



UNIVERSIDAD DE CHILE

**"Determinación de ibuprofeno y sus
metabolitos en muestras acuosas utilizando
fases naturales en técnicas de
microextracción y GC-MS"**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Químicas

Facultad De Ciencias

Por

Valentina Varinia Rojas Candia

Marzo / 2023

**Directores de Tesis: Dr. Pablo Richter Duk,
Dr. Carlos Manzano Dávila y Dr. Daniel Arismendi**

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por el candidato.

Valentina Varinia Rojas Candia

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Químicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día

Director de Tesis:
Dr. Pablo Richter

Director de Tesis:
Dr. Carlos Manzano

Director de Tesis
Dr. Daniel Arismendi

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Carlos Rojas

Dra. Loreto Ascar

Dra. Tatiana Garrido

Dra. Verónica Arancibia

“Con suficiente tiempo, el talento y el entorno no son las únicas cosas que importan. ¡Con el tiempo, el trabajo arduo hace que brille!” – Sakuma Manabu

“No hay atajos para la victoria. Tienes que escalar esa empinada montaña paso a paso. Hay un abismo abajo y nunca termina. ¡Tú única opción es seguir escalando!” – Ryuichi Kazama



Valentina Rojas, nació el 07 de abril de 1997. Cursó su enseñanza básica y media en dos colegios, en el Fernando de Aragón y en el Espíritu Santo del Verbo Divino. En el año 2016 ingresó a la Universidad de Chile a estudiar la carrera de Licenciatura en Ciencias con Mención en Química. En el año 2019 realizó su tesis de pregrado, “Síntesis de compuestos fluorescentes basados en aminoisoxazoles anulados” con el Dr. Luis Vilches Herrera y se graduó de Licenciada en Química. Desde el año 2021 se encuentra desarrollando sus tesis, “Determinación de ibuprofeno y sus metabolitos en muestras acuosas utilizando fases naturales en técnicas de microextracción y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas”, en el programa de Magíster en Ciencias Químicas de la misma universidad con el Dr. Pablo Richter.

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi tutor el Dr. Pablo Richter por permitirme trabajar en su laboratorio y confiar en mi a pesar de no conocerme, por su buena disposición, por enseñarme cosas nuevas y por guiarme e incentivar me en este nuevo camino de la química analítica.

A Daniel, por aceptar ser mi tutor, por enseñarme todo lo del laboratorio, por darme los mejores consejos analíticos y por tenerme mucha paciencia. A todos los chicos del laboratorio (Ale, Naty y Giovanni) por recibirme con los brazos abiertos y hacer que mi estadía fuera muy amena y entretenida. También a Inma y a la profe Inés por sus consejos y a Betsabet por transmitirme todos sus conocimientos y ayudarme en cada crisis cromatográfica.

Al Dr. Carlos Manzano por aceptar ser mi tutor de la Facultad de Ciencias y por tener muy buena disposición y a la comisión por sus críticas constructivas.

A mi madre Mónica por estar siempre conmigo en cada momento, apoyarme en todas las decisiones que tomo y por entenderme siempre. A mi mami María por ser la mejor abuelita del mundo. A mis hermanos Christopher y Xavier que también aportaron su grano de arena en este proceso.

A mi compañero, amigo y confidente Roger, por acompañarme en pregrado y ahora en postgrado, por entenderme más que nadie, por apoyarme y ayudarme siempre cuando lo necesito. Gracias por querer ser mi compañero de vida. Nuevamente, Hasta el final, el final...

A mis compañeros y amigas de la U en especial a Carolina, Sabrina y Dina que sin duda fueron fundamental en este proceso. Guardo momentos de mucha risa, de los mejores cumpleaños y también de grandes sustos por los ramos. Ciclobutano siempre en mi corazón.

A ANID por otorgarme la beca de Magíster Nacional (22210280) y financiar mis estudios de postgrado. También al proyecto Fondecyt 1220225 por el financiamiento de esta investigación.

Y finalmente a todos aquellos que me ayudaron en este proceso y creen que deban estar presentes en este trabajo.

Valentina Rojas

INDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Antecedentes generales	1
1.1.1. Ibuprofeno y metabolitos.....	2
1.2. Antecedentes específicos	6
1.2.1. Preparación de muestras.....	6
1.2.2. Fases sorbentes naturales.....	10
1.2.3. Carbones activados	18
1.2.4. Determinación y cuantificación de analitos.....	22
1.2.5. Caracterización de las fases sorbentes.....	25
1.2.6. Propuesta de Investigación.....	26
2. HIPÓTESIS	28
3. OBJETIVOS	29
3.1. Objetivo general.....	29
3.2. Objetivos específicos.....	29
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
4.1. Materiales.....	30
4.2. Reactivos	30
4.3. Instrumentos y equipos de laboratorio.....	31
4.4. Metodología	32
4.4.1. Preparación de estándares y optimización cromatográfica.....	32
4.4.2. Fases naturales	34
a) Preparación fases sorbentes.....	34
b) Procedimiento RDSE de fases naturales	36
4.4.3. Carbones activados	37
a) Síntesis de carbones activados.....	37
b) Procedimiento RDSE para CA de semilla de palta y CA de corcho.....	39
4.4.4. Optimización de variables influyentes en RDSE	41
4.4.5. Caracterización de fases sorbentes:	44
4.4.6. Validación del método analítico	45
a) Precisión y Exactitud	45
b) Curva de calibración	47

c) Límite de detección y de cuantificación	48
4.4.7. Muestras reales	48
5. Resultados y Discusión.....	49
5.1. Optimización cromatográfica (GC-MS):.....	49
5.1.1. Derivatización	49
5.1.2. Determinación de método cromatográfico.....	53
5.2. Fases naturales	55
5.2.1. Preparación de las fases sorbentes naturales.....	55
5.2.2. Caracterización de fases sorbentes naturales.....	61
5.2.3. Optimización de variables involucradas en RDSE utilizando fases naturales	69
5.2.3.1. Cantidad de fase (semilla de palta en polvo).....	69
5.2.3.2. Estudio de variables químicas	70
5.2.3.3. Estudio de variables hidrodinámicas	74
5.3. Validación del método analítico para fases naturales	80
5.3.1. Cifras de mérito.....	80
5.4. Comparación de fases naturales con fases comerciales	83
5.5. Carbones activados	85
5.5.1. Síntesis de carbones activados	85
5.5.2. Caracterización de los CAs.....	100
5.5.3 Optimización de carbones activados en RDSE.....	104
5.5.3.1. Estudio de variables químicas	104
5.5.3.2. Estudio de variables hidrodinámicas	110
5.6. Validación del método analítico para CAs	114
5.6.1. Determinación de las cifras de mérito	114
5.6.2. Muestras reales	117
5.7. Comparación de fases	118
6. CONCLUSIONES	126
7. BIBLIOGRAFÍA	127

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representación de contaminación de aguas por fármacos	2
Esquema 2. Fuente de aparición del ibuprofeno en el medio ambiente.....	3
Esquema 3. Procedimiento de extracción en fase sólida (SPE)	7
Esquema 4. (a) Sistema de SPME, (b) Sistema de SBSE	8
Esquema 5. Sistema RDSE: (a) Disco plano, (b) Disco con cavidad.....	9
Esquema 6. (a) Disco con camisa con fase laminar de corcho, (b) Vista desde arriba.	9
Esquema 7. Reacción de derivatización por sililación con MSTFA.....	24
Esquema 8. Proceso de extracción en sistema RDSE para la determinación de los analitos...	27
Esquema 9. Preparación de la fase semilla de palta en polvo	34
Esquema 10. Preparación del disco rotatorio con corcho laminar (en rosa) y semilla de palta en polvo (en verde)	36
Esquema 11. Ruta de carbonización para las fases sorbentes.....	38
Esquema 12. Síntesis de carbón activado.....	38
Esquema 13. Procedimiento de RDSE con carbón activado.	39
Esquema 14. Mecanismo sugerido por Ma et al. (2016)	99
Esquema 15. Mecanismo sugerido a partir de lo informado por Ma et al. (2016) y Xi et al. (2018)	100

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del ibuprofeno.....	4
Figura 2. Estructuras químicas de 1-hidroxiibuprofeno (a), 2-hidroxiibuprofeno (b) y carboxiibuprofeno (c).	4
Figura 3. Estructuras químicas de algunas fases comerciales implementadas en la técnica RDSE	10
Figura 4. Corteza de alcornoque, corcho (<i>Quercus surber L.</i>).....	12
Figura 5. Estructuras químicas de suberina (a) y lignina (b).....	13
Figura 6. Comparación de respuestas obtenidas usando distintas fibras en DI-SPME (corcho, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS y PDMS) para el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en muestras de agua de río	14
Figura 7. Recuperaciones absolutas de hormonas utilizando diferentes fases de extracción en RDSE	14
Figura 8. Evolución de la producción y superficie mundial de palta (1966-2016).....	16
Figura 9. Estructuras químicas de componentes de la semilla de palta	17
Figura 10. Estructura química del grafito (a) y del carbón activado (b).	19
Figura 11. a) Disco rotatorio con camisa usando corcho laminar como fase sorbente, b) Camisa del disco, c) Disco con agitador magnético, d) Lámina de corcho.	34
Figura 12. Disco con cavidad utilizando fase sorbente semilla de palta.	35
Figura 13. Disco con camisa utilizando carbón activado de corcho (activado con K_2CO_3) como fase sorbente.	40
Figura 14. Analitos de estudio.....	49
Figura 15. Área cromatográfica en función de las distintas condiciones de derivatización.....	50
Figura 16. Cromatogramas (TIC) de analitos derivatizados.	51
Figura 17. Gráficos de Pareto obtenido del análisis screening para cada analito.....	53
Figura 18. Cromatograma de ibuprofeno y sus metabolitos.	54
Figura 19. Cromatograma TIC más iones cuantificadores de ibuprofeno y sus metabolitos.	55
Figura 20. Área cromatográfica en función de solvente de limpieza y elución usando corcho laminar como fase de extracción.	57
Figura 21. Estudio de limpieza de fase corcho laminar.	58
Figura 22. Estructura química del compuesto perseorangina	59
Figura 23. Estudio de limpieza de la fase semilla de palta.	60
Figura 24. Comparación de cromatogramas al utilizar diferentes solventes de elución con la fase semilla de palta en polvo.....	60

Figura 25. Espectro FTIR para fase sorbente corcho laminar.....	61
Figura 26. Espectro FTIR para fase sorbente semilla de palta	62
Figura 27. Micrografías SEM del corcho natural.....	63
Figura 28. Micrografías SEM de semilla de palta natural.....	64
Figura 29. a) Punto de carga cero (PZC) y b) Punto isoelectrico (IEP) del corcho natural.....	65
Figura 30. a) Punto de carga cero (PZC) y b) Punto isoelectrico (IEP) de la semilla de palta natural	65
Figura 31. Análisis TGA y DTG (a y b) para la fase corcho laminar.....	67
Figura 32. Análisis TGA y DTG (a y b) para la fase semilla de palta.....	68
Figura 33. Respuesta analítica en función de la cantidad de fase sorbente (semilla de palta) .	69
Figura 34. Respuesta analítica en función del pH para corcho laminar	71
Figura 35. Respuesta analítica en función del pH para polvo de semilla de palta.....	71
Figura 36. Respuesta cromatográfica en función del efecto salting-out para el cocho laminar..	73
Figura 37. Respuesta cromatográfica en función del efecto salting-out para semilla de palta ..	73
Figura 38. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido de la optimización de las variables hidrodinámicas usando corcho laminar como fase sorbente.	77
Figura 39. Superficie de contorno de deseabilidad para el estudio de variables hidrodinámicas utilizando corcho como fase sorbente.	78
Figura 40. Respuesta cromatográfica en función del volumen de muestra para semilla de palta	78
Figura 41. Perfil de tiempo de extracción de semilla de palta	79
Figura 42. Curvas de adición estándar en matriz (5-60 µg/L) para ibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno (en duplicado) utilizando corcho laminar.	81
Figura 43. Curva de adición estándar en matriz usando semilla de palta.....	82
Figura 44. Comparación de fases comerciales con corcho laminar	83
Figura 45. Comparación de fases comerciales con semilla de palta particulada.....	84
Figura 46. Respuesta analítica en función de la concentración de activante para el CA de semilla de palta a 400°C.....	86
Figura 47. Respuesta analítica en función de la concentración de activante para el CA de semilla de palta a 400°C utilizando ZnCl ₂ y K ₂ CO ₃ al 40,30 y 20% m/v.....	88
Figura 48. Cromatograma obtenido al usar carbón de semilla de palta activado con K ₂ CO ₃ al 30% (a 400°C).	88
Figura 49. Cromatograma obtenido al usar carbón de semilla de palta activado con ZnCl ₂ al 30% (a 400°C).	89
Figura 50. Fotografía de los carbones de s. de palta activados con K ₂ CO ₃ a diferentes concentraciones.....	90

Figura 51. Respuesta analítica en función de la temperatura de pirólisis para el carbón activado con ZnCl ₂ al 30% <i>m/v</i> de semilla de palta.	91
Figura 52. Espectro FTIR del carbón de semilla de palta activado con ZnCl ₂ (CA Zn30, A) y con K ₂ CO ₃ (CA K30, B) a distintas temperaturas.	93
Figura 53. Respuesta analítica versus concentración de activante para el CA de corcho a 400°C.	94
Figura 54. Respuesta analítica en función de la concentración de activante para el CA de corcho a 400°C utilizando K ₂ CO ₃ y ZnCl ₂	95
Figura 55. Respuesta analítica en función de la temperatura de carbonización de corcho (activado con K ₂ CO ₃ al 20% <i>m/v</i>).	96
Figura 56. Fotografía de carbón de corcho activado con K ₂ CO ₃ al 20% a 800°C.	97
Figura 57. Espectro FTIR del carbón de corcho activado con K ₂ CO ₃ (CA K20, A) y con ZnCl ₂ (CA Zn20, B) a distintas temperaturas.	98
Figura 58. Micrografías SEM del CA de s. de palta Zn 30% a 600°C.	101
Figura 59. Micrografías SEM de CA de corcho K20% a 600°C.	102
Figura 60. PCZ y IEP (a y b) del CA de s. palta.	103
Figura 61. PZC y IEP (a y b) del CA de corcho.	103
Figura 62. Respuesta analítica en función del pH para CA de semilla de palta.	105
Figura 63. Respuesta analítica en función del pH para CA de corcho.	106
Figura 64. Respuesta analítica en función de la concentración de NaCl (% <i>m/v</i>) para CA de semilla de palta.	107
Figura 65. Respuesta analítica en función de la concentración de NaCl (% <i>m/v</i>) para CA de corcho.	108
Figura 66. Respuesta analítica en función de los solventes de elución para el CA de semilla de palta.	109
Figura 67. Respuesta analítica en función de solvente de elución para CA de corcho.	109
Figura 68. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido de la optimización de las variables hidrodinámicas usando CA de s. de palta como fase sorbente.	111
Figura 69. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido de la optimización de las variables hidrodinámicas usando CA de corcho como fase sorbente.	112
Figura 70. Superficies de contornos de deseabilidad para los analitos de estudio usando CA de s. de palta (a) y CA de corcho (b) como fases sorbentes.	113
Figura 71. Curvas de adición estándar en matriz (5-100 µg/L) para los analitos utilizando la fase CA de s. de palta.	114
Figura 72. Curvas de adición estándar en matriz (5-100 µg/L) para los analitos utilizando la fase CA de corcho.	116

Figura 73. Comparación de fases comerciales con CA de s. de palta	119
Figura 74. Comparación de fases comerciales con CA de corcho.....	120
Figura 75. Comparación de CA de s. de palta con biochar sintetizado a distintas temperaturas.	121
Figura 76. Comparación de CA de corcho con biochar sintetizado a distintas temperaturas. .	121
Figura 77. Espectros FTIR de diferentes biochar de s. de palta (A) y biochar de corcho (B) a distintas temperaturas.....	122
Figura 78. Micrografías SEM de biochar de semilla de palta a 600°C	124
Figura 79. Micrografías SEM de biochar de corcho a 600°C	125

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de ibuprofeno y sus metabolitos.....	5
Tabla 2. Comparación de diferentes métodos analíticos de determinación de ibuprofeno y sus metabolitos desde muestras de aguas.	24
Tabla 3. Condiciones cromatográficas y del espectrómetro de masas.....	33
Tabla 4. Condiciones de activación en horno convencional (mufla) para semilla de palta y corcho laminar.....	37
Tabla 5. Condiciones de extracción utilizando CAs de s. de palta y corcho.....	40
Tabla 6. Optimización de variables en RDSE.	41
Tabla 7. Matriz de experimentos (diseño Doehlert) para la fase sorbente corcho laminar.....	43
Tabla 8. Matriz de experimentos (diseño Doehlert) para carbones activados de corcho y semilla de palta.	44
Tabla 9. Condiciones de derivatización de los analitos.	49
Tabla 10. Matriz de screenig para estudio de derivatización de los analitos.....	52
Tabla 11. Tiempo de retención y iones cuantificador e identificador de los analitos.....	54
Tabla 12. Prueba de solventes de limpieza y de elución.....	56
Tabla 13. Evaluación de la preparación de la fase corcho laminar.....	57
Tabla 14. Evaluación de la preparación de la fase semilla de palta en polvo	59
Tabla 15. ANOVA de una vía de cantidad de fase para ibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno	70
Tabla 16. Valores de pH de la muestra acuosa antes y después de la extracción	72
Tabla 17. Análisis ANOVA de la regresión del diseño Doehlert (k=3) utilizando corcho laminar.	76
Tabla 18. Variables de estudios y condiciones optimizadas.....	80
Tabla 19. Cifras de mérito para el corcho laminar	81
Tabla 20. Cifras de mérito para la fase semilla de palta	82
Tabla 21. Test t entre las concentraciones (40 y 30% m/v) del activante ZnCl ₂	87
Tabla 22. Rendimientos de síntesis de CA de s. de palta utilizando ZnCl ₂ y K ₂ CO ₃ (40, 30, 20% m/v) a 400°C.....	89
Tabla 23. ANOVA de una vía entre las tres temperaturas de pirólisis para el CA de s. de palta.	91
Tabla 24. Rendimientos de síntesis de CA de s. de palta (Zn30%) para tres temperaturas diferentes (400, 600 y 800°C).....	92
Tabla 25. Rendimientos del proceso de fabricación de los carbones activados de corcho con K ₂ CO ₃ y ZnCl ₂ a 400°C.....	96

Tabla 26. Rendimientos del proceso sintético del CA de corcho a diferentes temperaturas.	97
Tabla 27. ANOVA de la regresión para los analitos utilizando los CAs como fases sorbentes.	111
Tabla 28. Recopilación de las variables optimizadas en RDSE empleando las fases CA de s. de palta y CA de corcho.....	113
Tabla 29. Figuras de mérito para el método propuesto del CA de semilla de palta.	115
Tabla 30. Figuras de mérito para el método propuesto del CA de corcho.	117
Tabla 31. Concentración (\pm SD) de fármacos en afluentes y efluentes de la PTAR El Trebal, usando CA de semilla de palta como fase sorbente	118

Glosario

MeCN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
BA μ E	Bar adsorptive microextraction
BTEX	Benceno, tolueno, etilbenceno y xileno
CA	Carbón activado
COOH-IBU	Carboxiibuprofeno
FC	Factor de concentración
IBU	Ibuprofeno
IEP	Isoelectric point
LD	Límite de detección
LQ	Límite de cuantificación
LLE	Liquid-Liquid Extraction
MeOH	Metanol
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida
Oasis HLB	Oasis Hydrophilic-Lipophilic Balance
C18	Octadecil silano
PDMS	Polidimetilsiloxano
PCB-77	3,3', 4,4'-Tetraclorobifenil
PZC	Point of zero charge
Rpm	Revoluciones por minuto
RDSE	Rotating disk sorptive extraction
RSD	Relative standard deviation
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SEM	Scanning Electron Microscopy
SPE	Solid Phase Extraction
St-DVB	Estireno divinilbenceno
TGA	Thermogravimetric análisis
t_R	Tiempo de retención
1-OH-IBU	1-hidroxiibuprofeno
2-OH-IBU	2-hidroxiibuprofeno

RESUMEN

En el último tiempo, el uso de materias primas naturales ha llamado la atención de muchos investigadores de la rama de la Química analítica para emplearlos como fases sorbentes en la determinación de contaminantes emergentes. En Chile se generan alrededor de 8,1 millones de toneladas de basura donde el 58% equivale a residuos orgánicos. Entre los desperdicios domésticos se encuentran las cáscaras de frutas, semillas o cuercos, bolsas de té, residuos de café, cáscaras de huevo e incluso tapones de corcho, el cuál son una fuente rica en carbono. Algunos de ellos se encuentran compuestos por una diversidad de polímeros naturales como celulosa, hemicelulosa, lignina o suberina que contienen varios grupos funcionales que le dan la capacidad de interactuar con diferentes moléculas y, por tanto, pueden ser aplicados como fases sorbentes. Sin embargo, una novedosa estrategia es utilizar los residuos agrícolas en su forma de carbón activado ya que, de acuerdo a las condiciones experimentales de pirólisis y activación, se puede modular su nivel de porosidad y la polaridad de su superficie, mejorando sustancialmente las propiedades sorbentes de una fase natural. En consecuencia, el uso de estas fases en técnicas de microextracción permite llevar a cabo un trabajo mucho más limpio y eco-amigable con el medio ambiente, cumpliendo así con algunos postulados de la Química Analítica Verde.

En este estudio se implementó el uso de una tecnología de microextracción basada en la extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE), empleando la fase de corcho y semilla de palta, para la extracción de ibuprofeno y sus metabolitos (1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno y carboxiibuprofeno) a partir de muestras acuosas y su posterior determinación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Se utilizaron tanto las fases naturales como sus carbones activados, donde se optimizaron las variables (hidrodinámicas y químicas) involucradas en el proceso de extracción y se optimizaron las condiciones de síntesis de los carbones activados. Posteriormente, los métodos optimizados fueron validados a través de sus cifras de mérito.

Los experimentos con los carbones activados se realizaron a tres diferentes temperaturas, donde se encontró que la condición óptima fue a 600°C. Se probaron dos activantes químicos (K_2CO_3 y $ZnCl_2$) y se evaluaron sus concentraciones, para la activación del corcho se consideró como óptimo utilizar una solución de K_2CO_3 al 20%*m/v* y para la semilla de palta $ZnCl_2$ al 30%*m/v*.

En cuanto al procedimiento RDSE, los resultados mostraron que las extracciones se vieron fuertemente influenciadas por el pH dado que los analitos son ácidos, para las fases naturales y el carbón activado de corcho se obtuvo un pH óptimo de 2 y para el carbón activado de semilla palta pH 4. En cuanto a la fuerza iónica, se requiere de 20% de NaCl para las fases naturales, 10% de NaCl para el carbón activado de corcho y para el carbón activado de semilla de palta no se requiere la presencia de sal. Por otro lado, las variables hidrodinámicas óptimas que se obtuvieron utilizando corcho y la semilla de palta son 20 mL de muestra, 90 y 60 min para el tiempo de extracción, respectivamente, y 2000 rpm para la velocidad de agitación. Para los carbones activados son 25 mL de muestra y 90 min para el tiempo de extracción.

Los límites de detección y de cuantificación de los métodos oscilaron en el rango de los ng/L. Sin embargo, las mayores eficiencias de extracción se tienen cuando se utilizan carbones activados como fases sorbentes, ya que con las fases naturales solo es posible detectar ibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno. Con el corcho natural se obtuvieron recuperaciones relativas entre 39-118% y con la semilla de palta natural se tuvieron recuperaciones relativas entre 31-105% para ibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno. Por otro lado, con el carbón activado de corcho se calcularon porcentajes de recuperaciones absolutas entre 19-55% y con el carbón activado de semilla de palta entre 16-46% para los analitos ibuprofeno, 1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno y carboxiibuprofeno.

Finalmente, se aplicó el método propuesto con el carbón activo de semilla de palta para el análisis de afluentes y efluentes de una planta de tratamiento de aguas residuales de Santiago de Chile. La concentración encontrada estuvo entre 0,17-5,57 $\mu\text{g/L}$ en afluentes y en efluentes entre 0,59-4,34 $\mu\text{g/L}$ para ibuprofeno y sus metabolitos.

SUMMARY

Recently, the use of natural raw materials has attracted the attention of many researchers in the field of analytical chemistry to use them as sorbent phases in the determination of emerging contaminants. In Chile, around 8.1 million tons of waste are generated, 58% of which is organic waste. Among the household waste are fruit peels, seeds or shells, tea bags, coffee waste, eggshells and even cork stoppers, which are a rich source of carbon. Some of them are composed of a diversity of natural polymers such as cellulose, hemicellulose, lignin or suberin that contain various functional groups that give them the ability to interact with different molecules and, therefore, can be applied as sorbent phases. However, a novel strategy is to use agricultural residues in their activated carbon form since, according to the experimental conditions of pyrolysis and activation, their porosity level and surface polarity can be modulated, substantially improving the sorbent properties of a natural phase. Therefore, the use of these phases in microextraction techniques allows carrying out a much cleaner and eco-friendly work with the environment, thus complying with some postulates of Green Analytical Chemistry.

This study implemented the use of a microextraction technology based on rotating-disk sorptive extraction (RDSE), using the cork and avocado seed phase, for the extraction of ibuprofen and its metabolites (1-hydroxyibuprofen, 2-hydroxyibuprofen and carboxyibuprofen) from aqueous samples and their subsequent determination by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Both natural phases and their activated carbons were used, where the variables (hydrodynamic and chemical) involved in the extraction process were optimized and the synthesis conditions of the activated carbons were optimized. Subsequently, the optimized methods were validated through their figures of merit.

The experiments with activated carbons were carried out at three different temperatures, where it was found that the optimum condition was at 600°C. Two chemical activants (K_2CO_3 and

ZnCl₂) were tested and their concentrations were evaluated, for cork activation it was considered optimal to use a K₂CO₃ solution at 20% w/v and for avocado seed ZnCl₂ at 30% w/v.

As for the RDSE procedure, the results showed that the extractions were strongly influenced by the pH since the analytes are acidic, for the natural phases and the cork activated carbon an optimum pH 2 was obtained and for the avocado seed activated carbon pH 4. As for the ionic strength, 20% NaCl is required for the natural phases, 10% NaCl for the cork activated carbon and for the avocado seed activated carbon the presence of salt is not required. On the other hand, the optimum hydrodynamic variables obtained using cork and avocado seed are 20 mL of sample, 90 and 60 min for extraction time, respectively, and 2000 rpm for velocity of rotation. For the activated carbons are 25 mL of sample and 90 min for the extraction time.

The detection and quantification limits of the methods ranged in the ng/L. However, the highest extraction efficiencies were obtained when activated carbons were used as sorbent phases, since with natural phases it was only possible to detect ibuprofen and 1-hydroxyibuprofen. With natural cork, relative recoveries between 39-118% were obtained and with natural avocado seed, relative recoveries between 31-105% were obtained for ibuprofen and 1-hydroxyibuprofen. On the other hand, with the cork activated carbon, absolute recoveries between 19-55% and with the avocado seed activated carbon between 16-46% were calculated for the analytes ibuprofen, 1-hydroxyibuprofen, 2-hydroxyibuprofen and carboxyibuprofen.

Finally, the proposed method was applied with avocado seed activated carbon for the analysis of influents and effluents from a wastewater treatment plant in Santiago, Chile. The concentration found was between 0.17-5.57 µg/L in influents and for effluents between 0.59-4.34 µg/L for ibuprofen and its metabolites.

1. INTRODUCCIÓN

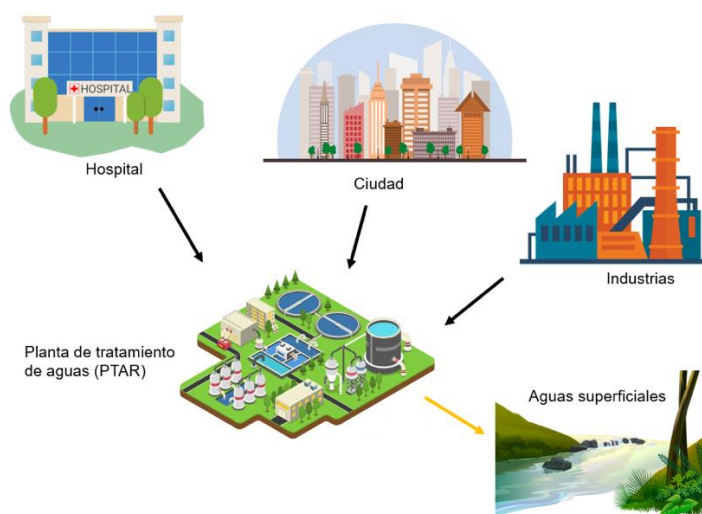
1.1. Antecedentes generales

En la última década, las investigaciones se han centrado en el estudio de contaminantes ambientales o más bien “contaminantes nuevos o emergentes”, debido a que son compuestos que no se encuentran regulados y se desconoce la información acerca de sus tratamientos e impactos.¹ La característica de estos compuestos es que no necesitan ser persistentes en el medioambiente para generar influencias negativas ya que su tasa de retiro y/o transformación está equilibrada por su continua introducción al medioambiente. Entre estos contaminantes se encuentran los productos farmacéuticos (PF).²

Los PF son sustancias químicas sintéticas que abarcan una gran diversidad de compuestos con diferentes propiedades, ionizables en la mayoría de los casos en matrices complejas dada su estabilidad y actividad biológica.³ Actualmente, los PF son considerados como una importante fuente de contaminación para los medios ambientales por las continuas descargas que se producen diariamente.⁴ Grandes cantidades de fármacos son desechados mediante diferentes fuentes y mecanismos, como por ejemplo a través de descargas de hospitales, de industrias, de excreciones humanas y animales, de la basura doméstica, entre otras.⁵ Posteriormente, estos desechos llegan a las aguas servidas para ser tratados y/o eliminados en las plantas de tratamientos de aguas residuales (PTAR) y a pesar de ello, su eliminación no es exhaustiva. Las PTAR no se encuentran diseñadas para eliminar este tipo de compuestos y una gran parte de estos productos es liberado al medio ambiente a través de los efluentes u otra es retenida en los lodos de las PTAR,⁶ más bien, se infiere que las plantas de tratamientos de aguas actúan como una puerta de entrada a las matrices acuosas.⁷ Sin embargo, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, sus metabolitos, productos de degradación y/o propiedades de los suelos, estos puedan alcanzar las aguas subterráneas, contaminar los

acuíferos y quedarse retenidos en los suelos afectando así al ecosistema.⁸ Por tanto, la determinación de la presencia de productos farmacéuticos en el medio acuático genera un campo de gran interés.

Las drogas antiinflamatorias no esteroideas (AINEs) se encuentran entre los PF más utilizados por la población tanto en el cuidado de la salud humana como animal. Los AINEs se caracterizan por ser fármacos antipiréticos, antiinflamatorios y analgésicos que alivian distintos síntomas como fiebre, dolor e hinchazón.⁹ De acuerdo a la literatura se ha informado su cuantificación en el rango de concentración de ng/L hasta µg/L en aguas de río y residuales e incluso se ha demostrado que estos pueden estar presentes en el agua potable y aguas subterráneas alcanzando niveles trazas de concentración (ng/L).¹⁰⁻¹²

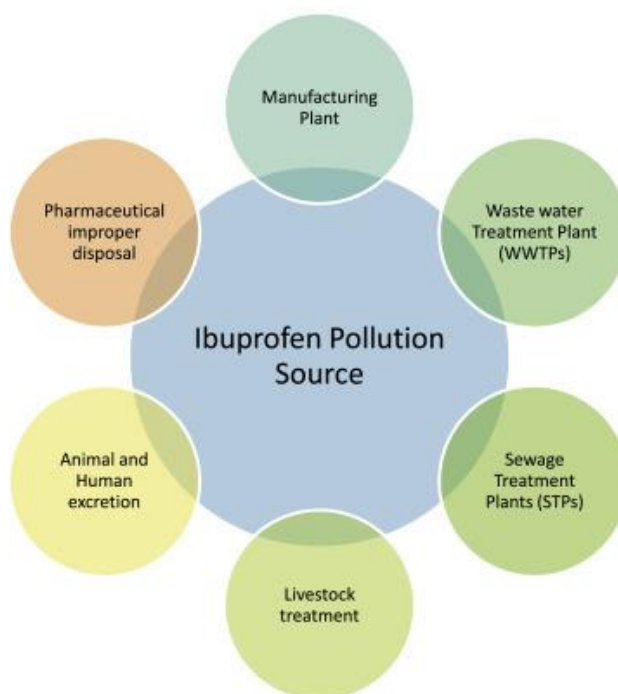


Esquema 1. Representación de contaminación de aguas por fármacos.

1.1.1. Ibuprofeno y metabolitos

El ibuprofeno (IBU) denominado químicamente como ácido (RS)-2-(4-isobutilfenil)propanoico es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) frecuentemente utilizado, a nivel mundial, por sus propiedades farmacéuticas, por su bajo costo y fácil accesibilidad. Es uno de los fármacos principales en la “Lista de Medicamentos Esenciales” de la Organización Mundial de la Salud

(OMS),¹³ por tanto, tiene una producción anual estimada en millones de toneladas, lo que conlleva a que esté presente en muchos cuerpos de agua debido a que es vertido constantemente a través de los efluentes municipales, hospitalarios e industriales (Esquema 2).¹⁴ Según el Instituto de Salud Pública (ISP, 2020) el IBU, de la dosis de 600 mg, se encuentra tercero en el ranking de los medicamentos más vendidos en Chile, con un total de 4.709.576 unidades vendidas entre enero-octubre del año 2021.¹⁵



Esquema 2. Fuente de aparición del ibuprofeno en el medio ambiente.²¹

Estructuralmente el IBU es un alquilbenceno con un grupo funcional ácido carboxílico, contiene un carbono α asimétrico en la cadena lateral del ácido propiónico (Figura 1) que permite obtener dos enantiómeros con dos configuraciones (-)-(R) o (+)-(S). Si bien, este se comercializa como una mezcla racémica, su actividad antiinflamatoria se encuentra dada por el enantiómero (+)-(S), puesto que en el cuerpo humano el (-)-(R)-IBU se invierte unidireccionalmente al enantiómero activo (+)-(S)-IBU.^{16,17}

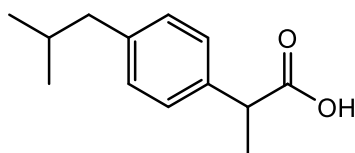


Figura 1. Estructura química del ibuprofeno.

