

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***DETERMINACIÓN DE METALES TRAZA EN MUESTRAS DE
AGUA POR MICROEXTRACCIÓN EN FASE POLIMÉRICA
SOPORTADA EN DISCO ROTATORIO Y POSTERIOR
CUANTIFICACIÓN MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA EN
FASE SÓLIDA***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Química área de Especialización en Química Ambiental y
Memoria para optar al Título de Químico por:

CARLOS ALBERTO MUÑOZ BELMAR

Director de Tesis: Dr. Pablo Richter Duk

Santiago-CHILE
Noviembre 2013

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

CARLOS ALBERTO MUÑOZ BELMAR

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, Área de Especialización: Química Ambiental y Título de Química, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dr. Pablo Richter _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

M.S.c Inés Ahumada _____

Dra. Tatiana Garrido _____

Dra. Ady Giordano _____

Agradecimientos

Para comenzar, debo expresar mi agradecimiento a CONICYT, y específicamente al proyecto FONDECYT 1100085, por el financiamiento a este trabajo.

Siempre he creído que la familia es lo más importante en este mundo, ya que gracias a su amor incondicional y la sabiduría que te entregan finalmente forman nuestro carácter y personalidad, y por esto debo expresar mi más profundo amor y aprecio a mis padres, Andrea y Miguel, quienes siempre me han apoyado desde que comencé a emprender el largo y complejo camino de la enseñanza superior, y a quienes quiero con todo mi corazón. Debo darles las gracias por ser excelentes papas, por todo el cariño que me han entregado y por soportar todos los dolores de cabeza que pude ocasionarles, y por las lecciones de vida que me han dado desde pequeño, ya que gracias a ustedes he llegado tan lejos. También agradezco a mi hermano mayor Miguel al cual quiero mucho y que siempre ha estado para apoyarme cuando lo necesito. Les doy las gracias a mis tíos y primos por los consejos y cariño que me han entregado, y a mis abuelos quienes fueron como mis segundos padres en mi niñez, y a quienes siempre llevaré en mis recuerdos y mi corazón. Finalmente quiero agradecer a mi sobrina Nicole, y a Anastasia, mi cachorrita, quienes han llenado de alegría y energía a mi familia con su presencia.

Quiero agradecer a mi tutor, el profesor Pablo Richter, a quien admiro y me acogió para realizar mi tesis, ya que gracias a su apoyo y conocimiento he logrado superar las dificultades para concluir exitosamente mi trabajo. También a las profesoras Inés Ahumada, Loreto Ascar y Tatiana Garrido, y a mis compañeros de laboratorio con quienes compartí la mayor parte del tiempo en que realice mi tesis, por ayudarme y darme consejos, y por hacer más llevaderas las tardes en el laboratorio.

Quiero agradecer a mis amigos, que aunque pocos, los considero amigos de verdad, y que han estado conmigo en las buenas y las malas. Agradezco a Claudio por acompañarme desde que ingresé al laboratorio y convertirse en mi "partner", y también a Adriana y Miguelito, quienes me han acogido como un miembro más de su familia. También a Alejandro y su novia Karla, con quienes he compartido durante tantos años, forjando fuertes lazos de amistad. A Guillermo por ser mi "gurú espiritual", fuera de broma, tus consejos me han servido de mucho y además siempre me has ayudado a salir a flote en los momentos más difíciles. Y a Pablo, Christian, Jhonny y Flavio, compañeros inseparables en las fiestas, con ustedes me relajo y puedo disfrutar de buenos momentos de conversación intelectual (o sea, sin sentido), siempre serán mis grandes amigos y espero pronto poder compartir una cerveza con ustedes. (Aprovecho de agradecer a Cristian,

“Pepito”, que aunque desapareció del mapa, de todas formas espero que sea feliz en lo que sea que esté haciendo en su vida).

Además quiero dar las gracias a Andrés, Aliosha, mis amigos de farmacia Cristian y Pablo y mi amigo del colegio Juan Pablo, quienes me han dado su amistad y con quienes he compartido mucho estos últimos meses, espero seguir cruzando caminos a futuro con todos ustedes.

Finalmente quiero agradecer a Carolina, mi novia, quien se ha convertido en un pilar fundamental en mi vida. Con tu amor y cariño llenaste de luz mi existencia y lograste que volviera a sonreír en forma sincera, y aunque apenas llevamos algunos meses juntos en forma “oficial”, durante mucho tiempo has estado conmigo apoyándome emocionalmente. Siempre estaré contigo en lo que necesites, y gracias por considerarme el mejor amigo del mundo. Tú también eres mi mejor amiga, y te quiero con todo mi corazón.

Resumen

El cobre es un elemento traza de alta importancia a nivel biológico, siendo una de sus principales vías de ingreso al organismo la ingesta de agua. Sin embargo, es altamente tóxico al consumirse en altas cantidades, ya que se deposita en órganos y tejidos, generando diversas complicaciones. Se requiere elaborar metodologías de análisis que permitan mantener un control de su concentración en la matriz acuosa. Aunque técnicas como espectroscopía de absorción atómica (AAS) y espectrometría de plasma inductivamente acoplada (ICP) son usadas en su determinación, la espectrofotometría de absorción molecular UV-Visible para la determinación colorimétrica sigue siendo ampliamente considerada como alternativa de análisis, debido a la disponibilidad de equipos en los laboratorios y bajo costo asociado.

Para lograr determinaciones colorimétricas de metales se emplean ligantes que permiten formar complejos cromóforos que originan señales específicas de absorbancia. Debido a que el metal se encuentra a niveles traza, en muchos casos se requiere preconcentrar antes de llevar a cabo el análisis. En este trabajo, se empleó la técnica de extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) sobre una fase de polidimetilsiloxano (PDMS) para la preconcentración y determinación por espectrofotometría UV-Visible en fase sólida como posible metodología de evaluación del contenido de cobre en matrices acuosas. Para lograr la medición se usó dietilditiocarbamato de sodio (NaDDTC) como ligante para formar el cromóforo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, el cual arroja una respuesta analítica a una longitud de onda de 432 nm.

Se analizaron los factores físicos, químicos y los relacionados al dispositivo de extracción, que influyen sobre la retención del analito en la fase apolar, mediante estudio multivariable. La temperatura y pH del medio presentaron especial importancia en el proceso, el primer parámetro influye sobre la movilidad del complejo a través del seno de la solución, favoreciendo además la difusión a través del film estático de agua, mientras que un pH adecuado logra estabilizar la forma aniónica del ligante. Se comprobó también que al aumentar la cantidad de reactivo libre se favorece la formación de complejo, de acuerdo a lo indicado por la estequiometría de

reacción. Este factor resulta de importancia al trabajar sobre medios acuosos que contienen iones metálicos interferentes, los cuales pueden interactuar con el NaDDTC. Al realizar la extracción sobre matrices conteniendo cantidad creciente de interferente, se demostró una recuperación cuantitativa para concentración 0,1 M de NaDDTC en el medio. A partir de modificar las velocidades de rotación debido al uso del disco (óptimo de 1000 rpm), es posible obtener bajos tiempos de extracción, sin embargo el efecto no resultó significativo en el estudio. En cuanto al análisis de la consecuencia de agregar NaCl o Na₂SO₄ al medio, se observó un efecto adverso sobre la extracción, luego, el efecto *salting out* no es apreciado y se descartó su uso. Para experiencias posteriores se trabajó bajo los parámetros óptimos obtenidos, determinándose tiempos de equilibrio de 30, 53 y 90 min para 100, 500 y 1000 mL de muestra respectivamente.

Se determinaron los parámetros analíticos que caracterizan a la metodología. Los estudios indicaron que el método entrega resultados con una baja dispersión (con desviaciones estándares relativas de 7,2 y 8,4%) y de alta exactitud (-4,3% de error relativo) por análisis de un estándar multielemental de aguas. Este último estudio confirmó además la alta selectividad de extracción del cromóforo de cobre por sobre otros iones metálicos. Los límites de detección y cuantificación obtenidos alcanzaron valores menores a 12 µg L⁻¹ y se redujeron al disminuir el volumen de muestra. El parámetro de sensibilidad también se analizó, demostrando un efectivo incremento de la pendiente a mayor volumen de muestra. Los ensayos de recuperación sobre matrices de agua potable indicaron un valor promedio del 95,6% determinándose que la metodología estudiada permite extraer cuantitativamente al complejo de cobre. La alta concentración de cobre en la matriz, la afinidad del complejo hacia el extractante y el hecho que no ocurra acoplamiento con las señales de absorbancias de interferentes complejados explican la alta recuperación del estudio. Finalmente, se validó el método estudiado por comparación a la técnica espectroscópica ICP-OES, obteniéndose resultados comparables entre sí (99,6 y 96,8% para muestra de agua potable y 102,5% para la muestra fortificada). De los estudios realizados para optimizar y validar se concluye

que la metodología desarrollada permite extraer exitosamente al cromoforo Cu(DDTC)_2 para su análisis espectrofotométrico, a través de un método simple, rápido, poco contaminante y fácilmente aplicable en cualquier laboratorio analítico.

Determination of trace metals in water samples by polymeric phase micro extraction supported in a rotating disk and quantification by solid phase spectrophotometry

Summary

Copper is a trace metal of high importance at biological level, because it participates in different metabolic and regulatory processes, being water intake one of the main routes of entry in the organism. However, copper is highly toxic when consumed in high quantities because it accumulates in organs and biological tissue resulting in headaches, nausea or, in extreme cases, kidney and liver damage. Due to this, it is required to elaborate analytical methodologies to maintain a strict control of its concentration in the aqueous matrix. Although techniques such as atomic absorption spectrometry (AAS) and inductively coupled plasma (ICP) are used in its determination, UV-Visible molecular absorption spectrometry for the colorimetric determination is still widely considered as an alternative for analysis, due to the availability of equipment and low costs.

To achieve colorimetric determination of trace metals is necessary to use organic reagents to form chromogenic complexes, which originate specific absorbance responses. Since metals are at trace levels in water, in many cases is required to preconcentrate before carrying out the analysis. In this work, we used the rotating disk sorptive extraction technique (RDSE) on a film of polydimethylsiloxane (PDMS) for preconcentration and subsequent determination by direct UV-Visible solid phase spectrophotometry as a possible methodology to evaluate the content of copper in aqueous matrices. To achieve the spectrophotometric measurement, sodium diethyldithiocarbamate (NaDDTC) was used as a binding reagent to form the chromophore complex $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, which yields an analytical response to a wavelength of 432 nm.

Both physical and chemical factors, and those related to the extraction device were analyzed, which affect the retention of the analyte in the non-polar phase, through multivariate analysis to generate response surfaces. The temperature and pH of the medium were particularly important in the process (the optimum values for 25 mL of sample were 90 ° C and pH 9),

the first parameter influences the mobility of the complex through the bulk of the solution, favoring further diffusion through the stagnant layer of water, while an adequate pH allows to stabilize the anionic form of the reagent, which reacts with the metal ions. It was also found that increasing the amount of free reagent favors the formation of chelates, as indicated by the reaction stoichiometry. This factor is important when working in aqueous media containing interfering metal ions, which can interact with the NaDDTC, reducing their availability. When extracting on matrices containing increasing concentrations of interferents showed quantitative recovery of copper for reagent concentrations in the medium equal to 0.1 mol L^{-1} . It is possible to achieve high rotational speeds due to the use of the disk (1000 rpm optimal) obtaining low extraction times; however the effect was not significant in the study. Upon analyzing the consequences of adding salt to the medium, an adverse effect was observed on extraction, then salting out effect is not appreciated and salt use was discarded. Working under these optimal conditions, the equilibrium times obtained were 30, 53 and 90 min for 100, 500 and 1000-mL water samples.

Subsequently it was possible to determine the analytical parameters which characterize this methodology. The studies showed that the method provided results with low dispersion between measurements (with relative standard deviations of 7.2 and 8.4%) and high accuracy (-4.3% of relative error) for a multi-elemental water standard. This latter study also confirmed the high selectivity for removal of copper as a chromophore over other metal ions. The detection and quantification limits reached values lower than 12 mg L^{-1} and were reduced by decreasing the sample volume analyzed. The sensitivity parameter was also studied, showing an effective increment as sample volume was increased. By this study also indicated the possibility of saturation of PDMS to determine elevated copper matrix volumes of 1 liter, which was resolved by increasing the volume of phase supported on the extraction device, this can be achieved because the disk configuration. This study also indicated the possibility of saturation of the PDMS phase when determining high copper concentrations on elevated matrix volumes (at least 1 liter), this problem was resolved by increasing the volume of phase supported on the extraction device; this can be

achieved due to the disk configuration. Recovery tests on drinking water matrices showed a mean value of 95.6%, then the studied method can quantitatively extract the copper complex on the PDMS. The high concentration of copper in the matrix, the affinity of the complex to the extractant and the fact that no signal coupling of interfering complexes occurs could explain the high recovery of the study. Finally, the studied method was validated by comparison with the ICP-OES spectroscopic technique. Similar results were obtained between both techniques (99,6 and 96,8% for drinking water samples and 102,5% for spiked samples). Due to all conducted studies to optimize parameters and to validate, it was possible to conclude that the methodology allows to successfully extract the chromophore $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ for spectrophotometric analysis through a simple, fast, low-polluting, easily applicable method.

Índice de Contenidos:

I.	Agradecimientos	I
II.	Resumen	III
III.	Summary	VI
1.	Introducción	1
2.	Hipótesis	6
3.	Objetivos	
3.1	Objetivo general	6
3.2	Objetivos específicos	6
4.	Materiales	
4.1	Reactivos	8
4.2	Aparatos e Instrumentos	9
5.	Metodología experimental	
5.1.	Formación del complejo y procedimiento de extracción.....	10
5.2.	Condiciones de trabajo para la optimización de los factores	
1)	Estudio multivariable de factores de temperatura y pH	12
2)	Estudio multivariable de factores de velocidad de rotación, concentración de NaDDTC y agregado de sal	12
3)	Estudio del tiempo de equilibrio (t_e) para la extracción	13
4)	Determinación de parámetros analíticos	13
a.	Estudio de la exactitud del método	13
b.	Estudio de la precisión, a través de repetibilidad y reproducibilidad	13
c.	Determinación de límites de detección y cuantificación	14
d.	Estudio de la sensibilidad del método	14
e.	Determinación de la recuperación del método	14
f.	Estudio del efecto de interferentes en el medio	15
g.	Validación del método por comparación a metodología espectroscópica ICP-OES	15
6.	Resultados y Discusión	
6.1.	Estudio multivariable de la temperatura y pH sobre la extracción ...	16

a.	Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción en fase sólida	19
b.	Efecto del pH del medio sobre el proceso de microextracción en fase sólida	20
6.2.	Estudio multivariable de la velocidad de rotación, concentración de NaDDTC y adición de sal sobre la extracción	21
a.	Efecto de la rotación sobre la transferencia de masa	25
b.	Efecto de la adición de sal	27
c.	Efecto de la concentración de NaDDTC	28
6.3.	Estudio del tiempo de equilibrio para la extracción por RDSE	29
6.4.	Determinación de parámetros analíticos	
a.	Estudio de la exactitud del método.....	32
b.	Estudio de la precisión, a través de repetibilidad y reproducibilidad.....	34
c.	Determinación de límites de detección y cuantificación.....	36
d.	Estudio de la sensibilidad del método.....	38
e.	Determinación de la recuperación del método.....	41
f.	Estudio del efecto de interferentes en el medio.....	42
g.	Validación del método por comparación a metodología espectroscópica ICP-OES.....	45
7.	Conclusiones	48
8.	Bibliografía	51
9.	Apéndices	
9.1.	Apéndice 1	57
9.2.	Apéndice 2	64
9.3.	Apéndice 3	72

Índice de Tablas:

Tabla 1: Diseño multivariable para temperatura y pH al rango de valores definido.....	12
Tabla 2: Diseño multivariable para rotación, adición de sal y concentración de NaDDTC al rango de valores definido.....	12
Tabla 3: Condiciones experimentales para los tres volúmenes (estudio del tiempo de equilibrio).....	13
Tabla 4: Respuestas de absorbancia obtenidas para los factores de temperatura y pH en los rangos evaluados por el diseño experimental.....	17
Tabla 5: Respuestas de absorbancia obtenidas aplicando los factores de rotación, NaCl agregado y concentración de NaDDTC en los rangos evaluados por el diseño experimental.....	21
Tabla 6: Respuestas de absorbancia obtenidas al aplicar los factores estudiados a los niveles indicados por el estudio, para Na ₂ SO ₄ (rotación, adición de sal y concentración de NaDDTC).....	22
Tabla 7: Resultados obtenidos del estudio del tiempo de equilibrio para el proceso de extracción a los volúmenes 100, 500 y 1000 mL.....	30
Tabla 8: Parámetros de la curva de calibración y resultados para el estudio de la exactitud del método.....	33
Tabla 9: Resultados obtenidos para la determinación de la precisión de la metodología estudiada.....	34
Tabla 10: Resultados de desviación para la repetibilidad y reproducibilidad.....	35
Tabla 11: Resultados de LOD y LOQ para un duplicado de 100 mL.....	38
Tabla 12: Resultados de LOD y LOQ para 500 y 1000 mL de muestra.....	38

Tabla 13: Parámetros de curvas de calibración empleadas en el estudio de la sensibilidad.....	40
Tabla 14: Parámetros de curva de calibración para repetición del estudio sensibilidad a 1000 mL.....	40
Tabla 15: Parámetros de curva y valores de recuperación del método aplicado a una matriz de agua potable.....	42
Tabla 16: Recuperación de cobre (como $\mu\text{g L}^{-1}$) desde matrices acuosas en presencia de interferentes.....	43
Tabla 17: Recuperación de cobre porcentual desde matrices acuosas en presencia de interferentes.....	43
Tabla 18: Recuperación de cobre en matrices con concentración creciente de interferentes.....	44
Tabla 19: Parámetros de curva y valores de recuperación de muestras de agua potable por análisis RDSE-espectrofotometría en fase sólida y comparación a técnica ICP-OES.....	46

Índice de Figuras:

Figura 1: Espectro de absorción del complejo CuDDTC_2 de acuerdo a lo indicado en los estudios realizados por Wang y colaboradores.....	10
Figura 2: Esquematización de la metodología general de trabajo para la determinación de cobre presente en matrices acuosas. Pasado un tiempo determinado (dt) el analito se extrae cuantitativamente al PDMS para su cuantificación.....	11
Figura 3: Representación de la superficie de respuesta estimada para temperatura y pH.....	17
Figura 4: La carta de Pareto estandarizada muestra, además de la significancia, si el efecto es positivo o negativo (temperatura y pH).....	18
Figura 5: Grafico de interacción, indica posibles interacciones negativas o positivas entre factores (temperatura y pH).....	18
Figura 6: Formación y depósito de burbujas en la superficie del PDMS.....	20
Figura 7: Superficie de respuesta de los factores estudiados empleando NaCl como sal (rotación, cantidad de NaDDTC y adición de sal).....	22
Figura 8: Diagrama Pareto estandarizado de significancia de efectos (para NaCl).....	23
Figura 9: Interacciones entre los tres factores definidos en el estudio, con A igual a la concentración de ligante, B igual a la concentración de NaCl y C igual a la velocidad de rotación.....	23
Figura 10: Superficie de respuesta de los efectos, con Na_2SO_4 como sal.....	24
Figura 11: Diagrama Pareto de los tres efectos estudiados, con uso de Na_2SO_4	24

Figura 12: Interacción de factores definidos en el estudio, con A igual a la concentración de ligante, B igual a la concentración de Na ₂ SO ₄ y C igual a la velocidad de rotación.....	25
Figura 13: Modelo de difusión de un analito hacia el material extractante.....	26
Figura 14: Esquema de reacción entre el catión Cu ⁺² y el ión ligante DDTC- derivado de la sal sódica ditiocarbámica.....	28
Figura 15: Estudio del tiempo de extracción para un volumen de muestra de 100 mL.....	31
Figura 16: Estudio del tiempo de extracción para un volumen de muestra de 500 mL.....	31
Figura 17: Estudio del tiempo de extracción para un volumen de muestra de 1000 mL.....	32
Figura 18: Resultados obtenidos del estudio de repetibilidad, donde se realizaron 8 mediciones independientes, reutilizando la fase.....	35
Figura 19: Resultados obtenidos del estudio de reproducibilidad, donde se realizaron 6 mediciones independientes, cada una con una fase distinta...	35
Figura 20: Grafico de evaluación de pendientes para estudio de sensibilidad.....	41
Figura 21: Recuperación porcentual de Cu ⁺² (eje X) en presencia de interferentes en el medio.....	43
Figura 22: Espectros de absorción de Cu(DDTC) ₂ (1), Ni(DDTC) ₂ (2), Zn(DDTC) ₂ (3) y Fe(DDTC) ₂ (4) de acuerdo a lo indicado por Backlund Walker y colaboradores.....	45
Figura 23: Espectro de la luz ultravioleta y visible, con las longitudes de onda expresadas en nm.....	57
Figura 24: Algunos fenómenos de dispersión del haz de luz en el recipiente o la solución.....	60

Figura 25: Esquema instrumental del espectrofotómetro UV-Visible de doble haz, con haces separados en el tiempo.....	61
Figura 26: Disco rotatorio con PDMS soportado (A) antes y (B) después de la extracción de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de MG en aguas, y espectro de absorción del MG determinado por espectrofotometría en fase solida.....	62
Figura 27: Esquema de los mecanismos que conforman el proceso de sorción sobre un extractante.....	65
Figura 28: Representación espacial del complejo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ en el plano xy definido sobre el metal central.....	73

1. Introducción

El análisis de las posibles propiedades ligantes de los alquilditiocarbamatos se inició en el año 1908 gracias a Delepine, sin embargo no fue hasta fines de la década del 30 que comenzó la aplicación de este tipo de compuestos en el campo de la química analítica al estudio de metales, debido a su capacidad de formar quelatos estables y generar complejos metálicos insolubles en agua que pueden solubilizarse en solventes orgánicos para su extracción ^{1,2}. Distintos autores han utilizado derivados del dietilditiocarbamato (DDTC) considerando una característica afín de muchos de los complejos formados: su coloración. A través de métodos de extracción líquido-líquido empleando solventes como cloroformo, hexano y tetracloruro de carbono, fue posible separar los complejos de las matrices acuosas. Es posible realizar la determinación y cuantificación mediante la técnica de espectrofotometría de los metales debido a los distintos colores de los complejos formados ²⁻⁴. Estos ensayos permitieron demostrar que esta técnica, junto con determinar en forma efectiva el metal objetivo, presenta una alta sensibilidad permitiendo la medición de cantidades traza siendo necesaria la eliminación de los interferentes para llevar a cabo la determinación. Los estudios confirmaron que la extracción sigue la ley de Beer, de forma que es posible relacionar la absorbancia como respuesta a la concentración de metal extraído como complejo con dietilditiocarbamato ³.

