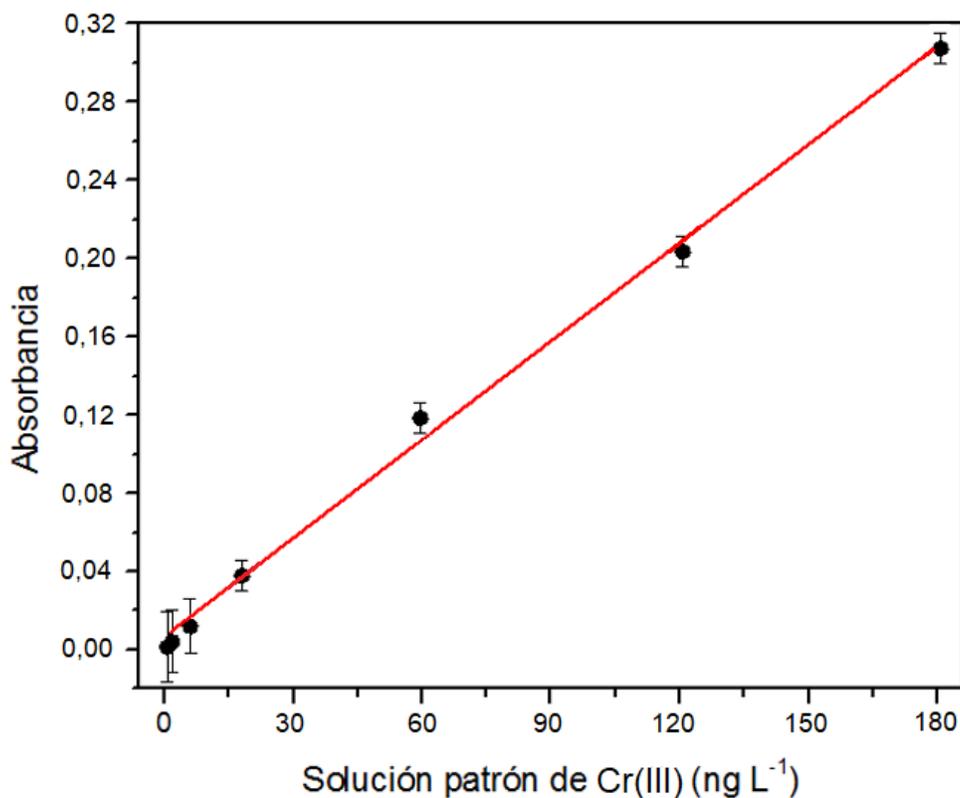


Fig. 3.3.14 Curva de calibración obtenida a partir del análisis de soluciones patrón de Cr(III) con el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto en condiciones óptimas (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

El factor de mejora de la sensibilidad (EF) se calculó a partir de la relación de pendiente de los gráficos de calibración antes y después de la aplicación del método MIL-DLLME propuesto [25]. Se logró obtener un EF de 105 para un volumen de muestra de 7 mL. La eficiencia de extracción se definió como la relación de masa total de Cr originalmente presente en la fase acuosa con respecto a la extraída en la fase de MIL [26]. Se obtuvo una eficiencia de extracción del 98% con la metodología optimizada (Tabla 2.6). El procedimiento completo de preconcentración (formación del par iónico, extracción en la fase de MIL dispersa, separación de la fase de MIL de la fase acuosa por una varilla magnética, dilución y medición del analito por ETAAS), podría tomar aproximadamente 16 minutos por muestra. Sin embargo, dado que fue posible tratar muchas muestras simultáneamente usando varias varillas magnéticas, la frecuencia de análisis se determinó principalmente mediante mediciones ETAAS en lugar del tiempo transcurrido para la extracción. Por lo tanto, se obtuvo una frecuencia analítica de al menos 12 muestras por hora con el método propuesto. A continuación, en la Tabla 3.3.2 se pueden observar los distintos parámetros que permiten evaluar el rendimiento analítico de la metodología desarrollada.

Tabla 3.3.2 Parámetros analíticos del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.

Parámetros	
Rango lineal	15-180 ng L ⁻¹
LOD	5,0 ng L ⁻¹
RSD	3,5 %
EF	105
Eficiencia de extracción	98,0 %
Frecuencia analítica	12 muestras h ⁻¹

La Tabla 3.3.3 muestra un estudio comparativo sobre el rendimiento analítico del método DLLME propuesto con respecto a los trabajos ya informados en la literatura que utilizan ILs como extractantes para la determinación de Cr por ETAAS. El método propuesto muestra LOD, EF y rango lineal comparable a otros métodos DLLME. Sin embargo, se ha señalado como una ventaja principal del método MIL-DLLME propuesto, que el paramagnetismo intrínseco del MIL simplifica la técnica DLLME porque evita el paso de centrifugación que requiere de mucho tiempo. Otro aspecto importante de este método es la posibilidad de realizar la determinación de Cr a niveles ultratrazas mediante una simple dilución de la matriz de MIL y su inyección en el horno de grafito de ETAAS.

Tabla 3.3.3 Métodos analíticos reportados en la literatura para preconcentración y determinación de Cr por IL-DLLME-ETAAS.

Extractante (cantidad)	Agente quelante	Dispersante (volumen)	LOD (ng L ⁻¹)	RSD (%)	EF ^a	Rango lineal (ng L ⁻¹)	Muestra (volumen)	Ref
[C ₈ mim]NTf ₂ ^b (100 µL)	APDC	-	2,0	8,0	300	5,0 - 100	Agua y juguetes plasticos (10 mL)	[27]
[C ₆ mim]PF ₆ ^c (50 µL)	APDC	-	70	9,2	300	500 - 8000	Agua (8 mL)	[28]
[C ₄ mim]BF ₄ ^d (80 mg) y [APmim]PF ₆ ^e (120 mg)	-	Acetona (250 µL)	5,0	3,8	52	20 - 900	Sangre humana (10 mL)	[29]
[C ₈ mim]PF ₆ (100 µL)	IICDET ^f	Acetona (200 µL)	5,4	3,8	25	20 - 175	Sangre humana (5 mL)	[30]
[P _{6,6,6,14}]FeCl ₄ (50 µL)	-	Acetonitrilo (50 µL)	5,0	3,5	105	15 - 180	Miel (7 mL)	Método propuesto

^aEF: Factor de refuerzo de la sensibilidad. Relación de las pendientes de las curvas de calibración para Cr con y sin el paso de preconcentración.

^bbis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metil imidazolio, ^chexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio, ^dtetrafluoroborato de 1-butil-3-metil imidazolio

^ehexafluorofosfato de 1-(3-aminopropil)-3-metil imidazolio, ^fisopropil-2-[(isopropoxicarbonotioil)sulfanil]etanotiolato.

3.3.10 Estudio de exactitud y determinación de Cr en muestras de miel

El método MIL-DLLME-ETAAS propuesto se aplicó para la determinación de Cr en muestras de miel de diferentes tonalidades. Los intentos de preparar y validar un material de referencia certificado (CRM) para oligoelementos en la miel se pueden encontrar en la literatura [31]. Sin embargo, estos CRM aún no se comercializan debido a problemas con la homogeneidad de la composición de la miel originada en las diferentes áreas de producción. Por esta razón, se desarrolló un estudio de recuperación realizado a tres niveles de concentración de Cr en presencia de la matriz de muestra en estudio. Los valores de recuperación obtenidos se encontraban en el rango de 94,0-101% (Tabla 3.3.4), lo que indica que el método MIL-DLLME fue adecuado para la determinación precisa de Cr en las muestras de miel. Las concentraciones de Cr obtenidas luego del análisis de las muestras se encontraban en el rango de 25,6-26,4 ng L⁻¹ para miel 'extra clara'; 38,1-39,5 ng L⁻¹ para miel 'clara'; 45,1-48,3 ng L⁻¹ para miel 'ámbar extra clara'; 71,4-72,9 ng L⁻¹ para miel 'ámbar claro'; 75,0-75,7 ng L⁻¹ para miel 'ámbar' y 79,2-80,7 ng L⁻¹ para miel 'ámbar oscuro'. Estos resultados indican que a medida que aumenta la tonalidad de las muestras de miel en estudio, aumenta el contenido de Cr. Se han reportado resultados similares al vincular un mayor contenido mineral con una coloración creciente de la miel [23]. Los valores de concentración de Cr encontrados en este trabajo son consistentes con el contenido de este mineral en trabajos previos reportados en la literatura.

Tabla 3.3.4 Determinación de Cr en miel y estudio de recuperación (Intervalo de confianza del 95%; n = 6).

Muestra de miel	Añadido (ng L⁻¹)	Encontrado (ng L⁻¹)	Recuperación (%)^a	Muestra de miel	Encontrado (ng L⁻¹)	Recuperación (%)^a
Extra clara 1	0	25,6 ± 0,8 (0,090) ^b	-	Extra clara 2	26,4 ± 0,9 (0,092) ^b	-
	20	44,9 ± 1,6	96,5		46,0 ± 1,7	98,0
	40	64,0 ± 1,8	96,0		66,2 ± 1,8	99,5
	80	103,5 ± 2,5	97,4		105,1 ± 2,6	98,4
Clara 1	0	38,1 ± 1,1 (0,133) ^b	-	Clara 2	39,5 ± 1,3 (0,138) ^b	-
	20	58,1 ± 1,7	100		58,9 ± 1,9	97,0
	40	77,2 ± 2,1	97,7		78,4 ± 2,3	97,2
	80	117,5 ± 2,5	99,2		118,0 ± 2,5	98,1
Ámbar extra clara 1	0	45,1 ± 1,5 (0,158) ^b	-	Ámbar extra clara 2	48,3 ± 1,8 (0,169) ^b	-
	20	64,9 ± 2,0	99,0		67,8 ± 2,2	97,5
	40	84,3 ± 2,3	98,0		88,0 ± 2,4	99,2
	80	122,5 ± 2,6	96,7		128,0 ± 2,8	99,6

Ámbar claro 1	0	71,4 ± 2,0	-	Ámbar claro 2	72,9 ± 2,2	-	
		(0,250) ^b				(0,255) ^b	
	20	90,9 ± 2,4	97,5			92,3 ± 2,5	97,0
	40	110,1 ± 2,6	96,7			112,0 ± 2,6	97,7
	80	150,5 ± 3,0	98,9		153,0 ± 3,1	100	
Ámbar 1	0	75,0 ± 2,4	-	Ámbar 2	75,7 ± 2,4	-	
		(0,262) ^b				(0,265) ^b	
	20	94,3 ± 2,6	96,5			94,9 ± 2,7	96,0
	40	112,8 ± 2,8	94,5			113,6 ± 2,9	94,7
	80	152,1 ± 3,2	96,4		152,8 ± 3,2	96,4	
Ámbar oscuro 1	0	79,2 ± 2,6	-	Ámbar oscuro 2	80,7 ± 2,8	-	
		(0,277) ^b				(0,282) ^b	
	20	98,1 ± 2,7	94,5			99,9 ± 2,7	96,0
	40	116,9 ± 2,9	94,2			118,8 ± 3,0	95,2
	80	154,4 ± 3,3	94,0		156,6 ± 3,4	94,9	

^a(Encontrado-Base)/Añadido × 100

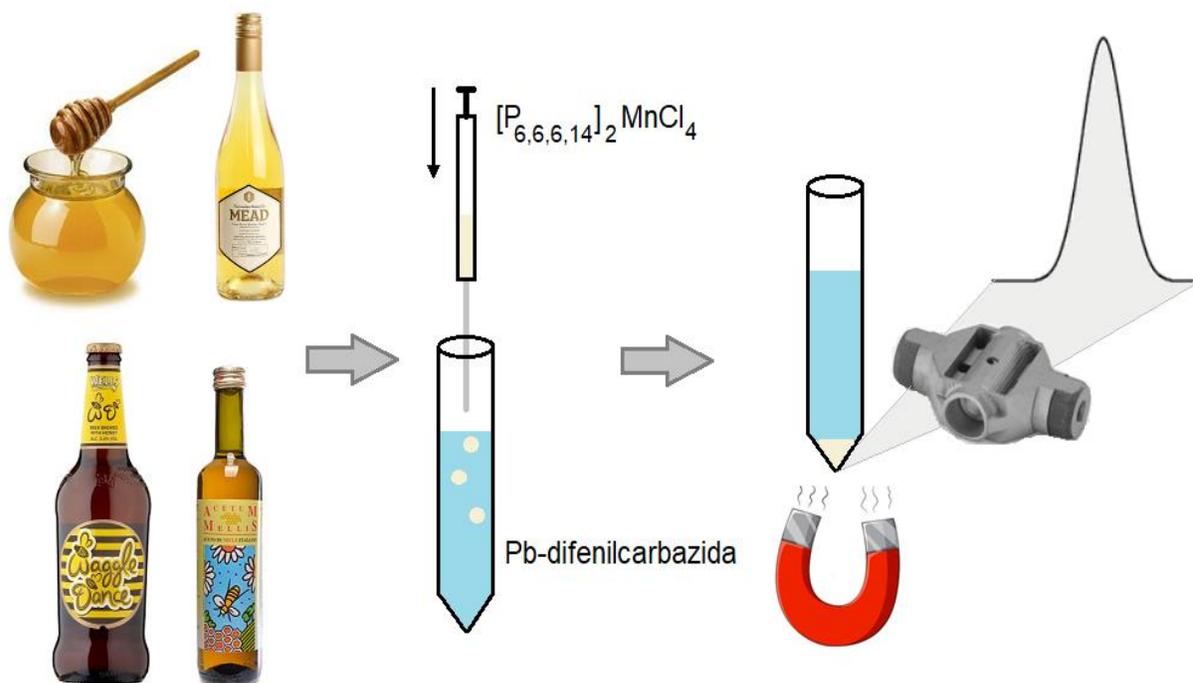
^bConcentración de Cr expresado como ng de Cr por g de miel (ng g⁻¹)

3.3.11 Conclusiones

En este trabajo, se ha demostrado que el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ es una excelente alternativa para la extracción eficiente de Cr y su determinación a niveles traza en muestras complejas como la miel. Para aplicar un MIL que contenga cantidades significativas de Fe en DLLME, se debió desarrollar un estudio detallado para determinar el efecto de matriz del MIL en la señal analítica y remediar el efecto de la interferencia durante la detección de Cr por ETAAS.

La principal ventaja de utilizar un MIL en DLLME se basa en la separación con mayor facilidad de la fase de extracción por un campo magnético externo, evitando así el paso de centrifugación. Además, la metodología propuesta permitió la extracción y preconcentración de Cr(III) en la fase de MIL mediante el uso de medio ácido proporcionado por HCl y la formación de pares iónicos, sin el uso de agentes complejantes. Por otro lado, la metodología propuesta permitió la determinación de Cr incluso en la matriz compleja del MIL, mediante una simple dilución de la fase del MIL e inyección directa en ETAAS. Por lo tanto, se logró una alta sensibilidad analítica a pesar de la alta complejidad de la matriz en estudio. De esta manera, el método MIL-DLLME propuesto puede considerarse una herramienta valiosa para la determinación de Cr en miel a niveles ultratrazas, especialmente en laboratorios de rutina dedicados al control de calidad de este tipo de alimentos.

3.4 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Pb en productos apícolas



3.4.1 Introducción

Los productos apícolas se consideran alimentos importantes y saludables, debido a su contenido de vitaminas, minerales y antioxidantes [1]. Hoy en día, los productos derivados de la miel se utilizan cada vez más, incluido el vino de miel (hidromiel), el vinagre de miel y la cerveza de miel, debido a que la sustitución del azúcar refinado por la miel brinda a los productos derivados beneficios para la salud. Esto se debe a diversas características de la miel, como por ejemplo el hecho de que, es bactericida y fortalece el sistema inmunológico [2]. Sin embargo, las abejas melíferas están expuestas a la contaminación ambiental, transportando xenobióticos a la colmena que pueden afectar las

características de la miel y sus derivados [3]. Por lo tanto, la determinación de contaminantes en productos apícolas es necesaria para su comercialización y para asegurar que los mismos estén libres de contaminantes nocivos.

El Pb se considera un contaminante altamente tóxico debido a que la absorción por parte del organismo de pequeñas cantidades causa efectos adversos para la salud, como disfunción respiratoria, renal, cardiovascular y reproductiva [4]. Por lo tanto, las cantidades residuales de Pb en los alimentos son fuertemente reguladas por los diferentes países para permitir el comercio y consumo seguro de los mismos. Por ejemplo, el Reglamento Técnico del Mercosur establece un límite máximo permitido de $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$ de Pb en miel; $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb en bebidas alcohólicas en general (como la cerveza y vinagre de miel) y $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ de Pb en vino (como la hidromiel) [5]. Por otro lado, según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), se establece un límite máximo de Pb en miel de $2,0 \mu\text{g g}^{-1}$ [6]. Por lo tanto, teniendo en cuenta las bajas concentraciones a las que se puede encontrar el Pb en productos apícolas, así como los bajos límites establecidos por diversas autoridades regulatorias, el desarrollo de métodos analíticos sensibles y precisos son una demanda constante en la industria alimentaria.