El IBU es un fármaco inhibidor de prostaglandinas que a través de su mecanismo de acción permite controlar la inflamación, dolor y fiebre mediante la inhibición de la ciclooxigenasa (responsable de la biosíntesis de prostaglandinas).¹⁸ Se metaboliza en el hígado dando lugar a metabolitos a través de una oxidación. Se excreta, a través de la orina, en un porcentaje relativamente alto, entre el 70-80% de la dosis terapéutica, como compuesto original, libre o conjugado, o en forma de metabolito, siendo así continuamente eliminado en las aguas residuales. Sus principales metabolitos son 2-hidroxiibuprofeno (2-OH-IBU) y carboxiibuprofeno (COOH-IBU), mientras que otros metabolitos como el 1-hidroxiibuprofeno (1-OH-IBU) también pueden estar presentes en la orina, pero en concentraciones más bajas (Figura 2).¹⁶⁻¹⁸

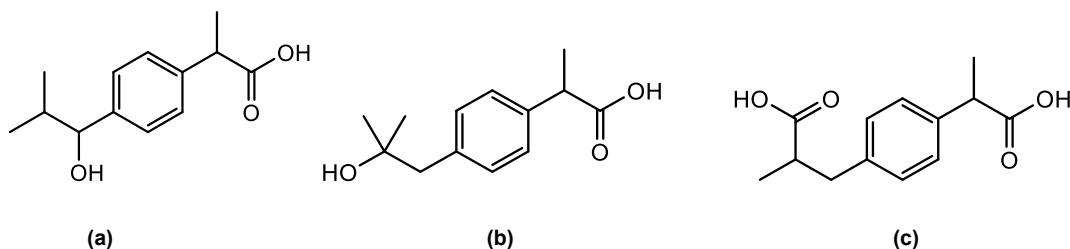


Figura 2. Estructuras químicas de 1-hidroxiibuprofeno (a), 2-hidroxiibuprofeno (b) y carboxiibuprofeno (c).

Como se observa en la Tabla 1 tanto el IBU como sus metabolitos son compuestos ácidos donde su constante de acidez (pK_a) varía entre 3,97 y 5,3. Por otro lado, presentan coeficientes de partición octanol/agua (Log Kow) que varían entre 2,37 y 3,97, lo que indica que son compuestos de un rango de polaridad entre media y baja.^{19,20} Si bien, estos poseen leve solubilidad en agua, sus propiedades ionizables les permiten tener una movilidad bastante alta en el medio acuoso debido a que a pH neutro se encuentran totalmente ionizados o en su forma desprotonada, lo que indica que podrían fácilmente incorporarse a la cadena trófica.

Tabla 1. Propiedades fisicoquímicas de ibuprofeno y sus metabolitos.

Molécula*	Fórmula molecular	Peso Molecular (g/mol)	pKa	Log Kow	Solubilidad en agua (g/L)	Ref.
IBU	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206,285	4,91 – 5,3	3,97	0,021	19, 20
1-OH-IBU	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	222,284	4,55	2,69	0,51	19, 20
2-OH-IBU	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	222,284	4,63	2,37	0,3	19, 20
COOH-IBU	C ₁₃ H ₁₆ O ₄	236,267	3,97	2,78	0,3	19, 20

*IBU: ibuprofeno, 1-OH-IBU: 1-hidroxiibuprofeno, 2-OH-IBU: 2-hidroxiibuprofeno, COOH-IBU: carboxiibuprofeno.

La entrada de estos compuestos en varios cuerpos de agua genera efectos adversos a largo plazo en la vida acuática. Se ha demostrado que el ibuprofeno tiene efectos de disruptor endocrino e inductor potencial del estrés oxidativo.²¹ Por ejemplo, Pomati *et al.* (2006),²² demostraron que el ibuprofeno afecta significativamente en el crecimiento de varias especies de bacterias y hongos. Schnell *et al.* (2009)²³ informaron que el ibuprofeno combinado con otros productos farmacéuticos ambientales puede impedir la proliferación celular en las células embrionarias humanas, sin embargo, la citotoxicidad del ibuprofeno producida fue por concentraciones superiores a los valores encontrados en el medio ambiente. Por otro lado, en cuanto a sus metabolitos Marco-Urrea *et al.* (2009)²⁴ detallan que estos presentan una toxicidad superior al ibuprofeno, luego de tratar con hongos las aguas dopadas con este compuesto, donde además solo se detectó la presencia de los metabolitos hidroxilados.

Dado que los metabolitos han sido considerados más tóxicos que el compuesto original, es importante estudiarlos y encontrar métodos eficaces para su detección. En la actualidad, se ha detectado la presencia de estos compuestos en cuerpos de aguas como por ejemplo, Ferrando-Climent *et al.* (2012),¹⁹ informaron la detección y cuantificación de ibuprofeno y sus metabolitos en muestras de aguas residuales donde registraron para los afluentes concentraciones de 13,74; 5,8; 38,4 y 94,0 µg/L y para los efluentes 1,9; 1,4; 10,7 y 5,9 µg/L para IBU, 1-OH-IBU, COOH-IBU y 2-OH IBU, respectivamente. Además, encontraron en muestras de ríos la presencia de COOH-IBU alcanzando una concentración de 3,9 µg/L.

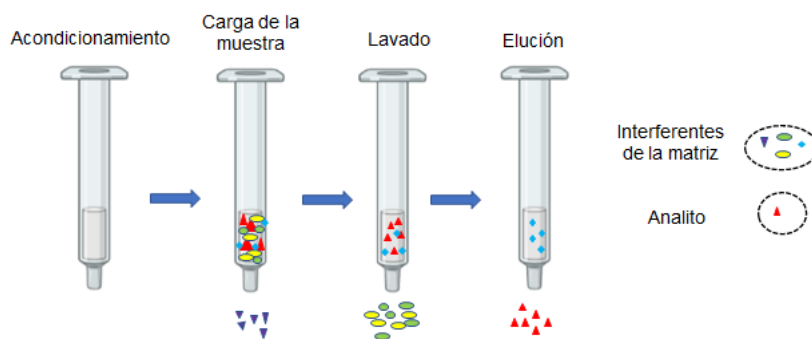
1.2. Antecedentes específicos

1.2.1. Preparación de muestras

A lo largo de los años, la química analítica ha jugado un papel fundamental en el desarrollo de la ciencia, ya que permite la obtención de información, en forma cuantitativa, cualitativa o estructural, de un determinado sistema u objeto a partir de un problema analítico, como por ejemplo, la determinación de la composición de una muestra desconocida o la determinación de un analito objetivo en una determinada matriz que a través de diferentes parámetros de calidad (o cifras de mérito), se puede comprobar la validez de los resultados. Sin embargo, el procedimiento analítico para cuantificar y/o determinar la presencia de un analito en una matriz dada requiere de una serie de etapas, las cuales van a variar de acuerdo con el tipo de analito que se desea determinar, el tipo de matriz y la concentración en la que estén presentes dichos compuestos. En este contexto, el desarrollo de métodos para la medición de contaminantes ambientales, como el ibuprofeno y sus metabolitos, en matrices acuosas es parte de esta rama de la química. Por lo tanto, dado que este tipo de contaminantes se encuentran presentes en matrices complejas y cantidades trazas, la etapa de preparación de muestra es un paso trascendental antes de ingresar la muestra al instrumento analítico, por lo que se debe realizar una etapa previa de preconcentración y aislamiento de los analitos desde la muestra que permita eliminar los interferentes de la matriz, haciendo factible la detección y cuantificación.²⁵

Una técnica convencional es la extracción en fase sólida (SPE) que permite el enriquecimiento y limpieza de muestras a través de la preconcentración del analito de interés. Esta técnica consiste en retener en un adsorbente sólido los compuestos de estudio (disueltos en una muestra líquida), los interferentes son eliminados a través de la adición de un eluyente adecuado y los analitos son posteriormente eluidos y concentrados (Esquema 3). Esta técnica en comparación a otras más convencionales como LLE (extracción líquido-líquido) no requiere del uso indiscriminado de solventes orgánicos.²⁶ Sin embargo, a pesar de que SPE ha resultado

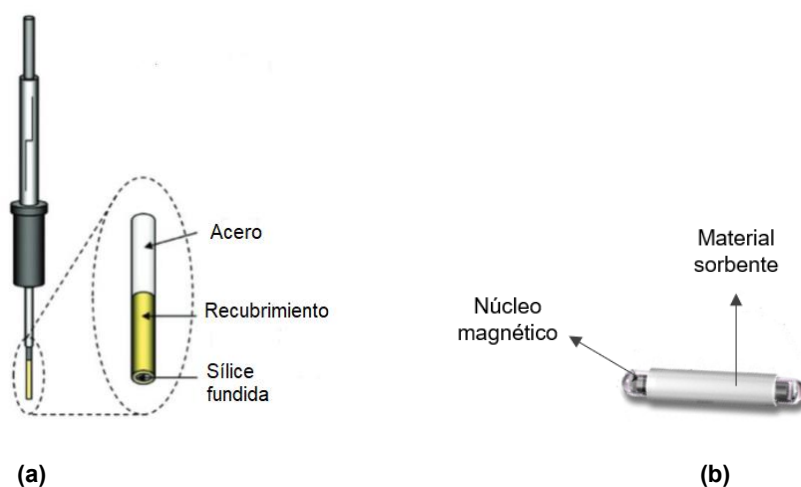
ser una técnica de preparación de muestra preferida para la extracción de distintos fármacos a partir de medios acuosos, en el último tiempo, la línea de investigación se ha inclinado por la miniaturización de las técnicas. En efecto, se buscan técnicas que permitan llevar a cabo la microextracción de los analitos y con una línea más verde, es decir, técnicas que reduzcan el uso de solventes orgánicos que sean contaminantes y/o peligrosos para el medio ambiente y el operador, métodos más rápidos, simples y que sean de bajo costo.²⁷



Esquema 3. Procedimiento de extracción en fase sólida (SPE).

La microextracción en fase sólida (SPME) es una técnica miniaturizada de preparación de muestra que fue introducida en los años 90s.²⁸ Esta técnica se caracteriza por combinar muestreo y preconcentración en un solo paso, además, que está libre del uso de solventes o bien requiere de muy pequeñas cantidades. El sistema de SPME consiste en una fibra de sílice fundida recubierta con una película polimérica o un determinado sorbente que permita la extracción y la concentración del analito deseado (Esquema 4a). Se basa en el principio de partición de los analitos entre la matriz de la muestra y el recubrimiento de la fibra, donde la extracción se considera completa cuando la concentración del analito de interés ha alcanzado el equilibrio de distribución entre muestra-fibra. La desorción puede llevarse a cabo a través de una desorción térmica directamente en el inyector de un cromatógrafo de gases (GC). Por otro lado, una de las desventajas de SPME es la pequeña cantidad de película polimérica (alrededor de 0,5 μL de PDMS) que recubre la fibra lo que genera una extracción de compuestos limitada. En el año 1999 se introdujo una nueva técnica, SBSE (extracción por sorción en barra de

agitación), con el fin de superar algunas de las desventajas de SPME u otras técnicas.²⁹ El sistema de SBSE (Esquema 4b) está compuesto por una barra magnética recubierta por una película de PDMS (alrededor de 25–125 μ L de PDMS) que se introduce directamente en la muestra líquida donde los analitos son sorbidos en ella, al poseer una mayor cantidad de película de recubrimiento mejora la eficiencia de extracción comparado con SPME. Al igual que la microextracción en fase sólida la extracción por sorción en barra magnética se basa en un equilibrio de partición entre la muestra y el sorbente polimérico.^{29,30} Sin embargo, tiene una velocidad de agitación limitada ya que sobre los 600 rpm se puede deteriorar la fase debido al contacto directo con el material de vidrio del vial que contiene la muestra y, además, es de alto costo.³¹

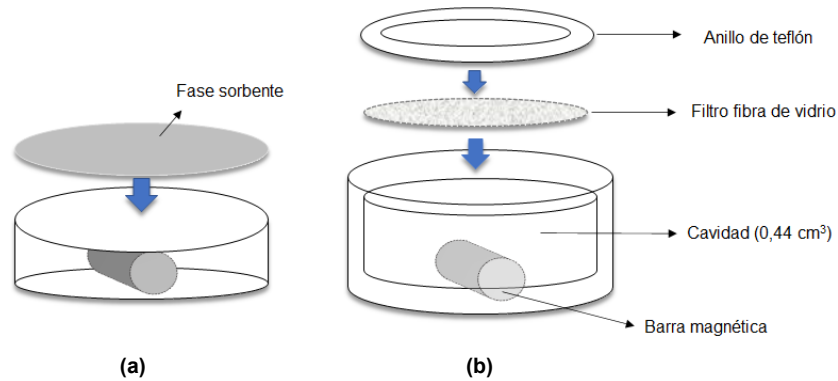


Esquema 4. (a) Sistema de SPME, (b) Sistema de SBSE.³⁰

Por otro lado, el año 2009 se desarrolló una técnica alternativa a la barra de agitación, denominada extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE), a causa de mejorar las limitaciones de SBSE.³² El sistema permite integrar tanto los procesos de extracción como de agitación y se compone de un disco de teflón con una mini barra magnética en su interior y a un lado de las caras se encuentra adherida la fase sorbente.

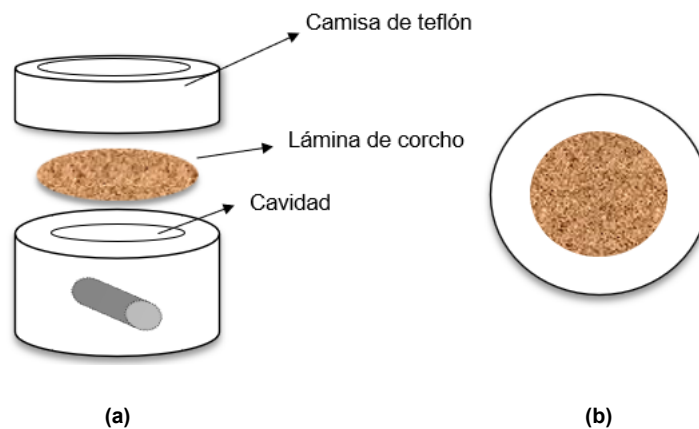
El disco posee dos configuraciones:

Disco plano para fases laminares (como C18) y disco con cavidad para fases particuladas o en polvo, como Oasis HLB (Esquema 5).



Esquema 5. Sistema RDSE: (a) Disco plano, (b) Disco con cavidad.

No obstante, este dispositivo se ha modificado a un disco con camisa (Esquema 6) que también posee una cavidad, pero más pequeña que el disco tradicional. Permite adherir una fase laminar, como una lámina de corcho, o una fase en polvo. Este finalmente, se sujeta con una camisa (de teflón) que tiene una cavidad en su interior (0,1 cm³).



Esquema 6. (a) Disco con camisa con fase laminar de corcho, (b) Vista desde arriba.

Las principales ventajas de la técnica RDSE en comparación a las otras técnicas nombradas, es que el sistema del disco rotatorio posee una gran área superficial, pues la muestra acuosa se encuentra en contacto directo con la fase de extracción. El disco puede girar a altas velocidades (hasta 3000 rpm) sin dañar la fase sorbente, lo que genera una alta transferencia de masa del

analito a la fase, disminuyendo el tiempo de extracción. En un dispositivo de bajo costo, fácil automatización, simple, rápido, lo que cumple con varios principios de la química verde y permite el uso de distintas fases sorbentes, lo que favorece la extracción de analitos de diferentes polaridades y matrices de origen. Por ejemplo, se ha implementado el uso de Oasis HLB para la determinación de AINEs desde muestras de aguas residuales, octadecilsilano (C18) y copolímero de divinilbenceno-N-divinilpirrolidona para la extracción de hormonas desde muestras de aguas, polidimetilsiloxano (PDMS) para la extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), polímeros de impresión molecular (MIP) para determinar ácido mefenámico y diclofenaco en matrices acuosas.^{32,33(a-d)} Se ha desarrollado también en otras matrices como plasma, leche de vaca y orina.^{34 (a-c)} En la Figura 3 se muestran algunas estructuras químicas de fases comerciales implementadas en RDSE.

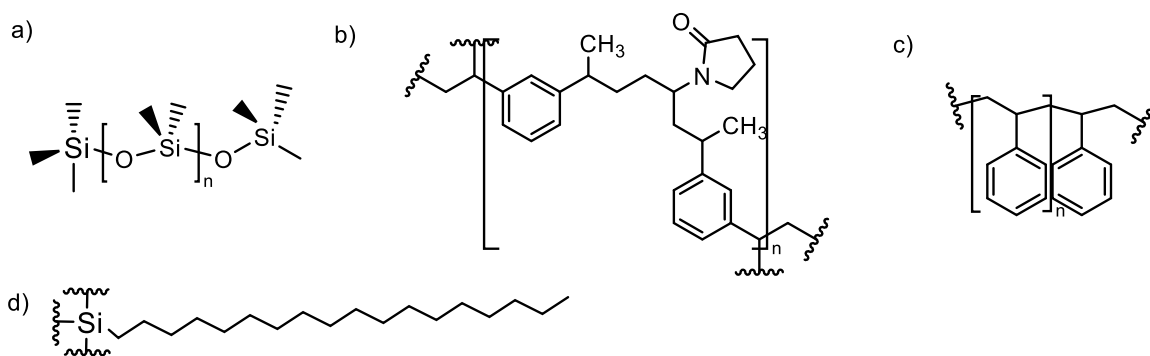


Figura 3. Estructuras químicas de algunas fases comerciales implementadas en la técnica RDSE. a) PDMS, b) Oasis HLB, c) St-DVB, d) C18.³⁵

1.2.2. Fases sorbentes naturales

Tal como se nombró anteriormente, existe una diversidad de fases comerciales sintéticas que se han implementado exitosamente en la determinación de diferentes compuestos analíticos. Sin embargo, en el último tiempo se ha considerado la opción de poner en práctica el uso de materias primas naturales como fases sorbentes. Las ventajas de los bio-sorbentes comparados con fases comerciales sintéticas son su disponibilidad a partir de fuentes

renovables, son inocuos y biodegradables. Además, muchos de estos biomateriales, a menudo, son obtenidos de desechos de alimentos e industrias manufactureras por lo que permiten reciclar y transformar residuos biológicos como sorbentes biodegradables, generando alternativas más simples y económicas.³⁶ El empleo de estos biomateriales acompañados con técnicas miniaturizadas, como por ejemplo RDSE (que permite la disminución de la fase de sorción y la reducción de solventes orgánicos), posibilitan desarrollar metodologías más ecológicas y amigables con el medio ambiente, cumpliendo así con algunos de los 12 postulados de la química analítica verde. La principal utilidad que se les ha dado a los bio-sorbentes son la remediación y purificación de iones metálicos y contaminantes orgánicos desde muestras de aguas residuales.^{36,37}

Varias de las fases comerciales están hechas a partir de polímeros sintéticos, sin embargo, actualmente los biopolímeros están siendo cada vez más atractivos para ser ocupados como fases sobre los polímeros sintéticos. Los biopolímeros, tal como lo dice su nombre, son polímeros hechos a partir de unidades monoméricas unidas covalentemente, tienen estructuras complejas y bien definidas. Según la unidad monomérica y estructura del biopolímero se pueden dividir en polinucleótidos, polipéptidos y polisacáridos, siendo estos últimos los más comúnmente usados como materiales de sorción. Por ejemplo, la celulosa, la quitina y la lignina se encuentran entre los polisacáridos frecuentemente utilizados en la síntesis de sorbentes y preparación de la muestra.^{36,38}

Corcho

El corcho es una materia prima natural que se obtiene de la corteza del alcornoque (*Quercus surber L.*) (Figura 4). Es un roble de hoja perenne de crecimiento lento y se cultiva en varios países como España, Portugal, el sur de Francia, Italia, Argelia, Marruecos, Túnez y China, donde Portugal tiene el 50% de la producción mundial y procesa alrededor de las tres cuartas partes de todo el corcho. La calidad y el grosor de la corteza varían según las condiciones específicas de crecimiento del árbol. Es un material renovable y biodegradable, pues la

recolección del corcho no daña el árbol y este vuelve a producir una nueva capa. Se caracteriza, por ser impermeable, buen aislante térmico y acústico, poco denso, elástico, rígido, estable, compresible, entre otras, y ha demostrado tener alta capacidad de adsorción lo que ha motivado a la comunidad científica a utilizarlo como fase de extracción.³⁹



Figura 4. Corteza de alcornoque, corcho (*Quercus suber* L.).

El corcho se compone principalmente por suberina (aprox. 40%), lignina (aprox. 24%) y polisacáridos (aprox. 20%) (celulosa y hemicelulosa), también contiene algunas ceras y otros compuestos (aprox. 15%).⁴⁰ La suberina es una macromolécula formada estructuralmente por ácidos grasos fenólicos de cadena larga y grupos hidroxilos que se encuentran unidos a través de grupos éster que forman la estructura de un gran poliéster. Por otro lado, la lignina se caracteriza por ser polímeros fenólicos que resultan de la unión de varios grupos ácidos y alcoholes fenilpropílicos (Figura 5).³⁹⁻⁴³ Debido a la gran variedad de grupos funcionales el corcho se caracteriza por ser un compuesto con un balance hidrofílico-hidrofóbico que le permite interactuar a través de diferentes interacciones mediante puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e interacciones del tipo π - π (π -stacking) con diferentes tipos de analitos.⁴⁴

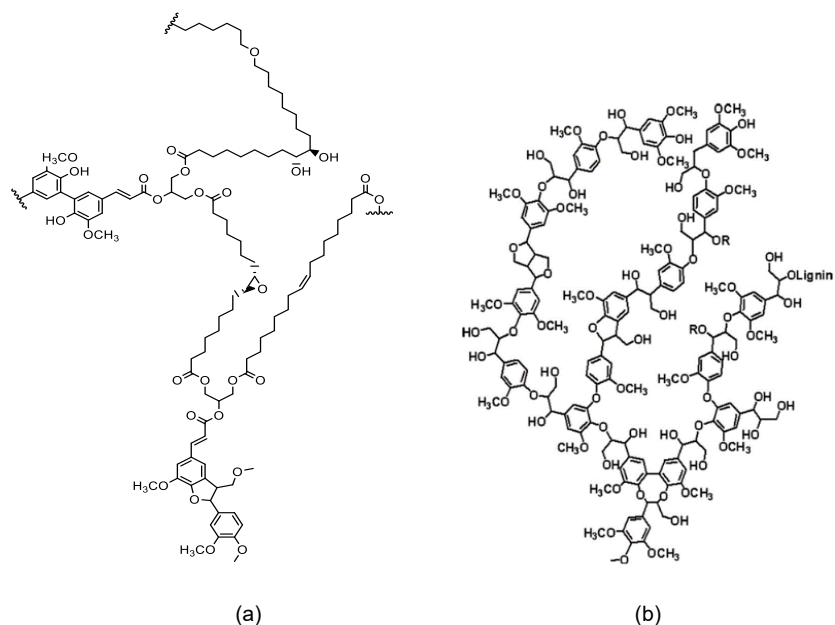


Figura 5. Estructuras químicas de suberina (a) y lignina (b).⁴³

Estudios previos han informado el uso de corcho como fase sorbente natural implementado en distintas técnicas de extracción. Días *et al.* en el año 2013 y 2015, informaron el uso del corcho en polvo implementado en SPME para la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) y pesticidas organoclorados en muestras de aguas. En la Figura 6 se observa una comparación de diferentes fibras que se utilizaron en SPME en la determinación de PAHs. El corcho demostró tener un buen potencial como recubrimiento al mostrar eficiencias de extracción similar o mejor que PDMS/DVB y DVB/CAR/PDMS, además, fue capaz de extraer todos los analitos de estudios en comparación a otros recubrimientos que no fueron capaces de extraerlos. De manera análoga, en el año 2015, el mismo grupo utilizó el corcho en polvo en la microextracción en barra de agitación (BA μ E) para la determinación de parabenos, benzofenonas y triclocarbán en muestras acuosas.^{45(a,b,c)}

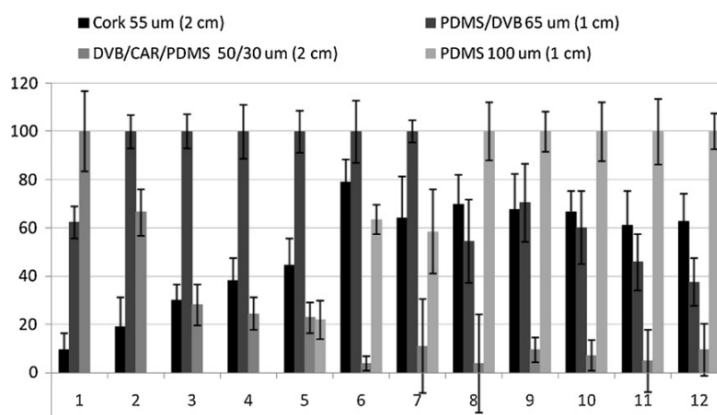


Figura 6. Comparación de respuestas obtenidas usando distintas fibras en DI-SPME (corcho, PDMS/DVB, DVB/CAR/PDMS y PDMS) para el análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en muestras de agua de río. Analitos: 1. Acenaftileno, 2. Fluoreno, 3. Fenantreno, 4. Antraceno, 5. Pireno, 6. benzo(a)antraceno, 7. Criseno, 8. benzo(b)fluoranteno, 9. Benzo(k)fluoranteno, 10. Benzo(a)pireno, 11. Dibenzo(a,h)a,2,3[c,d]pireno, 12. Benzo(g,h,i)perileno.^{45a}

El corcho también se ha implementado en la técnica RDSE. Manzo *et al.* (2019)⁴⁴ reportaron el uso del corcho laminar como fase sorbente en el disco rotatorio para determinar hormonas en muestras de aguas. En la Figura 7 se muestra una comparación de recuperaciones absolutas entre la lámina de corcho y fases sintéticas comerciales. Los resultados arrojaron que el corcho tiene recuperaciones similares a Oasis HLB y un tanto superior a las otras fases comerciales (C18, St-DVB y Nylon), lo que les permitió demostrar que es una buena alternativa para ser utilizado como fase en RDSE para extraer hormonas a partir de muestras de aguas.

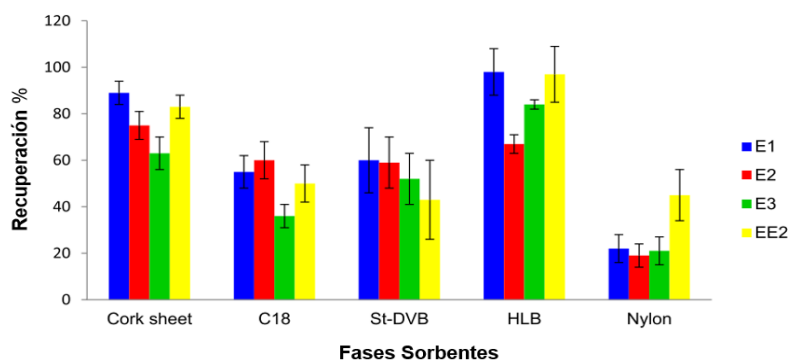


Figura 7. Recuperaciones absolutas de hormonas utilizando diferentes fases de extracción en RDSE. (Velocidad de rotación: 2000 rpm, volumen de muestra: 20 mL, tiempo de extracción 45 min).⁴⁴

Por otro lado, Vieira *et al.* (2018) usaron corcho laminar y arcilla montmorillonita como fases sorbentes para la determinación de parabenos en muestras de aguas usando la técnica RDSE. En el año 2020, los mismos autores reportaron nuevamente la aplicación del corcho como fase de sorción en el disco rotatorio para la determinación simultánea de multiclases de microcontaminantes orgánicos (pesticidas, BTEX y PAHs) en matrices acuosas.^{46(a,b)}

Sin embargo, esta sería la primera vez que se utiliza corcho en RDSE para determinar analitos en un rango de polaridad mayor como los son el IBU y sus metabolitos a partir de muestras de aguas.

Semilla de palta

La palta (*Persea americana*), conocida mundialmente como aguacate, es un fruto comestible que se caracteriza por tener un elevado contenido de lípidos. Es el fruto del palto, árbol de hoja perenne, cuya especie arbórea pertenece a la familia *Lauraceae*. La palta de origen mexicano, guatemalteco y antillano contiene más de 85 variedades que se encuentran distribuidas desde el sur de Estados Unidos (*Persea bobnia*) hasta Chile (*Persea lingue*), siendo hoy en día cultivada en todo el mundo con más de 150 especies.^{47,48}

Actualmente, la palta es uno de los frutos más consumidos a nivel mundial, lo que ha generado un gran aumento en su producción y se espera que siga continuando en los siguientes años. Por tanto, a lo largo del tiempo, el consumo de palta ha ido aumentando rápidamente por lo que se ha convertido en un fruto importante en la exportación. Según la ODEPA, para los últimos 50 años, a nivel global, la cosecha de palta y la producción, ha ido creciendo con una tasa media anual de 3,7%, pasando de 884.538 toneladas producidas en 93.189 hectáreas en el año 1966, a 5.567.043 toneladas producidas en 563.913 hectáreas el año 2016 (Figura 8).⁴⁹

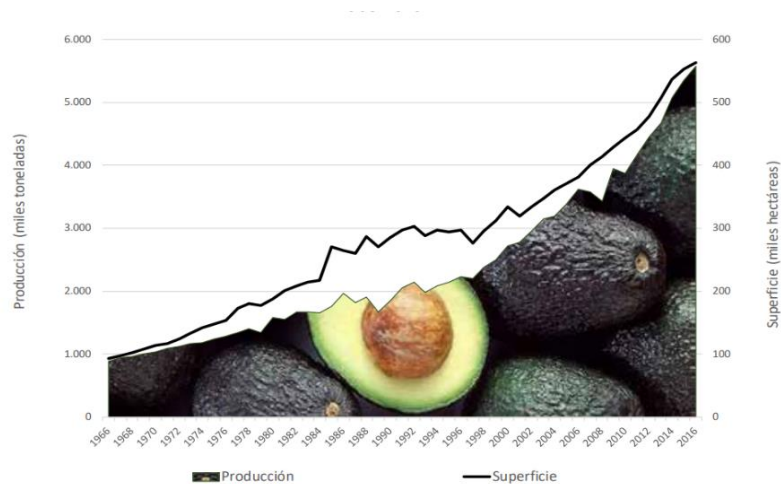


Figura 8. Evolución de la producción y superficie mundial de palta (1966-2016).⁴⁹

La palta se consume principalmente como un fruto seco, pero además, se producen productos derivados de ella que también son altamente preferidos por las personas, como aceite de palta, guacamoles o salsas, productos congelados, pastas e incluso productos de cosmética y de cuidado personal. Sin embargo, este gran consumo y alta producción diaria genera que se produzcan grandes cantidades de residuos agrícolas, particularmente cáscaras y semillas (cuesco).⁵⁰ Este último, la semilla de palta, abarca alrededor del 15-16% del peso total de la fruta y se generan aproximadamente 1,6 millones de toneladas anuales, entre los cuescos y las cáscaras, a nivel mundial como residuos sólidos municipales.⁵⁰⁻⁵¹ En cuanto a nuestro país, Chile, es uno de los mayores consumidores y productores de palta, siendo la palta hass una de la preferida por la población. Según el comité de paltas de Chile, en la temporada 2019-2020, *“Chile produjo alrededor de 168.000 toneladas de palta hass y se estima una producción de 220.000 toneladas para la temporada 2021-2022. Se detalla que alrededor de un 28% fue consumida en el territorio chileno y el 72% fue exportada a diferentes países.”* Es decir, si la masa de la semilla equivale aproximadamente al 16% del peso total de la fruta y un 28% de 220.000 toneladas de palta se está consumiendo en Chile, alrededor de 10.000 toneladas de semilla de palta se están generando por cada temporada. Sin embargo, la semilla de palta se puede considerar como un residuo agrícola, ya que no presenta ningún valor comercial y es

continuamente desechada como basura. Por otro lado, este residuo contiene una gran cantidad de polifenoles, los cuales, debido a sus propiedades bioactivas, han llamado la atención de las industrias alimentarias y cosméticas por su alta capacidad antioxidante.⁵²

La semilla de palta está compuesta por distintas familias de polifenoles, tales como ácidos fenólicos, flavonoles y taninos, entre ellas, ácido cafeico, catequinas y procianidina. Son ricas en potasio y fibra. También, se componen de ácidos grasos, almidón, hemicelulosa, celulosa y lignina (Figura 9). Sin embargo, su composición química no es constante, sino que varía entre cultivos, ya que se verá afectada por los distintos factores que puedan afectar el crecimiento de la planta.⁵⁰⁻⁵³ Tales características estructurales le permiten a la semilla de palta adsorber moléculas mediante distintas fuerzas intermoleculares, llamando la atención de investigadores que la han empleado en distintas aplicaciones. Se ha utilizado para la eliminación de contaminantes fenólicos, halogenados (fluoruro), colorantes y metales pesados en aguas residuales.⁵⁵⁻⁵⁷

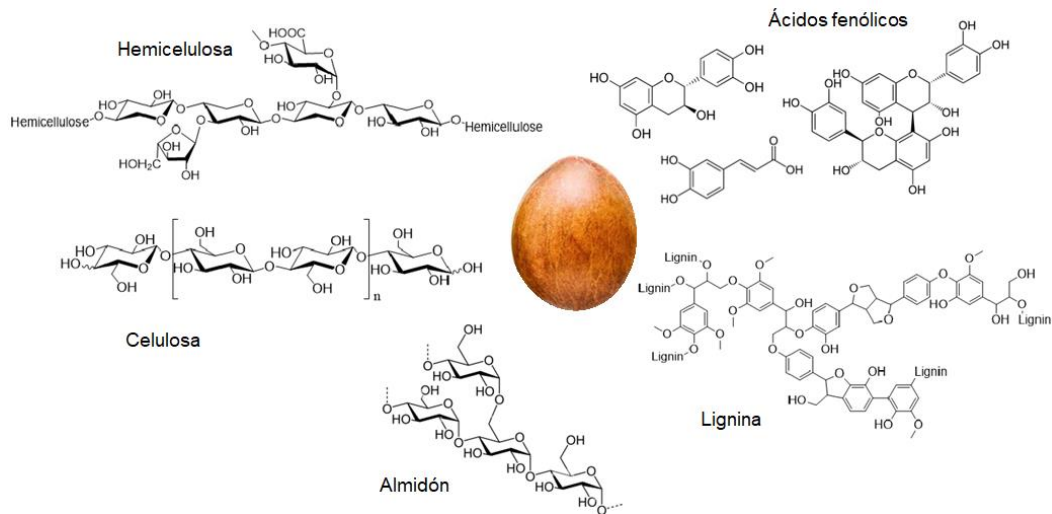


Figura 9. Estructuras químicas de componentes de la semilla de palta.

