

ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS VERDES DE MICROEXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE
CONTAMINANTES EMERGENTES EMPLEANDO LÍQUIDOS IÓNICOS Y SOLVENTES
NATURALES EUTÉCTICOS PROFUNDOS

JHON SEBASTIAN LÓPEZ COLLAZOS

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
GRUPO DE INVESTIGACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
(Q.C.B.)
POPAYÁN
2022

ESTANDARIZACIÓN DE TÉCNICAS VERDES DE MICROEXTRACCIÓN PARA EL ANÁLISIS DE
CONTAMINANTES EMERGENTES EMPLEANDO LÍQUIDOS IÓNICOS Y SOLVENTES
NATURALES EUTÉCTICOS PROFUNDOS

JHON SEBASTIAN LÓPEZ COLLAZOS

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de Químico

Director

FERNANDO JOSÉ HERNÁNDEZ BLANCO. Ph.D.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN QUÍMICA DE COMPUESTOS BIOACTIVOS
(Q.C.B.)

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2022

Nota de aceptación

Director

Fernando José Hernández Blanco, Ph.D.

Jurado

Dr. German Cuervo Ochoa

Jurado

Dr. Jaime Martín Franco

Fecha de sustentación: 18 de Octubre del 2022

Dedicatoria

A mis padres quienes me apoyaron a lo largo de todo este camino, a mi hermana Lu por estar a mi lado siempre y ser ese motor que me ayudaba a continuar cada día, a mí abuela Hortensia Pérez por estar conmigo y ayudarme día a día y por mí abuelo Luis Collazos, quien aunque difícilmente hoy sabe quién soy, yo jamás podré olvidar cada una de las cosas que hizo por mí y todo lo que me inculcó, que son las bases de quien soy hoy en día.

"Nuestros primeros esfuerzos son puramente instintivas incitaciones de una vívida e indisciplinada imaginación. Pero esos impulsos tempranos, aunque no son inmediatamente productivos, son del momento más grande y podrían darle forma a nuestros mismos destinos"

Nikola Tesla

Agradecimientos

A Dios gracias por la vida, por la familia que me dio y todas las personas que ha puesto en mi camino.

Al Doctor Fernando José Hernández Blanco por todo su apoyo, consejo, paciencia y creer en mí para el desarrollo de este trabajo.

Al Doctor Juan Carlos Argoti por su asesoría y acompañamiento.

Al grupo de investigación Química de Compuestos Bioactivos por acogerme en él y prestarme sus instalaciones y recursos.

Al Doctor Danny Arteaga por el presto de material, equipos e instalaciones de los laboratorios de Química.

A los doctores Tania Gutiérrez y Edier Pérez por facilitarme y colaborar en el uso de los equipos de la Unidad de Análisis Industrial.

A los grupos de investigación de Agroquímica y Catálisis por prestar sus equipos y espacio.

A la Universidad del Cauca, al Departamento de Química y profesores que a lo largo de mi estadía han contribuido en mi formación como profesional y como persona.

A el Laboratorio de Espectroscopia de la Universidad del Valle, por permitirnos usar algunos de sus equipos y reactivos.

A mi papá Carlos López por todo su apoyo emocional y económico a lo largo de toda mi vida.

A mi mamá Janneth Collazos, a mi hermano, a mis hermanas, mi tía Ximena y a mi familia por estar siempre conmigo y motivarme día a día para hacer lo que más me gusta que es trabajar en el campo de la química y la ciencia.

A la familia Molano Zúñiga por apoyarme siempre, principalmente a mi primo y hermano Yamid Molano.

A mi novia Karen Vanesa Torres por estar a mi lado, apoyarme, ayudarme y sobretodo motivarme día a día.

A mis compañeros del grupo de investigación por su colaboración y contribuir en mi formación como Químico, en especial a Camila Ceballos, Jorge Parra, Juan Carlos Ortiz, Gabriel Ramírez y Marlon Velásquez.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	2
2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUA	2
2.2. SOLVENTES VERDES	2
2.2.1. Síntesis de Líquidos Iónicos.....	3
2.2.2. Síntesis de Solventes Eutécticos Profundos.....	4
2.3. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA.	5
2.3.1 Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)	6
2.3.2 Microextracción líquido-líquido-líquido (LLLME).....	7
2.4 TÉCNICA DE ULTRA-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE DIODOS (μ CLAR-DAD).....	8
2.4.1 Detector de arreglo de diodos (DAD).....	9
2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL	10
2.5.1 Diseño Factorial del estilo 2^k	10
2.5.2 Diseño Cribado de Plackett-Burman	10
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
4. OBJETIVOS	13
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
5. METODOLOGÍA	14
5.1 SÍNTESIS DE SOLVENTES NATURALES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (NADES)	14
5.2 SÍNTESIS DE LÍQUIDOS IÓNICOS (IL).....	14
5.3 PURIFICACIÓN DE IBUPROFENO	15
5.4 DETERMINACIÓN POR μ CLAR-DAD.....	16
5.5 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA POR SOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DLLME-DES).....	16
5.6 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO CON LÍQUIDOS IÓNICOS (LLLME-IL)	18

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS	20
6.1 SÍNTESIS DE SOLVENTES NATURALES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (NADES)	20
6.2 SÍNTESIS DE LÍQUIDOS IÓNICOS (IL).....	23
6.3 RENDIMIENTO EN LA PURIFICACIÓN DE IBUPROFENO	26
6.4 CURVAS DE CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS EN μ CLAR-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE IBU, AAS Y AS	27
6.4.1 Curva de calibración en espectrofotómetro UV-Vis	27
6.4.2 Curva de calibración y parámetros en μ CLAR-DAD	29
6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA POR SOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DLLME-DES)	32
6.6 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO CON LÍQUIDOS IÓNICOS (LLLME-IL)	43
7. CONCLUSIONES.....	50
8. BIBLIOGRAFÍA	51
9. ANEXOS.....	57

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AAS: Ácido acetilsalicílico

ACN: Acetonitrilo

ANOVA: Análisis de varianza

AS: Ácido salicílico

CE: Contaminantes emergentes

μCLAR: ultra-Cromatografía líquida de alta resolución

μCLAR-DAD: ultra-Cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos

DAD: Detector de diodos

DES: Solventes eutécticos profundos

DINCH: Éster diisononílico del ácido dicarboxílico de 1,2-ciclohexano

DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva

DoE: Diseño Experimental

ESOC: Sustancias emergentes preocupantes

FT-IR: Infrarrojo con transformada de Fourier

GL: Grados de libertad

HBA: Aceptar de enlaces de hidrógeno

HBD: Donante de enlaces de hidrógeno

IBU: Ibuprofeno

IL: Líquidos iónicos

LC: Límite de cuantificación

LD: Límite de detección

LLE: Extracción en fase líquida

LLLME: Microextracción líquido-líquido-líquido

LPME: Microextracción en fase líquida

MET: Técnicas de microextracción

m_p: Pendiente promedio

NADES: Solventes naturales eutécticos profundos

ONU: Organización de las Naciones Unidas

P/A o P_A: Relación en volumen entre la muestra y la fase apolar

PCP: Productos de cuidado personal

pK_a: Función P de la constante de acidez

RMN: Espectroscopia de resonancia magnética nuclear

S_b: Desviación estándar del intercepto

SDME: Microextracción de una sola gota

SPE: Extracción en fase sólida

^tBuBr: Bromuro de terc-butilo

^tBuOK: Terc-butoxido de potasio

THF: Tetrahidrofurano

TLC: Cromatografía en capa fina

¹H-RMN: Espectroscopia de resonancia magnética nuclear protónica

¹³C-RMN: Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de carbono 13

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Estudios con el uso de μ CLAR y sus detectores.....	8
Tabla 2. Lista de combinaciones con las cuales se prueba si hay formación de NADES.....	14
Tabla 3. Grupos alquilo y contra iones utilizados en la síntesis de IL	15
Tabla 4. Soluciones utilizadas para el DoE de Plackett-Burman.	17
Tabla 5. Variables evaluadas para el DoE de Plackett-Burman para el DLLME-DES.....	17
Tabla 6. Variables evaluadas para el DoE de Plackett-Burman para el LLLME-IL	18
Tabla 7. Datos de las ecuaciones de cada curva por espectrofotometría UV, LD y LC para el AAS y AS.....	29
Tabla 8. Absorbancias entre días para establecer la precisión en el espectrofotómetro UV-Vis en el equipo GENESIS 6 del AAS y el AS.	29
Tabla 9. Datos de las ecuaciones de cada curva, LD y LC obtenidos a partir del comportamiento observado mediante μ CLAR-DAD para AAS, AS e IBU.	31
Tabla 10. Datos para establecer la precisión mediante los valores obtenidos mediante μ CLAR-DAD del AAS, AS e IBU.	31
Tabla 11. Datos para establecer la robustez mediante los valores obtenidos mediante μ CLAR-DAD del AAS, AS e IBU.	32
Tabla 12. DoE Plackett-Burman DLLME-DES con resultados.	33
Tabla 13. Análisis de varianza DoE Plackett-Burman DLLME-DES.	34
Tabla 14. Determinación del efecto del salting out en DLLME-DES.	35
Tabla 15. Recobros obtenidos en el DoE 2^2 para DLLME-DES.	36
Tabla 16. Análisis de varianza DoE Factorial 2^2 del AAS en la DLLME-DES.	36
Tabla 17. Análisis de varianza DoE Factorial 2^2 del AS en la DLLME-DES.....	36
Tabla 18. Análisis de varianza DoE Factorial 2^2 del IBU en la DLLME-DES.	37
Tabla 19. Porcentaje iónico del AS, AAS e IBU según el pH.	40
Tabla 20. DoE Plackett-Burman LLLME-IL con resultados.....	44
Tabla 21. Análisis de varianza DoE Plackett-Burman LLLME-IL.....	45
Tabla 22. Recobros obtenidos en el DoE 2^2 con puntos centrales para LLLME-IL.	46
Tabla 23. Análisis de varianza DoE Factorial 2^2 con puntos centrales de la DLLME-IL.	46
Tabla 24. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados.	57
Tabla 25. Equipos utilizados en la investigación.	58

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Etapas proceso de DLLME.	7
Figura 2. Modelo del montaje para LLLME.	8
Figura 3. Etapas DLLME con DES sin agente dispersante.....	17
Figura 4. Montaje de la extracción experimental para LLLME-IL, frente al modelo teórico.	19
Figura 5. Formación de los DES.	20
Figura 6. Espectros electromagnéticos FT-IR del DES ₁ y DES ₂	21
Figura 7. Espectro electromagnético FT-IR del NADES ₃	22
Figura 8. Espectro ¹ H-RMN del DES ₁	22
Figura 9. Espectro ¹³ C-RMN del DES ₁	23
Figura 10. Espectros electromagnéticos IR de los IL.	24
Figura 11. Espectros ¹ H-RMN del IL ₁	25
Figura 12. Espectro ¹³ C-RMN del IL ₁	26
Figura 13. Espectro FT-IR del Ibu purificado.	27
Figura 14. Curvas de calibración para el AAS y el AS.....	28
Figura 15. Curvas de calibración en μCLAR-DAD para AAS, AS e IBU.	30
Figura 16. Diagrama de Pareto DoE de Plackett-Burman DLLME-DES.....	35
Figura 17. Diagrama de Pareto para los DoE factoriales 2 ² de DLLME-DES del AAS, AS e IBU.	37
Figura 18. Gráfica normal de efectos estandarizados para los DoE factoriales 2 ² de DLLME-DES del AAS, AS e IBU.	39
Figura 19. Gráficas efectos principales de las variables en el DoE 2 ² de DLLME-DES para el AAS, AS e IBU.	40
Figura 20. Grafica de la interacción entre variables en el DoE 2 ² de DLLME-DES para el AAS, AS e IBU.	42
Figura 21. Diagrama de Pareto DoE de Plackett-Burman LLLME-IL.	45
Figura 22. Diagrama de Pareto y gráfica normal de efectos estandarizados para el DoE factoriales 2 ² con puntos centrales de LLLME-IL.	47
Figura 23. Gráficas efectos principales e interacción de variables en el DoE 2 ² con puntos centrales de la LLLME-IL.	48

LISTADO DE ESQUEMAS

Esquema 1. Cationes más usados en la síntesis de IL.	3
Esquema 2. Aniones más usados en la síntesis de IL.	4
Esquema 3. Donantes de enlaces de hidrógeno (HBD).	5
Esquema 4. Aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA).....	5
Esquema 5. Reacción general para la síntesis de IL.	15
Esquema 6. Estequiometría en la síntesis del IL ₁ y rendimiento.	23

RESUMEN

La contaminación del agua ha sido una problemática de gran interés en las últimas décadas. Es un recurso que se ha visto afectado por el estilo de vida de la humanidad en los últimos tiempos, ya que han aparecido contaminantes en concentraciones bajas que antes no se clasificaban como contaminantes, sin embargo, se ha encontrado que aun en esas concentraciones pueden tener un impacto considerable, tanto en la salud como ambientalmente.

En el presente trabajo se desarrollaron metodologías de microextracción para contribuir en la identificación de algunos de los denominados contaminantes emergentes, como lo son la aspirina, ibuprofeno y el ácido salicílico.

Para identificar los analitos se estandarizaron las condiciones de medición en cromatografía líquida de alta resolución con detector de diodos, utilizando como fase móvil agua desionizada y acetonitrilo, midiendo la respuesta del ácido salicílico a 277 nm y a 198 nm para la aspirina y el ibuprofeno, encontrando que los tiempos de retención son de 3.97, 4.71 y 11.77 min para la aspirina, ácido salicílico e ibuprofeno respectivamente.

Además, de acuerdo con los coeficientes de correlación obtenidos en las curvas de calibración realizadas para cada analito, se estableció un comportamiento lineal entre $0,5 \pm 0,1$ a $5,0 \pm 0,1$ mg/L para la aspirina y el ácido salicílico, y entre $1,0 \pm 0,1$ a $5,0 \pm 0,1$ mg/L para el ibuprofeno, con coeficientes de correlación de 0.9868, 0.9949 y 0.9992 respectivamente. Con las curvas de calibración también se establecieron los límites de detección siendo estos de $0,06 \pm 0,01$; $0,07 \pm 0,01$ y $0,19 \pm 0,01$ mg/L para la aspirina, ácido salicílico e ibuprofeno respectivamente y los límites de cuantificación son de $0,21 \pm 0,01$; $0,23 \pm 0,01$ y $0,63 \pm 0,01$ mg/L para la aspirina, ácido salicílico e ibuprofeno respectivamente.

Para disminuir el impacto que las metodologías de microextracción puedan tener se sintetizaron solventes verdes (solventes eutécticos profundos y líquidos iónicos) para utilizarlos como extractantes, los solventes verdes con capacidades extractantes se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja y de resonancia magnética.

Para cada una de las metodologías de microextracción desarrolladas en este trabajo se utilizaron diseños experimentales de Plackett-Burman y factorial 2^k para establecer las mejores condiciones de extracción, en donde, la microextracción con gota dispersa asistida por solvente eutéctico profundo fueron a pH 6,0 para la aspirina y el ibuprofeno, para el ácido salicílico se extrae mejor a pH 4,0 y la extracción se realiza por un periodo de

10 minutos, donde se encontraron porcentajes de recobro entre 17,0 y 35,0% siendo el ácido salicílico el analito que mejor se extrajo por esta metodología.

Para la microextracción líquido-líquido-líquido los factores de más influencia fueron la relación volumétrica entre la fase acuosa con el analito y la fase orgánica apolar, siendo la mejor relación: por cada 3 mL de fase acuosa con muestra, 3 mL de fase apolar y el tiempo, donde la extracción debe ser en periodos de 8 minutos. Con esta metodología, se encontraron porcentajes de recobro entre 78,0 y 99,0%, sin embargo solo fue posible desarrollar la metodología para el ibuprofeno.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes o también denominadas sustancias emergentes preocupantes (ESOC, por sus siglas en inglés Emerging Substances of Concern), entre las cuales se encuentran fármacos, perfumes, productos de cuidado personal, pesticidas y algunos compuestos que se emplean en diferentes procesos industriales, comúnmente utilizados como sustitutos de otras sustancias debido a que tienen menor toxicidad, como por ejemplo el cambio de ftalatos a DINCH (Éster diisononílico del ácido dicarboxílico de 1,2-ciclohexano). La preocupación frente al impacto que pueden tener las ESOC surge debido a la poca información que se tiene al respecto y que existe la posibilidad de que afecten a la salud humana y ambiental (Hamza *et al.*, 2016; Salthammer, 2020).

Las ESOC, se encuentran a nivel de trazas (desde ng/L hasta µg/L) en los recursos hídricos de todo el mundo (Peña-Guzmán *et al.*, 2019), por lo cual las técnicas convencionales como extracción líquido-líquido o sólido-líquido no son muy efectivas para determinar y cuantificar estas sustancias. En países en desarrollo es aún menor la información que se tiene acerca de las ESOC y en especial la disposición de estas sustancias en cuerpos acuáticos (Tavengwa & Dalu, 2022).

Con el ánimo de contribuir en la identificación, cuantificación y una posible eliminación de ESOC en medios acuosos surge este trabajo de investigación, en el cual se desarrollaron dos métodos de microextracción empleando solventes sostenibles como lo son: los líquidos iónicos (IL por sus siglas en inglés Ionic Liquid) y solventes naturales eutécticos profundos (NADES por sus siglas en inglés Natural Deep Eutectic Solvents). Estas metodologías fueron empleadas para la determinación de fármacos (Ibuprofeno, aspirina y ácido salicílico). La identificación se realizó utilizando ultra-cromatografía líquida de alta resolución con detector de arreglo de diodos (µCLAR-DAD).

2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

2.1 CONTAMINANTES EMERGENTES EN AGUA

El agua es uno de los compuestos más importantes para todos los seres vivos, el cual se ha visto afectada por diversos factores antropogénicos, como la llegada de aguas residuales, productos farmacéuticos, pesticidas, productos de cuidado personal (PCP), cloacales sin tratar, la escorrentía de campos agrícolas, entre otros; se ha identificado que debido a las anteriores fuentes existe un continuo aumento en la concentración de contaminantes emergentes (CE) en el agua. Los CE del agua son compuestos o derivados de estos, que generalmente no se monitorean, pero tienen la probabilidad de entrar a los cuerpos acuáticos y causar efectos desfavorables a la salud humana y el ecosistema (Hamza *et al.*, 2016; Saquib *et al.*, 2021).

Esto es motivo de preocupación ya que, las tecnologías empleadas para el tratamiento de aguas residuales convencionalmente, como lodos activados, son ineficientes para eliminar los CE (Wiest *et al.*, 2021). Se ha demostrado en estudios que en Estados Unidos productos farmacéuticos y PCP estaban presentes en el 80% de 138 flujos para el 2009, al igual que se menciona en el mismo estudio que en Canadá para el 2014 había 165 CE diferentes, llegando a encontrar hasta en el agua potable contaminación por drogas excretadas (Hamza *et al.*, 2016), en Colombia igualmente ya existen estudios, en donde se busca monitorear productos farmacéuticos y PCP en agua, entre los cuales se encontró ibuprofeno (Pemberthy M *et al.*, 2020). Por esto, algunos países han iniciado el desarrollo de mecanismos y procesos para la identificación y regulación de CE, sin embargo aún existe una amplia cantidad de posibles CE sin encontrar (Saquib *et al.*, 2021).

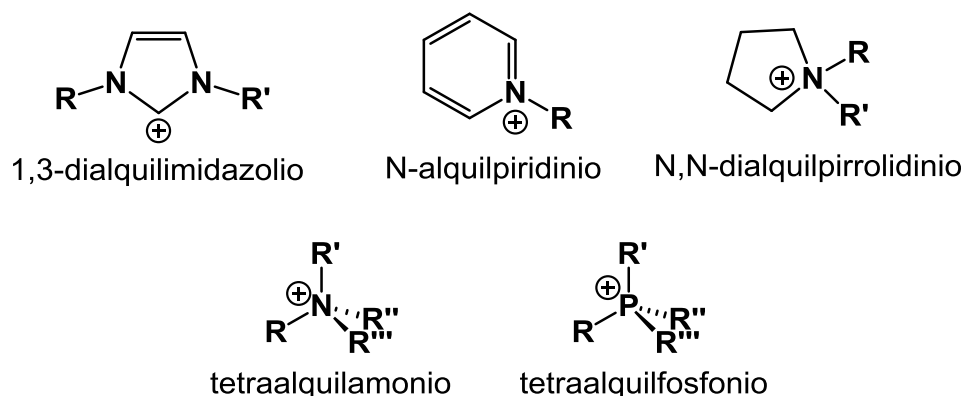
2.2. SOLVENTES VERDES

A menudo las sustancias utilizadas en síntesis, métodos de extracción y separación, entre otros procesos químicos son disolventes, utilizados en grandes cantidades, los cuales se caracterizan por su alta volatilidad, inflamabilidad y toxicidad. Por lo anterior, la búsqueda de solventes amigables con el medio ambiente y biodegradables está creciendo, además de estar relacionados directamente en el quinto principio de la química verde e indirectamente en el tercer y cuarto principio; en estos principios se cubren la generación de desechos que se deben reducir, el consumo de energía y la volatilidad de solventes. Dadas estas recomendaciones los solventes verdes deben tener ciertas características ambientales, de salud y seguridad que los diferencien de los solventes convencionales. Por lo tanto los líquidos iónicos, los solventes de hidrofobicidad conmutable y los solventes eutécticos profundos son los solventes más opcionados como candidatos en este campo de investigación (Santos *et al.*, 2022; Vanda *et al.*, 2018).

2.2.1. Síntesis de Líquidos Iónicos

Los líquidos iónicos o IL pueden verse como una clase de solventes, sin embargo esto depende del punto de vista, porque también son considerados sales líquidas con puntos de fusión por debajo del punto de ebullición del agua, pero esta última definición no da mucha información acerca de su composición, excepto que nos dice que son completamente iónicos. El término “líquido iónico” solía usarse anteriormente para referirse a “sal fundida”, aun así las diferencias prácticas son tales que permiten diferenciarlos por separado ya que los IL generalmente se pueden manejar como disolventes ordinarios (Wasserscheid, 2008).

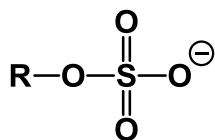
Los IL generalmente se sintetizan empleando un catión orgánico (Esquema 1), muchas veces heterocíclico y generalmente con algún átomo de nitrógeno o de fósforo y un anión que puede ser tanto inorgánico como orgánico (Esquema 2) (Verdía Bárbara, 2012).



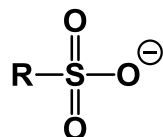
Esquema 1. Cationes más usados en la síntesis de IL.

La parte catiónica del IL cumple un gran papel en el comportamiento químico y evita que estos cristalicen, lo que afectaría su punto de fusión elevándolos como ocurre en las sales inorgánicas, por otra parte las propiedades físicas como tensión superficial, temperatura de descomposición, densidad y viscosidad de los IL se atribuyen a los aniones (Garza Tapia, 2013).

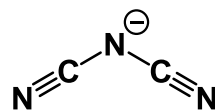
Entre las características de los IL se resalta una presión de vapor mínima, casi despreciable, lo que conlleva a puntos de ebullición muy elevados, además son compuestos no inflamables y con buena estabilidad térmica (temperatura de descomposición entre 300 y 400°C). En lo que respecta a la viscosidad suelen ser más viscosos de los solventes convencionales, sin embargo esta característica no afecta normalmente a la transferencia del analito de interés (MacFarlane *et al.*, 2017; National & Pillars, n.d.).



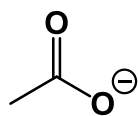
alquilsulfato



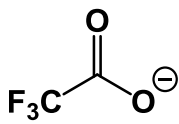
alquilsulfonato



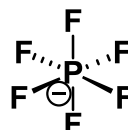
dicianamida



acetato



trifluoroacetato



hexafluorofosfato



Esquema 2. Aniones más usados en la síntesis de IL.

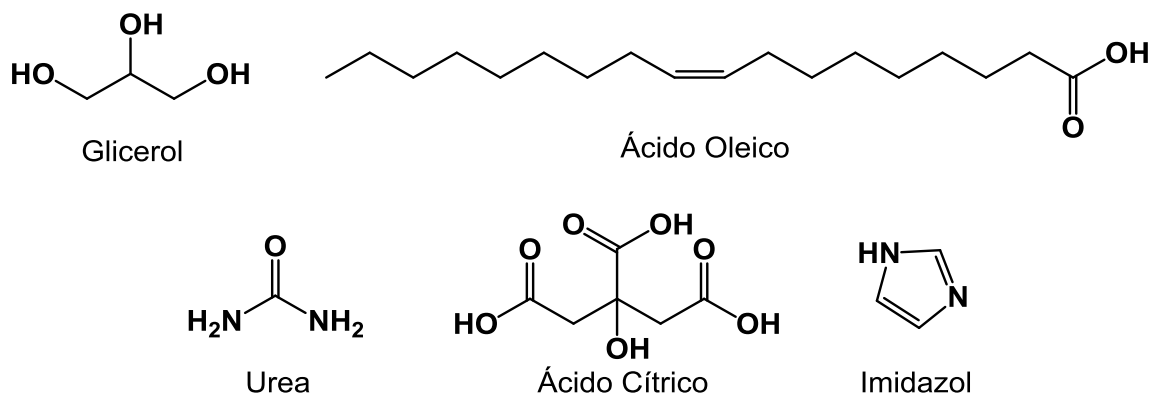
Como resultado de estas propiedades, en las últimas décadas ha surgido un gran interés en estas sustancias, gracias a su utilidad en aplicaciones como la electroquímica, síntesis orgánica, como fluidos de trabajo en aplicaciones mecánicas o como medios de extracción (Garza Tapia, 2013; Verdía Bárbara, 2012).