La determinación colorimétrica de metales objetivo a través de espectrofotometría usando el DDTC continuó en la década del 50, con nuevos estudios que incluían, por ejemplo, la determinación simultánea de cobre (Cu), cobalto (Co) y níquel (Ni) de una matriz acuosa, siendo esto posible a través de expresiones que relacionan la concentración de cada metal con diferencias de absorbancia a los valores de longitud de onda donde aparecen los máximos de absorción ³. La mayoría de estos estudios fueron empleados para el análisis de metales en diferentes tipos de matrices acuosas como agua de mar, vino, tintes, muestras de origen biológico, etc.

Los avances en el campo de la química analítica han permitido integrar la reacción de los ditiocarbamatos a técnicas de mayor complejidad que la espectrofotometría UV directa, permitiendo lograr determinaciones a niveles

ultra traza de concentración de los analitos. Un ejemplo a considerar emplea la técnica de HPLC en fase inversa acoplado a un sistema de detección electroquímica (LCEC) para determinar cobre al estado del complejo de cobre-dietilditiocarbamato (Cu-DDTC_2) en medio acetonitrilo-agua. La detección electroquímica permitió la cuantificación de Cu a niveles menores a 1 ng gracias a la capacidad del Cu-DDTC_2 de sufrir oxidaciones y reducciones reversibles con transferencia de un electrón ⁴. Un ejemplo más reciente considera el trabajo realizado por Wen y colaboradores (2011), para la determinación de cobre y cadmio desde muestras de agua y de alimento mediante la técnica de microextracción líquido- líquido dispersiva (DLLME), junto a su cuantificación mediante espectrofotometría UV-visible, usando DDTC como el reactivo quelante para cobre. El uso de DLLME permitió obtener una alta sensibilidad además de las ventajas asociadas al uso de una instrumentalización espectrofotométrica, como su simpleza y bajo costo ⁵.

Uno de los metales más estudiados a través de la reacción de complejación con ditiocarbamatos y en específico con DDTC, es el cobre, elemento biológicamente esencial para distintos organismos incluido el ser humano, cuando se encuentra en concentraciones a nivel traza. Sus potenciales de ionización para el electrón $4s^1$ y del orbital electrónico $3d^{10}$ son bajos, es decir, estos electrones se liberan fácilmente para obtener los estados iónicos cuproso (Cu^{+1}) y cúprico (Cu^{+2}). El ión cúprico es la forma más frecuente en que el cobre se encuentra en el medioambiente, incluyendo matrices acuosas, y además es la forma más tóxica para los organismos vivos ⁶. Estudios demuestran la necesidad de mantener los niveles de cobre en el organismo dentro de rangos aceptables de acuerdo a la legislación ambiental de cada país, de hecho se puede mencionar que la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, del inglés Environmental Protection Agency) registra al Cu^{+2} como uno de los contaminantes de mayor prioridad, a su vez la Organización Mundial de la Salud recomienda un máximo aceptable de $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ en el agua potable ⁷, mientras que se acepta un límite máximo de concentración de Cu^{+2} en aguas de 1 mg L^{-1} a nivel nacional ⁸, y esto se debe a que altas dosis de cobre pueden generar serias consecuencias a nivel de salud pública, incluyendo efectos carcinógenos y la aparición de cirrosis en etapas de niñez, además de enfermedades

toxicológicas ya que puede depositarse en el cerebro, piel, hígado y páncreas generando vómitos y náusea, dolores de cabeza, dificultades respiratorias, fallas de hígado y riñón junto a contaminar el medioambiente ^{7,9}.

Sin embargo las técnicas previamente mencionadas, junto con el incremento de sensibilidad, también traen una serie de inconvenientes a resolver. Estas dificultades incluyen la necesidad de llevar a cabo un paso de extracción líquido-líquido para separar o preconcentrar al complejo desde el medio lo que involucra posibles pérdidas del analito, así como la necesidad de emplear una gran cantidad de solventes orgánicos, no solo en la etapa de extracción sino que también para ejecutar las técnicas analíticas de medición. Para evitar estos inconvenientes, se hace necesario implementar metodologías de trabajo simples y de bajo costo, que generen una menor cantidad de elementos contaminantes, y que a su vez entreguen resultados confiables, con una elevada sensibilidad y permitan obtener altas recuperaciones del analito.

Tomando en cuenta lo anterior, la extracción en fase sólida se ha convertido en la alternativa más usada para el estudio de elementos traza en distintas matrices, al cumplir con todas las consideraciones anteriores y ser muy versátil en cuanto a los extractantes disponibles para usar. Como ejemplo es posible mencionar, el estudio de la eficiencia del DDTC como agente quelante de cobre, plomo y hierro desde muestras de vinos de fruta y sus destilados, a través de espectroscopia de absorción atómica. Se consideró la extracción en fase sólida como una etapa de preconcentración y separación de los complejos de DDTC de otros posibles interferentes presentes en la matriz, empleándose cartuchos de C₁₈ que presentan una alta afinidad de retención de los complejos de los metales mencionados ¹⁰.

Un material extractante emergente es la espuma de poliuretano. Existe una amplia variedad de trabajos que describen su uso para propósitos analíticos, desde los primeros estudios realizados por Bowen que empleaban espumas estables e inertes de poliéter o poliéster entrecruzadas por conexiones amido y cargadas con dietiléter como extractante ¹¹. Este material extractante se ha extendido para el análisis de distintos compuestos, como por ejemplo drogas anti inflamatorias no esteroideas ¹², y también se ha usado en la

determinación de Cu^{+2} como complejo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ donde se utilizó espuma no cargada y se realizó una caracterización cinética de la extracción, demostrándose que el proceso estaba determinado por una etapa de difusión a través del film estático ¹³.

Una metodología recientemente desarrollada para llevar a cabo procesos de preconcentración es la denominada extracción por sorción en disco rotatorio (rotating disk sorptive extraction, RDSE) la cual considera un disco de politetrafluoroetileno de aproximadamente 1,5 cm. de diámetro en cuyo interior se integra una barra magnética, lo que permite que el disco gire en su propio eje al ser puesto sobre un agitador magnético, produciendo un vórtice. Este vórtice, provoca un movimiento de convección en la solución en dirección al disco el cual permite lograr la transferencia de masa del analito. A su vez, la geometría del disco entrega la posibilidad de usar la cara expuesta al medio o solución como soporte de diferentes materiales extractantes. El sistema RDSE presenta un principio de funcionamiento similar al de una barra de agitación, en la metodología de extracción por fase inmobilizada en barra de agitación (stir bar sorptive extraction, SBSE), sin embargo la extracción RDSE presenta ventajas notorias sobre el sistema SBSE. En primer lugar, para llevar a cabo la extracción en SBSE se hace necesario recubrir la barra de agitación en su totalidad con el material extractante lo que genera una pérdida de la fase por la fricción generada entre ésta y la superficie del vial de extracción, debido a la misma agitación que ocurre, lo que conlleva a posibles pérdidas de analito, y a su vez limita condiciones de trabajo de importancia como la temperatura del medio y la velocidad de rotación máxima con la que se puede trabajar. En segundo lugar, ya que es posible alcanzar altas velocidades de rotación, se disminuye el tamaño de la capa estática de agua sobre la superficie del PDMS, facilitando la transferencia de masa del analito a la fase. En tercer lugar gracias a que los materiales extractantes se pueden retirar fácilmente desde el disco, y estos materiales pueden ser reutilizados luego de someterlos a un proceso de desorción con un solvente adecuado, la técnica RDSE resulta de menor costo y más fácil de manipular que la técnica SBSE. En cuarto lugar, la configuración del disco permite una mayor área de contacto del material extractante inmobilizado con la solución, lo que resulta en una mayor

velocidad de extracción ^{14,15}. Por ejemplo, la técnica RDSE se ha usado en la extracción de nonilfenol, un surfactante no iónico de baja polaridad, desde matrices acuosas por uso de PDMS. Se pudo confirmar gracias a este estudio todas las ventajas ya mencionadas que presentaba la técnica RDSE sobre la técnica SBSE como aumento de la capacidad de extracción, velocidad de rotación, temperatura del medio, etc. ¹⁴. Como última ventaja operacional a mencionar, la técnica RDSE permite la medición de analitos coloreados directamente desde el material extractante mediante espectrofotometría en fase sólida, lo que evita realizar la desorción líquida, por lo que se reduce el riesgo de pérdidas del analito y además se elimina totalmente el uso de solventes. Para ejemplificar este último punto, esta metodología ha sido empleada para la determinación de verde de malaquita, un compuesto orgánico empleado como tinte, agente fungicida y antibacterial en acuicultura ¹⁶. En este caso, se usó PDMS que puede retener al catión del verde de malaquita para su determinación a través de espectrofotometría de luz visible como una señal de absorbancia con máximo a una longitud de onda de 624 nm. La determinación se realiza directamente sobre la fase empleando soportes de vidrio, sin la necesidad de desorber con un solvente orgánico ¹⁵.

Es así como el objetivo de este trabajo consiste en desarrollar y optimizar una metodología que permita establecer y cuantificar la presencia de cobre en matrices acuosas (en su forma cúprica) por formación de un quelato cromóforo usando como agente ligante dietilditiocarbamato de sodio (NaDDTC), implementando como técnica de extracción el uso del disco rotatorio con PDMS soportado actuando como fase extractante apolar, y determinando los complejos formados a través de la recientemente desarrollada técnica de espectrofotometría en fase sólida.

2. Hipótesis

Una metodología analítica basada en extracción por sorción en disco rotatorio con fase de polidimetilsiloxano permitiría la extracción de los complejos neutros de dietilditiocarbamato de cobre desde matrices acuosas y la determinación del analito por lectura directa en la fase sólida a través de espectrofotometría UV-VIS.

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Desarrollar una metodología analítica para la determinación de cobre a niveles traza, a través de la formación de un complejo coloreado por reacción con DDTC el que es extraído por RDSE y evaluado por espectrofotometría UV-visible directa en fase sólida.

3.2 Objetivos Específicos

- Determinación del espectro de absorción del complejo de cobre con dietilditiocarbamato Cu-DDTC₂.
- Desarrollo de metodología de extracción del complejo Cu-DDTC₂ desde matrices acuosas que considera el uso de la técnica de extracción por disco rotatorio RDSE.
- Determinación de las variables físicas, químicas y aquellas relacionadas al sistema RSDE que afectarían la extracción del complejo Cu-DDTC₂.

- Optimización de las variables de extracción mediante un diseño experimental.
- Evaluación de la influencia de metales interferentes presentes en la matriz acuosa en la microextracción del complejo Cu-DDTC₂.
- Validación de la metodología de extracción desarrollada por comparación con alguna metodología estándar (ICP-OES) y empleo de material de referencia certificado adecuado.
- Análisis de muestras acuosas reales e interpretación de los resultados obtenidos.

4. Materiales

Para el desarrollo de este trabajo, se requirieron los siguientes materiales, que incluyen tanto los referidos a reactivos empleados como los elementos instrumentales:

4.1. Reactivos:

Todos los reactivos usados son de grado analítico o mayor (Merck, a menos que se indique lo contrario), y todas las soluciones se preparan con agua de alta pureza obtenida de un sistema de purificación de aguas Milli-Q PLUS.

- Estándar titrisol de Cu cuya concentración es 1000 mg en 500 mL. Otras concentraciones se prepararon por dilución de esta solución estándar. Todas las soluciones se mantuvieron almacenadas a 4 °C.
- Dietilditiocarbamato de sodio trihidratado (reactivo del cobre) para análisis ACS el cual es almacenado entre +3 a +4 °C, Se preparó una solución del ligante NaDDTC de 0,1 M en agua. Se trabajó a concentraciones menores del complejante por dilución de esta solución base cuando así sea requerido. Todas estas soluciones fueron almacenadas a temperatura ambiente previas a su uso.
- Solución buffer de fosfato 0,1 M a pH 9. Se preparó pesando 17,79 g disueltos en 1 litro de agua y se empleó una solución de NaOH 0,1 M para llevar la solución final al pH deseado.
- Estándares de cobalto (Co), cadmio (Cd), níquel (Ni), hierro (Fe), zinc (Zn) y plomo (Pb), todos de concentración de 1000 mg en 500 mL. Concentraciones menores se prepararon por dilución de estas soluciones.
- Estándar de control de calidad ICP multielemento QCS-19 con concentración de Cu de 100 µg/mL (High-Purity Standards). Se diluyeron alícuotas de esta solución para su posterior uso.
- Fase extractante de alta transparencia de polidimetilsiloxano (PDMS). Las fases de PDMS empleadas en este trabajo se

sintetizaron a partir de un kit de elastómero de silicona Slygard-184, obtenida de Dow Corning Co. de acuerdo a las condiciones indicadas por el fabricante. Las fases obtenidas presentan un espesor (2 mm) y diámetro (1,5 cm aprox.) ideales para ser soportadas sobre el disco rotatorio a través de una gota de silicona.

4.2. Aparatos e Instrumentos

- Discos de teflón de 1,5 cm de diámetro, los que contienen en su interior una barra magnética que permite su agitación. Sobre una de las caras del disco fue soportado el material extractante.
- Agitador magnético MR-3002 con control de temperatura y velocidad de rotación máxima de 1250 rpm (Heidolph).
- pH/ION metro modelo pMX 3000/pH (WTW).
- Equipo de espectrofotometría de absorción molecular UV/Visible UV2 (UNICAM).
- Equipo de espectroscopía de plasma acoplado a espectrofotometría de emisión óptica (ICP-OES) para la validación de la metodología (provisto por AGQ Labs & Technological Services)
- Debido a la naturaleza de la determinación se usaron placas de vidrio que permiten soportar la fase al haz de luz del espectrofotómetro.
- Mezclador vortex KMC-1300V (VISION Scientific Co.)
- Placa de Teflón con moldes circulares de 1,5 cm para la gelificación del PDMS.

5. Metodología experimental

5.1. Formación del complejo y procedimiento de extracción:

Se agrega una alícuota de muestra o estándar a un volumen final de 25 a 1000 mL de solución en matraces Erlenmeyer. Se agrega una alícuota de solución de NaDDTC 0,1 M para alcanzar una concentración $5 \times 10^{-3} \text{M}$ y se ajusta el pH a 9,0 mediante la adición de una alícuota de buffer $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M. El volumen de muestra se calienta a una temperatura de 90°C . Posteriormente el disco rotatorio con PDMS es puesto al interior del matraz, en contacto directo con la matriz. El matraz es puesto sobre el agitador magnético, para lograr la extracción del complejo de cobre en la fase de PDMS, con una velocidad de rotación de 1000 rpm. Luego de realizada la extracción, la fase se separa del disco y se limpia con acetona para retirar los residuos de silicona, luego se lava con agua milli-Q y se seca. El film es puesto en un soporte de placas de vidrio y luego se inserta en el haz de luz del espectrofotómetro UV-visible. Para determinar el complejo se mide la absorbancia de la señal analítica generada (Fig. 1) cuyo máximo, para este estudio, está en los 432 nm, contra una fase de PDMS como blanco que es puesto en el segundo soporte del equipo espectrofotométrico (Fig. 2). Una descripción más detallada de esta técnica de determinación se indica en el Apéndice 1.

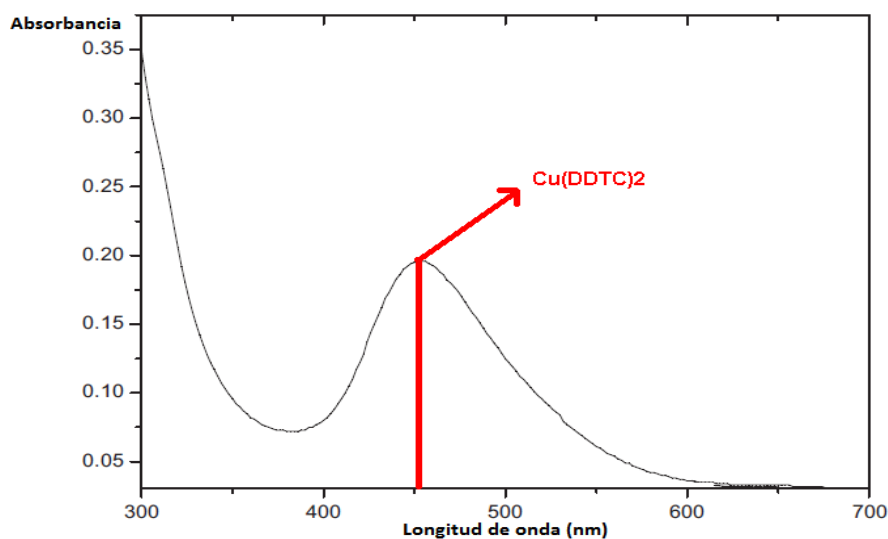


Figura 1: Espectro de absorción del complejo CuDDTC_2 de acuerdo a lo indicado en los estudios realizados por Wang y colaboradores ¹⁷

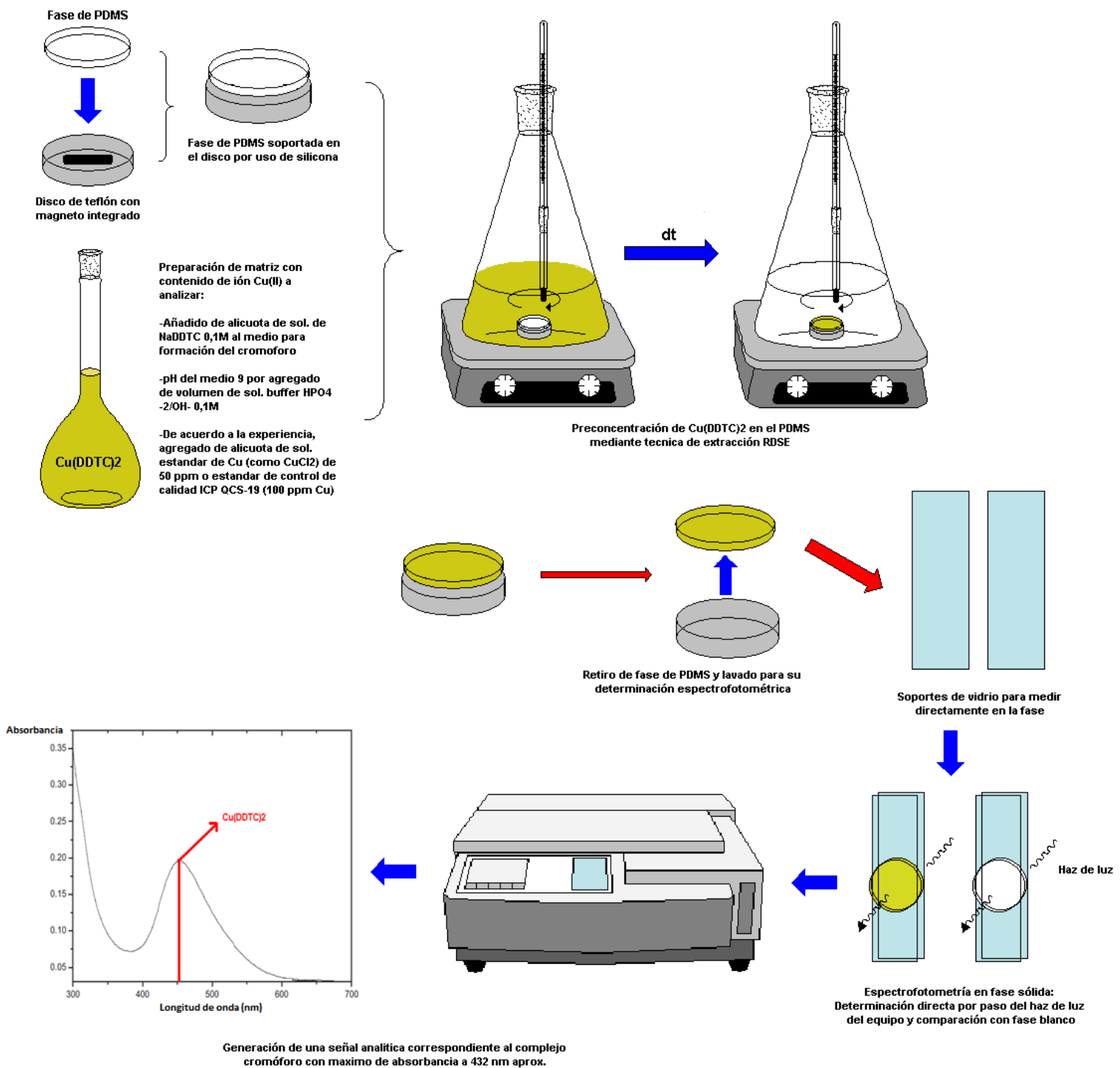


Figura 2: Esquematación de la metodología general de trabajo para la determinación de cobre presente en matrices acuosas. Pasado un tiempo determinado (dt) el analito se extrae cuantitativamente al PDMS para su cuantificación.