Por ejemplo, Elizalde-González *et al.* (2007)⁵⁵ aplicaron el uso de la semilla de palta tanto en su forma natural, carbonizada y activada para la eliminación de distintos tintes en soluciones acuosas, cuyos resultados mostraron que la semilla de palta sin carbonizar presentaba una

mayor capacidad de adsorción en comparación a las carbonizadas debido a la mayor cantidad de grupos ácidos en su superficie. Bhaumik *et al.* (2014)⁵⁶ utilizaron carbón de semilla de palta, activado con ácido sulfúrico, para la eliminación de cromo (VI) en aguas residuales en experimentos por lotes. Los estudios mostraron la presencia de grupos oxo-funcionales e indicaron que la adsorción del Cr(VI) dependía en gran medida del pH, cuyo valor óptimo era 2. Leite *et al.* (2018)⁵⁷ desarrollaron el uso de la semilla de palta como carbón activado para la remoción y optimización de varios contaminantes orgánicos emergentes, entre ellos, 15 compuestos fenólicos y 10 productos farmacéuticos en soluciones acuosas. Demostraron que los carbones activados a partir de la semilla de palta exhibían una capacidad de adsorción muy alta para los compuestos. Además, informaron que la adsorción de contaminantes orgánicos emergentes en los carbones activados de semilla de palta podría estar determinada por las interacciones de apilamiento π - π presentes en los anillos fenoles y puentes de hidrógeno debido a la presencia de grupos polares como -OH, -COO, -O y -NH.

De acuerdo a lo que hemos podido investigar en la literatura, la semilla de palta ha sido utilizada solo con fines remediales, no existiendo a la fecha aplicaciones analíticas de este sustrato como fase en microextracción.

1.2.3. Carbones activados

El carbón activado (CA) es un material sólido negro carbonáceo que posee una estructura cristalina similar a la del grafito, pero menos perfecta (Figura 10). Tal como lo indica su nombre, es materia carbonizada de origen vegetal o mineral y se caracteriza por ser altamente poroso, por tener una gran área superficial interna y una alta capacidad de adsorción. El área superficial del CA varía dependiendo de la materia prima y del proceso de activación, que se puede realizar utilizando distintos métodos (físicos o químicos). Los CAs pueden llegar a alcanzar áreas superficiales del orden de 500 a 1500 m²/g, estas grandes áreas les permiten convertirse en excelentes adsorbentes.⁵⁸ Debido a sus propiedades de adsorción, los CAs son ampliamente utilizados en la purificación de aguas y gases, a través de la eliminación de

contaminantes orgánicos, en el almacenamiento de energía y en catálisis.⁵⁹ Por otra parte, dependiendo del tamaño de poro que posea, va a determinar el atrapamiento físico de las moléculas. Existe variedad en el tamaño de poros y se pueden clasificar (según la IUPAC) mediante su diámetro, entre estos, se encuentran los microporos (menores a 2 nm), mesoporos (entre 2 y 50 nm) y macroporos (mayores de 50 nm).⁶⁰

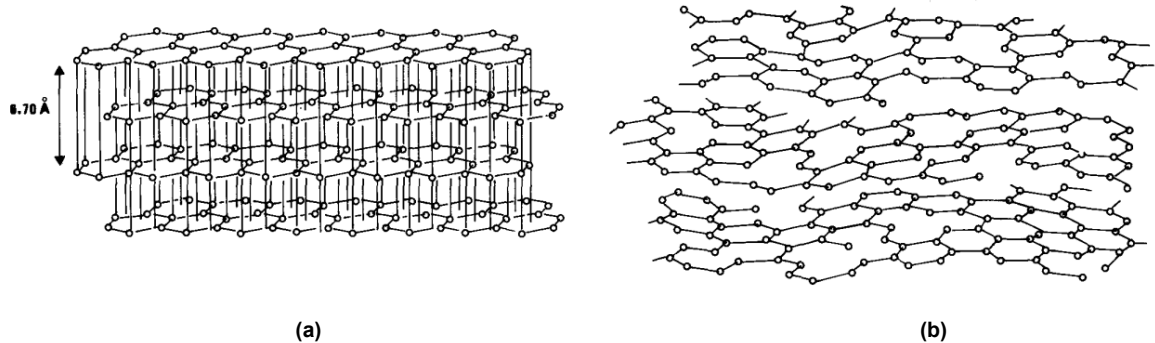


Figura 10. Estructura química del grafito (a) y del carbón activado (b).⁵⁸

La síntesis del CA considera dos pasos esenciales tales como, carbonización y activación. La carbonización consiste principalmente en reducir el contenido volátil, del material precursor, a través de un proceso de pirólisis, en ausencia de oxígeno y en el rango de temperatura entre 300 a 900 °C, y crear un material con alto contenido de carbono fijo. Por otra parte, la activación se encarga de que la materia carbonizada aumente su superficie específica y presente un elevado y variado grado de volumen de poros. Esto permite que el material carbonizado se transforme en un material altamente adsorbente, ya que generalmente la capacidad de adsorción del CA se encuentra influenciada por la naturaleza porosa que se encuentra definida por su área superficial. Por tanto, la activación puede variar o ajustar la naturaleza química de la superficie del material carbonizado y darles características únicas.⁵⁸⁻⁶⁰

Existen tres tipos de activaciones, entre ellas se encuentran la activación física, la activación química y la activación fisicoquímica.⁵⁸⁻⁶⁰

- **Activación física:** Ocurre en dos etapas y se le conoce, además, como activación térmica. La primera etapa consiste en la carbonización que elimina elementos volátiles tales como hidrógeno y oxígeno en presencia de un gas inerte como N₂ o Ar. La segunda etapa consiste en la activación que se lleva a cabo con la ayuda de un gas oxidante, como CO₂, O₂ o H₂O_{gas}, a temperaturas elevadas (800-1200 °C).

Las ventajas de la activación física es que genera un procedimiento limpio y ecológico debido a que no produce desechos secundarios como otros tipos de activaciones. Sin embargo, la etapa limitante de este procedimiento es la temperatura, ya que requiere de temperaturas elevadas. Por debajo de los 900 °C la reacción es lenta y no es factible. También la activación requiere de largos tiempos, además, los rendimientos son bajos y genera CA con superficies específicas pobres.

- **Activación química:** Denominada también como oxidación húmeda. Esta activación en comparación a la activación física se efectúa en una sola etapa, dado que la carbonización y la activación se llevan a cabo de manera simultánea. Se realiza en el rango de temperatura de los 450 °C a 850°C. La activación química requiere que el material precursor se impregne con un agente químico o activante y de una etapa posterior de lavado.

La ventaja de la activación química es que se lleva a cabo en tiempos cortos, no requiere de temperaturas elevadas, produce una alta área de superficie específica y mejores rendimientos, no obstante, presenta corrosividad por sus agentes activantes y una etapa de lavado obligatoria. Si bien, este método tiene como desventaja ser más contaminante que el método físico, todo dependerá del agente activante que se utilice.

- **Activación Físicoquímica:** Esta activación es una combinación de la activación física y química, ya que implica la impregnación química del material precursor con un agente activante, cuya activación se realiza bajo la presencia de un gas oxidante.

La activación fisicoquímica genera áreas de superficies controlables, pero es complejo de ejecutar y requiere de un excesivo consumo de energía.

En particular, se detallará la activación química porque fue la empleada en este trabajo de investigación. Existe una variedad de agentes químicos que se utilizan como activantes, entre estos, los agentes ácidos, básicos (fuertes y débiles) y las sales neutras. Entre los agentes más comunes se encuentran H_3PO_4 , H_2SO_4 , HNO_3 , NaOH , KOH , ZnCl_2 , H_2O_2 , K_2CO_3 y CaCl_2 . Los diferentes tipos de activantes llevarán a distintos mecanismos de activación, dependiendo del material precursor que se utilice y de la aplicación posterior del CA. Los materiales activantes actúan como agentes deshidratantes y oxidantes, es decir, ayudan a desarrollar la porosidad mediante la deshidratación y degradación de la estructura de la biomasa, además, inhiben la formación de alquitrán y otros productos no deseados durante el proceso. Por tanto, la etapa posterior de lavado es de suma relevancia dado que permite eliminar todo el activante sobrante y proporciona el desarrollo de poros del CA. De acuerdo con ello, se debe controlar bien la relación entre el agente químico y la masa del material precursor, ya que el tamaño de poros y el área superficial se encuentran influenciados por este factor. Otros factores que se deben considerar en la síntesis de un CA es la temperatura de carbonización, la velocidad de calentamiento, la presencia de una atmósfera inerte, el tiempo de residencia y el tipo de material de partida, debido a que jugarán un rol importante al influir en la calidad, en las características y en las propiedades de CA resultante.⁵⁹⁻⁶⁰

Tal como se nombró anteriormente las propiedades texturales y superficiales del CA dependen principalmente del material precursor y del método de preparación. Por ello, para que un material sea materia prima debe ser un compuesto con un alto contenido de carbono elemental y un bajo contenido de compuestos inorgánicos. La brea, por ejemplo, es frecuentemente utilizado como precursor de carbones activados, pero no es renovable y es nocivo para el medio ambiente. Por el contrario, los materiales lignocelulósicos y residuos agrícolas, por ejemplo, la madera y las cáscaras de semillas de frutos contienen un alto contenido de compuestos volátiles y son componentes ricos en carbono, siendo altamente interesantes para usarlos como material de partida en la síntesis de carbones activados. Además, los residuos agrícolas se

caracterizan por ser materiales naturales renovables, abundantes, biocompatibles, económicos y respetuosos con el medioambiente.^{61,62}

No obstante, el carbón activado sintetizado a partir de un residuo agrícola, aplicado como fase sorbente, tiene fines prometedores, ya que comparado con una fase natural (bio-sorbente a partir del residuo agrícola sin carbonizar), el carbón posee mejores características adsorbentes como mayor aromaticidad, mayor porosidad y variedad de grupos funcionales que permiten aumentar aún más la eficiencia de extracción de los analitos objetivos.

1.2.4. Determinación y cuantificación de analitos

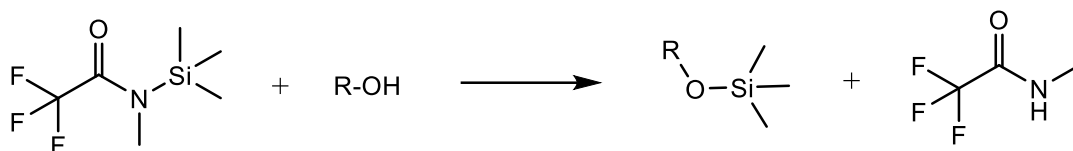
Como se nombró en un principio, los contaminantes emergentes se encuentran presentes en pequeñas concentraciones y en matrices complejas. Por tanto, para poder determinarlos es necesario el uso de instrumentos analíticos altamente sensibles y selectivos.

La cromatografía de gases (GC) es una técnica analítica que permite separar los componentes químicos de una mezcla. La separación de dichos componentes dependerá de la distribución de las sustancias entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre una superficie de un sólido inerte. Esta técnica se encuentra dedicada particularmente a la separación, identificación y cuantificación de analitos volátiles y semivolátiles. La información que nos entrega el equipo (con un detector convencional) a través del cromatograma, es el tiempo de retención de cada señal cromatográfica que permite identificar el analito separado, sin embargo, ese es el único dato que nos entrega el instrumento analítico. Este dato no es suficiente para identificar de manera certera un compuesto de estudio, pues existe la posibilidad que dos analitos coeluyan, sobre todo si se trabaja con una mezcla de muchos componentes. Por otra parte, la espectrometría de masas (MS) es otra herramienta que permite identificar con gran precisión la composición de una molécula en función de su relación masa-carga. No obstante, la espectrometría de masas solo permite la identificación de sustancias puras, ya que el espectro de una mezcla de compuestos resulta en la superposición de los espectros

individuales de cada componente, por tanto, requiere de una separación previa. La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GS-MS) da lugar a una técnica combinada que permite separar una mezcla compleja mediante el GC y luego identificarla y cuantificarla a través de MS.⁶³

Tal como se nombró es muy usual trabajar con muestras que tengan muchos componentes, cabe la posibilidad de una coelución o que sus señales se encuentren muy próximas, dificultando su identificación. En este contexto, el espectrómetro de masas no solo entrega espectros, sino que acoplado a un cromatógrafo de gases, actúa como un detector donde nos entrega el cromatograma TIC (*total ion current*) y nos da la posibilidad de trabajar en dos modalidades. Una modalidad es SCAN que nos permite trabajar con todos los iones presentes y la otra modalidad, que es la que se usó en este trabajo, es SIM (*selected ion monitoring*) que permite que el detector de masas se convierta en un detector cromatográfico selectivo debido a que facilita localizar la presencia de uno o varios compuestos específicos y también permite disminuir el efecto del ruido químico.⁶⁴

Uno de los límites de GC-MS es la estabilidad térmica, la volatilidad y polaridad de las moléculas. Para disminuir la polaridad, aumentar la volatilidad y la termoestabilidad de los compuestos se procede a someter a los analitos a una reacción de derivatización previo a la inyección cromatográfica. La derivatización proporciona un medio para analizar los analitos que de otra forma sería difícil de volatilizar. La reacción más usual es la derivatización por sililación que permite derivatizar compuestos altamente polares para analizarlos por GC. Esta se realiza comúnmente en presencia de un catalizador, como la piridina, o de un solvente polar aprótico, como acetato de etilo, para mejorar la susceptibilidad del hidrógeno “activo” (grupo polar) que será sustituido por el grupo apolar. El Esquema 7 muestra la reacción típica de derivatización en donde el agente sililante, N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA), sustituye un hidrógeno “activo” del analito (molécula polar) por un grupo trimetilsilano (TMS) no polar.⁶⁵⁻⁶⁶



Esquema 7. Reacción de derivatización por siliación con MSTFA.

Estudios previos han informado la determinación de ibuprofeno y sus metabolitos en muestras de aguas donde se han usado distintas técnicas de extracción e instrumentos analíticos (Tabla 2).

Tabla 2. Comparación de diferentes métodos analíticos de determinación de ibuprofeno y sus metabolitos desde muestras de aguas.

Analitos	Matriz	LD (ng/L)	Re%	Fase sorbete	Técnica de extracción	Instrumento analítico	Ref .
Diclofenaco, ibuprofeno , naproxeno, ketoprofeno	Aguas residuales (Afluentes -efluentes)	1-33	71-104	Oasis HLB	RDSE	GC-MS	33a
Ketoprofeno, ibuprofeno , naproxeno, diclofenaco, ácido acetilsalicílico, ácido mefenámico	Aguas residuales	60-223	100-102	MIP	RDSE	GC-MS	33d
Ácido clofibrico, diclofenaco, gemfibrozilo, ibuprofeno , naproxeno, ketoprofeno	Aguas residuales (Afluentes -efluentes)	1-91	74-110	Oasis HLB	RDSE	UHPLC-TOF/MS	67
Metilparabeno, etilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, estrona, 17-β-estradiol, estriol, 17-α-etinilestradiol, bisfenol A, triclosán, ibuprofeno , ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco, ácido mefenámico, ácido acetilsalicílico	Aguas residuales (Afluentes -efluentes)	2-150	11-97	Oasis HLB	RDSE	GC-MS	68
Ibuprofeno , 1-hidroxiibuprofeno , Carboxiibuprofeno ,	Aguas residuales y aguas	2,1-23 0,7-16	41-193	Oasis HLB	SPE	UPLC-MS/MS	19

2-hidroxiibuprofeno	de río						
Enalaprilato, enalapril, furosemida, carbamazepina, ibuprofeno, carboxiibuprofeno, 1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno	Aguas residuales	592- 686	97-109	Oasis HLB	SPE	HPLC-ESI- MS/MS	20
ácido clofíbrico ibuprofeno	Aguas ambienta- les y Orina	240- 780	79-99	CA de corcho	BAμE	HPLC-DAD	69

1.2.5. Caracterización de las fases sorbentes

Para llevar a cabo un eficaz tratamiento de muestra es importante conocer estructuralmente la fase con la que se trabaja. Las fases sorbentes se diferencian una de otra por su origen, composición química, su forma, cantidad de poros presentes y/o área superficial, etc. Estas propiedades le van a conferir sus características adsorbentes y su afinidad por los analitos. Por tanto, estudiar estos parámetros son muy valiosos para determinar la afinidad de un determinado adsorbente por un adsorbato.

La espectroscopía infrarroja (IR) es una herramienta que permite determinar los grupos funcionales presentes en las moléculas que componen las fases. Se basa en que los compuestos absorben luz infrarroja convirtiéndola en vibración molecular, cada absorción será característica de los enlaces químicos presentes en las moléculas.⁷⁰ Determinar los grupos funcionales del material es lo primordial ya que servirá como guía para saber el tipo de interacción que se dará entre analito-sorbente. Para estudiar la morfología y tamaño de partícula del material se puede hacer un análisis mediante la microscopía electrónica de barrido (SEM) a diferentes aumentos. El análisis SEM se fundamenta en la emisión de un haz de electrones (e-) que se hace incidir sobre una muestra de estudio. Este haz de e- interaccionará con la muestra generando diferentes tipos de señales que serán recibidas por detectores, donde luego, la información será traducida en una imagen de alta definición.⁷¹ Por otro lado,

cada material posee una distribución de carga neta sobre su superficie que influirá en la retención de un determinado tipo de contaminante. Por ello, es importante evaluar el punto de carga cero (PZC) y el punto isoeléctrico (IEP). El PZC se define como aquel valor de pH en el cuál la carga neta total, tanto externa como interna, de las partículas sobre la superficie del material adsorbente es neutra. Por otra parte, el IEP hace referencia a las cargas superficiales externas del material. Ambos parámetros permitirán determinar el pH de la fase.⁷²

Debido a que en este trabajo se plantea la carbonización de las fases naturales, es relevante conocer las temperaturas de descomposición de los compuestos que conforman los materiales y caracterizar a su vez su composición. Una herramienta que permite medir estas temperaturas es el análisis termogravimétrico (TGA) que consiste en la medición de la pérdida de masa, de una muestra determinada, a medida que va cambiando la temperatura con el tiempo o bien, a una temperatura fija durante un tiempo establecido.⁷³

1.2.6. Propuesta de Investigación

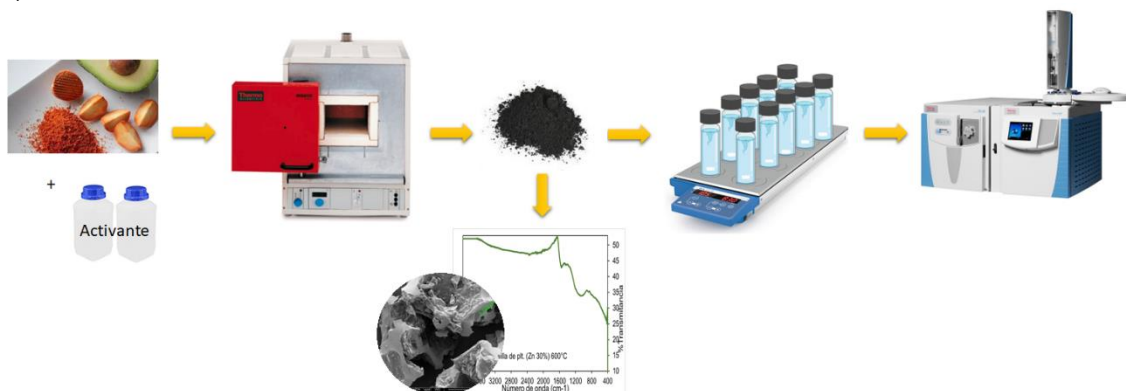
En este trabajo de investigación se propone desarrollar un método para la determinación y cuantificación de cuatro analitos (ibuprofeno, 1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno y carboxiibuprofeno) en muestras de aguas, aplicando la técnica de extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) con fases sorbentes naturales y en su forma de carbón activo. Las fases escogidas para este estudio son el corcho y la semilla de palta. En primera instancia se desea evaluar las fases naturales optimizando las condiciones de extracción y su posterior validación. En segundo lugar, se propone estudiar las fases naturales como carbón activado, optimizando las condiciones de síntesis, el proceso de extracción y la respectiva validación del método. Ambas metodologías serán utilizadas para determinar los analitos de interés. Además, se realizará un estudio comparativo con fases sintéticas comerciales. Se plantea la cuantificación de los compuestos mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas, en modalidad SIM. La caracterización de las fases se llevará a cabo mediante distintos análisis, entre ellos, a través de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR),

microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis termogravimétrico (TGA). El Esquema 8 resume la propuesta de investigación.

a)



b)



Esquema 8. Proceso de extracción en sistema RDSE para la determinación de los analitos. a) Usando fases naturales (corcho laminar) en la sorción, b) Utilizando CA (de semilla de palta) como fase en la extracción. (Metodología)

2. HIPÓTESIS

- La microextracción por sistema de disco rotatorio con el uso de corcho – o alternativamente semilla de palta - como fase sorbente permitiría extraer el ibuprofeno y/o sus metabolitos (1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno y carboxiibuprofeno) presentes en muestras acuosas, reteniéndolos con una eficiencia estadísticamente similar a fases comerciales.
- El uso de carbones activados como fases sorbentes, de semilla de palta o corcho, permitirían extraer de forma más eficiente los analitos ibuprofeno, 1-hidroxiibuprofeno, 2-hidroxiibuprofeno y carboxiibuprofeno comparado con el material original, mediante la técnica RDSE.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- Desarrollar un método analítico preciso, exacto y sensible, que permita determinar ibuprofeno y/o sus metabolitos en muestras acuosas usando la técnica de microextracción RDSE con fase sorbente natural y carbón activado.

3.2. Objetivos específicos

- Optimizar la separación del ibuprofeno y sus respectivos metabolitos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).
- Optimizar la extracción de los analitos utilizando RDSE con las fases sorbentes corcho laminar y semilla de palta.
- Optimizar la extracción de los analitos utilizando RDSE con las fases sorbentes carbonizadas-activadas.
- Caracterizar las distintas fases sorbentes.
- Validar la metodología a través de la determinación de las propiedades analíticas.
- Comparar la eficiencia de extracción del corcho y semilla de palta como fase extractiva con otras fases comerciales.
- Aplicar el método en la determinación de los analitos en muestras reales.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales

- Disco de teflón con camisa y cavidad, 1,5 cm de diámetro, con barra magnética
- Lámina de corcho aglomerado con granos de 2 mm de espesor de 1m x 1m (Corchos Chile, San Miguel, Santiago)
- Semillas de palta Hass (Feria libre, Puente Alto, Chile)
- Sacabocado de golpe 12 y 14 mm de diámetro, Boehm
- Material de vidrio (Vasos de precipitados, pipetas volumétricas, matraces de aforo, probetas y botellas Duran)
- Pipetas Pasteur (Hirschmann ®)
- Micropipetas 20 – 1000 μ L
- Papel fibra de vidrio Rilab 110mm
- Viales de vidrio 12, 20 y 30 mL
- Crisoles más tapas de porcelana
- Matraz Kitasato y embudo Büchner
- Papel filtro
- Molinillo de café
- Mortero de ágata

4.2. Reactivos

Todos los reactivos y solventes de grado analítico que se utilizaron fueron adquiridos mediante proveedores comerciales autorizados: Sigma-Aldrich, Merck, entre otras.

- Ácido clorhídrico 37%
- Acetato de etilo grado cromatográfico
- Acetonitrilo grado cromatográfico

- Agua desionizada obtenida de un equipo Millipak ® Express 20 Filter (Merck)
- Carbonato de potasio
- Cloruro de sodio 99,5%
- Cloruro de zinc
- Hidróxido de sodio
- Helio extra puro $\geq 99,9999\%$
- Metanol grado cromatográfico
- N-metil-N-trimetilsilil-trifluoro-acetamida (MSTFA, Merck)
- Nitrógeno extra puro $\geq 99,995\%$ (Linde)

Estándares:

- Estándar ibuprofeno (Sigma, Aldrich)
- Estándar 1-hidroxi-ibuprofeno, (Sigma-Aldrich)
- Estándar 2-hidroxi-ibuprofeno, (Sigma-Aldrich)
- Estándar carboxiibuprofeno (Sigma-Aldrich)
- Estándar subrogante, ibuprofeno-D₃ (Cerilliant Corporation)

Fases comerciales:

- Oasis® HLB, Waters Corporation
- Estireno-divinilbenceno (St-DVB), Waters Corporation
- Octadecilsilano (C18), Waters Corporation

4.3. Instrumentos y equipos de laboratorio

- Cromatógrafo de gases acoplado a un detector espectrómetro de masas con analizador de cuadrupolo (Thermo Fisher Scientific ISQ)
- Columna capilar marca Restek Rtx-5MS (5% difenil/ 95% dimetil polisiloxano), 30 m, 0,25 mmID, 0,25 μm df

- Espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Nicolet iS5, Thermo Scientific. Acoplado a un accesorio de muestreo inteligente de reflectancia total atenuada (ATR) iTX-iD7 con cristal de diamante
- Microscopio electrónico de barrido de alta resolución (HR-SEM), modelo INSPECT-F50, FEI
- Vortex mixer KMC-1300V
- Evaporador Biotage VWR
- Agitador magnético, Jeio Tech
- pH-metro WTW modelo Pmx 3000
- Balanza analítica precisa 125A, Swiss quality
- Horno Mufla M-110/1100°C Thermo Heraeus
- Incubadora New Brunswick Scientific Co Classic Series C24 Benchtop Incubator Shaker Model M1247-0004
- Mini microcentrífuga modelo M-6 Boe 8074100 MundoLab

4.4. Metodología

4.4.1. Preparación de estándares y optimización cromatográfica

1. Se prepararon estándares concentrados para cada uno de los analitos y a partir de estas soluciones, se prepararon por dilución estándares de trabajo a una concentración de 2 y 10 mg/L. Se preparó un estándar subrogante (ibuprofeno-D₃) en una concentración de 2 mg/L y un estándar interno (PCB-77) a una concentración de 1 mg/L.
2. Para la derivatización de los analitos, en un vial de 2 mL se añadió 100 µL de un multiestándar de 1 mg/L y se evaporó a sequedad bajo una corriente de N₂. Luego, se añadió 50 µL de MSTFA (agente derivatizante), 50 µL de AcOEt y se agitó en el vortex,

a temperatura ambiente, durante 5 min para homogeneizar la solución. Para encontrar la óptima derivatización, se estudió la presencia de catalizador (volumen de piridina), el tiempo y la temperatura en la reacción de sililación, además, se realizaron estudios quimiométricos del tipo screening evaluando estos tres factores.

3. A partir de los respectivos estándares derivatizados, se realizó el estudio del método cromatográfico para la determinación y cuantificación de ibuprofeno y sus metabolitos por GC-MS. Para ello, se inyectaron 2 μL de cada estándar en modalidad full SCAN para verificar los tiempos de retención y las masas de cada compuesto. Luego, se seleccionó la modalidad monitoreo selectivo de iones (SIM), donde se eligieron los iones más adecuados para cada molécula. La Tabla 3 indica las condiciones del GC-MS.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas y del espectrómetro de masas.

Cromatógrafo de gases	
Volumen de inyección:	2 μL
Modo de inyección:	Splitless
Temperatura del inyector:	280°C
Gas Carrier:	Helio (He)
Rampas de calentamiento:	R ₀ = 75 °C (1min) R ₁ = 75 a 300 °C x 15 °C/min (5min)
Flujo:	1 mL/min
Tiempo de análisis:	21 min
Solvent delay:	7 min
Espectrómetro de masas	
Tipo de fuente:	Impacto electrónico (EI)
Analizador:	Cuadrupolo simple (ISQ)
Temperatura línea de transferencia:	300°C
Temperatura de la fuente:	250°C

4.4.2. Fases naturales

a) Preparación fases sorbentes

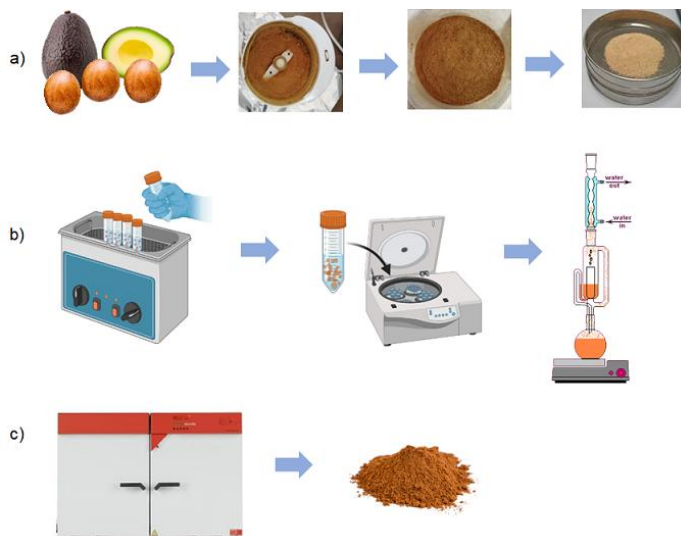
Corcho laminar

La preparación del corcho laminar estuvo basada en el tratamiento informado anteriormente por Manzo *et al.* (2019).⁴⁴ Se cortaron trozos circulares de la lámina de corcho con un sacabocado de golpe de 12 mm de diámetro. Los trozos de corcho se sometieron a limpieza por ultrasonido, inicialmente con agua desionizada durante 60 min y luego 2 sesiones con metanol por 30 min. Se almacenaron en una incubadora a 37 °C para su posterior secado. Una vez limpios y secos, el corcho se fijó en el disco con camisa (Figura 11).



Figura 11. a) Disco rotatorio con camisa usando corcho laminar como fase sorbente, b) Camisa del disco, c) Disco con agitador magnético, d) Lámina de corcho.

Semilla de palta en polvo



Esquema 9. Preparación de la fase semilla de palta en polvo. a) Proceso de molienda y tamizado, b) Limpieza del material, c) Secado de la fase.

En el Esquema 9 se resume la preparación de la fase semilla de palta en polvo. Previo a moler la semilla, se lavó con agua desionizada para sacar los restos de palta que podían quedar en el material. Inmediatamente, se secó en la estufa a 45°C y se cortaron en trozos. Los trozos se añadieron a un vaso de precipitado con agua desionizada para ablandarlos y se molieron con un molinillo de café. La semilla molida se tamizó y se almacenó como un polvillo muy fino (200-400 mesh). Al igual que el corcho, la semilla de palta particulada se sometió a diversos lavados. En una primera etapa se limpió con agua desionizada por ultrasonido durante 60 min (en consecuencia, se centrifugó para separar ambas fases durante 15 min a 4500 rpm) y luego, en una segunda etapa se lavó con metanol y n-hexano mediante Soxhlet para sacar las grasas y/o aceites presentes en el material. Se secó a 45°C en una estufa y se utilizó como fase sorbente en el disco con cavidad (Figura 12).

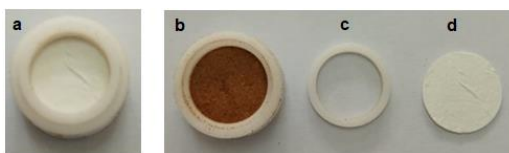
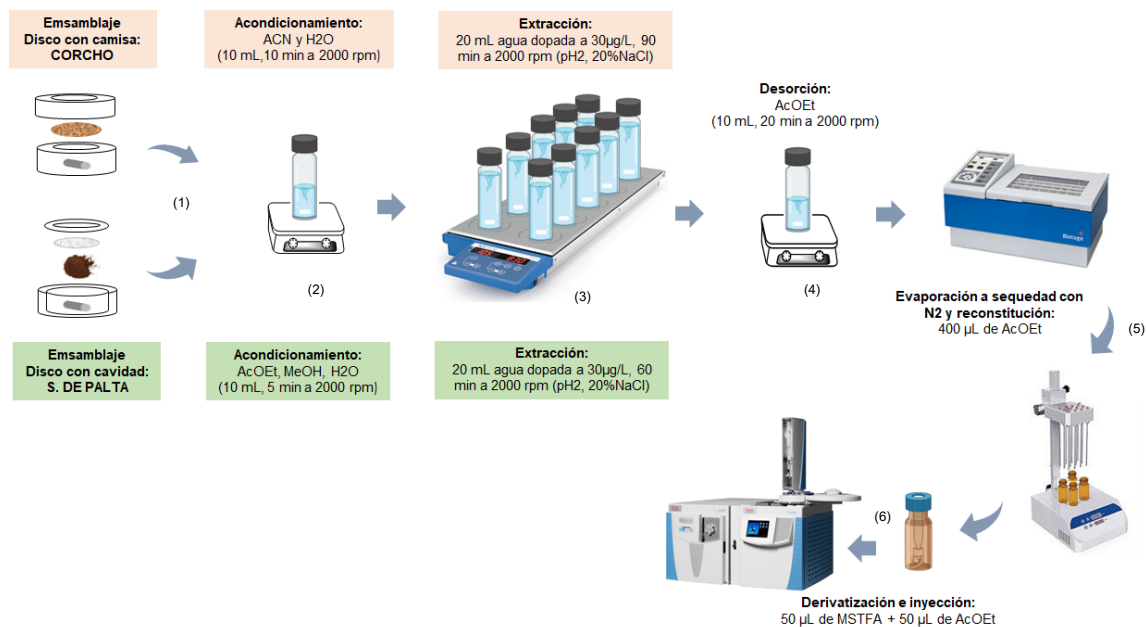


Figura 12. Disco con cavidad utilizando fase sorbente semilla de palta. a) Disco con cavidad armado, b) Disco relleno con semilla de palta, c) anillo de teflón, d) filtro de fibra de vidrio (12 mm).