2.2.2. Síntesis de Solventes Eutécticos Profundos

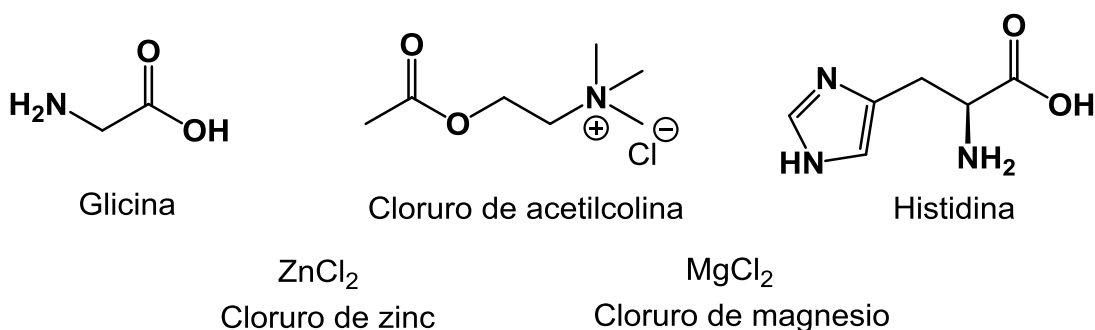
La creación de solventes sostenibles, es uno de los mayores retos de la química verde, y en este contexto la implementación y los avances en la creación y aplicaciones de los solventes naturales eutécticos profundos o NADES es una alternativa ecológica importante (Pisano *et al.*, 2018).

El término “DES” (por sus siglas en inglés, Deep Eutectic Solvents) fue acuñado por Abbot y colaboradores en 2003, quienes pretendían mediante la mezcla de dos sólidos con elevados puntos de fusión, conseguir la formación de líquidos, así se encontró que la mezcla de estos sólidos en una relación óptima, conlleva a la formación de una mezcla eutéctica líquida a temperatura ambiente y con propiedades inusuales como solvente (Vides, 2013), la variación en el término a NADES, implica que la mezcla eutéctica está constituida por metabolitos presentes de forma natural en las células y organismos (Pisano *et al.*, 2018).

Los DES o NADES se pueden obtener a partir de un donante de enlaces de hidrógeno (HBD, por sus siglas en inglés Hydrogen Bond Donors)(Esquema 3) y un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA, por sus siglas en inglés Hydrogen Bonds Acceptor)(Esquema 4), al mezclar estos componentes en proporciones molares generalmente de 1:1, 1:2 y 1:3, se producen líquidos a temperatura ambiente, además la economía atómica es del 100% y no requiere etapas de purificación, sin embargo, hay algunos compuestos como la glicina que se puede usar como HBA o HBD (de Andrade *et al.*, 2022; Pisano *et al.*, 2018; Vides, 2013).



Esquema 3. Donantes de enlaces de hidrógeno (HBD).



Esquema 4. Aceptores de enlaces de hidrógeno (HBA).

Las propiedades fisicoquímicas de los DES, como la viscosidad, conductividad, densidad y polaridad dependen de sus componentes y la naturaleza química de estos últimos, además de las interacciones intermoleculares que se pueden presentar (Pisano *et al.*, 2018; Qin *et al.*, 2020).

Por lo anterior y que curiosamente los DES pueden formar enlaces de hidrógeno adicionales con otros solutos, se crea la posibilidad para un amplio rango de aplicaciones dentro de la química, como por ejemplo en síntesis, electroquímica, biocatálisis y extracciones (de Andrade *et al.*, 2022; Vides, 2013).

2.3. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA.

En los procesos analíticos, la preparación de la muestra es uno de los pasos más críticos, el cual se ve afectado directamente por las técnicas convencionales por falta de selectividad y el alto consumo de disolventes orgánicos. Por esto, el desarrollo de técnicas de microextracción (MET, por sus siglas en inglés Microextraction Techniques) como técnicas ecológicas para sustituir las metodologías convencionales de preparación y extracción de muestras, además de que las MET han disminuido algunos de los problemas que se presentaban con los enfoques tradicionales como la disminución o eliminación de

reactivos tóxicos, disminución en la emisión de gases y vapores, lo que repercute en la aplicación de los principios uno y seis de la química verde (Pino, 2020). De una forma más general, la base de los MET es la miniaturización de las técnicas de extracción, como la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés Solid Phase Extraction) y la extracción líquido-líquido (LLE, por sus siglas en inglés, liquid-liquid extraction) (Carasek *et al.*, 2021; Jalili *et al.*, 2020).

Las MET en fase líquida (LPME, por sus siglas en inglés Liquid Phase Microextraction), como la microextracción de una sola gota (SDME, por sus siglas en inglés Single Drop Microextraction), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, por sus siglas en inglés Dispersive Liquid-Liquid Microextraction) y la microextracción líquido-líquido-líquido (LLLME, por sus siglas en inglés Liquid-Liquid-liquid Microextraction), usan cantidades muy pequeñas de solventes, aspecto óptimo en términos ambientales del proceso. Los solventes que se emplean en las LPME por lo general deben tener ciertas propiedades fisicoquímicas, como viscosidad, densidad y punto de ebullición elevados en comparación al agua, las cuales van a influir en la efectividad de los mismos al realizar la extracción. Por esto el estudio de la implementación de los solventes verdes en las LPME es un tema de interés y relativamente nuevo, siendo (Carasek *et al.*, 2021; Marcinkowska *et al.*, 2019).

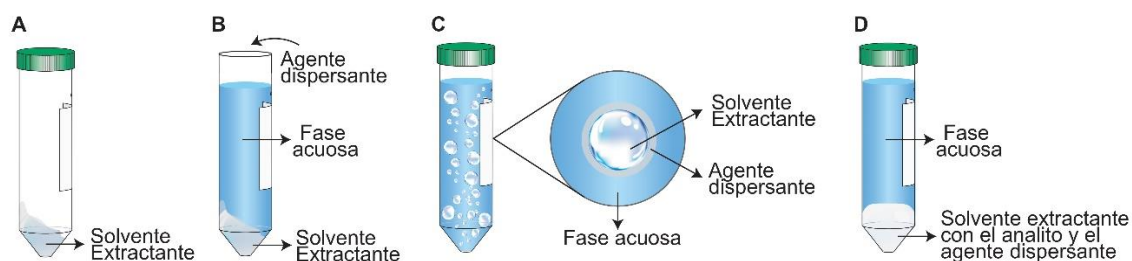
2.3.1 Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

Siguiendo el principio de la LLE, en donde el analito en una fase líquida se redistribuye en dos fases, luego de que la fase líquida en donde se encuentra se pone en contacto con otra fase líquida completamente inmiscible o parcialmente miscible en la primera, en la mayoría de los casos una fase es acuosa y la otra es un solvente orgánico. En la DLLME, se busca que la fase apolar o el extractante se disperse en forma de pequeñas esferas por toda la fase acuosa que contiene el analito, para de esta manera aumentar los puntos de contacto del analito con su extractante y facilitar la extracción (Figura 1).

La selección de la fase orgánica es uno de los factores más determinantes en la aplicación de esta técnica, por lo general se emplean compuestos clorados con densidad mayor a la del agua, los cuales son altamente tóxicos y volátiles, además de que tienen eficiencia de extracción y una selectividad baja para analitos complejos como medicamentos o con matrices complejas como los alimentos (Wang, Chen *et al.*, 2019). Además, para implementar la DLLME se requiere la adición en algunos casos de un agente dispersante para formar una emulsión, quienes de igual forma que los solventes orgánicos suele ser tóxico y a su vez estos suelen ser solubles en la solución de la muestra, disminuyendo así los coeficientes de partición de los analitos y disminuye la transferencia del analito al solvente extractor (Jing *et al.*, 2022). Por lo anterior, se ha buscado la manera de combinar

los solventes verdes y la DLLME, como ejemplo se mencionan metodologías para la extracción de compuestos fenólicos presentes en plantas, extracción de ésteres de ácido ftalatos presentes en muestras de agua y bebidas (Sereshi *et al.*, 2022).

Figura 1. Etapas proceso de DLLME.



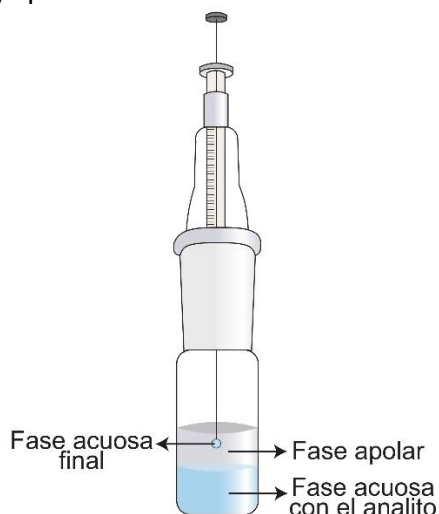
(A) Adición solvente extractante en el eppendorf (B) Adición de muestra y agente dispersante (C) Dispersión del solvente extractante en la solución, con ayuda del dispersante (D) Separación luego de la extracción

2.3.2 Microextracción líquido-líquido-líquido (LLLME)

Dentro de las diferentes formas de LPME, se encuentra la LLLME o “microextracción del disolvente con reextracción simultánea” nombrada así por su desarrollador Ma y Cantwell en 1999; esta es una microextracción en tres fases y es de las más adecuadas para la extracción de analitos básicos y ácidos. El principio de esta metodología de extracción es que ocurre en dos etapas simultáneas, en donde el analito ionizable pasa primero a una fase orgánica apolar. En esta etapa se facilita la extracción debido a que en la fase acuosa se utiliza un pH que disminuya la solubilidad del analito en la fase acuosa y la aumente en la fase apolar (usando el mismo principio de una LLE), por lo general se busca que la fase apolar tenga una densidad menor a la del agua. En la segunda etapa de la extracción se busca que el analito pase a una segunda fase acuosa, donde se ioniza o se emplean otros compuestos como IL para promover la extracción (Figura 2).

Esta técnica da la posibilidad de inyectar y medir directamente mediante cromatografía líquida de fase reversa o electroforesis capilar, una vez terminada la extracción ya que el analito termina en una fase acuosa (Viera Santana *et al.*, 2013). En la electroextracción también se ha implementado esta metodología de extracción trifásica para el estudio de productos farmacéuticos a nivel de trazas, alcanzando un recobro de hasta el 56%, buen rango lineal y límites de detección entre 0,36 y 3,21 ng mL⁻¹ (He *et al.*, 2021).

Figura 2. Modelo del montaje para LLLME.



2.4 TÉCNICA DE ULTRA-CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECTOR DE DIODOS (μ CLAR-DAD)

La ultra-cromatografía líquida de alta resolución (μ CLAR) es una de las técnicas analíticas de separación más usadas y tiene diferentes tipos dados por la solubilidad y la masa molecular de los analitos, entre estos se encuentra la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión molecular, cromatografía en fase normal y cromatografía en fase reversa. Además, a la μ CLAR se le pueden acoplar una cantidad considerable de detectores como puede ser de fluorescencia, espectrometría de masas y detector de arreglo de diodos (DAD) (Harris, 2003; Skoog *et al.*, 2015). De esta manera la μ CLAR y los diferentes detectores con los que se puede acoplar, se han implementado en estudios como los reportados en la tabla 1.

Tabla 1. Estudios con el uso de μ CLAR y sus detectores.

Estudio	Columna analítica	Fase móvil	Detector	Referencia
Un método de extracción verde de alto rendimiento basado en un solvente eutéctico profundo natural hidrofóbico para la determinación de contaminantes emergentes en el agua.	Phenomene x Kinetex C18.	Gradiente con ACN y agua ultra pura.	Detector de arreglo de diodos.	(Morelli <i>et al.</i> , 2020)
Análisis de control de dopaje de 14 diuréticos en alimentos de origen animal	Waters Acquity UHPLC BEH C 18	Gradiente con metanol y agua.	Espectrometría de masas.	(Yan <i>et al.</i> , 2022)

Continuación tabla 1.

Aplicación de un método rápido y sensible para la determinación de contaminantes emergentes en aguas residuales utilizando una extracción rápida, fácil, económica, eficaz, robusta y segura.	Kinetex C18 core-shell.	0,1 % de ácido fórmico en agua Milli-Q y metanol.	Espectrometría de masas.	(Martínez-Piernas <i>et al.</i> , 2021)
Determinación de vitamina B12.	Intercambio aniónico Alltech con un tamaño de partícula de 7 μm .	Tampón de ácido acético/acetato de sodio.	Espectrofotómetro de absorción atómica de llama solar ATI UNICAM 929.	(Erarpat <i>et al.</i> , 2022).
Determinación de contaminantes emergentes en matrices acuosas con microextracción líquido-líquido dispersiva soportada por fibra hueca (HF-DLLME)	Columna C18 (Phenomene x Kinetex, 250 mm \times 4,6 mm id, 5 μm de espesor de película). También se utilizó una precolumna C18 (Phenomene x Kinetex)	Mezcla de agua al 35 %, metanol al 30 % y ACN al 35 %. Con gradientes.	Detector de arreglo de diodos.	(Lopes <i>et al.</i> , 2017)
La naturaleza cíclica de la química del suelo: análisis forense.	Phenomene x Kinetex 2,6 μm EVO C18- 100 \AA 100 mm \times 2,1 mm.	Gradiente con metanol y agua.	Detector de arreglo de diodos y espectrometría de masas.	(Hay <i>et al.</i> , 2022)

2.4.1 Detector de arreglo de diodos (DAD)

El DAD es un tipo de detector basado en el transporte de carga entre semiconductores tipo n a semiconductores tipo p, producto de la incidencia de la energía de diferentes longitudes de onda. La particularidad de este detector es que es de longitud de onda variable, además se puede monitorear una sola longitud de onda entre 190 nm y 900 nm

en un momento dado si se desea. El DAD empleado en este trabajo puede medir un barrido y monitorear cuatro longitudes de onda fijas al mismo tiempo.

2.5 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño experimental (DoE, por sus siglas en inglés Design of Experiments) es la técnica más empleada para optimizar e identificar las variables con mayor influencia en un proceso; para esto, en el DoE se utilizan metodologías estadísticas para identificar los factores y sus interacciones significativas, además de que el DoE ayuda a crear un modelo con los niveles de cada factor que conlleva a la mejor respuesta experimental (Elik *et al.*, 2021). Entre los DoE que más se implementan se encuentran los cribados utilizados principalmente para identificar variables, los factoriales del estilo 2^k y de superficie de respuesta como el de Box-Behnken, estos últimos para establecer los valores óptimos que deben tomar los diferentes factores (Altunay, 2021; Elik *et al.*, 2021; Elik *et al.*, 2022).

2.5.1 Diseño Factorial del estilo 2^k

En muchos experimentos que se requiere estudiar el efecto individual y/o colectivo de varios factores sobre una respuesta, la utilización de diseños factoriales como la solución más eficiente. Ya que, en cada ensayo o experimento completo se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores.

Los diseños factoriales presentan casos especiales, cuya importancia radica en la utilización de cada uno de estos en los trabajos de investigación y porque constituyen la base de partida de otros diseños experimentales de gran valor práctico.

El más importante de los casos especiales es el de k factores, con dos niveles por cada uno. Los niveles pueden ser cuantitativos, como dos valores de temperatura, pH, tiempo o concentración, o bien cualitativos, como dos equipos, dos operadores o quizá la presencia o ausencia de un factor. Un desarrollo completo de un diseño de este tipo requiere $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ experimentos y se denomina diseño 2^k (Montgomery, 2004).

2.5.2 Diseño Cribado de Plackett-Burman

Son diseños de 2 niveles de resolución III (diseño factorial fraccionado). En un diseño de resolución III, los efectos principales forman estructura de alias con las interacciones de 2 factores. Es posible elaborar diseños de resolución III para investigar hasta $k = N - 1$ factores con tan solo N experimentos, donde N es un múltiplo de 4. Si $k = N - 1$, se dice que el diseño factorial fraccionado está saturado.

En particular los diseños de Plackett-Burman se utilizan para $N = 12, 20, 24, 28$ y 36 experimentos, y son de interés cuando se tienen muchas variables a estudiar en un experimento, debido a que disminuyen la experimentación necesaria para identificar si una variable tiene influencia significativa. Sin embargo, estos diseños no pueden

representarse como cubos, por lo que no suelen ser útiles para encontrar el mejor valor de cada variable. En ocasiones se les ha llamado diseños no geométricos. Por lo tanto, solo se debe utilizar este tipo de diseños cuando se esté dispuesto a presuponer que las interacciones de 2 factores son insignificantes. Los diseños de Plackett-Burman se utilizan normalmente para identificar los factores más importantes a principios de la fase de experimentación (Montgomery, 2004).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El crecimiento en la población humana, los cambios en la calidad de vida y con ello el desarrollo tecnológico, clínico e industrial en las últimas décadas, ha traído consigo una alta demanda de diferentes productos los cuales son fuente de las ESOC's, los cuales son una nueva amenaza a los recursos naturales, entre ellos uno ya escaso para el ser humano, como lo es el agua, ya que dentro del ciclo del agua se da el flujo de contaminantes que se asocia al uso antropogénico del líquido (Mashile *et al.*, 2022).

Las ESOC's se encuentran en estos medios acuosos en concentraciones menores a $\mu\text{g/L}$, por lo que las técnicas de extracción y determinación convencionales no son lo suficientemente eficientes, haciéndose necesario el desarrollo de nuevas técnicas para la identificación y cuantificación de estos contaminantes del agua (Peña-Guzmán *et al.*, 2019).

Además, aun siendo los niveles de concentración de estas ESOC's tan bajas, son motivo de una creciente preocupación debido a que su liberación puede afectar al medio ambiente y los recursos hídricos, ya que muchas de las ESOC's como los fármacos pueden ser bioacumulables y tóxicos en la fauna acuática; además para el caso particular de los antibióticos, un tipo de fármacos, se ha encontrado que puede llegar a inducir una resistencia, causando problemas en la salud humana (como efectos disruptores endocrinos y cáncer) (Hube & Wu, 2021).

Para combatir esta problemática emergente e incentivar a la disminución de la liberación de ESOC's al medio ambiente, la Organización de las Naciones Unidas (ONU) ha abordado en la agenda para la sostenibilidad del medio ambiente, un objetivo de "agua limpia y saneamiento" (Objetivo 6) entre 17 objetivos de desarrollo sostenible que fueron tratados, en el cual la Meta 6,3 dice "Para 2030, mejorar la calidad del agua mediante la reducción de la contaminación, eliminando y minimizando la liberación de productos químicos y materiales peligrosos en los vertidos, la reducción a la mitad de la proporción en aguas residuales sin tratar y el aumento sustancial del reciclaje y la reutilización segura a nivel mundial" (Naciones Unidas, 2015).

En consecuencia surge este trabajo de investigación, donde se estandarizaron dos metodologías de microextracción: microextracción líquido-líquido dispersiva por solventes eutécticos profundos (DLLME-DES) y microextracción líquido-líquido-líquido con líquidos iónicos (LLLME-IL), para la determinación y cuantificación de aspirina, ácido salicílico e ibuprofeno en muestras acuosas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar técnicas de microextracción para la determinación de algunos contaminantes emergentes empleando líquidos iónicos y solventes naturales eutécticos profundos para desarrollar métodos por DLLME y LLLME.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Sintetizar líquidos iónicos y solventes naturales eutécticos profundos, mediante síntesis orgánica total.

4.2.2 Evaluar los parámetros de extracción asociados mediante el empleo de diseño experimental.

4.2.3 Estandarizar una técnica por CLAR-DAD para cuantificación y determinación de ácido salicílico, ácido acetilsalicílico e ibuprofeno.

5. METODOLOGÍA

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron una serie de reactivos y materiales adquiridos en diferentes casas comerciales referenciados en la tabla 24 (Anexo 1), además los equipos usados se reportan en la tabla 25 (Anexo 2).

5.1 SÍNTESIS DE SOLVENTES NATURALES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (NADES)

En la síntesis de los NADES se tomaron diferentes HBA y HBD, los cuales se mezclaron en un vial en diferentes relaciones molares (Tabla 2). Se empleó la metodología utilizada por Florindo y Blanco, realizando las siguientes modificaciones, no se adiciona agua a ninguna mezcla, el calentamiento se controla directamente (60°C) y la agitación es progresiva hasta que se forme un líquido muy viscoso, similar a la miel (90 min) (Florindo *et al.*, 2017).

Tabla 2. Lista de combinaciones con las cuales se prueba si hay formación de NADES.

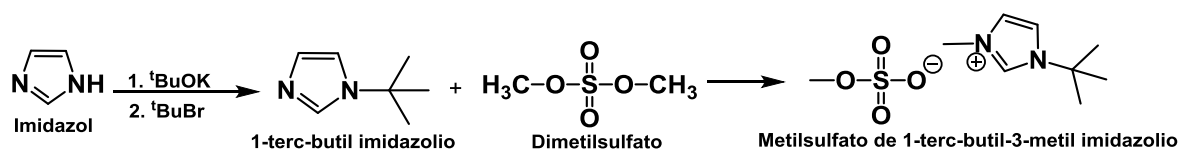
Denominación	HBA	HBD	Relaciones Molares (HBA-HBD)		
DES ₁	ZnCl ₂	Urea	1-3,5		
DES ₂	MgCl ₂	Urea	1-1	1-3	1-4
DES ₃	MnCl ₂	Urea	1-3	1-3,5	1-4
DES ₄	CdCl ₂	Urea	1-3	1-4	
DES ₅	FeCl ₂	Urea	1-3	1-3,5	1-4
DES ₆	ZrOCl ₂	Urea	1-1	1-3	6-1
DES ₇	FeCl ₃	Urea	1-2	1-3	1,5-2
NADES ₁	Glicina	Ácido Oxálico	1-1	1-4	2-1
NADES ₂	Glicina	Urea	1-2	1-3	
NADES ₃	Glicina	Ácido Cítrico	1-3	1-5	
NADES ₄	Asparagina	Urea	1-2	1-4	
NADES ₅	Tirosina	Urea	1-2	1-4	
NADES ₆	Cisteina	Urea	1-2	1-4	
NADES ₇	Alanina	Urea	1-2	1-4	

Los NADES que fueron estables a temperatura ambiente, se caracterizaron utilizando espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR) y el NADES con mejores resultados para los objetivos del trabajo se caracterizó adicionalmente por espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN).

5.2 SÍNTESIS DE LÍQUIDOS IÓNICOS (IL)

Para la síntesis de los IL se empleó tetrahidrofurano (THF) previamente secado. Así, en un matraz de 500 mL se añadieron 0.0240 mol de terc-butoxido de potasio (^tBuOK) a una solución de 0,0245 mol de imidazol en 200 mL de THF, esta mezcla se hizo reaccionar durante 90 minutos a 45°C y 100 rpm; luego se agregaron 0,0250 mol de bromuro de terc-butilo (^tBuBr), se aumentó el calentamiento a 60°C y se dejó reaccionar durante 24 horas.

Se siguió la reacción por cromatografía en capa fina (TLC) (usando diclorometano y metanol en una relación de volúmenes 6:1 respectivamente). Al finalizar esta etapa, quedó en el matraz un precipitado, el cual se separó por filtración seguidamente el filtrado se rotaevaporó para eliminar el THF y obtener el producto crudo. Luego, el producto crudo se disolvió en diclorometano y realizaron lavados con agua para eliminar impurezas, la fase apolar se destiló a presión reducida y se obtuvo el 1-terc-butil imidazolio. Para terminar, se añadió lentamente dimetilsulfato al producto anterior a 20°C y 100 rpm de agitación y reaccionó durante 3 horas (agregando como R₂ un metilo y dejando como contraión el metilsulfato), después de esto se obtuvo el producto bruto que se purificó adicionando éter etílico anhidro y agitando fuertemente (350 rpm) por 30 minutos, luego se decantó y filtró al vacío para obtener el metilsulfato de 1-terc-butil-3-metil imidazolio, el cual es el IL viscoso puro; la reacción general se presenta en el esquema 5 (Zuo *et al.*, 2020).



Esquema 5. Reacción general para la síntesis de IL.

Se sintetizaron 2 IL utilizando esta metodología, cambiando el ^tBuOK por borohidruro de sodio, los halogenuros de alquilo y el contra ion final (Tabla 3).

Tabla 3. Grupos alquilo y contra iones utilizados en la síntesis de IL.

Denominación	R ₁	R ₂	Contra ion	Esquema
IL ₁	Terc-butil	Metil	Metilsulfato	X^{\ominus}
IL ₂	Alilo	Alilo	Cloruro	

El IL₁ que fue funcional para los objetivos de este trabajo se caracterizó mediante FT-IR y RMN, al IL₂ solo se le tomó un espectro FT-IR.

5.3 PURIFICACIÓN DE IBUPROFENO

Se emplearon 2 tabletas de 800 mg de ibuprofeno (IBU) comerciales de Coaspharma, las cuales se maceraron, luego se llevaron a un matraz de 500 mL y se adicionaron 100 mL de etanol al 95%, esta mezcla se agitó por 2 h, luego se llevó a un baño termostático a 50°C durante 20 min, posteriormente se filtró por gravedad, al filtrado se le adicionaron 40 mL de diclorometano e hidróxido de sodio 1M (50/50) se llevaron a un embudo de separación y finalmente la parte polar se rotaevaporó obteniéndose un sólido blanco que corresponde al IBU, el cual se identificó mediante espectrometría FT-IR (Gil *et al.*, 2009).

5.4 DETERMINACIÓN POR μ CLAR-DAD

Para la estandarización del método cromatográfico se tomó como referencia diferentes investigaciones en las cuales se ha estudiado al menos uno de los analitos objetivos de este trabajo. Cada fase móvil o muestra a inyectar se filtró previamente con filtros de 0,22 μ m. Ahora bien, primero se evaluaron diferentes fases móviles utilizando metanol y acetonitrilo (ACN) grado HPLC además de agua tipo 1 al 0,1% de ácido fórmico, hasta encontrar la composición óptima para separar y poder cuantificar los tres analitos de estudio (ácido acetilsalicílico (AAS), ácido salicílico (AS) e ibuprofeno (IBU)), además se miró el comportamiento de los analitos en la columna variando el flujo y seleccionando el que mejor resolución tienen los analitos (Gurrani *et al.*, 2022; Kamal *et al.*, 2020; Payán *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2019).