5.2. Condiciones de trabajo para la optimización de los factores:

1) Estudio multivariable de factores de temperatura y pH:

Se planteó el diseño experimental para 20 mediciones considerando los factores experimentales y variables de respuestas indicados:

Tabla 1: Diseño multivariable para temperatura y pH al rango de valores definido:

Factor	Valor bajo	Valor alto	
Temperatura	-1,0 (45°C)	+1,0 (90°C)	
pH	-1,0 (3,0)	+1,0 (10,0)	
Variable de respuesta	Absorbancia		
Condiciones experimentales (para volumen de 25 mL)			
Tiempo extracción	30 minutos	Concentración NaDDTC	5*10 ⁻⁴ M
Velocidad rotación	1250 rpm	Concentración Cu(Cu ⁺²)	500 µg L ⁻¹

2) Estudio multivariable de factores de velocidad de rotación, concentración de NaDDTC y adición de sal:

Se planteó un diseño experimental desde 16 mediciones para los factores experimentales y variables de respuesta indicados, donde los valores naturales se indican en paréntesis. Se emplearon NaCl y Na₂SO₄ como sales en estudio. Las condiciones experimentales de trabajo se muestran en la tabla:

Tabla 2: Diseño multivariable para rotación, adición de sal y concentración de NaDDTC al rango de valores definido:

Factor	Valor bajo	Valor alto	
Velocidad de rotación (rpm)	-1,0 (750)	+1,0 (1250)	
Sal agregada (%p/v)	-1,0 (0)	+1,0 (10)	
Concentración NaDDTC (M)	-1,0 (10 ⁻⁵)	+1,0 (10 ⁻³)	
Variable de respuesta	Absorbancia		
Condiciones experimentales (para volumen de 25 mL)			
Tiempo extracción	30 minutos	Temperatura	90°C
pH del medio	9,0	Concentración Cu(Cu ⁺²)	500 µg L ⁻¹

3) Estudio del tiempo de equilibrio (t_e) para la extracción:

Se emplearon tres volúmenes de matriz (100, 500 y 1000 mL), y se procedió a realizar la extracción incrementando el tiempo del proceso. Cuando la señal se tornó constante, se determinó el parámetro t_e por interpolación gráfica. Cada punto del gráfico se trabajó en triplicado, determinándose el promedio y la desviación estándar:

Tabla 3: Condiciones experimentales para los tres volúmenes:

Velocidad rotación	1000 rpm	Temperatura	90°C
pH del medio	9,0	Concentración Cu(Cu ⁺²)	30 µg L ⁻¹
Concentración NaDDTC	5*10 ⁻³ M		

4) Determinación de parámetros analíticos:

a. Estudio de la exactitud del método:

Se realizaron ensayos de exactitud sobre un estándar de control multielemental QCS-19 de concentración de Cu igual a 100 µg mL⁻¹. Se tomaron 5 alícuotas de esta solución (25 µL) y cada una se diluyó con agua milli-Q a 100 mL para obtener una concentración igual a 25 µg L⁻¹. Se interpolaron los resultados a la curva de calibración empleada para determinar la concentración. Por último se obtuvieron los valores de error relativo porcentual (%ER). En este estudio se emplearon las condiciones óptimas indicadas en la sección 5.1.

b. Estudio de la precisión, a través de repetibilidad y reproducibilidad:

Para estudiar la repetibilidad se trabajó con una batería de 8 soluciones de concentración de cobre de 30 µg L⁻¹ preparados en agua milli-Q en 100 mL. El dispositivo de extracción usado (disco + fase de PDMS) es el mismo para cada medición, reutilizándose el material previa desorción con metanol. Luego se determinó la desviación estándar relativa porcentual entre las señales.

Para los estudios de reproducibilidad se trabajó con una batería de 6 soluciones de concentración de cobre de 30 µg L⁻¹ preparados en agua ultra

pura a 100 mL. Se empleó un dispositivo de extracción diferente en cada medición. Finalmente se determinó la desviación estándar relativa porcentual entre señales. En ambos estudios se consideraron las condiciones experimentales definidas en la sección 5.1.

c. Determinación de límites de detección y cuantificación:

Se utilizaron curvas de calibración en un rango de concentración entre 3 - 15 $\mu\text{g L}^{-1}$ y tiempo de extracción de 30 minutos. Otras curvas fueron preparadas incrementando el volumen de muestra a 500 y 1000 mL en el mismo rango y tiempos de 90 minutos para evaluar cambios en los valores de los límites. Cada punto de curva fue medido en triplicado en condiciones experimentales definidas en la sección 5.1.

d. Estudio de la sensibilidad del método:

Se estudió la sensibilidad del método como valor de la pendiente de curvas de soluciones de cobre en agua ultra pura, a volúmenes de 100, 500 y 1000 mL para un rango de concentración entre 10 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ en triplicado. En caso de producirse saturación, se trabajó con un set de fases de mayor volumen de PDMS. El promedio en masa de las fases empleadas fue de 0,40 g y 0,54 g. Las condiciones de trabajo se indican en la sección 5.1.

e. Determinación de la recuperación del método:

Se emplearon 5 muestras de agua potable obtenidas del sistema de abastecimiento de agua que fueron fortificadas con 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ de solución de cobre a un volumen de 100 mL. Se determinó la concentración por interpolación a una curva de calibración en un rango de 25 - 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Cada punto de curva se trabajó en triplicado. Se obtuvo la recuperación porcentual (R%) en función de expresiones indicadas en la sección de Resultados y Discusión. Se logra la recuperación cuantitativa cuando R% está entre 80 a 120%. Las condiciones experimentales quedan definidas en la sección 5.1.

f. Estudio del efecto de interferentes en el medio:

Se evaluó la eficiencia de extracción para un medio conteniendo como iones interferentes Co, Cd, Fe, Ni, Zn y Pb, en una concentración tanto de Cu como de interferente igual a $40 \mu\text{g L}^{-1}$, y se incrementó la concentración de NaDDTC desde 10^{-3} hasta $10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$. Por comparación al valor obtenido al analizar muestras conteniendo solo Cu, se determinó el porcentaje de Cu recuperado para cada interferente. Cada punto a determinar se obtuvo como medición de un triplicado de muestras. A su vez, se evaluó el efecto del incremento de concentración de interferentes sobre la extracción de Cu. Se trabajó en un rango de concentración entre 25 a $2500 \mu\text{g L}^{-1}$ para cada interferente y se determinó la absorbancia del complejo de Cu para cada punto. Como en el caso anterior, se trabajó con una concentración de cobre de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ y 10^{-3} M de NaDDTC. En ambos casos, se trabajó en las condiciones definidas en la sección 5.1 y un volumen final de 100 mL.

g. Validación del método por comparación a metodología espectroscópica ICP-OES:

Se validaron los resultados obtenidos del análisis de muestras de agua potable usando la metodología planteada respecto al método ICP-OES. Se enviaron dos muestras de agua potable de 500 mL, y una muestra fortificada con $30 \mu\text{g L}^{-1}$ de solución de Cu al mismo volumen para su estudio en el espectrómetro de plasma en el laboratorio Agriquem América (Acreditado INN NCh 17025). En forma paralela se estudiaron tres muestras de agua potable en las mismas condiciones a las anteriores usando el método RDSE acoplado a espectrofotometría. Las condiciones experimentales se indican en la sección 5.1. Se comparó la concentración de cobre obtenida de cada método por muestra para establecer el grado de concordancia de los resultados entre técnicas y evaluar la capacidad analítica del método estudiado.

6. Resultados y Discusión

Al momento de optimizar los factores que influyen en el proceso de extracción se determinó que para el primer estudio multivariable, se consideraron aquellas variables que influirían sobre la posibilidad de que ocurran contactos efectivos para la formación del complejo: la temperatura (que afectaría la movilidad del ion ligante en la solución) y el pH (para la estabilización de la especie iónica a reaccionar). Una tercera variable de importancia en la formación de complejo, la concentración de NaDDTC, finalmente es incluida con las de concentración de sal y velocidad de rotación del disco en un segundo estudio. Estas dos últimas variables influirían principalmente sobre el comportamiento del cromóforo sobre el PDMS por lo cual se agrupan en el mismo estudio: mientras que el añadir NaCl o Na₂SO₄ al medio reduciría la solubilidad del complejo, favoreciendo su extracción al PDMS, la velocidad de rotación actuaría sobre el movimiento del analito hacia la fase (específicamente en la reducción de la capa estancada de agua que recubre la fase) favoreciendo su transferencia al PDMS. Cada factor (y su importancia sobre el proceso de extracción) será tratado en forma independiente en las secciones siguientes.

6.1. Estudio multivariable de la temperatura y pH sobre la extracción:

Se obtuvieron los resultados de absorbancia de las mediciones solicitadas por el diseño experimental (Tabla 4), luego, es posible obtener la superficie de respuesta de los factores estudiados (Fig. 3) y el diagrama de Pareto para la evaluación de sus significancias e interacciones sobre la extracción. Para esta y posteriores experiencias, se midió cada fase en tres ocasiones para que el haz de luz atravesase la mayor área del PDMS posible. El análisis y optimización del diseño reveló que, para un máximo de absorbancia de 0,237, los valores óptimos de los factores son 90°C para temperatura y pH 9,41. Se seleccionó finalmente pH 9 para no degradar el extractante.

Tabla 4: Respuestas de absorbancia obtenidas para los factores de temperatura y pH en los rangos evaluados por el diseño experimental:

Medición	Temperatura (°C)	pH	Abs
1	45	6	0,080
2	45	8	0,076
3	45	10	0,070
4	90	6	0,232
5	90	8	0,206
6	90	10	0,249
7	67	6	0,136
8	67	8	0,121
9	67	8	0,099
10	67	8	0,085
11	67	10	0,114
12	45	3	0,027
13	67	3	0,032
14	90	3	0,042
15	45	4	0,045
16	67	4	0,069
17	90	4	0,070
18	45	5	0,056
19	67	5	0,130
20	90	5	0,191

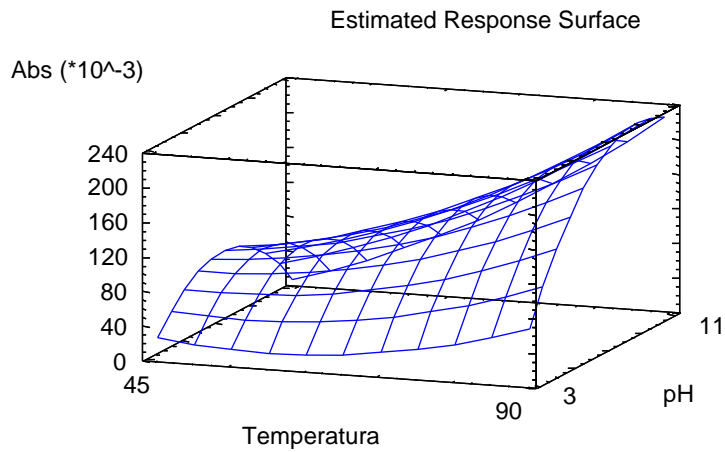


Figura 3: Representación de la superficie de respuesta estimada para temperatura y pH.

Tanto la formación del complejo como su transporte hacia el extractante fue favorecida a alta temperatura (90°C) y pH básico (pH 9,41). Se puede inferir que ambos factores poseen un grado de importancia sobre el proceso. A través del diagrama de pareto (Fig. 4) se determinó la influencia de los factores y sus interacciones:

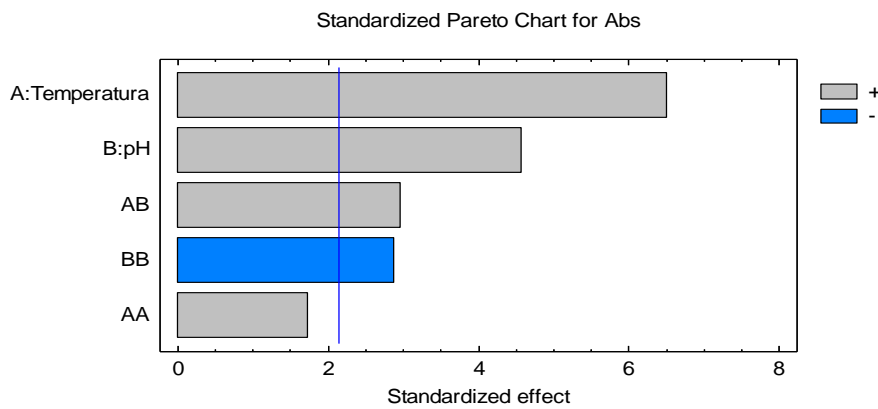


Figura 4: La carta de Pareto estandarizada muestra, además de la significancia, si el efecto es positivo (provoca aumento de la respuesta) o negativo (provoca disminución).

El diagrama de Pareto indica que la temperatura y el pH presentan un efecto significativo y positivo sobre la extracción al igual que la interacción entre ambas. El efecto estandarizado de la temperatura es más significativo y tiene mayor influencia en la extracción.

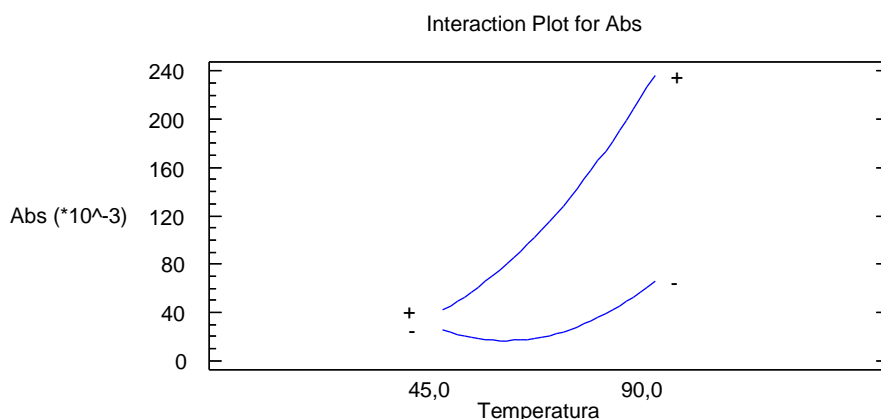


Figura 5: Grafico de interacción, indica posibles interacciones negativas o positivas entre factores.

En la Figura 5 se observa una interacción positiva: al aumentar la temperatura a mayor pH, el incremento de respuesta es mayor que a menor pH lo que se explica ya que una mayor temperatura, favorece la movilidad del ion DDTC^- que a su vez es estabilizado a pH 9,0. Esto aumenta la posibilidad de contacto del ligante con el ión Cu^{+2} , provocando la transferencia de carga electrónica desde los grupos S del ligando hacia el metal y favoreciendo la formación del cromóforo extraíble en el PDMS.

a. Efecto de la temperatura sobre el proceso de microextracción en fase sólida:

De acuerdo a los resultados del estudio multivariable, se observa que la mayor extracción se logra a temperaturas elevadas (sin llegar a ebullición) siendo 90°C el valor óptimo, y al analizar la carta de Pareto es posible notar que la temperatura es un efecto significativo positivo ¹⁸. Este resultado se explica, ya que la mayor temperatura favorece en primer lugar, el

movimiento molecular convectivo a través del seno de la solución generado por la rotación del disco. En segundo lugar, se debe considerar que un fenómeno de difusión permite la transferencia de masa del complejo a través de la capa estática de agua. Para que ocurra esta difusión se debe alcanzar una temperatura tal que permita superar aquellas barreras energéticas que impidan el movimiento de las partículas. Desde las leyes de Fick es posible derivar la siguiente expresión para el coeficiente de difusión (D):

$$D = D_0 \exp\left(-\frac{Q_D}{RT}\right) \text{ (Ecuación 1)}$$

Donde Q_D indica la energía de activación necesaria para lograr la difusión en unidades de J (mol)^{-1} , $R = 8,314 \text{ J (mol K)}^{-1}$, T es la temperatura aplicada al sistema (en grados K), y D_0 es un término pre-exponencial de unidad $\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$ de difusión espontánea e independiente de la temperatura y concentración, mostrando que se requiere una temperatura elevada para alcanzar la energía requerida para lograr la difusión en el film ¹⁹. Si se considera que la difusión es la etapa determinante de la velocidad una temperatura de 90°C entrega al sistema energía suficiente para que las moléculas puedan difundir a través del film estático hacia el PDMS donde son absorbidas ^{19,20}. Además de favorecer la movilidad, las altas temperaturas también afectan la viscosidad del medio, estos parámetros se pueden relacionar a través de modelos matemáticos indicando que la mayor temperatura permite reducir las fuerzas de cohesión entre moléculas de solución, lo que genera como consecuencia la reducción de la viscosidad.

Los resultados indican que trabajar a temperaturas mayores a 90°C reduce la absorbancia leída desde el PDMS debido a la formación de burbujas de vapor, que impiden la correcta transferencia de masa del complejo al depositarse en la superficie del material ¹⁵ actuando como una barrera física (Fig. 6). El control de la temperatura y la agitación del disco a altas velocidades permiten liberar las burbujas que se encuentran débilmente soportadas sobre el PDMS.

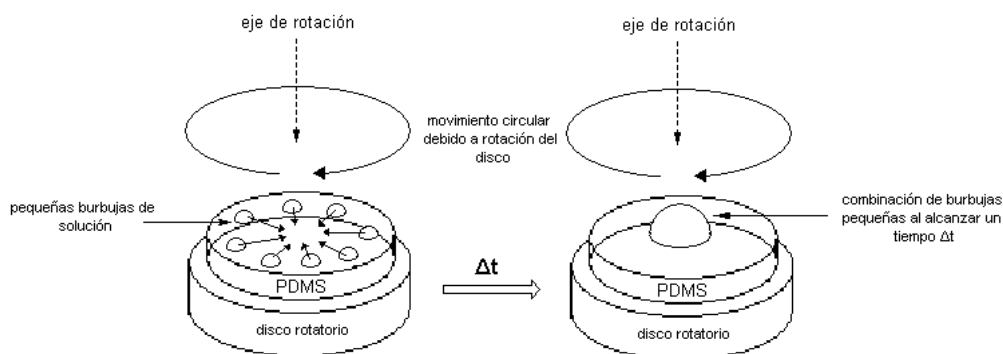
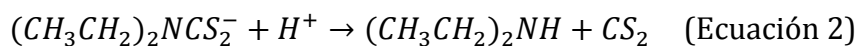


Figura 6: Formación y depósito de burbujas en la superficie del PDMS.

b. Efecto del pH del medio sobre el proceso de microextracción en fase sólida:

Para lograr que la especie metálica sea retenida en el PDMS esta debe existir en su forma complejada no iónica, luego, el parámetro de pH adquiere especial importancia: alcanzado un valor óptimo, se favorece la existencia y estabilización de la especie iónica $DDTC^-$ la cual reacciona con el catión para la formación del cromóforo. Para este estudio, se determinó un pH óptimo de 9,41, permitiendo alcanzar la mayor recuperación del analito y siguiendo el comportamiento indicado por distintos autores ^{21,22}. A pH mayor al óptimo hay reducción de la respuesta analítica que se explica por un fenómeno de hidrólisis que sufre el ión Cu^{+2} en medio altamente básico, formándose $Cu(OH)_2$, reduciendo la disponibilidad de iones Cu^{+2} para reaccionar con los iones de ligante presentes en el medio. Las bajas respuestas en los valores de pH ácidos estudiados se deben a la descomposición del ion dietilditiocarbamato ²³, de acuerdo a:



Es importante considerar que si bien la mayor eficiencia de extracción se logra en condiciones básicas algunos autores recomiendan no trabajar a pH > 9,0 para evitar la degradación de la fase de PDMS ^{24,29}.

6.2. Estudio multivariable de velocidad de rotación, concentración de NaDDTC y adición de sal sobre la extracción:

Se obtuvieron los resultados de absorbancia de las mediciones solicitadas por el diseño (Tablas 5 y 6) y se determinó la superficie de respuesta de los factores estudiados y el diagrama de Pareto para la evaluación de sus significancias e interacciones sobre la extracción.

Tabla 5: Respuestas de absorbancia obtenidas aplicando los factores de rotación, NaCl agregado y concentración de NaDDTC en los rangos evaluados por el diseño experimental:

Medición	Ligante (M)	% NaCl (p/v)	Rotación (rpm)	Abs
1	1,00 E-4	5	1250	0,129
2	1,00 E-4	5	750	0,098
3	1,00 E-5	0	1250	0,259
4	1,00 E-3	10	750	0,159
5	1,00 E-3	0	1250	0,142
6	1,00 E-3	5	1000	0,092
7	1,00 E-5	0	750	0,240
8	1,00 E-4	10	1000	0,139
9	1,00 E-5	10	1250	0,117
10	1,00 E-3	10	1250	0,133
11	1,00 E-5	10	750	0,112
12	1,00 E-3	0	750	0,093
13	1,00 E-4	0	1000	0,224
14	1,00 E-5	5	1000	0,167
15	1,00 E-4	5	1000	0,246
16	1,00 E-4	5	1000	0,188

Tabla 6: Respuestas de absorbancia obtenidas al aplicar los factores estudiados a los niveles indicados por el estudio, para Na₂SO₄:

Medición	Ligante (M)	% Na ₂ SO ₄ (p/v)	Rotación (rpm)	Abs
1	1,00 E-4	5	1250	0,227
2	1,00 E-4	5	750	0,260
3	1,00 E-5	0	1250	0,243
4	1,00 E-3	10	750	0,145
5	1,00 E-3	0	1250	0,121
6	1,00 E-3	5	1000	0,118
7	1,00 E-5	0	750	0,267
8	1,00 E-4	10	1000	0,186
9	1,00 E-5	10	1250	0,101
10	1,00 E-3	10	1250	0,169
11	1,00 E-5	10	750	0,160
12	1,00 E-3	0	750	0,124
13	1,00 E-4	0	1000	0,235

14	1,00 E-5	5	1000	0,223
15	1,00 E-4	5	1000	0,169
16	1,00 E-4	5	1000	0,180

Al adicionar solución de NaCl al sistema (Fig. 7), la optimización del diseño entregó los siguientes valores óptimos: concentración de ligante óptima a nivel 1.0 (10^{-3} M NaDDTC), concentración de sal a nivel -0.999992 (0% p/v NaCl), y velocidad de rotación a nivel 0,273687 (1068 rpm).

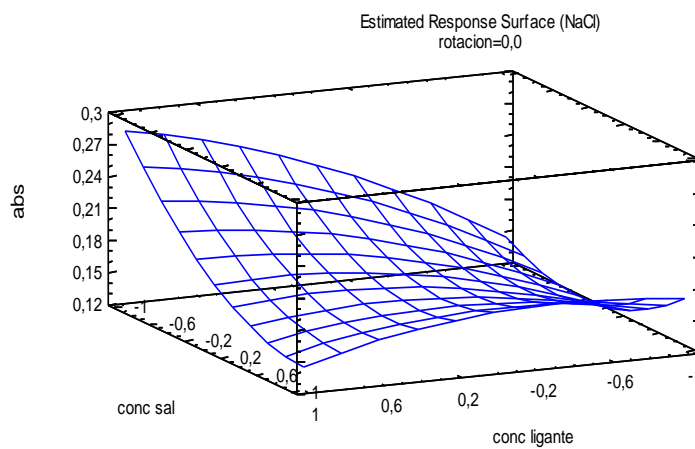


Figura 7: Superficie de respuesta de los factores estudiados empleando NaCl como sal.

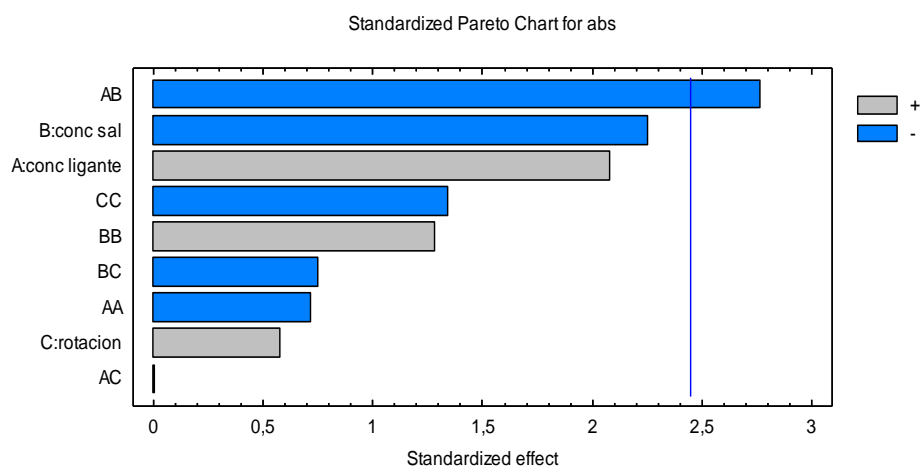


Figura 8: Diagrama Pareto estandarizado de significancia de efectos (para NaCl)

Se demostró que los factores individuales del estudio no resultan significativos, y exceptuando la concentración de NaCl, los valores positivos demuestran lo concordante de los resultados con los fundamentos teóricos, luego, el único efecto significativo negativo es la interacción AB, y la rotación del disco y la cantidad de ligante en el medio son efectos positivos. El efecto negativo del NaCl agregado indica que ocurren fenómenos que reducen la eficiencia del proceso.