Es importante señalar que todos los solventes orgánicos utilizados en los procedimientos de limpieza fueron recuperados mediante destilación a presión reducida.

b) Procedimiento RDSE de fases naturales



Esquema 10. Preparación del disco rotatorio con corcho laminar (en rosa) y semilla de palta en polvo (en verde). 1) Ensamblaje del disco, 2) Acondicionamiento del disco, 3) Extracción de los analitos en la muestra de agua, 4) Desorción de los analitos, 5) Evaporación y reconstitución, 6) Extracto derivatizado e inyección en cromatógrafo.

Acondicionamiento:

Corcho: El acondicionamiento del corcho laminar fue basado en lo informado anteriormente por Vieira *et al.* (2020).^{46b} Se añadió una lámina de corcho de 47 mg en el disco de extracción y se sujetó con una camisa de teflón. Luego, en un vial de vidrio se acondicionó el disco con 10 mL de MeCN y 10 mL de agua desionizada durante 10 min a 2000 rpm.

Semilla de palta: Se añadió 60 mg de fase a la cavidad del disco rotatorio, inmediatamente, se cubrió con un filtro de fibra de vidrio y se selló con un anillo de teflón. En un vial de vidrio se acondicionó la fase, semilla de palta, con 10 mL de AcOEt, 10 mL de MeOH y 10 mL de agua desionizada durante 5 min a 2000 rpm.

Extracción: En ambos casos el proceso de extracción es el mismo. Las condiciones de cada método se muestran en el Esquema 10. A continuación, se explicará con el método del corcho laminar.

Para la extracción, a un vial de vidrio que contenía el disco con la fase de sorción, se añadió una alícuota de 20 mL de agua desionizada. Se utilizó HCl 1 mol/L para ajustar el pH de las muestras (pH 2) y NaCl al 20% para la fuerza iónica. Se dopó con una solución multiestándar de los analitos a una concentración de 30 µg/L y se agitó a una velocidad de 2000 rpm por un tiempo de 90 min a temperatura ambiente. Para la desorción de los analitos, el disco se traspasó a un vial de 20 mL, se añadió 10 mL de AcOEt y se agitó durante 20 min a 2000 rpm. El extracto con AcOEt que contenía a los analitos concentrados, se evaporó bajo una corriente de N₂ hasta sequedad a 60°C durante 60 min. Se reconstituyó con 400 µL de AcOEt y se agitó durante 5 min en un vortex. Se traspasó la muestra a viales de 2 mL y se evaporaron a sequedad bajo flujo de N₂. Finalmente, los extractos fueron derivatizados e inyectados en el GC-MS. Previo a la inyección se añadió 30 µL de PCB-77 (1 mg/L) como estándar interno.

4.4.3. Carbones activados

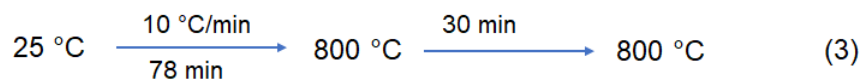
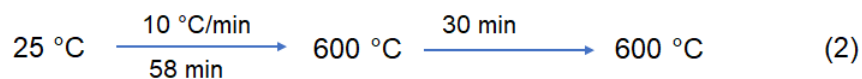
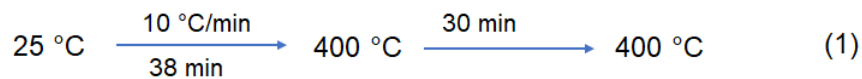
a) Síntesis de carbones activados

Se estudió la carbonización-activación de la semilla de palta y del corcho en un horno convencional (mufla). Se analizaron las temperaturas finales de pirólisis (t_f), el activante químico y las concentraciones del activante. En la Tabla 4 se indican las condiciones de activación.

Tabla 4. Condiciones de activación en horno convencional (mufla) para semilla de palta y corcho laminar.

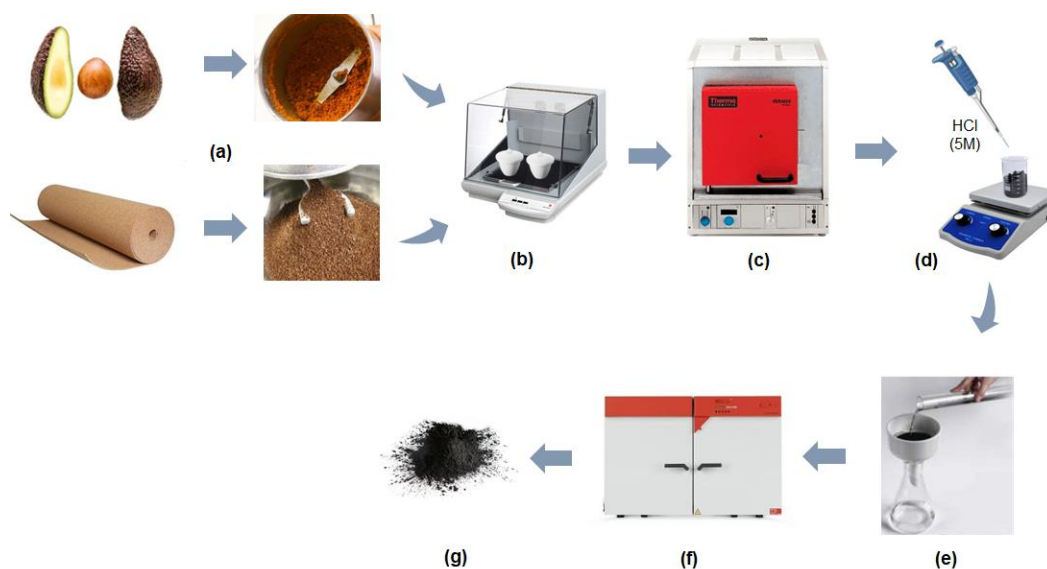
Tipo de activación	Química	
Material de partida	Semilla de palta	Corcho
Activantes	ZnCl ₂ , K ₂ CO ₃	
Concentración activante (%m/v)	20, 30, 40	10, 20, 40
T _i (°C)	25	
T _f (°C)	400, 600, 800	
Flujo de N ₂ (psi)	1-1,5	
Velocidad de calentamiento (°C/min)	10	

Programas de temperaturas del horno:



Esquema 11. Ruta de carbonización para las fases sorbentes. (1) programa a 400°C, (2) programa a 600°C y (3) programa a 800°C.

Procedimiento de carbonización-activación de semilla de palta y corcho:

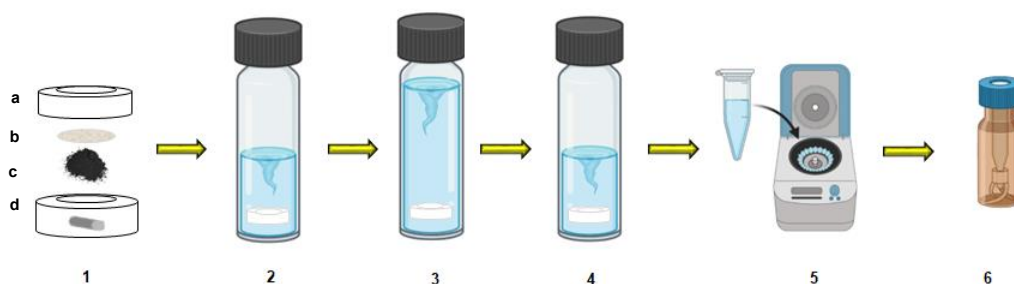


Esquema 12. Síntesis de carbón activado. a) Material precursor molido en molino (corcho o semilla de palta), b) Mezcla de agente activante con material precursor (agitación a 160 rpm en incubadora a 60°C), c) Pirólisis del material (proceso de carbonización y activación), d) Lavado con HCl 5mol/L, e) Filtración del material carbonizado y lavado con agua, f) Secado del carbón a 55°C, g) Carbón molido y tamizado listo para implementar en disco rotatorio.

La carbonización y la respectiva activación tanto para la semilla de palta como para el corcho fueron basados en lo reportado por Leite *et al.* (2018)⁵⁷ y Mestre *et al.* (2007)⁷⁴. Como se observa en el Esquema 12, previo a la pirólisis se molieron ambas fases en un molino para obtener polvo de semilla de palta y corcho molido. Se mezcló en un crisol de porcelana 1g de la materia prima correspondiente y 4 mL de la solución activante (ZnCl_2 o K_2CO_3) en una relación 1:4

(material de partida:activante) hasta formar una pasta homogénea. La mezcla se dejó agitando (150 rpm) a 60°C durante toda la noche (15 h) a sequedad. Luego, la pasta homogeneizada y seca en el crisol con tapa se colocó en el horno convencional. Se saturó la muestra dentro del horno con N₂ (1,5 psi) por 20 min para asegurar una atmósfera inerte. Para la pirólisis se comenzó con una temperatura de 25°C y se elevó en un flujo de 10°C/min hasta llegar a 400°C, donde se mantuvo por 30 min. Finalmente, se dejó enfriar bajo flujo de N₂ hasta aproximadamente 150 °C. El material pirolizado se lavó con HCl 5 mol/L durante 2 h y luego con agua hasta llegar a pH neutro, se secó durante 24 h a 55°C, se molió en un mortero de ágata para generar un polvillo de carbón y se tamizó a un tamaño de partícula entre 75-38 µm (lo que equivale a 200 y 400 mesh respectivamente). De la misma manera se llevó a cabo la síntesis de los carbones a 600 y 800°C respectivamente.

b) Procedimiento RDSE para CA de semilla de palta y CA de corcho



Esquema 13. Procedimiento de RDSE con carbón activado. 1) Ensamblaje del disco (a. Camisa de teflón, b. filtro de fibra de vidrio, c. fase de CA, d. disco rotatorio con barra magnética), 2) Acondicionamiento del disco, 3) Extracción de los analitos desde la muestra de agua, 4) Desorción de los analitos, 5) Centrifugación del eluato, 6) Extracto derivatizado en vial de inyección.

Acondicionamiento: Para ambos CAs, se acondicionó el disco con la fase en un vial de vidrio con 10 mL de AcOEt, 10 mL de MeOH y 10 mL de agua desionizada durante 5 min a 2000 rpm.

Extracción: El procedimiento de extracción se llevó a cabo de igual forma a lo descrito anteriormente con las fases naturales y que se resume brevemente en el Esquema 13. Sin embargo, las condiciones óptimas de cada método propuesto fueron distintas para cada CA (Tabla 5).

Tabla 5. Condiciones de extracción utilizando CAs de s. de palta y corcho.

Variables	Condiciones de extracción	
	CA de s. de palta	CA de corcho
Fase	CA de s. de palta	CA de corcho
Activación del carbón	ZnCl ₂ 30% a 600°C	K ₂ CO ₃ 20% a 600°C
Cantidad de fase (mg)	50	30
pH	4	2
NaCl %m/v	0	10
Solvente de elución	MeOH	MeCN

El proceso de RDSE de los CAs se interpretará a través de la metodología del CA de corcho.

En la cavidad del disco rotatorio se añadió 30 mg de carbón de corcho activado con K₂CO₃ al 20%*m/v* (a 600°C), se colocó el filtro y se selló con la camisa del disco (Figura 13). Luego, el disco con la fase se acondicionaron con los solventes ya mencionados. Para la extracción se agregó una alícuota de 25 mL de muestra, se ajustó el pH a 2, se añadió NaCl al 10% y se enriqueció a una concentración de 30 µg/L de los analitos. Se agitó a una velocidad de 2000 rpm durante 90 min. Para la desorción, se transfirió el disco a otro vial, donde se agregó 10 mL de MeCN y se agitó a 2000 rpm durante 20 min. Posteriormente, se transfirió el extracto con MeCN a viales de 12 mL para ser evaporados a sequedad bajo flujo de N₂ a una temperatura de 60°C por 60 min. El extracto evaporado se reconstituyó con 400 µL de MeCN y se agitó en un vortex en 5 min, luego, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 min. La muestra centrifugada se traspasó a viales de 2 mL para ser evaporada a sequedad bajo una corriente de N₂. Se derivatizó el extracto, se añadió 30 µL de PCB-77 (1 mg/L) como estándar interno y se inyectó en el GC-MS.

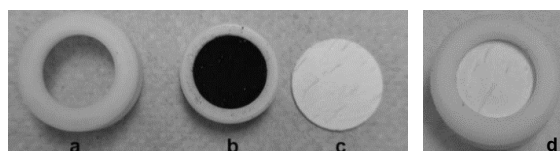


Figura 13. Disco con camisa utilizando carbón activado de corcho (activado con K₂CO₃) como fase sorbente. a) Camisa de teflón, b) disco con carbón activado, c) filtro de fibra de vidrio (14 mm), d) Sistema RDSE armado.

4.4.4. Optimización de variables influyentes en RDSE

Se realizó la optimización de los distintos factores que podían afectar en el procedimiento de extracción de los analitos. Se evaluaron pH, fuerza iónica, cantidad de fase, velocidad de agitación, volumen de muestra y tiempo de extracción para todos los sorbentes (Fases naturales y carbones activados). La Tabla 6 señala las condiciones que se estudiaron para cada fase de sorción.

Tabla 6. Optimización de variables en RDSE.

Fases	Naturales		Carbones activados	
	Corcho	Semilla de palta	Corcho	Semilla de palta
Cantidad de fase	-	50-80 mg	-	-
pH	2-9		2-10	2-9
Fuerza iónica	0-30% m/v de NaCl			
Volumen de muestra	Estudio quimiométrico (Diseño Doehlert)	20-50mL	Estudio quimiométrico (Diseño Doehlert)	
Tiempo de extracción		5-120 min		
Velocidad de agitación		-		

Cantidad de fase: Se estudió la cantidad de fase sorbente de la semilla de palta en polvo. Se agregaron al disco rotatorio 50, 60, 70 y 80 mg de semilla particulada y se evaluó cada uno por triplicado.

Variables químicas

pH: Se estudió el pH del medio a distintos rangos. Para las fases naturales y el CA de semilla de palta se evaluó en un intervalo de pH 2 a 9 y para el CA de corcho de 2 a 10. El pH del medio se ajustó con un pH-metro y se prepararon distintas soluciones de ácido y de base. Los experimentos se realizaron en triplicado.

Las soluciones preparadas fueron:

- Una solución de HCl 1 mol/L donde se añadieron 3 gotas de ácido para ajustar a pH 2.
- Una solución buffer de ácido acético 0,1 mol/L en el que se agregaron 500 μ L del tampón para alcanzar pH 4.
- Una solución buffer de fosfato de sodio dibásico 1 mol/L en el que se agregaron 500 μ L para llevar el medio a pH 6.
- Una solución de NaOH 0,05 mol/L donde se añadieron 12 y 15 gotas hasta pH 9 y 10 respectivamente.

Fuerza iónica: La fuerza iónica se estudió utilizando soluciones de NaCl a diferentes concentraciones (0, 10, 20 y 30 %m/v), por triplicado.

Variables hidrodinámicas

Fases naturales

Tiempo de extracción, volumen de muestra y velocidad de agitación:

Para el corcho laminar, mediante el uso del programa Statgraphics, se realizó un estudio quimiométrico de análisis multirespuesta para analizar las variables volumen de muestra, tiempo de extracción y velocidad de agitación, donde se aplicó un diseño Doehlert de un total de 15 experimentos (Tabla 7).

Tabla 7. Matriz de experimentos (diseño Doehlert) para la fase sorbente corcho laminar.

Experimentos	Valores codificados			Valores Reales		
	X1	X2	X3	Tiempo (min)	Velocidad (rpm)	Volumen (mL)
1	0	0	0	60	1100	20
2	1	0	0	120	1100	20
3	0.5	0.866	0	90	2000	20
4	-0.5	0.866	0	30	2000	20
5	-1	0	0	0	1100	20
6	-0.5	-0.866	0	30	200	20
7	0.5	-0.866	0	90	200	20
8	-0.5	-0.289	-0.816	30	800	10
9	0	0.577	-0.816	60	1700	10
10	0.5	-0.289	-0.816	90	800	10
11	-0.5	0.289	0.816	30	1400	30
12	0	-0.577	0.816	60	500	30
13	0.5	0.289	0.816	90	1400	30
14	0	0	0	60	1100	20
15	0	0	0	60	1100	20

Para el caso de la semilla de palta, se realizó un análisis univariado para el volumen de muestra y el tiempo de extracción. Ambos experimentos se hicieron en triplicado.

Volumen de muestra (semilla de palta): Los volúmenes de muestra que se estudiaron fueron: 20, 30, 40 y 50 mL de agua desionizada a 2000 rpm en un tiempo de 60 min.

Tiempo de extracción (semilla de palta): Los tiempos de extracción estudiados fueron: 5, 30, 60, 90 y 120 min utilizando 20 mL de muestra a una velocidad de agitación de 2000 rpm.

Carbones activados

Tiempo de extracción y volumen de muestra: En ambos CAs, se aplicó un diseño Doehlert para analizar las variables volumen de muestra y tiempo de extracción con un total de 9 experimentos. En la Tabla 8 se muestra la matriz de experimentos.

Tabla 8. Matriz de experimentos (diseño Doehlert) para carbones activados de corcho y semilla de palta.

Experimentos*	Valores codificados		Valores reales	
	X1	X2	Tiempo (min)	Volumen (mL)
1	0	0	60	20
2	1	0	120	20
3	0.5	0.866	90	30
4	-0.5	0.866	30	30
5	-1	0	0	20
6	-0.5	-0.866	30	10
7	0.5	-0.866	90	10
8	0	0	60	20
9	0	0	60	20

*Se llevaron a cabo a una velocidad de agitación de 2000 rpm.

4.4.5. Caracterización de fases sorbentes:

Todos los sorbentes (tanto los carbones activados como las fases naturales) se caracterizaron a través de la espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) y microscopía electrónica de barrido (SEM).

Para estudiar la carga neta de las fases, se estudió el pH de estas, mediante el punto isoeléctrico (IEP) y el punto de carga cero (PZC). Estos últimos experimentos fueron basados en lo informado por Amaringo *et al.* (2013).⁷²

IEP: Se añadieron alícuotas de 20 mL de agua desionizada a varios viales de vidrio y se ajustó el pH desde 2 a 12 (9 unidades), adicionando distintas cantidades de solución de ácido o base (HCl 1 mol/L; HCl 0,01 mol/L; NaOH 1 mol/L; NaOH 0,01 mol/L; NaOH 0,05 mol/L). Luego, se añadió 200 mg de fase de extracción y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Transcurrido el período se midió el potencial zeta de la muestra.

PZC: A diferentes viales de vidrio se agregó 20 mL de agua desionizada, ajustando el pH desde 2 a 12 (9 unidades), donde se adicionaron cantidades adecuadas de ácido o base (HCl 1 mol/L; HCl 0,01 mol/L; NaOH 1 mol/L; NaOH 0,01 mol/L; NaOH 0,05 mol/L). Luego, se adicionó 200

mg de fase sorbente y se agitó durante 48 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se midió el pH final de la muestra.

Finalmente se hicieron análisis termogravimétricos a las fases naturales (corcho y semilla de palta) que permite determinar el % de la pérdida de peso mediante la descomposición térmica del material.

4.4.6. Validación del método analítico

Para la validación del método analítico es necesario determinar sus cifras de mérito tales como: curva de calibración, precisión, exactitud, límites de detección y de cuantificación. La determinación de las cifras de mérito se realizó empleando muestras de agua de río y agua potable utilizando el método propuesto por cada una de las fases.

a) Precisión y Exactitud

La precisión y la exactitud se determinaron con muestras de agua de río (sitio Canoa y/o puente Esperanza, río Mapocho, Santiago de Chile). Para las fases naturales se enriqueció a una concentración de 30 µg/L de multiestándar de los cuatro analitos y de un estándar subrogante (Ibuprofeno-D₃) a la misma concentración. Para los carbones activados, las muestras se doparon a una concentración de 10 µg/L de multiestándar y de ibuprofeno deuterado.

La precisión se determinó mediante el parámetro de la desviación estándar relativa (RSD) a través de la repetibilidad de las muestras, se aplicó el método propuesto en 6 extracciones utilizando diferentes discos en las mismas condiciones. Este fue determinado en base a la ecuación 1.

$$\%RSD = \frac{\sigma}{\bar{X}} \times 100 \quad (1)$$

Basado en lo informado por Becerra-Herrera *et al.* (2015),⁶⁷ la exactitud se determinó mediante el parámetro de la recuperación (%Re) de los analitos, se aplicó el método de extracción propuesto de cada fase y se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$Re (\%) = \frac{A_{s4} - A_{s3}}{A_{s2}} \times 100 \quad (2)$$

Cada término corresponde a las áreas promedio de: 6 muestras de aguas enriquecidas con un multiestándar y un estándar subrogante a una concentración de 30 o 10 µg/L respectivamente (S4), 3 muestras blancos (S3) y 3 muestras cuyo extracto fue enriquecido con los respectivos estándares (multiestándar y estándar subrogante de concentración 30 o 10 µg/L) previo al paso de derivatización (S2).

Cabe destacar que esta ecuación permite determinar el % de recuperación libre de efecto matriz.

Para tener resultados más fiables se calculó el efecto matriz que fue determinado de dos maneras diferentes:

1) Una forma fue en base al área de los analitos (Ecuación 3).

$$\% EM = \frac{A_{s2} - A_{s3}}{A_{s1}} \times 100 \quad (3)$$

Donde S1 corresponde a una solución estándar de los analitos, S2 corresponde a un extracto que fue fortificado previo al paso de la derivatización y S3 corresponde a una muestra blanco.

2) Otra forma fue en base a las pendientes de la curva en matriz de los analitos y de la curva de estándar en solvente (Ecuación 4). Esta ecuación se basó en lo reportado por Zhou *et al.* (2017) y por Pizzuti *et al.* (2016).⁷⁵⁻⁷⁶

$$\%EM = \left(\frac{\text{Pendiente adición estándar en matriz} - \text{Pendiente curva de estándar en solvente}}{\text{Pendiente curva de estándar en solvente}} \right) \times 100 \quad (4)$$

Utilizando ambos métodos es posible determinar si la matriz causa un efecto positivo (aumento de la respuesta del detector) o negativo (disminución de la respuesta del detector).

b) Curva de calibración

La curva de calibración se llevó a cabo utilizando muestras reales (sitio Canoa o puente Esperanza, río Mapocho, Santiago de Chile). Donde se aplicó el método optimizado para cada uno de los sorbentes y se realizó todo por duplicado. La curva se trazó como el área de la señal cromatográfica vs la concentración del analito. Las respuestas cromatográficas fueron normalizadas por el área de la señal del PCB-77 (estándar interno). La ecuación de la recta y el coeficiente lineal R^2 se calculó en base a la curva de calibración.

Curva de calibración para la fase corcho laminar: Se utilizó agua de río del sitio Canoa, se enriquecieron las muestras en cinco niveles de concentración para cada uno de los analitos (5, 10, 20, 40 y 60 $\mu\text{g/L}$).

Curva de calibración para la fase semilla de palta en polvo: Se utilizó agua de río del sitio Canoa. Para el IBU se enriqueció a 5, 10, 30 y 100 $\mu\text{g/L}$ y para el 1-OH-IBU se fortificó a 5, 30, 100, 200 y 300 $\mu\text{g/L}$.

Curva de calibración para la fase CA de corcho: Se utilizó agua de río del puente Esperanza, se doparon las muestras en cinco niveles de concentración para todos los analitos (5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$).

Curva de calibración para la fase CA de semilla de palta: Se utilizó agua de río del sitio Canoa y se fortificaron las muestras alcanzando cinco niveles de concentración para todos los analitos (5, 10, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/L}$).

c) Límite de detección y de cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se determinaron usando agua potable (de la llave). Se aplicó el método analítico propuesto (para cada una de las cuatro fases optimizadas) a 6 muestras blancos.

Para determinar el límite de detección (LD) se integró la señal del blanco en los tiempos de retención de los analitos, se calculó el promedio de las áreas normalizadas y se sumó 3 veces su desviación estándar (σ) para determinar el Y_{LD} de acuerdo a la ecuación 5. Luego, el Y_{LD} se interpoló en la curva de calibración y finalmente se le aplicó el factor de concentración correspondiente.

$$Y_{LD} = \bar{X} + 3\sigma \quad (5)$$

Para determinar el límite de cuantificación (LQ) se llevó a cabo de la misma manera que el LD, pero al promedio de las áreas normalizadas se le sumó 10 veces la desviación estándar del blanco (Ecuación 6).

$$Y_{LQ} = \bar{X} + 10\sigma \quad (6)$$

4.4.7. Muestras reales

Las muestras reales fueron colectadas por nuestro grupo de laboratorio entre el año 2018 y 2021. Se tomaron muestras de afluentes y efluentes de la PTAR El Trebal (Región Metropolitana, Padre Hurtado) y se estudió la aplicabilidad del método propuesto de una de las fases. Previo a cada análisis las muestras fueron filtradas y almacenadas en botellas de polipropileno a 4°C.

5. Resultados y Discusión

5.1. Optimización cromatográfica (GC-MS):

5.1.1. Derivatización

Los analitos fueron derivatizados para aumentar su estabilidad térmica, disminuir su polaridad y aumentar su volatilidad, previo a la inyección cromatográfica.

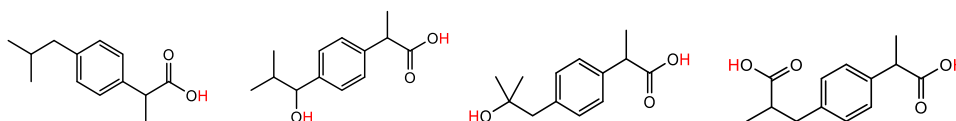


Figura 14. Analitos de estudio. Los protones marcados en rojo se encuentran susceptibles a la derivatización.

Se evaluaron tres condiciones diferentes para la derivatización de los analitos (Tabla 9). Se optimizó la temperatura, tiempo y cantidad de piridina (catalizador) en la reacción de silylación. El volumen de agente derivatizante, MSFTA, se mantuvo constante (50 μL) y cuando no se añadió piridina, este se reemplazó con AcOEt (solvente polar aprótico). El volumen de MSFTA se mantuvo al ser validados en trabajos anteriores.^{33b,44}

Tabla 9. Condiciones de derivatización de los analitos.

Condiciones	Volumen MSFTA (μL)	Volumen Piridina (μL)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
Cnd 1	50	50	80	30
Cnd 2	50	0	80	30
Cnd 3	50	50	Ambiente	5
Cnd 4	50	0	Ambiente	5

A continuación, se muestra las respuestas obtenidas en el estudio de la derivatización.

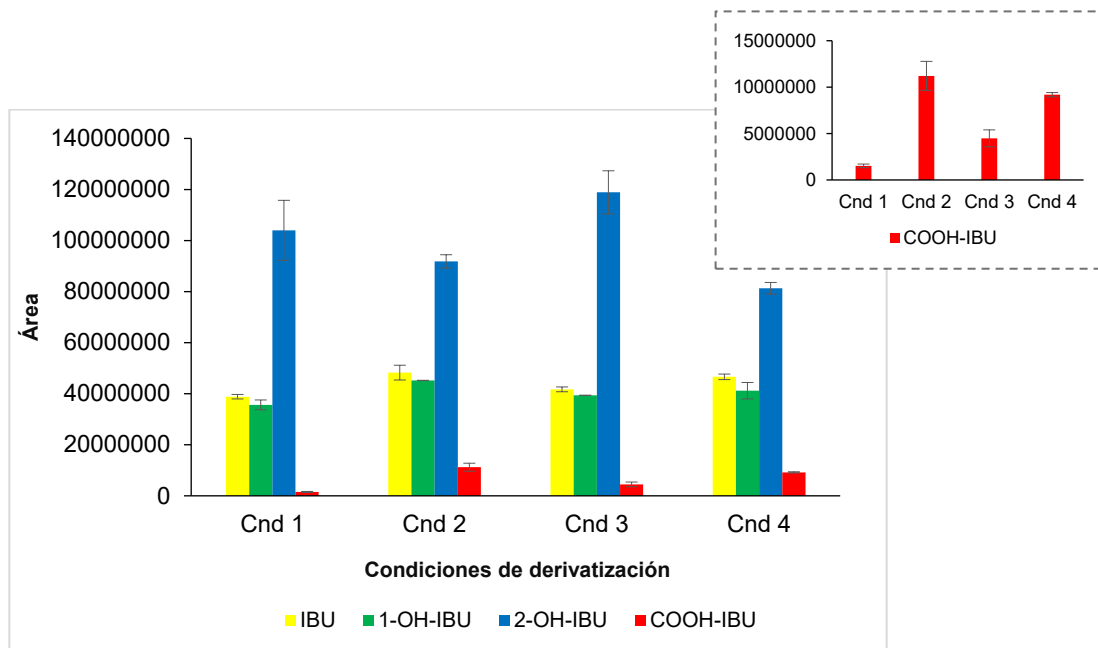


Figura 15. Área cromatográfica en función de las distintas condiciones de derivatización.

La Figura 15 muestra las respuestas cromatográficas (áreas) para los cuatro analitos en función de las distintas condiciones de derivatización estudiadas (ver Tabla 9). Se observa que con las condiciones 1 y 3 (reacción en presencia de piridina) el compuesto COOH-IBU obtiene una baja respuesta cromatográfica, en cambio, con las condiciones 2 y 4 (derivatización sin piridina) el área aumenta considerablemente. Los compuestos IBU y 1-OH-IBU mostraron resultados similares al COOH-IBU.

Al realizar un análisis estadístico (ANOVA de una vía) entre las condiciones 2 y 4 se obtuvo que no hay diferencia significativa entre ambas respuestas ($p > 0,05$) para los cuatro analitos. Por tanto, se consideró como óptima la condición 4, ya que permite un trabajo en menor tiempo y sin gasto de energía, siendo una derivatización más eco-amigable y rápida, sin una pérdida considerable de señal cromatográfica.

Se consideró además que la reacción de silylación óptima debía ser sin piridina, ya que las señales cromatográficas de los analitos derivatizados con este catalizador perdían resolución y forma (Figura 16).

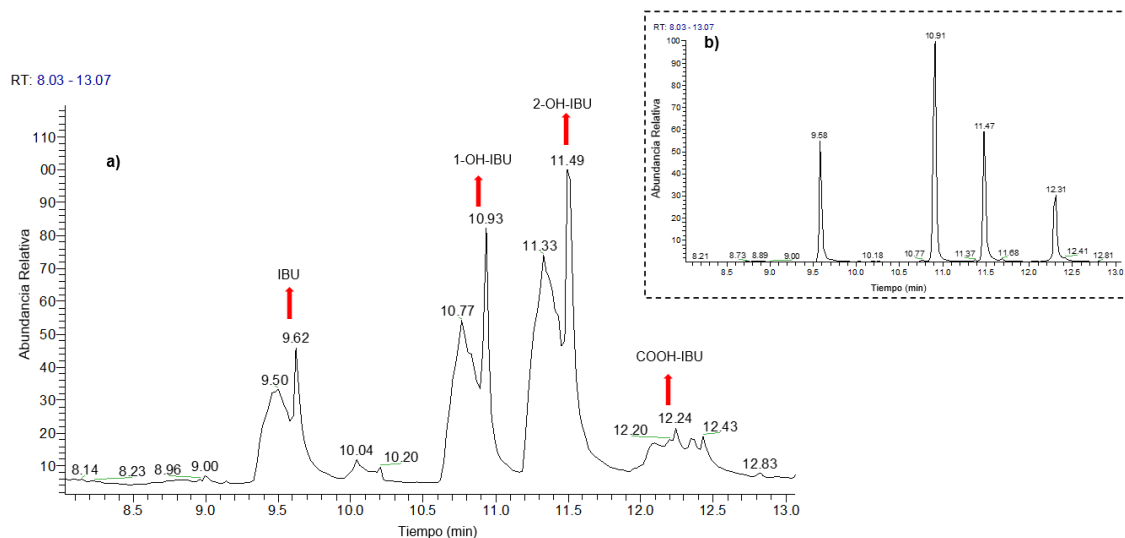


Figura 16. Cromatogramas (TIC) de analitos derivatizados. (a) Reacción con piridina a 80 °C, (b) Reacción sin piridina a temperatura ambiente.