Una vez fijadas las condiciones cromatográficas, se realizó una curva de calibración con 6 puntos para cada analito por separado y por triplicado, para determinar los Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) teóricos (Ecuación 1 y 2 respectivamente), el comportamiento lineal se establece de acuerdo con el coeficiente de correlación (Kamal *et al.*, 2020).

$$LD = \frac{3S_b}{m_p}$$

Ecuación 1. Límite de detección teórico.

$$LC = \frac{10S_b}{m_p}$$

Ecuación 2. Límite de cuantificación teórico.

5.5 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA POR SOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DLLME-DES)

En la primera parte, se preparó una curva para el AS y AAS por triplicado utilizando el espectrofotómetro UV-Vis Genesis 6, determinando la absorbancia a 235 y 277 nm respectivamente y haciendo uso de los DoE cribado y factorial se identificó la influencia de diferentes factores sobre la extracción de cada analito, primero se evaluó mediante un DoE cribado de Plackett-Burman de 20 experimentos, si los factores analito, pH, tiempo de extracción, salting out (efecto de que haya sal en solución) y volumen de DES₁ tienen una influencia significativa frente a la efectividad de la extracción, para esto se preparan 100,0 \pm 0,1 mL de diferentes soluciones de AAS y AS (Tabla 4). De cada solución se tomaron 10,00 \pm 0,04 mL y se le adicionó una cantidad de DES₁ correspondiente de acuerdo con el DoE, esto se realizó en un vial y al combinar la muestra con el DES₁ se agitó con un vortex para conseguir la dispersión del DES₁ en la solución por 10 segundos, una vez transcurrido el tiempo de microextracción se centrifugó a 10000 rpm y -2°C por 10 min, seguidamente

se procedió a evaluar cada uno de los factores expuestos en la tabla 5, se utiliza como respuesta el porcentaje de recobro en cada extracción, el cual se determinó encontrando la cantidad de analito en solución luego del proceso de microextracción (Figura 3)(Altunay, 2021; Cortada Cortés, 2012).

Figura 3. Etapas DLLME con DES sin agente dispersante.

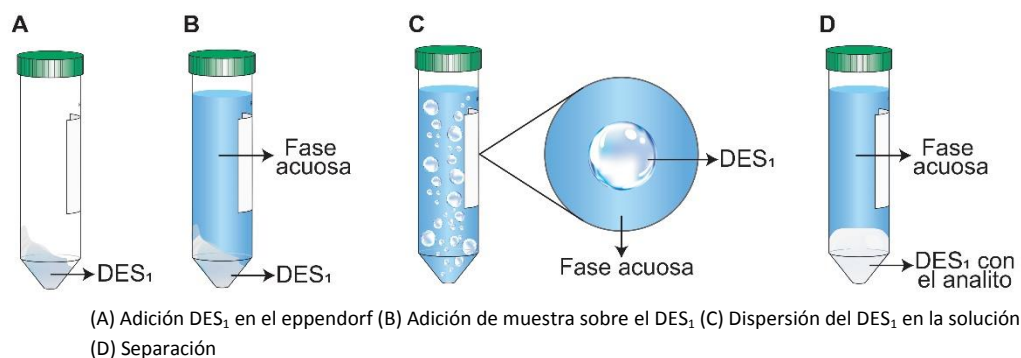


Tabla 4. Soluciones utilizadas para el DoE de Plackett-Burman.

Analito	Concentración Analito (mg/L)	Concentración de NaCl (%)	pH
AAS	134,0 ± 0,1	1	6,0
			9,0
		5	6,0
			9,0
AS	20,0 ± 0,1	1	6,0
			9,0
		5	6,0
			9,0

Tabla 5. Variables evaluadas para el DoE de Plackett-Burman para el DLLME-DES.

Variable	Nivel	
	Bajo	Alto
Analito	AS	AAS
pH	6,0	9,0
Tiempo (min)	5	10
Salting out (%)	1	5
Volumen DES ₁ (μL)	250	500

Una vez establecidas las variables con influencia significativa en el proceso de microextracción, se realizó para cada uno de los tres analitos un DoE factorial 2² por triplicado, teniendo como variables el pH (pH 4,0 y pH 6,0), donde se cambiaron los

niveles debido a los resultados obtenidos en el DoE de Plackett-Burman y el tiempo (5 y 10 min). Para los DoE factoriales se cuantificó por μ CLAR-DAD, por lo cual se modificó la composición de cada solución que se tomará como muestra, estableciendo la concentración utilizada como estándar para cada analito de $2,0 \pm 0,1$ mg/L, se tomó solo 1 mL de muestra en un vial eppendorf de 2mL, se adicionaron 25 μ L del DES₁ y no se agregó sal. Las demás etapas del procedimiento y la forma en que se estableció la eficiencia de la microextracción se continúan realizando como ya se describió.

5.6 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO CON LÍQUIDOS IÓNICOS (LLLME-IL)

Para esta metodología se preparó una solución de $2,0 \pm 0,1$ mg/L de IBU a pH de 2,5, solución que fue la fase acuosa en donde se encuentra el analito, la fase intermedia o apolar fue acetato de etilo y finalmente la tercera fase líquida es una gota que fue la solución acuosa que contiene el IL (Figura 4), la cantidad de cada una de las fases fue una de las variables a estudiar mediante el DoE cribado de Plackett-Burman de 24 experimentos, en donde se evaluaron en total cinco variables diferentes (Tabla 6).

Tabla 6. Variables evaluadas para el DoE de Plackett-Burman para el LLLME-IL

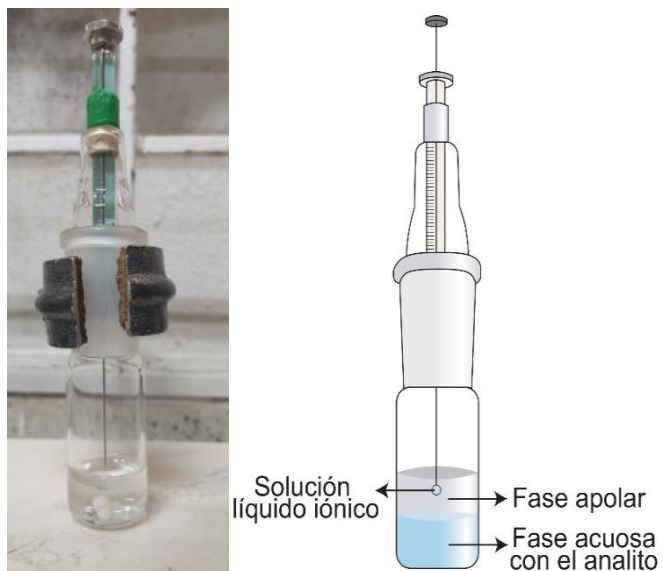
Variable	Nivel	
	Bajo	Alto
Relación en volumen entre la muestra y la fase apolar (mL muestra/mL fase apolar)	3/3	4/2
Agitación (rpm)	50	100
Tiempo por extracción con la gota (min)	4	8
Volumen gota (μ L)	3	6
Concentración IL (%)	1	5

Una vez establecidas, por medio de las respuestas obtenidas en el DoE de Plackett Burman, las variables que pueden tener influencia significativa en el proceso de microextracción, se planteó un diseño factorial 2^2 con puntos centrales por triplicado siendo las variables a analizar en este DoE el tiempo (4, 6, 8 min) y la relación entre la fase donde está la muestra y la fase apolar (4/2; 3,5/2,5; 3/2), empleando como muestra una solución $4,0 \pm 0,1$ mg/L, fijando el tamaño de la gota en 3 μ L, la agitación en 100 rpm y el %IL en $5,0 \pm 0,1\%$. La medición de cada microextracción se realizó mediante μ CLAR-DAD.

Una vez establecidas las mejores condiciones para esta metodología de extracción se realizó la microextracción de AS y AAS, sin embargo, debido a que la señal de la fase apolar y acuosa presentó interferencia al tiempo de retención del AS y AAS en μ CLAR-DAD, la medición de estos dos analitos se realizó en el espectrofotómetro UV-Vis GENESIS

6 utilizando como muestras una solución de $30,0 \pm 0,1$ y $100,0 \pm 0,1$ mg/L respectivamente.

Figura 4. Montaje de la extracción experimental para LLLME-IL, frente al modelo teórico.



Para cada diseño por punto se realizaron tres microextracciones sucesivas.

6. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Los resultados se expresaron como el promedio de tres valores y teniendo en cuenta la incertidumbre expandida. El análisis espectroscópico de los espectros IR se realizó con el software OMNIC y el de los espectros RMN se analizó con ACD/LABS. Los cromatogramas obtenidos se analizaron con el software Xcalibur. El análisis estadístico para las curvas de calibración se realizó en la herramienta de Microsoft Office Excel y para los DoE se realizó en el software Minitab 18.

6.1 SÍNTESIS DE SOLVENTES NATURALES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (NADES)

En la obtención de cada NADES y como ya se estableció que la formación de estos depende de la relación molar que se utilizó, entonces para cada DES y NADES se probaron diferentes relaciones (Tabla 2) hasta encontrar la relación óptima para la formación o establecer que no fue posible con los HBA y HBD que se emplean, aunque en la gran mayoría de las mezclas utilizadas se logró apreciar la formación de un líquido, de igual manera persiste la presencia de partículas en estos, así se estableció si la formación del DES es total, al quedar alguna partícula rompe el equilibrio y la mezcla se solidifica, cuando esto ocurrió, no fue posible volver la mezcla líquida nuevamente, por lo cual para definir como efectiva la formación del DES, la eficiencia de la reacción debe ser del 100% (economía atómica del 100%) (Figura 5). Con base a lo anterior, se define como efectiva la formación del DES₁, DES₂ y NADES₃. A cada uno se le tomó un espectro FT-IR como método para caracterizarlos (Figuras 6 y 7).

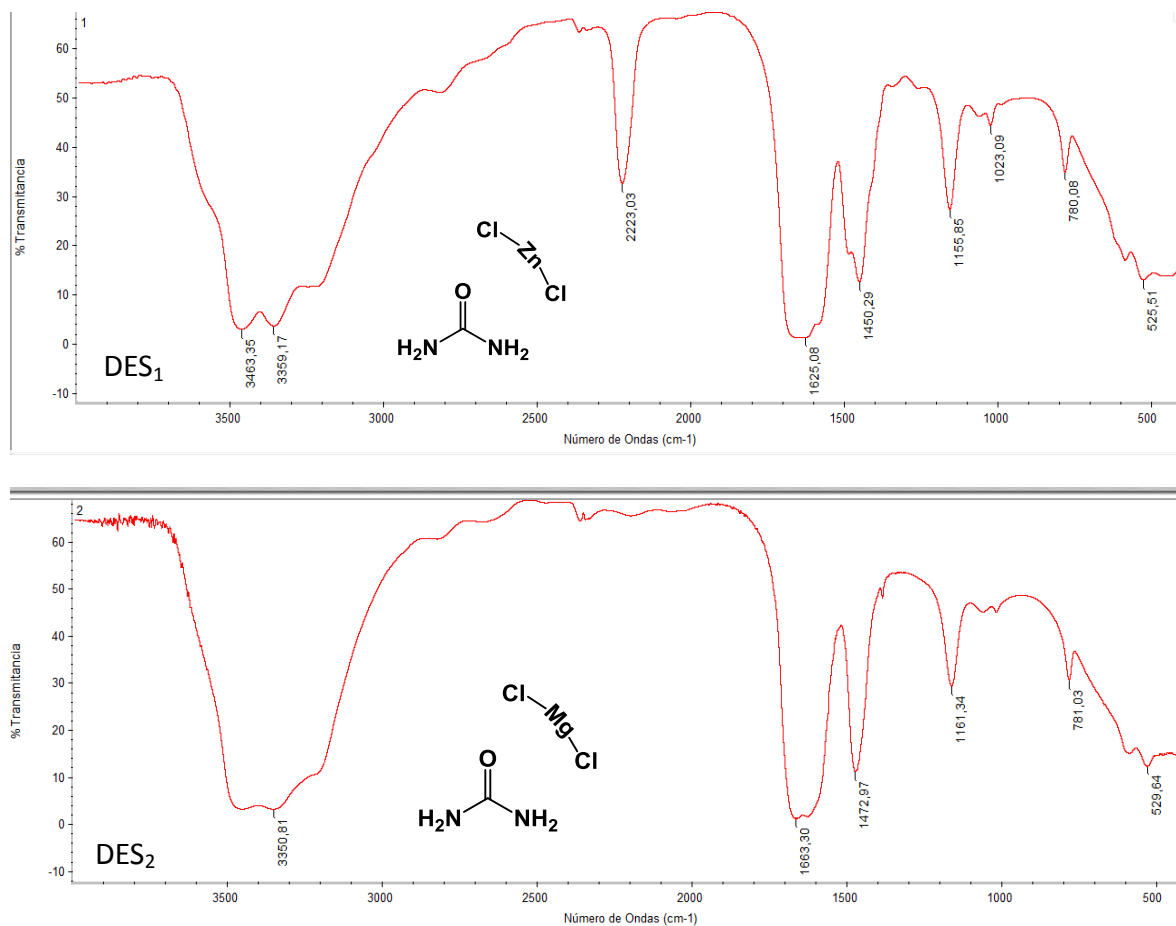
Figura 5. Formación de los DES.



En los espectros FT-IR tomados al DES₁ y DES₂ se puede observar la formación de enlaces tipo puentes de hidrógeno correspondientes a la interacción molecular de la urea con el ZnCl₂ para el DES₁ y la urea con el MgCl₂ para el DES₂, esto al observar cambios en la señal correspondiente al estiramiento del enlace N-H, la cual se desplaza, pasando de 3438 y 3340 cm⁻¹ a 3463 y 3359.17 cm⁻¹ respectivamente para el DES₁. Por otro lado, se observa una banda alrededor de 3460 y una en 3350 cm⁻¹ en el DES₂. Los desplazamientos de las bandas son producto de la reducción de los enlaces de hidrógeno intermoleculares en la

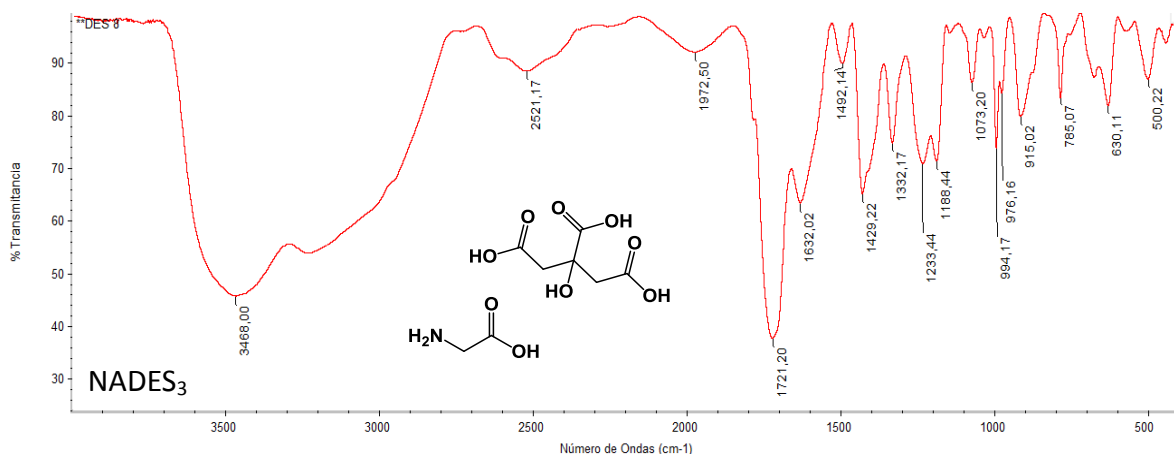
urea, lo que a su vez permite la formación de nuevos enlaces de hidrógeno o posibles interacciones y conlleva a la creación del sistema $\text{ZnCl}_2/\text{Urea}$ y $\text{MgCl}_2/\text{Urea}$ (Zhang *et al.*, 2018). También, en el espectro FT-IR del DES_1 con la aparición de la señal a 2223.03 cm^{-1} se confirma la generación de una interacción tipo enlace de hidrógeno, posiblemente por la fuerte interacción que se crea debido a un equilibrio entre el zinc y los hidrógenos de la urea, generándose como intermediario la especie NH^+ (Figura 6, Anexo 3).

Figura 6. Espectros electromagnéticos FT-IR del DES_1 y DES_2 .



Igualmente, al comparar el espectro FT-IR del NADES_3 con los espectros FT-IR de los reactivos que lo conforman se logra apreciar un cambio en las señales correspondientes a los grupos carboxilo en la zona entre 2500 y 3500 cm^{-1} de ambos compuestos, pasando a presentar una única banda ancha y con sólo un sobresalto entre 3000 y 3500 cm^{-1} esto es indicativo de la interacción entre el HBA y el HBD con la generación de enlaces tipo puente de hidrógeno y de esta manera se limitan los alargamientos de los enlaces C-O y N-H del ácido cítrico y la glicina, esto también se puede observar en la disminución de la intensidad de las señales en la zona entre 2000 y 500 cm^{-1} (Figura 7, Anexo 3).

Figura 7. Espectro electromagnético FT-IR del NADES₃.



Por objetivos del trabajo al DES₁ adicionalmente se le realizó la caracterización mediante RMN protónica y de carbono 13 (¹H-RMN, ¹³C-RMN), donde al comparar la señales de los espectros obtenidos con los reportados para la urea en DMSO-d₆, se logra apreciar como en el ¹H-RMN y en el ¹³C-RMN hay corrimiento de la única banda, esta señal es porque la urea tiene 4 hidrógenos, que están en los grupos amino (2 hidrógenos por cada nitrógeno) y solo tiene un carbono, el desplazamiento de esta señal se da hacia campo bajo, en el ¹H-RMN pasa la banda de 5,41 a 5,72 ppm y en ¹³C-RMN pasa de 159,49 a 161,06 ppm esto producto de la interacción de la urea con el ZnCl₂ y la generación de enlaces tipo puente de hidrógeno (Figuras 8 y 9, Anexo 4)(Zhang et al., 2018).

Figura 8. Espectro ¹H-RMN del DES₁.

Frequency (MHz)	400.02	Nucleus	1H	Number of Transients	32
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zg30
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	6393.86	Temperature (degree C)	27.000

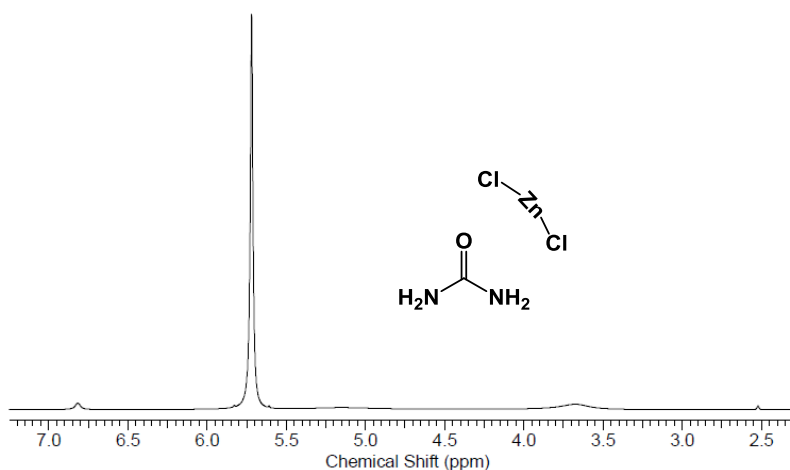
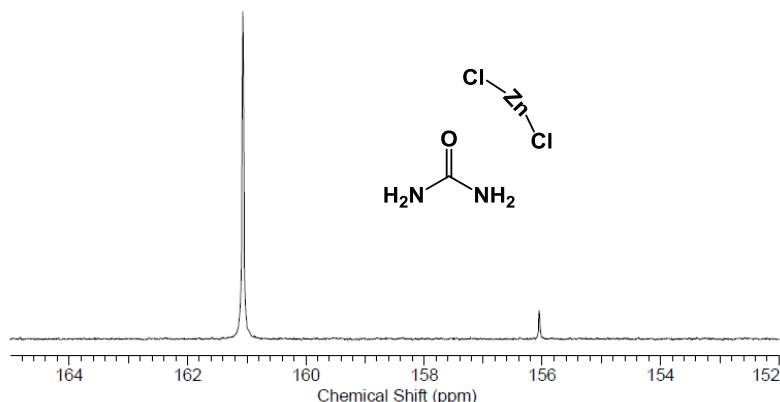


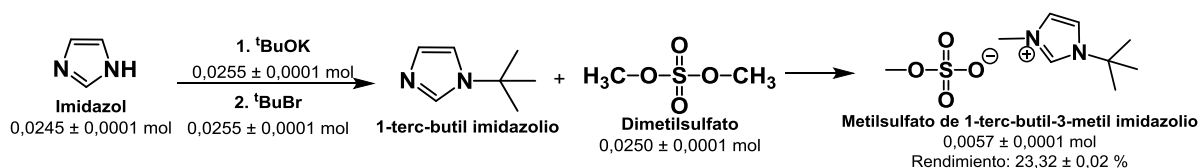
Figura 9. Espectro ^{13}C -RMN del DES₁.

Frequency (MHz)	100.59	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	4096
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	24038.46	Temperature (degree C)	27.000



6.2 SÍNTESIS DE LÍQUIDOS IÓNICOS (IL)

Para la síntesis de IL, se logró apreciar que en cada etapa es indispensable el empleo de atmósfera inerte, ya que algunos reactivos como el dimetilsulfato son muy reactivos y se descomponen en presencia de agua u oxígeno, por lo cual se estableció un adaptador para colocar un globo con N_2 . Por otra parte, en la síntesis del IL₁ se identificó que aunque la literatura reporta que en la primera alquilación la velocidad depende del halogenuro utilizado, siendo bajo condiciones más suaves si este es clorado, sin embargo al emplear un halogenuro bromado terciario, se favorece la formación por la estabilidad del carbocatión que se genera, además la reacción no fue tan lenta como se esperaba, aun así el rendimiento fue de $23,32 \pm 0,02\%$ (Esquema 6). Para el IL₂ no fue posible establecer un rendimiento debido a sus características físicas, como viscosidad muy elevada y textura de gel (Wasserscheid, 2008).

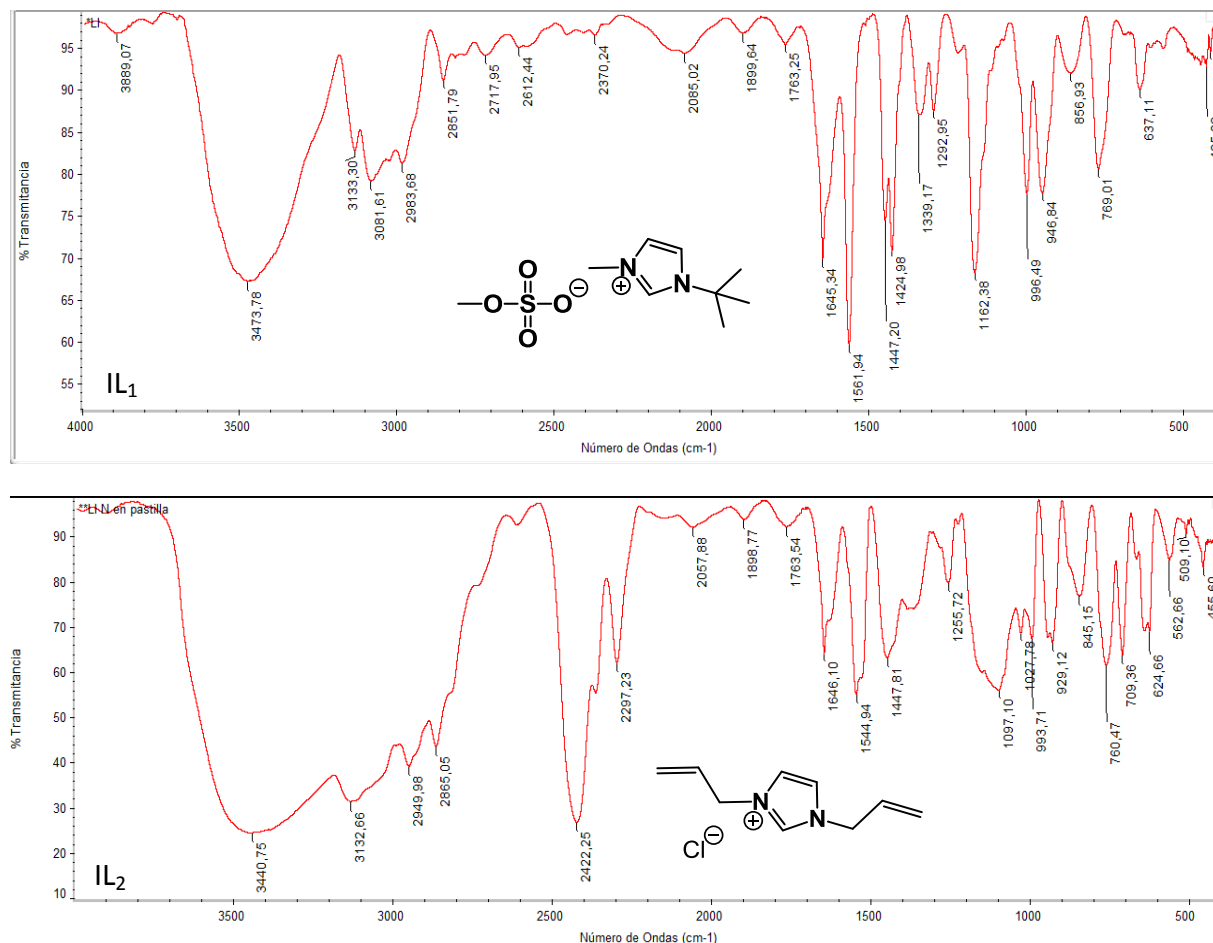


Esquema 6. Estequiometría en la síntesis del IL₁ y rendimiento.