Para determinar el Pb en productos apícolas con exactitud, precisión y sensibilidad a los bajos niveles de concentración requeridos por las legislaciones, la preconcentración previa a la detección a menudo se requiere para la mayoría de las técnicas de detección instrumental. Se han informado varios métodos analíticos de microextracción basados en ILs para la preconcentración de Pb en muestras de diferente complejidad con determinación por ETAAS. Estas técnicas de microextracción incluyen, microextracción en gota única (SDME) en agua [7], microextracción en fase líquida con fibra hueca (HFLPME) en muestras ambientales y biológicas [8] y DLLME en muestras de agua y lixiviado de juguetes [9]. Del mismo modo, se han desarrollado métodos analíticos de microextracción centrados en el uso de ILs con la adición de magnetita, para proporcionar magnetismo a la metodología,

los cuales se aplicaron a la determinación de Pb en agua [10] y aceites vegetales comestibles [11].

Alternativamente, se han comenzado a utilizar MILs, que evitan el uso de la centrifugación y la adición de magnetita, y a su vez se pueden separar fácilmente con un imán [12]. Se han aplicado MILs de tipo fosfonio en DLLME para la extracción de diferentes metales [13-15], sin embargo, estas metodologías han requerido estudios rigurosos para remediar la presencia de Fe en la fase de extracción, debido a que genera interferencias en la determinación de Pb por ETAAS y a su vez limita el pH de trabajo. De esta manera, los MILs compuestos de otros metales paramagnéticos, como Co, Mn y Dy, pueden ser alternativas útiles para desarrollar nuevos métodos de preconcentración analítica, que eviten los inconvenientes generados por el Fe [16].

En esta última parte del trabajo experimental de la tesis, se desarrolló una técnica DLLME asistida por el MIL $[P_{6,6,6,14}]_2MnCl_4$ para la extracción y preconcentración de Pb a niveles ultratraza en productos apícolas con detección por ETAAS. Para ello, se realizó un estudio detallado de la complejación de Pb con 1,5-difenilcarbazida y su transferencia a la fase de MIL. La optimización de las condiciones experimentales se desarrolló a través de un enfoque multivariado.

3.4.2 Ensayos preliminares sobre la determinación de Pb en MILs

En este trabajo, se probó una serie de MILs de tipo fosfonio como agentes de extracción para el desarrollo del método DLLME propuesto. Por lo tanto, se seleccionó en forma preliminar aquellos MILs que contienen diferentes aniones paramagnéticos, como Co(II), Fe(III), Mn(II) y Dy(III), que por ende, proporcionan una alta susceptibilidad magnética [17]. Este fenómeno es justificado en base al número de electrones desapareados presentes en el orbital más externo de cada ión. De esta manera, los iones Fe(III) y Mn(II) presentan 5 electrones desapareados, mostrando una alta susceptibilidad

magnética, mientras que Co(II) solo presenta 3 electrones desapareados, por lo que su susceptibilidad magnética es relativamente menor. Por otro lado, Dy(III) presenta 7 electrones no apareados, lo que determina la susceptibilidad magnética más alta de los iones en estudio. El comportamiento expuesto puede observarse en la Fig. 3.4.1.

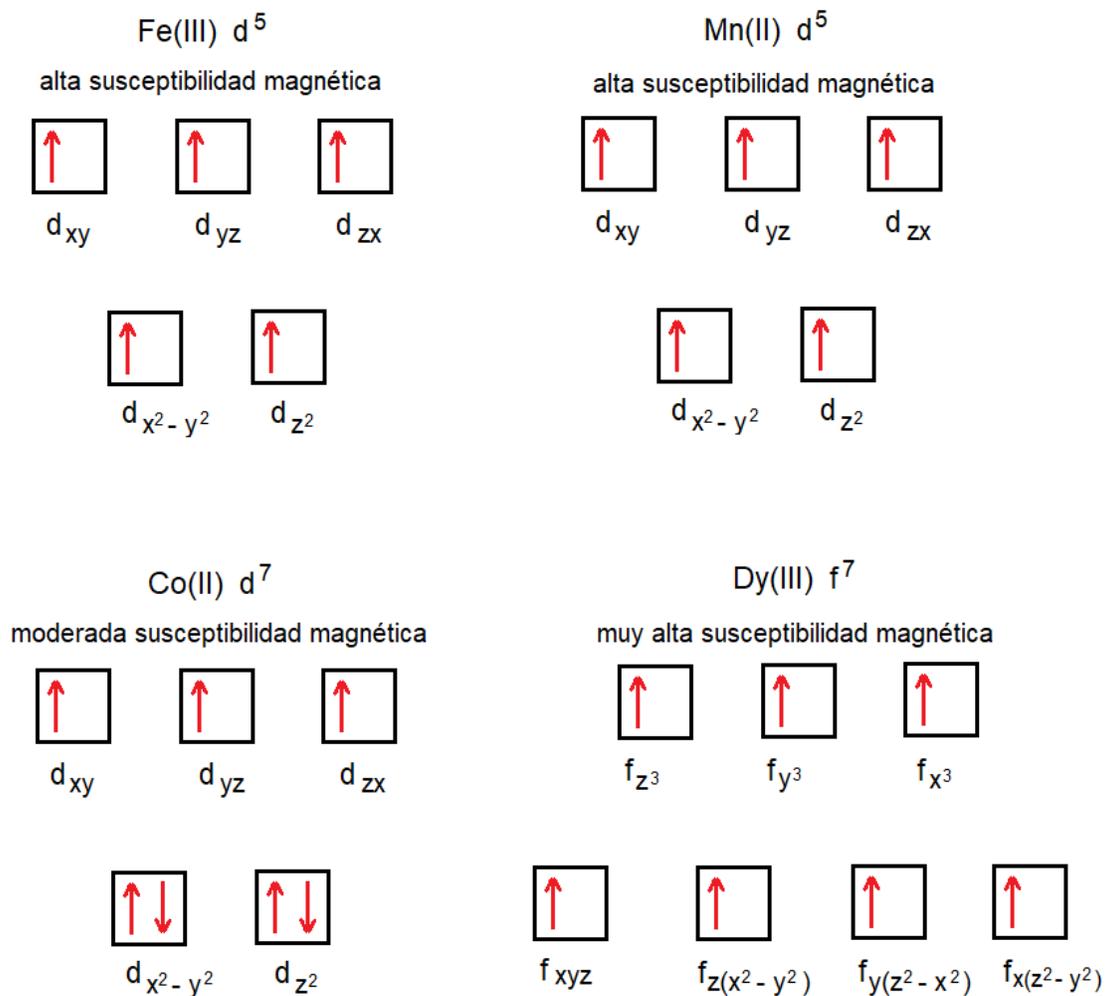


Fig. 3.4.1 Diagrama esquemático de la susceptibilidad magnética presentada por Fe(III), Mn(II), Co(II) y Dy(III).

En un primer estudio, se evaluó la posibilidad de determinar con exactitud y precisión el Pb en presencia de las diferentes matrices proporcionadas por los MILs. Cada MIL se disolvió en cloroformo para formar una solución al 50% (p/v) y se inyectaron alícuotas de 20 µL en el horno de grafito de ETAAS junto con 100 µg L⁻¹ de solución estándar de Pb. Se

observó un deterioro de la señal cuando se utilizó el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$. Por otro lado, los MILs formados por Co(II) y Dy(III) no deterioraron significativamente la señal, mientras que $[P_{6,6,6,14}]_2MnCl_4$ permitió la determinación de Pb sin deterioro de la señal de absorbancia. Posteriormente, se evaluó la eficiencia de extracción de Pb utilizando los MILs de Co(II), Mn(II) y Dy(III). Para este estudio, se utilizaron como agentes extractantes soluciones de cloroformo al 50% (p/v) de los MIL planteados. Las muestras se ajustaron a 1 mol L^{-1} de HCl, junto con la adición de $15 \text{ }\mu\text{L}$ de 1 mg L^{-1} de Pb(II) y $30 \text{ }\mu\text{L}$ de 50 mg L^{-1} de APDC, debido a que es un agente complejante comúnmente utilizado para quelar Pb en medio ácido. Se utilizó agitación por vortex en muestras de 5 mL durante 10 minutos. El MIL $[P_{6,6,6,14}]_2MnCl_4$ permitió obtener una extracción de Pb cercana al 40%. Mientras que $[P_{6,6,6,14}]_2CoCl_4$ y $[P_{6,6,6,14}]_3DyCl_6$ mostraron eficiencias de extracción menores al 15%. Por lo que se decidió utilizar el MIL de Mn(II) para el resto de los estudios.

3.4.3 Condiciones para la formación del complejo

La extracción de elementos con ILs hidrófobos generalmente se realiza mediante la formación de un complejo no polar o mediante el uso de un agente quelante orgánico que permite una extracción del analito más eficiente [18]. En base a las condiciones ácidas del medio de extracción, fue necesaria la elección de agentes complejantes típicos para Pb que formaran un complejo estable en estas condiciones [19]. Los agentes complejantes elegidos fueron: APDC, DDTc, DDTP, HQ y DFC. Para este estudio, se utilizó una relación molar 1:100 (analito:complejante), con $15 \text{ }\mu\text{L}$ de solución de Pb(II) de 1 mg L^{-1} , 5 mL de muestra y agitación por vortex durante 10 minutos. DFC mostró una eficiencia de extracción de alrededor del 90%, que fue significativamente mayor que el resto de los agentes complejantes en estudio, como se puede observar en la Fig. 3.4.2.

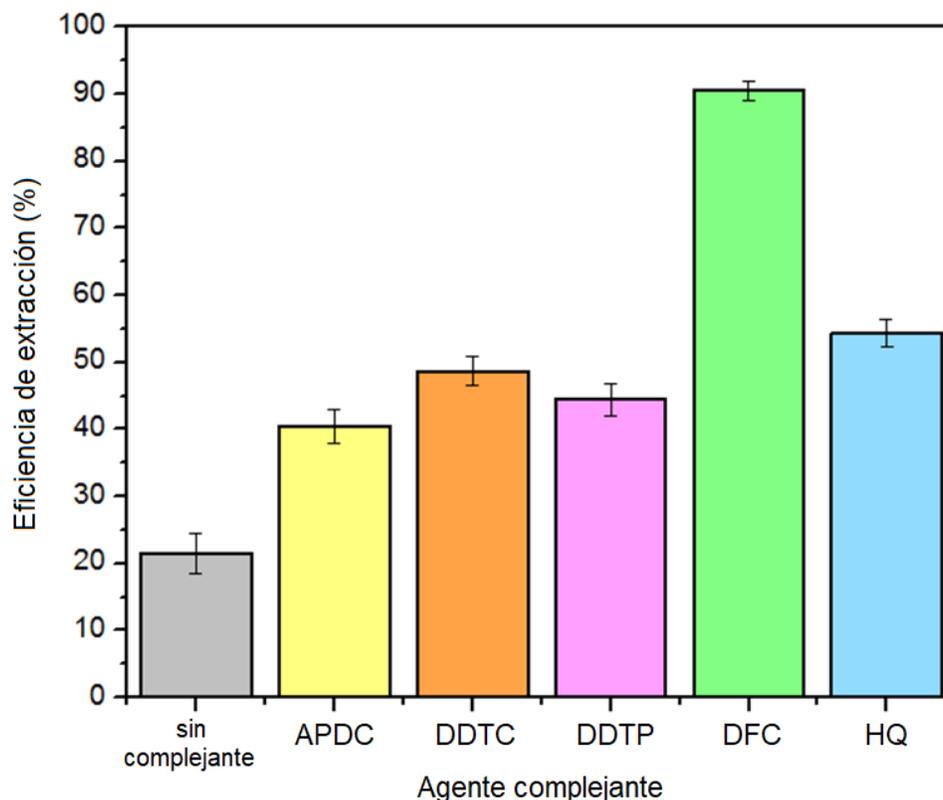


Fig. 3.4.2 Efecto del tipo de agente complejante en la extracción de Pb en el método propuesto. Extracción de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II) en 5 mL de muestra ajustada a 1 mol L^{-1} de HCl, con agitación por vortex durante 10 min y 150 μL de MIL. Agentes complejantes utilizados: APDC, DDTC, DDTP, DFC y HQ (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

Posteriormente, se estudió el efecto de la concentración de DFC para establecer una concentración mínima de agente quelante que permitiera la formación total del complejo Pb-DFC y la mayor eficiencia de extracción. Se analizaron diferentes relaciones molares de Pb:DFC y se observó que una relación molar de 1:100 permitió obtener una eficiencia de extracción del 91%, como se puede observar en la Fig. 3.4.3 a. Finalmente, se estudió el efecto de la concentración de HCl en la formación del complejo Pb-DFC y la eficiencia de extracción en el rango de 0,1 a $2,5 \text{ mol L}^{-1}$. Se obtuvo una eficiencia de extracción máxima del 92,5% ajustando el medio a $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl (Fig. 3.4.3 b).

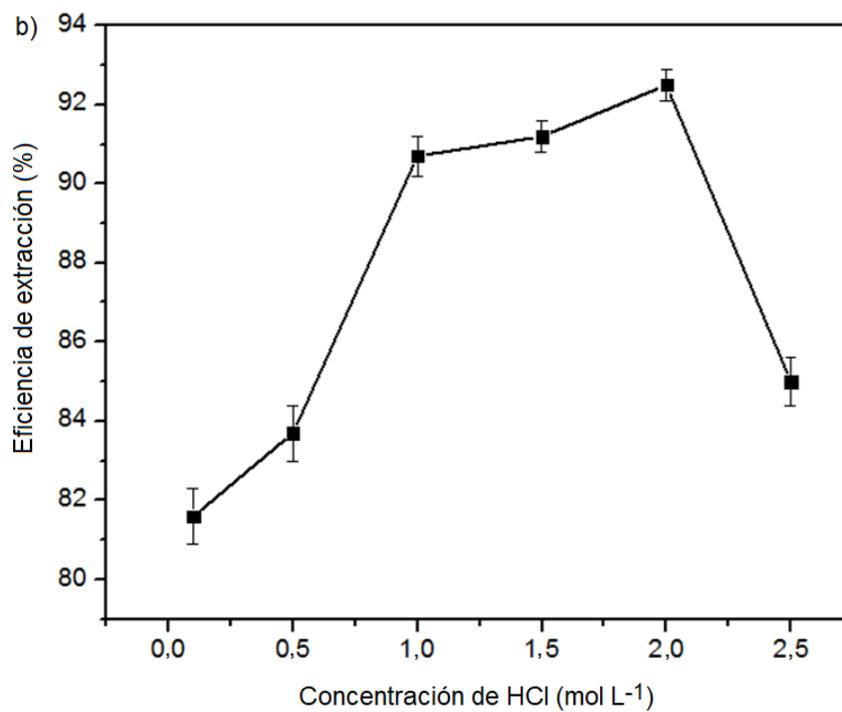
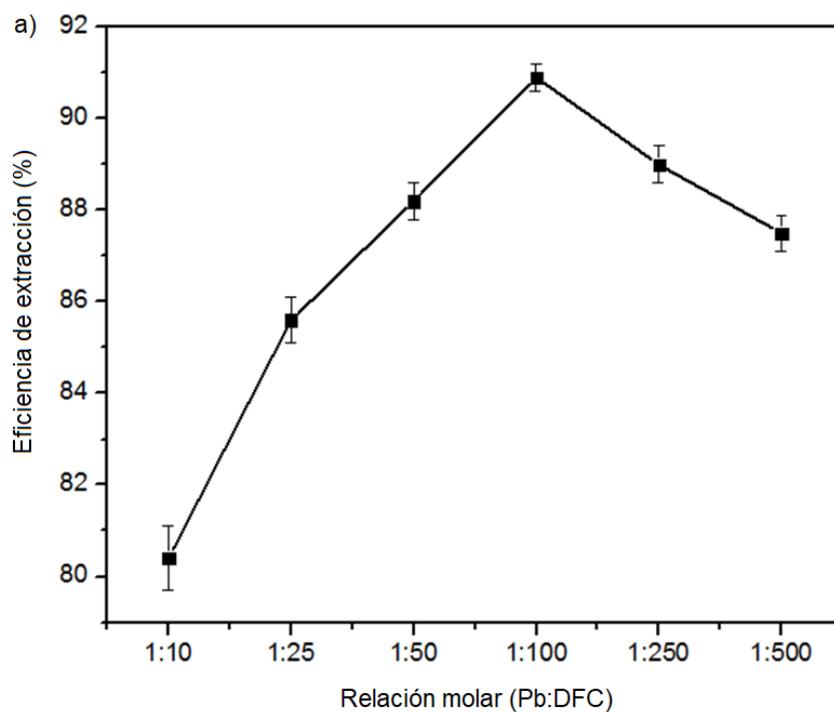


Fig. 3.4.3 (a) Evaluación del efecto de la relación molar (Pb:DFC) sobre la eficiencia de extracción del método propuesto. (b) Efecto de la concentración de HCl sobre la extracción del complejo Pb-DFC. Otras condiciones se pueden observar en la Tabla 2.7 (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.4.4 Optimización multivariada de las condiciones de extracción

La estrategia univariada presenta inconvenientes cuando hay interacciones entre los factores evaluados en la optimización de la metodología, debido a que no es posible informar cómo interactúa un factor con el resto, o determinar cómo estas interacciones afectan la respuesta. De esta manera, con el método univariado se obtiene una comprensión limitada del sistema en estudio. Además, en general no proporciona las condiciones óptimas, ya que el experimentador solo varía un factor a la vez, lo cual es ineficiente cuando muchos factores tienen que estudiarse a diferentes valores. Por otro lado, dicha estrategia requiere gran cantidad de experimentos y tiempo. Estos inconvenientes se pueden remediar mediante la variación de más de un factor simultáneamente (estrategia multivariada). De esta manera, es posible obtener información sobre las interacciones entre las variables en estudio, con un número reducido de experimentos [20].