Tal como se observa en la Figura 16, el cromatograma **a** muestra las respuestas de los analitos derivatizados con piridina y el cromatograma **b** muestra los analitos derivatizados sin piridina. Los reactivos de sililo se encuentran influenciados tanto por el medio del sistema como por la adición de un catalizador, donde este último aumenta la reactividad del reactivo. Si bien, la piridina es el catalizador más frecuentemente utilizado en este tipo de reacción, ya se ha informado en la literatura que puede producir colas en las señales cromatográficas.⁶⁶ No obstante, al derivatizar con piridina se observan cromatogramas “desdoblados” el cuál se asocia a una descomposición de los analitos ya que en ausencia de piridina esto no ocurre. Por otro lado, muchos compuestos requieren de temperatura para derivatizarse por el impedimento estérico o la posición en la que se encuentra el hidrógeno (H-O-R) que será reemplazado por el grupo trimetilsilano (TMS), en la literatura se informa un calentamiento que no supere los 60 °C y alrededor de 10 a 15 min para evitar la descomposición del derivado, sin embargo, el calentamiento a largo plazo va a depender de que tan obstaculizado se encuentra el compuesto. En este caso, los compuestos son moléculas ácidas que poseen protones sin impedimentos para ser sustituidas por el TMS, a excepción del 2-OH-IBU que posee un alcohol terciario, aun así, se infiere que no es necesario el catalizador (piridina) para desprotonar los

compuestos, puesto que el ataque nucleofílico de los compuestos al MSTFA sucede sin dificultad. Por tanto, para el ibuprofeno y sus metabolitos la derivatización se lleva a cabo solo usando un exceso suficiente de reactivo sililante y un medio polar aprótico, donde se da de forma rápida sin la necesidad de piridina.

De manera análoga, se llevó a cabo un estudio quimiométrico (screening) que permitieron reforzar los resultados obtenidos anteriormente.

El estudio screening consistió en un análisis del tipo 2^k experimentos, donde k indica el número de factores en estudio. En este trabajo en particular, $k = 3$ lo que lleva a un total de 8 pruebas, sin embargo, se añadieron dos centros dando en conjunto un análisis de 10 experimentos. A continuación, se muestra la matriz de screening de la derivatización (Tabla 10).

Tabla 10. Matriz de screenig para estudio de derivatización de los analitos.

Experimentos	Valores codificados			Valores reales		
	A	B	C	Piridina (μL)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (min)
1	-1	-1	-1	0	30	5
2	1	-1	-1	50	30	5
3	-1	1	-1	0	70	5
4	1	1	-1	50	70	5
5	-1	-1	1	0	30	55
6	1	-1	1	50	30	55
7	-1	1	1	0	70	55
8	1	1	1	50	70	55
9	0	0	0	25	50	30
10	0	0	0	25	50	30

La significancia de cada factor se estimó desde un valor t (test de Student) con un 95 % de confianza (5% de significancia) determinado a partir de la varianza experimental. La significancia de cada factor se muestra en un gráfico de Pareto, donde cada barra nos entrega el valor del efecto estandarizado correspondiente al t experimental.

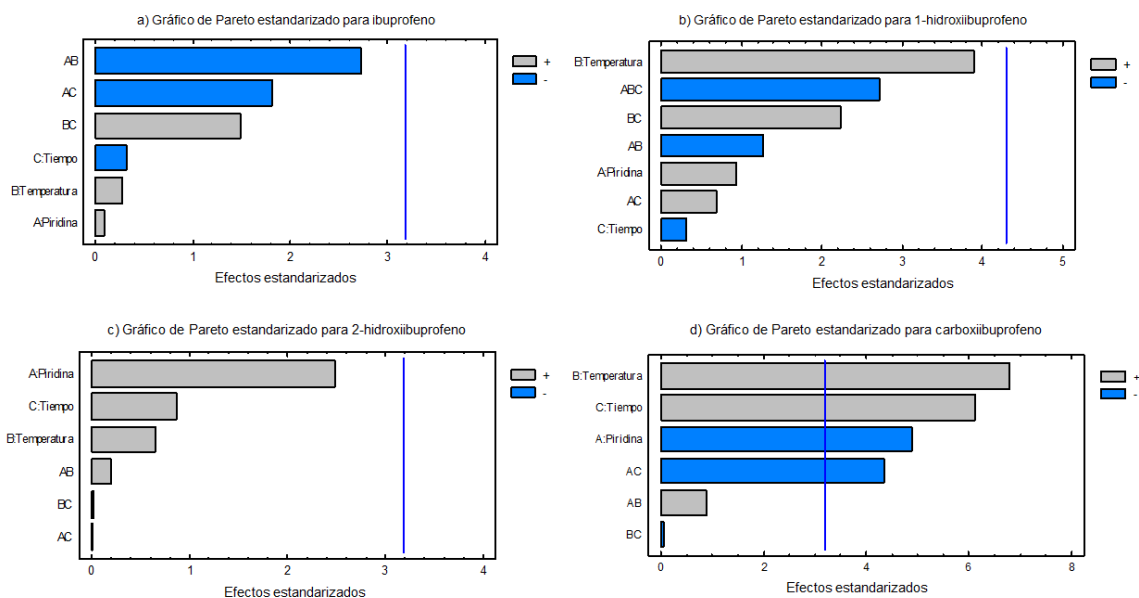


Figura 17. Gráficos de Pareto obtenido del análisis screening para cada analito. a) Gráfico de Pareto para ibuprofeno, b) Gráfico de Pareto para 1-hidroxiibuprofeno, c) Gráfico de Pareto para 2-hidroxiibuprofeno, d) Gráfico de Pareto para carboxiibuprofeno.

Como se puede observar en la Figura 17, tanto para el ibuprofeno como para los analitos hidroxilados (1-hidroxiibuprofeno y 2-hidroxiibuprofeno) ningún factor es significativo. Sin embargo, en el caso del carboxiibuprofeno todos los factores, incluyendo las interacciones entre ellas, son significativos y se observa claramente que la piridina afecta de forma negativa en la respuesta. Si bien, los factores temperatura y tiempo tienen una significancia positiva en el proceso de derivatización del carboxiibuprofeno, se determinó llevar a cabo la derivatización sin piridina y a temperatura ambiente en un tiempo de 5 min, considerando la mejor respuesta en los cromatogramas, de la misma manera que para los otros tres analitos (ibuprofeno, 1-hidroxiibuprofeno y 2-hidroxiibuprofeno).

5.1.2. Determinación de método cromatográfico

Mediante el uso de estándares de cada analito se realizó el estudio para encontrar un método cromatográfico adecuado. Este método permitió la determinación y cuantificación del ibuprofeno y sus metabolitos por GC-MS.

En la Figura 18 se aprecia el cromatograma obtenido para las moléculas de interés, donde se observa que el IBU posee el tiempo de retención más corto (9,58 min), es decir, posee menos afinidad por la fase estacionaria. Por otro lado, el COOH-IBU posee el tiempo más largo (12,31 min), ya que tiene mayor afinidad con la fase estacionaria.

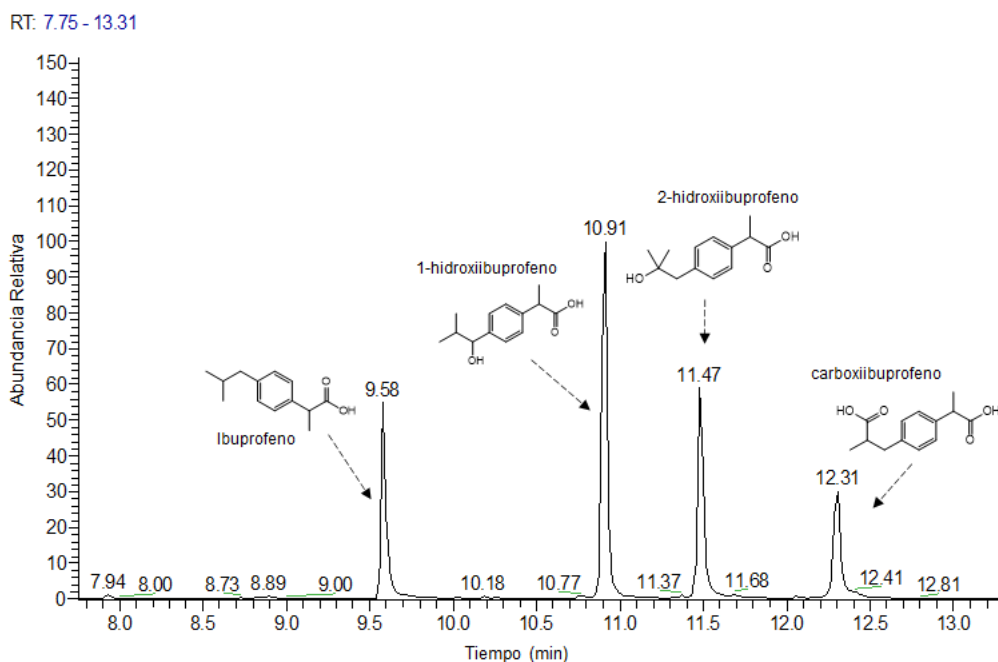


Figura 18. Cromatograma de ibuprofeno y sus metabolitos.

A continuación, se presenta una tabla resumen de los tiempos de retención (t_R) y de los iones cuantificadores e identificadores de IBU, 1-OH-IBU, 2-OH-IBU y COOH-IBU que se obtuvieron al inyectar las muestras en el cromatógrafo de gases.

Tabla 11. Tiempo de retención y iones cuantificador e identificador de los analitos.

Analito	t_R (min)	ión cuantificador (m/z)	ión identificador (m/z)
IBU	9,58	160	234
1-OH-IBU	10,91	323	324
2-OH-IBU	11,47	131	308
COOH-IBU	12,31	218	336

La Figura 19 muestra el cromatograma TIC y los iones cuantificadores de cada analito (modo SIM).

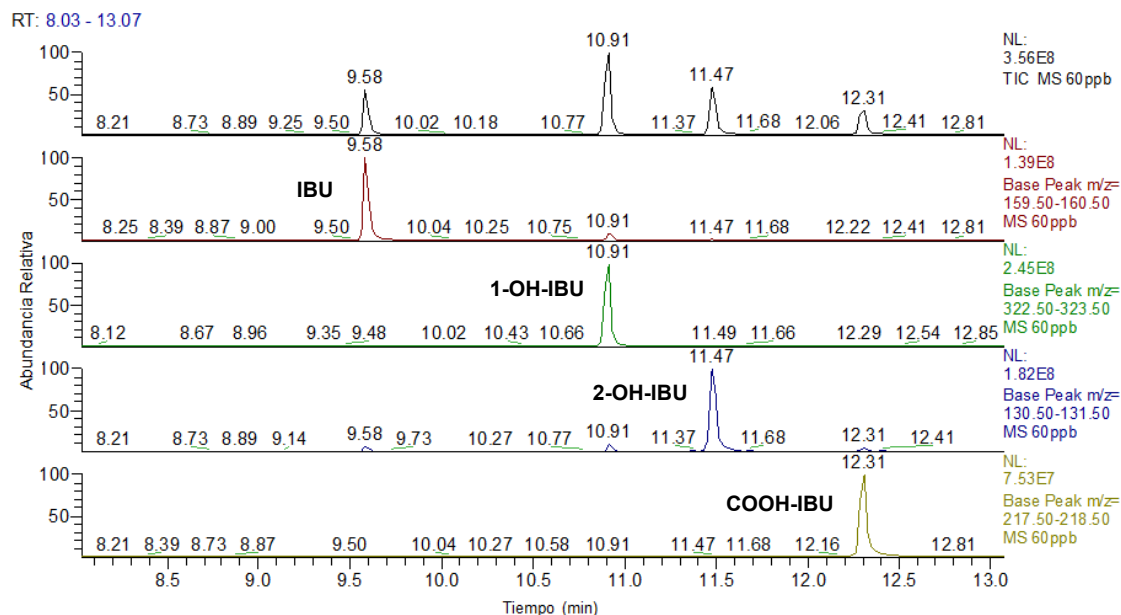


Figura 19. Cromatograma TIC más iones cuantificadores de ibuprofeno y sus metabolitos.

5.2. Fases naturales

5.2.1. Preparación de las fases sorbentes naturales

Corcho laminar

Generalmente el corcho que se encuentra en el mercado pasa por procesos de trituración y prensado, ya sea mediante calor y ligantes o por aglomeraciones donde se utilizan pegamentos. En consecuencia, se evaluó el factor de limpieza del material y se observó como éste afectaba en el procedimiento de RSDE de los analitos. Se probaron distintos solventes para limpiar el material junto con el solvente de elución para llevar a cabo la desorción de los compuestos y se hicieron pruebas utilizando el corcho con distintos tratamientos.

En primera instancia se estudiaron cuatro solventes para la elución (acetato de etilo, cloroformo, acetona y metanol), donde se obtuvieron mejores respuestas con metanol y acetato de etilo.

Posterior a este análisis, se llevó a cabo el experimento de limpieza del corcho, con cloroformo y metanol, junto con los solventes de elución restantes (MeOH y AcOEt) (Tabla 12).

Tabla 12. Prueba de solventes de limpieza y de elución.

Experimentos	Solvente de limpieza	Solvente de elución
1	MeOH	MeOH
2	MeOH	AcOEt
3	CHCl ₃	MeOH
4	CHCl ₃	AcOEt

Los resultados a través del análisis cromatográfico mostraron que al usar metanol como solvente de limpieza y acetato de etilo como solvente de elución dan cuenta de cromatogramas más limpios, más resueltos y con mayores áreas cromatográficas. En la Figura 20 se observa que se obtienen mayores áreas para los analitos 1-OH-IBU, 2-OH-IBU y COOH-IBU utilizando estos respectivos solventes (metanol para la limpieza y acetato de etilo para la desorción).

Al utilizar MeOH como solvente en la elución se obtenía la problemática de que no solo desorbiera los analitos, sino que también siguiera extrayendo compuestos de la matriz del corcho y que contaminara el extracto e interfiriera en los cromatogramas finales, aumentando el efecto matriz y dificultando la detección de las moléculas en estudio. Por otro lado, debido a que el AcOEt se caracteriza por ser un solvente polar aprótico, siendo miscible en solvente orgánicos como etanol, éter y acetona, y sabiendo que el disco queda humedecido después de la extracción, la mayor respuesta que se obtiene a través de las áreas cromatográficas se asocian a que la fuerza centrípeta del disco y el gran vortex que se forma (debido a las altas revoluciones por minuto) tras el campo magnético, genera que las partículas de agua se mezclen con las de acetato de etilo provocando a su vez que los analitos se puedan desorber y permanecer en la fase orgánica.

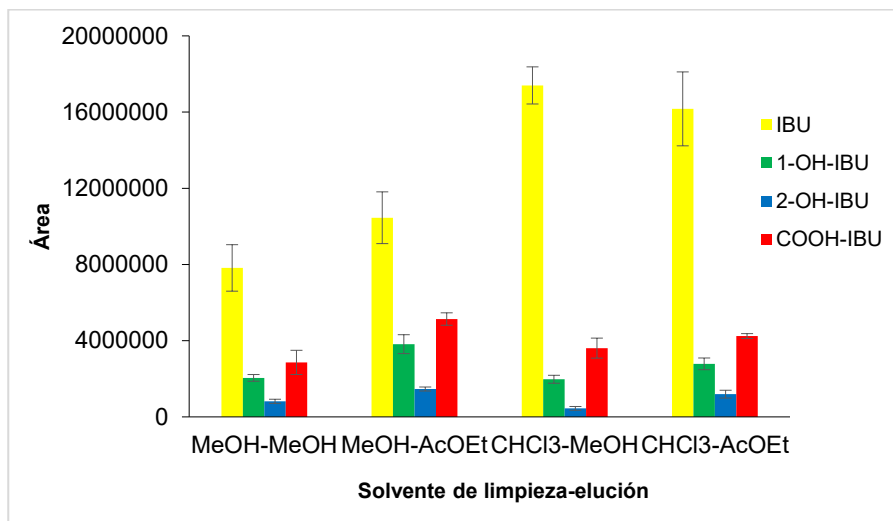


Figura 20. Área cromatográfica en función de solvente de limpieza y elución usando corcho laminar como fase de extracción.

Luego de estudiar el solvente de limpieza del material junto con el solvente de elución, se estudió el corcho como fase de extracción con distintos tratamientos. A continuación, la Tabla 13 indica los tratamientos aplicados.

Tabla 13. Evaluación de la preparación de la fase corcho laminar.

Nombre del tratamiento	Procedimiento de la fase*
Sin tratamiento	Corcho laminar sin limpiar
1 tratamiento	Los trozos circulares del corcho se limpiaron mediante ultrasonido con agua (una vez durante 60 min) y luego, dos veces con metanol (por 30 min)
2 tratamientos	Los trozos circulares del corcho se limpiaron mediante ultrasonido (una vez durante 60 min) y luego, cuatro veces con metanol (por 30 min) hasta la desaparición completa del color amarillo del lixiviado

*Todas las pruebas se aplicaron extrayendo los analitos mediante el sistema-rotatorio e inyectado en GC-MS.

Al utilizar el material con 2 tratamientos se obtenían áreas analíticas bajas para los analitos. Al usar la fase sin tratamiento, los cromatogramas tenían mucho ruido de fondo (matriz del corcho). Sin embargo, la fase con 1 tratamiento mostró tener áreas mayores para los analitos

con cromatogramas más limpios (Figura 21). Por consiguiente, se determinó emplear el corcho con 1 tratamiento, es decir, limpiarlo una vez con agua y dos veces con metanol mediante baño de ultrasonido.

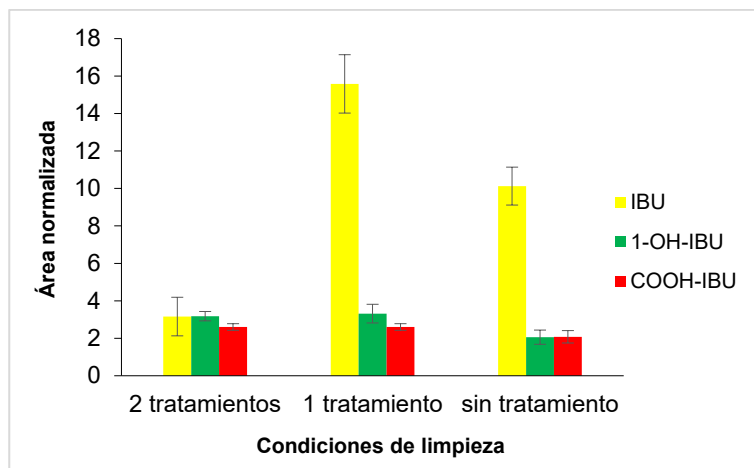


Figura 21. Estudio de limpieza de fase corcho laminar.

Semilla de palta en polvo

La semilla de palta es una fase natural que posee diferentes compuestos en su estructura, por ejemplo aceites, que pueden afectar el proceso de extracción. Por ello, se evaluó la limpieza del material previo al procedimiento de optimización de la extracción de los analitos.

En comparación al corcho, la semilla de palta requiere de varios días de lavado ya que cuando se tritura en presencia de aire, esta desarrolla un color rojo-anaranjado (reacción dependiente de polifenol oxidasa), cuyo pigmento natural se debe a un compuesto denominado perseorangina (Figura 22).⁷⁸ La eliminación de este color rojizo o más bien de este compuesto, es un tanto difícil por lo que se procedió a estudiar la limpieza a través del ultrasonido y Soxhlet para eliminar aquel efecto matriz de la semilla de palta que podía interferir en las extracciones del ibuprofeno y sus metabolitos.

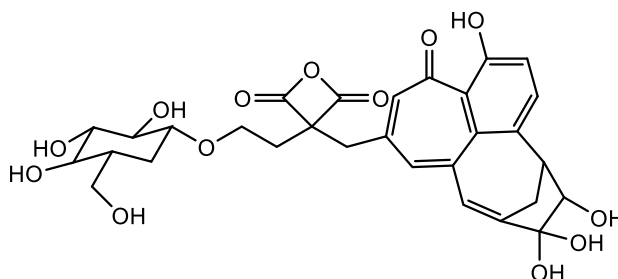


Figura 22. Estructura química del compuesto perseoranga.⁷⁸

Al igual que para el corcho, se evaluó la fase semilla de palta con distintos tratamientos que fueron estudiados mediante la extracción de los analitos a través del disco-rotatorio y cuantificados a través del GC-MS. La Tabla 14 señala los tratamientos empleados.

Tabla 14. Evaluación de la preparación de la fase semilla de palta en polvo.

Nombre del tratamiento	Procedimiento de la fase
Sin tratamiento	Semilla molida y tamizada sin limpiar
1 tratamiento	La semilla fue sometida a baño de ultrasonido una vez con agua (durante 60 min) y luego, dos veces con metanol (por 30 min)
2 tratamientos	La semilla fue sometida a baño de ultrasonido una vez con agua (durante 60 min) y luego, a una extracción Soxhlet (primero con metanol y después con n-hexano durante 24 h)

La Figura 23 muestra los resultados obtenidos al aplicar los diferentes tratamientos a la semilla de palta basados en las áreas normalizadas de los compuestos. Al contrario del corcho laminar, se obtienen mejores áreas y cromatogramas más limpios de los analitos con la fase limpia con 2 tratamientos, aunque si bien, se obtienen mayores áreas para el IBU con la fase sin tratar, para los otros analitos se obtienen áreas relativamente bajas.

Se concluye que, para una limpieza más eficiente del material, se requiere de una primera etapa de limpieza con agua por ultrasonido y luego de una segunda etapa de limpieza con metanol y n-hexano mediante Soxhlet.

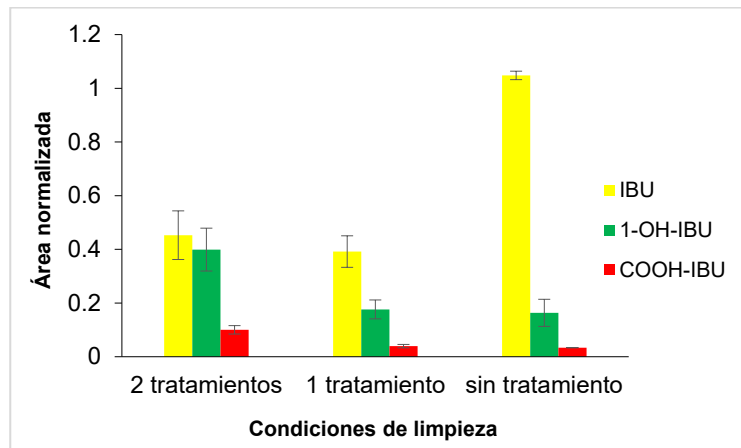


Figura 23. Estudio de limpieza de la fase semilla de palta.

Para la semilla de palta también se evaluaron los solventes de elución. Se utilizaron MeOH, AcOEt y una mezcla entre ellos (1:1). La Figura 24 muestra la comparación de los cromatogramas que se obtuvieron al eluir los analitos con diferentes solventes para llevar a cabo el proceso de desorción desde el disco rotatorio. Como resultado se obtuvo que al eluir con MeOH y una mezcla de MeOH-AcOEt (1:1) se co-extraía una cantidad importante de la matriz (de la fase) el cuál se veía reflejado en los cromatogramas. Además, eluyendo con MeOH o con la mezcla de solventes (1:1) se obtenían áreas cromatográficas con dispersiones grandes. Como resultado, para la semilla de palta se determinó utilizar AcOEt como solvente para la desorción.

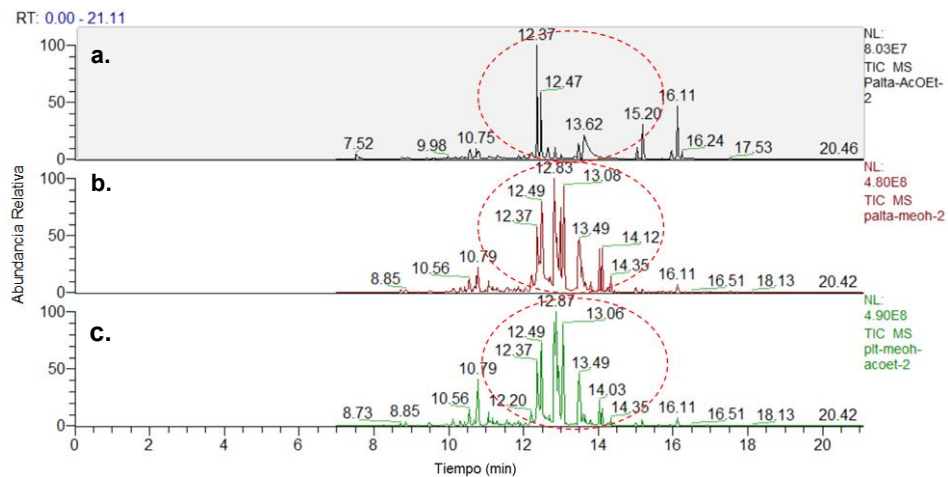


Figura 24. Comparación de cromatogramas al utilizar diferentes solventes de elución (a. AcOEt, b. MeOH y c. mezcla 1:1 MeOH:AcOEt) con la fase semilla de palta en polvo.

5.2.2. Caracterización de fases sorbentes naturales

En la Figura 25 se aprecia el espectro infrarrojo del corcho laminar.

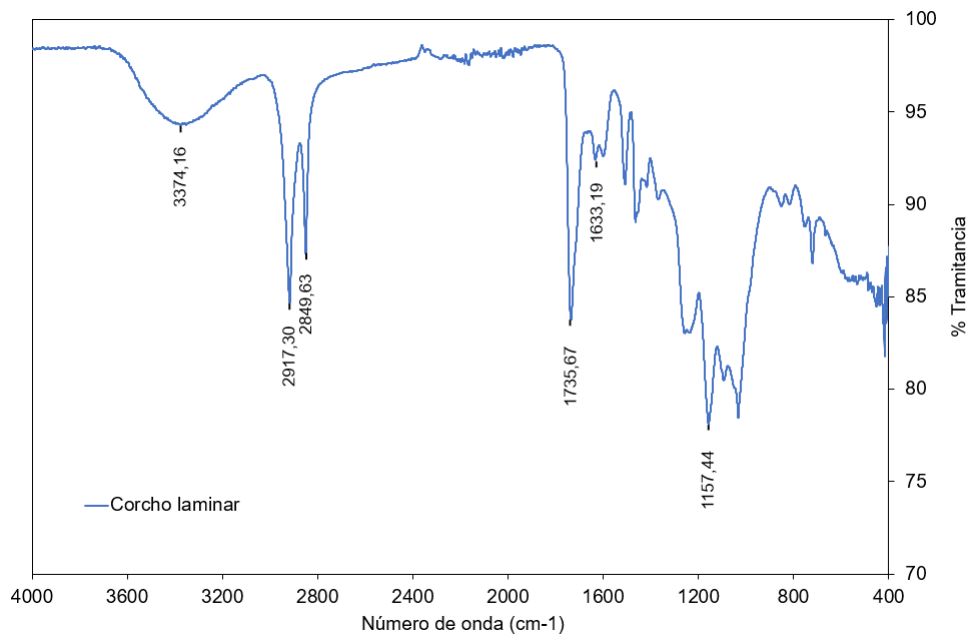


Figura 25. Espectro FTIR para fase sorbente corcho laminar.

A mayor número de onda se distingue una banda ancha de poca intensidad aproximadamente en 3400 cm^{-1} , característica de los grupos OH y dos bandas agudas e intensas entre 2800 y 2900 cm^{-1} en la región de estiramiento de los grupos CH. Estas bandas se asocian principalmente a contribuciones de lignina, suberina y polisacáridos, este caso, moléculas que poseen varios grupos hidroxilos y carbonos alifáticos. A 1700 cm^{-1} se observa una banda aguda de estiramiento que corresponden a los grupos C=O de los grupos funcionales éster que conforman la estructura de la suberina. En la región aromática entre 1500 y 1600 cm^{-1} se aprecian dos bandas poco intensas que se atribuyen a estiramientos de C=C de los anillos de benceno que conforman la estructura tanto de la lignina como de la suberina. Entre 1100 y 1300 cm^{-1} se observan contribuciones de los grupos metoxi (-OCH) de la lignina, polisacáridos y suberina.

La Figura 26 muestra el espectro infrarrojo de la semilla de palta en polvo.

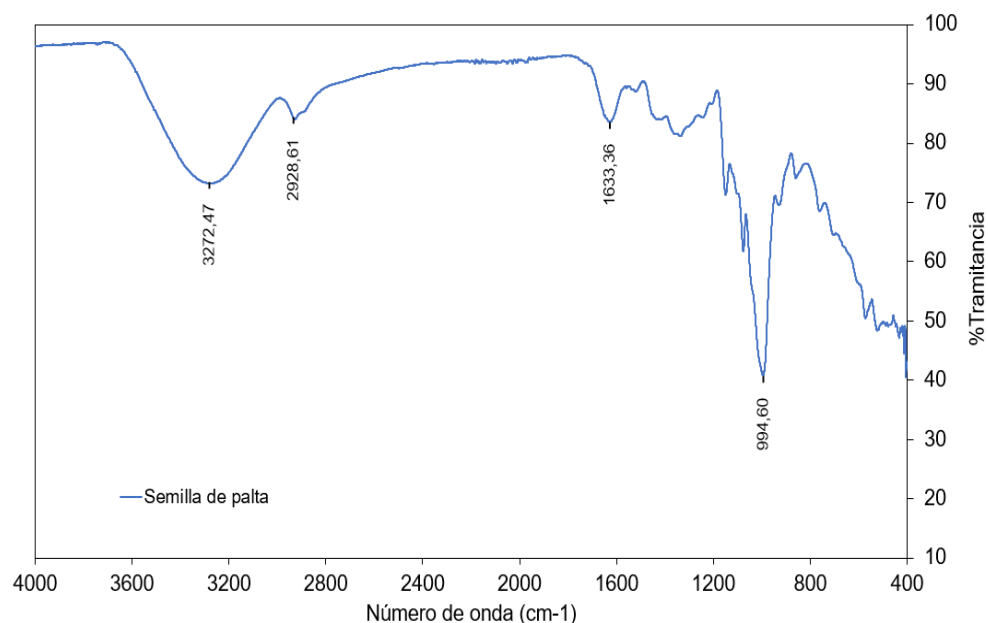


Figura 26. Espectro FTIR para fase sorbente semilla de palta.

Se observa una banda ancha aproximadamente en 3270 cm^{-1} correspondientes a los grupos OH presentes en los polifenoles de la semilla. En la zona de estiramiento de los grupos CH se distinguen dos picos poco resueltos entre 2800 y 2900 cm^{-1} que dan cuenta de carbonos alifáticos presentes en la estructura de la semilla de palta. Aproximadamente en 1630 cm^{-1} se nota un pequeño pico que corresponde a $\text{C}=\text{C}$ producto de anillos conjugados presentes en lignina. En 1000 cm^{-1} se observa una fuerte banda que forma parte de la huella dactilar de la semilla que se puede atribuir a enlaces C-O.

Esta información ayuda a predecir los tipos de interacciones que pueden existir entre las fases y los analitos. Como se observa en la Figura 25 el corcho está compuesto principalmente por grupos OH, $\text{C}=\text{O}$ y $\text{C}=\text{C}$, lo que predice interacciones mediante puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas como fuerzas de Van der Waals y π -stacking, sin embargo, estas últimas deberían ser mayoritarias recordando el hecho de que la fase está compuesta principalmente por suberina y lignina (moléculas altamente hidrofóbicas). Por otra parte, a simple vista la semilla de palta se compone de una menor cantidad de grupos funcionales, exhibiendo características de baja polaridad. Al igual que el corcho, la semilla de palta puede

interactuar con los analitos mediante interacciones hidrofílicas, a través del OH, así como también fuerzas de Van der Waals y π -stacking.

A continuación, las Figuras 27 y 28 muestran los análisis SEM para las fases corcho y semilla de palta.

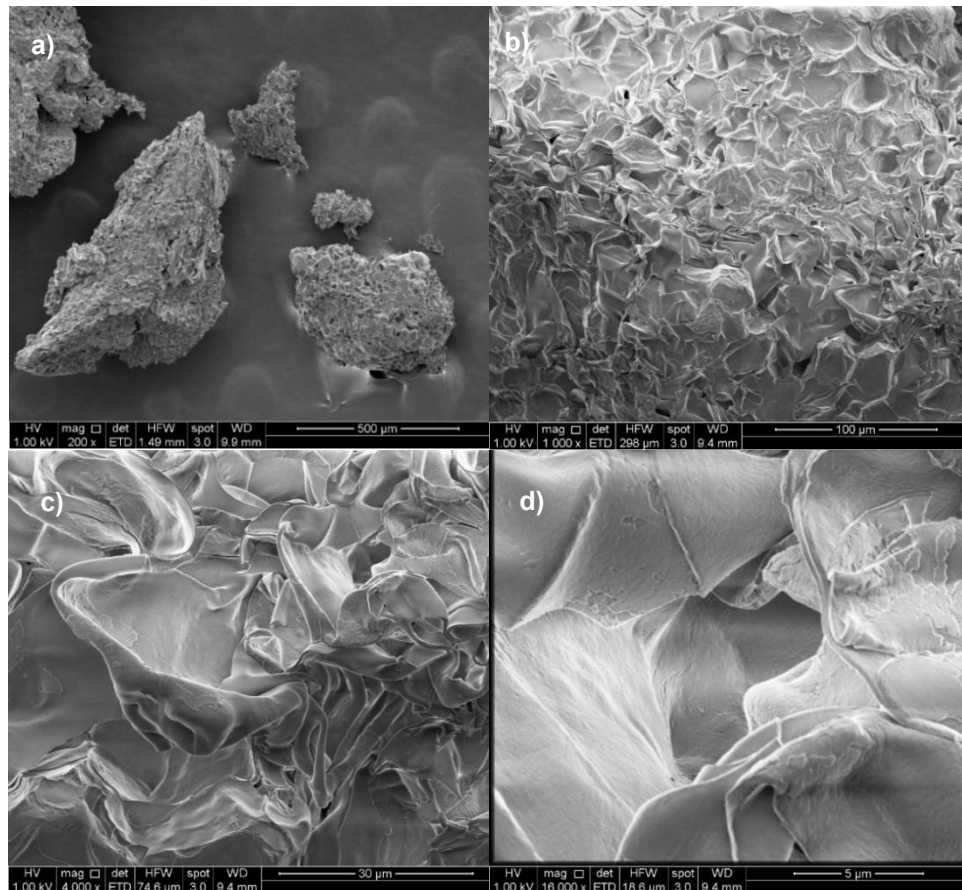


Figura 27. Micrografías SEM del corcho natural: a) 200 x, b) 1000 x, c) 4000 x, d) 16000 x.