Los dos IL obtenidos se caracterizaron por espectroscopia FT-IR donde se logró apreciar la presencia de una banda ancha a $3473,78$ y $3440,75 \text{ cm}^{-1}$ para los IL₁ y IL₂ respectivamente, esto se puede deber a la presencia del protón carbeno en forma de N^+ , además se encuentran las bandas correspondientes al estiramiento de los C-H aromáticos en $3133,30$, $3081,61$, $2983,68 \text{ cm}^{-1}$ para IL₁ y a $3132,66$, $2949,98$, $2865,05 \text{ cm}^{-1}$ para IL₂ y las bandas entre 1420 y 1647 cm^{-1} de las vibraciones C-C y C-N en el anillo de imidazol en los

dos IL; como también las banda en el espectro del IL₁ a 2851.79 y 2717.95 cm⁻¹ característica de estiramiento de carbonos alifáticos, mientras que para el IL₂ se observa una banda a 2297.23 y 2422.25 cm⁻¹ que se pueden deber a la tensión C=C-C del alilo (Figura 10, Anexo 5) (Nessim *et al.*, 2018).

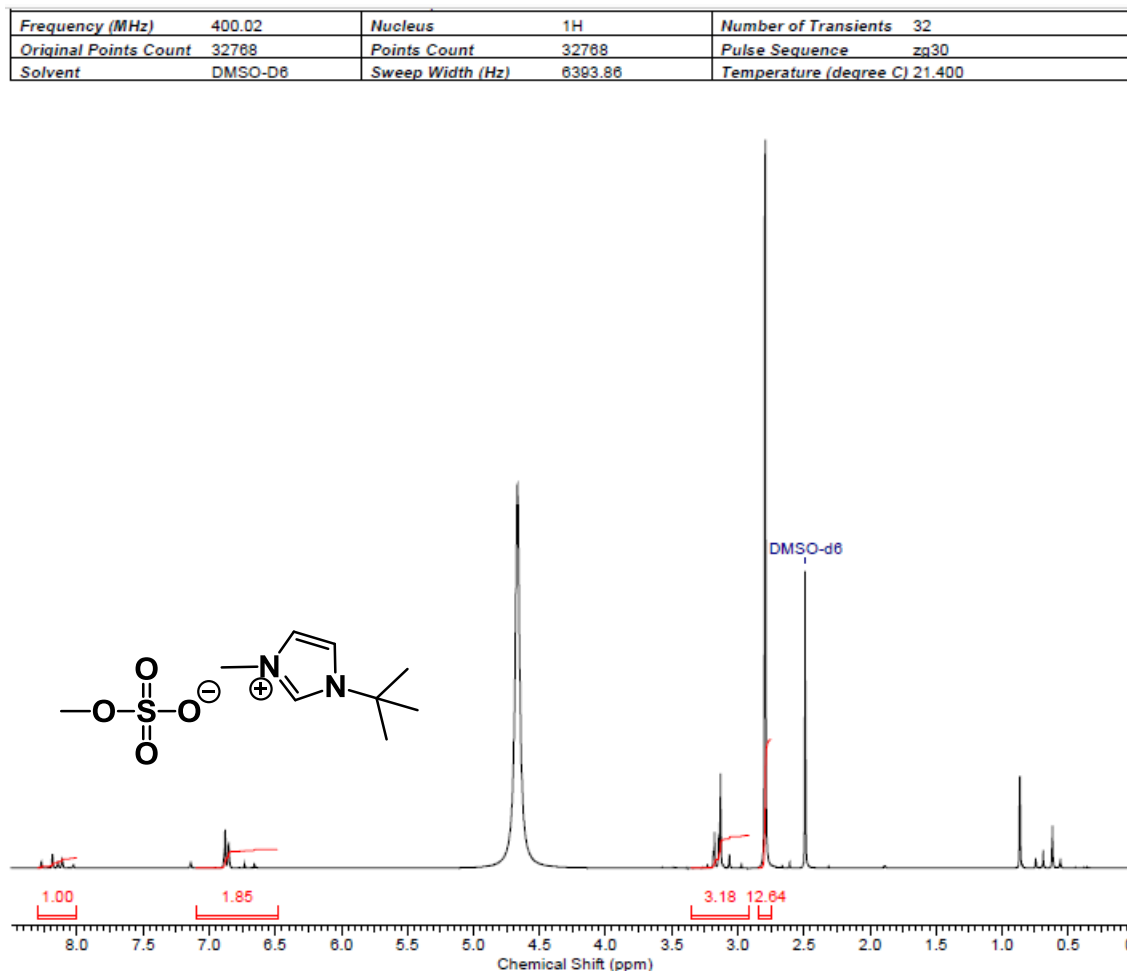
Figura 10. Espectros electromagnéticos IR de los IL.



En el ¹H-RMN del IL₁ se pueden confirmar los enlaces y la formación del IL esperado, ya que entre 8,27 y 8,03 ppm se observa la señal relacionada con el protón del carbono que se encuentra en medio de los dos nitrógenos que vienen de la raíz del imidazol, por lo cual tiene una integración de 1, la multiplicidad de la señal para este protón se debe a que está afectado por la distribución espacial de los grupos metilo que se encuentran en posición α y β a los nitrógenos del anillo. Los protones aromáticos se pueden observar en 6,88 y 6,85 ppm con multiplicidad de espín doblete e integran 1,85 por los dos protones. En 2,79 ppm se encuentra la señal característica de los hidrógenos del grupo metilo unido al nitrógeno protonado y los hidrógenos de los metilos del terc-butil, señales que se encuentran solapadas y por lo cual la integración da 12,64. Finalmente a 3,13 ppm se encuentra la señal de los protones del metilo del sulfato, con una integración de 3,18. (Nessim *et al.*,

2018), las demás señales corresponden al solvente en el cual se midieron los espectros que fue el DMSO-d6 (en 2,49 ppm) y al agua (entre 5,00 y 4,50 ppm) (Figura 11, Anexo 6).

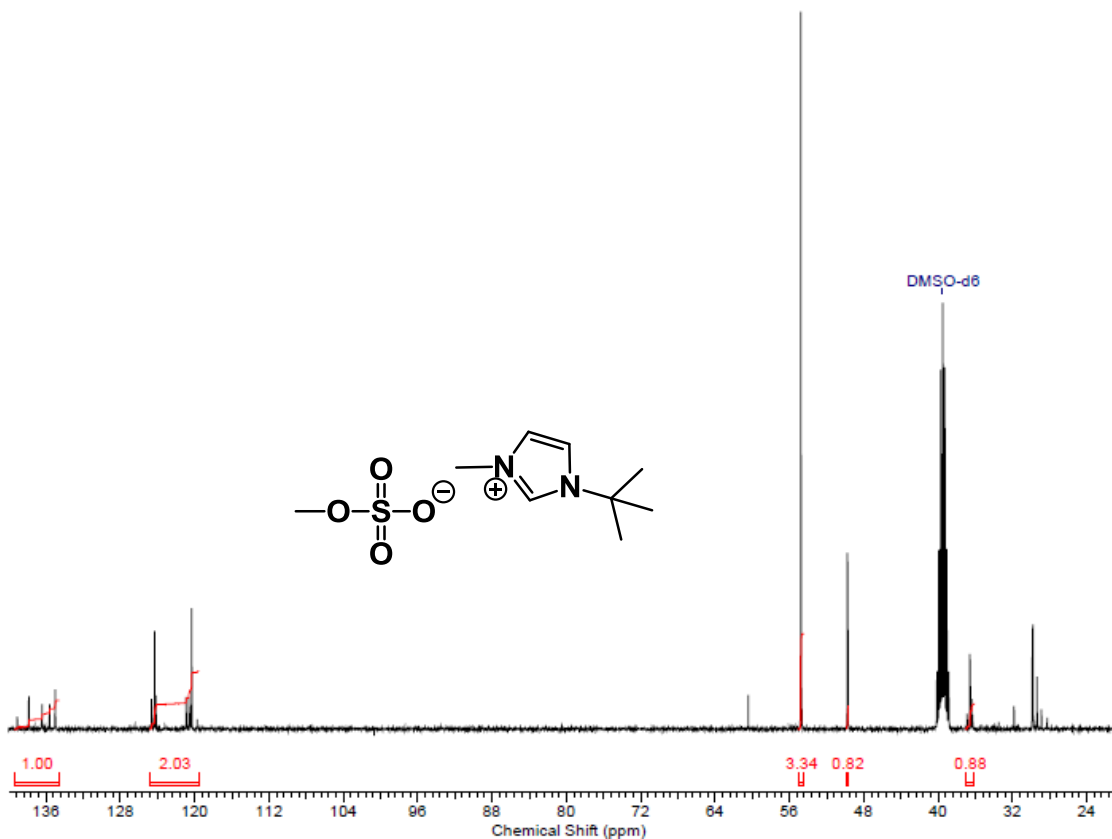
Figura 11. Espectros ^1H -RMN del IL₁.



Además en el ^{13}C -RMN, de igual manera se puede observar la señal correspondiente al carbono que se encuentra entre los nitrógenos a 136 ppm. En 123 y 119 ppm están las señales de los carbonos aromáticos. En 49 ppm estaría la señal del metilo del contra ion metilsulfato. La señal del metilo unido al nitrógeno se encuentra en 35,89 ppm y finalmente la señal del carbono cuaternario y de los metilos del terc-butil se encuentran en 54,08 ppm, como una señal solapada. Las demás señales al igual que en el ^1H -RMN corresponden a impurezas y a la señal del solvente (en 39 ppm) (Figura 12, Anexo 7).

Figura 12. Espectro ^{13}C -RMN del IL₁.

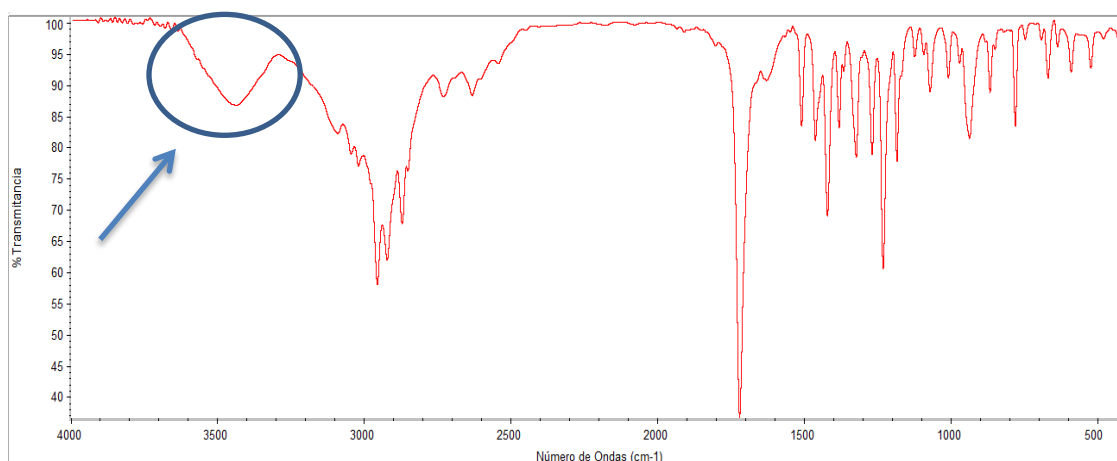
Frequency (MHz)	100.59	Nucleus	^{13}C	Number of Transients	4096
Original Points Count	32768	Points Count	32768	Pulse Sequence	zgpg30
Solvent	DMSO-D6	Sweep Width (Hz)	24038.46	Temperature (degree C)	22.800



6.3 RENDIMIENTO EN LA PURIFICACIÓN DE IBUPROFENO

Al realizar la metodología ya expuesta y partiendo de que el contenido de IBU reportado para las pastillas por parte de Coaspharma es de 800 mg por tableta, se tiene que luego del proceso de purificación se recuperó el $84,8 \pm 0,1\%$, el crudo de IBU recuperado se midió por espectroscopia FT-IR en pastilla de KBr y se comparó con espectros reportados en la literatura y bases de datos se aprecia que aun después de la purificación el crudo de IBU contiene excipientes (señal marcada en el espectro FT-IR del IBU tomado)(Figura 13, Anexo 8).

Figura 13. Espectro FT-IR del Ibu purificado.



6.4 CURVAS DE CALIBRACIÓN Y PARÁMETROS EN μ CLAR-DAD PARA LA DETERMINACIÓN DE IBU, AAS Y AS

En la elaboración de las curvas de calibración en UV para el AAS, el AS y el IBU se preparó una solución estándar de $1000 \pm 0,1$ mg/L de cada analito en etanol al 98%, y a partir de esta se elaboró la curva o los puntos que se tomaron como muestra en agua; de igual forma se establece mediante la medición del blanco que la cantidad de etanol que tendría cada solución no afecta en la medición (Akay *et al.*, 2021; Kamal *et al.*, 2020).

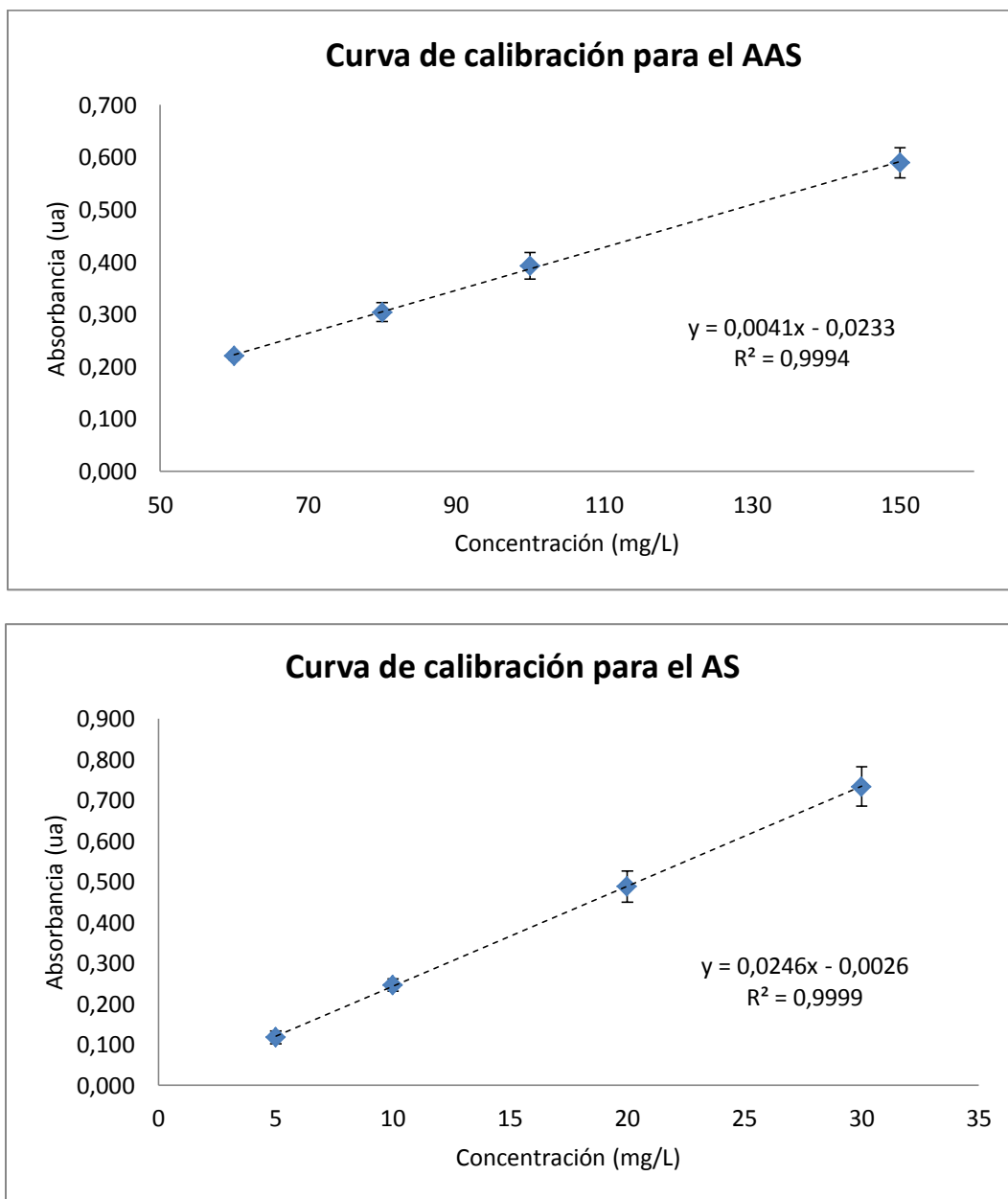
6.4.1 Curva de calibración en espectrofotómetro UV-Vis

Para la medición en el espectrofotómetro UV-Vis GENESIS 6 primero se estableció la longitud de onda de máxima absorbancia para el AAS y el AS que fueron 235 y 277 nm respectivamente. Luego, de acuerdo con la respuesta de las soluciones se estableció el rango de concentraciones dando como resultado las curvas presentadas en la figura 14, cada curva se realizó por triplicado (Anexo 9).

Sin embargo, debido a los altos LD y LC que se encontraron en el espectrofotómetro UV-Vis las curvas no se usaron para cuantificar directamente, sino para establecer reproducibilidad de los valores de absorbancia de las soluciones que se utilizaron posteriormente en algunos de los DoE que se desarrollaron.

Por lo anterior las curvas en el espectrofotómetro UV-Vis solo tienen 4 puntos cada una.

Figura 14. Curvas de calibración para el AAS y el AS.



Con las ecuaciones de las curvas de calibración y aplicando las ecuaciones 1 y 2 se establecieron los LD y LC para cada analito (Tabla 7). Además, de acuerdo con los coeficientes de correlación (R^2) se estableció que hay un comportamiento lineal entre $60,0 \pm 0,1$ a $150,0 \pm 0,1$ mg/L y de $5,0 \pm 0,1$ a $30,0 \pm 0,1$ mg/L para el AAS y el AS respectivamente, con R^2 mayor a 0,9994.

Tabla 7. Datos de las ecuaciones de cada curva por espectrofotometría UV, LD y LC para el AAS y AS.

	Datos AAS		Datos AS	
	Pendiente	Intercepto	Pendiente	Intercepto
Valor curva 1	0,0043	-0,0569	0,0231	-0,0097
Valor curva 2	0,0043	-0,0321	0,0261	-0,0006
Valor curva 3	0,0037	-0,0191	0,0246	0,0024
Desviación Estándar	0,0003	0,0192	0,0015	0,006
	LD (mg/L)	14,05	LD (mg/L)	0,77
	LC (mg/L)	46,84	LC (mg/L)	2,56

La repetibilidad o precisión se determinó midiendo el porcentaje de desviación estándar relativa para tres concentraciones dentro del rango lineal para cada analito, preparado por triplicado preparando cada solución en tres días diferentes. El porcentaje de desviación estándar relativa para cada una de las muestras fue menor a 5% lo que indica una buena precisión del método propuesto, además por medio de la prueba de Tukey se estableció que no hay diferencia significativa entre las respuestas (Tabla 8, Anexo 10).

Tabla 8. Absorbancias entre días para establecer la precisión en el espectrofotómetro UV-Vis en el equipo GENESIS 6 del AAS y el AS.

Concentración (mg/L)	AAS			% desviación estándar relativa
	Absorbancia			
	Día 1	Día 2	Día 3	
70	0,247	0,269	0,256	3,509
110	0,420	0,441	0,431	1,991

Concentración (mg/L)	AS			% desviación estándar relativa
	Absorbancia			
	Día 1	Día 2	Día 3	
15	0,337	0,371	0,346	4,094
25	0,568	0,617	0,584	3,460

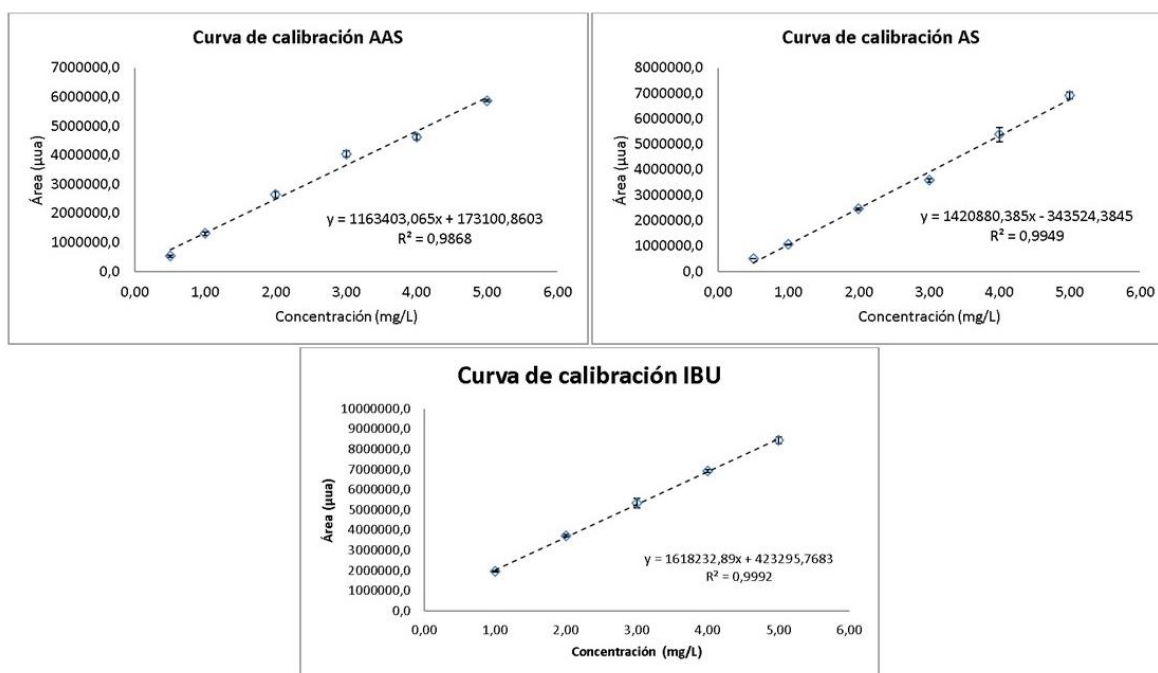
6.4.2 Curva de calibración y parámetros en μ CLAR-DAD

Primero se establecieron las mejores condiciones para separar e identificar los tres analitos mediante el mismo método en μ CLAR-DAD, para esto se pasaron muestras con diferentes fases móviles variando entre 30-70% agua al 0,1% de ácido fórmico y como solvente complementario metanol o ACN a un flujo de 0,1 mL/min, con una columna

Kinetex 1.7 μm C8 (Phenomenex®) y la temperatura tanto del automuestreador como la de la columna a 20°C. Siendo la fase móvil con mejor respuesta para los 3 analitos una fase móvil de agua al 0,1% de ácido fórmico con ACN en un gradiente que inició con 40% ACN y se mantuvo por 2 min, luego subió al 70% ACN y regresó a 40% ACN esto con una variación del 6% ACN/min y para finalizar se quedó 2 min más al 40% ACN, para tener así corridas de 14 min para cada analito (Anexo 11).

Una vez establecidos los parámetros óptimos para medir los analitos, se estableció por medio del DAD si la longitud de onda de mejor respuesta es igual que en el UV, encontrando que hay variaciones, por lo cual las curvas en el $\mu\text{CLAR-DAD}$ se realizaron con la absorbancia de los analitos a 277 nm para el AS y a 198 nm para AAS e IBU, encontrando que los tiempos de retención son de 3.97, 4.71 y 11.77 min para el AAS, AS e IBU respectivamente. Con las soluciones utilizadas para encontrar las mejores condiciones para medir los tres analitos se establecieron los rangos de concentración que se usaron para realizar cada una de las curvas en $\mu\text{CLAR-DAD}$ y la respuesta que se tuvo en cuenta fue el área de pico (la curva para cada analito se realiza por separado y triplicado), obteniendo así como resultado las curvas presentadas en la figura 13 (Anexos 12-14). La curva de calibración del IBU solo tiene 5 puntos, porque se retiró el punto de 0,50 mg/L, debido a que el LC para este analito es de 0,63 mg/L (Tabla 9)

Figura 15. Curvas de calibración en $\mu\text{CLAR-DAD}$ para AAS, AS e IBU.



De igual forma que para las curvas realizadas mediante espectrofotometría UV-Vis, con las ecuaciones de las curvas de calibración construidas mediante $\mu\text{CLAR-DAD}$ y aplicando las

ecuaciones 1 y 2 se establecieron los LD y LC para cada analito (Tabla 9), y de acuerdo con los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos en estas curvas, se obtuvo un comportamiento lineal entre $0,50 \pm 0,01$ a $5,00 \pm 0,01$ mg/L para AAS y AS, mientras que para IBU la linealidad se obtuvo entre $1,00 \pm 0,01$ a $5,00 \pm 0,01$ mg/L, con R^2 de 0.9868, 0.9949 y 0.9992 respectivamente. Por lo anterior, se puede establecer que la técnica cromatográfica utilizada es más sensible a los analitos AAS y AS, además que el valor más bajo correspondiente al coeficiente de regresión sea para el AAS, se puede deber a que este analito se degrada en medio acuoso.

Tabla 9. Datos de las ecuaciones de cada curva, LD y LC obtenidos a partir del comportamiento observado mediante μ CLAR-DAD para AAS, AS e IBU.

	Datos AAS		Datos AS		Datos IBU	
	Pendiente	Intercepto	Pendiente	Intercepto	Pendiente	Intercepto
Valor curva 1	1161370,384	186179,342	1459241,890	-378007,3836	1673471,666	226733,030
Valor curva 2	1178891,792	144845,871	1386550,066	-314638,1699	1707561,578	143010,923
Valor curva 3	1149947,019	188277,367	1416849,200	-337927,6000	1619629,775	345697,414
Desviación Estándar	14579,054	24492,014	36513,192	32053,195	44334,098	101852,613
	LD (mg/L)	0,06	LD (mg/L)	0,07	LD (mg/L)	0,19
	LC (mg/L)	0,21	LC (mg/L)	0,23	LC (mg/L)	0,63

La precisión se estableció de igual manera que la empleada para espectrofotometría UV-Vis y el porcentaje de desviación estándar relativa de las diferentes muestras fue menor al 3% lo que además de indicar una buena precisión del método propuesto, indica que mediante esta metodología se es más preciso en la medición que por el espectrofotometría UV-Vis, igualmente por medio de la prueba de Tukey se estableció que no hay diferencia significativa entre los valores de áreas obtenidos al medir diferentes días (Tabla 10, Anexo 10).