En el presente trabajo, se realizó una optimización multivariada de una serie de variables que influyen en la eficiencia de extracción de Pb en la fase de MIL. Se utilizó el software Design Expert® 7.0 (StatEase Inc., Minneapolis, EE. UU.) para procesar todos los resultados y evaluar los estadísticos.

3.4.4.1 Variables categóricas

Se realizaron diferentes experimentos para preseleccionar los factores óptimos de cada variable categórica en la eficiencia de extracción del método. En principio, se evaluó la influencia del tipo de agitación (vortex y ultrasonido) durante 10 minutos. En estos experimentos, la agitación con ultrasonido resultó ineficiente. Posteriormente, se estudió el uso de diferentes dispersantes (acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, etanol y metanol) a un volumen de 50 μ L. Finalmente, se evaluó la influencia de la fuerza iónica, debido a que la adición de sal generalmente permite aumentar el rendimiento de extracción

de algunos analitos en función del efecto salino [21]. Para este estudio, se investigó el uso de diferentes sales (NaClO_4 , NaNO_2 , NaNO_3 , NaCl , KCl , MgCl_2 y CaCl_2) a una concentración final del 1% (p/v).

Los factores óptimos obtenidos fueron: 10 min de agitación por vortex, 50 μL de acetonitrilo como dispersante y 1% (p/v) de NaCl para ajustar la fuerza iónica. Se pueden observar otras condiciones experimentales en la Tabla 2.7. En esta serie de estudios, fue posible mejorar la eficiencia de extracción de 92,5 a 94,5%; como se puede observar en la Fig. 3.4.4 a y 3.4.4 b.

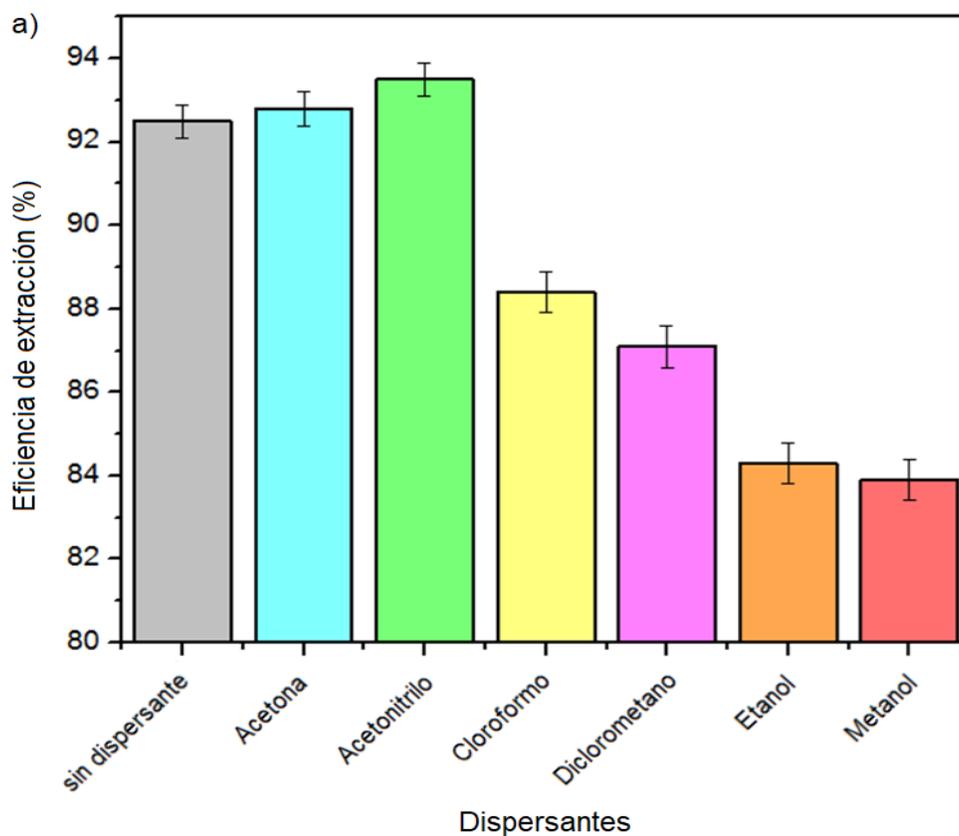


Fig 3.4.4 (a) Efecto del tipo de dispersante (50 μL): acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, etanol y metanol, sobre la eficiencia de extracción para 5 mL de muestra y 150 μL de fase de MIL (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

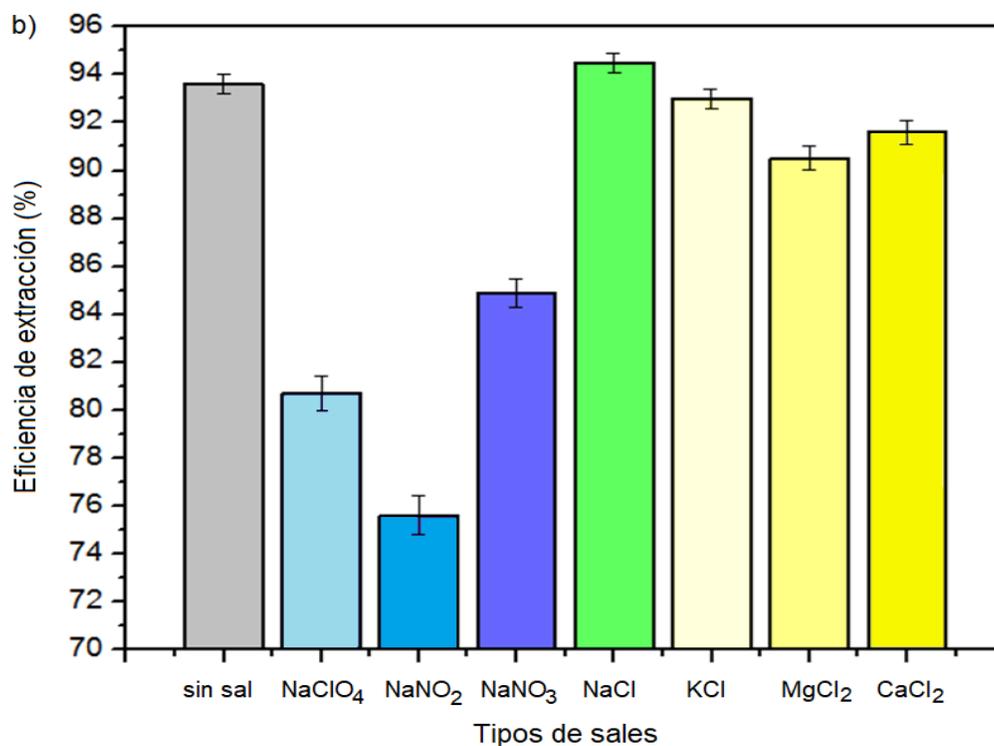


Fig 3.4.4 Continuación. (b) Influencia de la fuerza iónica, las sales utilizadas a una concentración del 1% (p/v) fueron: NaClO₄, NaNO₂, NaNO₃, NaCl, KCl, MgCl₂ y CaCl₂ (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

3.4.4.2 Selección de factores

La siguiente etapa consistió en la evaluación de las variables numéricas del sistema a través de un proceso multivariado. Los factores e intervalos analizados fueron: concentración de NaCl (0-1% (p/v)), volumen de dispersante (35-65 μL), tiempo de agitación (6-10 min), volumen de fase extractante (90-150 μL) y volumen de muestra (5-8 mL). El analito se determinó midiendo la altura máxima de las señales de absorbancia de Pb obtenidas después de la concentración previa de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II). El modelo seleccionado en el software fue Plackett Burman, que requirió un total de 15 experimentos, como se puede observar en la Tabla 3.4.1. A través de un orden lineal y un modelo polinomial, se obtuvo un modelo significativo y concéntrico, cuya falta de ajuste no fue significativa. La

respuesta requirió transformación logarítmica donde se obtuvo un R^2 de 0,9962 y R^2 ajustado de 0,9902 con un coeficiente de variación del 1,0%.

Tabla 3.4.1 Ensayos requeridos en la selección de factores significativos.

Ensayo	NaCl %(p/v)	Dispersante (μL)	Agitación (min)	MIL (μL)	Muestra (mL)	Eficiencia de extracción (%)
1	0	35	10	150	8	93,7
2	0	35	6	150	8	82,6
3	0,50	35	6	90	5	88,2
4	0,25	50	8	120	6,5	86,4
5	0,50	65	10	150	5	87,7
6	0,50	35	10	150	5	81,3
7	0	65	10	90	8	78,5
8	0	65	10	90	5	75,4
9	0,25	50	8	120	6,5	82,6
10	0,50	65	6	90	8	78,2
11	0	35	6	90	5	75,9
12	0,50	35	10	90	8	75,6
13	0	65	6	150	5	71,1
14	0,50	65	6	150	8	76,1
15	0,25	50	8	120	6,5	80,3

Luego del análisis de varianza (ANOVA) proporcionado por el software, se utilizó el gráfico de Pareto para determinar las variables con efectos significativos en el modelo. Como se puede observar en la Fig. 3.4.5, el volumen de muestra y el volumen de dispersante no fueron variables significativas. Se decidió minimizar el volumen de

acetonitrilo como dispersante (35 μ L) y maximizar el volumen de la muestra (8 mL) para el resto de los experimentos. Por otro lado, 3 variables fueron significativas en el modelo, el volumen de la fase extractante y el tiempo de agitación con efecto positivo en la señal, y por otro lado, la concentración de sal con efecto negativo en la señal.

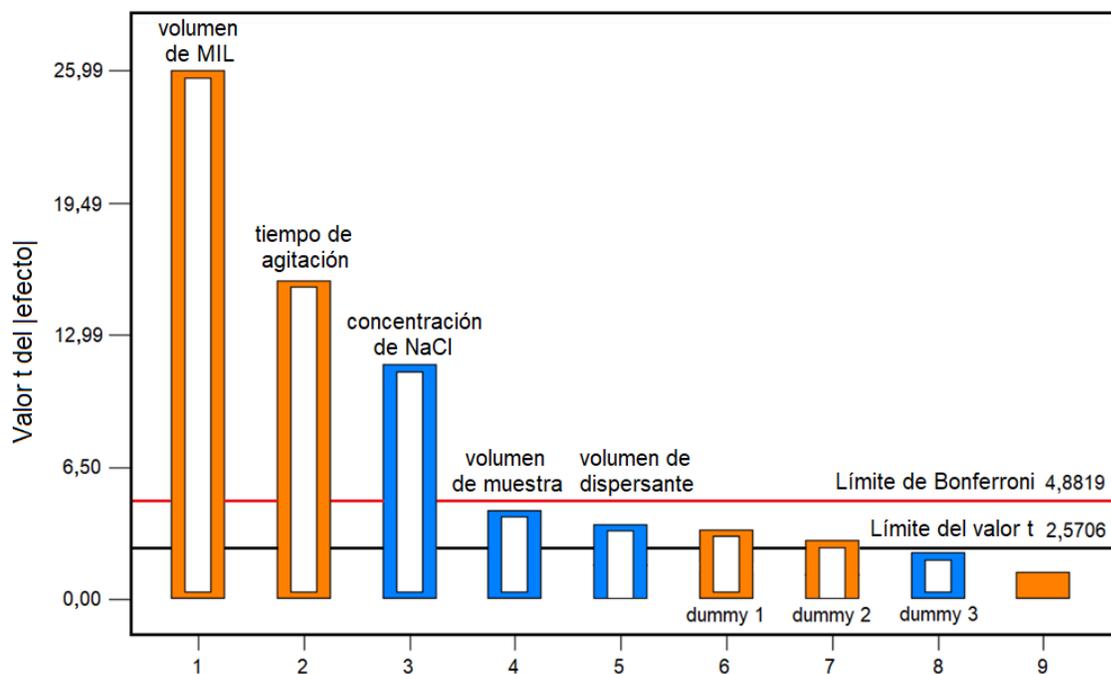


Fig. 3.4.5 Gráfico de Pareto de Pb para determinar los efectos significativos de las variables en la eficiencia de extracción. ■ Efecto significativo positivo y ■ efecto significativo negativo. Las condiciones instrumentales y de preconcentración para la determinación de Pb se pueden observar en la Tablas 2.7 y 3.4.1.

3.4.4.3 Superficie de respuesta

La última etapa de la optimización multivariada fue el análisis de la superficie de respuesta. Considerando el comportamiento del modelo obtenido en la "Selección de Factores", las variables significativas se evaluaron en los siguientes rangos: concentración de NaCl (0-0,5% (p/v)), tiempo de agitación (6-10 min) y volumen de la fase de extracción (90-150 μ L). Se seleccionó un modelo tipo Box-Behnken, que requirió de 15 ensayos, como se puede observar en la Tabla 3.4.2. A través de un modelo de orden cúbico, se obtuvo un

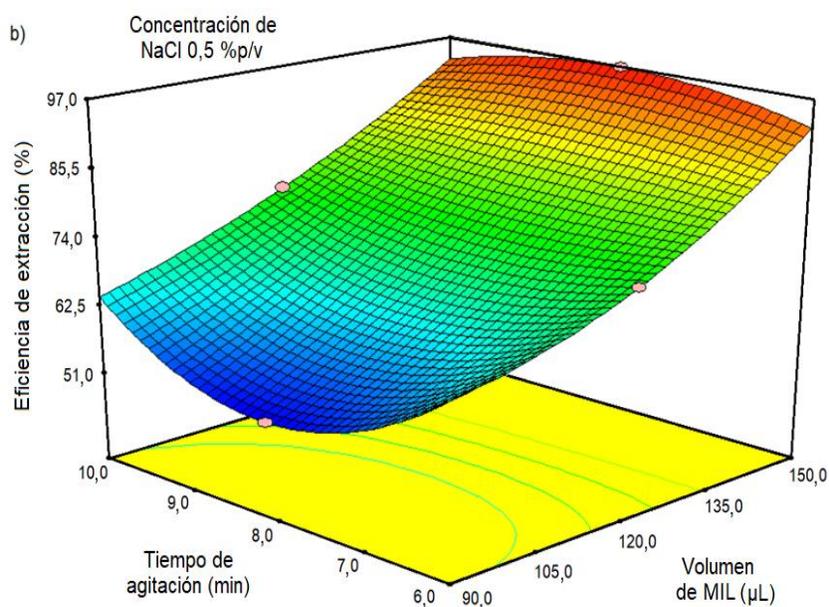
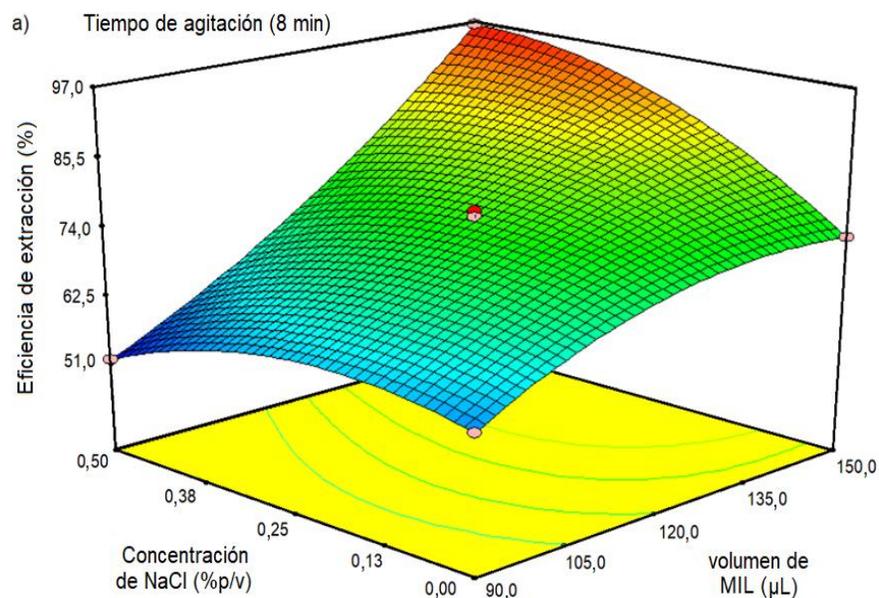
modelo concéntrico y significativo, cuya falta de ajuste fue no significativa. No se requirió una transformación de la respuesta y se obtuvo un coeficiente de variación de 0,74% con R^2 de 0,9996 y R^2 ajustado de 0,9973; lo que indica una buena correlación entre los datos experimentales y el modelo ajustado.

Tabla 3.4.2 Ensayos requeridos en la etapa de superficie de respuesta.