Para tener un análisis más adecuado se molió el corcho laminar. Debido a su elasticidad y flexibilidad el proceso de molienda y tamizado fue un tanto difícil, es por esto que se escogió un tamaño de malla más grande (100 mesh) que la semilla de palta. Se estudió la superficie del material a diferentes magnitudes desde 100 x a 16000 x, se observaron partículas con una superficie rugosa y con una estructura discontinua debido a la presencia de algunos poros que atraviesan el grosor de las partículas.

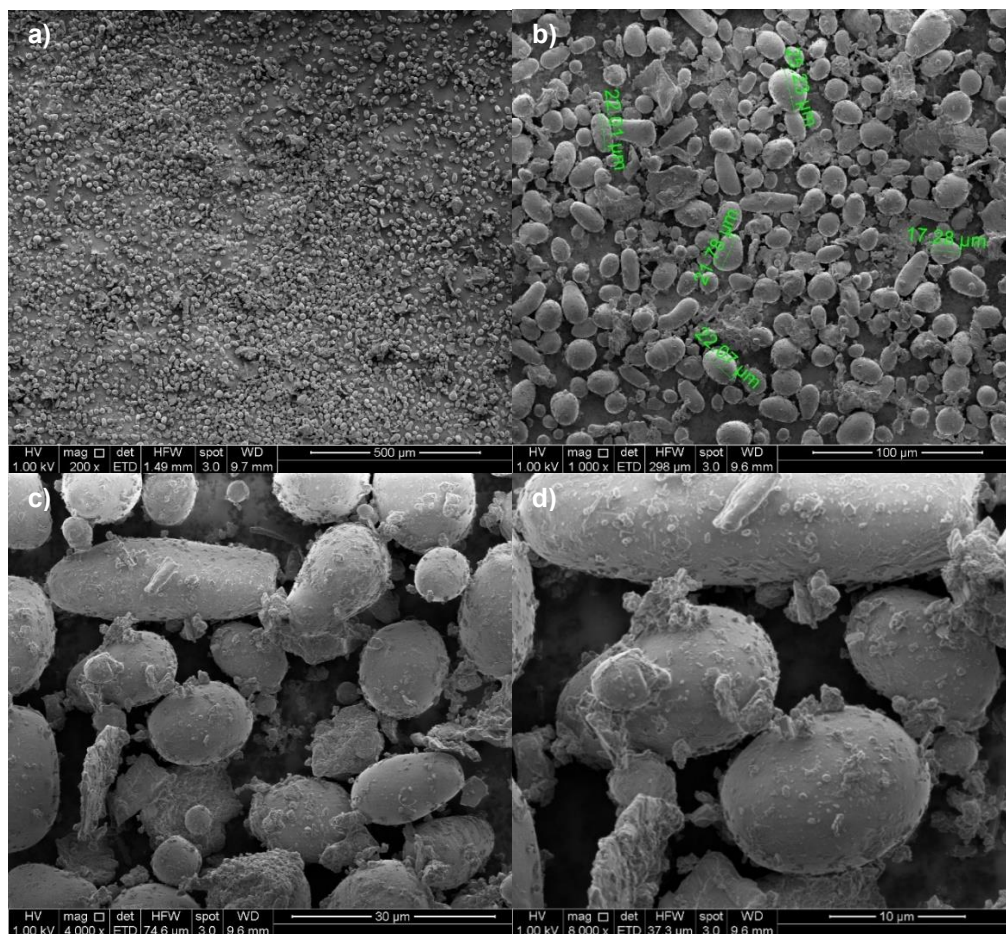


Figura 28. Micrografías SEM de semilla de palta natural: a) 200 x, b) 1000 x, c) 4000 x, d) 8000 x.

Al igual que para el corcho, se llevó a cabo el análisis morfológico del material particulado de la semilla de palta, en este caso, se estudiaron amplitudes desde 200 x a 8000 x. Se observaron superficies o estructuras ovaladas no porosas y con un tamaño de partícula aproximado de 20 μm. Las bajas eficiencias de adsorción se asocian a su superficie plana sin poros. Como la semilla se encuentra molida, en tal caso, es importante estudiar el tamaño de las partículas ya que para disminuir la dispersión de los datos se requiere que la fase se encuentre lo más homogénea posible. Por tanto, tamizar el material particulado es de suma importancia.

Se estudió el pH de las fases mediante la determinación del PZC y la determinación del IEP. Para estudiar ambos parámetros se evaluó en 9 unidades de pH (2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 12). En el caso del PZC se dejó agitando durante 48 h y se graficó el pH inicial vs el pH final. El PZC

corresponde al punto de la curva donde corta la diagonal. Por otra parte, el IEP mantuvo una agitación de 2 h donde se graficó el potencial zeta en función del pH, el valor del IEP corresponde al pH en el cual el potencial zeta es cero. Las Figuras 29 y 30 nos indican los valores correspondientes del PZC y IEP.

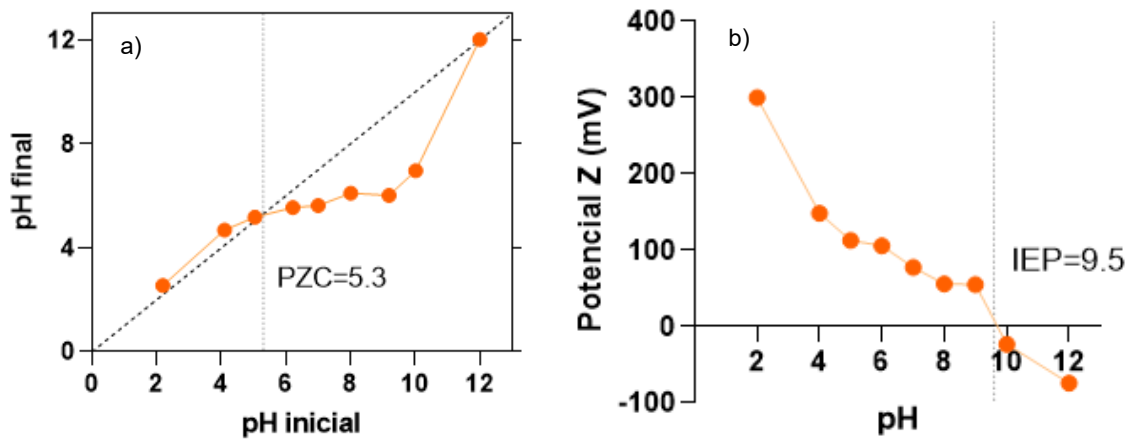


Figura 29. a) Punto de carga cero (PZC) y b) Punto isoeléctrico (IEP) del corcho natural.

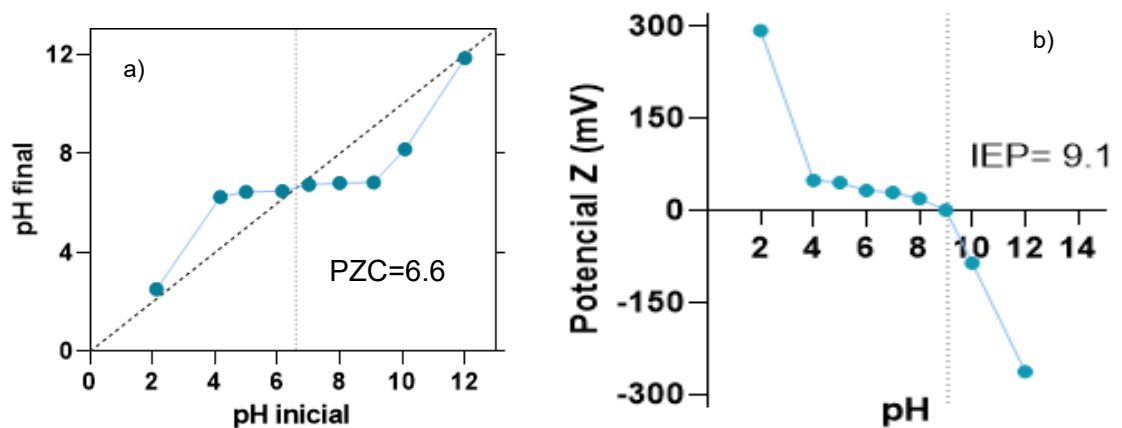


Figura 30. a) Punto de carga cero (PZC) y b) Punto isoeléctrico (IEP) de la semilla de palta natural.

Los valores del PZC para el corcho y la semilla de palta son 5,3 y 6,6 respectivamente. Se observaron valores constantes de pH en el rango de 4 a 10. La variable PZC nos indica el pH en el que las cargas superficiales e internas se anulan, es decir, existe la misma cantidad de sitios positivos y negativos. Esto nos señala que a valores menores que el pH 6,6 o 5,3 el material se encontrará protonado favoreciendo las cargas positivas, a pH igual a 6,6 o 5,3 el

material tendrá la misma cantidad de cargas positivas y negativas y a pH superiores que 6,6 o 5,3 se encontrará desprotonado favoreciendo las cargas negativas. No obstante, de lo que se pudo notar en los espectros infrarrojos de los materiales naturales, ambos, no contienen grupos aminos en su estructura, sino que solo grupos OH lo que sugiere que tanto a pH ácidos y pH neutros (pH = 5,3 o 6,6) la fase se encontrará en su forma neutra. Dado que los analitos que se están determinado son especies ácidas, para que puedan interaccionar con las fases, se debería utilizar pH (del medio acuoso) inferiores al PZC de la fase sorbente para que no intervengan cargas en el proceso de extracción.

Los valores del IEP que se obtuvieron para el corcho y la semilla de palta son 9,5 y 9,1 respectivamente. Como se puede notar en ambas gráficas a medida que aumentaba el pH el potencial zeta iba disminuyendo. El IEP indica la carga superficial del material, los valores 9,5 y 9,1 señalan el valor de pH en el que el potencial zeta de la fase es cero. Es decir, a valores mayores que el IEP el potencial zeta será negativo y a valores menores que el IEP el potencial zeta será positivo.

Se llevó a cabo el análisis termogravimétrico para el corcho y la semilla de palta. Este análisis permite investigar el comportamiento térmico de los materiales y sus componentes. En ambos casos se midieron el % de pérdida de masa utilizando las fases molidas y tamizadas (200-400 mesh).

Comenzando con el corcho, se utilizó 5,09 mg de material y se evaluó en un rango de temperatura de 25 a 1000°C a una velocidad de 10 °C/min. La Figura 31 muestra las curvas de descomposición térmica.

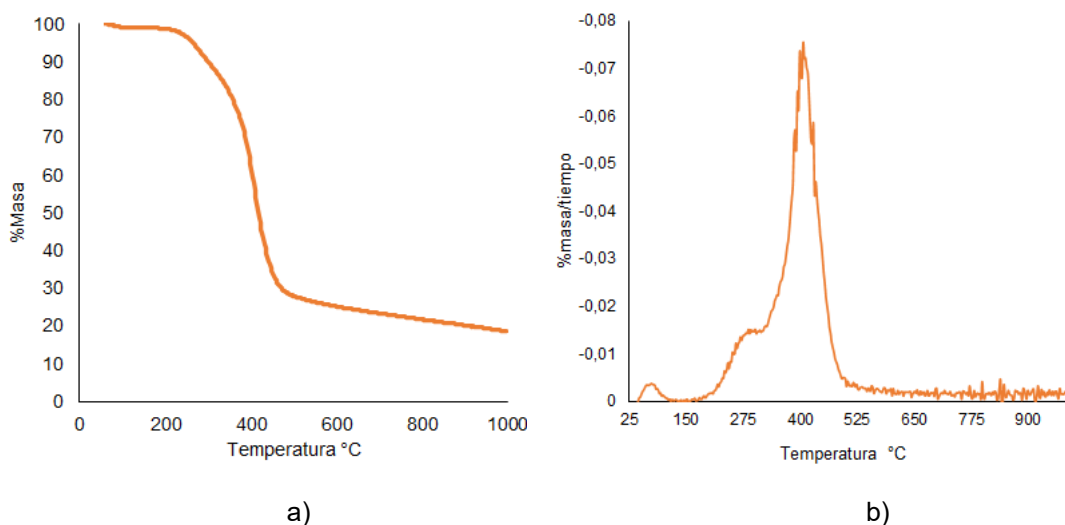


Figura 31. Análisis TGA y DTG (a y b) para la fase corcho laminar.

El primer gráfico (a) muestra el TGA, donde se observa la variación de la pérdida de masa en función de la temperatura. En el segundo gráfico (b) se puede ver el DTG que mide la derivada de la masa con respecto al tiempo en función de la temperatura, a través de sus puntos de inflexión se logra visualizar de mejor manera los rangos de temperatura de la degradación de los componentes del corcho. Como se observa, la descomposición se puede dividir en tres partes la primera desde los 43°C hasta aproximadamente los 125°C, la segunda desde los 180°C hasta alrededor de los 325°C y la última desde los 325°C hasta los 498°C. La primera degradación se asocia a pérdida de ceras y agua (evaporación de la humedad y deshidratación). La segunda y tercera etapa son más complicadas debido a que se encuentran acopladas y se relaciona con varios procesos, como descomposición de lignina y suberina. Según lo mencionado en literatura,^{45a} la suberina comienza a descomponerse parcialmente desde los 200°C, los polisacáridos (alrededor de un 90%) comienzan a degradarse desde los 250°C y desaparecen completamente a mayores temperaturas, la lignina entre los 250 y 300°C comienza a descomponerse. Con esta información, la segunda etapa se asocia a descomposición de polisacáridos que se acopla con el comienzo de la degradación de suberina y lignina. La tercera etapa es más predominante ya que tanto la suberina como la lignina se

degradan en mayor cantidad. No obstante, estos datos permiten confirmar la presencia de estos biopolímeros en el corcho.

El estudio termogravimétrico para la semilla de palta se realizó con 8,76 mg de material particulado, se evaluó en el mismo rango de temperatura que el corcho (25 a 1000°C) a una velocidad de 10 °C/min. La Figura 32 muestra las curvas de degradación térmica.

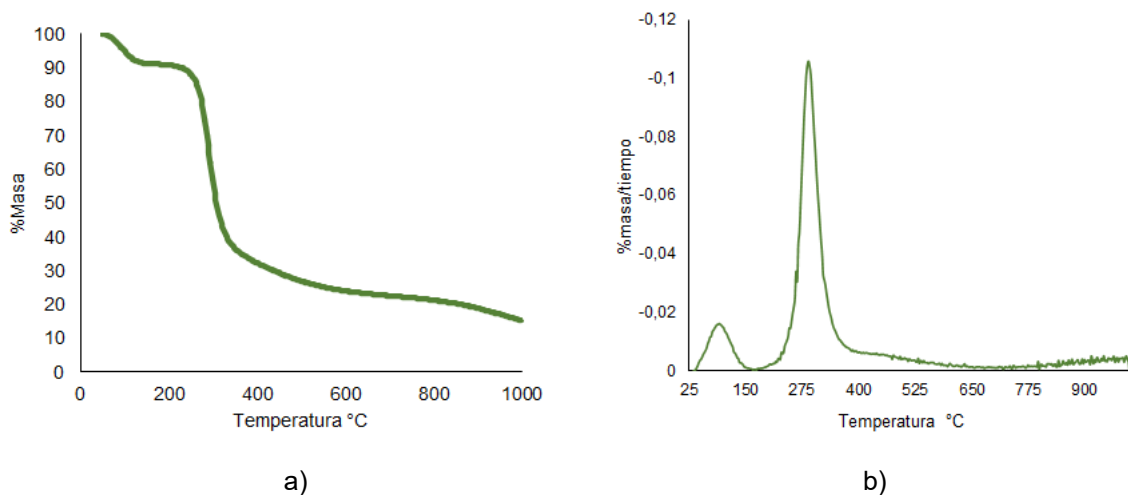


Figura 32. Análisis TGA y DTG (a y b) para la fase semilla de palta.

Para la semilla de palta la descomposición se puede dividir en dos etapas, la primera desde los 25°C hasta alrededor de los 160°C y la segunda desde los 220 hasta los 400°C. La primera etapa se asocia a pérdida de humedad y la segunda, la pérdida de peso se hace más predominante, el cual se relaciona a una mezcla de componentes. La semilla de palta se compone de celulosa, hemicelulosa y lignina. Estudios informan que la hemicelulosa es menos estable y comienza a desgradarse aproximadamente entre 220-315°C y la celulosa al ser más polimerizada tiene una degradación desde los 315°C.⁷⁹ En consecuencia, la etapa predominante se asocia a % de pérdida de peso de hemicelulosa, celulosa y lignina. Finalmente, se pueden confirmar la presencia de estos polímeros naturales en la semilla de palta.

Debido a que posteriormente se desea trabajar con las fases naturales en su forma de carbón activado, el TGA nos sirve para predecir la temperatura mínima de descomposición de los materiales y nos guía para saber si los materiales se encuentran completamente carbonizados. De lo mencionado anteriormente, podemos notar que tanto la suberina como los polisacáridos se carbonizarán por completo a temperaturas $\geq 400^{\circ}\text{C}$. En el caso de la lignina un gran porcentaje se habrá pirolizado a los 400°C y a temperatura más altas ($> 500^{\circ}\text{C}$) del todo.

5.2.3. Optimización de variables involucradas en RDSE utilizando fases naturales

Una de las etapas más predominante en la metodología de preparación de muestra es el proceso de extracción de los analitos mediante la técnica de RDSE. Para lograr la mejor eficiencia de extracción del ibuprofeno y sus metabolitos utilizando los bio-sorbentes, se estudió la cantidad de fase (en el caso de la semilla de palta) y las variables químicas e hidrodinámicas, en el que se probaron distintos pH, concentraciones de sal (%m/v), tiempos de extracción, velocidad de agitación y volúmenes de muestra.

5.2.3.1. Cantidad de fase (semilla de palta en polvo)

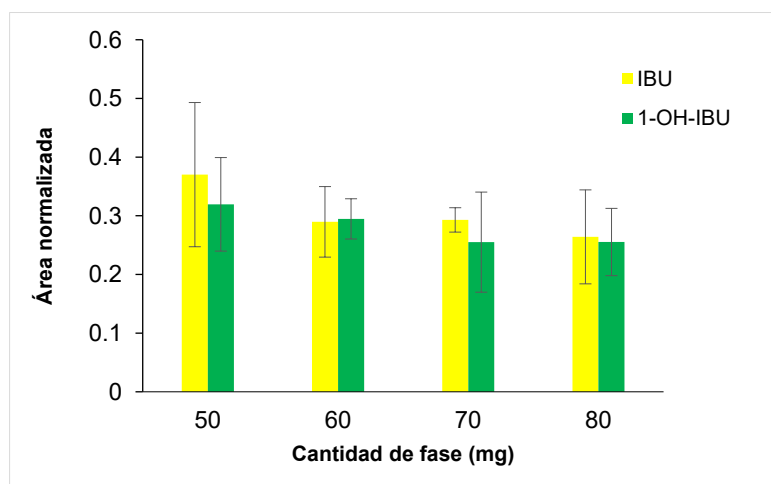


Figura 33. Respuesta analítica en función de la cantidad de fase sorbente (semilla de palta). Se estudió con 20 mL de muestra, pH 2, 2000 rpm por 60 min.

Se estudió la cantidad de fase de la semilla de palta en polvo, se evaluaron 50, 60, 70 y 80 mg de material. La máxima capacidad de sorbente que permite el disco con cavidad son 80 mg por lo que es de esperar que tenga mejor respuesta analítica (mayor extracción) al haber mayor cantidad de fase. Sin embargo, en este caso en particular sucedió todo lo contrario, ya que se obtuvo mayor respuesta con 50 mg (Figura 33). Por ello, se hizo un análisis estadístico de una vía (ANOVA) que permitió determinar si existe diferencia significativa entre las medias obtenidas en el proceso de extracción en base a las diferentes cantidades de fase. El análisis ANOVA mostró que no hay diferencia significativa entre las distintas cantidades de fase para ambos compuestos ($p > 0,05$) por lo que no debería ser significativo en el proceso de extracción la cantidad de sorbente que se utilice de acuerdo al rango estudiado (Tabla 15).

Tabla 15. ANOVA de una vía de cantidad de fase para ibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno.

Analito	<i>F-Ratio</i>	<i>P_{value}</i>
IBU	0,86	0,5099
1-OH-IBU	0,51	0,6880

Se presume que con 80 mg de material se obtuvo una menor respuesta de extracción debido a que la fase al estar en contacto con la muestra acuosa se hincha, generando una fase altamente compactada.

Se consideró como óptimo 60 mg de semilla en polvo, ya que permite el uso de una menor cantidad de fase y con menos dispersión en los datos obtenidos durante el proceso de extracción.

5.2.3.2. Estudio de variables químicas

pH

El estudio de pH en la extracción de compuestos ácidos como el ibuprofeno y sus metabolitos es fundamental, ya que son moléculas que se ionizan a medida que va cambiando el pH del

medio, ya sea valores sobre o bajo su pKa, influyendo directamente en la sorción de la fase sorbente.

Se analizaron cuatro pH distintos (2; 4,5; 6,5 y 9) en ambas fases. Para estudiar el pH se utilizó agua desionizada y se enriqueció con los analitos a una concentración de 30 µg/L. Se analizó la respuesta analítica en función de los distintos pH. En las Figuras 34 y 35 se muestran los resultados para ambos bio-sorbentes.

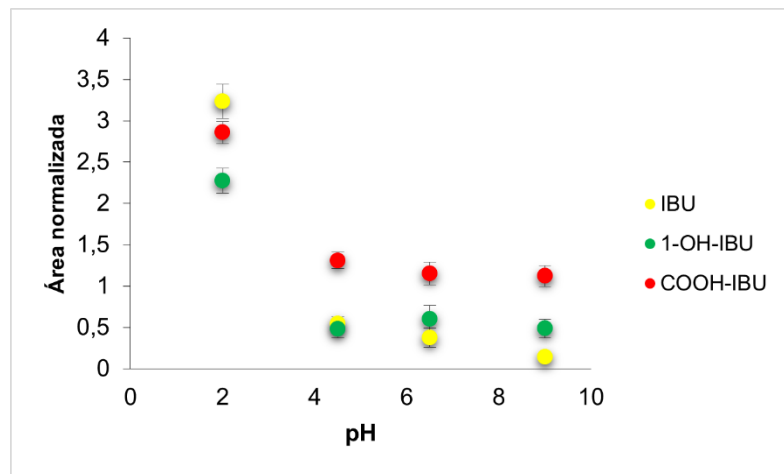


Figura 34. Respuesta analítica en función del pH para corcho laminar. Se estudió con 20 mL de muestra, en un tiempo de 60 min a una velocidad de 2000rpm.

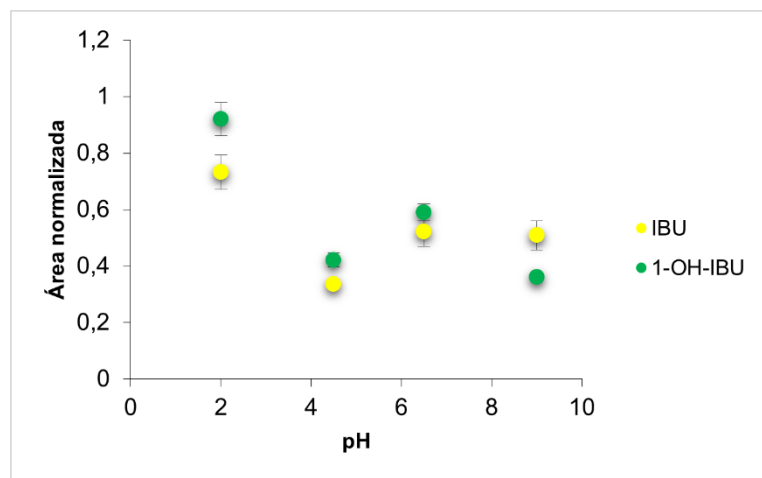


Figura 35. Respuesta analítica en función del pH para polvo de semilla de palta. Se estudió con 20 mL de muestra, en un tiempo de 90 min a una velocidad de 2000 rpm.

Al alterar el pH del medio no solo se ven afectados los analitos, pues la fase sorbente también se ve implicada. Se estableció que el pH óptimo del medio acuoso para la extracción de los compuestos en ambas fases sorbentes es 2, lo que da cuenta de la naturaleza ácida de estas moléculas, en este caso ácidos débiles (pK_a 3,97-5,3). A pH 2 tanto el IBU como sus metabolitos se encuentran protonados, o más bien en su forma neutra, favoreciendo no solo las fuerzas de Van der Waals y apilamientos π - π entre los analitos y la fase sorbente, sino también la interacción mediante puentes de hidrógeno. Por el contrario, a pH mayores que el pK_a , medio más básico, los analitos se encuentran ionizados (con una carga negativa) provocando que se anulen las interacciones de puentes de hidrógeno entre analito-sorbente, principal fuerza intermolecular de los compuestos.

Se realizó la medición del pH de la matriz (muestra acuosa) para una de las fases, posterior al experimento realizado, a fin de verificar si variaba el pH de la muestra durante el proceso de extracción (Tabla 16). Los valores cambiaron relativamente poco manteniéndose en el rango estudiado.

Tabla 16. Valores de pH de la muestra acuosa antes y después de la extracción.

pH _i durante la extracción	pH _f posterior a la extracción
2	1,95
4,5	4,75
6,5	6,76
9	8,85

Efecto salino (Salting-out)

Con el fin de optimizar la extracción de los analitos se estudió el efecto salting-out. Se evaluaron distintas concentraciones de NaCl (0, 10, 20 y 30% m/v) en 20 mL de muestra.

Al adicionar sal a la muestra aumenta la fuerza iónica, pues la presencia de sal en el sistema acuoso genera que disminuya la solubilidad del compuesto orgánico, en este caso del

ibuprofeno y sus metabolitos, debido a que dejan de ser solvatados por las moléculas de agua. En consecuencia, al saturar con sal el sistema, el coeficiente de distribución aumenta facilitando la transferencia del compuesto orgánico desde la fase acuosa a la fase extractante.

Las Figuras 36 y 37 muestran las respuestas de los analitos.

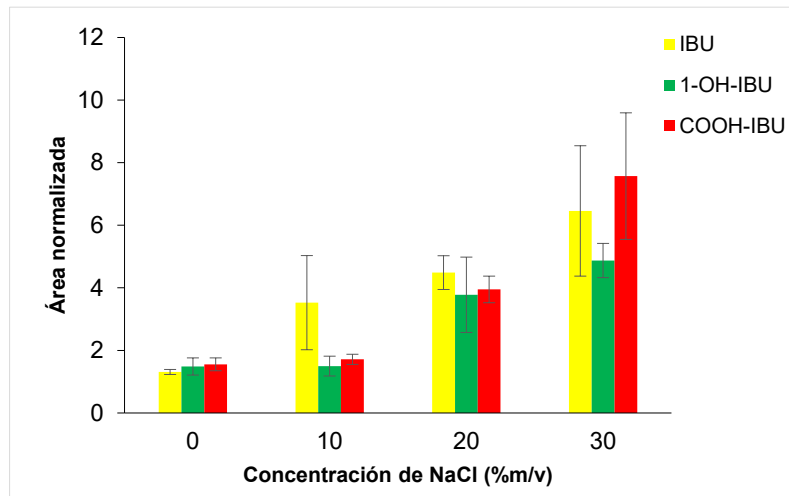


Figura 36. Respuesta cromatográfica en función del efecto salting-out para el corcho laminar. Se estudió con 20 mL de muestra, pH 2, 2000 rpm por 60 min.

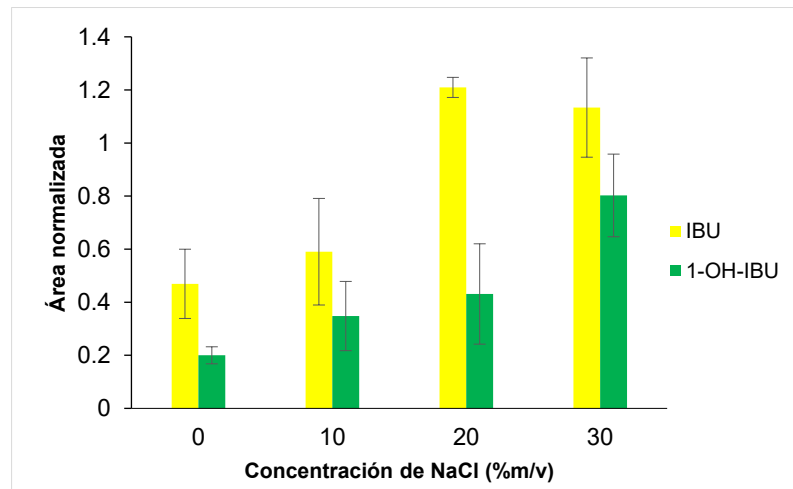


Figura 37. Respuesta cromatográfica en función del efecto salting-out para semilla de palta. Se estudió con 20 mL de muestra, pH2, 2000 rpm por 90 min.

Como se observa en ambos casos, ya sea usando corcho o semilla de palta como sorbente, se requiere de una gran cantidad de sal (20 o 30% m/v de NaCl lo que equivale a 4 o 6 g/20mL de

agua) para tener una mayor extracción. Sin embargo, se estableció como óptimo 20% m/v de NaCl para evitar una mayor dispersión en los datos. La alta dispersión de los datos a mayores concentraciones de sal se atribuye a que durante el proceso de extracción la sal es arrastrada, hacia la cavidad del disco, lo que puede interferir en los pasos finales de derivatización e inyección en el equipo, dando lugar a mayores errores experimentales.

5.2.3.3. Estudio de variables hidrodinámicas

Volumen de muestra, tiempo de extracción y velocidad de agitación

Estudios previos donde se ha aplicado la técnica RDSE han demostrado que las variables más importantes que influyen en el proceso de extracción son el tiempo de extracción, la velocidad de agitación y el volumen de muestra.³² Sin embargo, la velocidad de agitación es uno de los factores más importantes para tener una sorción eficiente, debido a que la transferencia de masa de los analitos está limitada por su difusión entre la fase sorbente y la capa estancada de agua del solvente que se forma sobre el disco, por lo tanto, si la velocidad de agitación es alta la capa estancada disminuye y facilita la transferencia de masa desde la muestra a la fase extractiva promoviendo así una cantidad mayor de analito extraído. No obstante, es importante evaluar los tres factores de manera simultánea ya que la velocidad de agitación, el volumen de muestra y el tiempo de extracción se encuentran relacionados entre sí. Para que exista un menor tiempo de extracción debe existir un mecanismo de ayuda que permita aumentar la velocidad de agitación ya que si el proceso de extracción se realiza en ausencia de este, solo dependerá de la difusión del analito en la muestra el cuál tomará mucho más tiempo en que llegue a la fase y sea adsorbido, generando tiempos largos y procesos poco eficientes, del mismo modo con el volumen de muestra. Si bien, al aumentar el volumen habrá mayor cantidad de analito en la muestra, se necesitará una velocidad de agitación mayor para que pueda alcanzar el tiempo de equilibrio más rápido.

Con el fin de obtener las condiciones óptimas para el método, utilizando corcho laminar implementado en el disco con camisa, se diseñó un estudio multivariado para evaluar las variables volumen de muestra, tiempo de extracción y velocidad de agitación a través de un modelo de superficie de respuesta basado en el diseño Doehlert.

El diseño Doehlert permite la distribución uniforme de los puntos en el espacio, cuya uniformidad de la distribución forman una figura romboidal en la que se le asignan distintos niveles a cada factor según el peso o relevancia que tenga. El número de experimentos se rige por la expresión $N = k^2 + k + 1$, donde N es el número de experimentos, k las variables y más un centro.⁸⁰⁻⁸¹ En este caso $k = 3$ lo que lleva a un total de 13 experimentos (incluido un centro). Basado en la literatura, se consideró que la velocidad de extracción es la variable más significativa por lo que se le asignaron 7 niveles de trabajo (X2), al tiempo de extracción se le asignaron 5 niveles de estudio (X1) y al volumen de muestra 3 niveles (X3). Para las tres variables (tiempo, velocidad y volumen de muestra) se llevó a cabo un total de 15 experimentos, incluyendo 3 centros. Se tomó como variable de respuesta las áreas cromatográficas normalizadas de los analitos. En la Tabla 7 (ver en metodología) se muestra la matriz de experimentos.

Para evaluar la calidad del modelo se hizo un análisis de la varianza (ANOVA) de la regresión mediante una comparación de errores. El ANOVA de la regresión compara las variabilidades asociadas a la regresión del modelo con la del residuo, se establece que para que el modelo sea viable primero se debe hacer una comparación entre la SCM (suma de cuadrados medios) del modelo y la SCM de los residuos, que a través de un test de Fisher se logra determinar la significancia, donde $p\text{-value} < 0,05$. Luego se realiza un segundo test de significancia, en el que se compara la SCM del error puro con la SCM de la carencia de ajuste, cuyo $p\text{-value} > 0,05$.

La Tabla 17 muestra la predicción para cada analito de los modelos de regresión (p-value de regresión vs error residual), carencia de ajuste (p-value de carencia de ajuste vs error puro) y el coeficiente de determinación (R^2). Se obtuvieron respuestas solo para tres compuestos (IBU, 1-

OH-IBU y COOH-IBU) ya que el analito 2-OH-IBU mostró una respuesta demasiado baja no pudiéndose distinguir del ruido.

Tabla 17. Análisis ANOVA de la regresión del diseño Doehlert (k=3) utilizando corcho laminar.

Analito	p-value REG/RE*	p-value LOF/EP*	R ² (%)
IBU	0,04	0,34	85,66
1-OH-IBU	0,04	0,06	86,34
COOH-IBU	0,04	0,05	75,29

* REG: varianza de la regresión (modelo), RE: residuo (varianza error total), LOF: carencia de ajuste (lack of fit), EP: error puro.