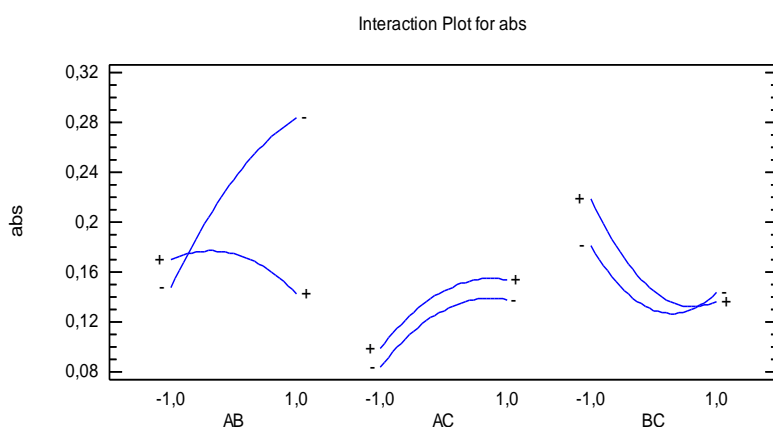


Figura 9: Interacciones entre los tres factores definidos en el estudio, con A igual a la concentración de ligante, B igual a la concentración de NaCl y C igual a la velocidad de rotación.

En la Figura 9 se observa que no hay interacción AC, el efecto BC negativo puede explicarse por la interacción electrostática entre el soluto y el NaCl, que es favorecido por una mayor rotación y que reduce la movilidad. La interacción AB negativa puede indicar un fenómeno de competencia entre los iones del ligante y los iones generados de la disociación de la sal por los cationes Cu^{+2} , provocando una menor capacidad de formación del complejo.

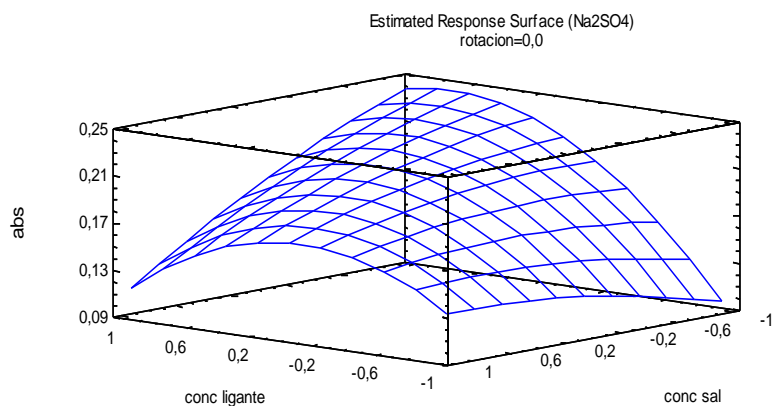


Figura 10: Superficie de respuesta de los efectos, con Na₂SO₄ como sal.

La Fig. 10 muestra que ocurre un incremento marcado en la respuesta al no agregar Na₂SO₄ al medio, un comportamiento similar al observado en el estudio anterior al agregar NaCl para el efecto salting out.

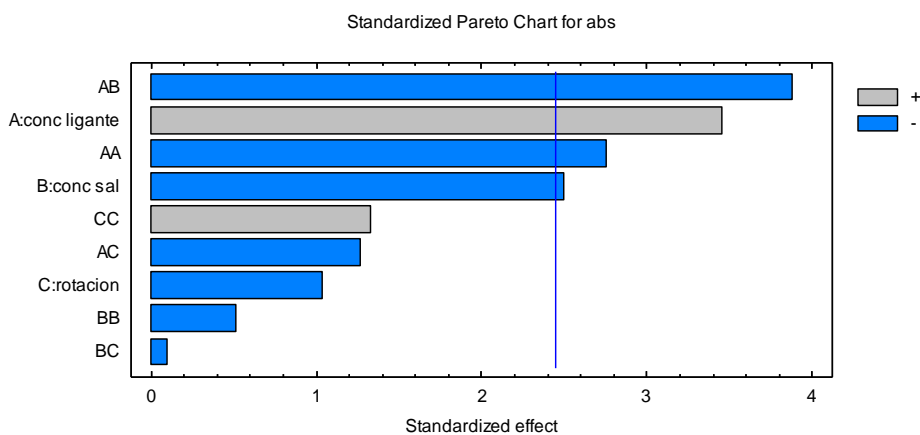


Figura 11: Diagrama Pareto de los tres efectos estudiados, con uso de Na₂SO₄.

Para el Na₂SO₄, la concentración óptima de ligante está al nivel 0,862629 (9,32*10⁻⁴ M NaDDTC) mientras que los óptimos respectivos de concentración de sal y velocidad de rotación son -1.0 (0%p/v Na₂SO₄) y -0,999951 (750 rpm).

La carta Pareto (Fig. 11) indica que la mayor concentración de iones DDTC^- desplaza el equilibrio de reacción hacia la formación de complejos, y la sal resulta perjudicial por lo que se descarta su uso en experiencias posteriores.

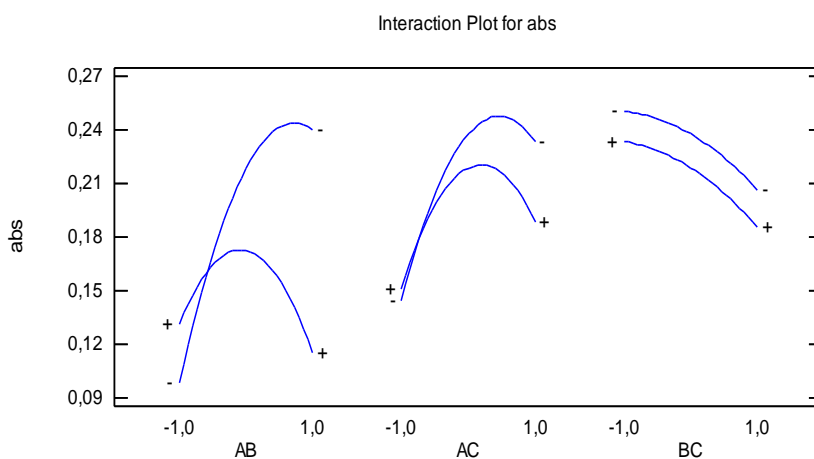


Figura 12: Interacción de factores definidos en el estudio, con A igual a la concentración de ligante, B igual a la concentración de Na_2SO_4 y C igual a la velocidad de rotación.

A partir de la Fig. 12, se observan las interacciones entre factores. La interacción AC negativa se explica ya que, a elevadas velocidades, se puede alterar la transferencia de masa del analito al PDMS y el desplazamiento de iones DDTC^- en el seno de la solución, reduciendo la posibilidad de contacto iónico para formar el cromóforo ²⁵. El efecto BC se debe a la interacción entre las moléculas del analito apolar y de sal (potenciado a mayores velocidades de rotación ya que aumentan las posibilidades de que ocurran choques efectivos entre el analito y la sal) reduciendo la movilidad al PDMS.

a. Efecto de la rotación sobre la transferencia de masa:

La rotación del disco afecta directamente al film estático que cubre la superficie del extractante. Al analizar el esquema del proceso de difusión a través del film (Fig. 13), se observa que la reducción de la transferencia de masa por presencia del film estático se traduce en un menor ancho de flecha, luego, la difusión a través de este film se considera como la etapa limitante de la velocidad del proceso:

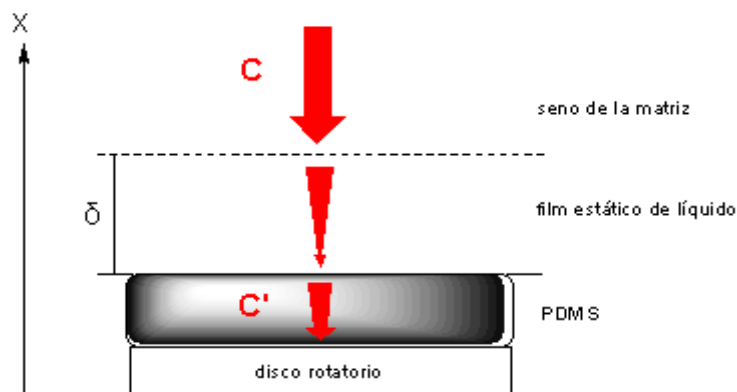


Figura 13: Modelo de difusión de un analito hacia el material extractante.

Donde δ indica el espesor del film estático que recubre el PDMS. Whitman indicó que un objeto estacionario sometido a la acción de un líquido en movimiento adquiere un film estático de fluido alrededor de su superficie donde se originan fuerzas de viscosidad las cuales vuelven más lenta la velocidad de flujo ²⁶. De acuerdo a la siguiente expresión de velocidad de transferencia de masa (dn/dt) definida para procesos de microextracción:

$$\frac{dn}{dt} = \left(\frac{DA}{\delta}\right) C \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde D es el coeficiente de difusión (difusividad) de la muestra, A es el área superficial de PDMS disponible a interactuar, C es la concentración del analito y δ es el espesor del film estático. Se observa una dependencia inversamente proporcional entre la velocidad y espesor, de forma que un film estático más delgado favorecería la transferencia de masa ya que la acción de las fuerzas de viscosidad generadas es menor, e influyen en menor medida sobre la difusión, luego se logra la reducción del ancho de la capa estática a una mayor velocidad de rotación del dispositivo de extracción ^{27,28}.

Los resultados indican un descenso de la respuesta analítica medida. Se debe recalcar que, en el caso de estos estudios multivariable, se utilizó un volumen de muestra de 25 mL. Una elevada velocidad de rotación del disco (superior al óptimo obtenido), aunque permite reducir el espesor de la capa estática, puede generar problemas a volúmenes reducidos, al formar un vórtice lo suficientemente fuerte como para generar un espacio de aire. Este

espacio evita el normal contacto de la fase con la solución, desfavoreciendo la extracción. Otros fenómenos también permiten explicar la reducción de la respuesta, por ejemplo:

- a) Carencia de homogeneidad del vórtice cuando la agitación se ejecuta a mayores velocidades, alterando el flujo convectivo normal del analito al PDMS.
- b) A mayor rotación, el analito puede no permanecer el tiempo suficiente para difundir a través del film estático y lograr ser retenido en el PDMS, por lo que se difunde hacia el seno de la muestra.
- c) La mayor rotación del disco podría favorecer la formación de burbujas, efecto potenciado por la elevada temperatura de trabajo ²⁹⁻³¹.

b. Efecto de la adición de sal:

El añadir sales en el medio busca modificar la fuerza iónica de la solución mejorando la eficiencia de extracción, a través del concepto de "salting-out" definido originalmente para el estudio de solubilidad de proteínas ³². Hofmeister describió el proceso como un fenómeno de formación de capas de solvatación en torno a los iones de la sal agregada. Luego, la fuerte unión electrostática entre los iones de la sal y las moléculas de agua generan una disminución de las moléculas de agua disponibles a interactuar con el analito apolar (en este caso el cromógeno CuDDTC₂) para formar esta capa de solvatación en torno a los iones de la sal, lo que provoca finalmente que una menor cantidad de moléculas de agua se enlacen superficialmente con el cromógeno reduciendo su solubilidad ³³⁻³⁵.

Para este estudio se trabajó con sales mono y divalente para evaluar sus influencias en la extracción. Es de esperar que la extracción se vea beneficiada al trabajar con iones de sales divalentes ya que presentan una mayor posibilidad de solvatación. Los resultados indicaron una menor respuesta analítica a mayor contenido de ambas sales, demostrando que el efecto siempre es desfavorable, lo cual se puede relacionar a un incremento de la viscosidad de la solución ³⁰, a que es posible alcanzar un límite de saturación al agregar altas cantidades de sal al medio, por lo que las moléculas de sal impiden la correcta movilidad de las moléculas del

complejo cromógeno a través del seno de la solución, también pueden ocurrir interacciones entre las moléculas de sal y las del analito apolar, de origen electrostático que provocan una menor movilidad del analito reduciendo la transferencia del cromógeno al PDMS ²⁹. Finalmente puede existir competencia entre los iones de sal y el analito presentes en el medio por los sitios adsortivos del material polimérico, lo que provoca una reducción del área superficial disponible para retener el analito. ^{29,36}.

c. Efecto de la concentración de NaDDTC:

Para el estudio, se consideró la formación de un quelato cromóforo neutro y apolar con una banda de absorción intensa en la zona visible para lograr la determinación de Cu. Se empleó entonces el dietilditiocarbamato de sodio como agente ligante al reaccionar fácilmente con Cu⁺² de acuerdo a:

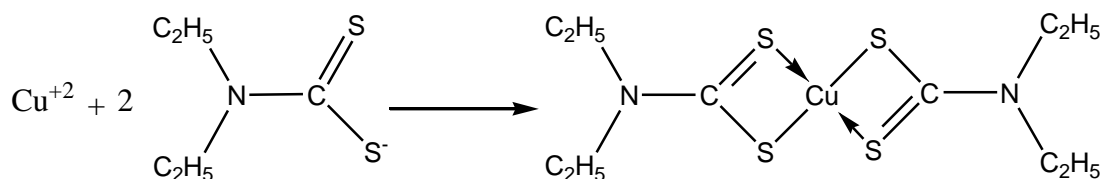


Figura 14: Esquema de reacción entre el catión Cu⁺² y el ión ligante DDTC⁻ derivado de la sal sódica ditiocarbámica.

La estequiometría indica que se necesitan dos moles de moléculas de ligante por mol de átomos de Cu⁺². Entonces, la extracción de quelatos de metal puede ser esquematizada como:

Complejo metálico neutro y de coordinación saturada en la fase orgánica	MA_z
Ión metálico M es complejado por z moléculas de ligando A para formar la especie neutra MA _z en la fase acuosa	$M^{z+} + zA^- \rightleftharpoons MA_z$

Luego, algunos autores ³⁷ definen la razón de distribución D_M (tomando en cuenta todas las especies metálicas en la fase acuosa), en función de constantes de formación y distribución entre fases, tal que:

$$D_M = \frac{[MA_z]_{org}}{\sum [MA_n^{z-n}]} = \frac{K_{DC}\beta_z[A^-]^z}{\sum \beta_n[A^-]^n} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde β_z es la constante de formación de complejo, β_n es la constante de formación de especies retenidas en la fase acuosa (el ión M^{+2} y las especies MA^- y MA_2), y K_{DC} es el coeficiente de distribución entre fases, observándose que D_M depende solo de la concentración de ligando libre en el medio $[A^-]$. Esta expresión indica que el incremento de concentración de A^- desplaza la distribución del complejo formado hacia la fase orgánica donde finalmente es retenido.

Los máximos resultados se alcanzan al máximo de concentración fijado (10^{-3} M) en un medio libre de iones interferentes. Se pueden utilizar concentraciones mayores para favorecer la extracción ya que un exceso de ligante asegura la total formación del complejo con cobre cuando hay iones interferentes en el medio ^{21,22}, los que reaccionan con $DDTC^-$ y reducen la disponibilidad del anión para la reacción deseada.

6.3. Estudio del tiempo de equilibrio para la extracción por RDSE:

Se determinó el tiempo de equilibrio para la extracción del complejo $CuDDTC_2$ por interpolación gráfica cuando las respuestas analíticas se tornan constantes, para tres volúmenes de matriz lo que requirió aumentar la concentración de cobre en el medio para mantener la proporcionalidad.

Los tiempos de equilibrio se alcanzan a 30, 53 y 90 minutos para 100, 500 y 1000 mL de muestra respectivamente (Fig.15, 16 y 17), lo que se explica ya que, como consecuencia del incremento de volumen, el espacio tridimensional a través del cual se debe desplazar el analito se hace mayor, por lo que el proceso de transferencia de masa hacia el PDMS se logra a tiempos más largos.

También se debe considerar que se forma una mayor cantidad de moléculas de $CuDDTC_2$ cuando el volumen se incrementa, por lo que se tiene que trasladar a la fase una masa total mayor del analito, lo que al sistema le tomaría más tiempo (bajo condiciones constantes de rotación y temperatura).

Tabla 7: Resultados obtenidos del estudio del tiempo de equilibrio para el proceso de extracción a los volúmenes 100, 500 y 1000 mL:

Volumen empleado					
100 mL		500 mL		1000 mL	
Tiempo (min)	Abs (*10 ⁻³)	Tiempo (min)	Abs (*10 ⁻³)	Tiempo (min)	Abs (*10 ⁻³)
6	13	15	23	30	86
12	31	30	61	45	116
15	41	45	104	60	147
18	68	53	128	75	161
20	79	60	127	90	200
25	90	75	123	105	203
30	108	90	121	120	206
40	110				
60	105				

Para los procesos de extracción, se logra el estado de equilibrio cuando no se observa una tendencia al cambio de la distribución del analito entre las fases "a" y "b". Para un sistema simple de fases inmiscibles ³⁸ se tiene que:

$$C_a \rightleftharpoons C_b, \text{ con } K_D = \frac{C_b}{C_a} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde K_D indica el coeficiente de reparto entre fases definido por el cociente de la concentración de analito retenido en fase orgánica (C_b) y aquel en la fase acuosa (C_a). Luego, se define el tiempo de equilibrio (t_e) en técnicas de microextracción como:

$$t_e = \frac{3\delta K_d P_t}{D} \quad (\text{Ecuación 6})$$

Donde δ indica el espesor del film estático de líquido, K_d es el coeficiente de distribución del analito entre fases, P_t es el espesor de la fase de PDMS y D es el coeficiente de difusión (difusividad) de la muestra ^{14,28}.

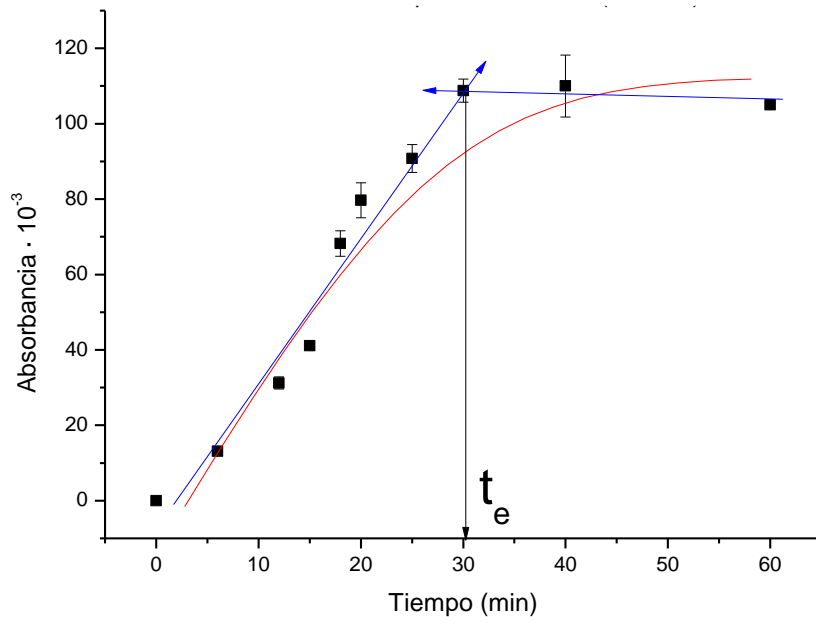


Figura 15: Estudio del tiempo de extracción para un volumen de muestra de 100 mL.

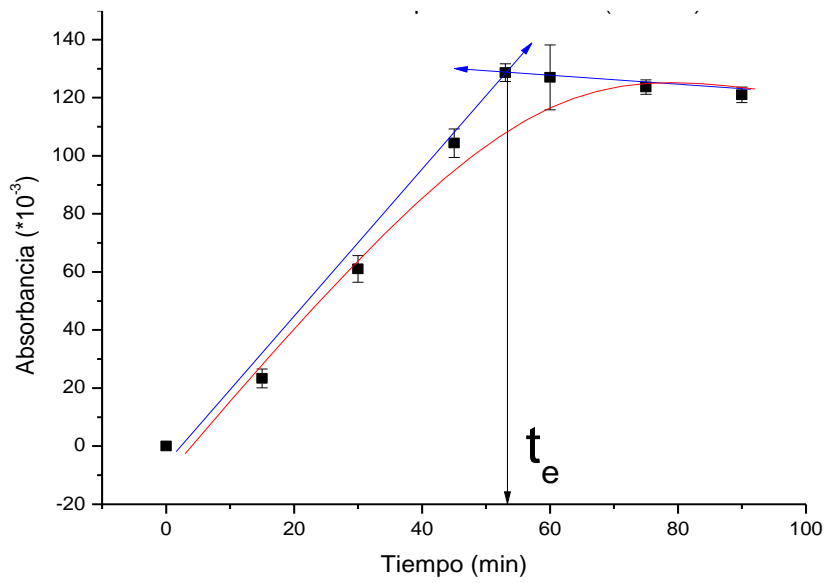


Figura 16: Estudio del tiempo de extracción para un volumen de muestra de 500 mL.

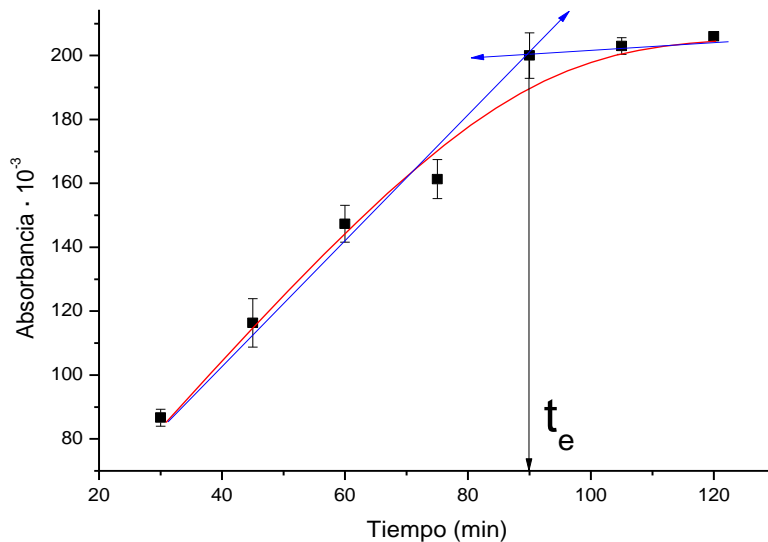


Figura 17: Estudio del tiempo de extracción para un volumen de muestra de 1000 mL.