Ensayo	Concentración de NaCl (% p/v)	Tiempo de agitación (min)	Volumen de MIL (μL)	Eficiencia de extracción (%)
1	0,25	8	120	85,9
2	0,25	10	90	82,7
3	0,25	6	90	82,6
4	0	10	120	86,1
5	0,25	6	150	94,8
6	0,5	10	120	85,1
7	0,5	8	90	50,8
8	0,5	6	120	82,8
9	0	8	150	81,6
10	0,25	10	150	96,1
11	0	8	90	67,5
12	0,25	8	120	85,1
13	0	6	120	82,7
14	0,25	8	120	86,2
15	0,50	8	150	96,9

En la Fig. 3.4.6 se pueden observar las superficies de respuesta obtenidas en el sistema, con lo que se puede concluir que la eficiencia de extracción es máxima (97,0%)

maximizando el volumen de la fase extractante (150 μL), utilizando una concentración de sal mayor al punto central (mayor que 0,25% (p/v)) y tiempo de agitación de 8 min. Posteriormente, se desarrollaron pruebas variando la concentración de sal de 0,25 a 0,50% (p/v) donde se verificó que al maximizar la concentración de NaCl la eficiencia de extracción era óptima.



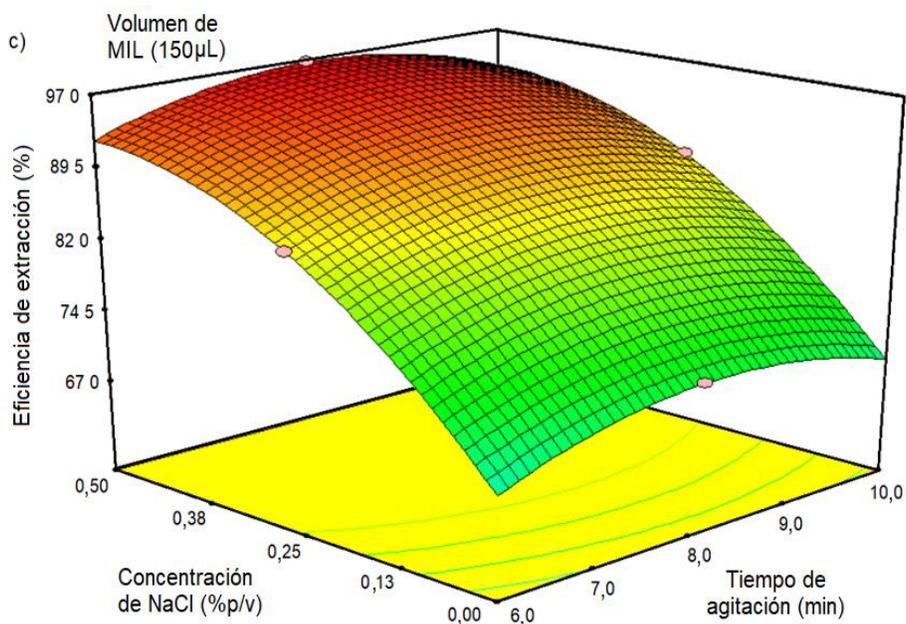


Fig. 3.4.6 Gráficos de superficie de respuesta en la determinación de Pb para determinar las condiciones óptimas de extracción. Influencia en la eficiencia de extracción variando: (a) concentración de NaCl y volumen de MIL, (b) tiempo de agitación y volumen de MIL, (c) concentración de NaCl y tiempo de agitación. Las condiciones experimentales óptimas se pueden observar en la Tabla 2.7.

3.4.4.4 Robustez

Finalmente, luego de obtener las condiciones óptimas de extracción, se propuso una serie de pruebas con el fin de evaluar la robustez del método. Este estudio consistió en analizar los cambios en la eficiencia de extracción producidos por pequeñas variaciones de los 5 factores evaluados dentro del estudio multivariado. Para cada variable, se propusieron 3 ensayos en los que solo se modificó el nivel de un factor a la vez. Los rangos evaluados para cada variable fueron los siguientes: volumen de dispersante (30-40 μL), volumen de muestra (7,5-8,5 mL), volumen de fase extractante (135-165 μL), concentración de NaCl (0,4-0,6% (p/v)) y tiempo de agitación (7-9 min).

A partir de los resultados obtenidos con este estudio, se calculó la diferencia de medias para cada parámetro de forma individual y se comparó con el producto obtenido a

partir de la desviación estándar del método y la raíz cuadrada de 2 [22]. En base a que la diferencia de medias para cada variable fue menor que el valor del producto mencionado, se pudo corroborar la robustez de cada variable en estudio.

3.4.5 Evaluación del efecto de la matriz del MIL sobre la detección de Pb por ETAAS

Una vez definidas las condiciones para una óptima extracción, se evaluaron aquellos parámetros que determinan la mayor sensibilidad analítica en las mediciones de Pb por ETAAS. Primero, se inyectaron diferentes volúmenes de la fase extractante (10-30 μL). Se observó que la inyección de incluso 20 μL de fase extractante no afectó la sensibilidad de la señal de absorbancia, mientras que volúmenes mayores dieron como resultado una reproducibilidad deficiente y un fondo espectral significativo. Posteriormente, se evaluó la inyección de diferentes volúmenes (20 a 50 μL) de una solución de modificador de matriz comúnmente utilizada para la determinación de Pb (150 mg L^{-1} de Mg^{2+} + 2500 mg L^{-1} de $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$) [23]. La mayor relación señal/fondo para la determinación de Pb por ETAAS se obtuvo cuando se inyectaron 20 μL de modificador de matriz.

Finalmente, se evaluaron diferentes temperaturas y rampas para las etapas de pirólisis y atomización, de manera de permitir la eliminación gradual de la matriz orgánica y evitar pérdida de Pb durante el tratamiento térmico. La optimización del programa de horno de grafito se estudió en el rango de 350-550°C y 750-950°C para la pirólisis, y un rango de 1400-1600°C para la atomización. Las temperaturas óptimas para la pirólisis gradual de la fase de MIL fueron 400°C y 850°C, mientras que la temperatura óptima de atomización fue de 1500°C, como se puede observar en la Fig. 3.4.7. Se pueden observar otras condiciones de detección en la Tabla 3.4.3.

Tabla 3.4.3 Condiciones instrumentales ETAAS para la determinación de Pb.

Condiciones instrumentales	
Longitud de onda	283,3 nm
Ancho de banda espectral	0,7 nm
Corriente de lámpara EDL	360 mA
Modificadores de matriz	50 µg NH ₄ H ₂ PO ₄ (20 µL 2500 mg L ⁻¹) 3 µg Mg [Mg(NO ₃) ₂] (20 µL 150 mg L ⁻¹)

Programa de temperatura del horno de grafito				
Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo de rampa (s)	Tiempo de meseta (s)	Flujo de argón (mL min ⁻¹)
Secado 1	110	15	30	250
Secado 2	130	15	15	250
Pirólisis 1	500	15	20	250
Pirólisis 2	850	10	20	250
Atomización	1500	0	3	0
Limpieza	2400	1	2	250

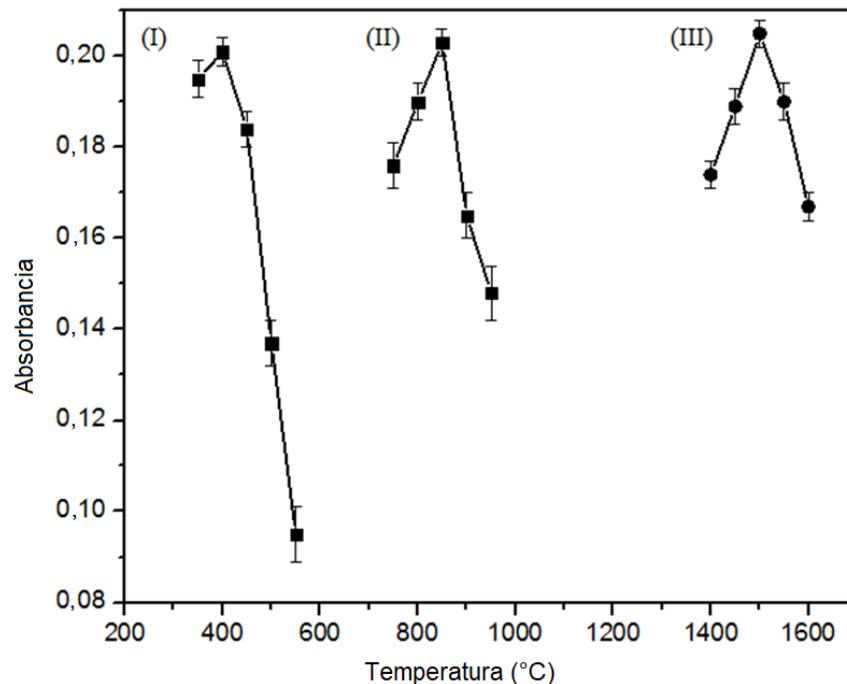


Fig. 3.4.7 Evaluación de las curvas de temperatura de pirólisis (■) y atomización (●) para $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb en $150 \mu\text{L}$ de solución de MIL (50% (p/v) de $[\text{P}_{6,6,6,14}]_2\text{MnCl}_4$ en CHCl_3). (I) Etapa de pirólisis 1, (II) etapa de pirólisis 2 y (III) etapa de atomización. Otras condiciones fueron las mencionadas en la Tabla 2.7 (Intervalo de confianza del 95%, $n = 6$).

3.4.6 Estudio de interferencias

En este trabajo, se desarrolló el estudio de posibles interferencias inorgánicas en la determinación de Pb por el método propuesto. Se pueden encontrar varios cationes en la miel y sus derivados en altas concentraciones o trazas, incluidos Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ , y aniones Cl^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} [24]. Se analizaron soluciones patrón de $3,0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb(II) en presencia de cada ion concomitante a niveles de concentración a los que normalmente se encuentran en la miel y sus derivados. Se consideró que un ion concomitante interfiere cuando causa una variación de la señal analítica en $\pm 5\%$. Los resultados mostraron que los iones analizados no generaron efectos de interferencia en hasta $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para As^{3+} , Cd^{2+} y Hg^{2+} , 450mg L^{-1} para Ca^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mg^{2+} , Na^+ y K^+ , y

hasta 600 mg L^{-1} para Cl^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . Además, se estudió el efecto de la glucosa y la fructosa en la extracción de Pb, ya que son los compuestos orgánicos presentes en mayor proporción en las muestras en estudio [25]. Lo cual no generó efectos de interferencia significativos.

En la Fig. 3.4.8 se puede observar la señal obtenida en las condiciones óptimas de extracción para una solución estándar de $0,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb.

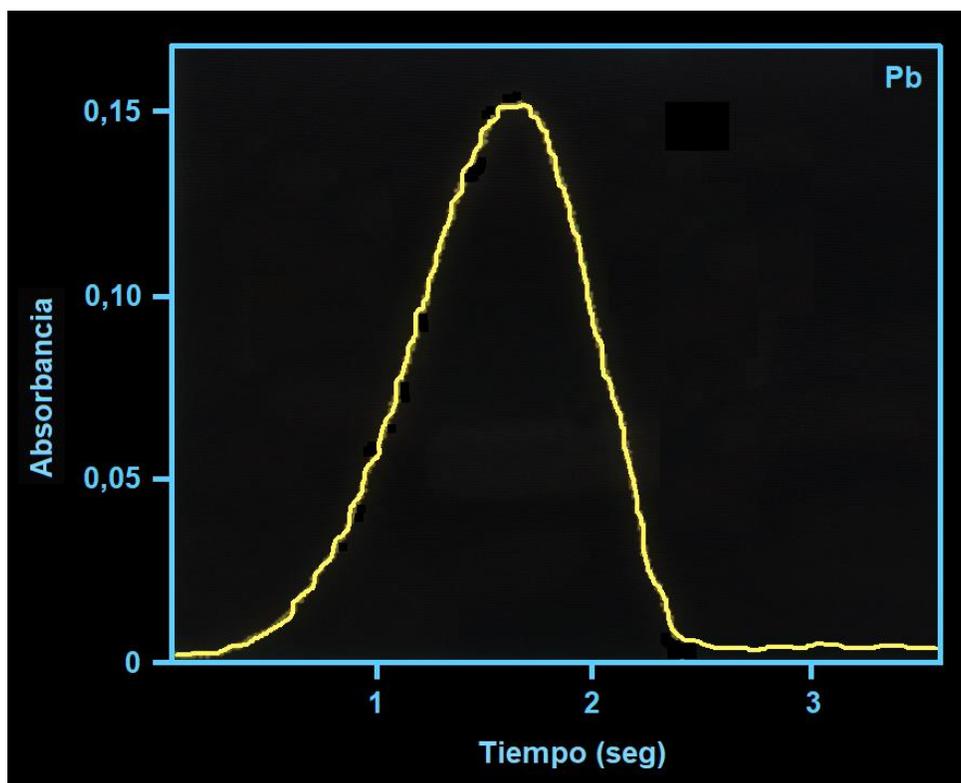


Fig. 3.4.8 Señal obtenida luego de la inyección de una solución de $0,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ de Pb en condiciones óptimas del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.

3.4.7 Rendimiento analítico

El gráfico de calibración obtenido después de aplicar el método propuesto para el análisis de 7 patrones de calibración en la determinación de Pb en productos apícolas, mostró un rango lineal de 10 ng L^{-1} a 3000 ng L^{-1} , con un coeficiente de correlación de 0,9975 (Fig. 3.4.8). El límite de detección (LOD) obtenido fue de 3 ng L^{-1} de Pb, que se calculó en función de la señal en la intersección más tres veces la desviación estándar de

la solución en blanco en la ecuación de regresión [22]. La desviación estándar relativa (RSD) fue de 3,6%; calculada con base en la medición de diez réplicas de muestra a 30 ng L⁻¹ de Pb.

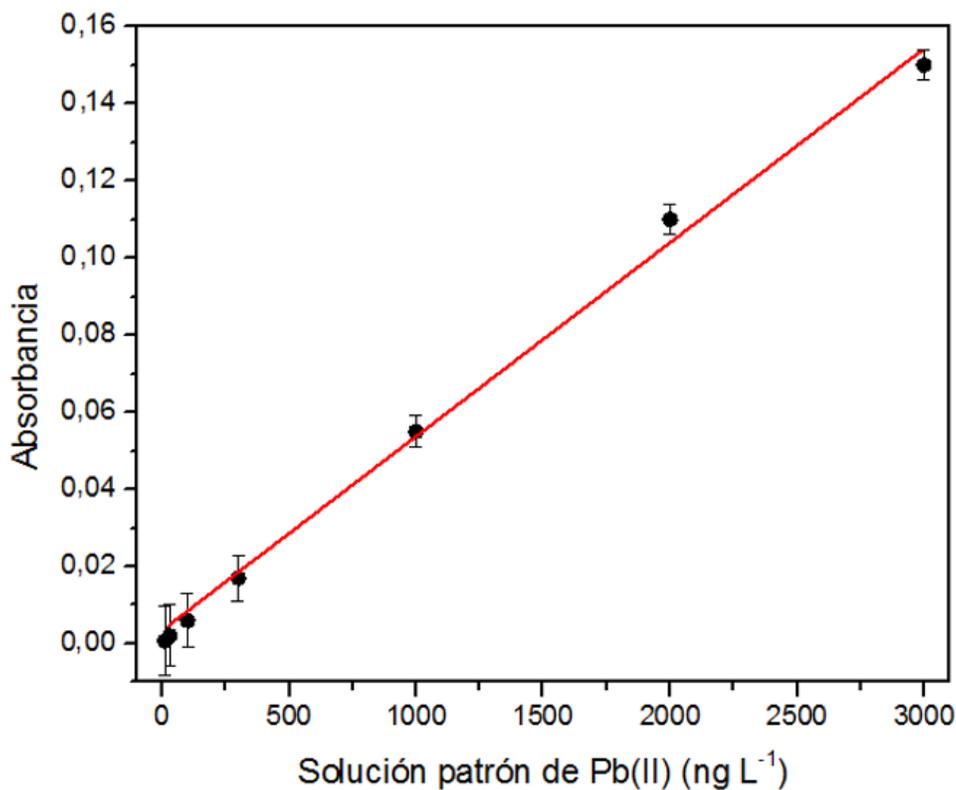


Fig. 3.4.9 Curva de calibración obtenida a partir del análisis de soluciones patrón de Pb(II) con el método MIL-DLLME-ETAAS propuesto en condiciones óptimas (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

El factor de refuerzo o incremento de la sensibilidad (EF) se calculó a partir de la relación de pendiente de los gráficos de calibración antes y después de la aplicación del método de preconcentración propuesto [26]. Luego de la optimización de todas las variables de la metodología, se alcanzó un EF de 107 con un volumen de muestra de 8 mL. La eficiencia de extracción se definió como el porcentaje de Pb de la fase acuosa que se extrajo en la fase de MIL [27]. Se logró una eficiencia de extracción del 97,0% con la metodología en condiciones óptimas (Tabla 2.7). El procedimiento completo de preconcentración puede

tomar aproximadamente 12 minutos por muestra. Sin embargo, dado que fue posible tratar muchas muestras simultáneamente usando varios imanes, la frecuencia del análisis fue determinada principalmente por las mediciones en ETAAS. Se obtuvo una frecuencia analítica de al menos 15 muestras por hora con el método propuesto. A continuación, en la Tabla 3.4.4 se pueden observar los distintos parámetros que permiten evaluar el rendimiento analítico de la metodología desarrollada.