Como se observa en la Tabla 17, para el primer test (SMC_{modelo} vs SCM_{residuos}) se obtuvo un p-value < 0,05 para las tres respuestas, lo que se traduce en que la diferencia entre la regresión y el residuo es significativa, vale decir, la varianza del modelo es más grande comparada con la del residuo. En cuanto al segundo análisis, solo dos respuestas obtuvieron un p-value > 0,05 (IBU y 1-OH-IBU), donde se observó que no hay diferencia estadísticamente significativa entre la carencia de ajuste y el error puro demostrando que la carencia de ajuste es despreciable. Por tanto, el modelo es adecuado para describir los datos. Para el caso del COOH-IBU dio un valor de p-value = 0,05 aun así, se consideró en el análisis multivariado. Se obtuvieron valores de R² > 75% para los analitos, el coeficiente de determinación se encuentra dado por la SCM del modelo respecto a la SCM total, indicando entonces que prácticamente el 75% de la variabilidad está siendo explicada por el modelo.

A continuación, en la Figura 38 se muestran los gráficos de Pareto obtenidos a partir del ANOVA de la regresión.

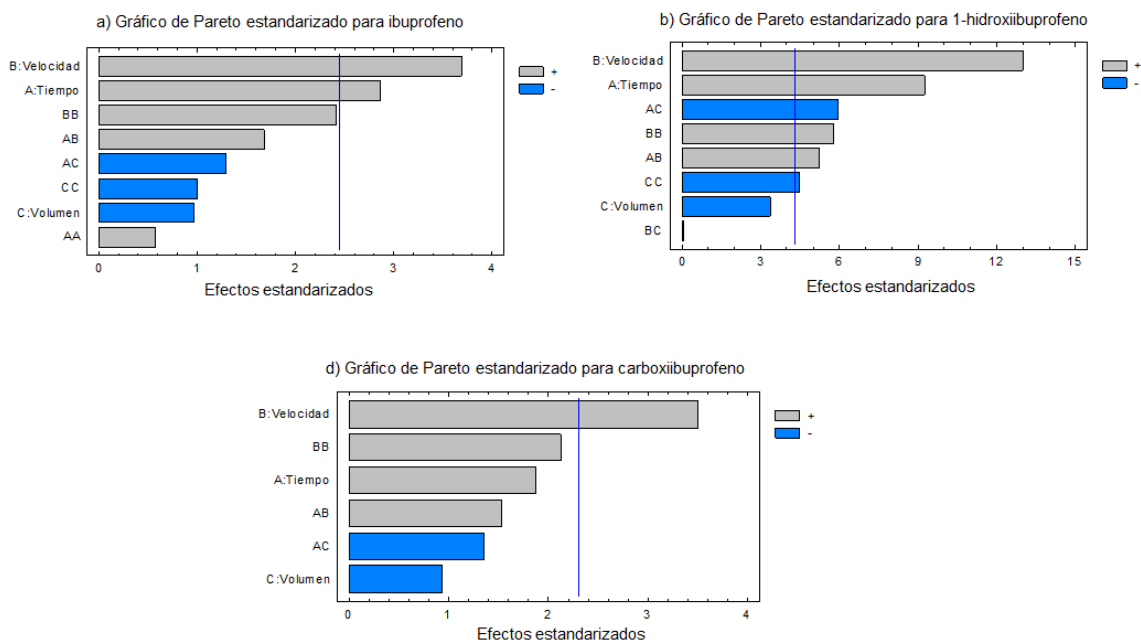


Figura 38. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido de la optimización de las variables hidrodinámicas usando corcho laminar como fase sorbente.

Se observa que para los tres analitos (IBU, 1-OH-IBU, COOH-IBU) la velocidad de agitación es significativa en la respuesta cromatográfica, afectando positivamente. El tiempo de extracción fue significativo para el IBU y 1-OH-IBU, en el que también afecta de forma positiva. Sin embargo, el volumen de muestra no mostró tener significancia en las respuestas de los compuestos.

Por otro lado, con el fin de encontrar la zona de compromiso y el punto óptimo de las tres variables para los compuestos objetivos se analizó la optimización multirespuesta mediante la función de deseabilidad (D), dándoles el mismo impacto a cada una de las variables. La Figura 39 muestra la superficie de contorno de deseabilidad para los analitos de estudio. La deseabilidad general fue 0,84798. Los valores óptimos para lograr una mayor respuesta cromatográfica se obtienen con un tiempo de 90 min, 20 mL para el volumen de muestra y una velocidad de 2000 rpm. Este último consiste con el hecho nombrado anteriormente, a una mayor velocidad de agitación aumenta el flujo y el equilibrio de partición entre la fase sorbente-analito se alcanza más rápido.

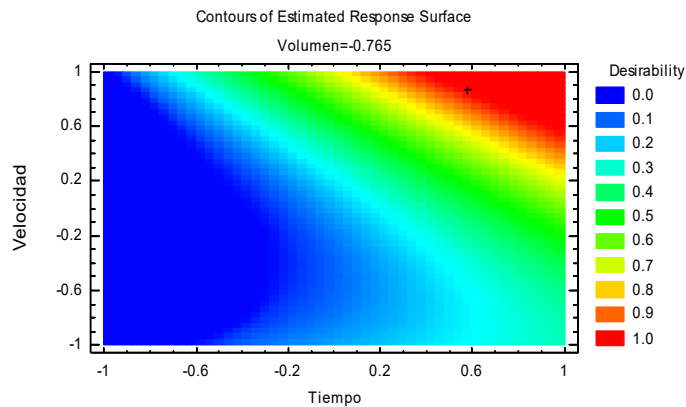


Figura 39. Superficie de contorno de deseabilidad para el estudio de variables hidrodinámicas utilizando corcho como fase sorbente.

Para la semilla de palta se llevó a cabo un análisis de multirespuesta, pero los analitos no se adecuaron al modelo, por ello se hizo un análisis univariado para optimizar el volumen de muestra y el tiempo de extracción. Como ya se ha demostrado que la etapa limitante se encuentra dada por la velocidad de agitación, se mantuvo constante a un valor de 2000 rpm (máximo valor que permite el agitador magnético).

Se estudiaron cuatro volúmenes de muestra distintos para la semilla de palta (20, 30, 40 y 50 mL). Se utilizó agua desionizada, el cual se enriqueció a una concentración de 30 $\mu\text{g/L}$ y la extracción se realizó en un tiempo de 60 min.

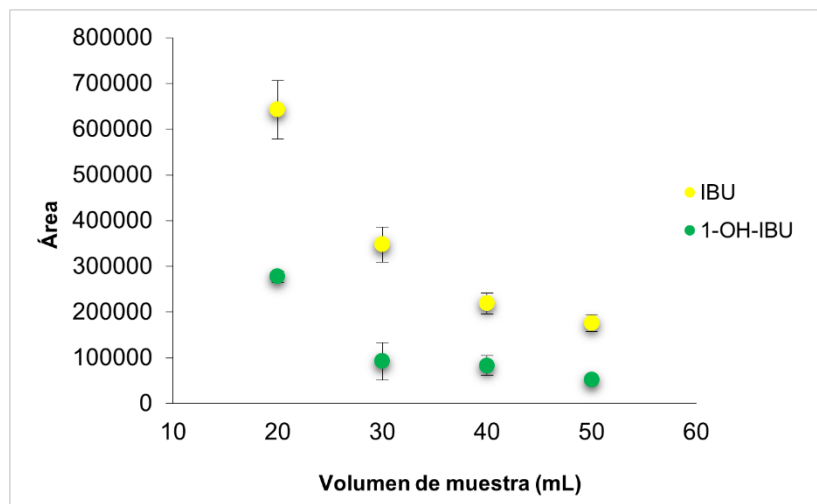


Figura 40. Respuesta cromatográfica en función del volumen de muestra para semilla de palta. Se estudió a una velocidad de 2000rpm y en un tiempo de 60 min.

Para los 60 min establecidos el equilibrio de extracción se vio favorecido con 20 mL de muestra. En la Figura 40 se observa que con 20 mL de muestra se alcanza una mayor extracción (mayor respuesta analítica).

Una vez optimizado el volumen se estudió el tiempo de extracción a distintos valores (5, 30, 60, 90 y 120 min) utilizando 20 mL de muestra dopada a una concentración de 30 µg/L y una velocidad de agitación de 2000 rpm. En primera instancia, siempre se buscan tiempos cortos para tener un análisis rápido, pero la técnica de RDSE se basa en el equilibrio, es decir, llegará un punto en el proceso en el que los compuestos no serán más extraídos por la fase sorbente. Por tanto, al incrementar el tiempo de extracción se procura que todos los compuestos que están siendo extraídos desde la fase acuosa hayan llegado a la fase sorbente y a su vez alcanzado tal equilibrio.

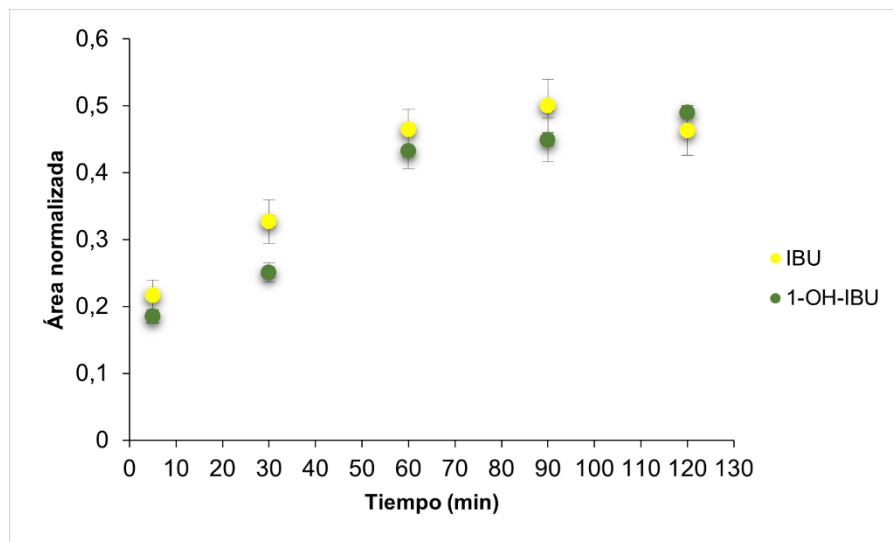


Figura 41. Perfil de tiempo de extracción de semilla de palta. Se utilizó 20 mL de muestra y una velocidad de 2000 rpm.

La Figura 41 muestra el perfil de tiempo de extracción de la fase semilla de palta. Se puede notar que se alcanza el equilibrio alrededor de los 60 min utilizando 20 mL de muestra tanto para el IBU como para el 1-OH-IBU.

La Tabla 18 recopila las variables optimizadas del proceso de extracción usando los bio-sorbentes corcho laminar y semilla de palta en polvo.

Tabla 18. Variables de estudios y condiciones optimizadas.

Variables	Condiciones optimizadas	
	Corcho Laminar	Semilla de palta en polvo
Fase sorbente	Camisa	Cavidad
Disco		
Cantidad de fase (mg)	47	60
pH		2
% m/v NaCl		20
Volumen de muestra (mL)		20
Tiempo de extracción (min)	90	60
Velocidad de agitación (rpm)		2000
Derivatización: Tiempo, solvente y temperatura	5 min, AcOEt:MSTFA (1:1) y T° amb.	

5.3. Validación del método analítico para fases naturales

5.3.1. Cifras de mérito

La determinación de las cifras de mérito se explicará por separado para cada fase natural.

Corcho laminar

Se determinaron las cifras de mérito para validar el método propuesto con el corcho laminar utilizado como fase sorbente en RDSE. Solo se detectaron IBU y 1-OH-IBU. En la Figura 42 se pueden ver las curvas de calibración en matriz para ambos compuestos.

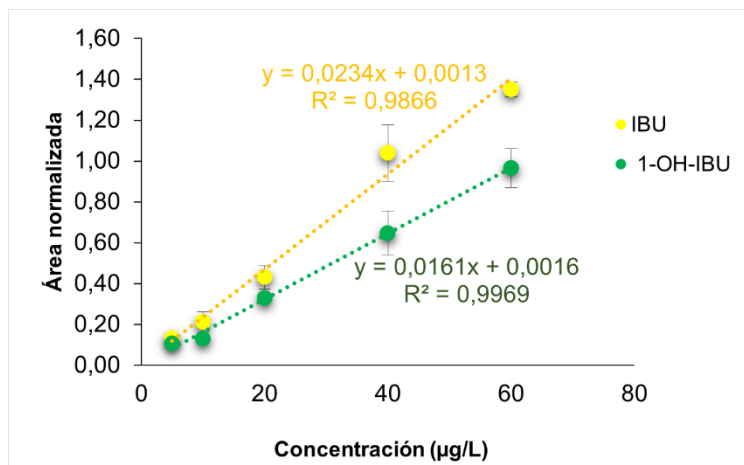


Figura 42. Curvas de adición estándar en matriz (5-60 µg/L) para ibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno (en duplicado) utilizando corcho laminar.

Se estudió en un rango lineal de concentración usando cinco niveles diferentes, se obtuvieron coeficientes $R^2 > 0,98$ en ambos casos, lo que indica un buen ajuste lineal. Se detectaron LD y LQ bajos en el orden de los ng/L tanto para el IBU como para el 1-OH-IBU que fueron determinados utilizando agua potable sin dopar ($n = 6$). En cuanto a la exactitud y la precisión, se estudiaron a través de los parámetros de la recuperación (%Re) y la desviación estándar relativa (%RSD). Se determinaron valores de recuperación relativo al estándar subrogante de ibuprofeno-D₃ que se situaron entre 118 y 39 %. Los valores menores al 100% para el 1-OH-IBU se justifican por el hecho de que es un compuesto más polar que el IBU y, además, tiene un comportamiento distinto al compuesto marcado con deuterio. Finalmente, para el IBU se obtuvo $RSD \leq 6\%$ y para el 1-OH-IBU $RSD \leq 13\%$. La Tabla 19 resume los valores obtenidos.

Tabla 19. Cifras de mérito para el corcho laminar.

Analito	Sensibilidad (L/µg)	Linealidad (R^2)	LD ^a (ng/L)	LQ ^a (ng/L)	Re relativa ^b (%)	RSD (%) ^b (n = 6)
IBU	0,0234	0,9866	11,66	25,76	118	6
1-OH-IBU	0,0161	0,9969	8,96	25,28	39	13

^a agua potable, ^b agua de río, * se aplicó un factor de concentración (FC) de 153.

Semilla de palta

Al igual que para el corcho, con la semilla de palta también se detectaron solo los analitos IBU y 1-OH-IBU. Las cifras de méritos fueron determinadas utilizando muestras reales de agua de río y el método propuesto para esta fase. En la Figura 43 se observan las curvas de adición estándar de los analitos.

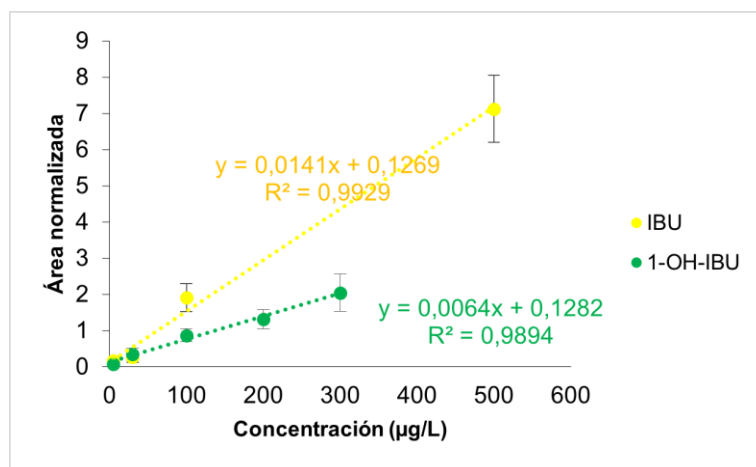


Figura 43. Curva de adición estándar en matriz usando semilla de palta. Se estudió desde 5-500 µg/L para ibuprofeno y desde 5-300 µg/L para 1-hidroxiibuprofeno, en duplicado.

Se evaluaron en intervalos de concentraciones relativamente alto dado las bajas eficiencias de extracción de la semilla. Se obtuvieron $R^2 > 0,98$ en ambos compuestos indicando un adecuado ajuste lineal. Los límites de detección y de cuantificación encontrados están en niveles de concentración de ng/L. La exactitud del método se determinó en base al % de recuperación, obteniéndose 105 y 31% para el IBU y 1-OH-IBU, sin embargo, estos valores se encuentran relativo al estándar subrogante (ibuprofeno-D₃). Finalmente, para la precisión se obtuvieron $RSD \leq 25$ %. La Tabla 20 recopila las cifras de mérito calculadas.

Tabla 20. Cifras de mérito para la fase semilla de palta.

Analito	Sensibilidad (L/µg)	Linealidad (R ²)	LD ^{a*} (ng/L)	LQ ^{a*} (ng/L)	Re relativa ^b (%)	RSD (%) ^b (n = 6)
IBU	0,0141	0,9929	1,40	4,61	105	22
1-OH-IBU	0,0064	0,9894	2,34	7,71	31	25

^a agua potable, ^b agua de río, * se aplicó un FC de 153.

5.4. Comparación de fases naturales con fases comerciales

Se comparó la eficiencia de la fase corcho laminar con otras fases comerciales (C18, Oasis HLB y St-DVB) donde se aplicó el método propuesto para la extracción de los analitos mediante RDSE. El estudio se llevó a cabo utilizando el disco con camisa, en triplicado. Como se observa en Figura 44, para el IBU el corcho laminar tuvo eficiencias de extracción similares a las otras fases comerciales y mayor a la lámina de C18, sin embargo, para el compuesto 1-OH-IBU tuvo eficiencias menores comparadas con las otras fases sintéticas, aun así, mostró tener buenas respuestas cromatográficas. No obstante, el corcho laminar es un material renovable, económico y biodegradable que permitió detectar los analitos de manera similar a las fases comerciales.

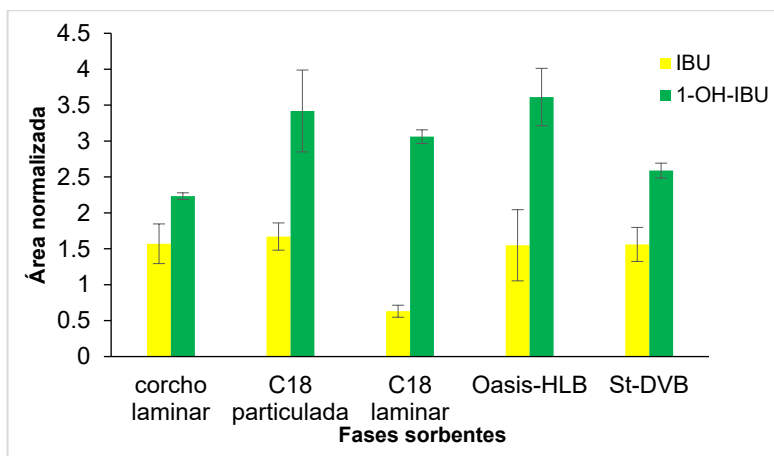


Figura 44. Comparación de fases comerciales con corcho laminar. Se llevó a cabo usando pH 2, NaCl al 20% m/v, 20 mL de muestra a una concentración de 30 μ L, 2000 rpm y 90 min.

De manera paralela, se comparó la eficiencia de la semilla de palta con las mismas fases comerciales mencionadas anteriormente (Oasis HLB, C18 y St-DVB), el cual se aplicó el método optimizado en triplicado. En la Figura 45 se observan los resultados. En este caso, se aprecia de forma clara que con Oasis HLB la respuesta analítica es mayor. La semilla de palta mostró un comportamiento de extracción similar a la fase C18 y mejor al St-DVB.

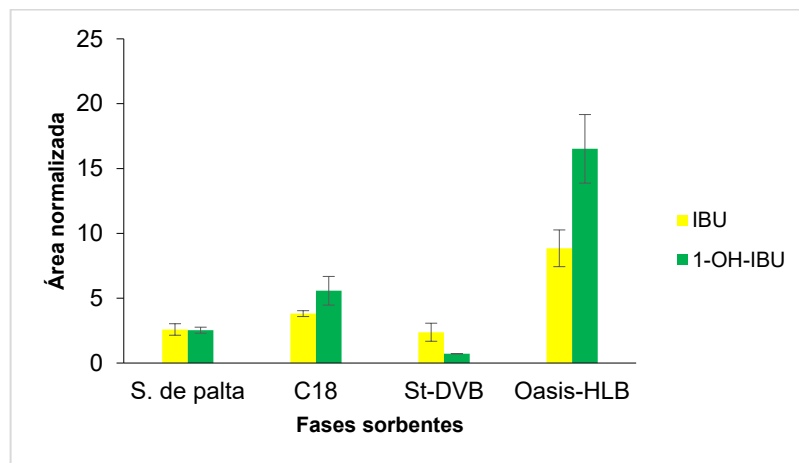


Figura 45. Comparación de fases comerciales con semilla de palta particulada. Se llevó a cabo usando pH 2, NaCl al 20% m/v, 20 mL de muestra a una concentración de 30 μ L, 2000 rpm y 60 min.

Por las bajas eficiencias de extracción y bajas respuestas cromatográficas que se obtuvieron con las fases naturales en los experimentos anteriores, solo se pudo validar los analitos IBU y 1-OH-IBU. Los analitos en estudio, al ser sustancias ácidas, su principal fuerza de interacción con la fase sorbente es a través de puentes de hidrógeno. El corcho se encuentra compuesto principalmente por suberina y lignina, polímeros naturales que se caracterizan por ser mayoritariamente hidrofóbicos, si bien estas sustancias tienen grupos polares como grupos hidroxilos y carbonilos en su estructura que lo hacen tener este balance hidrofílico-hidrofóbico, se presume por la baja respuesta de los analitos, que la principal fuerza de interacción de estos polímeros son fuerzas hidrofóbicas como fuerzas de Van der Waals e interacciones del tipo π - π , lo que ya se ha demostrado en trabajos anteriores en extracciones de PAHs, parabenos, hormonas y BTEX.⁴⁵ Por lo que se concluye que el corcho laminar es una fase más apolar y los analitos de estudio sustancias en un rango de polaridad más alta, cuyas interacciones entre analito-agua son más fuertes que las interacciones entre sorbente-analito generando una extracción de baja eficiencia analítica. Por otro lado, la semilla de palta contiene menos cantidad de grupos funcionales, además, no posee poros en su estructura y su superficie es totalmente lisa generando que las principales interacciones se anulen. Dado que las fases naturales no han mostrado buenos rendimientos analíticos, el desafío siguiente está en encontrar una nueva estrategia de preparación de muestra, por ello, se propone realizar la

extracción con la fase de corcho y semilla de palta carbonizada-activada, y así aumentar la porosidad, aromaticidad y presencia de grupos funcionales que permitan mejorar el proceso de sorción de los analitos.

5.5. Carbones activados

5.5.1. Síntesis de carbones activados

Se evaluó la síntesis de los carbones activados para mejorar la sorción de las fases sorbentes naturales y aumentar la eficiencia de extracción del ibuprofeno y sus metabolitos. Se utilizaron las mismas condiciones de carbonización para los materiales precursores, donde se varió el activante, su concentración y la temperatura final de pirólisis (t_f). En ambos casos se utilizó 1 g de material de partida y 4 mL de solución de activante (1:4). La relación precursor:activante y las diferentes concentraciones de solución se determinaron a partir de lo informado anteriormente por Deng *et al.* 2009.⁸² La velocidad de calentamiento de los carbones activados fue de 10°C/min y el tiempo de permanencia de 30 min.

Para la síntesis de los respectivos carbones activados (CAs) se estudió lo siguiente:

- 1) Concentración del activante químico a una temperatura fija.
- 2) Comparación con otro activante.
- 3) Temperatura final de pirólisis.

En este contexto, se explicará cada síntesis por separado.

CA de semilla de palta:

Estudio de la concentración del activante químico

El activante químico se determinó en base a lo reportado por la literatura (Leite *et al.* 2018)⁵⁷ donde se utilizó la sal neutra de cloruro de zinc ($ZnCl_2$). Se ha informado que la sal de zinc

genera una especie de efecto plantilla, induciendo la formación de microporos, pero a medida que aumenta la concentración del activante el tamaño de poros incrementa.⁸³

Para determinar la concentración de la solución del activante químico en %m/v se fijó una temperatura, en este caso de 400°C, ya que no era una temperatura tan elevada evitando la formación de cenizas y de bajos rendimientos de síntesis. La concentración resultante se estudió en función de la mejor respuesta analítica y eficiencia de extracción.

El proceso de extracción se llevó a cabo en duplicado utilizando 20 mL de agua desionizada, dopada a una concentración de 30 µg/L y en un tiempo de 60 min. Se estudiaron tres concentraciones de ZnCl₂ (40, 30 y 20%) y se utilizó el disco con camisa para mantener un sistema cerrado y evitar la filtración de las partículas de carbón a la muestra, además, se añadió un proceso de centrifugado previo a la derivatización para evitar dañar la columna del GC-MS.

En la Figura 46 se aprecia las respuestas analíticas de los compuestos en función de las distintas concentraciones del activante químico utilizado para sintetizar carbón activado de semilla de palta.

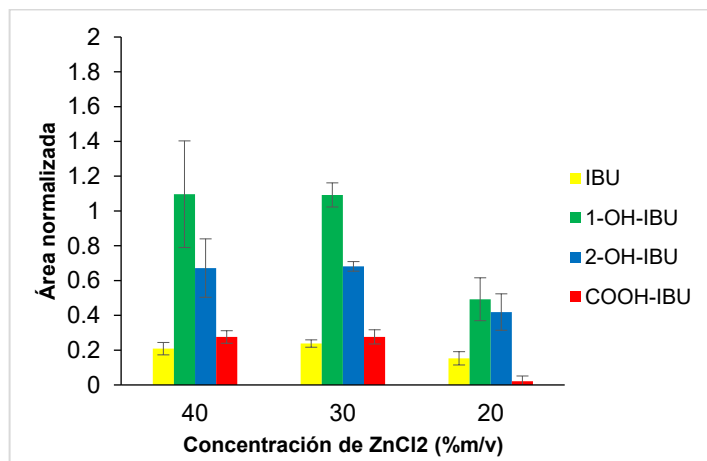


Figura 46. Respuesta analítica en función de la concentración de activante para el CA de semilla de palta a 400°C.

Como se observa, se tiene menores respuestas activando la semilla con una solución de ZnCl₂ al 20%. Por el contrario, a mayores concentraciones del activante la eficiencia aumenta

considerablemente. Tanto al 40% como al 30% de concentración se obtienen respuestas similares, donde no se encontró diferencia significativa ($p > 0,05$) entre los resultados para los analitos (Tabla 21). Por tanto, se definió como óptimo una concentración al 30% de $ZnCl_2$ porque permite una menor dispersión de los datos y un menor consumo de reactivo comparado con la solución al 40%.

Tabla 21. ANOVA de una vía entre las concentraciones (40 y 30% m/v) del activante $ZnCl_2$.

Analito	<i>F-Ratio</i>	<i>P_{value}</i>
IBU	0,46	0,5686
1-OH-IBU	0,01	0,9201
2-OH-IBU	0,00	0,9776
COOH-IBU	0,01	0,9410

Comparación con otro activante químico

De manera análoga, se probó la activación con otro agente químico (K_2CO_3). Donde se realizó el mismo experimento y en las mismas condiciones propuestas. Sin embargo, este fue descartado porque generaba altas desviaciones en los resultados y poca reproducibilidad (ver Figura 47).

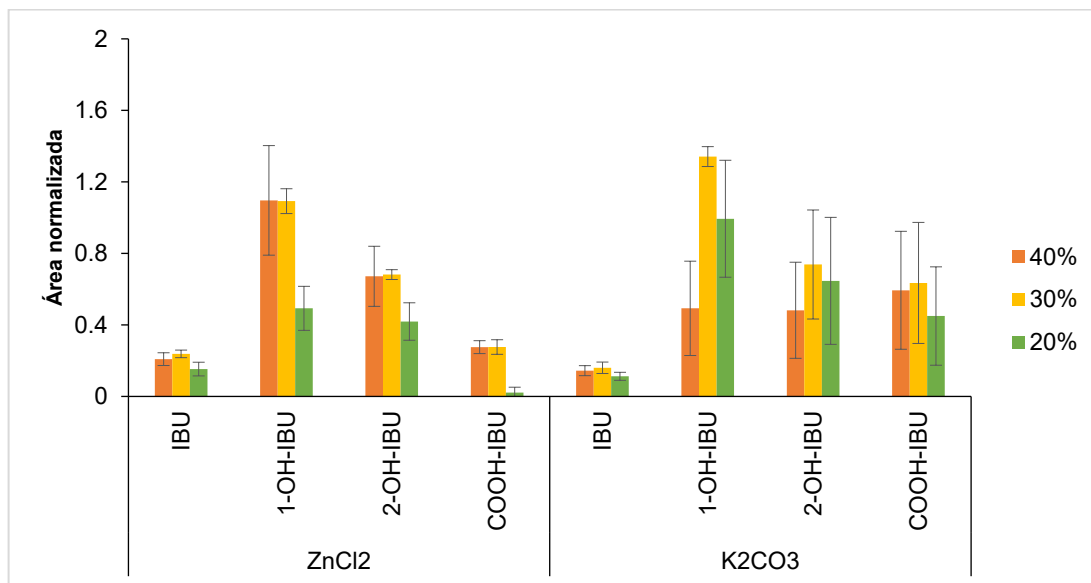


Figura 47. Respuesta analítica en función de la concentración de activante para el CA de semilla de palta a 400°C utilizando ZnCl₂ y K₂CO₃ al 40,30 y 20% m/v.

Cuando se utiliza el carbón de semilla de palta activado con K₂CO₃ como fase de extracción, se generan cromatogramas sucios con señales poco definidas el cual dificulta la integración, conduce a un aumento en la dispersión y a una poca reproducibilidad (Figura 48). En cambio, al emplear el CA de ZnCl₂ como fase de extracción se genera todo lo contrario, ya que produce cromatogramas limpios con señales de fácil distinción (Figura 49).

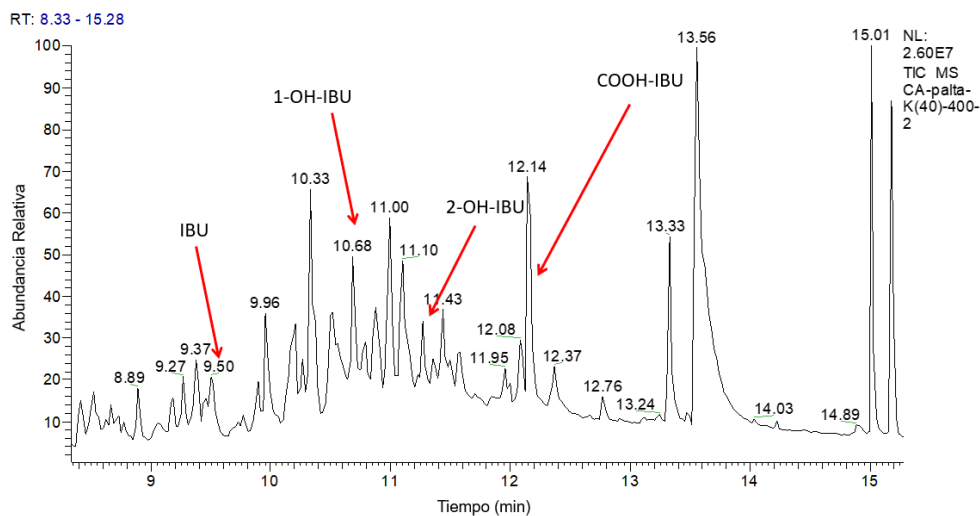


Figura 48. Cromatograma obtenido al usar carbón de semilla de palta activado con K₂CO₃ al 30% (a 400°C).

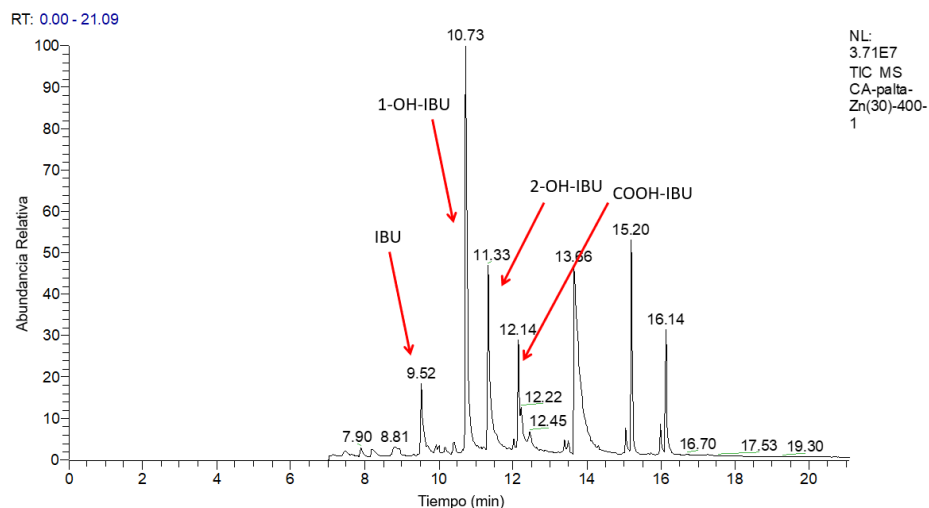


Figura 49. Cromatograma obtenido al usar carbón de semilla de palta activado con $ZnCl_2$ al 30% (a $400^\circ C$).

Se determinaron los rendimientos del proceso de síntesis de los carbones activados de semilla de palta a $400^\circ C$, empleando ambas soluciones ($ZnCl_2$ y K_2CO_3) a tres concentraciones diferentes. Estos fueron calculados a partir de las masas iniciales del material precursor (antes de la pirólisis) y las masas finales (materiales pirolizados secos, luego de lavar con ácido y agua). Como se observa en la Tabla 22, se obtienen mayores rendimientos sintéticos al activar el carbón con la sal $ZnCl_2$.