Tabla 10. Datos para establecer la precisión mediante los valores obtenidos mediante μ CLAR-DAD del AAS, AS e IBU.

Concentración (mg/L)	AAS			% desviación estándar relativa
	Área de pico			
	Día 1	Día 2	Día 3	
2	2456432	2455246	2574509	2,2
3,5	4159810	4108823	4011768	1,5

AS				
Área de pico				
Concentración (mg/L)	Día 1	Día 2	Día 3	% desviación estándar relativa
1,4	1634944	1574014	1673653	2,5
2,4	3075756	3084144	3008209	1,1

IBU				
Área de pico				
Concentración (mg/L)	Día 1	Día 2	Día 3	% desviación estándar relativa
1,8	3182351	3382234	3368826	2,8
4,0	6687040	6805957	6641349	1,0

Finalmente, para la evaluación de la robustez de la metodología propuesta para μ CLAR-DAD, se realizaron mediciones donde se cambió el pH y el disolvente (Etanol y Agua) en la solución donde se encontraban los analitos, cambiando solo un parámetro a la vez para estimar el efecto. Se prepararon muestras de $4,0 \pm 0,1$ mg/L para cada una de las soluciones y de cada analito. Con los resultados obtenidos se estableció que el método propuesto fue robusto porque los resultados no se vieron afectados por los cambios en estos parámetros, la prueba de Tukey también indicó que no hay diferencia significativa entre las medidas tomadas con diferentes solventes y a diferente pH (Tabla 11, Anexo 10).

Tabla 11. Datos para establecer la robustez mediante los valores obtenidos mediante μ CLAR-DAD del AAS, AS e IBU.

Analito	Solvente (Área)		% desviación estándar relativa
	Agua	Etanol 98%	
AAS	4582234	4492351	1,0
AS	5331439	5261573	0,7
IBU	7120063	7003550	0,8

Analito	pH (Área)		% desviación estándar relativa
	5,0	6,0	
AAS	4629810	4721768	1,0
AS	5287040	5425957	1,3
IBU	6878250	7120063	1,7

6.5 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA POR SOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DLLME-DES)

En este trabajo se desea identificar la eficiencia de los DES para extraer CE del agua, para lo cual a cada uno de los DES que se sintetizaron con efectividad se les hace prueba de solubilidad en agua y estabilidad frente a diferentes pH y concentraciones de sal, en

donde el único que no fue soluble en agua fue el DES₁, además es estable a pH entre 3-9 y en concentraciones menores o iguales al 5% de NaCl por un periodo de máximo 10 min, por lo cual se utilizaron condiciones que se encontraban dentro de estas características para realizar las microextracciones.

Una vez establecidas las condiciones se procede al desarrollo del DoE cribado de Plackett-Burman, la respuesta de este DoE se estableció mediante espectrofotometría UV-Vis y se cuantificó la concentración de analito que no fue extraída de la muestra, debido a que los equipos con los cuales se cuenta no es posible realizar la cuantificación y por características iónicas del DES cuantificar esta fase directamente no fue posible. Luego de desarrollado el DoE se obtuvieron los resultados reportados en la tabla 12.

Tabla 12. DoE Plackett-Burman DLLME-DES con resultados.

Analito	pH	Tiempo (min)	Salting out (%p/v)	V DES ₁ (µL)	% Recobro
AAS	6,0	10	5	250	46,9
AAS	9,0	5	5	500	13,6
AS	9,0	10	1	500	15,2
AS	6,0	10	5	250	0,0
AAS	6,0	5	5	500	34,7
AAS	9,0	5	1	500	31,4
AAS	9,0	10	1	250	48,3
AAS	9,0	10	5	250	41,6
AS	9,0	10	5	500	16,2
AAS	6,0	10	5	500	46,0
AS	9,0	5	5	500	18,3
AAS	6,0	10	1	500	38,6
AS	9,0	5	5	250	12,8
AS	6,0	10	1	500	31,9
AS	6,0	5	5	250	8,5
AS	6,0	5	1	500	27,9
AAS	6,0	5	1	250	40,1
AAS	9,0	5	1	250	36,1
AS	9,0	10	1	250	9,2
AS	6,0	5	1	250	23,2

De acuerdo con el análisis del diseño realizado por el software Minitab 18 se obtuvieron los valores correspondientes al análisis de varianza (ANOVA), donde entre los valores p solo el de la variable 'analito' es menor a 0,05 lo que indica que para esta variable, al menos en un nivel, las medidas son significativamente distintas, lo que se corroboró al

mirar el diagrama de Pareto donde solo el valor de la frecuencia encontrada para la variable 'analito' excede la línea de la frecuencia acumulada, según lo reportado por el software para los datos proporcionados. Con lo anterior se estableció que el analito es el factor que presenta una mayor influencia para el DoE desarrollado con un 95% de confianza (Tabla 13, Figura 16). Por lo cual, al haber con esto demostrado estadísticamente que el analito es la variable con mayor influencia, para los diseños posteriores se realizaron DoE sin incluir el analito como factor.

Tabla 13. Análisis de varianza DoE Plackett-Burman DLLME-DES.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	2760,89	552,18	6,07	0,003
Lineal	5	2760,89	552,18	6,07	0,003
Analito	1	2293,65	2293,65	25,20	0,000
pH	1	152,79	152,79	1,68	0,216
Tiempo	1	111,77	111,77	1,23	0,286
Salting out	1	200,09	200,09	2,20	0,160
V (DES)	1	2,58	2,58	0,03	0,869
Error	14	1274,04	91,00		
Total	19	4034,92			

Los GL (Grados de Libertad) son dados por el software que se empleó (Minitab 18), en donde los grados de libertad del modelo son la sumatoria de los grados de libertad que tiene cada variable o si es el caso la interacción entre las mismas. Cada variable a su vez tiene un solo grado de libertad, cuando se presenta en el ANOVA la interacción entre variables, esta interacción tiene igualmente un grado de libertad.

Para desarrollar el siguiente DoE, las mediciones se realizaron por μ CLAR-DAD y debido a la columna empleada, no se pudo realizar mediciones con muestras que contenían sal, por lo cual se realizó un diseño aislado donde se mantienen todas las condiciones constantes exceptuando la concentración de sal, evaluando la cantidad entre 0 y 5%, en donde se encontró que sin la adición de la sal había mejor rendimiento en la microextracción (Tabla 14). Esto debido a que la microextracción se realiza por interacción de cargas, por lo cual al adicionar sal, los iones ocupan los puntos activos en el DES y disminuye la capacidad extractora del DES (Anexo 15).

Figura 16. Diagrama de Pareto DoE de Plackett-Burman DLLME-DES.

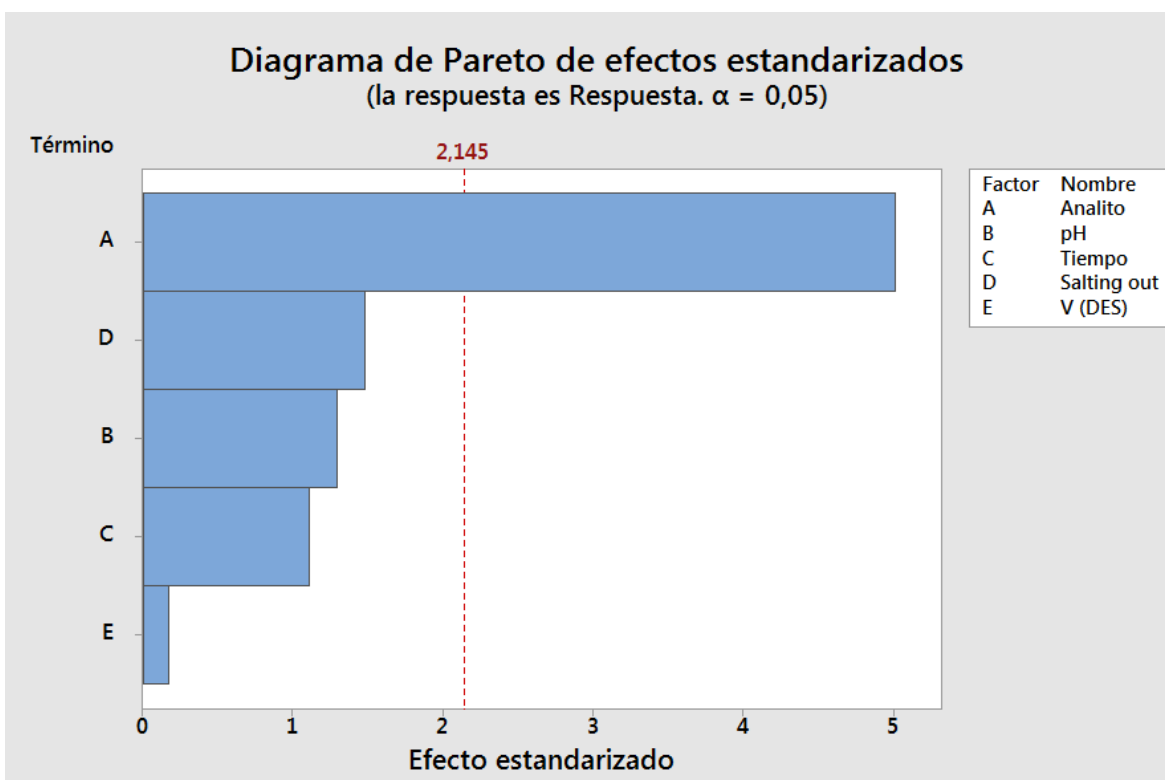


Tabla 14. Determinación del efecto del salting out en DLLME-DES.

Salting out (%)	% Recobro
0	19,02
1	12,08
5	1,53

De acuerdo con lo anterior, se decidió realizar un DoE factorial 2^2 por triplicado para cada analito, teniendo como variables el pH y el tiempo, obteniendo los resultados reportados en la tabla 15.

Con los resultados reportados en la tabla anterior se realizó el análisis estadístico en Minitab 18 para establecer las mejores condiciones para realizar la DLLME-DES, donde se encontró al comparar el ANOVA de cada diseño que para el IBU la variable con un valor $p < 0,05$ fue el tiempo, para el AS fue el pH y para el AAS fue tanto el pH como el tiempo, influencia que se corrobora en el diagrama de Pareto y con la gráfica normal de efectos estandarizados (Tablas 16, 17 y 18, Figuras 17 y 18).

Tabla 15. Recobros obtenidos en el DoE 2² para DLLME-DES.

pH	Tiempo (min)	% Recobro		
		AAS	AS	IBU
4,0	5	18,07	32,50	21,44
6,0	10	27,28	30,67	28,63
4,0	5	21,66	32,61	22,04
6,0	5	20,80	29,81	25,85
6,0	10	28,82	29,24	24,57
4,0	10	22,17	34,33	25,82
6,0	5	22,23	33,98	19,48
6,0	5	23,83	30,48	19,89
4,0	10	23,30	35,37	23,79
4,0	5	17,44	32,05	21,20
4,0	10	23,99	36,22	24,49
6,0	10	30,71	32,14	28,01

Tabla 16. Análisis de varianza DoE Factorial 2² del AAS en la DLLME-DES.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	152,367	50,789	18,00	0,001
Lineal	2	147,479	73,740	26,13	0,000
pH	1	60,861	60,861	21,57	0,002
Tiempo	1	86,618	86,618	30,69	0,001
Interacciones de 2 términos	1	4,888	4,888	1,73	0,225
pH*Tiempo	1	4,888	4,888	1,73	0,225
Error	8	22,576	2,822		
Total	11	174,943			

Tabla 17. Análisis de varianza DoE Factorial 2² del AS en la DLLME-DES.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	37,098	12,366	6,10	0,018
Lineal	2	27,015	13,507	6,66	0,020
pH	1	23,453	23,453	11,56	0,009
Tiempo	1	3,562	3,562	1,76	0,222
Interacciones de 2 términos	1	10,083	10,083	4,97	0,056

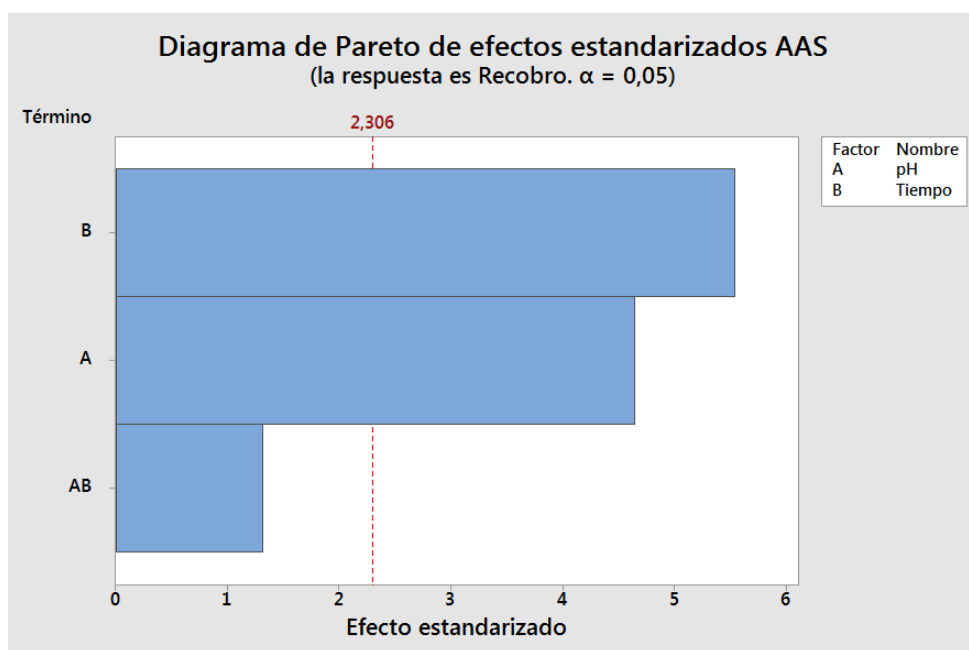
Continuación tabla 17.

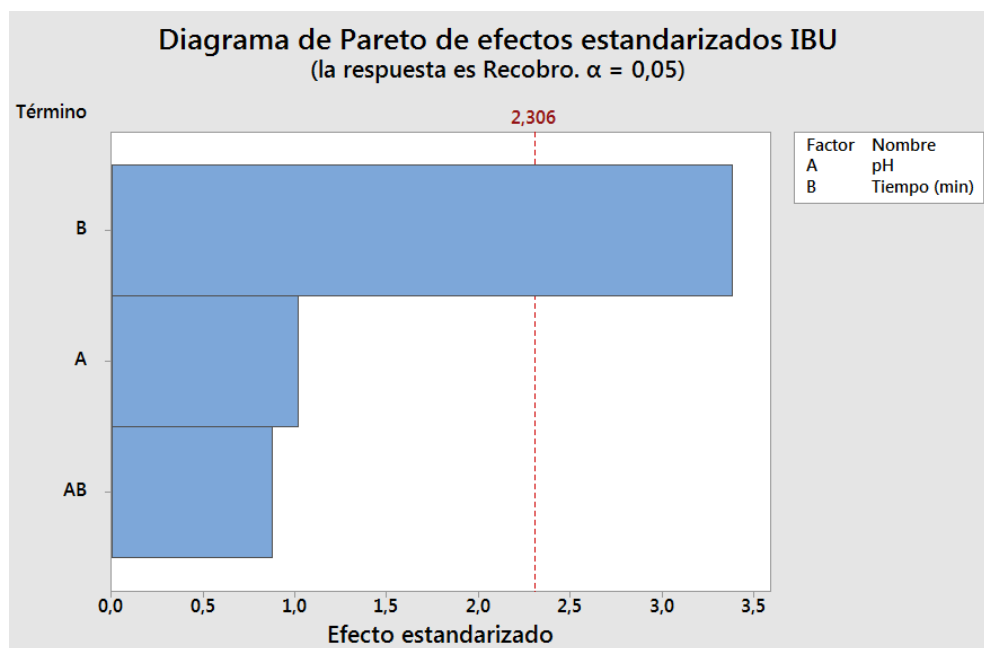
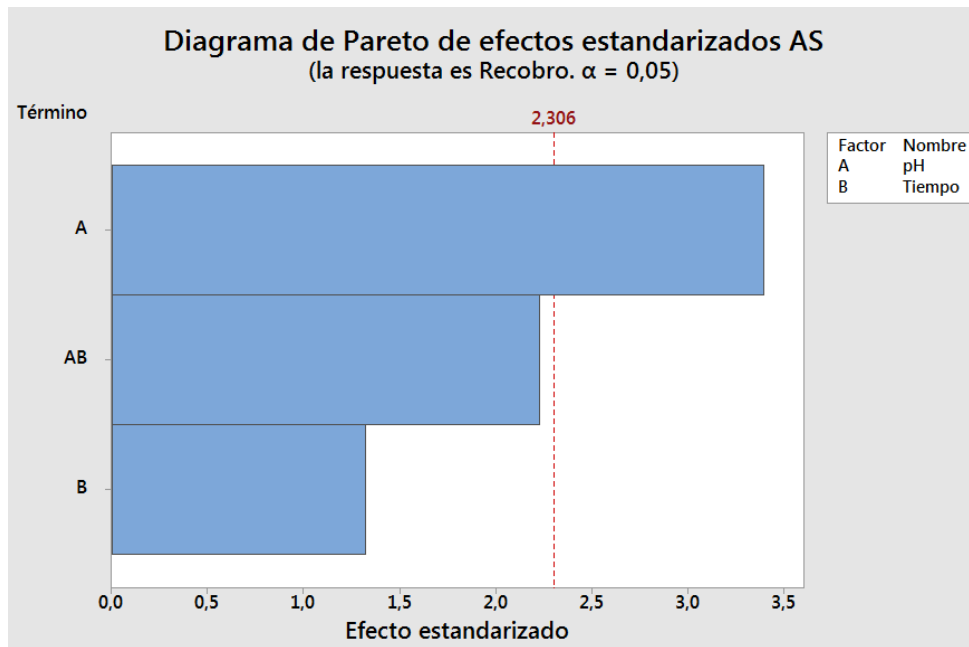
pH*Tiempo	1	10,083	10,083	4,97	0,056
Error	8	16,227	2,028		
Total	11	53,325			

Tabla 18. Análisis de varianza DoE Factorial 2² del IBU en la DLLME-DES.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	3	62,310	20,770	4,43	0,041
Lineal	2	58,714	29,357	6,26	0,023
pH	1	4,876	4,876	1,04	0,338
Tiempo (min)	1	53,839	53,839	11,49	0,010
Interacciones de 2 términos	1	3,596	3,596	0,77	0,407
pH*Tiempo (min)	1	3,596	3,596	0,77	0,407
Error	8	37,488	4,686		
Total	11	99,798			

Figura 17. Diagrama de Pareto para los DoE factoriales 2² de DLLME-DES del AAS, AS e IBU.

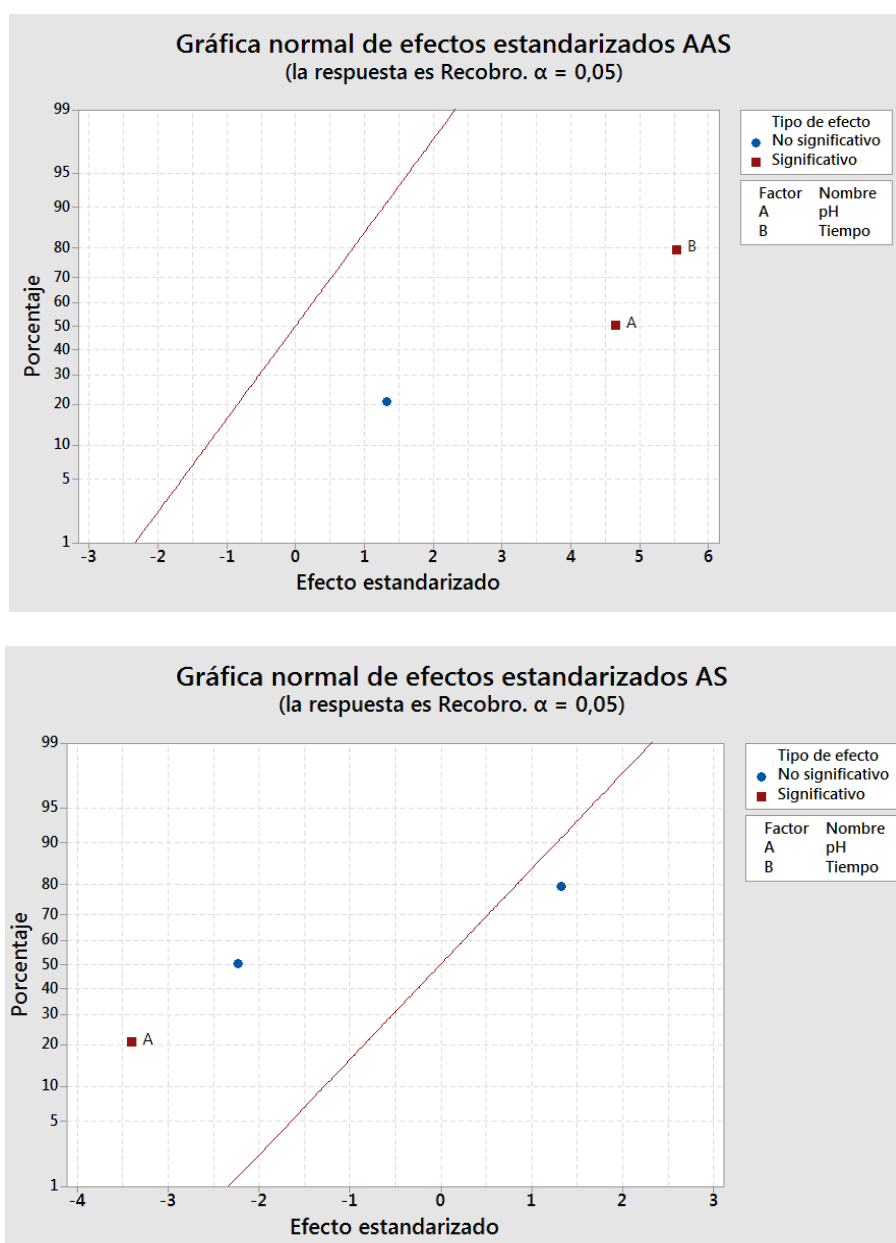


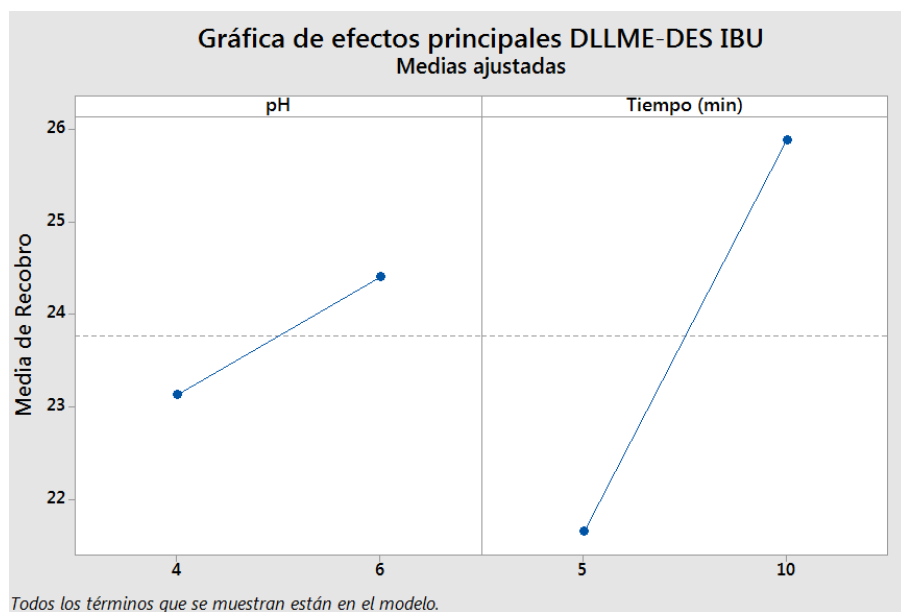
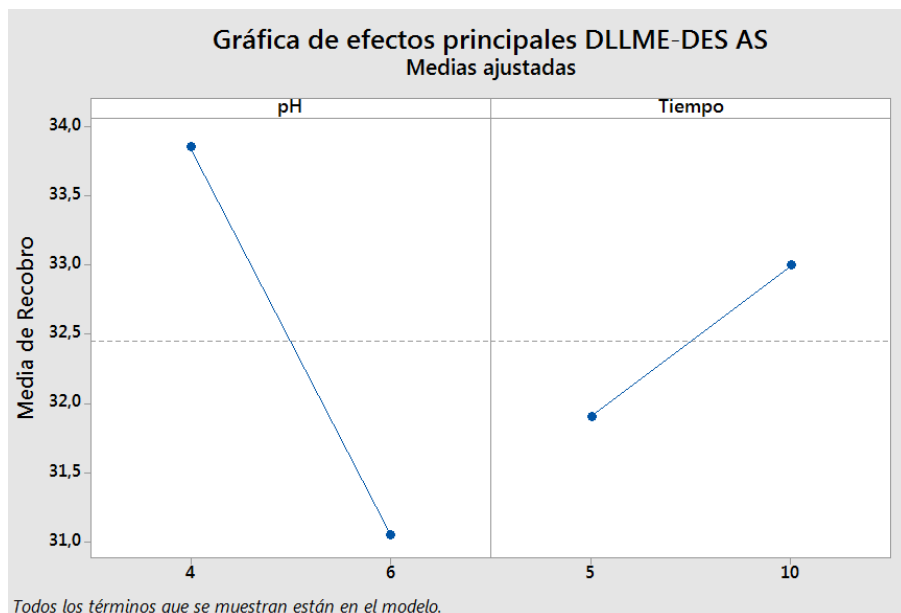


Sin embargo, al observar las gráficas de los efectos principales y de interacción entre las variables se puede observar que las mejores condiciones de microextracción según las variables estudiadas son iguales para el AAS y el IBU (pH de 6,0 y el tiempo de extracción 10 min), lo que no ocurre para el AS (tiempo de extracción 10 min y pH 4,0). Además, por la gráfica de interacción se ve que algunas variables de acuerdo con el analito de estudio son dependientes, sin embargo esta dependencia de las variables dado el punto de cruce no influye significativamente, por lo cual se mantienen como mejores condiciones para la microextracción las ya mencionadas (Figuras 19 y 20).