6.4. Determinación de parámetros analíticos:

- **Estudios de la exactitud y la precisión de la metodología.**

Para identificar y evaluar el error en una medición se definen los conceptos de exactitud y precisión, que permiten validar los resultados obtenidos. Mientras que la exactitud es una medida de la cercanía de una medición al valor verdadero que se va a medir, la precisión indica el grado de reproducibilidad de una metodología al expresar cuán concordantes son una serie de resultados entre sí.

a. Ensayos para evaluar la exactitud de la metodología:

La exactitud permite medir el error sistemático ³⁹⁻⁴¹, y puede ser cuantificado a través del error relativo porcentual (%ER), tomando en cuenta la expresión de error relativo (ER):

$$X_{promedio} = \frac{\sum X_i}{n} \text{ (Ecuación 7)}$$

$$ER = \left(\frac{X_{promedio} - X_{real}}{X_{real}} \right) \text{ (Ecuación 8)}$$

$$\%ER = ER * 100 \text{ (Ecuación 9)}$$

En esta expresión $\sum X_i$ es la sumatoria del replicado de mediciones, y n es el número total de mediciones, luego %ER da cuenta del grado de imprecisión de la medida, es decir, de su calidad.

Para este estudio, se utilizó un estándar de control multielemental de aguas (concentración de Cu^{+2} de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) diluido para alcanzar el rango de la curva de calibración empleada ($2,5$ a $30 \mu\text{g L}^{-1}$). Luego, se convirtió el resultado de absorbancia a concentración diluida del analito.

Tabla 8: Parámetros de la curva de calibración y resultados para el estudio de la exactitud del método:

Ecuación	$y = a + b \cdot x$		
R ² ajustado	0,97248		
	Valor	Error estándar	
Intercepto (a)	-11,84433	6,69802	
Pendiente (b)	5,37401	0,40314	
Medición	Abs (*10 ⁻³)	Conc. Diluida ($\mu\text{g/L}$)	Conc. Final (mg/L)
1	119,33	24,40	97,60
2	111,66	22,98	91,92
3	116	23,78	95,12
4	115,33	23,66	94,64
5	121,33	24,78	99,12
Factor Dilución= 4000		Promedio	95,68
		%ER	-4,32%
		S	2,78 mg/L

Como %ER es -4,32% se puede indicar que el método presenta una exactitud aceptable. Importante considerar que en la muestra existen otros 18 elementos (del estándar multielemental) los cuales pueden alterar la normal formación del complejo al reducir la cantidad de ión DDTC disponible a reaccionar con los iones Cu^{+2} . Este resultado se puede relacionar a condiciones experimentales no adecuadas (variaciones como la temperatura entre mediciones o uso de fases de PDMS con distintas masas, o una mala calibración del espectrofotómetro, generando una sobreestimación de la señal blanco y reduciendo la medición de absorbancia), y el control exhaustivo de estas condiciones reduciría su valor.

b. Ensayos de repetibilidad y reproducibilidad para estudiar la precisión:

La forma más común para determinar la variabilidad entre una serie de datos es la desviación estándar (σ) que se calcula mediante la siguiente expresión (para $n < 20$):

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - x_{promedio})^2}{n - 1}} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Finalmente se define el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa porcentual (%RSD) de forma que:

$$\%RSD = \frac{s \text{ (ó } \sigma)}{x_{promedio}} \times 100 \quad (\text{Ecuación 11})$$

Se debe considerar que a medida que se reducen los niveles de concentración, ocurre una disminución no proporcional de la precisión del método ⁴². La precisión se mide en términos de repetibilidad y reproducibilidad. Ambos parámetros pueden expresarse cuantitativamente mediante expresiones de dispersión de resultados (S o %RSD) ⁴³. Para este estudio, se realizaron ensayos de repetibilidad y reproducibilidad siguiendo las indicaciones planteadas en la metodología.

Tabla 9: Resultados obtenidos para la determinación de la precisión de la metodología estudiada:

Repetibilidad			Reproducibilidad		
Medición	Absorbancia	S (*10 ⁻³)	Medición	Absorbancia	S (*10 ⁻³)
1	0,068	1,41	Fase 1	0,083	5,10
2	0,077	6,03	Fase 2	0,094	1,53
3	0,085	6,67	Fase 3	0,079	3,22
4	0,080	7,09	Fase 4	0,077	1,53
5	0,075	1,52	Fase 5	0,092	4,99
6	0,082	3,46	Fase 6	0,090	2,63
7	0,077	4,62			
8	0,086	2,07			

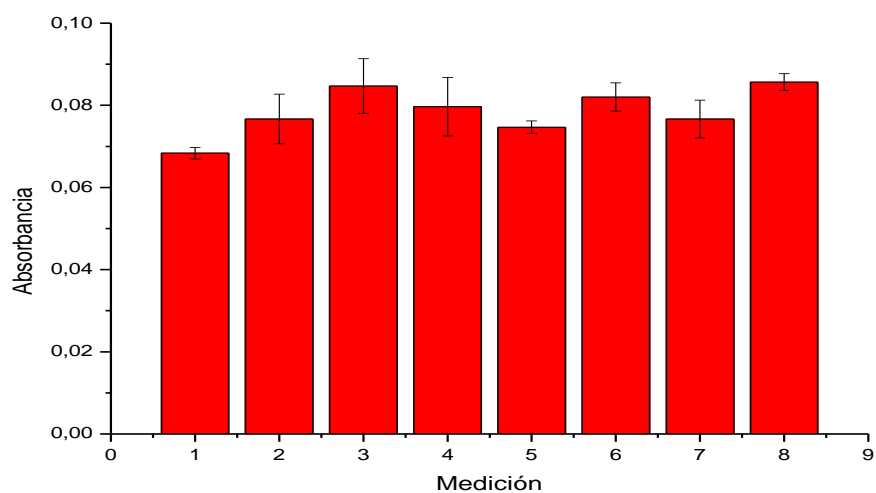


Figura 18: Resultados obtenidos del estudio de repetibilidad, donde se realizaron 8 mediciones independientes, reutilizando la fase.

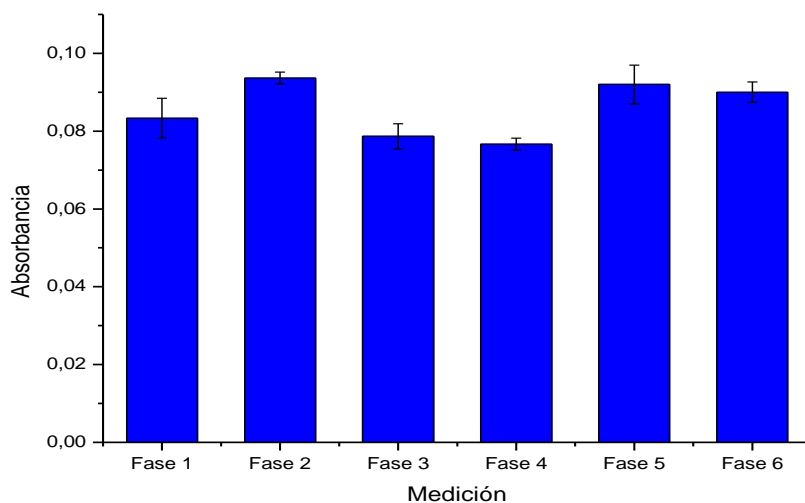


Figura 19: Resultados obtenidos del estudio de reproducibilidad, donde se realizaron 6 mediciones independientes, cada una con una fase distinta.

Tabla 10: Resultados de desviación para la repetibilidad y reproducibilidad:

	Repetibilidad (n=8)	Reproducibilidad (n=6)
Promedio de respuestas	$Abs_{promedio} = 0,079$	$Abs_{promedio} = 0,086$
Desviación estándar	$S = 0,0057$	$S = 0,0072$
Desviación porcentual	$\%RSD = 7,2\%$	$\%RSD = 8,4\%$

Los valores de desviación de 7,2% y 8,4% indican que el grado de dispersión en las mediciones es lo suficientemente bajo como para poder obtener resultados de alta concordancia al trabajar en condiciones constantes o cambiantes. Las desviaciones se pueden deber a factores como diferencias asociadas al disco mismo (provocando distintas velocidades de rotación en el mismo agitador), problemas en la placa de agitación y una extracción no uniforme sobre el PDMS (se extrae más en algunos sectores de la fase que en otros), estos factores resultan difíciles de controlar favoreciendo la dispersión entre resultados.

c. Límites de detección y cuantificación de la metodología:

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) entregan información relacionada a los valores de concentración en los cuales, de acuerdo al criterio del analista, es posible distinguir la señal de un analito del ruido y cuando es posible realizar la cuantificación ^{38,44} y son herramientas estadísticas que entregan un mecanismo para evaluar el rendimiento y limitaciones de un método o laboratorio en particular con el objetivo de que el analista logre tomar decisiones acertadas (aspecto crítico si se trabaja sobre matrices medioambientales o biológicas) ⁴⁵.

El límite de detección es el nivel de concentración más bajo que puede ser determinado por una metodología que sea estadísticamente diferente de un blanco. De acuerdo a IUPAC, LOD expresado como concentración o cantidad es derivado de la medición más pequeña (x_L) que puede ser detectada con una certeza razonable mediante un proceso analítico determinado. x_L se obtiene de la expresión:

$$x_L = x_{bi} + ks_{bi} \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde x_{bi} es el promedio de las mediciones del blanco, s_{bi} es la desviación estándar de los blancos y $k=3$ para un nivel de confianza del 90% ⁴⁵⁻⁴⁷.

El límite de cuantificación se define como el nivel de concentración sobre el cual se pueden obtener resultados cuantitativos con un grado de confianza específico ⁴⁴⁻⁴⁶.

Para obtener los valores, se puede considerar usar la proporción señal/ruido, la que se determina al comparar las señales medidas de analitos a concentraciones conocidas y bajas del analito con las señales de los blancos, estableciendo una concentración mínima a la cual el analito puede determinarse. Otro método para determinar LOD y LOQ se basa en la capacidad instrumental, en este caso los valores se obtienen en función a los documentos de validación y la tolerancia de calibración del equipamiento, entregado por el fabricante. Finalmente, se calculó LOD y LOQ para esta metodología empleando la desviación estándar (σ) y la pendiente (S) de la curva de calibración, donde el valor de σ se puede estimar al analizar un número apropiado de blancos y calcular la desviación estándar de estas respuestas, considerándose la magnitud de la respuesta analítica del ruido, o al trabajar con una curva de calibración específica, usando muestras que contengan el analito dentro del rango del LOD y LOQ. Como σ se puede emplear la desviación estándar residual de la línea de regresión o la desviación estándar del intercepto en el eje "y" ^{48,49}.

En función de este último punto, se posibilita derivar expresiones matemáticas simples para la obtención de estos valores críticos de concentración, tal que ^{45,46,49}:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S} \left(\frac{\mu g}{L} \right) \quad (\text{Ecuación 13})$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S} \left(\frac{\mu g}{L} \right) \quad (\text{Ecuación 14})$$

Donde " σ " es la desviación estándar de las respuestas, y " S " se refiere a la pendiente de la curva de calibración preparada para la experiencia. Para la metodología aquí estudiada, se determinaron los valores de LOD y LOQ considerando la desviación del intercepto en y, las condiciones de trabajo se definen en la sección de metodología experimental. Se observa que al incrementar el volumen de muestra se logra la reducción de los límites de concentración, aunque siguen siendo cercanos a 3 y 10 $\mu g L^{-1}$, valores bajos considerando la técnica de determinación (espectrometría de absorción molecular).

Tabla 11: Resultados de LOD y LOQ para un duplicado de 100 mL:

Ecuación	Y = a + b*x		
Volumen		Valor	Error estándar
100 mL	Intercepto (a)	4,01338	1,71515
R ² = 0,98927	Pendiente (b)	3,77792	0,17574
100 mL	Intercepto (a)	2,01006	1,81996
R ² = 0,99033	Pendiente (b)	4,22471	0,18648

Volumen		LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)
100 mL		3,34	11,12
100 mL		3,48	10,55

Tabla 12: Resultados de LOD y LOQ para 500 y 1000 mL de muestra:

Ecuación	y = a + b*x		
Volumen		Valor	Error estándar
500 mL	Intercepto (a)	20,8712	2,10333
R ² = 0,99146	Pendiente (b)	5,19647	0,21551
1000 mL	Intercepto (a)	20,65869	2,04062
R ² = 0,99521	Pendiente (b)	6,74279	0,20909

Volumen		LOD (µg L ⁻¹)	LOQ (µg L ⁻¹)
500 mL		2,97	9,91
1000 mL		2,22	7,40

De esta forma, los estudios de cuantificación deben realizarse a una concentración no menor a 10 µg L⁻¹ para asegurar el trabajo sobre el rango lineal efectivo. Al analizar muestras de agua de consumo, se comprobó que los valores de concentración esperados para el cobre son mayores a lo fijado por los límites de la metodología, por lo cual no se esperaría complicaciones al momento de aplicar la técnica al estudio de matrices acuosas.

d. Estudio de la sensibilidad de la metodología analítica:

El concepto de sensibilidad permite medir la capacidad de un método para diferenciar variaciones pequeñas de concentración. Aunque hay diversas formas de trabajar el concepto de sensibilidad ⁵⁰⁻⁵² existe una definición y un método de cálculo específico. De acuerdo a IUPAC, que entrega una

definición cuantitativa del concepto, la sensibilidad de calibrado se refiere a la pendiente de la curva de calibración en el rango de concentración estudiado. En general entre dos o más métodos con la misma precisión, aquel que presente la mayor pendiente se considera como más sensible, mientras que si poseen la misma pendiente, el método más preciso será el más sensible. Debido a esto, se observa que existen dos factores limitantes de la sensibilidad: la pendiente de la curva en sí y la precisión de la metodología ^{44,45,53}. En mediciones espectrofotométricas, un sistema que sigue un comportamiento lineal puede ser representado a través de una ecuación del tipo:

$$A = a + bX \quad (\text{Ecuación 15})$$

Donde "A" es la respuesta de absorbancia medida por el equipo, "a" es la señal instrumental del blanco analítico (gráficamente es el intercepto de la curva de calibrado con el eje Y), "X" es la concentración del analito, y donde "b", que es la pendiente de la recta se expresa matemáticamente como:

$$b = \frac{n \sum AX - \sum A \sum X}{n \sum X^2 - (\sum X)^2} = \frac{dA}{dX} \quad (\text{Ecuación 16})$$

Donde "n" es el número de mediciones, "dX" es la variación de concentración y "dA" es la variación de respuesta asociada ⁵⁴. La sensibilidad es independiente de la concentración de analito, ya que la pendiente mantiene su valor en todo el rango de concentraciones. A su vez, los factores de amplificación de señal alteran el valor de la sensibilidad de forma que el aumento de la ganancia de un instrumento en un factor determinado incrementa en forma proporcional la pendiente ^{44,53}. Se indica que métodos con una pendiente promedio de valor positivo alto (>1) o un valor negativo bajo (<-1) poseen una alta sensibilidad ⁴⁸.

En esta experiencia, se consideraron curvas de calibración preparadas a distintos niveles de volumen de acuerdo a la metodología (promedio de masa de fases de PDMS: 0,40 g). Luego, para 1000 mL de solución se preparó una segunda curva, esta vez usando fases de mayor masa (promedio de masas de fases de PDMS: 0,54 g). Las demás condiciones se mantuvieron constantes.

Tabla 13: Parámetros de curvas de calibración empleadas en el estudio de la sensibilidad:

Ecuación	y = a + b*x		
Volumen		Valor	Error estándar
100 mL	Intercepto (a)	42,7419	2,65973
R ² = 0,98632	Pendiente (b)	0,80818	0,0425
500 mL	Intercepto (a)	46,31931	5,62064
R ² = 0,99014	Pendiente (b)	2,01435	0,08981
1000 mL	Intercepto (a)	52,84801	13,56601
R ² = 0,96699	Pendiente (b)	2,63255	0,21677

Tabla 14: Parámetros de curva de calibración para repetición del estudio de sensibilidad a 1000 mL:

Ecuación	y = a + b*x		
Volumen		Valor	Error estándar
1000 mL	Intercepto (a)	34,16047	10,09435
R ² = 0,9902	Pendiente (b)	3,62836	0,16129

El incremento del volumen de muestra aumenta la sensibilidad de la metodología ya que los fenómenos de amplificación de señal provocan un incremento proporcional de la pendiente de la curva. Para 100 mL, un valor "b" igual a 0,81 indica que la metodología no presenta una elevada sensibilidad, situación que cambia a volúmenes mayores, demostrando que la técnica permite distinguir entre variaciones cercanas de concentración. Se debe destacar que en el caso de 1000 mL se observó una desviación de comportamiento lineal de la curva de calibración a altas concentraciones (Fig. 18, en azul). Suponiendo que no existen desviaciones instrumentales o químicas es posible asumir que este comportamiento se debe a la condición límite de la ley de Beer: A altas concentraciones del analito pueden ocurrir interacciones que alteran la distribución de carga entre las moléculas a determinar, como consecuencia de esto, se modifica el estado energético molecular y por lo tanto la capacidad de absorción de la radiación del analito. Sin embargo, este tipo de desviación sólo se observa para concentraciones superiores a 0,01 M, muy por sobre los niveles considerados en este estudio ⁴⁴. Una segunda explicación a este fenómeno indica la posible saturación de la fase de PDMS en el rango de concentración trabajado al existir un límite espacial que pueden ocupar las moléculas de

analito al ser absorbidas por la fase. Gracias a los resultados se comprobó que esta condición se supera al incrementar el volumen de fase aumentando la capacidad de interacción entre fase y analito, y por lo tanto se necesita mayor cantidad de PDMS para lograr que el comportamiento lineal de la curva de calibración sea el esperado en todo el rango de concentraciones evaluadas.

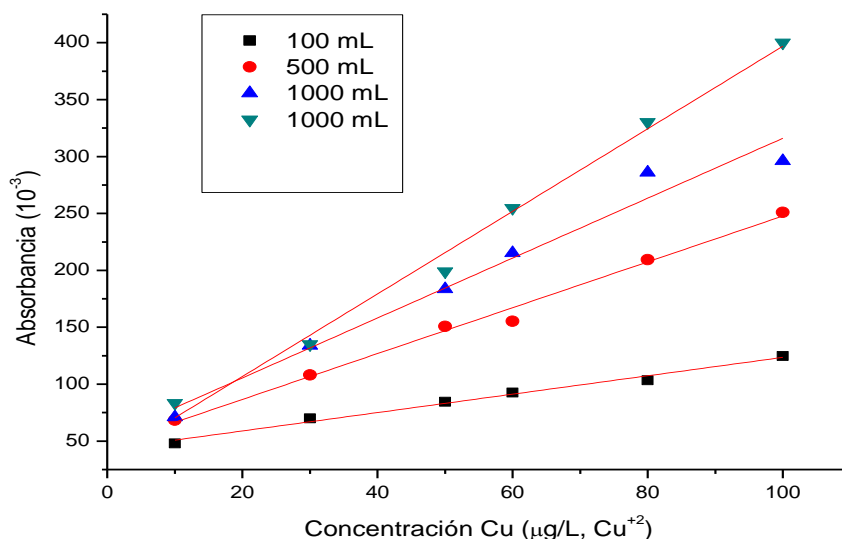


Figura 20: Grafico de evaluación de pendientes para estudio de sensibilidad.

e. Estudio de la recuperación de la metodología analítica

Se estudió la recuperación (R) o rendimiento de la etapa de preconcentración del analito extraído en el PDMS para la metodología estudiada mediante la expresión:

$$R = \frac{(C_a)_{rec}}{(C_a)_{orig}} = \frac{C_a(O + S) - C_a(O)}{C_a(S)} \quad (\text{Ecuación 17})$$

Donde $C_a(O)$ es la concentración de analito original en la muestra, $C_a(S)$ es la concentración de analito agregado y $C_a(O+S)$ es la cantidad de analito recuperada de la muestra fortificada ⁵⁵. Multiplicando el valor de R ($R \cdot 100$) es posible obtener una recuperación porcentual. Obtener R por adición de estándares para un set de blancos permite evaluar el rendimiento general de un procedimiento analítico, mientras que en muestra permite detectar errores sistemáticos debido a la matriz o evaluar su estabilidad ⁵⁶

Tabla 15: Parámetros de curva y valores de recuperación del método aplicado a una matriz de agua potable:

Ecuación	$y = a + b \cdot x$		
R ² ajustado	0,99654		
		Valor	Error estándar
	Intercepto (a)	51,77	3,75
	Pendiente (b)	2,20	0,057
Recuperación metodología			
Sobre muestra de agua potable fortificada con 25 µg/L [C _A (S)]			
Medición	Absorbancia(*10 ⁻³)	[Cu ⁺²] Recuperada(µg/L) [C _A (O+S)]	Recuperación (%) (R*100)
1	151	45,21	86,80
2	154	46,48	91,88
3	161	49,44	103,72
4	155	47,02	94,04
5	159	48,84	101,32
	Promedio	47,39 µg/L	95,55
	S	1,73 µg/L	6,93

El valor C_A (O) (cantidad nativa de cobre presente en las matrices de agua potable) es igual a 23,51 µg L⁻¹. Luego, la recuperación alcanza un valor de 95,55% (rango entre 86,80% a 103,72%), el cual se encuentra dentro del rango definido como aceptable (80-120%), entonces la técnica RDSE-Espectrofotometría en fase sólida permite recuperar en forma cuantitativa el cromóforo estudiado, es decir, se espera un rendimiento elevado de extracción. Luego, la metodología podría considerarse en el estudio de otros tipos de matrices acuosas, en las cuales resulte de interés determinar su contenido de metales traza.

f. Estudio del efecto de interferentes en el medio:

Uno de los aspectos críticos al momento de establecer la eficiencia del método se relaciona con la influencia de elementos presentes en la matriz a analizar que interfieren con el normal proceso de extracción del analito problema. Para evaluar el nivel de especificidad de la técnica estudiada, se estudiaron muestras de agua que contienen tanto al metal traza problema (Cu) como uno de los siguientes iones interferentes: Co, Cd, Fe, Ni, Zn, Pb. Todos estos elementos se incorporaron al analito a una concentración de 40

$\mu\text{g L}^{-1}$, luego se determinó la recuperación de cobre al incrementar la concentración de ligante. Estos agentes interferentes han sido seleccionados ya que se ha reportado que estos iones pueden interactuar con la sal sódica de dietilditiocarbamato generando complejos de diversa estructura y geometría molecular, por lo tanto, pueden reducir la disponibilidad del reactivo ligante para la formación del complejo de cobre ^{5,57-61}.