Tabla 3.4.4 Parámetros analíticos del método MIL-DLLME-ETAAS propuesto.

Parámetros	
Rango lineal	10-3000 ng L ⁻¹
LOD	3,0 ng L ⁻¹
RSD	3,6 %
EF	107
Eficiencia de extracción	97,0 %
Frecuencia analítica	15 muestras h ⁻¹

La Tabla 3.4.5 muestra un estudio comparativo del desempeño analítico del método DLLME propuesto con respecto a los trabajos ya reportados en la literatura que utilizan IL como extractantes para la determinación de Pb por ETAAS. La metodología propuesta muestra LOD, EF y rango lineal comparable a otros métodos LLME. Sin embargo, una ventaja del método propuesto se basa en el paramagnetismo intrínseco del MIL que simplifica la técnica DLLME porque evita el paso de centrifugación que consume mucho tiempo y se evita la adición de magnetita. Otro aspecto a considerar de este método es la posibilidad de realizar la determinación de Pb a niveles ultratrazas mediante una digestión relativamente simple de las muestras a ser analizadas y la inyección directa de la fase extractante en el horno de grafito de ETAAS.

3.4.8 Estudio de exactitud y determinación de Pb en productos apícolas

El método propuesto se aplicó eficientemente para la determinación de Pb en productos apícolas. Los intentos de preparar y validar un material de referencia certificado (CRM) para oligoelementos en la miel se pueden encontrar en la literatura [28], sin embargo, no existen CRM para otros productos apícolas. Por otro lado, estos CRM aún no se comercializan debido a problemas con la homogeneidad de la composición de la miel originada en las diferentes áreas de producción. Por esta razón, se desarrolló un estudio de recuperación a tres niveles de concentración de Pb en presencia de las diferentes matrices en estudio. Los valores de recuperación obtenidos estuvieron en el rango de 94,8-101% (Tabla 3.4.6). Los resultados demostraron también que a medida que aumentó el color de las muestras de miel en estudio, el contenido de Pb también aumentaba. Estos resultados están de acuerdo con estudios que vinculan el contenido mineral con la coloración de la miel. Las concentraciones de Pb encontradas en este trabajo son consistentes con las reportadas en trabajos previos en la literatura [24]. Mientras que las muestras de hidromiel, vinagre de miel y cerveza de miel, presentaron un contenido significativamente menor. Este fenómeno podría explicarse al considerar que el contenido de miel en estos productos derivados es menor. Además, debe mencionarse que los valores de concentración de Pb encontrados en este trabajo se encuentran por debajo de los límites establecidos por el MERCOSUR [5] y la regulación de la USDA [6], lo cual determina que su comercialización es viable.

Tabla 3.4.5 Métodos analíticos reportados en la literatura para la preconcentración y determinación de Pb por IL-DLLME-ETAAS.

Extractante (cantidad)	Agente quelante	Dispersante (volumen)	LOD (ng L ⁻¹)	RSD (%)	EF ^a	Rango lineal (ng L ⁻¹)	Muestra (volumen)	Ref.
[C ₈ mim]NTf ₂ ^b (100 µL)	APDC	-	3,0	7,3	280	10 - 400	Agua y juguetes plásticos (10 mL)	[9]
TOMATS ^c (50 mg)	TOMATS	Acetona (300 µL)	1,0	4,9	48,7	60 - 500	Lápiz labial y hojas de pino (10 mL)	[29]
[C ₆ mim]PF ₆ ^d (120 µL) + Fe ₃ O ₄ (100mg)	APDC	-	150	2,8	48,0	500 - 40000	Agua (15 mL)	[10]
[C ₄ mim]FeCl ₄ ^e (150 µL) + Fe ₃ O ₄ (60 mg)	-	-	20 ng Kg ⁻¹	5,9	-	60 - 1500 ng Kg ⁻¹	Aceites vegetales comestibles (10 g)	[11]
[P _{6,6,6,14}] ₂ MnCl ₄ (150 µL)	DFC	Acetonitrilo (35 µL)	3,0	3,6	107	10 - 500	Miel, hidromiel, vinagre y cerveza de miel (8 mL)	Método propuesto

^aEF: Factor de refuerzo de la sensibilidad. Relación de las pendientes de las curvas de calibración para Pb con y sin el paso de preconcentración;

^bbis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-octil-3-metilimidazolio; ^ctiosalicilato de trioctilmetilamonio; ^dhexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio; ^etetracloroferrato de 1-butil-3-metilimidazolio.

Tabla 3.4.6 Determinación de Pb en productos apícolas y estudio de recuperación (Intervalo de confianza del 95%, n = 6).

Muestra apícola	Añadido (ng L⁻¹)	Encontrado (ng L⁻¹)	Recuperación (%)^a	Muestra apícola	Encontrado (ng L⁻¹)	Recuperación (%)^a
Miel ámbar claro 1	0	84,2 ± 1,1	-	Miel ámbar claro 2	86,8 ± 1,0	-
		(0,67) ^b			(0,69) ^b	
	25	108,1 ± 1,5	95,6		110,5 ± 1,6	94,8
	50	133,5 ± 2,0	98,6		135,9 ± 2,1	98,2
	100	184,0 ± 2,8	99,8		186,1 ± 2,9	99,3
Miel ámbar 1	0	94,1 ± 1,3	-	Miel ámbar 2	97,5 ± 1,4	-
		(0,75) ^b			(0,78) ^b	
	25	118,4 ± 1,8	97,2		121,7 ± 1,9	96,8
	50	143,3 ± 2,2	98,4		146,9 ± 2,3	98,8
	100	193,8 ± 3,1	99,7		197,1 ± 3,2	99,6
Miel ámbar oscuro 1	0	112,9 ± 1,6	-	Miel ámbar oscuro 2	114,1 ± 1,7	-
		(0,90) ^b			(0,91) ^b	
	25	137,2 ± 2,1	97,2		138,7 ± 2,2	98,4
	50	162,5 ± 2,5	99,2		164,0 ± 2,6	99,8
	100	213,0 ± 3,5	100		214,8 ± 3,6	101

	0	32,3 ± 0,4	-		35,1 ± 0,3	-
Hidromiel 1	25	56,7 ± 0,6	97,6	Hidromiel 2	59,8 ± 0,7	98,8
	50	81,6 ± 1,0	98,6		84,7 ± 1,1	99,2
	100	132,0 ± 1,9	99,7		135,0 ± 2,0	99,9
	0	20,5 ± 0,2	-		21,9 ± 0,3	-
Vinagre de miel 1	25	44,2 ± 0,5	94,8	Vinagre de miel 2	45,7 ± 0,5	95,2
	50	68,7 ± 0,8	96,4		70,6 ± 0,9	97,4
	100	119,1 ± 1,7	98,6		120,9 ± 1,8	99,0
	0	43,0 ± 0,4	-		45,2 ± 0,5	-
Cerveza de miel 1	25	67,0 ± 0,8	96,0	Cerveza de miel 2	69,4 ± 0,8	96,8
	50	92,3 ± 1,3	98,6		94,3 ± 1,4	98,2
	100	142,5 ± 2,1	99,5		145,0 ± 2,2	99,8

^a(Encontrado-Base)/Añadido × 100

^bConcentración de Pb expresada como ng de Pb por g de miel (ng g⁻¹)

3.4.9 Conclusiones

Se demostró que el uso del MIL $[P_{6,6,6,14}]_2MnCl_4$ permite la extracción eficiente y la determinación de Pb a niveles ultratrazas en productos apícolas, tales como miel, hidromiel, vinagre de miel y cerveza de miel. Se desarrolló un estudio detallado para remediar el efecto de matriz en la señal analítica debido a la complejidad de las muestras en estudio y la fase de extracción de MIL.

La principal ventaja de utilizar este MIL en DLLME se basa en la separación rápida y fácil de la fase extractante utilizando un imán y, por lo tanto, se evita la centrifugación. Además, en esta metodología se eliminó la necesidad de emplear un MIL conteniendo Fe, lo cual de otro modo produce un efecto de interferencia significativo en la determinación del analito. Tampoco el uso de magnetita como aditivo de fase extractante fue necesario. Una vez optimizados todos los parámetros que determinan el rendimiento analítico del método propuesto, se pudo arribar a una determinación altamente sensible de Pb, incluso cuando la detección del analito se realizó en presencia de la matriz de MIL en ETAAS. El método propuesto puede considerarse una herramienta valiosa para la determinación de Pb en miel y productos derivados a niveles ultratrazas, lo que sería de especial interés para laboratorios de rutina dedicados al control de calidad de este tipo de productos.

Capítulo 4: Conclusiones y perspectivas futuras

En la presente Tesis Doctoral, se desarrollaron novedosas metodologías analíticas, cuyo diseño y aplicación se fundamentó en la utilización de MILs como alternativas a los solventes orgánicos e ILs convencionales. De hecho, en este trabajo de tesis se demostró el gran potencial de aplicación de los MILs como solventes de extracción para el desarrollo de métodos de preconcentración eficientes que resultaron muy apropiados en la determinación de metales a niveles traza e incluso ultratrazas. Un aspecto muy importante a destacar, es que los métodos analíticos basados en el empleo de estos nuevos solventes presentan notables beneficios ambientales debido a la reducción en la generación de residuos (eliminando las pérdidas de solvente por evaporación y la utilización de pequeños volúmenes). Además, los MILs han aportado un notorio incremento en la selectividad y eficiencia analítica a las metodologías desarrolladas, sumado al aprovechamiento de sus propiedades magnéticas.

El desarrollo del presente trabajo de tesis, ha demostrado que los MILs de tipo fosfonio pueden ser excelentes opciones para la eficiente extracción y determinación de diferentes metales tóxicos, permitiendo que las metodologías sean herramientas muy útiles para detectarlos desde bajas concentraciones en muestras complejas como la miel y sus derivados. Sin embargo, en la aplicación de los MILs no estuvo ausente de importantes desafíos analíticos, ya que debió estudiarse cuidadosamente las condiciones de trabajo debido a que podría causar fuertes efectos de interferencia en ETAAS.

Sin dudas, la principal ventaja de la aplicación de MILs es la posibilidad de separar las fases mediante la influencia de un campo magnético generado por un imán, lo que simplifica el procedimiento DLLME al evitar los pasos de centrifugación que en general consumen un tiempo significativo. Asimismo, el magnetismo intrínseco que tienen los MILs

evita el uso de aditivos como la magnetita, para promover la magnetización de la fase extractante.

En primer lugar, se desarrolló una metodología DLLME basada en un MIL (MIL-DLLME-ETAAS) para la determinación de Cd por ETAAS en muestras de miel. Dichas muestras requirieron de una dilución previa, acidificación del medio y posterior complejación del analito con el reactivo DDTP. En este caso, se utilizó el MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ para la extracción del complejo Cd-DDTP y posteriormente se aplicó una etapa de retroextracción del analito en un pequeño volumen de solución acuosa de HNO_3 , debido a la imposibilidad de realizar la determinación del analito en presencia de la compleja matriz aportada por el MIL.

En segundo lugar, se desarrolló una metodología MIL-DLLME-ETAAS para la preconcentración y determinación de As en muestras de miel. Para ello, se requirió de una etapa de limpieza o "clean-up" de la muestra para eliminar los iones interferentes de la misma y posteriormente el As presente fue complejado con DTTP en medio ácido para su extracción en $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$. De esta manera, la determinación directa del analito en la fase de MIL fue factible, luego de un riguroso estudio de las condiciones instrumentales en ETAAS.

En tercer lugar, se trabajó en el diseño y aplicación de una metodología de preconcentración y determinación de Cr en muestras de miel de diferentes tonalidades, para lo cual se procedió a una etapa de calcinación de las muestras y posterior dilución en medio de HCl para promover la formación de un cloroacuocomplejo de Cr. El MIL $[P_{6,6,6,14}]FeCl_4$ fue utilizado como fase de extracción, el cual fue retirado de la solución de muestra mediante la utilización de una varilla magnética, para su posterior dilución en un pequeño volumen de solvente adecuado y determinación por ETAAS.

Finalmente, se abordó el desarrollo de una metodología de preconcentración y determinación de Pb en muestras de miel y derivados, mediante la utilización del MIL

[P_{6,6,6,14}]₂MnCl₄. La metodología desarrollada implicó en una primera etapa la digestión de muestras de miel, hidromiel, cerveza y vinagre de miel, la complejación del Pb presente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido y por último la extracción en la fase de MIL para su posterior determinación por ETAAS.

Como resumen, y realizando un balance de las investigaciones realizadas en la tesis doctoral, puede mencionarse que las metodologías analíticas aquí desarrolladas presentan una aceptable compatibilidad ambiental debido al empleo de MILs como fases extractantes y debido principalmente a su nula volatilidad, sumado a la reducción de la escala de las operaciones de extracción de los analitos, lo cual en definitiva condujo a una disminución marcada de los volúmenes de solventes utilizados mediante técnicas DLLME que miniaturizan los sistemas de extracción y preconcentración. La combinación de las excelentes propiedades que poseen los MILs para su utilización como extractantes (como volatilidad indetectable), junto a su eficiente implementación durante la ejecución de técnicas DLLME y su magnetismo intrínseco, ha permitido arribar a métodos de preconcentración muy eficientes y selectivos.

Las nuevas metodologías demostraron ser muy satisfactorias para el análisis de muestras apícolas, pudiéndose determinar trazas e incluso ultratrazas de As, Cd, Cr y Pb, en forma práctica y sencilla, y con requerimientos instrumentales mínimos que conducen a la posibilidad de emplearlos incluso en los laboratorios analíticos menos sofisticados. Dicha característica abre un panorama de aplicación de los métodos desarrollados en laboratorios analíticos de rutina, en donde además de sensibilidad se requiere una elevada productividad en la ejecución de los análisis. Así, las metodologías analíticas desarrolladas permiten una alta frecuencia analítica y elevados factores de refuerzo de la sensibilidad.

Como perspectiva a futuro, se plantea la posibilidad de continuar con el desarrollo de metodologías de extracción y preconcentración basadas en el empleo de MILs, para diversos analitos inorgánicos, como Hg, Sb y Se, entre otros. Asimismo, se continuará la

búsqueda de nuevos MILs para ser empleados en el desarrollo de metodologías de microextracción, los cuales presenten menor viscosidad y mayor susceptibilidad magnética. Se propone también el estudio de MILs en sistemas de preconcentración en flujo, que expandan la utilización de diversos MILs. Además, se propone el desarrollo de metodologías que faciliten el análisis de especiación, con bajas necesidades de instrumentación altamente sofisticada, de modo que puedan emplearse incluso por los laboratorios analíticos menos equipados. En este sentido, se contribuirá a crear metodologías de referencia que puedan servir de herramientas para el establecimiento de marcos regulatorios respecto a aspectos cualitativos y cuantitativos de diferentes analitos y sus especies en diferentes matrices.

Referencias bibliográficas

Capítulo 1: Introducción

1.1 Generalidades de los metales tóxicos en estudio

- [1] P. Goya, P. Román, J. Elguero, La tabla periódica de los elementos químicos, Los Libros de la Catarata 2019.
- [2] J. Hernández, Los elementos químicos y sus nombres, Pliegos de Yuste: Revista de cultura y pensamiento europeos 4(1) (2006) 57-68.
- [3] L. Sánchez, A.G. del Pozo, Historia de una Tabla Periódica, Anales de Química, 2019, pp. 235-235.
- [4] M.L. Robles Osorio, E. Sabath, Breve historia de la intoxicación por plomo: de la cultura egipcia al Renacimiento, 66 (1) (2014) 88-91.
- [5] D.L. Sparks, Toxic metals in the environment: the role of surfaces, Elements 1(4) (2005) 193-197.
- [6] L. Friberg, Cadmium in the Environment, CRC Press (2018).
- [7] M. Achternbosch, C. Kupsch, G. Sardemann, K.R. Bräutigam, Cadmium flows caused by the worldwide production of primary zinc metal, Journal of Industrial Ecology 13(3) (2009) 438-454.
- [8] P. Bhattacharya, A.H. Welch, K.G. Stollenwerk, M.J. McLaughlin, J. Bundschuh, G. Panauallah, Arsenic in the environment: biology and chemistry, Science of the total environment, 379(2-3) (2007) 109-120.
- [9] D.C. Adriano, Arsenic, Trace elements in terrestrial environments, Springer (2001).
- [10] A.M. Zayed, N. Terry, Chromium in the environment: factors affecting biological remediation, Plant and soil 249(1) (2003) 139-156.
- [11] O.H. Pattee, D.J. Pain, Lead in the environment, Handbook of ecotoxicology 2 (2003) 373-399.
- [12] S. Kasap, A. Willoughby, Mercury Cadmium Telluride: Growth, Properties and Applications, John Wiley & Sons (2011).
- [13] A. Mudhoo, S.K. Sharma, V.K. Garg, C.H. Tseng, Arsenic: an overview of applications, health, and environmental concerns and removal processes, Critical Reviews in Environmental Science and Technology 41(5) (2011) 435-519.