La variación en la influencia del pH para cada analito, es tema de estudio y se plantean dos posibles mecanismos de extracción de acuerdo con la literatura, una es mediante interacciones pi, que puede ser la forma por la cual se ve favorecida la extracción del AS, porque para este analito se ve favorecida la extracción a un pH muy cercano a su pKa (pKa AS 3,0) y el otro mecanismo que se plantea es mediante interacciones iónicas, por lo cual la microextracción del AAS y el IBU se estaría dando de esta forma, ya que a pH 6,0 por sus pKa (pKa AAS 3,5 y pKa IBU 4,45) hay una mayor probabilidad de que los analitos se encuentren en el medio en su estado desprotonado (Tabla 19)(Xing et al., 2022).

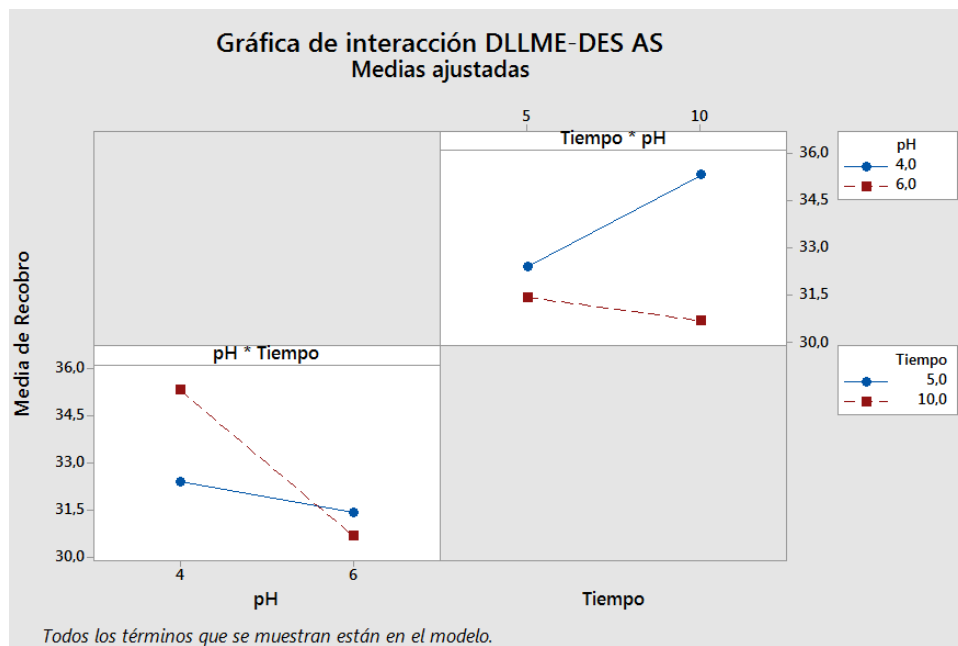
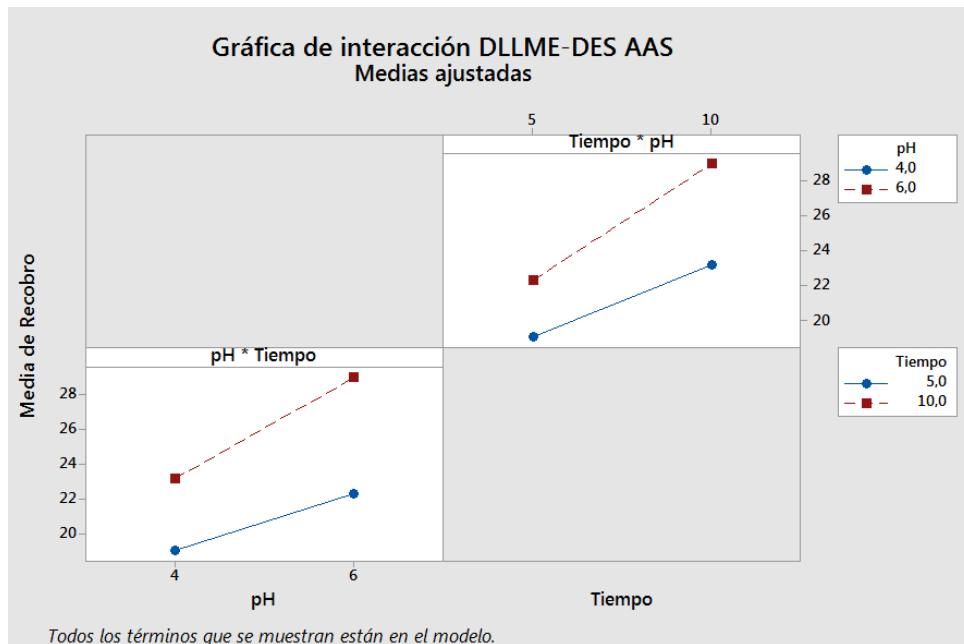
Figura 18. Gráfica normal de efectos estandarizados para los DoE factoriales 2² de DLLME-DES del AAS, AS e IBU.

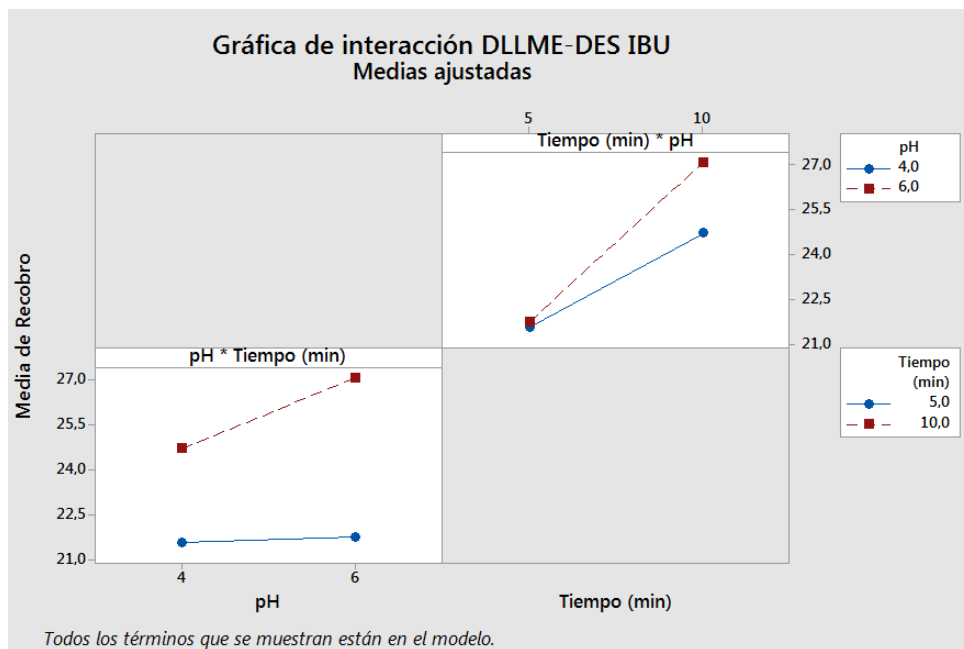




Adicional a lo anterior, se identificó que al utilizar el DES₁ en esta metodología de microextracción, en la etapa final, luego de centrifugar el DES se solidifica con el analito que se haya extraído, facilitando de esta manera la remoción y separación de las fases, cuando esto ocurre se ha denominado microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por solventes eutécticos profundos usando la solidificación del eutéctico.

Figura 20. Grafica de la interacción entre variables en el DoE 2² de DLLME-DES para el AAS, AS e IBU.





6.6 DISEÑO EXPERIMENTAL PARA LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO-LÍQUIDO CON LÍQUIDOS IÓNICOS (LLME-IL)

Para definir si los IL sintetizados se pueden utilizar en la LLLME-IL, se evalúa si debido a su viscosidad la capilaridad de estos se ve afectada y no es posible tomarlos con una jeringa cromatográfica, donde se encontró que el IL₂ no se puede debido a su alta viscosidad, por lo cual se decide trabajar solo con el IL₁ en esta metodología de microextracción, seguidamente se establece la estabilidad de la gota respecto a la concentración de IL en agua, encontrando que la gota es estable para una concentración de IL igual o menor al $5,0 \pm 0,1\%$. De igual manera, se estableció el tiempo y la agitación máxima con barra magnética que resiste la gota suspendida, posteriormente se estableció, de acuerdo con los máximos valores de resistencia de la gota, los niveles para cada factor que se evaluaron.

Además, al igual que para el diseño DLLME-DES, se cuantificó la cantidad de analito que no fue extraído de la fase acuosa con muestra, ya que si se inyecta una solución con el IL por la columna del μ CLAR-DAD con la que se contaba se hubiera desangrado. Para establecer si el analito pasa a través de las fases hasta la gota, se tomaron $500 \pm 1 \mu\text{L}$ de la fase apolar después de las microextracciones. A continuación, se evaporó el solvente (60°C máxima temperatura de secado) y se reconstituyó el volumen con etanol absoluto (98% de pureza) (Anexo 16).

Finalmente, se estableció el DoE cribado de Plackett-Burman con 24 experimentos reportado en la tabla 20 para establecer las variables con influencia significativa para esta metodología, usando como muestra IBU a una concentración de $2,0 \pm 0,1 \text{ mg/L}$.

Tabla 20. DoE Plackett-Burman LLLME-IL con resultados.

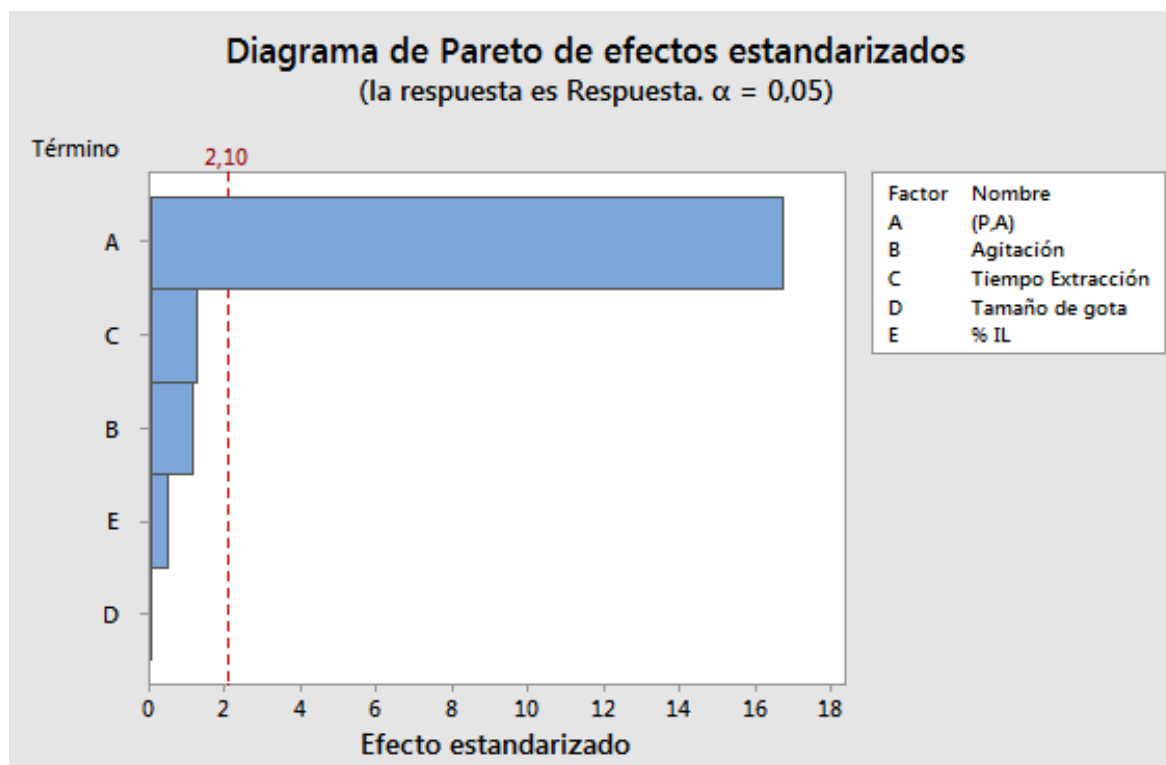
Relación en volumen entre la muestra y la fase apolar (P,A)	Agitación	Tiempo Extracción	Tamaño de gota	% IL	Respuesta (μg extraídos)
3,3	2	8	6	1	3,39
4,2	2	8	3	1	5,71
3,3	2	4	3	5	4,39
3,3	5	8	6	5	4,29
3,3	5	4	3	5	4,38
4,2	5	8	6	1	6,02
4,2	5	4	3	1	6,05
3,3	5	8	3	5	4,39
4,2	5	8	6	5	5,96
3,3	5	4	6	1	4,20
3,3	2	8	3	5	4,28
4,2	2	8	6	5	5,86
3,3	2	4	3	1	4,21
4,2	5	4	6	1	6,15
3,3	2	8	6	1	4,62
4,2	2	4	3	1	5,84
4,2	2	8	3	5	5,74
3,3	5	8	3	1	4,28
3,3	5	4	6	5	4,20
4,2	2	4	6	5	5,82
4,2	5	8	3	1	5,78
4,2	2	4	6	5	6,02
4,2	5	4	3	5	5,99
3,3	2	4	6	1	4,51

Con los resultados obtenidos (Tabla 20) y la ayuda de Minitab 18, se obtiene el ANOVA del diseño por medio del cual se identificó que solo para la variable 'P,A' tiene un valor p menor a 0,05; por lo cual se establece que para esta variable al menos en un nivel las medidas son significativamente distintas (Tabla 21). Además, esta influencia se confirmó con el diagrama de Pareto resultante (Figura 21) y permitió definir con un 95% de confianza a esta variable como la de mayor influencia en el proceso.

Tabla 21. Análisis de varianza DoE Plackett-Burman LLLME-IL.

Fuente	GL	SC Sec.	Contribución	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	5	16,5019	93,99%	16,5019	3,3004	56,30	0,000
Lineal	5	16,5019	93,99%	16,5019	3,3004	56,30	0,000
(P,A)	1	16,3317	93,02%	16,3317	16,3317	278,62	0,000
Agitación	1	0,0711	0,40%	0,0711	0,0711	1,21	0,285
Tiempo Extracción	1	0,0865	0,49%	0,0865	0,0865	1,48	0,240
Tamaño de gota	1	0,0000	0,00%	0,0000	0,0000	0,00	0,996
% IL	1	0,0127	0,07%	0,0127	0,0127	0,22	0,648
Error	18	1,0551	6,01%	1,0551	0,0586		
Falta de ajuste	16	0,2760	1,57%	0,2760	0,0173	0,04	1,000
Error puro	2	0,7791	4,44%	0,7791	0,3895		
Total	23	17,5570	100,00%				

Figura 21. Diagrama de Pareto DoE de Plackett-Burman LLLME-IL.



Así, de acuerdo con los resultados del DoE cribado de Plackett-Burman para la LLLME-IL, se decide realizar un DoE factorial 2^2 con puntos centrales por triplicado, siendo los

factores a evaluar en este DoE la relación entre la fase acuosa con muestra y la fase apolar, además de incluir al ‘tiempo’, por ser el segundo factor con mayor influencia. El DoE y los resultados obtenidos se reportan en la tabla 22.

Tabla 22. Recobros obtenidos en el DoE 2² con puntos centrales para LLLME-IL.

Relación en volumen entre la muestra y la fase apolar (P,A)	Tiempo (min)	Respuesta %
3,75	6	96,09
4,2	8	95,32
3,3	8	99,79
3,75	6	89,12
3,75	6	94,39
4,2	4	88,52
3,3	4	91,66
4,2	8	95,52
4,2	4	85,21
3,3	8	99,79
3,3	4	99,57
4,2	8	95,54
3,3	4	91,66
3,3	8	99,79
4,2	4	78,95

En el análisis estadístico realizado en Minitab 18, para los resultados obtenidos en el DoE factorial 2² con puntos centrales, se identificó que las variables ‘P,A’ y ‘tiempo’ tienen un efecto significativo en la LLLME-IL, dados los resultados del ANOVA, donde los valores p de estas variables son menores a 0,05, esto se confirmó con el diagrama de Pareto y la gráfica normal de efectos estandarizados (Tabla 23, Figura 22).

Tabla 23. Análisis de varianza DoE Factorial 2² con puntos centrales de la DLLME-IL.

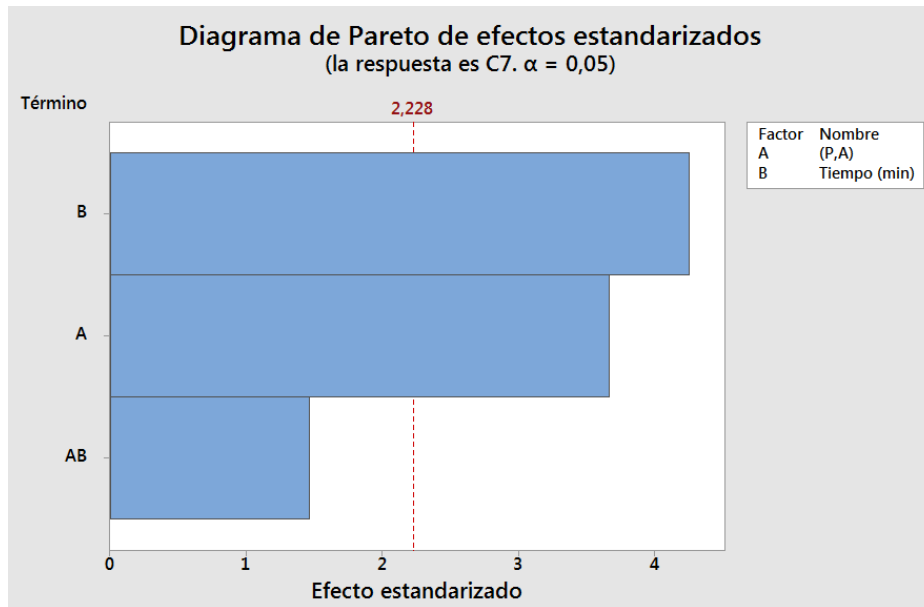
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	4	389,935	97,484	8,44	0,003
Lineal	2	365,089	182,545	15,81	0,001
(P,A)	1	155,373	155,373	13,46	0,004
Tiempo (min)	1	209,716	209,716	18,16	0,002
Interacciones de 2 términos	1	24,707	24,707	2,14	0,174

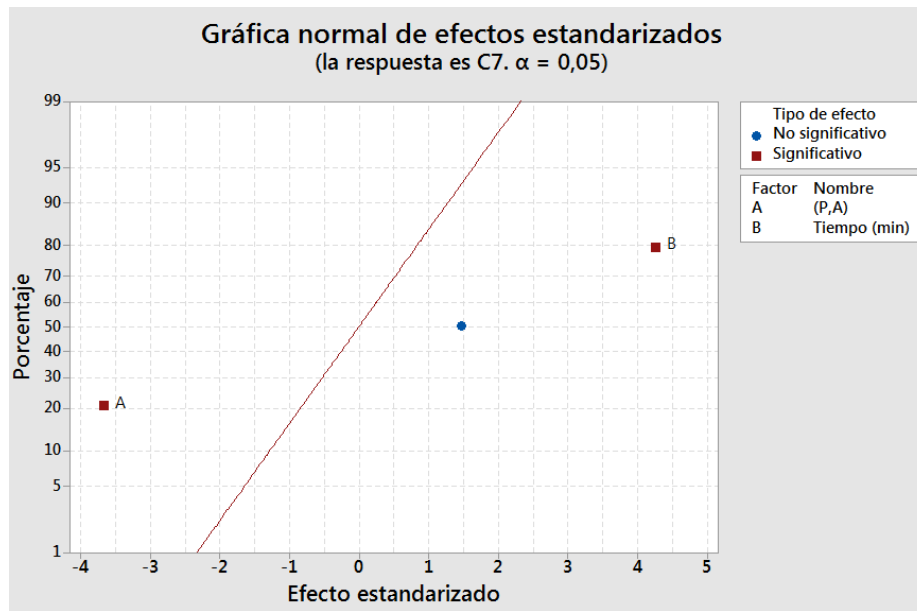
Continuación tabla 23.

(P,A)*Tiempo (min)	1	24,707	24,707	2,14	0,174
Curvatura	1	0,140	0,140	0,01	0,915
Error	10	115,468	11,547		
Total	14	505,404			

Además, mediante la gráfica normal se identificó que el tiempo es estandarizado positivo, lo que indica que al pasar del valor más bajo asignado al más alto mejora la extracción, caso contrario ocurre con el factor 'P,A' que tiene un efecto de estandarización negativo.

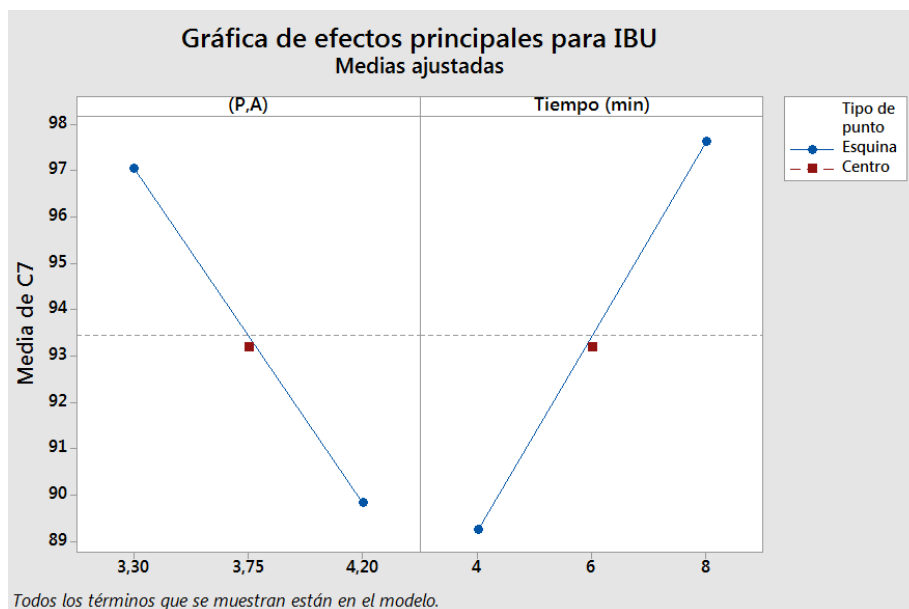
Figura 22. Diagrama de Pareto y gráfica normal de efectos estandarizados para el DoE factoriales 2^2 con puntos centrales de LLLME-IL.

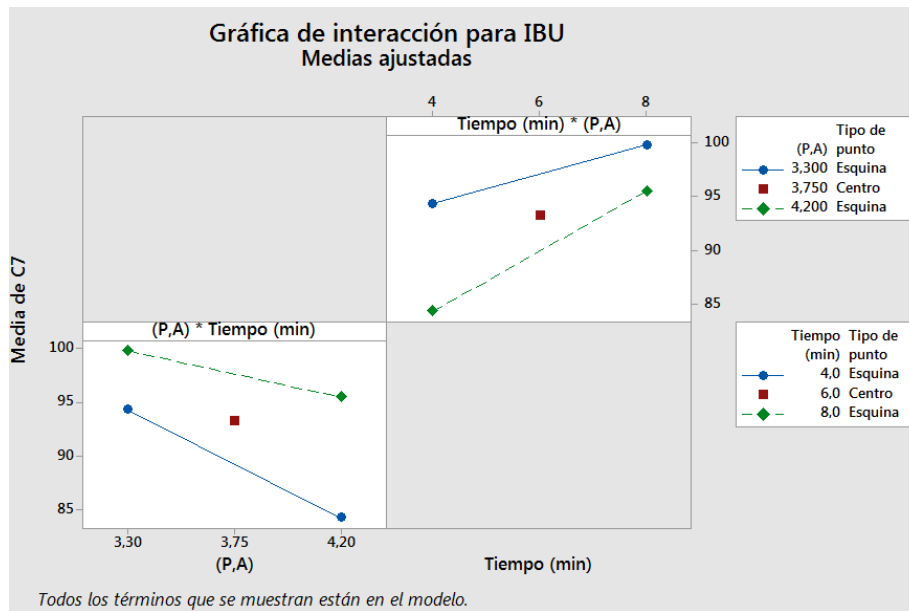




Para establecer las mejores condiciones de extracción se utilizaron las gráficas de los efectos principales y de interacción de las variables, definiendo que la microextracción debe darse por un tiempo de 8 min por cada extracción y la relación entre las fases debe ser de 3 mL de fase acuosa con muestra con 3 mL de fase orgánica apolar (Figura 21).

Figura 23. Gráficas efectos principales e interacción de variables en el DoE 2^2 con puntos centrales de la LLLME-IL.





Por otra parte, no fue posible establecer los rendimientos para la extracción de AS y AAS, debido a las condiciones de trabajo en el μ CLAR-DAD, donde al inyectar la fase acuosa con muestra por la sensibilidad del equipo y debido a la miscibilidad del acetato de etilo en agua, se presentó una señal de interferencia (tiempo de retención igual a la del AS y AAS). Se intentó realizar la cuantificación por espectrofotometría UV-Vis, pero ocurrió lo mismo, ya que la absorbancia de las soluciones luego de estar en contacto con el acetato de etilo se miraba afectaba y el equipo arroja absorbancias superiores a 1,7.

Aunque, para esta metodología se obtuvieron porcentajes de recobro entre 70,0 y 99,8%, no se podría establecer que es una metodología más eficiente que la microextracción dispersiva asistida por solventes eutécticos profundos donde los porcentajes de recobro están entre 17,0 y 36,0%, ya que para la microextracción en tres fases se realizaron extracciones sucesivas, mientras que para la microextracción dispersiva solo se realizó una única extracción.

7. CONCLUSIONES

Con esta investigación, se encontró que las metodologías de microextracción desarrolladas pueden llegar a ser alternativas verdes para la determinación, cuantificación e incluso para la remoción de ácido acetil salicílico, ácido salicílico e ibuprofeno de matrices acuosas, ya que se encontraron recobros de 17-35% en DLLME-DES y de 78-99% para LLLME-IL.