Tabla 16: Recuperación de cobre (como $\mu\text{g L}^{-1}$) desde matrices acuosas en presencia de interferentes (en la columna final se indican las concentraciones obtenidas del análisis de matrices conteniendo solo cobre):

Interferente	Co	Cd	Ni	Fe	Zn	Pb	Cu
	[Cu] ($\mu\text{g/L}$)	[Cu] ($\mu\text{g/L}$)	[Cu] ($\mu\text{g/L}$)	[Cu] ($\mu\text{g/L}$)	[Cu] ($\mu\text{g/L}$)	[Cu] ($\mu\text{g/L}$)	[Cu] ($\mu\text{g/L}$)
10^{-3} M DDTC	39	30,6	19,5	39,1	31,8	29,8	39,2
10^{-2} M DDTC	39,1	38,3	27,3	39,1	39,7	38,5	40
10^{-1} M DDTC	40,2	40,7	40,2	39,7	40,6	39,5	40,8

Tabla 17: Recuperación de cobre porcentual desde matrices acuosas en presencia de interferentes:

	Co	Cd	Ni	Fe	Zn	Pb
10^{-3} M DDTC ⁻ (1)	99	78	49	99	81	76
10^{-2} M DDTC ⁻ (2)	98	96	68	98	99	96
10^{-1} M DDTC ⁻ (3)	99	99	99	97	99	97

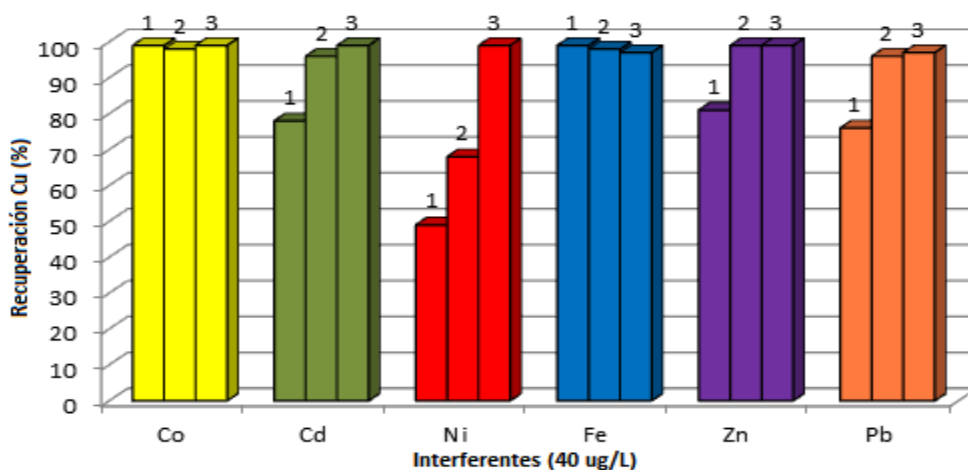


Figura 21: Recuperación porcentual de Cu^{2+} en presencia de interferentes en el medio.

Se observa que al existir en el medio Cd, Zn y Pb, bajo la metodología planteada, se requiere una concentración de 10^{-2} M para lograr la recuperación cuantitativa del cobre ($R > 80\%$). En el caso de Ni, fue

necesario aumentar la concentración a 0,1 M de NaDDTC para alcanzar la misma condición. Se realizó un segundo estudio para evaluar el grado de selectividad de la metodología, al extraer 40 µg L⁻¹ de Cu en solución con concentraciones crecientes (de 25 a 2500 µg L⁻¹) de los interferentes estudiados, midiéndose cada punto en triplicado.

Tabla 18: Recuperación de cobre en matrices con concentración creciente de interferentes:

Interferente	Co		Ni		Cd	
Concentración (µg L ⁻¹)	Abs (*10 ⁻³)	[Cu] (µg/L)	Abs (*10 ⁻³)	[Cu] (µg/L)	Abs (*10 ⁻³)	[Cu] (µg/L)
25	181,5	34,2	186,1	35,1	189,6	35,7
250	191,3	36,1	188,6	35,6	185,3	34,9
750	183,3	34,6	157,6	29,7	157,5	29,7
1250	153,2	28,9	136,6	25,7	146,6	27,6
1870	131,4	24,8	106,5	20,1	121,5	22,9
2500	108,9	20,5	84,6	15,9	101,4	19,1
Interferente	Zn		Pb		Fe	
Concentración (µg L ⁻¹)	Abs (*10 ⁻³)	[Cu] (µg/L)	Abs (*10 ⁻³)	[Cu] (µg/L)	Abs (*10 ⁻³)	[Cu] (µg/L)
25	198,1	37,3	197,3	37,2	186,5	35,2
250	201,1	37,9	212,3	40,1	181	34,1
750	196,2	37	207,1	39,1	177,6	33,5
1250	204	38,4	198,9	37,5	161,5	30,4
1870	194,5	36,7	196,8	37,1	147	27,7
2500	189,9	35,8	199,8	37,6	137,3	25,9

De acuerdo a los resultados, no se observó un efecto significativo de la presencia de Zn y Pb sobre la respuesta analítica del cromóforo, sin embargo en el caso de Co, Ni, Cd y Fe, a concentraciones mayores a 750 µg L⁻¹ se apreció una reducción significativa de la señal analítica, lo cual se explica por un fenómeno de competencia de estos iones metálicos con el Cu por los iones quelantes, los cuales presentan una baja especificidad al momento de reaccionar. Luego si están presentes en solución cantidades excesivas de los iones metálicos contaminantes, una mayor concentración de agente ligante puede ser usada para disminuir los efectos de competencia, sin requerirse el uso de agentes enmascarantes. A su vez, al observar la información de concentración límite entregada por la norma chilena de calidad de aguas, con excepción de Zn, los niveles de concentración de estos interferentes están muy por debajo del límite permitido para el Cu ⁸, luego, una apropiada dilución de la muestra de agua podría ayudar a disminuir en forma efectiva el efecto de matriz. Se concluye que los interferentes afectan al proceso de formación del complejo

Cu(DDTC)₂ al reducir la disponibilidad de moléculas de ligante en solución a reaccionar con Cu²⁺, pero sus señales de absorbancia no se acoplan a la señal analítica del Cu(DDTC)₂ a 432 nm.

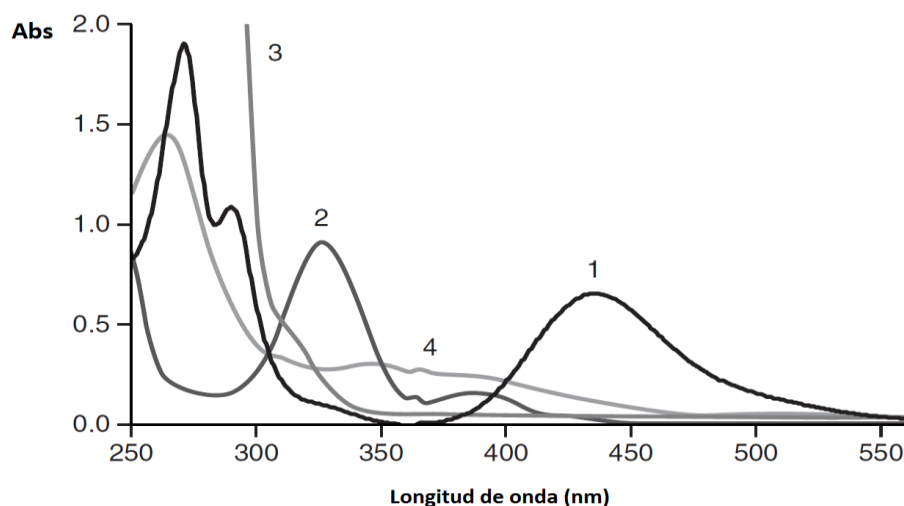


Figura 22: Espectros de absorción de Cu(DDTC)₂ (1), Ni(DDTC)₂ (2), Zn(DDTC)₂ (3) y Fe(DDTC)₂ (4) de acuerdo a lo indicado por Backlund Walker y colaboradores ⁶².

Es importante mencionar que para complejos metálicos dietilditiocarbamicos, el orden de las constantes de estabilidad de formación de complejos es el siguiente: Mn (II) < Fe (II) < Co (II) < Ni (II) < Cu (II) > Zn (II) ²¹, lo cual explica también por qué se favorece la reacción de complejación de Cu por sobre las otras especies en solución.

g. Validación del método por comparación a metodología ICP-OES:

Para validar la capacidad analítica del método se empleó la espectroscopía de emisión óptica de plasma inductivamente acoplado inductivo (ICP-OES). Esta técnica ha sido usada en la determinación de metales pesados desde muestras de agua ^{63,64} y, a modo de descripción breve, el equipo contiene una antorcha conformada por una unidad Tesla para ionizar al argón, y una bobina de radiofrecuencia para generar un fuerte campo electromagnético al interior de la antorcha. Gracias a la acción de ambos elementos, y por las altas temperaturas alcanzadas, ocurre la atomización e ionización del analito. Posteriormente los átomos excitados de la muestra se estabilizan

generando la emisión de radiación electromagnética con una longitud de onda característica. Esta señal es finalmente procesada en el equipo espectrofotométrico para su cuantificación.

Se analizaron tres muestras de agua obtenidas directamente del sistema de agua potable a través de ICP-OES. Otras tres muestras de agua potable fueron tomadas para su análisis mediante la técnica RDSE y determinación por espectrofotometría UV-Visible. La cuantificación del contenido de Cu^{+2} en las muestras se realizó por interpolación de los resultados de absorbancia de las muestras a una curva de calibración preparada en el rango de 50-200 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para verificar la validación se determinó el porcentaje de recuperación al comparar la concentración de Cu^{+2} obtenida de la metodología estudiada con los valores obtenidos de la técnica ICP-OES.

Tabla 19: Parámetros de curva y valores de recuperación de muestras de agua potable por análisis mediante técnica RDSE-espectrofotometría en fase sólida y comparación a técnica ICP-OES.

Ecuación	$y = a + b \cdot x$		
R ² ajustado	0,99645		
		Valor	Error estándar
Absorbancia	Intercepto	40,08257	5,39127
Absorbancia	Pendiente	1,42061	0,03793

Comparación entre metodologías				
Por estudios de recuperación sobre muestras de agua potable				
Medición	RDSE/UV-Visible		ICP-OES	Recuperación
	Absorbancia (*10 ⁻³)	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	R%
Muestra 1	252,3	149,4	150	99,6
Muestra 2	246,3	145,2	140 (150)	96,8
Fort. (30 $\mu\text{g/L}$)	302,3	184,6	180	102,5

Los resultados indicaron recuperaciones del 99,6 y 96,8% empleando la metodología planteada para extracción desde muestras de agua potable si se compara a los resultados obtenidos del análisis por la técnica ICP-OES, y de 102,5% para el análisis de muestras fortificadas. Gracias al alto nivel de concordancia entre resultados se verificó la capacidad analítica de la

metodología y, por lo tanto, se validó para su uso en la determinación del elemento traza desde matrices acuosas.

7. Conclusiones:

- a. La metodología analítica desarrollada permitió lograr la efectiva extracción y preconcentración de cobre (en su forma iónica estable Cu^{+2}) presente en matrices acuosas, por formación de un complejo cromóforo apolar con dietilditiocarbamato, en una fase de PDMS a través de la técnica RDSE, donde la retención en el extractante ocurre a través de un mecanismo de absorción y logrando medir en forma efectiva la absorbancia del complejo por espectrofotometría directamente desde el polidimetilsiloxano, eliminando la etapa de desorción líquida y reduciendo el consumo de solventes orgánicos contaminantes.
- b. La posibilidad de soportar el PDMS sobre la superficie del dispositivo de extracción elimina el contacto directo del extractante con el vial de extracción, y como consecuencia, no existe riesgo de degradación del material. Esto permitió incrementar la temperatura y la velocidad de rotación de trabajo, beneficiando termodinámica y cinéticamente el proceso de extracción.
- c. Se posibilitó reducir los tiempos en los que el sistema alcanza la condición de equilibrio ($t_e = 30, 53$ y 90 minutos para $100, 500$ y 1000 mL de volumen de muestra) al comparar con otras técnicas de extracción acopladas a espectrofotometría para la determinación del complejo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$.
- d. Se determinó que a valores de pH cercanos a 9 se beneficia el proceso de extracción al estabilizar la forma iónica DDTC^- para la posterior formación del complejo cromóforo.
- e. Se demostró que el añadir sal para aumentar la fuerza iónica del medio reduce la eficiencia de extracción del analito $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ apolar, por lo que se descarta su uso.

- f. Se encontró que un incremento de concentración del ditiocarbamato favorece la formación del complejo cúprico al existir interferentes en el medio. En matrices de agua potable, con altos contenidos de cobre respecto a otros elementos, se espera que se favorezca la reacción de formación del cromóforo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$.
- g. Los estudios de exactitud y precisión arrojaron un error relativo por defecto del 4,3% para diluciones de un estándar multielemental, y valores de %RSD para los ensayos de repetibilidad de 7,2% y para la reproducibilidad de 8,4%, logrando resultados exactos y precisos.
- h. La extracción siguió un comportamiento lineal y proporcional a la cantidad de analito agregado a la solución. La sensibilidad aumentó a un mayor volumen de muestra desde 0,80 a 3,63, permitiendo realizar estudios de recuperación. Se debe considerar que para concentraciones muy elevadas del complejo existe la posibilidad de saturación del PDMS.
- i. Los límites de detección y cuantificación calculados a través de curvas de calibración fueron 3,34 y 3,48 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 11,12 y 10,55 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente (para volumen de 100 mL). Ya que el límite máximo de cobre en Chile en aguas es de 1 mg L^{-1} , se posibilita emplear la metodología en el análisis de muestras acuosas.
- j. La metodología planteada permitió extraer en forma cuantitativa al complejo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ para su posterior determinación por espectrofotometría en fase sólida, lo que se comprobó al estudiar muestras de agua potable, lográndose una recuperación promedio porcentual igual a 95,55% (rango porcentual entre 86,8% a 103,7%).
- k. Se validó la técnica al comparar resultados de absorbancia del cromóforo desde muestras de agua a los entregados por la técnica ICP-OES, obteniendo recuperaciones de 99.6, 96.8 y 102.5% para

muestras y fortificado respectivamente. Se demostró, entonces, la capacidad de la metodología RDSE acoplada a espectrofotometría en fase sólida para ejecutar procedimientos analíticos para la determinación de trazas de metal presente en aguas.

- I. Junto a las ventajas operacionales que ofrece la configuración de disco rotatorio (reducción de tiempos de extracción, aumento de temperaturas de trabajo, posible determinación por espectrofotometría en fase sólida), se posibilita la reutilización del PDMS (luego de una etapa de desorción) y el reemplazo sencillo del film, permitiendo la reducción de costos comparado a otras técnicas de microextracción.

8. Bibliografía:

1. T. Callan, J. Russell Henderson, "A new reagent for the colorimetric determination of minute amounts of copper", *Analyst* 1929, 54, 650-653.
2. R. Lacoste, M. Earing, S. Wiberley, "Colorimetric Estimation of Various Metal Derivatives of Sodium Diethyldithiocarbamate", *Anal. Chem.* 1951, 23 (6), 871-874.
3. J. Chilton, "Simultaneous Colorimetric Determination of Copper, Cobalt, and Nickel as Diethyldithiocarbamates", *Anal. Chem.* 1953, 25 (8), 1274-1275.
4. A. Bond, G. Wallace, "Determination of Copper as a Dithiocarbamate Complex by Reversed-Phase Liquid Chromatography with Electrochemical Detection", *Anal. Chem.* 1981, 53, 1209-1213.
5. X. Wen, Q. Yang, Z. Yan, Q. Deng, "Determination of cadmium and copper in water and food samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with UV-vis spectrophotometry", *Microchemical Journal* 2011, 97, 249-254.
6. R. Lamontagne, A. Ervin, K. Ewing, J. Foerster, "Copper Sensor System for Unattended Marine Operations" 1998, Naval Research Laboratory.
7. M.S Meniai, Chikhi M., "Elimination of Cu (II) from Aqueous Solutions by Liquid-liquid Extraction. Test of sodium diethyldithiocarbamate (SDDT) as an Extracting Agent", *Energy Procedia* 2012, 18, 1165-1174.
8. C. Concha et al., "Normas oficiales para la calidad del agua: Norma Chilena Oficial 409/1. Of.84, 1984.
9. X. Zhao, H. Zhao, Y. Yuan and H. Gao, "Determination of copper at ng mL⁻¹ level in surface water using the electrophilic substitution reaction between Cu(II) and 3-(3-sulfophenylazo)-6-(4-chloro-2-phosphonophenylazo)-4,5-dihydroxynaphthalene-2,7-disulfonic acid-Ca(II) complex", *Revue Roumaine de Chimie* 2008, 53 (4), 313-323.
10. S. Chantai, N. Suwamart, C. Ruangviriyachai, "Solid-Phase Extraction with Diethyldithiocarbamate as Chelating Agent for Preconcentration and Trace Determination of Copper, Iron and Lead in Fruit Wine and Distilled Spirit by Flame Atomic Absorption Spectrometry", *E-Journal of Chemistry* 2011, 8 (3), 1280-1292.
11. H. Bowen, "Absorption by Polyurethane Foams: New Method of Separation", *J. Chem. Soc. (A)* 1970, 1082-1085.
12. A. Silva, F. Portugal, J. Nogueira, "Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental

water matrices: Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases", *Journal of Chromatography A* 2008, 1209, 10-16.

13. O. Sant'Ana, L. Jesuino, R. Cassella, M. Carvalho, R. Santelli, "Solid Phase Extraction of Cu(II) as Diethyldithiocarbamate (DDTC) Complex by Polyurethane Foam", *J. Braz. Chem. Soc.* 2003, 14 (5), 728-733.

14. P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, B. Sepulveda, "Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples", *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 8598-8602.

15. P. Richter, A. Cañas, C. Muñoz, C. Leiva, I. Ahumada, "Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and direct determination by solid phase spectrophotometry", *Analytica Chimica Acta* 2011, 695, 73-76.

16. I. Safarik, M. Safariková, "Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water", *Water Research* 2002, 36, 196-200.

17. J. Wang, X. Zhou, H. Ma, G. Tao, "Diethyldithiocarbamate functionalized CdSe/CdS quantum dots as a fluorescent probe for copper ion detection", *Spectrochimica Acta Part A* 2011, 81, 178-183.

18. I. Papastathopoulos, J. Tawn, "A generalized Student's t-distribution", *Statistic and Probability Letters* 2013, 83, 70-77.

19. W. Callister, "Introduction to materials science for engineers", 1995, 95-108.

20. E. Cussler, "Diffusion: Mass Transfer in Fluid Systems, second edition", 1997.

21. V. Sastri, K. Aspila, C. Chakrabarti, "Studies on the solvent extraction of metal dithiocarbamates", *Canadian Journal of Chemistry* 1969, 47, 2320-2323.

22. S. Yeh, J. Lo, L. Shen, "Determination of Extraction Constants for Metal Diethyldithiocarbamates and Chloride-Mixed Metal Diethyldithiocarbamates by Substoichiometric Extraction", *Anal. Chem.* 1980, 52, 528-531.

23. K. Karlin, "Progress in Inorganic Chemistry", vol. 53, Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., 75-141.

24. L. Melo, A. Nogueira, F. Lanças, M. Queiroz, "Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples", *Analytica Chimica Acta* 2009, 663, 57-64.

25. P. Serodio, J. Nogueira, "Development of a stir-bar-sorptive extraction-liquid desorption-large volume injection capillary gas chromatographic-

mass spectrometric method for pyrethroid pesticides in water samples", *Anal. Bioanal. Chem.* 2005, 382, 1141-1151.

26. H. Dieter Baehr, K. Stephan, "Heat and mass transfer", Third edition, 2011, 81-87.

27. Z. Qin, L. Bragg, G. Ouyang, J. Pawliszyn, "Comparison of thin-film microextraction and stir bar sorptive extraction for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples with controlled agitation conditions", *Journal of Chromatography A* 2008, 1196-1197, 89-95.

28. I. Bruheim, X. Liu, J. Pawliszyn, "Thin-film Microextraction", *Anal. Chem.* 2003, 75, 1002.

29. A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L. Fernández, N. Extebarria, O. Zuloaga, "Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions", *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 2642-2666.

30. J. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. Lopez-Mahía, D. Prada-Rodriguez, "Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in watersamples by stir-bar sorptive extraction-liquid desorption-gas-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A* 2007, 1174, 27-39.

31. W. McCabe, J. Smith, P. Harriott, "Operaciones Unitarias en Ingeniería Química", 4^{ta} edición, Mc Graw Hill, 1991, 678-717.

32. R. Baldwin, "How Hofmeister Ion Interactions Affect Protein Stability", *Biophysical Journal* 1996, 71, 2056-2063.

33. K. Dill, T. Truskett, V. Vlachy, B. Hribar-Lee, "Modeling Water, the Hydrophobic Effect and Ion Solvation", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2005, 34, 173-99.

34. G. Chen, P. Fenimore, J. Berendzen, H. Frauenfelder, B. McMahon, "The Role of the Hydration Shell of Proteins", *Chemistry and Bioscience, Associate Directorate for Theory, Simulation and Computation*, 74-75.

35. D. Bucher, S. Kuyucak, "Polarization of Water in the First Hydration Shell of K⁺ and Ca⁺² Ions", *The Journal of Physical Chemistry B Letters* 2008, 112, 10786-10790.

36. F. Portugal, M. Pinto, J. Nogueira, "Optimization of Polyurethane Foams for Enhanced Stir Bar Sorptive Extraction of Triazinic Herbicides in Water Matrices", *Talanta* 2008, 77, 765-773.

37. J. Rydberg, G. Choppin, C. Musikas, T. Sekine, "Solvent Extraction Principles and Practice- Second Edition", 2004, Taylor & Francis Group, 109-205.