- [14] I. Arduini, A. Masoni, L. Ercoli, Effects of high chromium applications on miscanthus during the period of maximum growth, *Environmental and Experimental Botany* 58(1-3) (2006) 234-243.
- [15] R.L. Ziegfeld, Importance and uses of lead, *Archives of Environmental Health: An International Journal* 8(2) (1964) 202-212.
- [16] F.B. Martí, *Química analítica cualitativa*, Paraninfo (2002).
- [17] G. Rayner-Canham, R.L. Escalona García, H.J. Escalona García, *Química inorgánica descriptiva*, Pearson Educación (2000).
- [18] M. Tellez-Plaza, E. Guallar, B.V. Howard, J.G. Umans, K.A. Francesconi, W. Goessler, E.K. Silbergeld, R.B. Devereux, A. Navas-Acien, Cadmium exposure and incident cardiovascular disease, *Epidemiology* 24(3) (2013) 421.
- [19] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press (2014).
- [20] M.N. Rana, J. Tangpong, M.M. Rahman, Toxicodynamics of lead, cadmium, mercury and arsenic-induced kidney toxicity and treatment strategy: a mini review, *Toxicology Reports* 5 (2018) 704-713.
- [21] J. Thompson, J. Bannigan, Cadmium: toxic effects on the reproductive system and the embryo, *Reproductive toxicology* 25(3) (2008) 304-315.
- [22] M.R. Rahimzadeh, M.R. Rahimzadeh, S. Kazemi, A.A. Moghadamnia, Cadmium toxicity and treatment: an update, *Caspian journal of internal medicine* 8(3) (2017) 135.
- [23] M.F. Hughes, B.D. Beck, Y. Chen, A.S. Lewis, D.J. Thomas, Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective, *Toxicological Sciences* 123(2) (2011) 305-332.
- [24] S.J.S. Flora, *Handbook of arsenic toxicology*, Academic Press (2014).
- [25] A.A. Duker, E. Carranza, M. Hale, Arsenic geochemistry and health, *Environment international* 31(5) (2005) 631-641.
- [26] K. Kalia, S.J. Flora, Strategies for safe and effective therapeutic measures for chronic arsenic and lead poisoning, *Journal of occupational health* 47(1) (2005) 1-21.
- [27] H. Sun, J. Brocato, M. Costa, Oral chromium exposure and toxicity, *Current environmental health reports* 2(3) (2015) 295-303.

- [28] A. Levina, R. Codd, C.T. Dillon, P.A. Lay, Chromium in biology: toxicology and nutritional aspects, *Progress in inorganic chemistry* 51 (2003) 145-250.
- [29] I.A. Minigaliyeva, B.A. Katsnelson, L.I. Privalova, V.B. Gurvich, V.G. Panov, A.N. Varaksin, O.H. Makeyev, M.P. Sutunkova, N.V. Loginova, E.P. Kireyeva, Toxicodynamic and toxicokinetic descriptors of combined chromium (VI) and nickel toxicity, *International journal of toxicology* 33(6) (2014) 498-505.
- [30] M. Costa, C.B. Klein, Toxicity and carcinogenicity of chromium compounds in humans, *Critical reviews in toxicology* 36(2) (2006) 155-163.
- [31] S.W. Smith, *The role of chelation in the treatment of other metal poisonings*, Journal of Medical Toxicology, Springer, (2013).
- [32] A. Navas-Acien, E. Guallar, E.K. Silbergeld, S.J. Rothenberg, Lead exposure and cardiovascular disease—a systematic review, *Environmental health perspectives* 115(3) (2007) 472-482.
- [33] J. Patočka, K. Černý, Inorganic lead toxicology, *Acta Medica* 46(2) (2003) 65-72.
- [34] M. Geraldine, T. Venkatesh, Evaluation, diagnosis, and treatment of lead poisoning in a patient with occupational lead exposure: a case presentation, *Journal of Occupational medicine and Toxicology* 2(1) (2007) 7.

1.2 Principios básicos sobre la miel

- [1] R. Jaffé, N. Pope, A.L. Acosta, D.A. Alves, M.C. Arias, P. De la Rúa, F.O. Francisco, T.C. Giannini, A. González-Chaves, V.L. Imperatriz-Fonseca, Beekeeping practices and geographic distance, not land use, drive gene flow across tropical bees, *Molecular ecology* 25(21) (2016) 5345-5358.
- [2] G.C. Obute, Pollination: a threatened vital biodiversity service to humans and the environment, *International Journal of Biodiversity and Conservation* 2(1) (2010) 1-13.
- [3] B.K. Klatt, A. Holzschuh, C. Westphal, Y. Clough, I. Smit, E. Pawelzik, T. Tscharntke, Bee pollination improves crop quality, shelf life and commercial value, *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 281(1775) (2014) 20132440.
- [4] E. Pacini, Pollination, *Encyclopedia of ecology*, Elsevier (2008).
- [5] G. Kritsky, *The tears of Re: Beekeeping in ancient Egypt*, Oxford University Press (2015).

- [6] G. Kritsky, Beekeeping from antiquity through the Middle Ages, *Annual review of entomology* 62 (2017) 249-264.
- [7] R.K. Gupta, M. Khan, R. Srivastava, V. Goswami, *History of beekeeping in developing world, Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security*, Springer (2014).
- [8] J. Wilde, *Beekeeping: history and domestication, Bee health and veterinarians* (2014) 29-31.
- [9] C. Alimentarius, *CODEX Norma para la Miel, Codex stan* (1981).
- [10] P.M. da Silva, C. Gauche, L.V. Gonzaga, A.C.O. Costa, R. Fett, *Honey: Chemical composition, stability and authenticity, Food Chemistry* 196 (2016) 309-323.
- [11] S. Gok, M. Severcan, E. Goormaghtigh, I. Kandemir, F. Severcan, *Differentiation of Anatolian honey samples from different botanical origins by ATR-FTIR spectroscopy using multivariate analysis, Food chemistry* 170 (2015) 234-240.
- [12] A. Gallego-Picó, R.M. Garcinuño-Martínez, P. Fernández-Hernando, *Honey authenticity and traceability, Comprehensive Analytical Chemistry, Elsevier* (2013).
- [13] M.A. Dominguez, M.E. Centurión, *Application of digital images to determine color in honey samples from Argentina, Microchemical Journal* 118 (2015) 110-114.
- [14] S. Bogdanov, *Nutritional and functional properties of honey, Voprosy pitaniia* 79(6) (2010) 4-13.
- [15] Y.A. Alqadhi, B. Waykar, S. De, A. Pal, *Biological properties and uses of honey: A concise scientific review, Indian Journal of Pharmaceutical and Biological Research* 4(03) (2016) 58-68.
- [16] M.A. Abeshu, B. Geleta, *Medicinal uses of honey, Biology and Medicine* 8(2) (2016) 1000279.
- [17] N. Czipa, D. Andrási, B. Kovács, *Determination of essential and toxic elements in Hungarian honeys, Food Chemistry* 175 (2015) 536-542.
- [18] A. Shenkute, Y. Getachew, D. Assefa, N. Adgaba, G. Ganga, W. Abebe, *Honey production systems (Apis mellifera L.) in Kaffa, Sheka and Bench-Maji zones of Ethiopia, Journal of Agricultural Extension and Rural Development* 4(19) (2012) 528-541.
- [19] R. Subramanian, H. Umesh Hebbar, N. Rastogi, *Processing of honey: A review, International Journal of Food Properties* 10(1) (2007) 127-143.
- [20] M.C. Quicazán, M.M. Cuenca, A.B. Paz, *Producción de hidromiel en el contexto de la apicultura en Colombia, Universidad Nacional de Colombia* 2019.

- [21] C.X. Código Alimentario Argentino, Correctivos y coadyuvantes, 2013.
- [22] S. Buiatti, Beer in health and disease prevention, University of Udine, Italy (2009) 211-225.
- [23] G. Secilio, Sistema de facilitación de acceso a mercados internacionales para pequeños y medianos productores rurales. Miel: Superando barreras para acceder al mercado internacional. Impacto de las barreras paraarancelarias en la cadena apícola. Implementación de normas de calidad y certificación: inversión y rentabilidad, (2006).
- [24] I.S. Montes, El plan estratégico Argentina Apícola 2017 y su influencia en el sector apícola de la localidad de Tandil, Universidad Nacional de La Plata-CONICET. Facultad de Humanidades y Ciencias, (2012).
- [25] M.J. Couvillon, R. Schürch, F.L. Ratnieks, Dancing bees communicate a foraging preference for rural lands in high-level agri-environment schemes, *Current Biology* 24(11) (2014) 1212-1215.
- [26] R.M. Johnson, Honey bee toxicology, *Annual review of entomology* 60 (2015) 415-434.
- [27] G. Wright, D. Baker, M. Palmer, D. Stabler, J. Mustard, E. Power, A. Borland, P. Stevenson, Caffeine in floral nectar enhances a pollinator's memory of reward, *science* 339(6124) (2013) 1202-1204.
- [28] A. Tapparo, C. Giorio, M. Marzaro, D. Marton, L. Soldà, V. Girolami, Rapid analysis of neonicotinoid insecticides in guttation drops of corn seedlings obtained from coated seeds, *Journal of Environmental Monitoring* 13(6) (2011) 1564-1568.
- [29] C.A. Mullin, M. Frazier, J.L. Frazier, S. Ashcraft, R. Simonds, J.S. Pettis, High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health, *Plos One* 5(3) (2010) 9754.
- [30] A. Pisani, G. Protano, F. Riccobono, Minor and trace elements in different honey types produced in Siena County (Italy), *Food chemistry* 107(4) (2008) 1553-1560.
- [31] Ž. Bargańska, M. Ślebioda, J. Namieśnik, Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 46(3) (2016) 235-248.
- [32] R.C. de Oliveira, S.C. do Nascimento Queiroz, C.F.P. da Luz, R.S. Porto, S. Rath, Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination, *Chemosphere* 163 (2016) 525-534.

- [33] G. Matin, N. Kargar, H.B. Buyukisik, Bio-monitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves, *Ecological Engineering* 90 (2016) 331-335.
- [34] A. Roman, B. Madras-Majewska, E. Popiela-Pleban, Comparative study of selected toxic elements in propolis and honey, *Journal of Apicultural Science* 55(2) (2011) 97-106.
- [35] J.J. van der Steen, J. de Kraker, T. Grotenhuis, Spatial and temporal variation of metal concentrations in adult honeybees (*Apis mellifera* L.), *Environmental monitoring and assessment* 184(7) (2012) 4119-4126.
- [36] S. Bogdanov, P. Martin, Honey authenticity, *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene* 93(3) (2002) 232-254.
- [37] S. Bogdanov, M. Haldimann, W. Luginbühl, P. Gallmann, Minerals in honey: environmental, geographical and botanical aspects, *Journal of Apicultural Research* 46(4) (2007) 269-275.
- [38] G.M. Común, Reglamento Técnico MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos, Asunción (2011).
- [39] Y. Fakhri, M. Abtahi, A. Atamaleki, A. Raoofi, H. Atabati, A. Asadi, A. Miri, E. Shamloo, A. Alinejad, H. Keramati, The concentration of potentially toxic elements (PTEs) in honey: a global systematic review and meta-analysis and risk assessment, *Trends in food science & technology* 91 (2019) 498-506.
- [40] P. Pohl, I. Sergiel, H. Steck, Determination and fractionation of metals in honey, *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39(4) (2009) 276-288.
- [41] F.C. Rosa, F.A. Duarte, J.N. Paniz, G.M. Heidrich, M.A. Nunes, E.M. Flores, V.L. Dressler, Dispersive liquid-liquid microextraction: An efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry, *Microchemical Journal* 123 (2015) 211-217.
- [42] P. Pohl, Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(1) (2009) 117-128.

1.3 Líquidos iónicos magnéticos

- [1] A. Kokorin, Ionic liquids: theory, properties, new approaches, BoD–Books on Demand (2011).
- [2] T. Welton, Ionic liquids: a brief history, *Biophysical reviews* 10(3) (2018) 691-706.
- [3] C.A. Angell, Y. Ansari, Z. Zhao, Ionic liquids: past, present and future, *Faraday discussions* 154 (2012) 9-27.
- [4] J.I. Kadokawa, Ionic Liquids: New Aspects for the Future, BoD–Books on Demand (2013).
- [5] R. Caminiti, L. Gontrani, The structure of ionic liquids, Springer (2013).
- [6] S. Handy, Ionic Liquids: Classes and Properties, BoD–Books on Demand (2011).
- [7] Y. Marcus, Ionic liquid properties, From Molten Salts to Room Temperature (2016).
- [8] D. Rooney, J. Jacquemin, R. Gardas, Thermophysical properties of ionic liquids, *Ionic liquids*, Springer (2009).
- [9] P.T. Anastas, P. Wasserscheid, A. Stark, Green solvents: ionic liquids, John Wiley & Sons (2013).
- [10] A. Torriero, M. Shiddiky, Electrochemical properties and applications of ionic liquids, Nova Science Publishers (2011).
- [11] D. Zhao, Y. Liao, Z. Zhang, Toxicity of ionic liquids, *Clean–soil, air, water* 35(1) (2007) 42-48.
- [12] P. Wasserscheid, T. Welton, Ionic liquids in synthesis, John Wiley & Sons (2008).
- [13] K.K. Laali, Ionic liquids in synthesis, *Synthesis* 2003(11) (2003) 1752-1752.
- [14] A. Stojanovic, B.K. Keppler, Ionic liquids as extracting agents for heavy metals, *Separation Science and Technology* 47(2) (2012) 189-203.
- [15] E.M. Martinis, P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, Emerging ionic liquid-based techniques for total-metal and metal-speciation analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29(10) (2010) 1184-1201.
- [16] K.D. Clark, O. Nacham, J.A. Purslow, S.A. Pierson, J.L. Anderson, Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: a review, *Analytica chimica acta* 934 (2016) 9-21.
- [17] A. Joseph, G. Żyła, V.I. Thomas, P.R. Nair, A. Padmanabhan, S. Mathew, Paramagnetic ionic liquids for advanced applications: A review, *Journal of Molecular Liquids* 218 (2016) 319-331.
- [18] S. Hayashi, H. Hamaguchi, Discovery of a magnetic ionic liquid [Bmim]FeCl₄, *Chemistry Letters* 33(12) (2004) 1590-1591.

- [19] E. Santos, J. Albo, A. Irabien, Magnetic ionic liquids: synthesis, properties and applications, *Rsc Advances* 4(75) (2014) 40008-40018.
- [20] I. Rykowska, J. Ziemblińska, I. Nowak, Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: a review, *Journal of molecular liquids* 259 (2018) 319-339.
- [21] E. Santos, J. Albo, A. Rosatella, C.A. Afonso, A. Irabien, Synthesis and characterization of magnetic ionic liquids (MILs) for CO₂ separation, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89(6) (2014) 866-871.
- [22] Z. Liu, X. Sun, M. Hao, C. Huang, Z. Xue, T. Mu, Preparation and characterization of regenerated cellulose from ionic liquid using different methods, *Carbohydrate polymers* 117 (2015) 99-105.
- [23] Q. Liu, L. Yu, Y. Wang, Y. Ji, J. Horvat, M.L. Cheng, X. Jia, G. Wang, Manganese-based layered coordination polymer: synthesis, structural characterization, magnetic property and electrochemical performance in lithium-ion batteries, *Inorganic chemistry* 52(6) (2013) 2817-2822.
- [24] J. Wang, H. Yao, Y. Nie, X. Zhang, J. Li, Synthesis and characterization of the iron-containing magnetic ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids* 169 (2012) 152-155.
- [25] R.H. Herber, I. Nowik, M.E. Kostner, V. Kahlenberg, C. Kreutz, G. Laus, H. Schottenberger, Mössbauer spectroscopy and X-ray diffraction study of ⁵⁷Fe-labeled tetrachloroferrate(III)-based magnetic ionic liquids, *International journal of molecular sciences* 12(10) (2011) 6397-6406.
- [26] O. Nacham, K.D. Clark, H. Yu, J.L. Anderson, Synthetic strategies for tailoring the physicochemical and magnetic properties of hydrophobic magnetic ionic liquids, *Chemistry of Materials* 27(3) (2015) 923-931.
- [27] M. Sajid, Magnetic ionic liquids in analytical sample preparation: A literature review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* (2019).

1.4 Microextracción líquido-líquido dispersiva

- [1] J. Zhang, B. Hu, Liquid-Liquid Extraction (LLE), *Separation and Purification Technologies in Biorefineries* (2013) 61-78.
- [2] C. Hanson, *Recent advances in liquid-liquid extraction*, Elsevier (2013).
- [3] V.S. Kislik, *Solvent extraction*, *Solvent Extraction* (2012) 185-314.