A partir de las caracterizaciones espectroscópicas realizadas a los DES e IL, se identifica que las metodologías empleadas son efectivas para la síntesis de estos solventes verdes, aunque debido a la economía atómica, los reactivos y la metodología empleada en cada una de las síntesis es mucho más amigable con el medio ambiente la síntesis de DES. Además, el proceso de síntesis de los IL no es verde, ya que se utilizaron reactivos de una alta toxicidad como el dimetilsulfato y solventes halogenados.

En la determinación por ultra-cromatografía líquida de alta resolución se encontró una respuesta óptima con límites de detección de 0,06; 0,07 y 0,19 mg/L y límite de cuantificación de 0,21; 0,23 y 0,63 mg/L para el AAS, AS e IBU respectivamente, rango lineal entre $0,5 \pm 0,1$ a $5,0 \pm 0,1$ mg/L para la aspirina y el ácido salicílico, y entre $1,0 \pm 0,1$ a $5,0 \pm 0,1$ mg/L para el ibuprofeno, además de ser robusto para los tres analitos estudiados bajo las condiciones que se estandarizaron en este trabajo.

La utilización de diseños experimentales para establecer las variables e influencia de las mismas en las metodologías desarrolladas para la microextracción y determinación de contaminantes emergentes en agua, fue de gran utilidad para reducir la experimentación necesaria y la generación de desechos en el desarrollo de la misma, sin afectar los resultados los cuales fueron significativos y válidos para realizar el análisis adecuado de las metodologías estandarizadas, de acuerdo con los diferentes ANOVA, diagramas de Pareto y las gráficas de interacción normal.

Recomendaciones

Las metodologías de microextracción desarrolladas en este trabajo se pueden optimizar mejor si se pueden realizar las cuantificaciones en el equipo contando con una columna de intercambio iónico para poder medir directamente el analito en el extractante (solvente eutéctico profundo y solución con líquidos iónicos).

Evaluar la selectividad de los extractantes desarrollando las metodologías en soluciones donde se encuentren los analitos mezclados y estudiar si con muestras reales se mantiene la eficiencia de cada metodología. Además, se puede identificar qué otros contaminantes emergentes se pueden extraer bajo las condiciones establecidas en este trabajo.

8. BIBLIOGRAFÍA

- AGENDA, O. (2019). 2030, 2015. *Transforming our World: The 2030 Agenda for Sustainable Development*. New York, United Nations ARES, 701. (Referencia naciones unidas)
- Akay, S., Öztürk, S., Kalderis, D., & Kayan, B. (2021). Degradation, solubility and chromatographic studies of Ibuprofen under high temperature water conditions. *Chemosphere*, 277. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130307>
- Altunay, N. (2021). Optimization of ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction of niacinamide in pharmaceutical and cosmetic samples using experimental design. *Microchemical Journal*, 170(July), 106659. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106659>
- Carasek, E., Bernardi, G., Morelli, D., & Merib, J. (2021). Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. *Journal of Chromatography A*, 1640, 461944. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461944>
- Cortada Cortés, C. (2012). *Nuevas metodologías y aplicaciones de las técnicas de microextracción líquido-líquido para la determinación de contaminantes orgánicos*.
- de Andrade, D. C., Monteiro, S. A., & Merib, J. (2022). A review on recent applications of deep eutectic solvents in microextraction techniques for the analysis of biological matrices. *Advances in Sample Preparation*, 1(December 2021), 100007. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2022.100007>
- Elik, A., Bingöl, D., & Altunay, N. (2021). Ionic hydrophobic deep eutectic solvents in developing air-assisted liquid-phase microextraction based on experimental design: Application to flame atomic absorption spectrometry determination of cobalt in liquid and solid samples. *Food Chemistry*, 350(November 2020). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129237>
- Elik, A., Demirbaş, A., & Altunay, N. (2022). Experimental design of ligandless sonication-assisted liquid- phases microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvents for accurate determination of Pb(II) and Cd(II) from waters and food samples at trace levels. *Food Chemistry*, 371(May 2021). <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131138>
- Erarpat, S., Bodur, S., Günkara, Ö. T., & Bakırdere, S. (2022). Combination of high performance liquid chromatography and flame atomic absorption spectrophotometry using a novel nebulizer interface supported T shaped slotted quartz tube for the determination of Vitamin B12. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 217(May), 114855. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114855>
- Florindo, C., Branco, L. C., & Marrucho, I. M. (2017). Development of hydrophobic deep eutectic solvents for extraction of pesticides from aqueous environments. *Fluid Phase*

Equilibria, 448, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.fluid.2017.04.002>

Garza Tapia, M. (2013). *EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO SOLVENTES PARA FÁRMACOS HIDROFÍLICOS Y SU APLICACIÓN EN PROCESOS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA*.

Gil, J. A. Q., Vargas, L. J. M., Florez, Ó. A. A., & Tobón, G. E. Z. (2009). The effect of the solvent recrystallization and particle size on wettability of ibuprofen. *Vitae*, 16(1), 49–54.

Gurrani, S., Prakasham, K., Pasupuleti, R. R., Wu, M. T., Dong, C. Di, & Ponnusamy, V. K. (2022). Rapid in-syringe-based ultrasonic-energy assisted salt-enhanced homogeneous liquid-liquid microextraction technique coupled with HPLC/low-temperature evaporative light-scattering detector for quantification of sodium hyaluronate in food products. *Microchemical Journal*, 172(PB), 106898. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106898>

Hamza, R. A., Iorhemen, O. T., & Tay, J. H. (2016). Occurrence, impacts and removal of emerging substances of concern from wastewater. *Environmental Technology and Innovation*, 5, 161–175. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2016.02.003>

Harris, D. C. (2003). *Análisis Químico Cuantitativo*. Editorial Reverté, S.a. (3a Edición). Retrieved from <https://drive.google.com/file/d/1xbID4QvwwwMURlpWaFKkAU2FSEwynnoe/view?ts=5f2cb311>

Hay, J. G. P., Oxley, A. P. A., Wos-oxley, M. L., Hayes, R., Pickles, T., Roberts, K., & Conlan, X. A. (2022). Talanta Open The cyclic nature of soil chemistry : Forensic analysis with the aid of ultra-high performance liquid chromatography. *Talanta Open*, 6(March), 100126. <https://doi.org/10.1016/j.talo.2022.100126>

He, Y., Miggiels, P., Wouters, B., Drouin, N., Guled, F., Hankemeier, T., & Lindenburg, P. W. (2021). A high-throughput, ultrafast, and online three-phase electro-extraction method for analysis of trace level pharmaceuticals. *Analytica Chimica Acta*, 1149, 338204. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338204>

Hube, S., & Wu, B. (2021). Mitigation of emerging pollutants and pathogens in decentralized wastewater treatment processes: A review. *Science of the Total Environment*, 779, 146545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146545>

Jalili, V., Barkhordari, A., & Ghiasvand, A. (2020). New extraction media in microextraction techniques. A review of reviews. *Microchemical Journal*, 153(November 2019), 104386. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104386>

Jing, X., Huang, X., Zhang, Y., Wang, M., Xue, H., Wang, X., & Jia, L. (2022). Cyclodextrin-based dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of fungicides in water, juice, and vinegar samples via HPLC. *Food Chemistry*, 367(July 2021).

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130664>

- Kamal, A. H., Marie, A. A., & Hammad, S. F. (2020). Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of omeprazole and aspirin in the presence of salicylic acid as degradation product. *Microchemical Journal*, 152(August 2019), 104350. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104350>
- Lopes, D., Dias, A. N., Simão, V., & Carasek, E. (2017). Determination of emerging contaminants in aqueous matrices with hollow fiber-supported dispersive liquid-liquid microextraction (HF-DLLME) and separation/detection by liquid chromatography – Diode array detection. *Microchemical Journal*, 130, 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2016.10.011>
- MacFarlane, D., Kar, M., & Pringle, J. (2017). *Fundamentals of Ionic Liquids Ionic Liquids in Biotransformations and Electrodeposition from Ionic Handbook of Green Chemistry – Green Solvents Electrochemical Aspects of Ionic Liquids , 2nd edition Nanocatalysis in Ionic Liquids.*
- Marcinkowska, R., Konieczna, K., Marcinkowski, Ł., Namieśnik, J., & Kloskowski, A. (2019). Application of ionic liquids in microextraction techniques: Current trends and future perspectives. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 119. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.07.025>
- Martínez-Piernas, A. B., Plaza-Bolaños, P., Gilabert, A., & Agüera, A. (2021). Application of a fast and sensitive method for the determination of contaminants of emerging concern in wastewater using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe-based extraction and liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1653. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462396>
- Mashile, G. P., Selahle, S. K., Mpupa, A., Nqombolo, A., & Nomngongo, P. N. (2022). Remediation of emerging pollutants through various wastewater treatment processes. In *Emerging Freshwater Pollutants* (pp. 137–150). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822850-0.00005-3>
- Montgomery, D. (2004). Diseño y análisis de experimentos. *Limusa Wiley*.
- Morelli, D. C., Bernardi, G., Morés, L., Pierri, M. E., & Carasek, E. (2020). A green - high throughput –extraction method based on hydrophobic natural deep eutectic solvent for the determination of emerging contaminants in water by high performance liquid chromatography – diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1626, 461377. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461377>
- Nessim, M. I., Zaky, M. T., & Deyab, M. A. (2018). Three new gemini ionic liquids: Synthesis, characterizations and anticorrosion applications. *Journal of Molecular Liquids*, 266, 703–710. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.07.001>
- Payán, M. R., López, M. Á. B., Fernández-Torres, R., Bernal, J. L. P., & Mochón, M. C.

- (2009). HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME). *Analytica Chimica Acta*, 653(2), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.018>
- Pemberthy M, D., Padilla, Y., Echeverri, A., & Peñuela, G. A. (2020). Monitoring pharmaceuticals and personal care products in water and fish from the Gulf of Urabá, Colombia. *Heliyon*, 6(6). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04215>
- Peña-Guzmán, C., Ulloa-Sánchez, S., Mora, K., Helena-Bustos, R., Lopez-Barrera, E., Alvarez, J., & Rodriguez-Pinzón, M. (2019). Emerging pollutants in the urban water cycle in Latin America: A review of the current literature. *Journal of Environmental Management*, 237(February), 408–423. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.02.100>
- Pino, A. L. (2020). *Química verde Enfoque sistémico* (Vol. 1).
- Pisano, P. L., Espino, M., Fernández, M. de los Á., Silva, M. F., & Olivieri, A. C. (2018). Structural analysis of natural deep eutectic solvents. Theoretical and experimental study. *Microchemical Journal*, 143(March), 252–258. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.08.016>
- Qin, H., Hu, X., Wang, J., Cheng, H., Chen, L., & Qi, Z. (2020). Overview of acidic deep eutectic solvents on synthesis, properties and applications. *Green Energy and Environment*, 5(1), 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2019.03.002>
- Salthammer, T. (2020). Emerging indoor pollutants. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 224(July 2019), 113423. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.113423>
- Santos, L. B., Assis, R. S., Barreto, J. A., Bezerra, M. A., Novaes, C. G., & Lemos, V. A. (2022). Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 146. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116478>
- Saqib, S., Yadav, A. K., & Prajapati, K. B. (2021). Emerging pollutants in water and human health. In *Contamination of Water* (pp. 285–299). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-824058-8.00008-6>
- Sereshti, H., Seraj, M., Soltani, S., Rashidi Nodeh, H., Hossein Shojaee AliAbadi, M., & Taghizadeh, M. (2022). Development of a sustainable dispersive liquid–liquid microextraction based on novel hydrophobic and hydrophilic natural deep eutectic solvents for the analysis of multiclass pesticides in water. *Microchemical Journal*, 175(January), 107226. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107226>
- Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J., & Crouch, S. R. (2015). *Fundamentos de química analítica. Fundamentos de química analítica* (Novena edi).

- Tavengwa, N. T., & Dalu, T. (2022). Introduction to emerging freshwater pollutants. In *Emerging Freshwater Pollutants* (pp. 1–6). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822850-0.00029-6>
- Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2018). Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus Chimie*, 21(6), 628–638. <https://doi.org/10.1016/j.crci.2018.04.002>
- Verdía Bárbara, P. (2012). *Diseño y síntesis de líquidos iónicos para aplicaciones específicas*. Universidad de Vigo.
- Vides, C. V. (2013). *DISOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES, DEEP EUTECTIC SOLVENTS): NUEVOS DISOLVENTES BIORENOVABLES EN CATÁLISIS HOMOGÉNEA MEDIADA POR METALES DE TRANSICIÓN*. *Helvetica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1002/hlca.19500330507>
- Viera Santana, S., & Santana Rodríguez, J. J. (2013). Técnicas analíticas avanzadas para la extracción y preconcentración de contaminantes emergentes en muestras líquidas. *Revista de La Academia Canaria de Ciencias: = Folia Canariensis Academiae Scientiarum*, ISSN 1130-4723, Vol. 25, N^o. 2, 2013, Págs. 77-95, 25(2), 77–95. Retrieved from <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5907418&info=resumen&idioma=ENG%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5907418&info=resumen&idioma=SPA%0Ahttps://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5907418>
- Wang, Q., Chen, R., Shatner, W., Cao, Y., & Bai, Y. (2019). State-of-the-art on the technique of dispersive liquid-liquid microextraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 51(August 2018), 369–377. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.08.010>
- Wasserscheid, P. (2008). *Ionic Liquids in Synthesis*. *Synthesis* (Vol. 1). Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9783527619559.fmatter/summary>
- Wiest, L., Gosset, A., Fildier, A., Libert, C., Hervé, M., Sibeud, E., ... Perrodin, Y. (2021). Occurrence and removal of emerging pollutants in urban sewage treatment plants using LC-QToF-MS suspect screening and quantification. *Science of the Total Environment*, 774, 145779. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145779>
- Xing, C., Cui, W. Q., Zhang, Y., Zou, X. S., Hao, J. Y., Zheng, S. Di, ... Li, Y. H. (2022). Ultrasound-assisted deep eutectic solvents extraction of glabridin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza glabra*: Optimization, extraction mechanism and in vitro bioactivities. *Ultrasonics Sonochemistry*, 83, 105946. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2022.105946>
- Yan, Y., Lian, K., Zhang, H., An, J., Zhang, Y., Kang, W., & Ai, L. (2022). Doping-control analysis of 14 diuretics in animal-derived foods using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal*, 174(October 2021), 106948. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106948>

- Zhang, Z., Kang, N., Wang, J., Sui, H., He, L., & Li, X. (2018). Synthesis and application of amino acid ionic liquid-based deep eutectic solvents for oil-carbonate mineral separation. *Chemical Engineering Science*, *181*, 264–271. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2018.02.023>
- Zheng, W., Yoo, K. H., Abd El-Aty, A. M., Park, D. H., Choi, J. M., Kim, S. K., ... Shin, H. C. (2019). Quantitative determination of carbasalate calcium derived metabolites, acetylsalicylic acid and salicylic acid, in six animal foods using liquid-liquid extraction method coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, *278*(November 2018), 744–750. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.118>
- Zuo, L., Ao, X., & Guo, Y. (2020). Study on the synthesis of dual-chain ionic liquids and their application in the extraction of flavonoids. *Journal of Chromatography A*, *1628*, 461446. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2020.461446>

9. ANEXOS

Anexo 1:

Tabla 24. Reactivos y materiales de laboratorio utilizados.

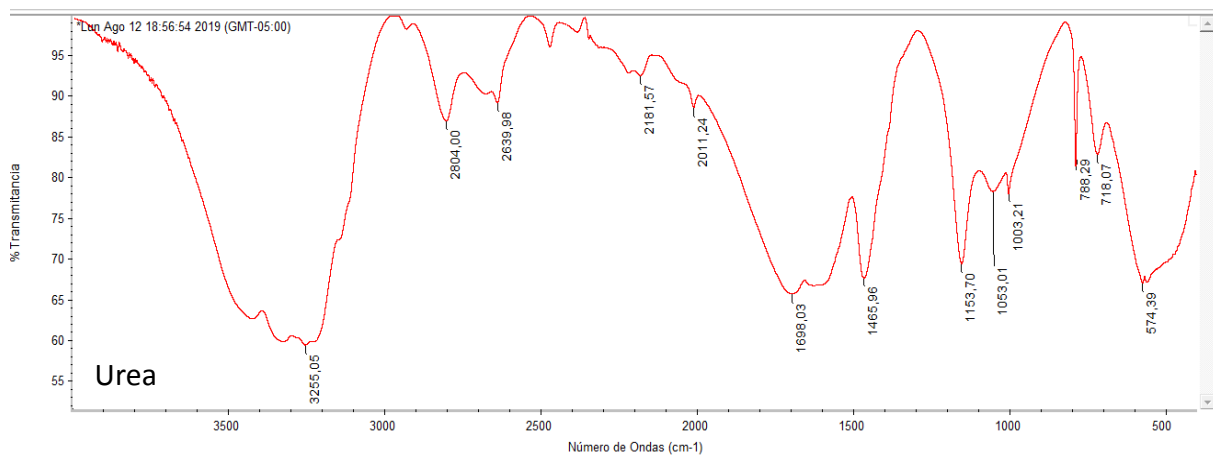
Reactivos	Especificaciones
Etanol, acetonitrilo grado HPLC, cloruro de cadmio (II), cloruro de hierro (III), metanol, ácido clorhídrico 0,1N	Fisher Scientific
Dimetilsulfato, cloruro de sodio, asparagina, tirosina, cisteína, alanina, cloruro de alilo	Sigma Aldrich
Acetato de etilo, cloruro de magnesio, ácido cítrico, ácido acético glacial, ácido salicílico, ácido acetilsalicílico, cloruro de manganeso (II), cloruro de hierro (II), sodio metálico, benzofenona.	Merck
Cloruro de zinc (II)	Supelco
Cloruro de zirconio	Acros Organics
Glicina, ácido oxálico dihidratado	Mallinckrodt Baker, Inc.
Tetrahidrofurano, diclorometano grado HPLC	Honeywell
Cloruro de cobre (I), Urea, Yoduro de Potasio	Carlo Erba
Terc-butoxido de potasio	Fluka
Imidazol	Scharlab
Ácido Fórmico (98%), bromuro de terc-burilo	Alfa Aesar

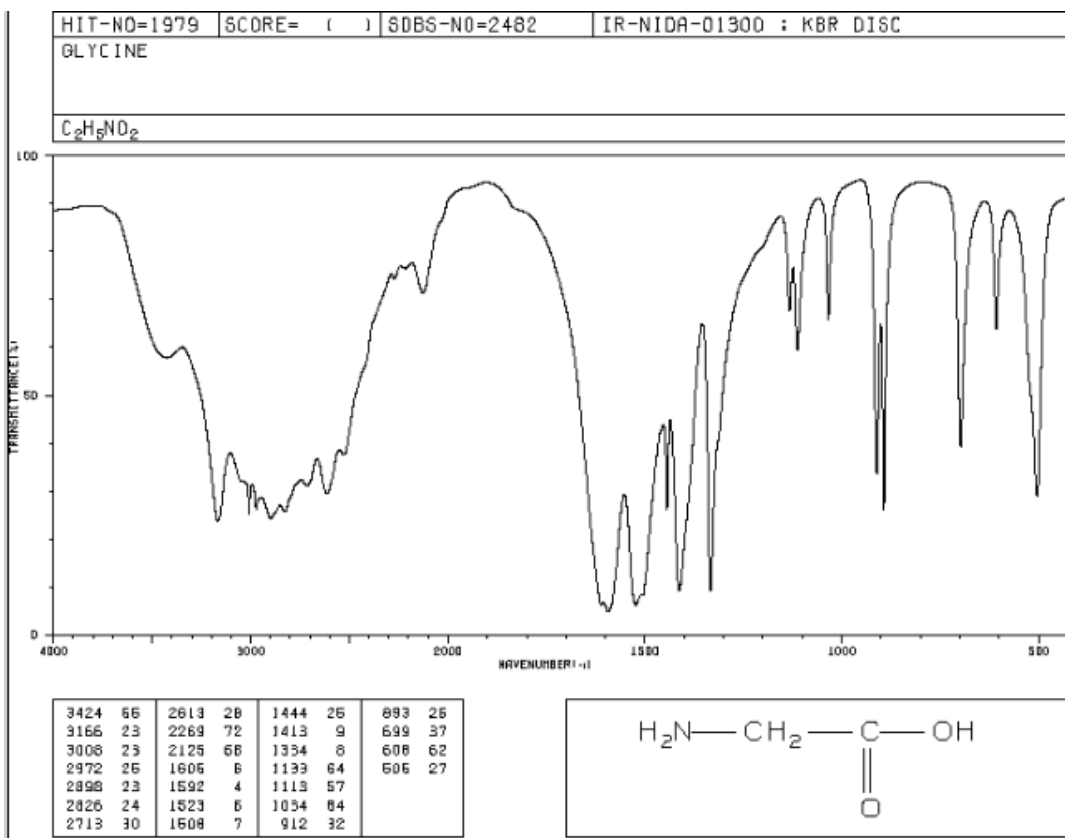
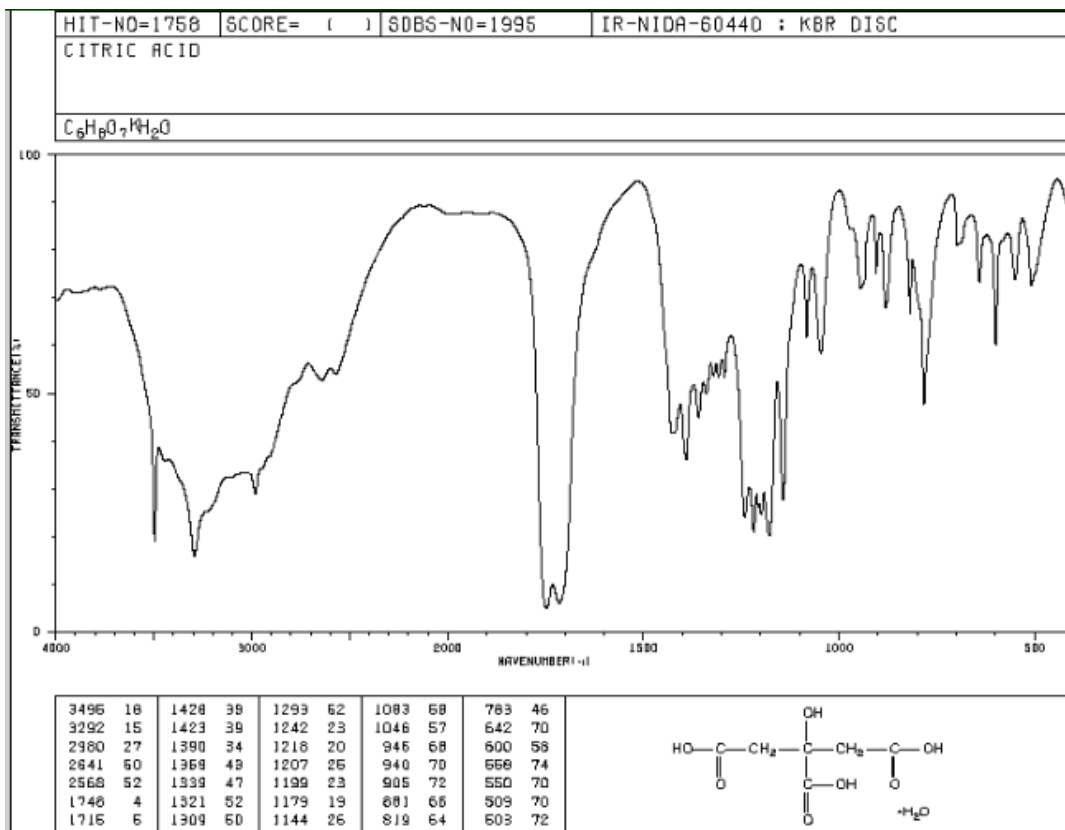
Anexo 2:

Tabla 25. Equipos utilizados en la investigación.

Equipo	Modelo	Marca
Espectrofotómetro de Uv-vis	GENESIS 6	Thermo Scientific (Texas, USA)
Rotaevaporador	Laborota 4003	Heidolph Instruments Gmbh Co (Schwabach, Alemania)
Ultrasonido	Ultrasonic Bath 2.8L	Fisher Scientific (Hampton, USA)
Balanza analítica	Ohaus	Adventure (EE.UU)
Cromatógrafo líquido de alta resolución detector de diodos	μ HPLC+ Dionex UltiMate 3000 Diode Array Detector	Thermo Scientific (Texas, USA)
Centrifuga	RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge	Sorvall Instruments
pHmetro	744 pH Meter	Metrohm
Espectrómetro infrarrojo	Nicolet™iS™10 FTIR	Thermo Scientific (Texas, USA)
Micropipeta	Transferpette® S	BRAND

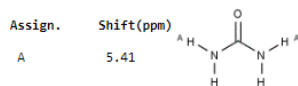
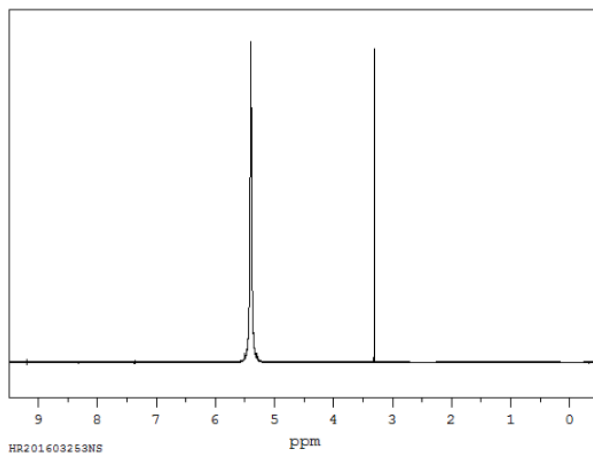
Anexo 3. Espectros electromagnéticos FT-IR de compuestos de partida en la síntesis del DES₁, DES₂ y NADES₃ (los espectros de la glicina y el ácido cítrico fueron tomados de la base de datos SDBSWeb: <https://sdb.sdb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, date of 58ccess)).