38. S. Mitra, "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry", 2003, Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc.
39. Hernández et al. , "Tratamiento de datos experimentales: Teoría de errores", Prácticas de Laboratorio: Física 2005, 103-116.
40. H. Olaechea, S. Billón, L. Berrocal de Montestruque, "Glosario básico de términos estadísticos", Instituto Nacional de Estadística e Informática, 2006.
41. C. Morón, I. Zacarías, S. de Pablo, "Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición", Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1997.
42. B. Duffau, F. Rojas, I. Guerrero, L. Roa, L. Rodríguez, M. Soto, M. Aguilera, S. Sandoval, "Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos", 2010, Instituto de Salud Pública, Chile.
43. L. Llamosa, L. Meza Contreras, M. Botero Arbelaez, "Estudio de repetibilidad y reproducibilidad utilizando el método de promedios y rangos para el aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración de acuerdo con la norma técnica NTC-ISO/IEC 17025", Scientia et Technica Año XIII 2007, No 35, 455-460.
44. D. Skoog, F. Holler, T. Nieman, "Principios de Análisis Instrumental", quinta edición, 2001.
45. Wisconsin Department of Natural Resources, "Analytical Detection Limit Guidance & Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits", 1996.
46. V. Thomsen, D. Schatzlein, D. Mercurio, "Limits of Detection in Spectroscopy", Spectroscopy 2003, 18 (12), 112-114.
47. E. Voigtman, "Limits of detection and decision, part 4", Spectrochimica Acta Part B 2008, 63 (2), 1-33.
48. National Association of Testing Authorities, "Guidelines for the validation and verification of quantitative and qualitative test methods", 2012, 1-32.
49. Wayman, E. Gordon, G. King, "The method detection limit and practical quantitation level: their derivations and regulatory implications", WM99 conference, 1999.
50. N. Dinesh, P. Nagaraja, K. Rangappa, "A Sensitive Spectrophotometric Assay for Tinidazole and Metronidazole Using a Pd-C and Formic Acid Reduction System", Turk. J. Chem. 2004, 28, 335-343.

51. B. Kurganov, A. Lobanov, I. Borisov, A. Reshetilov, "Criterion for Hill equation validity for description of biosensor calibration curves", *Analytica Chimica Acta* 2001, 427, 11-19.
52. K. Johansen, I. Lundstrom, B. Liedberg, "Sensitivity deviation: instrumental linearity errors that influence concentration analyses and kinetic evaluation of biomolecular interactions", *Biosensors & Bioelectronics* 2000, 15, 503-509.
53. I. Sierra Alonso, "Análisis Instrumental", volumen 1, 5-12.
54. D. Harvey, "Analytical Chemistry 2.0: Standardizing Analytical Methods", 156-170.
55. D. Burns, K. Danzer, A. Townshend, "Use of the terms "Recovery" and "Apparent Recovery" in analytical procedures", *Pure Appl. Chem.* 2002, 74 (11), 2201-2205.
56. D. Harvey, "Analytical Chemistry 2.0: Quality Assurance", 1002-1004.
57. S. Savasci, M. Akcay, "The Determination of Some Heavy Metal Cations by TLC/Photodensitometry", *Tr. J. of Chemistry* 1996, 20, 146-152.
58. Z. Jiang, S. Sun, A. Liang, C. Kang, Z. Huang, "Luminiscence Properties of Metal(II)-Diethyldithiocarbamate Chelate Complex Particles and Its Analytical Application", *Journal of Fluorescence* 2005, 15 (6), 859-864.
59. L. Tosi, A. Garnier, "Resonance-Raman Spectra of Copper(II) and Nickel(II) Diethyldithiocarbamates", *J.C.S. Dalton*, 1978, 53-56.
60. H. Rathore, M. Kumar, K. Ishratullah, "Metal ion chromatography on sodium diethyldithiocarbamate", *Indian Journal of Chemical Technology* 2006, 13, 84-87.
61. A. Uzun, M. Soylak, L. Elci, "Preconcentration and separation with Amberlite XAD-4 resin: determination of Cu, Fe, Pb, Ni, Cd y Bi at trace levels in waste water samples by flame atomic absorption spectrometry", *Talanta* 2001, 54, 197-202.
62. M. Backlund Walker, K. Edwards, P. Farmer, "Disulfiram, Metals, and Melanoma", *Journal of Chemical Education* 2009, 86 (10), 1224-1226.
63. L. Escudero, S. Cerutti, R. Olsina, J. Salonia, J. Gasquez, "Factorial design optimization of experimental variables in the on-line separation/preconcentration of copper in water samples using solid phase extraction and ICP-OES determination", *Journal of Hazardous Materials* 2010, 183, 218-223.

64. C. Cui, M. He, B. Hu, "Membrane solid phase microextraction with alumina hollow fiber on line coupled with ICP-OES for the determination of trace copper, manganese and nickel in environmental water samples", *Journal of Hazardous Materials* 2011, 187, 379–385.

9. Apéndices

9.1. Apéndice 1:

Espectrofotometría UV- Visible aplicado a medición en fase sólida:

Uno de los métodos de análisis más empleados para el determinación de analitos presentes en distintas matrices y que puedan absorber la luz en el rango ultravioleta, visible e IR cercano es la espectrofotometría UV-Visible. A nivel general, esta técnica espectroscópica usa la radiación del espectro electromagnético de longitud de onda (λ) entre 100 a 900 nm aprox. para generar transiciones electrónicas sobre una especie química (ya sea molecular, iónica, monoatómica o un complejo) que es capaz de absorber energía desde el haz de luz UV-Visible ¹ (Fig.23).

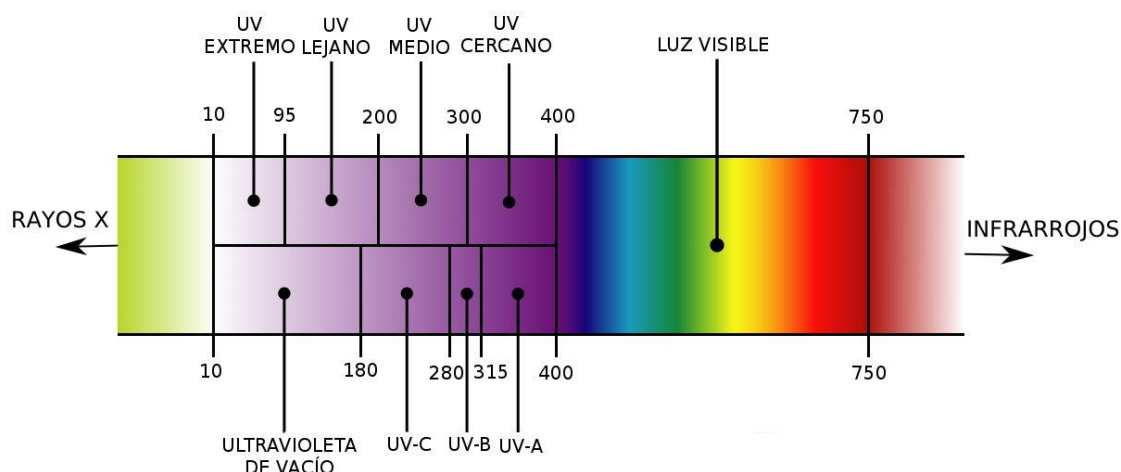


Figura 23: Espectro de la luz ultravioleta y visible, con las longitudes de onda expresadas en nm.

Luego, la respuesta analítica se representa gráficamente en función de la longitud de onda definiéndose el espectro de absorción, donde cada señal está asociada a una transición del electrón desde estados basales a estados excitados. Una vez realizada la medición, el objetivo es determinar la longitud de onda a la cual se produce la señal de máximo de absorbancia en el espectro (λ_{\max}), la cual es independiente para cada especie química. Gracias a esta señal es posible identificar por ejemplo grupos funcionales, además de cuantificar el contenido de una sustancia para una matriz determinada. Específicamente para moléculas poli atómicas y complejos, se

esperan señales en forma de bandas ya que la absorción de luz posee la energía suficiente para causar cambios electrónicos en el estado excitado ¹.

Esta técnica de determinación se rige por la ecuación de Planck la cual indica que existe una relación entre la energía (E) y la frecuencia (ν), la cual interacciona con la materia provocando distintas respuestas como transiciones electrónicas. Estas transiciones de un electrón desde su estado basal a uno excitado poseen una energía que puede ser relacionada al valor de longitud de onda (λ) de la radiación aplicada de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (\text{Ecuación 1})$$

En específico, la espectrofotometría UV-visible se usa principalmente en la determinación de conjugaciones moleculares y analitos cromóforos, es decir, aquellos que presentan grupos cromogénicos en su estructura los cuales alcanzan un estado excitado por transiciones electrónicas entre orbitales moleculares y atómicos, que posteriormente provocan como respuesta una emisión para pasar del estado excitado al basal. Para una muestra, se genera entonces un espectro de señales cuyo origen se encuentra en cada transición electrónica que experimenten sus componentes ^{1,2}.

Se indica que el mecanismo de acción de un fotón de energía sobre un analito permite lograr la excitación de un electrón desde el estado basal a través de tres etapas: interacción de la especie con el fotón, fotoexcitación y producción del estado excitado, luego de lo cual ocurre la transición electrónica como tal. En el caso de los cromóforos, las transiciones a estados π excitados presentan el mayor rango de aplicabilidad, al quedar definidas en la región de $\lambda = 200 - 700$ nm. De esta forma los analitos cromóforos se caracterizan en general por presentar un sistema de electrones π que pueden alcanzar excitación. La cuantificación de analitos mediante espectrofotometría se logra de acuerdo a lo indicado en las expresiones definidas por la ley de Lambert-Beer: estas establecen que la absorbancia (A) de un analito presente en una solución a medir es directamente proporcional a la cantidad de analito presente en aquella

solución, de esta forma se puede relacionar concentración con valores de transmitancia (T) o absorbancia a una longitud de onda específica para cada cromóforo. De esta forma se tiene que:

$$A = -\log T, \left(T = \frac{I}{I_0}\right) \text{ (Ecuación 2)}$$

Con I_0 igual a la intensidad de haz de luz incidente a la solución, e I igual a la intensidad de haz de luz que atraviesa la solución ^{1,2}. A su vez, la ley indica que existe una relación lineal entre la absorbancia (o transmitancia) de un analito a una determinada longitud de onda con su concentración, de acuerdo a la siguiente expresión:

$$A = \varepsilon Cl \text{ (Ecuación 3)}$$

Donde ε es el coeficiente de absorción molar (o absorptividad) del analito, C es su concentración y l es la distancia que atraviesa el haz de luz dentro de la muestra, también conocido como longitud de camino óptico para un medio con índice de refracción definido ^{1,2}. Gracias a (3) es posible lograr la determinación y cuantificación de un analito en una matriz acuosa por espectrofotometría. Mientras que ε es un valor que depende de la muestra que se esté midiendo, y C está relacionado a la cantidad de analito presente, el parámetro l puede ser regulado en función al tipo de soporte empleado para el análisis. Es necesario considerar que existen fenómenos de dispersión del haz de luz (principalmente absorción de luz por presencia del soporte, refracción, reflexión e interferencias) que alterarían las mediciones y que dependen en gran medida del material sólido usado para soportar el extractante (principalmente vidrio, plástico o cuarzo) y de la composición y opacidad de la matriz a analizar ² (Fig. 24).

Para concluir con la revisión de la determinación espectrofotométrica, se menciona brevemente las características del equipo empleado en las mediciones: el espectrofotómetro permite medir la radiación absorbida o transmitida por un soluto de concentración desconocida en solución, y por comparación con estándares conteniendo el mismo soluto, lograr su determinación y cuantificación. Un equipo espectrofotométrico está

compuesto principalmente de una fuente de luz continua que no sufra cambios bruscos en potencia en un rango amplio de longitudes (lámpara de

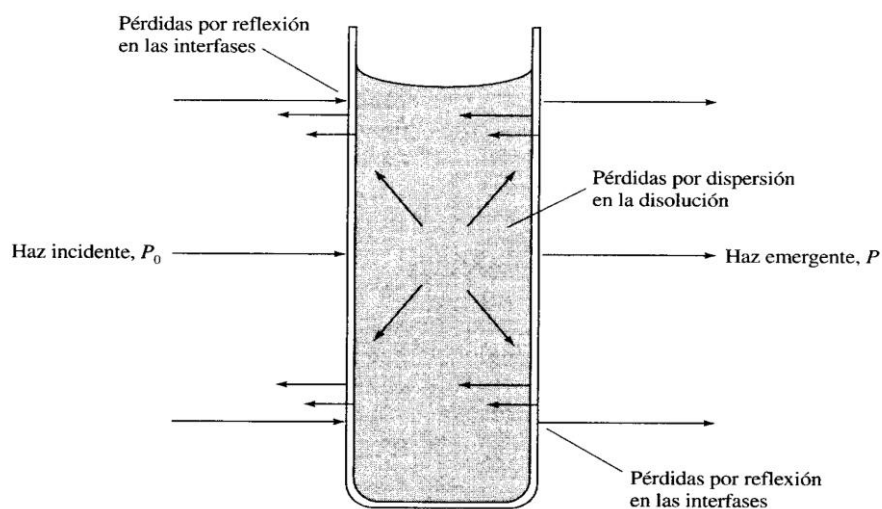


Figura 24: Algunos fenómenos de dispersión del haz de luz en el recipiente o la solución.

tungsteno, arco de xenón o de filamento de wolframio para longitudes de onda dentro del rango visible), soportes de muestra y referencia (para equipos de doble haz), monocromador para separar longitudes de onda de la luz, y el detector, que puede ser un fotodiodo o un dispositivo de cargas eléctricas interconectadas. Los espectrofotómetros pueden dividirse en los siguientes tipos: de haz sencillo (toda la luz pasa a través de la celda de muestra), multicanal (por empleo de detector de fotodiodos en serie) y de doble haz, como el espectrofotómetro UV/Visible UNICAM UV2 empleado en este trabajo, donde un divisor genera dos haces de luz en el espacio, uno pasa a través de la disolución de referencia, mientras el otro atraviesa la muestra. Cada haz finalmente llega a un fotodetector específico y electrónicamente se determina el cociente entre las señales de salida de ambos haces, previa amplificación ² (Fig. 25).

En general, los procesos de microextracción en materiales líquidos de alta viscosidad (como el PDMS) o materiales sólidos sorbentes incluyen una etapa de desorción para liberar la especie a analizar del material extractante y de esta forma realizar el análisis espectrofotométrico. En general, se emplea un solvente orgánico para desplazar el equilibrio de retención en el sorbente reduciendo su afinidad hacia el analito. Aunque necesaria, esta etapa puede conllevar posibles pérdidas del analito (alguna

cantidad puede permanecer retenida en el extractante, si no ocurre una eficiente distribución hacia el solvente de desorción)

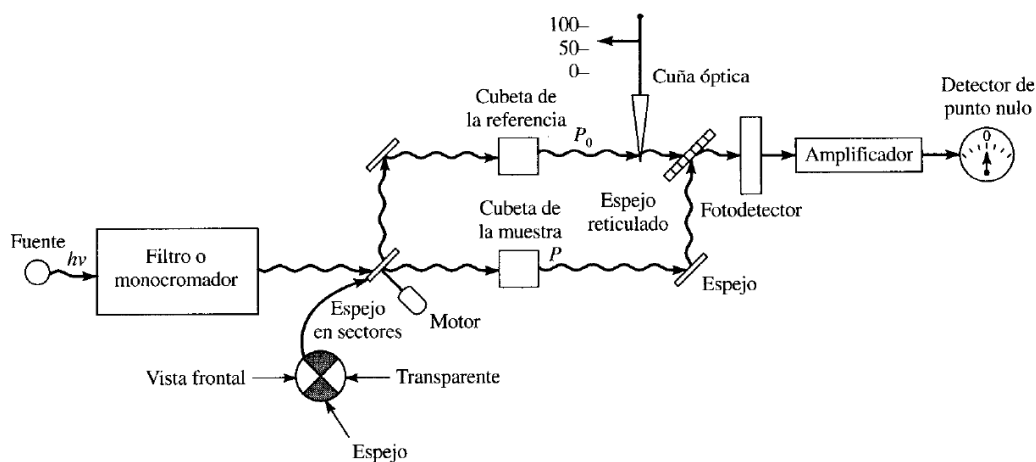


Figura 25: Esquema instrumental del espectrofotómetro UV-Visible de doble haz, con haces separados en el tiempo ².

y riesgos de contaminación debido a la manipulación requerida para llevar a cabo la desorción desde el sorbente. Se han desarrollado algunos caminos para superar estas dificultades (por ejemplo, se emplea desorción térmica para solutos volátiles y semivolátiles térmicamente estables, al acoplar directamente el dispositivo de extracción a una unidad de calentamiento) ³, sin embargo se hace necesario desarrollar metodologías de trabajo que permitan lograr la medición directa de la especie problema, para evitar los problemas previamente mencionados. Con este objetivo, se postula una nueva metodología de medición denominada espectrofotometría en fase sólida, que está asociada al uso de la técnica RDSE ⁴ y que considera el soporte del material extractante (con la geometría circular del disco y de espesor definido) en forma directa al haz de luz del espectrofotómetro, para lograr esto se emplean dos placas de vidrio rectangulares entre las cuales se ubica la fase de PDMS. En general no es posible usar el mismo PDMS empleado en otras técnicas de extracción debido a su opacidad. Se requiere entonces emplear el kit de silicona Slygard-184 para lograr la síntesis de fases de PDMS de alta transparencia que permitan la transferencia del haz de luz sin que ocurran fenómenos de interferencia. Al medir directamente sobre la fase de PDMS es posible solventar los dos problemas mencionados (contaminación y pérdidas del analito). El principal problema que se presenta al medir de esta manera radica en que se hace necesario que el

compuesto a analizar presente características de coloración, ya que analitos no cromóforos (aquellos dentro del rango UV) no son distinguibles del material polimérico. Esta técnica de medición ha sido probada exitosamente en la determinación del verde de malaquita (malachite green, MG) ⁵, donde se demostró que la extracción sigue el comportamiento indicado por la ley de Beer, pudiendo realizarse su cuantificación directamente desde el material de PDMS, lográndose recuperaciones de 99,3% y comprobándose aquellas ventajas cinéticas y termodinámicas asociadas a la configuración de disco rotatorio (Fig. 26).

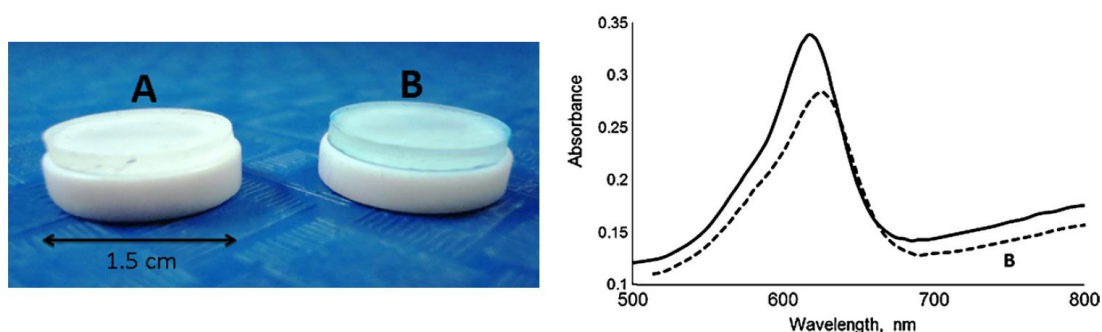


Figura 26: Disco rotatorio con PDMS soportado (A) antes y (B) después de la extracción de $40 \mu\text{g L}^{-1}$ de MG en aguas, y espectro de absorción del MG determinado por espectrofotometría en fase solida ⁵.

Referencias:

1. M.I. Litter, M.A. Armienta, S.S. Farías, "IBEROARSEN: Metodologías analíticas para la determinación y especiación de arsénico en aguas y suelos", CYTED, 2009, 44-48.
2. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, "Principios de Análisis Instrumental" Quinta edición, 2001, 322-352.
3. A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Extebarria, O. Zuloaga, "Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions", Journal of Chromatography A 2010, 1217, 2642-2666.
4. P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, B. Sepulveda, "Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples", Journal of Chromatography A 2009, 1216, 8598-8602.
5. P. Richter, A. Cañas, C. Muñoz, C. Leiva, I. Ahumada, "Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic

compounds and direct determination by solid phase spectrophotometry", *Analytica Chimica Acta* 2011, 695, 73-76.

9.2. Apéndice 2:

Extracción por sorción en disco rotatorio: teoría y fundamentos básicos.

1. Mecanismos de sorción de analitos en materiales extractantes:

Con el objetivo de entender como ocurre la extracción hacia el PDMS en la técnica RDSE, es necesario definir el mecanismo que gobierna este proceso. Algunos materiales, como el PDMS y el poliuretano, logran la extracción a través de un mecanismo de sorción donde, mediante combinación de procesos de absorción y adsorción se logra la retención fisicoquímica de los analitos en el material sorbente (Fig. 27). Para entender cómo funciona este mecanismo de sorción, es necesario comprender las dos etapas principales que la conforman:

1. Absorción: este proceso está referido al paso del analito por el material sorbente hasta ser retenido en el seno de este, es decir, el analito se "disuelve" en el sorbente. El analito entonces experimenta difusión (o partición, comportándose el PDMS como una fase líquida de alta viscosidad), donde existe una penetración tridimensional hacia el extractante. Finalmente la retención ocurre por interacciones débiles del analito con la fase extractante. Una de las ventajas principales de este tipo de interacción radica en una mayor capacidad extractiva al compararse con la adsorción ya que los analitos retenidos interaccionan con la totalidad del material extractante, es decir, con todo el volumen de sorbente disponible para la extracción. A su vez, debido a las interacciones débiles entre el material y el analito, este último puede desorberse fácilmente y con elevadas recuperaciones mediante desorción térmica, sin requerir el uso de solventes líquidos ^{1,2}.
2. Adsorción: este proceso considera la retención del analito mediante interacción superficial con el sorbente, a través de fuerzas intermoleculares como interacciones de Van der Waals o dipolo-

dipolo. En este caso, el material se caracteriza por presentar poros en su superficie, los cuales poseen sitios adsortivos donde ocurre la interacción. Debido al tipo de retención, la capacidad extractiva es menor que en la absorción: los analitos, además de otros elementos en la matriz, deben competir por estos sitios adsortivos, a medida que estos son ocupados se va reduciendo la eficiencia de extracción hasta alcanzar la saturación. Para este mecanismo se distinguen tres etapas principales: difusión a través del film estático que recubre el adsorbente, difusión a través de los poros y la reacción adsortiva, cuando ocurre la interacción o enlace del analito con el sitio adsortivo del material ^{1,2}.