- [4] E. Fernández, L. Vidal, Liquid-phase extraction and microextraction, *Ionic Liquids in Separation Technology*, Elsevier (2014).
- [5] J.M. Kokosa, Advances in solvent-microextraction techniques, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 43 (2013) 2-13.
- [6] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method, *Journal of Chromatography A* 1217(16) (2010) 2342-2357.
- [7] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Dispersive liquid–liquid microextraction in food analysis. A critical review, *Analytical and bioanalytical chemistry* 406(8) (2014) 2067-2099.
- [8] M.I. Leong, M.R. Fuh, S.D. Huang, Beyond dispersive liquid–liquid microextraction, *Journal of Chromatography A* 1335 (2014) 2-14.
- [9] T.C. Lo, M.H. Baird, C. Hanson, *Handbook of solvent extraction*, Wiley New York (1983).
- [10] M.J. Trujillo-Rodríguez, P. Rocío-Bautista, V. Pino, A.M. Afonso, Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 51 (2013) 87-106.
- [11] I. Rykowska, J. Ziemblińska, I. Nowak, Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: a review, *Journal of molecular liquids* 259 (2018) 319-339.
- [12] H. Yu, J. Merib, J.L. Anderson, Faster dispersive liquid-liquid microextraction methods using magnetic ionic liquids as solvents, *Journal of Chromatography A* 1463 (2016) 11-19.
- [13] A. Beiraghi, M. Shokri, S. Seidi, B.M. Godajdar, Magnetomotive room temperature dicationic ionic liquid: A new concept toward centrifuge-less dispersive liquid–liquid microextraction, *Journal of Chromatography A* 1376 (2015) 1-8.
- [14] K.D. Clark, O. Nacham, J.A. Purslow, S.A. Pierson, J.L. Anderson, Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: a review, *Analytica chimica acta* 934 (2016) 9-21.
- [15] E. Santos, J. Albo, A. Irabien, Magnetic ionic liquids: synthesis, properties and applications, *Rsc Advances* 4(75) (2014) 40008-40018.
- [16] M.J. Trujillo-Rodríguez, J.L. Anderson, In situ formation of hydrophobic magnetic ionic liquids for dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A* 1588 (2019) 8-16.

- [17] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, Miniaturized preconcentration methods based on liquid–liquid extraction and their application in inorganic ultratrace analysis and speciation: A review, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64(1) (2009) 1-15.
- [18] C.B. Ojeda, F.S. Rojas, Separation and preconcentration by dispersive liquid–liquid microextraction procedure: a review, *Chromatographia* 69(11-12) (2009) 1149-1159.
- [19] G. Giakissikli, A.N. Anthemidis, Magnetic materials as sorbents for metal/metalloid preconcentration and/or separation. A review, *Analytica chimica acta* 789 (2013) 1-16.

1.5 Espectrometría de absorción atómica electrotrémica

- [1] M. González-Cantellano, L. Montañó-Zetina, Spectroscopy and its technology: a historical review and its importance for the 21st century, *Latin American Journal Physics Education* 9(6) (2015) 1-14.
- [2] B. Welz, M. Sperling, *Atomic absorption spectrometry*, John Wiley & Sons (2008).
- [3] B. L'vov, Fifty years of atomic absorption spectrometry, *Journal of Analytical Chemistry* 60(4) (2005) 382-392.
- [4] S. Gao, The rise of atomic spectrometry in China over the past 25 years, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25(12) (2010) 1803-1807.
- [5] A. Jaiswal, M. Mohrana, P. Krishna, D. Moon, T. Mollo, O. Murty, Forensic Instrumental Technique Series-VI Atomic absorption spectrometry—a review, *Journal of Forensic Medicine and Toxicology* 27(2) (2010) 64-71.
- [6] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Cengage Learning (2017).
- [7] N.H. Bings, A. Bogaerts, J.A. Broekaert, Atomic spectroscopy, *Analytical chemistry* 85(2) (2013) 670-704.
- [8] B. Welz, High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 381(1) (2005) 69-71.
- [9] S.J. Hill, T.A. Arowolo, O.T. Butler, J.M. Cook, M.S. Cresser, C. Harrington, D.L. Miles, Atomic spectrometry update. Environmental analysis, *Journal of analytical atomic spectrometry* 18(2) (2003) 170-202.

- [10] A.H. Lefebvre, V.G. McDonell, Atomization and sprays, CRC Press (2017).
- [11] P. Worsfold, A. Townshend, C.F. Poole, M. Miró, Encyclopedia of analytical science, Elsevier (2019).
- [12] P. Wu, S. He, B. Luo, X. Hou, Flame furnace atomic absorption spectrometry: a review, Applied Spectroscopy Reviews 44(5) (2009) 411-437.
- [13] B. Welz, M.G.R. Vale, É.R. Pereira, I.N. Castilho, M.B. Dessuy, Continuum source atomic absorption spectrometry: past, present and future aspects - a critical review, Journal of the Brazilian Chemical Society 25(5) (2014) 799-821.

1.6 Diseño experimental y optimización multivariada

- [1] S.A. Weissman, N.G. Anderson, Design of experiments (DOE) and process optimization. A review of recent publications, Organic Process Research & Development 19(11) (2015) 1605-1633.
- [2] A.I. Khuri, S. Mukhopadhyay, Response surface methodology, Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics 2(2) (2010) 128-149.
- [3] M.A. Bezerra, R.E. Santelli, E.P. Oliveira, L.S. Villar, L.A. Escalera, Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry, Talanta 76(5) (2008) 965-977.
- [4] Z.K. Awad, T. Aravinthan, Y. Zhuge, F. Gonzalez, A review of optimization techniques used in the design of fibre composite structures for civil engineering applications, Materials & Design 33 (2012) 534-544.
- [5] Y.F. Wang, C.G. Wang, The application of response surface methodology, Journal of The Central University For Nationalities (Natural Science Edition) 3 (2005).
- [6] H.J. Seltman, Experimental design and analysis, Online Book 153 (2012) 168-172.
- [7] M.I. Rodrigues, A.F. Lemma, Experimental design and process optimization, CRC Press (2014).
- [8] W. Krzanowski, Principles of multivariate analysis, OUP Oxford (2000).
- [9] L.V. Candiotti, M.M. De Zan, M.S. Cámara, H.C. Goicoechea, Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, Talanta 124 (2014) 123-138.
- [10] F. Campolongo, J. Cariboni, A. Saltelli, An effective screening design for sensitivity analysis of large models, Environmental modelling & software 22(10) (2007) 1509-1518.

- [11] M. Sales, Diagrama de pareto, EALDE Business School 15 (2009).
- [12] R. Leardi, Experimental design in chemistry: A tutorial, *Analytica chimica acta* 652(1-2) (2009) 161-172.
- [13] R.N. Cardinal, M.R. Aitken, ANOVA for the behavioral sciences researcher, Psychology Press (2013).
- [14] R.E. Bruns, I.S. Scarminio, B. de Barros Neto, Statistical design-chemometrics, Elsevier (2006).
- [15] K.M. Desai, S.A. Survase, P.S. Saudagar, S. Lele, R.S. Singhal, Comparison of artificial neural network (ANN) and response surface methodology (RSM) in fermentation media optimization: case study of fermentative production of scleroglucan, *Biochemical Engineering Journal* 41(3) (2008) 266-273.
- [16] J. Osborne, Improving your data transformations: Applying the Box-Cox transformation, *Practical Assessment, Research, and Evaluation* 15(1) (2010) 12.
- [17] R. Myers, Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, John Wiley & Sons, (2009).
- [18] M.M. De Zan, C.M. Teglia, J.C. Robles, H.C. Goicoechea, A novel ion-pairing chromatographic method for the simultaneous determination of both nicarbazin components in feed additives: Chemometric tools for improving the optimization and validation, *Talanta* 85(1) (2011) 142-150.

Capítulo 2: Materiales y métodos

- [1] J. Wang, H. Yao, Y. Nie, X. Zhang, J. Li, Synthesis and characterization of the iron-containing magnetic ionic liquids, *Journal of Molecular Liquids* 169 (2012) 152-155.
- [2] W. Jiang, W. Zhu, Y. Chang, H. Li, Y. Chao, J. Xiong, H. Liu, S. Yin, Oxidation of aromatic sulfur compounds catalyzed by organic hexacyanoferrates in ionic liquids with a low concentration of H₂O₂ as an oxidant, *Energy & fuels* 28(4) (2014) 2754-2760.
- [3] R.E. Del Sesto, T.M. McCleskey, A.K. Burrell, G.A. Baker, J.D. Thompson, B.L. Scott, J.S. Wilkes, P. Williams, Structure and magnetic behavior of transition metal based ionic liquids, *Chemical Communications* (4) (2008) 447-449.

- [4] A.P. Doherty, L. Graham, K. Wagner, D.L. Officer, J. Chen, G.G. Wallace, Functional Electro-materials Based on Ferricyanide Redox-active Ionic Liquids, *Electrochimica Acta* 245 (2017) 934-940.
- [5] K.D. Clark, O. Nacham, J.A. Purslow, S.A. Pierson, J.L. Anderson, Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: a review, *Analytica chimica acta* 934 (2016) 9-21.
- [6] E. Santos, J. Albo, A. Irabien, Magnetic ionic liquids: synthesis, properties and applications, *Rsc Advances* 4(75) (2014) 40008-40018.
- [7] E. Santos, J. Albo, A. Rosatella, C.A. Afonso, A. Irabien, Synthesis and characterization of magnetic ionic liquids (MILs) for CO₂ separation, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 89(6) (2014) 866-871.
- [8] J.A. Pontis, L.A. Costa, S.J.R.d. Silva, A. Flach, Color, phenolic and flavonoid content, and antioxidant activity of honey from Roraima, Brazil, *Food Science and Technology* 34(1) (2014) 69-73.
- [9] I.C. Ferreira, E. Aires, J.C. Barreira, L.M. Estevinho, Antioxidant activity of Portuguese honey samples: Different contributions of the entire honey and phenolic extract, *Food Chemistry* 114(4) (2009) 1438-1443.
- [10] O. Lambert, M. Piroux, S. Puyo, C. Thorin, M. Larhantec, F. Delbac, H. Pouliquen, Bees, honey and pollen as sentinels for lead environmental contamination, *Environmental Pollution* 170 (2012) 254-259.
- [11] D. Citak, M. Tuzen, A novel preconcentration procedure using cloud point extraction for determination of lead, cobalt and copper in water and food samples using flame atomic absorption spectrometry, *Food and Chemical toxicology* 48(5) (2010) 1399-1404.

Capítulo 3: Resultados y discusión

3.1 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Cd en miel

- [1] C. Yu, Q. Ling, S. Yan, J. Li, Z. Chen, Z. Peng, Cadmium contamination in various environmental materials in an industrial area, Hangzhou, China, *Chemical Speciation & Bioavailability* 22(1) (2010) 35-42.

- [2] M. Szkup-Jablonska, B. Karakiewicz, E. Grochans, A. Jurczak, G. Nowak-Staz, I. Rotter, A. Prokopowicz, Effects of blood lead and cadmium levels on the functioning of children with behaviour disorders in the family environment, *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 19(2) (2012).
- [3] E.F.S. Authority, Cadmium dietary exposure in the European population, *EFSA Journal* 10(1) (2012) 2551.
- [4] A. Sixto, M. Fiedoruk-Pogrebnik, M. Rosende, D. Cocovi-Solberg, M. Knochen, M. Miró, A mesofluidic platform integrating restricted access-like sorptive microextraction as a front end to ICP-AES for the determination of trace level concentrations of lead and cadmium as contaminants in honey, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 31(2) (2016) 473-481.
- [5] H. Stecka, D. Jedryczko, P. Pohl, M. Welna, Pre-concentration of traces of cadmium, cobalt, nickel and lead in natural honeys by solid phase extraction followed by their determination using flame atomic absorption spectrometry, *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25(2) (2014) 331-339.
- [6] Z.A. Khammas, A.A. Ghali, K.H. Kadhim, Combined cloud-point extraction and spectrophotometric detection of lead and cadmium in honey samples using a new ligand, *International Journal Chemical Sciences* 10(3) (2012) 1185-1204.
- [7] F.C. Rosa, F.A. Duarte, J.N. Paniz, G.M. Heidrich, M.A. Nunes, E.M. Flores, V.L. Dressler, Dispersive liquid-liquid microextraction: An efficient approach for the extraction of Cd and Pb from honey and determination by flame atomic absorption spectrometry, *Microchemical Journal* 123 (2015) 211-217.
- [8] H. Chen, J. Han, Y. Wang, Y. Hu, L. Ni, Y. Liu, W. Kang, Y. Liu, Hollow fiber liquid-phase microextraction of cadmium (II) using an ionic liquid as the extractant, *Microchimica Acta* 181(11-12) (2014) 1455-1461.
- [9] S. Khan, T.G. Kazi, M. Soylak, Ionic liquid-based ultrasound-assisted emulsification microextraction of cadmium in biological samples: Optimization by a multivariate approach, *Analytical Letters* 48(11) (2015) 1751-1766.
- [10] Y. Wang, Y. Sun, B. Xu, X. Li, X. Wang, H. Zhang, D. Song, Matrix solid-phase dispersion coupled with magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of triazine herbicides in oilseeds, *Analytica chimica acta* 888 (2015) 67-74.

- [11] H. Yu, J. Merib, J.L. Anderson, Faster dispersive liquid-liquid microextraction methods using magnetic ionic liquids as solvents, *Journal of Chromatography A* 1463 (2016) 11-19.
- [12] A. Beiraghi, M. Shokri, S. Seidi, B.M. Godajdar, Magnetomotive room temperature dicationic ionic liquid: A new concept toward centrifuge-less dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal of Chromatography A* 1376 (2015) 1-8.
- [13] B. Welz, M. Sperling, *Atomic absorption spectrometry*, John Wiley & Sons (2008).
- [14] J.R. Garcia, J.B. Garcia, C.H. Latorre, M.F. Rodríguez, S.G. Martín, R.P. Crecente, Comparison of palladium-magnesium nitrate and ammonium dihydrogenphosphate modifiers for cadmium determination in honey samples by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 61(4) (2003) 509-517.
- [15] E.M. Martinis, P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, Emerging ionic liquid-based techniques for total-metal and metal-speciation analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29(10) (2010) 1184-1201.
- [16] F.B. Martí, *Química analítica cualitativa*, Editorial Paraninfo (2002).
- [17] J.C. Ramos, A.J. Curtius, D.L. Borges, Diethyldithiophosphate (DDTP): a review on properties, general applications, and use in analytical spectrometry, *Applied Spectroscopy Reviews* 47(8) (2012) 583-619.
- [18] R.E. Del Sesto, T.M. McCleskey, A.K. Burrell, G.A. Baker, J.D. Thompson, B.L. Scott, J.S. Wilkes, P. Williams, Structure and magnetic behavior of transition metal based ionic liquids, *Chemical Communications* (4) (2008) 447-449.
- [19] G. Rayner-Canham, R.L. Escalona García, H.J. Escalona García, *Química inorgánica descriptiva*, Pearson Educación (2000).
- [20] K.D. Clark, O. Nacham, H. Yu, T. Li, M.M. Yamsek, D.R. Ronning, J.L. Anderson, Extraction of DNA by magnetic ionic liquids: tunable solvents for rapid and selective DNA analysis, *Analytical chemistry* 87(3) (2015) 1552-1559.
- [21] Y.Q. Tang, N. Weng, Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis, *Bioanalysis* 5(12) (2013) 1583-1598.

- [22] G. Di Bella, V.L. Turco, A.G. Potorti, G.D. Bua, M.R. Fede, G. Dugo, Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach, *Journal of Food Composition and Analysis* 44 (2015) 25-35.
- [23] J. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson education (2018).
- [24] P. Berton, E.M. Martinis, L.D. Martinez, R.G. Wuilloud, Selective determination of inorganic cobalt in nutritional supplements by ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytica chimica acta* 713 (2012) 56-62.
- [25] P. Pohl, Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(1) (2009) 117-128.
- [26] G. Matin, N. Kargar, H.B. Buyukisik, Bio-monitoring of cadmium, lead, arsenic and mercury in industrial districts of Izmir, Turkey by using honey bees, propolis and pine tree leaves, *Ecological Engineering* 90 (2016) 331-335.
- [27] E.M. Martinis, R.A. Olsina, J.C. Altamirano, R.G. Wuilloud, Sensitive determination of cadmium in water samples by room temperature ionic liquid-based preconcentration and electrothermal atomic absorption spectrometry, *analytica chimica acta* 628(1) (2008) 41-48.
- [28] S. Li, S. Cai, W. Hu, H. Chen, H. Liu, Ionic liquid-based ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for a sensitive determination of cadmium in water samples, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64(7) (2009) 666-671.
- [29] I. López-García, Y. Vicente-Martínez, M. Hernández-Córdoba, Determination of lead and cadmium using an ionic liquid and dispersive liquid–liquid microextraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 110 (2013) 46-52.
- [30] H. Shirkhanloo, M. Ghazaghi, H.Z. Mousavi, Cadmium determination in human biological samples based on trioctylmethyl ammonium thiosalicylate as a task-specific ionic liquid by dispersive liquid–liquid microextraction method, *Journal of Molecular Liquids* 218 (2016) 478-483.