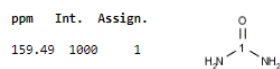
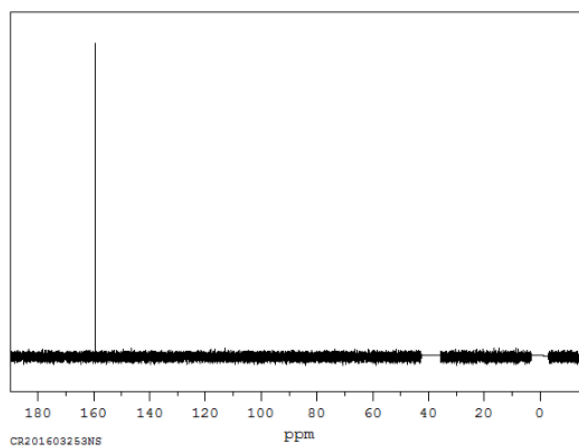


Anexo 4: Espectros ^1H -RMN y ^{13}C -RMN de la urea (los espectros fueron tomados de la base de datos SDBSWeb: <https://sdb.sdb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, date of 60ccess)).

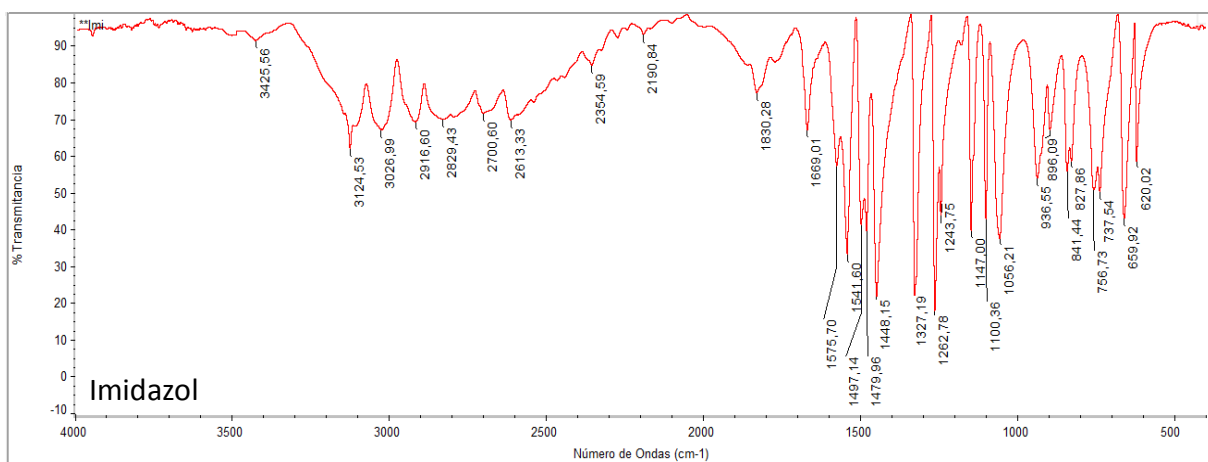
SDBS- ^1H NMR 399.65 MHz
 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 0.008 g : 0.5 ml DMSO- d_6
 urea



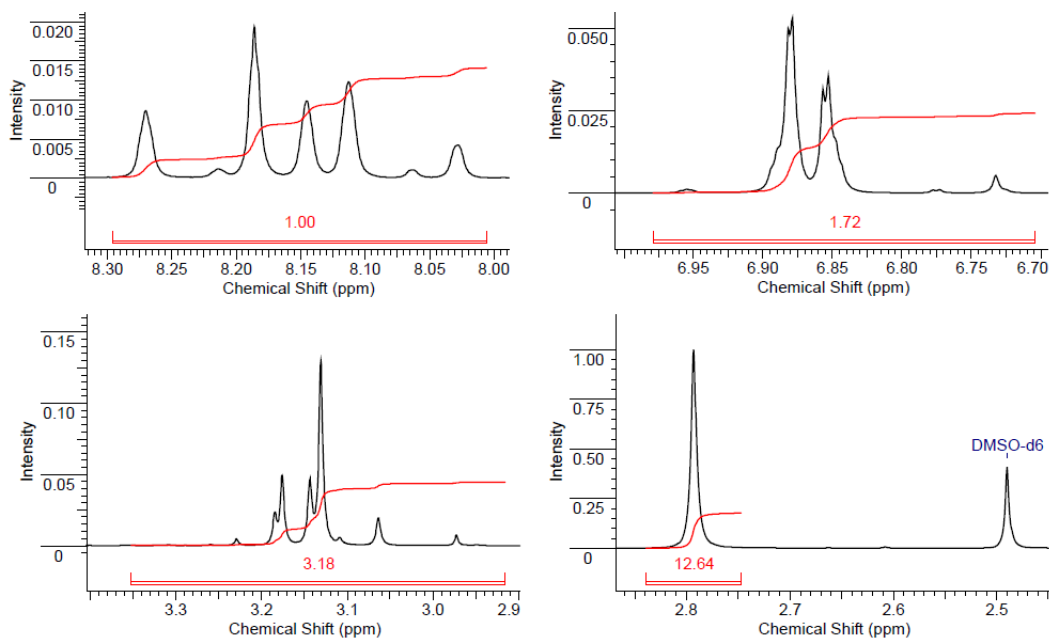
SDBS- ^{13}C NMR 100.40 MHz
 $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$ 0.008 g : 0.5 ml DMSO- d_6
 urea



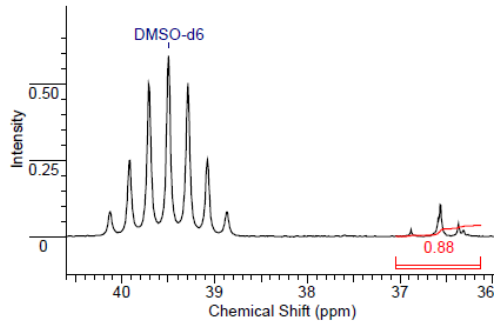
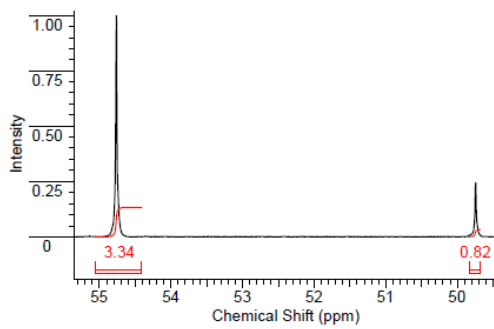
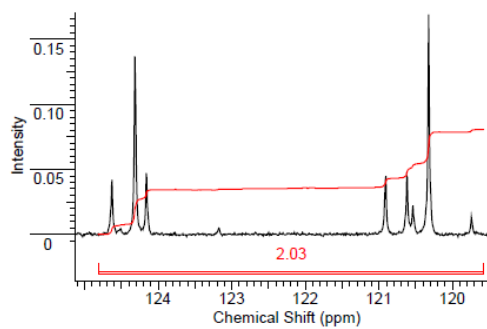
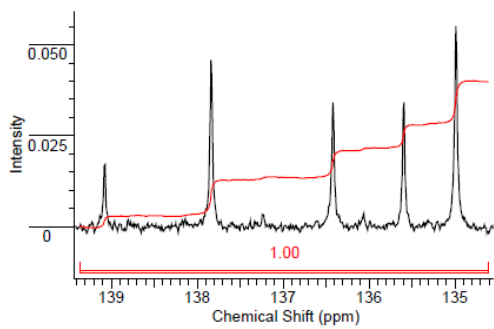
Anexo 5: Espectro electromagnético FT-IR del imidazol.



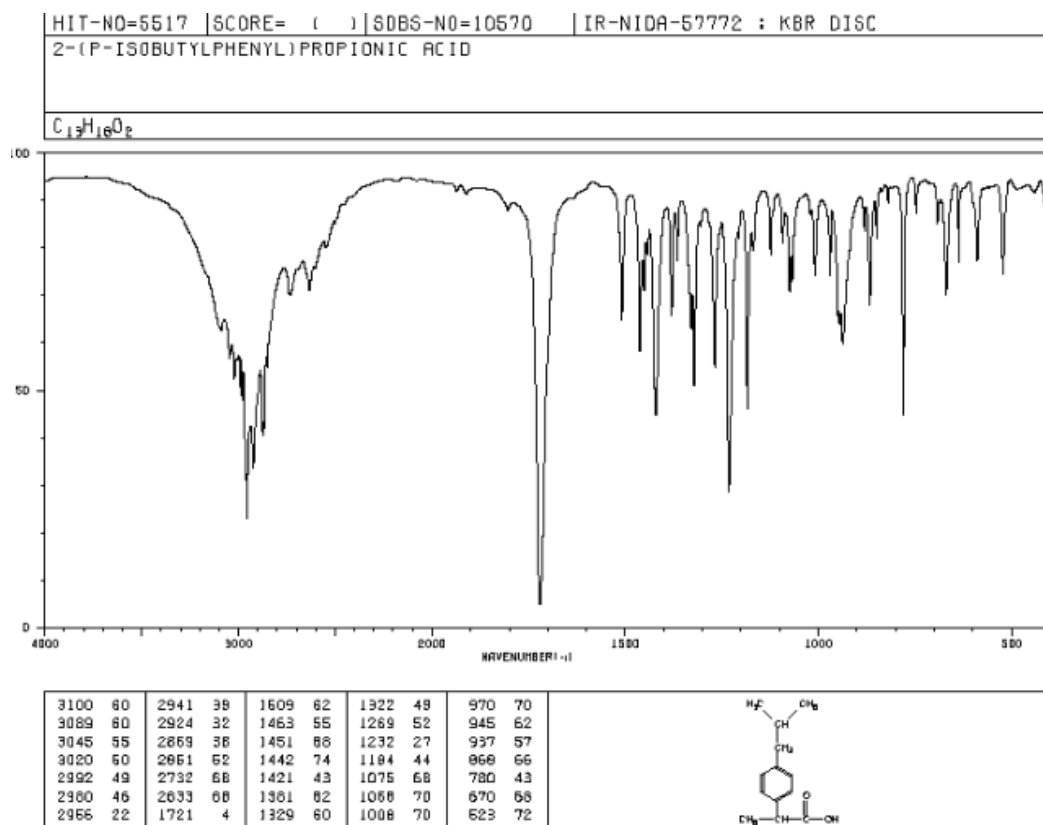
Anexo 6: Acercamientos en el espectro ¹H-RMN del IL₁.



Anexo 7: Acercamientos en el espectro ^{13}C -RMN del IL₁.



Anexo 8: Espectro IR del ibuprofeno tomado de la base de datos SDBSWeb: <https://sdb.sdb.aist.go.jp> (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, date of access).



Anexo 9: Datos curva de calibración en el Genesis 6.

Curva AAS	Absorbancia			Promedio	error promedio	Desviación estándar medidas	Desviación estándar de la media
Concentración (mg/L)	Curva 1	Curva 2	Curva 3				
40	0,125	0,133	0,140	0,133	0,005	0,008	0,004
60	0,212	0,225	0,224	0,220	0,006	0,007	0,004
80	0,283	0,313	0,316	0,304	0,014	0,018	0,011
100	0,363	0,409	0,406	0,393	0,020	0,026	0,015
150	0,596	0,615	0,558	0,590	0,207	0,029	0,017

Curva AS	Absorbancia						
Concentración (mg/L)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Promedio	error promedio	Desviación estándar medidas	Desviación estándar de la media
5	0,100	0,129	0,125	0,118	0,012	0,016	0,009
10	0,231	0,261	0,246	0,246	0,010	0,015	0,009
20	0,446	0,520	0,498	0,488	0,028	0,038	0,022
30	0,684	0,781	0,737	0,734	0,033	0,049	0,028

Anexo 10: Respuesta de la prueba de Tukey para las respuestas entre días de para la curva en el GENESIS y el μ CLAR-DAD, además de la respuesta con el cambio de solvente en μ CLAR-DAD, realizadas en Minitab 18.

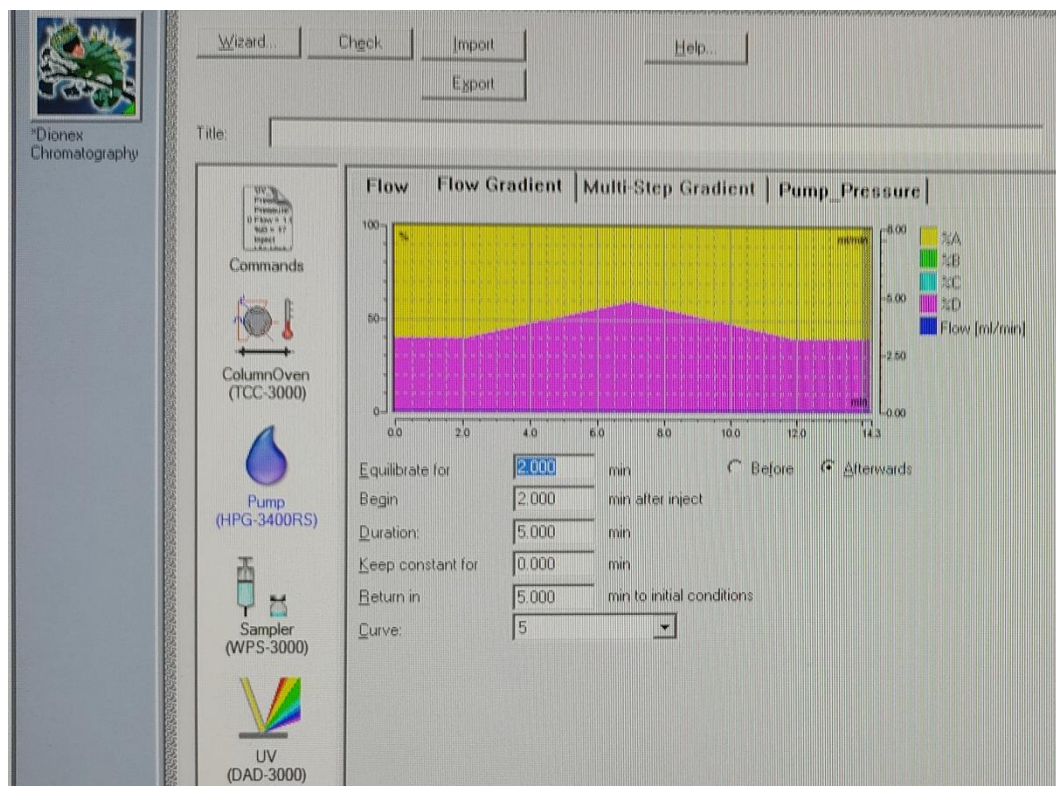
* NOTA * No se pueden realizar comparaciones de Tukey para este nivel de significancia, número de niveles y grados de libertad. No se puede proveer información de grupos o intervalos de confianza.

Método

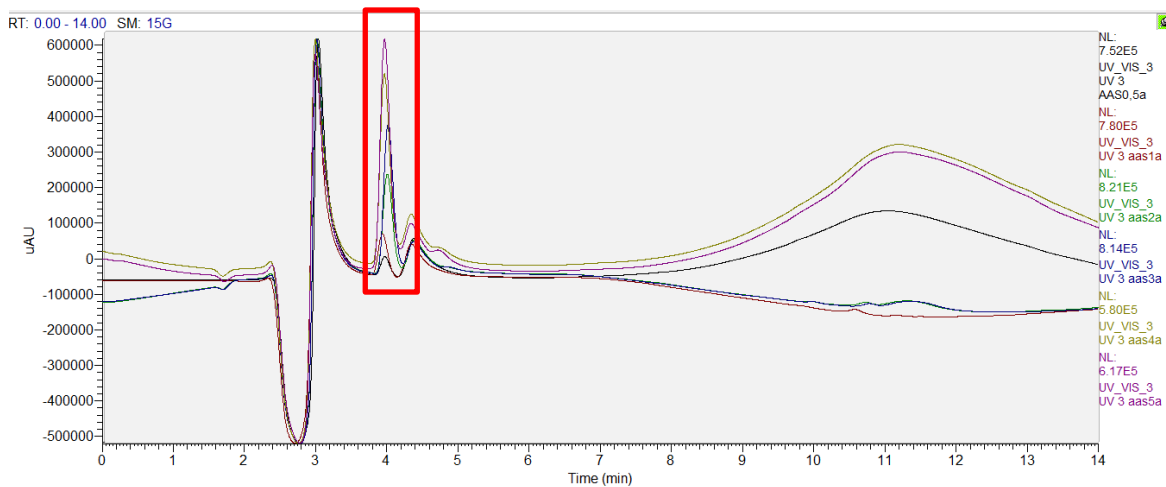
Hipótesis nula Todas las medias son iguales
 Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
 Nivel de significancia $\alpha = 0,05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Anexo 11: Gradiente utilizado en la medición para cada analito por μ CLAR-DAD (%A: Agua l 0,1% de ácido fórmico - %D: ACN).

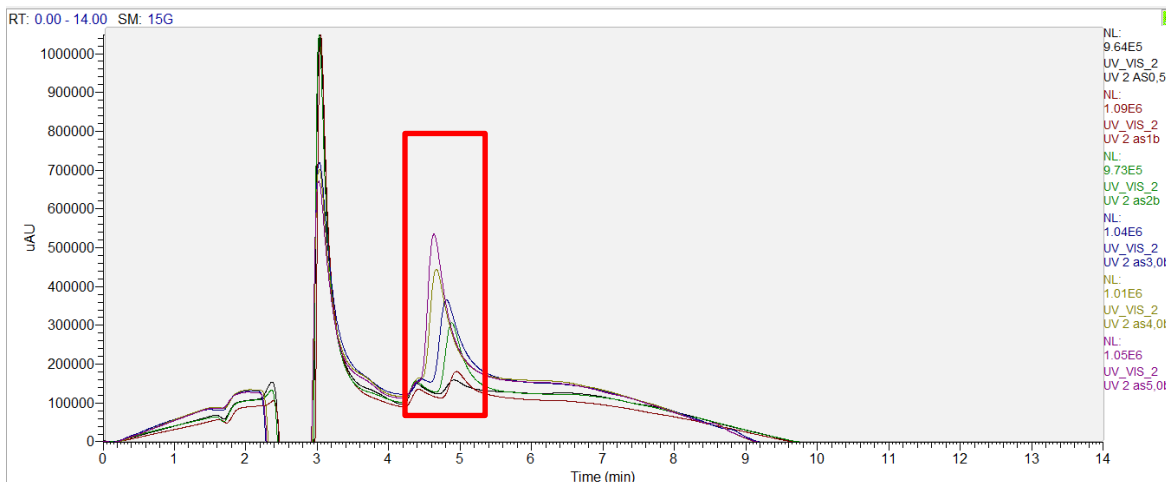


Anexo 12: Cromatograma curva de calibración ácido acetilsalicílico (t_R : 3,97 min) y tabla de datos.



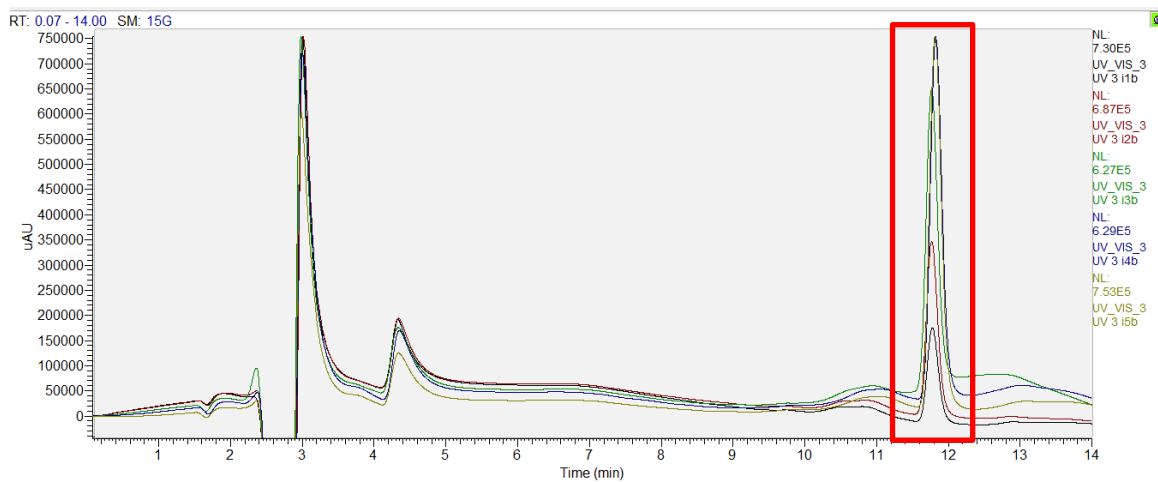
AAS concentración (mg/L)	A	B	C	Promedio	error promedio	Desviación estándar medidas	Desviación estándar de la media
0,5 ± 0,1	513959	513681	590034	539224,7	33872,9	44002,4	25404,8
1,0 ± 0,1	1252268	1333541	1363363	1316390,7	42748,4	57498,9	33197,0
2,0 ± 0,1	2779846	2607653	2589534	2659011,0	80556,7	105037,6	60643,5
3,0 ± 0,1	4147004	4067981	3936427	4050470,7	76029,1	106374,9	61415,6
4,0 ± 0,1	4584658	4725958	4566282	4625632,7	452083,1	87368,8	50442,4
5,0 ± 0,1	5840582	5893084	5908203	5880623,0	1977708,3	35490,9	20490,7

Anexo 13: Cromatograma curva de calibración ácido salicílico (t_R : 4,71 min) y tabla de datos.



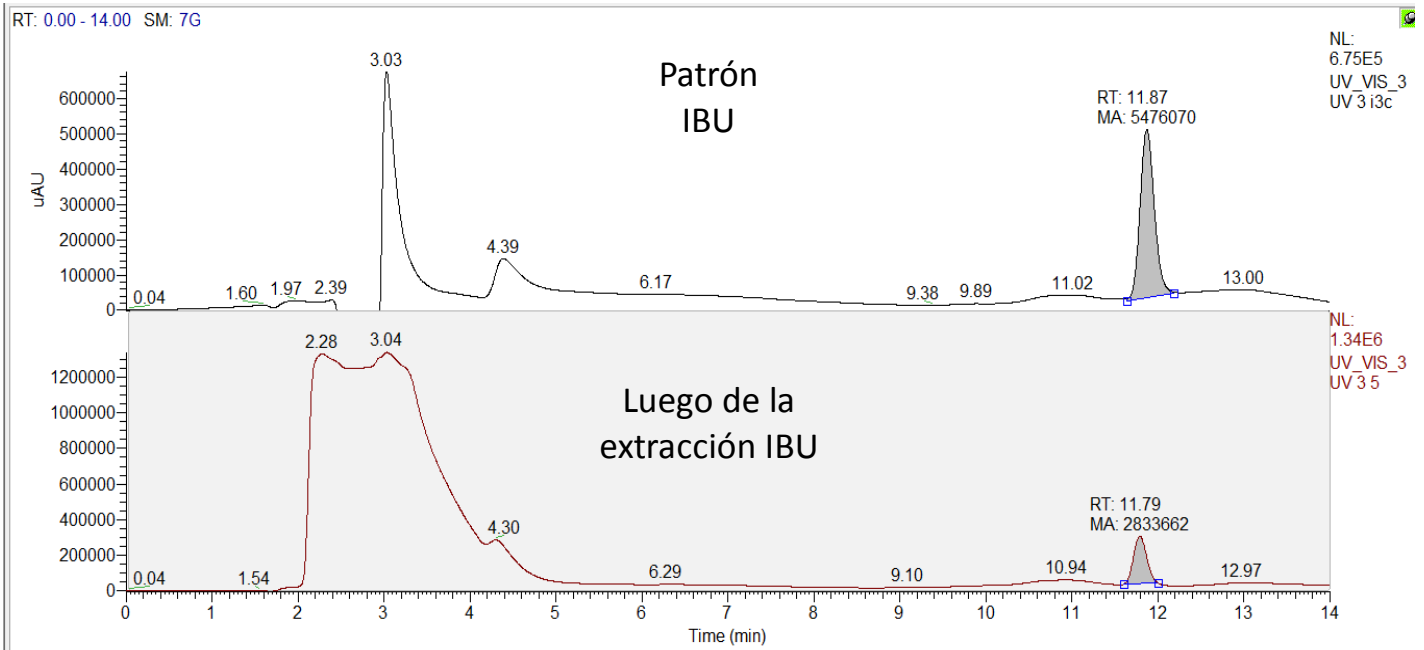
AS concentración (mg/L)	A	B	C	Promedio	error promedio	Desviación estándar medidas	Desviación estándar de la media
0,5 ± 0,1	519678	510327	531251	520418,7	7221,6	10481,6	6051,6
1,0 ± 0,1	1082649	1064236	1086487	1077790,7	9036,4	11894,5	6867,3
2,0 ± 0,1	2519642	2448120	2439474	2469078,7	33708,9	44002,0	25404,6
3,0 ± 0,1	3597398	3663684	3518749	3593277,0	49685,3	72555,3	41889,8
4,0 ± 0,1	5564156	5063342	5532447	5386648,3	726949,2	280440,0	161912,1
5,0 ± 0,1	7066682	6853988	6825189	6915286,3	2375993,4	131900,8	76153,0

Anexo 14: Cromatograma curva de calibración ibuprofeno (t_R : 11,77 min) y tabla de datos.



IBU concentración (mg/L)	A	B	C	Promedio	error promedio	Desviación estándar medidas	Desviación estándar de la media
0,50	845601	876841	908042	876828,0	20818,0	31220,5	18025,2
1,00	1901432	1993074	1988288	1960931,3	39666,2	51583,5	29781,7
2,00	3809331	3464084	3890674	3721363,0	171519,3	226491,8	130765,1
3,00	5301494	5402122	5296052	5333222,7	45932,9	59730,6	34485,5
4,00	7080460	6952327	6745908	6926231,7	538327,7	168795,7	97454,2
5,00	8360891	8636822	8349482	8449065,0	2908332,0	162702,4	93936,3

Anexo 15. Cromatogramas DLLME-DES.



Anexo 16. Cromatogramas LLLME-IL.