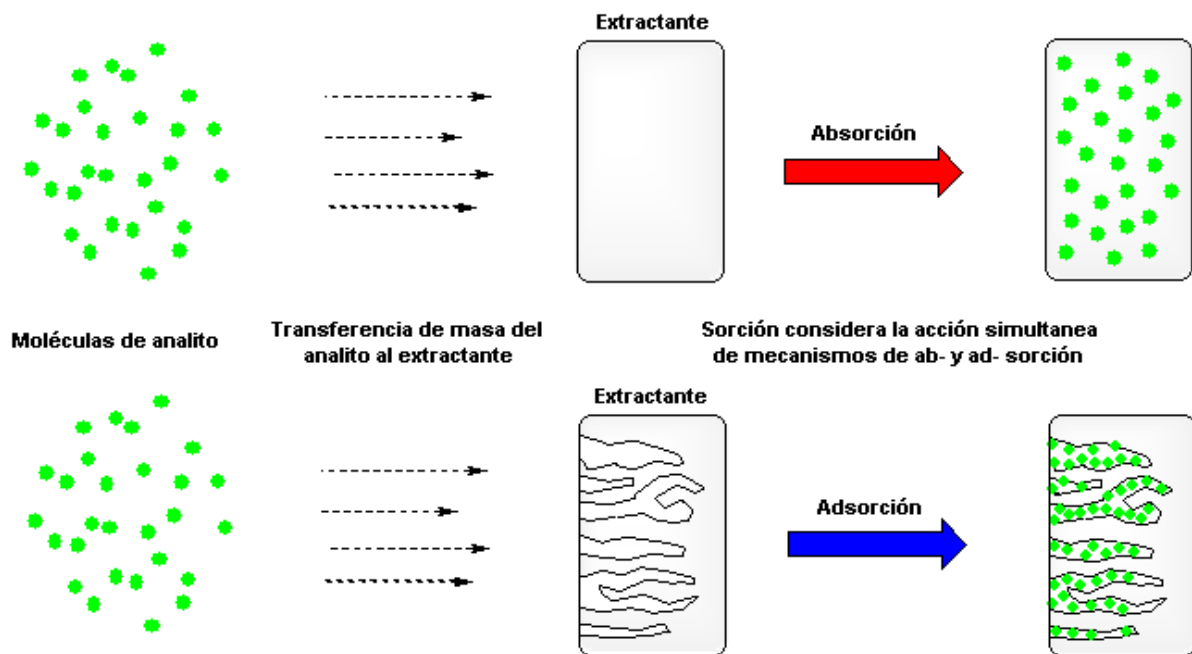


Figura 27: Esquema de los mecanismos que conforman el proceso de sorción sobre un extractante.

Algunos materiales interactúan con los analitos mediante otros mecanismos, como por ejemplo sorbentes de intercambio iónico (mediante atracción electrostática hacia sitios cargados en la superficie del material) y por interacción química del analito con el extractante (al generarse un enlace covalente entre elementos que presenten reactividad química) ¹.

Los extractantes que retienen a través de un mecanismo de adsorción presentan claras desventajas: una menor capacidad de extracción y la fuerza de las interacciones entre sorbente y soluto limita el proceso de

desorción (solo puede usarse desorción líquida debido a la fuerte interacción con el analito) ².

El desarrollo de materiales de sorción ha permitido solventar estas desventajas, aumentando el rango de aplicabilidad a diversos analitos de distintas características. Estos materiales poliméricos presentan una temperatura de transición vítrea menor a la temperatura en la que el proceso de extracción se lleva a cabo, luego, el material deja de comportarse como un sólido y actúa como un líquido de alta viscosidad con propiedades de difusión y distribución similares a las de los solventes orgánicos. Ya que los analitos se disuelven en el sorbente no ocurre un proceso de formación de enlaces con el material y por lo tanto es posible emplear la desorción térmica ².

De aquellos materiales que logran la extracción a través de mecanismo de sorción, uno de los más utilizados (y que será empleado en este estudio) es el PDMS. Esta es una fase líquida de alta viscosidad que presenta una baja polaridad. Usado como fase estacionaria en cromatografía y como material de recubrimiento en SPME, se caracteriza por ser muy inerte, altamente estable y por lograr la retención de compuestos apolares y de alto peso molecular, además de permitir trabajar en medios básicos. Es por estas características que se elige el PDMS como el material sorbente para la extracción de los complejos apolares neutros de CuDDTC₂, la cual se ve favorecida al trabajarse en rangos de pH básicos ^{2,3}.

a. La microextracción en fase sólida (SPME) como base de la técnica RDSE:

La microextracción en fase sólida es una técnica de extracción y preconcentración desarrollada por Pawliszyn a inicios de 1990, la cual emplea una fibra de silica similar a una aguja que esta revestida de un material sorbente de naturaleza polimérica a un espesor general entre 5 a 100 μm , y que permite la extracción de analitos volátiles, semivolátiles y no volátiles tanto desde muestras gaseosas u obtenidas desde el espacio cabeza (head-space) como muestras líquidas basándose en el equilibrio que se genera entre la muestra y la fibra recubierta de material sorbente, a través de la exposición directa de la fibra a la solución. Luego los analitos a

estudiar pueden ser determinados en sistemas cromatográficos previa etapa de desorción térmica (por uso de gas carrier inerte) o líquida (usando un solvente adecuado). Una serie de factores experimentales influyen en gran medida sobre la eficiencia de extracción, incluyendo la temperatura y pH de la solución de trabajo, si se añade un dispositivo de agitación al sistema de extracción, etc, sin embargo uno de los parámetros de mayor importancia está relacionado a la cantidad de material extractante soportado en el dispositivo. En específico para SPME, debido a la baja cantidad de sorbente soportado en la fibra, la capacidad extractiva es mucho menor lo que se traduce en reducción de la sensibilidad ⁴. Esta desventaja se ve aparentemente solventada por la introducción de la técnica de extracción por sorción en barra de agitación (SBSE). En el caso de SBSE, las principales ventajas radican en un aumento del volumen de material extractante soportado que se traduce en un incremento de la sensibilidad (permite extracción de analitos con $K_{o/w}$ menor a 10^5) y no requerir de un dispositivo externo de agitación al sistema, sin embargo sus desventajas incluyen la reducción de la velocidad de rotación máxima del sistema ya que la configuración de barra provoca un contacto directo del sorbente con el vial de extracción deteriorando al material a altas velocidades, elevado costo asociado a la producción de barras y una reducción en la razón del área de extractante contactado con el volumen de solución, además se deben considerar los riesgos de contaminación debido a la baja posibilidad de automatización del sistema y la necesidad de una unidad de desorción térmica especial para las barras ⁴⁻⁶. De esta forma se hace necesaria la optimización de estos parámetros para lograr recuperaciones cuantitativas. Para lograr esto, últimamente se ha desarrollado una técnica análoga a SPME y SBSE, la cual basándose en sus principios teóricos básicos adopta una nueva configuración del mismo sistema, generando la técnica RDSE ^{7,8}.

b. Principios teóricos básicos aplicados a RDSE:

Para todas las técnicas de microextracción es posible aplicar una expresión que relaciona los coeficientes de partición entre el material extractante (en

este caso se considerará PDMS al ser el material usado como revestimiento en las barras de agitación de la técnica SBSE y uno de los principales materiales extractantes usados en general, incluyendo a la técnica RSDE) y el agua ($K_{PDMS/W}$) y el coeficiente octanol/agua ($K_{O/W}$), tal que:

$$K_{O/W} \approx K_{\frac{PDMS}{W}} = K_D, \text{ con } K_D = \frac{C_b}{C_a} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Con K_D igual a constante de reparto entre fases, C_b y C_a igual a concentración de analito en fase orgánica y fase acuosa, respectivamente. Luego es posible obtener una expresión análoga a (1), pero que relaciona valores de concentración de analito presente tanto en la fase acuosa como en el PDMS, tal que:

$$K_{O/W} \approx K_{\frac{PDMS}{W}} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} * \frac{V_W}{V_{PDMS}} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Donde C_{PDMS} y C_W se refieren a la concentración de analito en PDMS y agua respectivamente, m_{PDMS} y m_W son las masas de analito en cada fase, V_{PDMS} y V_W son los volúmenes de cada fase respectivamente. Es posible simplificar (2) al obtener una expresión de razón de volúmenes de fase que asocia los valores de V_W y V_{PDMS} y los agrupa en un solo término definiendo β , tal que:

$$\beta = \frac{V_W}{V_{PDMS}} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Luego, se puede definir una expresión que permite relacionar los términos $K_{O/W}$, β y las masas de analito retenidas en cada fase, generándose:

$$\frac{K_{O/W}}{\beta} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_0 - m_{PDMS}} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Finalmente, reordenando (4), y considerando un valor de recuperación teórica R definido como $R = M_{PDMS} / M_0$, se obtiene una expresión que determina los factores de mayor importancia en los procesos de microextracción, tal que:

$$R = \frac{K_{O/W}}{\beta \left(1 + \frac{K_{O/W}}{\beta}\right)} \quad (\text{Ecuación 5})$$

Al analizar la expresión (5) vemos que los únicos dos factores que controlan la recuperación en un proceso de extracción son el coeficiente de partición y

la razón de volúmenes de fase^{1,2,4-6}. De esta forma es posible indicar que una mayor eficiencia de extracción, lo que se traduce en recuperaciones cuantitativas del analito, se logra con altos valores de $K_{O/W}$ y bajos valores de β . Este comportamiento se explica ya que:

1. Aquellos analitos que poseen un valor elevado de $K_{O/W}$ presentan una tendencia mayor a difundir y ser retenidos en la fase de menor polaridad (en este caso se considera al PDMS como análogo al octanol en este aspecto). Ya que $K_{O/W}$ puede considerarse como un indicador de polaridad, y conociendo que los analitos presentan una mayor afinidad hacia fases de extracción de polaridad semejante, las interacciones entre el PDMS de baja polaridad y analitos apolares se ven favorecidas ^{2,5,6}. En el caso estudiado, los complejos de cobre neutros generados con DDTc, debido a su polaridad, pueden ser transferidos (por un proceso de difusión) mediante partición entre fases, e interaccionar con el material polimérico de PDMS para su retención.
2. De acuerdo a la expresión (3), el parámetro β viene definido en función de volúmenes de fases extractante y acuosa, de forma que el valor de β se reduce cuando se incrementa el valor de V_{PDMS} . En función a los principios básicos que definen los mecanismos de sorción de analitos en fases extractantes, un mayor volumen de fase permite aumentar el espacio tridimensional de material disponible a interaccionar a través de extracción por absorción (considerando difusión a la totalidad del material extractante), permitiendo la retención de una mayor cantidad de analito, mientras que si se considera adsorción, un aumento de volumen incrementaría el número de poros en la superficie, lo que se traduce en mayor cantidad de sitios adsorptivos donde el analito puede interaccionar^{1,2,4-6}. La configuración de disco, al poder soportar un mayor volumen de fase en una de sus superficies, al comparar con la fibra recubierta (SPME) y la barra de agitación (SBSE), permitiría favorecer la extracción al aumentar las interacciones entre $CuDDTC_2$ y el sorbente, mejorando su retención, lo que se traduce en mayores recuperaciones del analito.

Más ventajas asociadas al uso del disco incluyen la reducción de los tiempos de equilibrio (t_e), y un incremento de la velocidad de transferencia de masa (dn/dt): para los procesos de microextracción, es posible definir expresiones que dan cuenta de ambos parámetros, tal que:

$$t_e = \frac{3\delta K_d P_f}{D} \text{ (Ecuación 6)}$$

$$\frac{dN}{dt} = \left(\frac{DA}{\delta}\right) C \text{ (Ecuación 7)}$$

Ambas expresiones dependen del factor δ de espesor del film estático de agua, una interfase generada sobre la superficie del extractante y que actúa como interferente del proceso de difusión del analito, luego, una mayor velocidad de rotación del sistema de extracción permite reducir el valor de δ . Debido a la configuración de barra, el sistema no puede alcanzar velocidades elevadas (el PDMS extractante está en contacto directo con el vial de extracción), una desventaja que se ve superada al usar la configuración de disco rotatorio, que permite trabajar a velocidades elevadas (>1250 rpm) sin que ocurra deterioro del PDMS.

Sin embargo, estas no son las únicas ventajas que el uso de una configuración en disco rotatorio para soportar el sorbente entrega: en específico para la determinación de compuestos coloreados no se hace necesario realizar la desorción del analito con un solvente, ya que la forma del material polimérico permite que pueda soportarse directamente en el espectrofotómetro⁸. Otras técnicas de microextracción previamente mencionadas no cuentan con esta ventaja: para microextracción en fase sólida, se hace necesario desorber desde el PDMS adosado a la fibra y luego llevar a la cubeta, en forma similar se debe trabajar sobre el PDMS soportado en la barra de agitación en SBSE. Por lo tanto, la medición directa sobre el PDMS trae beneficios tanto a nivel de costos como de tiempo requerido para llevar a cabo las mediciones espectrofotométricas.

Referencias:

1. S. Mitra, "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry", Wiley Interscience, John Wiley & Sons, Inc., 2003, 75-78.

2. E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, "Sorptive sample preparation - a review", *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 373, 3-22.
3. F. Augusto, E. Carasek, R. Gomes Costa Silva, S.R. Rivellino, A. Domingues Batista, E. Martendal, "New sorbents for extraction and microextraction techniques", *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 2533-2542.
4. W. Buchberger, P. Zaborsky, "Sorptive Extraction Techniques for Trace Analysis of Organic Pollutants in the Aquatic Environment", *Acta Chim. Slov.* 2007, 54, 1-13.
5. A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Extebarria, O. Zuloaga, "Stir-bar sorptive extraction: A view in method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions", *Journal of Chromatography A* 2010, 1217, 2642-2666.
6. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, "Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles", *J. Microcolumn Separations*, 1999, 11 (10), 737-747.
7. P. Richter, C. Leiva, C. Choque, A. Giordano, B. Sepulveda, "Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples", *Journal of Chromatography A* 2009, 1216, 8598-8602.
8. P. Richter, A. Cañas, C. Muñoz, C. Leiva, I. Ahumada, "Rotating disk sorbent extraction for pre-concentration of chromogenic organic compounds and direct determination by solid phase spectrophotometry", *Analytica Chimica Acta* 2011, 695, 73-76.

9.3. Apéndice 3:

El cromóforo CuDDTC_2 : descripción, características y consideraciones:

En general los ditiocarbamatos N-sustituídos (ligandos 1,1-ditiolatos monoaniónicos) han encontrado su utilidad en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de metales, permitiendo la detección y cuantificación de trazas de diversos materiales. Una de sus ventajas importantes radica en que los ácidos ditiocarbámicos sustituidos no son reactivos específicos, y son capaces de formar complejos metálicos estables de baja solubilidad en agua. Luego, las separaciones de metales por complejación dependen de las estabilidades relativas y solubilidades de la sal ditiocarbámica del metal requerido. Mientras que las sales sódicas y potásicas de ditiocarbamatos (las más usadas en estudios analíticos) presentan buena solubilidad en agua (20 mg/L para NaDDTC), los complejos ditiocarbámicos de los metales de transición se caracterizan por solubilizarse pobremente en agua, y ser más solubles hacia medios orgánicos, lo que permite desarrollar metodologías de extracción¹.

Los ditiocarbamatos estabilizan el cobre en los estados de oxidación +1, +2 y +3, siendo los complejos bis(ditiocarbamato) de cobre(II) los más comunes. Existen diversas formas de sintetizar los complejos, incluso a través de la mezcla directa de la sal sódica con polvos de cobre en cloroformo, demostrando su alta reactividad y versatilidad de uso¹.

Todos los complejos bis ditiocarbámicos de cobre (II) poseen un centro de cobre (II) cuadrado-planar¹, y en específico, el bis(dietilditiocarbamato) de cobre (II) (que puede interactuar con el centro metálico como un ligante unidentado, bidentado o como ligante de enlazamiento) presenta un ordenamiento plano cuadrado ligeramente distorsionado en torno al cobre². Este arreglo distorsionado se debe a que la energía de estabilización del campo cristalino es mayor que la energía repulsiva de las interacciones estéricas impuestas por el metal al adoptar la configuración plana-cuadrada¹.

Se ha podido caracterizar el complejo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ a través de estudios de espectrometría de resonancia Raman, trabajando en longitudes de onda

cercanas a la primera transición de transferencia de carga permitida. El estudio permitió asignar bandas de absorción para la transferencia Cu-S (stretching) además de interacciones S-C-S, S-C-N, Cu-S-C y Cu-S-Cu (bending), y definir que el fuerte peak de absorción del espectro molecular que aparece a 432 nm se puede asignar a una transición de transferencia de carga ligando-metal. Gracias a este estudio, se pudo definir que el complejo de cobre posee una simetría D_{2h} , donde el átomo de cobre se eleva ligeramente sobre el plano xy (Fig. 28), con el átomo de azufre del ligante enlazado en una posición axial. El fenómeno de transferencia de carga entre el ligando y el metal sucede por atracción electrostática que se origina por un fenómeno de transición electrónica, el cual ocurre desde los electrones de orbitales moleculares del átomo de azufre del ligante hacia los orbitales desocupados del cobre³.

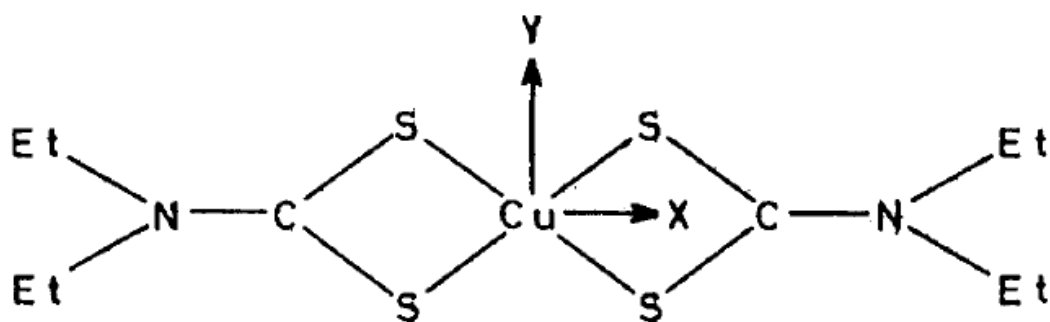


Figura 28: Representación espacial del complejo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ en el plano xy definido sobre el metal central.

Debido a la absorción a longitudes cercanas a 435 nm, el complejo presenta propiedades luminiscentes que permiten su determinación colorimétrica⁴. El complejo en solución se caracteriza por su coloración amarilla a café. El valor de pKa para la sal ácida es de 6,72, lo que indica que a pHs básicos (>8) se favorece la total ionización, obteniéndose la especie DDTC^- , la cual interacciona con los átomos metálicos en la matriz acuosa⁵.

La sal sódica del ácido dietilditiocarbámico presenta un log P_{ow} (con P_{ow} igual al coeficiente de partición octanol-agua) de 1,06 (estimado a través de cromatografía electrocinética micelar), indicador de la relativa polaridad de la sal, y que explica su afinidad al medio acuoso⁶. Aunque no se han informado valores de P_{ow} para el cromóforo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, estudios demuestran la existencia de interacciones hidrofóbicas para explicar la

retención al extractante, luego, el complejo presenta características de hidrofobicidad, y el material extractante actúa como un solvente orgánico apolar⁶⁻⁸. Tomando esto en cuenta, técnicas de extracción con materiales de sorción apolares también han sido empleadas en la determinación del complejo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ ⁸. Debido a esto se ha considerado, en este estudio, el empleo de PDMS, un reconocido material de sorción de baja polaridad como extractante soportado sobre el dispositivo de disco rotatorio ^{9,10}.

Se debe considerar, al momento de trabajar, la posible toxicidad de la sal sódica de dietilditiocarbamato: en organismos vivos, al sufrir descomposición proteica, se genera disulfiram el cual produce neuropatías periféricas en humanos y animales, y el dietilditiocarbamato, por formación del complejo, puede elevar los niveles de cobre en el cerebro y sistema nervioso periférico, generando stress oxidativo y peroxidación lipídica^{11,12}. A nivel externo, el NaDDTC puede causar irritación a la piel, ojos y el tracto respiratorio¹³.

Referencias

1. K.D. Karlin, "Progress in Inorganic Chemistry", John Wiley and Sons, Inc., 2005, 53, 383-395.
2. W.F. Coleman, "Molecular Models of Metal Complexes of Dithiocarbamates", Journal of Chemical Education, 2009, 86 (10), 1248.
3. L. Tosi, A. Garnier, "Resonance-Raman Spectra of Copper (II) and Nickel (II) Diethyldithiocarbamates", J.C.S. Dalton, 1978, 53-56.
4. Z. Jiang, S. Sun, A. Liang, C. Kang, Z. Huang, "Luminiscence properties of metal(II)-diethyldithiocarbamate chelate complex particles and its analytical application", Journal of Fluorescence 2005, 15 (6), 859-864.
5. V.D. Sastri, K.I. Aspila, C.L. Chakrabarti, "Studies on the solvent extraction of metal dithiocarbamates", Canadian Journal of Chemistry 1969, 47, 2320-2323.
6. I. Rogachev, C. Serra, A. Farran, J.L. Cortina, J. Gressel, A. Warshawsky, "Prediction of the octanol-water distribution of

- dithiocarbamate derivatives", *Reactive & Functional Polymers* 2003, 54, 17-24.
7. M.S. Meniai, M. Chikhi, "Elimination of Cu(II) from Aqueous Solutions by Liquid-liquid extraction. Test of Sodium Diethyldithiocarbamate (SSDT) as an Extracting Agent", *Energy Procedia* 2012, 18, 1165-1174.
 8. O.D. Sant'Ana, L.S. Jesuino, R.J. Cassella, M.S. Carvalho, R.E. Santelli, "Solid Phase Extraction of Cu(II) as Diethyldithiocarbamate (DDTC) Complex by Polyurethane Foam", *J. Braz. Chem. Soc.* 2003, 14 (5), 728-733.
 9. E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, "Sorptive sample preparation – a review", *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 373, 3-22.
 10. E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, "Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles", *J. Microcolumn Separations*, 1999, 11 (10), 737-747.
 11. E.G. Tonkin, H.L. Valentine, D.M. Milatovic, W. M. Valentine, "N,N-Diethyldithiocarbamate Produces Copper Accumulation, Lipid Peroxidation, and Myelin Injury in Rat Peripheral Nerve", *Toxicological Sciences* 2004, 81, 160-171.
 12. V.I. Lushchak, T.V. Bagnyukova, O.V. Lushchak, J.M. Storey, K.B. Storey, "Diethyldithiocarbamate injection induces transient oxidative stress in goldfish tissues", *Chemico-Biological Interactions* 2007, 170, 1-8.
 13. M. Backlund, K. Edwards, P.J. Farmer, "Disulfiram, Metals, and Melanoma", *Journal of Chemical Education* 2009, 86 (10), 1224-1226.