3.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de As en miel

- [1] L.B. Escudero, E.M. Martinis, R.A. Olsina, R.G. Wuilloud, Arsenic speciation analysis in mono-varietal wines by on-line ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction, *Food chemistry* 138(1) (2013) 484-490.
- [2] K. Jomova, Z. Jenisova, M. Feszterova, S. Baros, J. Liska, D. Hudecova, C. Rhodes, M. Valko, Arsenic: toxicity, oxidative stress and human disease, *Journal of Applied Toxicology* 31(2) (2011) 95-107.
- [3] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press (2014).
- [4] Ž. Bargańska, M. Ślebioda, J. Namieśnik, Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 46(3) (2016) 235-248.
- [5] A.A. Machado De-Melo, L.B.d. Almeida-Muradian, M.T. Sancho, A. Pascual-Maté, Composition and properties of *Apis mellifera* honey: A review, *Journal of Apicultural Research* 57(1) (2018) 5-37.
- [6] M. Koel, *Ionic liquids in chemical analysis*, CRC Press (2008).
- [7] A.C. Grijalba, L.B. Escudero, R.G. Wuilloud, Ionic liquid-assisted multiwalled carbon nanotube-dispersive micro-solid phase extraction for sensitive determination of inorganic As species in garlic samples by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 110 (2015) 118-123.
- [8] K.D. Clark, O. Nacham, J.A. Purslow, S.A. Pierson, J.L. Anderson, Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: a review, *Analytica chimica acta* 934 (2016) 9-21.
- [9] G. Rayner-Canham, R.L. Escalona García, H.J. Escalona García, *Química inorgánica descriptiva*, Pearson Educación (2000).
- [10] B. Welz, M. Sperling, *Atomic absorption spectrometry*, John Wiley & Sons (2008).
- [11] B.A. Neto, E.C. Meurer, R. Galaverna, B.J. Bythell, J. Dupont, R.G. Cooks, M.N. Eberlin, Vapors from ionic liquids: reconciling simulations with mass spectrometric data, *The journal of physical chemistry letters* 3(23) (2012) 3435-3441.

- [12] E.M. Martinis, P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, Emerging ionic liquid-based techniques for total-metal and metal-speciation analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29(10) (2010) 1184-1201.
- [13] F.B. Martí, *Química analítica cualitativa*, Editorial Paraninfo (2002).
- [14] J.C. Ramos, A.J. Curtius, D.L. Borges, Diethyldithiophosphate (DDTP): a review on properties, general applications, and use in analytical spectrometry, *Applied Spectroscopy Reviews* 47(8) (2012) 583-619.
- [15] R.E. Rivas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba, Speciation of very low amounts of arsenic and antimony in waters using dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 64(4) (2009) 329-333.
- [16] J. Liu, M. Jiang, G. Li, L. Xu, M. Xie, Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices, *Analytica chimica acta* 679(1-2) (2010) 74-80.
- [17] Z. Fang, *Flow injection separation and preconcentration*, VCH (1993).
- [18] Z. Gui-Ling, Calculation of Optimum pH Value about Chromogenic Reaction of Metal Ion with 5-Br-PADAP, *Journal of Qiqihar University (Natural Science Edition)* (5) (2006) 12.
- [19] G. Di Bella, V.L. Turco, A.G. Potorti, G.D. Bua, M.R. Fede, G. Dugo, Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach, *Journal of Food Composition and Analysis* 44 (2015) 25-35.
- [20] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson Education (2005).
- [21] P. Berton, E.M. Martinis, L.D. Martinez, R.G. Wuilloud, Selective determination of inorganic cobalt in nutritional supplements by ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytica chimica acta* 713 (2012) 56-62.
- [22] P. Pohl, Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(1) (2009) 117-128.

- [23] S. Rabieh, M. Bagheri, B. Planer-Friedrich, Speciation of arsenite and arsenate by electrothermal AAS following ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction, *Microchimica Acta* 180(5-6) (2013) 415-421.
- [24] X. Wang, G. Xu, P. Chen, Y. Sun, X. Yao, Y. Lv, W. Guo, G. Wang, Fully-automated magnetic stirring-assisted lab-in-syringe dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of arsenic species in rice samples, *RSC advances* 8(30) (2018) 16858-16865.
- [25] R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, Ionic liquid as ion-pairing reagent for liquid-liquid microextraction and preconcentration of arsenic species in natural waters followed by ETAAS, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25(9) (2010) 1485-1490.
- [26] X. Wang, G. Xu, P. Chen, X. Liu, Y. Fang, S. Yang, G. Wang, Arsenic speciation analysis in environmental water, sediment and soil samples by magnetic ionic liquid-based air-assisted liquid-liquid microextraction, *RSC advances* 6(111) (2016) 110247-110254.
- [27] X. Wang, G. Xu, X. Guo, X. Chen, J. Duan, Z. Gao, B. Zheng, Q. Shen, Effervescent tablets containing magnetic ionic liquids as a non-conventional extraction and dispersive agent for speciation of arsenite and arsenate in vegetable samples, *Journal of Molecular Liquids* 272 (2018) 871-877.

3.3 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Cr en miel

- [1] M. Solayman, M.A. Islam, S. Paul, Y. Ali, M.I. Khalil, N. Alam, S.H. Gan, Physicochemical properties, minerals, trace elements, and heavy metals in honey of different origins: a comprehensive review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15(1) (2016) 219-233.
- [2] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, *Handbook on the Toxicology of Metals*, Academic Press (2014).
- [3] Ž. Bargańska, M. Ślebioda, J. Namieśnik, Honey bees and their products: Bioindicators of environmental contamination, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 46(3) (2016) 235-248.
- [4] A.M. Zamudio Sánchez, Evaluación de residuos de plaguicidas y metales tóxicos en miel de abejas producida en zonas de cultivos de fresa y cítricos, *Facultad de Agronomía* (2017).

- [5] A. Akhtar, T.G. Kazi, H.I. Afridi, S.G. Musharraf, F.N. Talpur, N. Khan, M. Bilal, M. Khan, Vortex-assisted ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction for assessment of chromium species in artificial saliva extract of different chewing tobacco products, *Environmental Science and Pollution Research* 23(24) (2016) 25288-25298.
- [6] I. López-García, M. Briceño, Y. Vicente-Martínez, M. Hernández-Córdoba, Ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction for the speciation of traces of chromium using electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 115 (2013) 166-171.
- [7] W. Ahmad, A. Bashammakh, A. Al-Sibaai, H. Alwael, M. El-Shahawi, Trace determination of Cr (III) and Cr (VI) species in water samples via dispersive liquid-liquid microextraction and microvolume UV–Vis spectrometry. Thermodynamics, speciation study, *Journal of Molecular Liquids* 224 (2016) 1242-1248.
- [8] I. Gaubeur, M.Á. Aguirre, N. Kovachev, M. Hidalgo, A. Canals, Speciation of chromium by dispersive liquid–liquid microextraction followed by laser-induced breakdown spectrometry detection (DLLME–LIBS), *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 30(12) (2015) 2541-2547.
- [9] S.M. Yousefi, F. Shemirani, Selective and sensitive speciation analysis of Cr (VI) and Cr (III) in water samples by fiber optic-linear array detection spectrophotometry after ion pair based-surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction, *Journal of hazardous materials* 254 (2013) 134-140.
- [10] M. Zeeb, M.R. Ganjali, P. Norouzi, Preconcentration and trace determination of Chromium using modified ionic liquid cold-induced aggregation dispersive liquid–liquid microextraction: application to different water and food samples, *Food analytical methods* 6(5) (2013) 1398-1406.
- [11] K.D. Clark, O. Nacham, J.A. Purslow, S.A. Pierson, J.L. Anderson, Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: a review, *Analytica chimica acta* 934 (2016) 9-21.
- [12] E.F. Fiorentini, L.B. Escudero, R.G. Wuilloud, Magnetic ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction technique for preconcentration and ultra-trace determination of Cd in honey, *Analytical and bioanalytical chemistry* 410(19) (2018) 4715-4723.
- [13] E.F. Fiorentini, B.V. Canizo, R.G. Wuilloud, Determination of As in honey samples by magnetic ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 198 (2019) 146-153.

- [14] G. Rayner-Canham, R.L. Escalona García, H.J. Escalona García, *Química inorgánica descriptiva*, Pearson Educación (2000).
- [15] H.S. Gates, E.L. King, A Study of the Equilibria in Acidic Chromium (III) Chloride Solutions, *Journal of the American Chemical Society* 80(19) (1958) 5011-5015.
- [16] L.B. Escudero, P. Berton, E.M. Martinis, R.A. Olsina, R.G. Wuilloud, Dispersive liquid–liquid microextraction and preconcentration of thallium species in water samples by two ionic liquids applied as ion-pairing reagent and extractant phase, *Talanta* 88 (2012) 277-283.
- [17] P. Berton, L. Vera-Candioti, H.C. Goicoechea, R.G. Wuilloud, A microextraction procedure based on an ionic liquid as an ion-pairing agent optimized using a design of experiments for chromium species separation and determination in water samples, *Analytical Methods* 5(19) (2013) 5065-5073.
- [18] F.B. Martí, *Química analítica cualitativa*, Editorial Paraninfo (2002).
- [19] B. Welz, M. Sperling, *Atomic absorption spectrometry*, John Wiley & Sons (2008).
- [20] B.A. Neto, E.C. Meurer, R. Galaverna, B.J. Bythell, J. Dupont, R.G. Cooks, M.N. Eberlin, Vapors from ionic liquids: reconciling simulations with mass spectrometric data, *The journal of physical chemistry letters* 3(23) (2012) 3435-3441.
- [21] Ł. Komsta, R. Skibiński, A. Bojarczuk, M. Radoń, Salting-out chromatography—a practical review, *Acta Chromatographica* 23(2) (2011) 191-203.
- [22] B. Majidi, F. Shemirani, Salt-assisted liquid-liquid microextraction of Cr (VI) ion using an ionic liquid for preconcentration prior to its determination by flame atomic absorption spectrometry, *Microchimica Acta* 176(1-2) (2012) 143-151.
- [23] G. Di Bella, V.L. Turco, A.G. Potorti, G.D. Bua, M.R. Fede, G. Dugo, Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach, *Journal of Food Composition and Analysis* 44 (2015) 25-35.
- [24] J. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson Education (2018).
- [25] L.B. Escudero, E.M. Martinis, R.A. Olsina, R.G. Wuilloud, Arsenic speciation analysis in mono-varietal wines by on-line ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction, *Food chemistry* 138(1) (2013) 484-490.

[26] P. Berton, E.M. Martinis, L.D. Martinez, R.G. Wuilloud, Selective determination of inorganic cobalt in nutritional supplements by ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytica chimica acta* 713 (2012) 56-62.

[27] I. Lopez-Garcia, Y. Vicente-Martinez, M. Hernández-Córdoba, Determination of very low amounts of chromium (III) and (VI) using dispersive liquid–liquid microextraction by in situ formation of an ionic liquid followed by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 27(5) (2012) 874-880.

[28] H. Chen, P. Du, J. Chen, S. Hu, S. Li, H. Liu, Separation and preconcentration system based on ultrasonic probe-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction for determination trace amount of chromium (VI) by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 81(1-2) (2010) 176-179.

[29] H. Shir Khanloo, A.A.M. Beigi, M.M. Eskandari, B. Kalantari, Dispersive liquid-liquid microextraction based on task-specific ionic liquids for determination and speciation of chromium in human blood, *Journal of analytical chemistry* 70(12) (2015) 1448-1455.

[30] H. Shir Khanloo, M. Ghazaghi, M.M. Eskandari, Cloud point assisted dispersive ionic liquid-liquid microextraction for chromium speciation in human blood samples based on isopropyl 2-[(isopropoxycarbothioly) disulfanyl] ethane thioate, *Analytical chemistry research* 10 (2016) 18-27.

[31] P. Pohl, Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(1) (2009) 117-128.

3.4 Microextracción líquido-líquido dispersiva basada en un líquido iónico magnético para la preconcentración y determinación de ultratrazas de Pb en productos apícolas

[1] M. Musa Özcan, F. Al Juhaimi, Honey as source of natural antioxidants, *Journal of Apicultural Research* 54(3) (2015) 145-154.

[2] S. Bogdanov, Honey as nutrient and functional food, *Proteins* 1100 (2012) 1400-2700.

[3] G. Glavan, J. Bozic, The synergy of xenobiotics in honey bee *Apis mellifera*: mechanisms and effects, *Acta Biologica Slovenica* 56(1) (2013) 11-25.

- [4] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, Handbook on the Toxicology of Metals, Academic press 2014.
- [5] G.M. Común, Reglamento Técnico MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos, Asunción (2011).
- [6] S. Phillips, J. Wilson, GAIN (Global Agricultural Information Network) Report: United Kingdom, USDA Foreign Agricultural Service (2016).
- [7] E.M. Martinis, P. Bertón, J.C. Altamirano, U. Hakala, R.G. Wuilloud, Tetradecyl (triethyl) phosphonium chloride ionic liquid single-drop microextraction for electrothermal atomic absorption spectrometric determination of lead in water samples, *Talanta* 80(5) (2010) 2034-2040.
- [8] J. Abulhassani, J.L. Manzoori, M. Amjadi, Hollow fiber based-liquid phase microextraction using ionic liquid solvent for preconcentration of lead and nickel from environmental and biological samples prior to determination by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Journal of hazardous materials* 176(1-3) (2010) 481-486.
- [9] I. López-García, Y. Vicente-Martínez, M. Hernández-Córdoba, Determination of lead and cadmium using an ionic liquid and dispersive liquid-liquid microextraction followed by electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 110 (2013) 46-52.
- [10] L. Yao, X. Wang, H. Liu, C. Lin, L. Pang, J. Yang, Q. Zeng, Optimization of ultrasound-assisted magnetic retrieval-linked ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of cadmium and lead in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry, *Journal of industrial and engineering chemistry* 56 (2017) 321-326.
- [11] L. Yao, H. Liu, X. Wang, W. Xu, Y. Zhu, H. Wang, L. Pang, C. Lin, Ultrasound-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction using a magnetic ionic liquid coupled with micro-solid phase extraction for the determination of cadmium and lead in edible vegetable oils, *Food chemistry* 256 (2018) 212-218.
- [12] K.D. Clark, O. Nacham, J.A. Purslow, S.A. Pierson, J.L. Anderson, Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: a review, *Analytica chimica acta* 934 (2016) 9-21.

- [13] E.F. Fiorentini, L.B. Escudero, R.G. Wuilloud, Magnetic ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction technique for preconcentration and ultra-trace determination of Cd in honey, *Analytical and bioanalytical chemistry* 410(19) (2018) 4715-4723.
- [14] E.F. Fiorentini, B.V. Canizo, R.G. Wuilloud, Determination of As in honey samples by magnetic ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Talanta* 198 (2019) 146-153.
- [15] E.F. Fiorentini, M.N. Oviedo, R.G. Wuilloud, Ultra-trace Cr preconcentration in honey samples by magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* (2020) 105879.
- [16] I. Rykowska, J. Ziemblińska, I. Nowak, Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: a review, *Journal of molecular liquids* 259 (2018) 319-339.
- [17] E. Santos, J. Albo, A. Irabien, Magnetic ionic liquids: synthesis, properties and applications, *Rsc Advances* 4(75) (2014) 40008-40018.
- [18] E.M. Martinis, P. Berton, R.P. Monasterio, R.G. Wuilloud, Emerging ionic liquid-based techniques for total-metal and metal-speciation analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 29(10) (2010) 1184-1201.
- [19] F.B. Martí, *Química analítica cualitativa*, Editorial Paraninfo (2002).
- [20] L.V. Candiotti, M.M. De Zan, M.S. Cámara, H.C. Goicoechea, Experimental design and multiple response optimization. Using the desirability function in analytical methods development, *Talanta* 124 (2014) 123-138.
- [21] J. Liu, M. Jiang, G. Li, L. Xu, M. Xie, Miniaturized salting-out liquid-liquid extraction of sulfonamides from different matrices, *Analytica chimica acta* 679(1-2) (2010) 74-80.
- [22] J. Miller, J.C. Miller, *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*, Pearson Education (2018).
- [23] B. Welz, M. Sperling, *Atomic absorption spectrometry*, John Wiley & Sons (2008).

- [24] G. Di Bella, V.L. Turco, A.G. Potorti, G.D. Bua, M.R. Fede, G. Dugo, Geographical discrimination of Italian honey by multi-element analysis with a chemometric approach, *Journal of Food Composition and Analysis* 44 (2015) 25-35.
- [25] N. Yu, G.M. Zhou, J. Zhu, Determination of Sucrose, Glucose and Fructose in Honey and Wine by Ion Chromatography, *Food Science* 16 (2010).
- [26] L.B. Escudero, E.M. Martinis, R.A. Olsina, R.G. Wuilloud, Arsenic speciation analysis in mono-varietal wines by on-line ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction, *Food chemistry* 138(1) (2013) 484-490.
- [27] P. Berton, E.M. Martinis, L.D. Martinez, R.G. Wuilloud, Selective determination of inorganic cobalt in nutritional supplements by ultrasound-assisted temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction and electrothermal atomic absorption spectrometry, *Analytica chimica acta* 713 (2012) 56-62.
- [28] P. Pohl, Determination of metal content in honey by atomic absorption and emission spectrometries, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(1) (2009) 117-128.
- [29] A. Saljooqi, T. Shamspur, M. Mohamadi, D. Afzali, A. Mostafavi, A microextraction procedure based on a task-specific ionic liquid for the separation and preconcentration of lead ions from red lipstick and pine leaves, *Journal of separation science* 38(10) (2015) 1777-1783.