Tabla 22. Rendimientos de síntesis de CA de s. de palta utilizando $ZnCl_2$ y K_2CO_3 (40, 30, 20% m/v) a $400^\circ C$.

Concentración (% m/v)	% Rendimiento	
	$ZnCl_2$	K_2CO_3
40	50%	42%
30	47%	36%
20	30%	23%

Por otro lado, los menores rendimientos con el K_2CO_3 se asocian a que a pesar de tener una atmósfera inerte y los crisoles tapados (para tener un sistema más hermético), la reacción de la semilla de palta con K_2CO_3 fue tan violenta que durante el proceso de calentamiento generaba

una pequeña explosión (se especula una liberación intensa de algún gas o gases) “inflando” el carbón y conduciendo a la apertura del crisol, quemando la primera capa del CA y perdiendo material. En la Figura 50 se observa el desprendimiento del carbón en la activación con la sal de K_2CO_3 .



Figura 50. Fotografía de los carbones de s. de palta activados con K_2CO_3 a diferentes concentraciones.

Estudio de la temperatura de pirólisis

Una vez definido el agente activante y su respectiva concentración, se procedió a estudiar la temperatura de carbonización. Se estudiaron tres temperaturas diferentes 400, 600 y 800 °C que se evaluaron a través de la mejor eficiencia de extracción de los analitos.

El proceso de extracción se llevó a cabo en duplicado utilizando 20 mL de agua desionizada, dopada a una concentración de 30 $\mu\text{g/L}$, en un tiempo de 60 min a una velocidad de 2000 rpm y se utilizó el CA con $ZnCl_2$ al 30% (CA Zn30).

La Figura 51 muestra las respuestas analíticas de los compuestos en función de las diferentes temperaturas de pirólisis para el CA de semilla de palta.

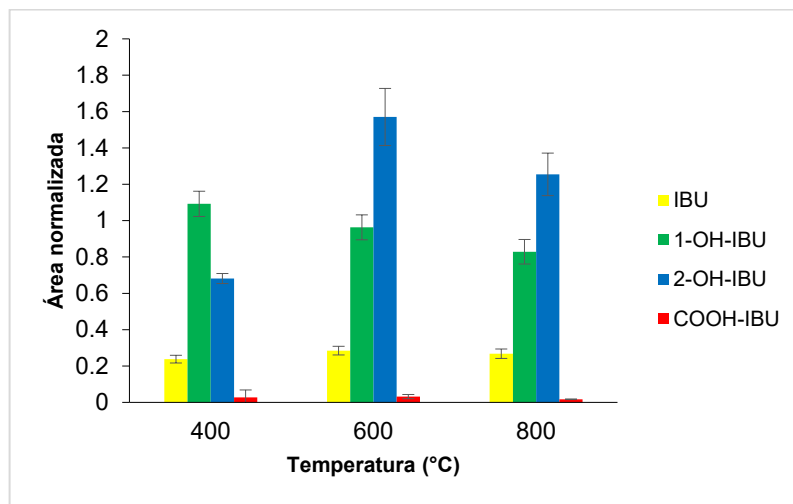


Figura 51. Respuesta analítica en función de la temperatura de pirólisis para el carbón activado con $ZnCl_2$ al 30%*m/v* de semilla de palta.

A 600 y 800°C se obtuvieron eficiencias de extracción semejantes, pero un tanto mayor a los 400°C. Al compararlos mediante un análisis quimiométrico de una vía (Tabla 23), se obtuvo que no existe diferencia significativa entre las tres temperaturas ($p > 0,05$).

Tabla 23. ANOVA de una vía entre las tres temperaturas de pirólisis para el CA de s. de palta.

Analito	<i>F-Ratio</i>	<i>P-value</i>
IBU	1,29	0,3939
1-OH-IBU	1,05	0,4509
2-OH-IBU	4,92	0,1129
COOH-IBU	2,31	0,2469

En este proceso la temperatura de carbonización es uno de los factores más significativos, seguido de la velocidad de calentamiento, una atmósfera inerte adecuada y el tiempo de residencia. Si bien, a temperaturas mayores aumenta el contenido de carbono fijo y se reduce el contenido de material volátil, se descartó el uso del CA a 800°C porque se obtienen bajos rendimientos de la producción del carbón (ver Tabla 24), aumenta el contenido de cenizas y se requiere de un gasto extra de energía y del uso de gas de N_2 . En este contexto, basado en los resultados de eficiencia de extracción de los analitos, se consideró como óptimo la síntesis de

carbón a 600°C activado con la solución de ZnCl₂ al 30% m/v por las mayores áreas, por sus señales más definidas y por sus mejores recuperaciones en el proceso de extracción de los analitos.

La Tabla 24 muestra los rendimientos del procedimiento de síntesis de los carbones de semilla de palta activado con soluciones de ZnCl₂ al 30% a tres temperaturas diferentes. Se observa que a 800°C los rendimientos sintéticos son relativamente bajos, el cual se asocia principalmente a las condiciones extremas de temperatura.

Tabla 24. Rendimientos de síntesis de CA de s. de palta (Zn30%) para tres temperaturas diferentes (400, 600 y 800°C).

ZnCl ₂ 30% m/v	
Temperatura	Rendimiento
400°C	50%
600°C	31%
800°C	14%

Finalmente, para notar la diferencia entre los carbones sintetizados a distintas temperaturas y con diferentes activantes, se midieron los espectros IR para cada CA de semilla de palta. La Figura 52 muestra los espectros IR de los carbones activados con ZnCl₂ y/o K₂CO₃ al 30%.

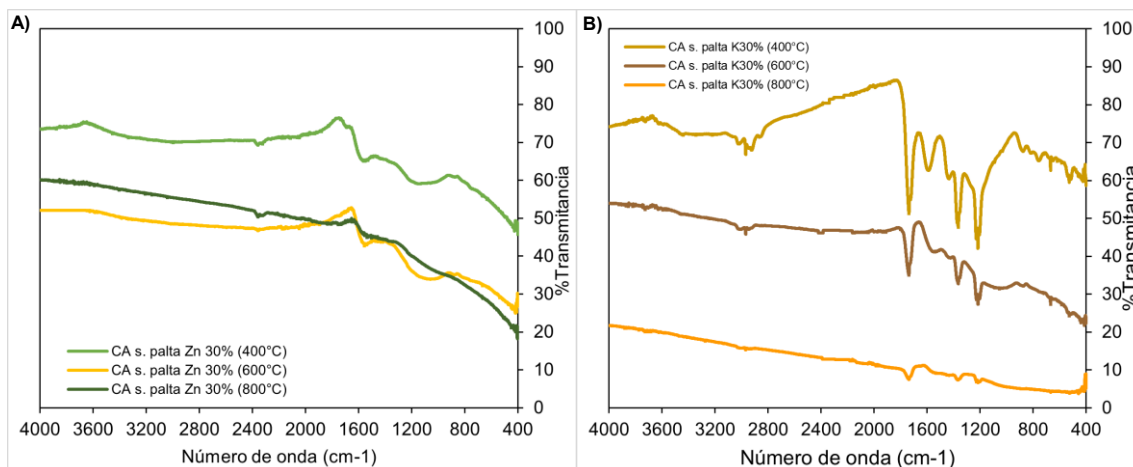


Figura 52. Espectros FTIR del carbón de semilla de palta activado con $ZnCl_2$ (CA Zn30, A) y con K_2CO_3 (CA K30, B) a distintas temperaturas.

En ambos casos se observa que a medida que aumenta la temperatura de pirólisis los grupos funcionales desaparecen. Tal como se mencionó anteriormente, es de esperar que a altas temperaturas se eliminen la mayor cantidad de componentes del material orgánico y quede solo la estructura del carbón. Se pueden notar una mayor presencia de grupos funcionales en los CAs K30, donde incluso, se aprecia una banda vibracional entre los 1700 cm^{-1} correspondiente a $C=O$, las cuales no se encontraban en el IR de la semilla de palta natural. Se observan bandas entre los 1500 y 1600 cm^{-1} asociado a enlace $C=C$ de anillos aromáticos y en 1200 - 1400 cm^{-1} una banda que se asocia a enlace $C-O$, que van disminuyendo su intensidad a medida que aumenta la temperatura. Por el contrario, para los CAs Zn30 los espectros se encuentran casi planos dado que no se observan grupos funcionales a excepción de una pequeña banda en 1600 cm^{-1} que podría corresponder a un enlace $C=C$ y que desaparece por completo a 800°C . Basado de la literatura, las sales neutras actúan como oxidantes y deshidratantes, por lo que se deberían formar dobles enlaces y grupos -oxo. Debido a que no se observan más grupos en el CA Zn30 a 600°C , pero muestra buenas eficiencias de extracción, se infiere que posee una gran área de superficie con una mayor porosidad.

CA de corcho:

Estudio de la concentración de activante

Basado de la literatura (Mestre *et al.* 2007)⁷⁴ se utilizó un activante alcalino (medio) como el K_2CO_3 para activar el corcho. Al igual que para la semilla de palta, se estudió la concentración de activante en %m/v a una temperatura fija de $400^\circ C$. Se estudiaron tres concentraciones diferentes (40, 20 y 10% m/v) que se analizaron en función de la mejor respuesta analítica y eficiencia de extracción. La extracción se llevó a cabo en duplicado, con 20 mL de agua desionizada dopada a una concentración de $30 \mu g/L$, en un tiempo de 60 min y a una velocidad de 2000 rpm.

En la Figura 53 se muestran las áreas cromatográficas de los analitos en función de las distintas concentraciones del activante K_2CO_3 .

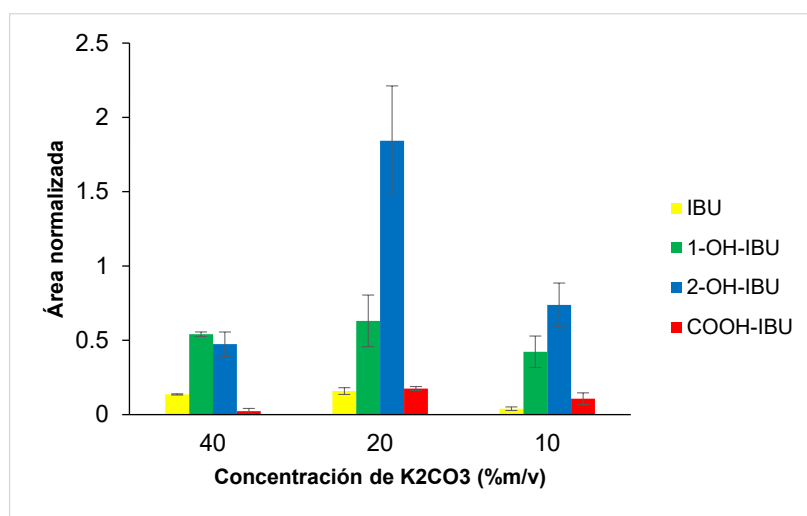


Figura 53. Respuesta analítica versus concentración de activante para el CA de corcho a $400^\circ C$.

Se consideró como óptimo activar el corcho con K_2CO_3 al 20% m/v ya que mostraba mayores eficiencias de extracción para los cuatro analitos. Por el contrario, al utilizar el carbón activado al 10% se obtenían menores respuestas analíticas con bajas eficiencias de extracción para el

IBU y al activar con una solución de concentración al 40% se obtenían respuestas menores para el COOH-IBU.

En literatura se ha informado la síntesis de carbón activado de corcho con K_2CO_3 en diferentes relaciones (K_2CO_3 :corcho), donde se revela que el desarrollo de porosidad es casi independiente del contenido de K_2CO_3 .⁸⁴ Basado entonces en las mejores respuestas analíticas se decidió utilizar 20% como concentración para la activación de corcho en una relación 4mL de activante:1g de corcho.

Comparación con otro activante químico

De manera paralela, se utilizó la sal de $ZnCl_2$ como agente activante para sintetizar carbón activado de corcho en las mismas condiciones mencionadas (a 400°C y en tres concentraciones). En la Figura 54 se muestran las respuestas cromatográficas de los analitos.

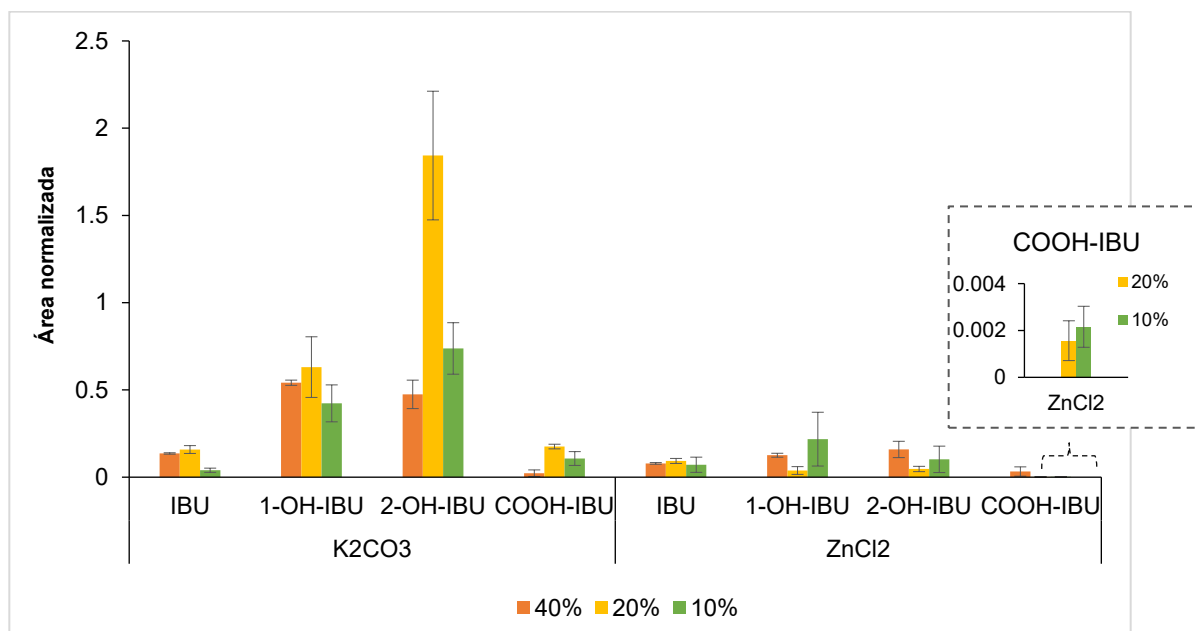


Figura 54. Respuesta analítica en función de la concentración de activante para el CA de corcho a 400°C utilizando K_2CO_3 y $ZnCl_2$.

A simple vista se puede notar que al utilizar carbón de corcho activado con $ZnCl_2$ disminuyen las respuestas analíticas y, por tanto, se obtienen bajas eficiencias de extracción para los

compuestos. Esto refuerza el hecho de que la síntesis de carbón activado de corcho muestra mejor respuesta con el reactivo químico de K_2CO_3 y con mayores rendimientos de síntesis (Tabla 25).

Tabla 25. Rendimientos del proceso de fabricación de los carbones activados de corcho con K_2CO_3 y $ZnCl_2$ a $400^\circ C$.

Concentración (% m/v)	Rendimiento	
	K_2CO_3	$ZnCl_2$
40	53%	47%
20	54%	60%
10	50%	47%

Estudio de la temperatura de pirólisis

Una vez definida la concentración del agente activante se procedió a estudiar la temperatura final de carbonización del corcho. Se probaron tres temperaturas finales (400 , 600 y $800^\circ C$) que fueron analizadas en base a las mejores eficiencias de extracción de los analitos de estudio.

La Figura 55 muestra las respuestas de extracción en función de la temperatura de pirólisis.

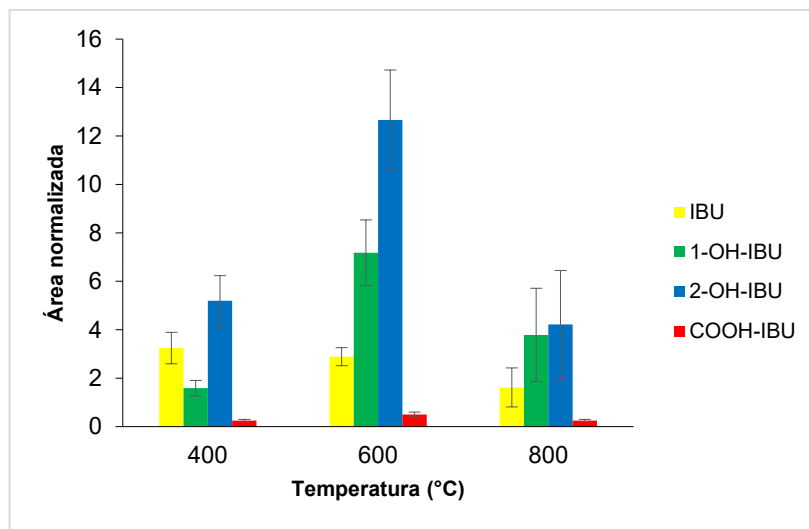


Figura 55. Respuesta analítica en función de la temperatura de carbonización de corcho (activado con K_2CO_3 al 20% m/v).

Como se observa, los CAs a 600 y 800 °C siguen una tendencia en la respuesta de los analitos, no así el CA a 400°C. Con respecto al compuesto COOH-IBU sus eficiencias de extracción disminuyeron a 400 y 800°C. Para el 1-OH-IBU la respuesta fue menor a los 400°C y en cuanto al IBU las eficiencias fueron decreciendo a medida que aumentaba la temperatura. Buscando una zona de compromiso entre las respuestas analíticas y comparando las eficiencias, se consideró como óptimo una temperatura final de 600°C.

A continuación, la Tabla 26 resume los rendimientos obtenidos durante el proceso de carbonización del corcho.

Tabla 26. Rendimientos del proceso sintético del CA de corcho a diferentes temperaturas.

K ₂ CO ₃ 20% m/v	
Temperatura	Rendimiento
400°C	53 %
600°C	32 %
800°C	23%

Como se observa, se obtuvieron rendimientos menores al 50% para las temperaturas de 600 y 800°C. Sin embargo, a pesar de que a los 400°C los rendimientos son mayores, las eficiencias de extracción son más bajas y no se asegura una carbonización completa.

Por otra parte, a diferencia del carbón activado de semilla de palta, el K₂CO₃ no reacciona de manera violenta con el corcho, pero si se forma una mayor cantidad de cenizas a medida que aumenta la temperatura, tal como se observa en la Figura 56.

CA corcho K20%



Figura 56. Fotografía de carbón de corcho activado con K₂CO₃ al 20% a 800°C.

Finalmente, se midieron los espectros IR para cada CA de corcho a fin de notar la diferencia entre las distintas temperaturas y los diferentes activantes. En la Figura 57 se observan los espectros de cada carbón activado.

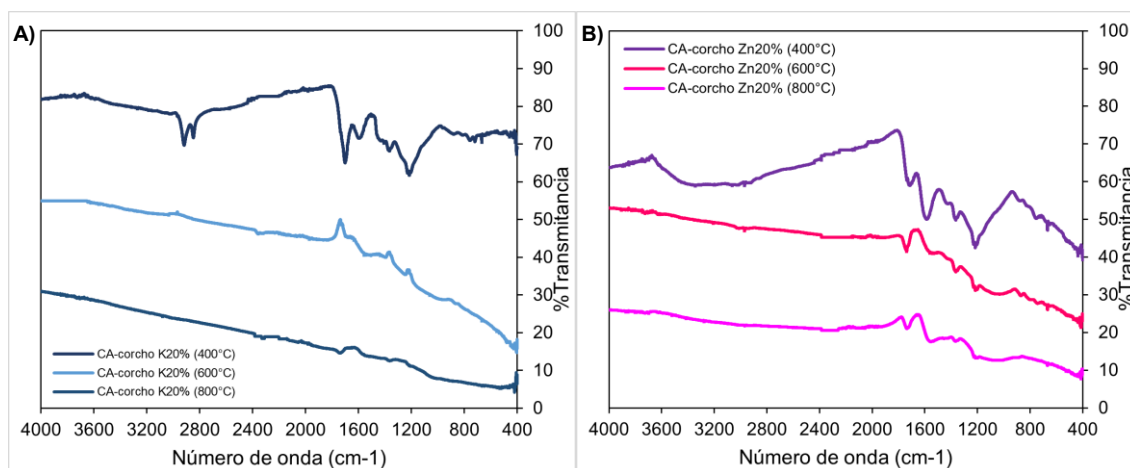
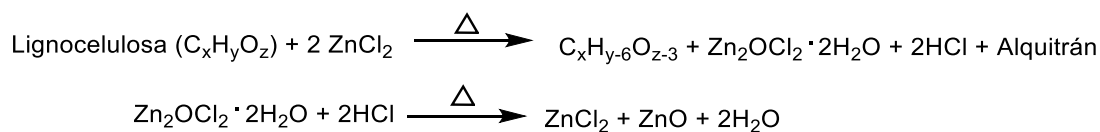


Figura 57. Espectros FTIR del carbón de corcho activado con K_2CO_3 (CA K20, A) y con $ZnCl_2$ (CA Zn20, B) a distintas temperaturas.

Tal como ya se mencionó, se observa que a medida que aumenta la temperatura de pirólisis los grupos funcionales van desapareciendo o haciéndose menos intensos. Comenzando con los espectros del CA Zn20 (B) al compararlo con el del corcho natural, los grupos funcionales entre la región de $1200-1700\text{ cm}^{-1}$ se mantienen y van disminuyendo su intensidad a mayor temperatura, sin embargo, se pierde la banda ancha de la región de los 3200 cm^{-1} y no se distinguen las bandas vibracionales de los enlaces CH. Por el contrario, para los CAs K20 (A) a los 400°C se conserva el espectro del corcho natural, pero sin la presencia de la banda en la región de los 3000 cm^{-1} correspondiente a los grupos OH. No obstante, a los 600 y 800°C no se aprecian grupos funcionales y los espectros son relativamente planos, exceptuando unas bandas de poca magnitud entre los 1600 cm^{-1} a los 600°C . Por tanto, se deduce que la mayor eficiencia de extracción del CA K20 (a 600°C) se debe a que posee una mayor área superficial altamente porosa.

Mecanismos de reacción de los activante ZnCl₂ y K₂CO₃

Los comportamientos distintos de cada adsorbente son probablemente consecuencias de sus características intrínsecas de su estructura, dados por el tamaño de poro, área superficial, forma y/o composición. En literatura se ha informado que el ZnCl₂ comparado con otros activantes, como el KOH, produce una mayor área superficial en el carbón, con mayor microporosidad y una estructura aromática más desarrollada.⁸⁵ Estas características se deben especialmente al mecanismo de activación del reactivo. El mecanismo sugerido del activante en el carbón es el que se muestra a continuación:

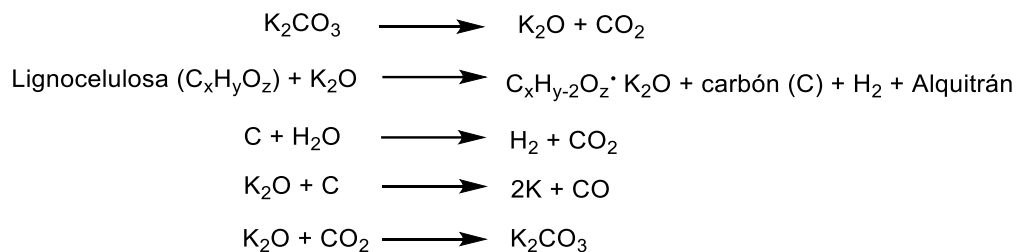


Esquema 14. Mecanismo sugerido por Ma *et al.* (2016).⁸⁵

A través del mecanismo propuesto se puede deducir que la semilla de palta reacciona con el ZnCl₂ y que en presencia de temperatura se deshidrata para formar el compuesto Zn₂OCl₂ dihidratado, este luego vuelve a reaccionar para producir la sal de zinc. Por tanto, el ZnCl₂ reacciona como un fuerte deshidratante rompiendo los enlaces glucosídicos presentes en los biopolímeros que están conformando la semilla de palta. El lavado con ácido permite eliminar los restos de ZnO que se quedan en el material y así generar el desarrollo de poros.

En cuanto al K₂CO₃ se diferencia principalmente del ZnCl₂ por sus propiedades básicas y por ser clasificado como un activante alcalino medio. Se ha demostrado que tiene un gran potencial como activante. Para el mecanismo se propone una primera etapa de descomposición del K₂CO₃ en K₂O y CO₂ (ver en Esquema 15). El K₂O reacciona con el material lignocelulósico, donde se deshidrata y los componentes volátiles se pierden. Los componentes bencénicos se volatilizan a alquitrán, las cadenas laterales y los grupos funcionales que contienen oxígeno se descomponen a medida que incrementa la temperatura. Posteriormente el K₂O reacciona con el material carbonoso formando potasio metálico y otros componentes. Se presume que el potasio

metálico reacciona en la matriz de los átomos de carbono para generar su reordenamiento, aumentando así el grado de grafitización. Una ventaja de esta reacción está en que se genera CO₂, el cual se especula que puede actuar como un gas oxidante mediante una activación física, generando efectos mayores de activación comparados con otros reactivos básicos como el KOH.^{60,85,86}



Esquema 15. Mecanismo sugerido a partir de lo informado por Ma *et al.* (2016) y Xi *et al.* (2018).^{85,86}

La reacción de K₂CO₃ comparada con la de ZnCl₂ es mucho más exotérmica, ya que se liberan gases como CO₂ y H₂, lo que puede explicar el hecho de que se abrieran los crisoles cuando se llevaba a cabo la pirólisis con la semilla de palta. El motivo por el cual no se observan grupos funcionales en los espectros infrarrojos de ambos CAs se puede asociar a que los activantes actuaron en mayor medida como deshidratantes, modulando la aromaticidad y aumentando el área superficial de los materiales.

5.5.2. Caracterización de los CAs

Además de los análisis FTIR, los CAs fueron caracterizados mediante otros análisis, tales como: SEM, PZC y IEP.

Se comenzará explicando los análisis SEM de cada CA. La Figura 58 muestra las micrográficas del CA de semilla de palta (Zn30, 600°C) a diferentes aumentos.

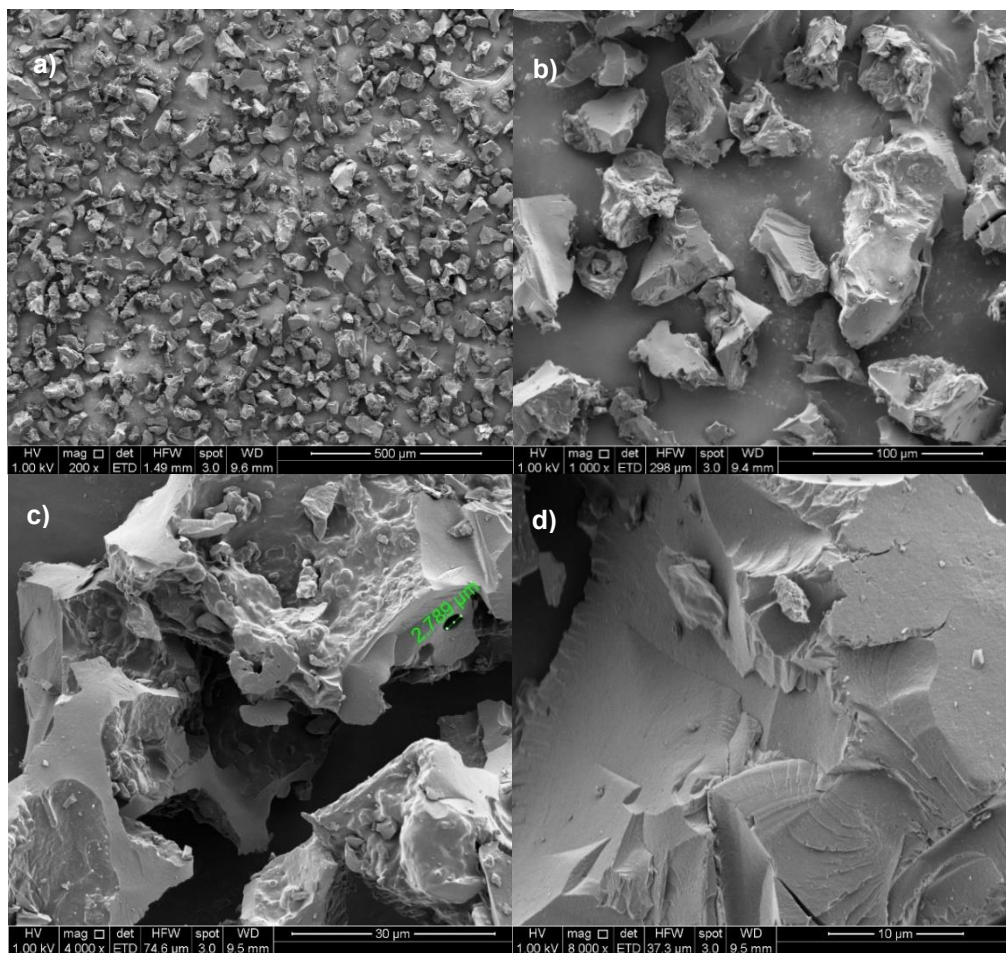


Figura 58. Micrografías SEM del CA de s. de palta Zn 30% a 600°C: a) 200 x, b) 1000 x, c) 4000 x, d) 8000x.

Como se puede notar, la morfología del CA cambia radicalmente con respecto a su forma natural, puesto que la semilla de palta sin pirólisis posee una estructura ovalada y lisa, sin embargo, su especie carbonizada se muestra como una roca de carbono de dimensiones irregulares con algunas fisuras, producto del proceso de molienda a través del mortero. Se observan algunos poros con un tamaño aproximado de 3 µm. Dado que no se logra visualizar la presencia de poros más pequeños (en nm), para comprobar su existencia se puede llevar a cabo un análisis BET (curva de adsorción-desorción de N₂). En la literatura se observan micrografías similares a las obtenidas en este estudio.⁵⁷

La Figura 59 nos enseña las micrografías SEM para el CA de corcho (K20, 600°C).

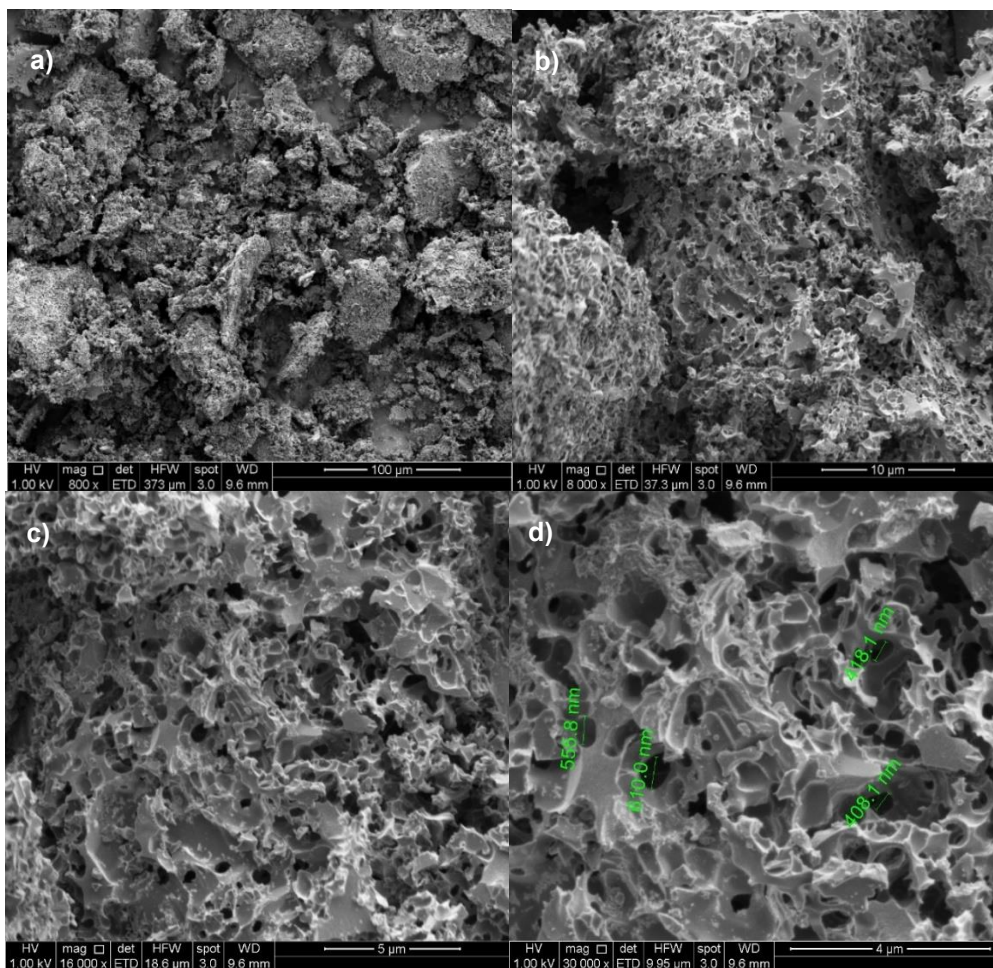


Figura 59. Micrografías SEM de CA de corcho K20% a 600°C: a) 800 x, b) 8000 x, c) 16000 x, d) 30000 x.

En el caso del CA de corcho, se conserva su estructura discontinua debido a la presencia clara de poros en su superficie. Se observaron tamaños de poros desde los 408 hasta los 610 nm.

La diferencia de poros con respecto al CA de la semilla de palta radica en la presencia de potasio metálico producto del mecanismo de reacción, donde ya se ha demostrado que penetra en la estructura interna de la red del carbón, expandiendo el espacio de la capa aromática, distorsionando la capa del carbono y creando así nuevos poros.^{60,87}

Se determinó el PZC y el IEP para cada CA. El procedimiento se llevó a cabo de la misma forma que para las fases naturales (ver en metodología).

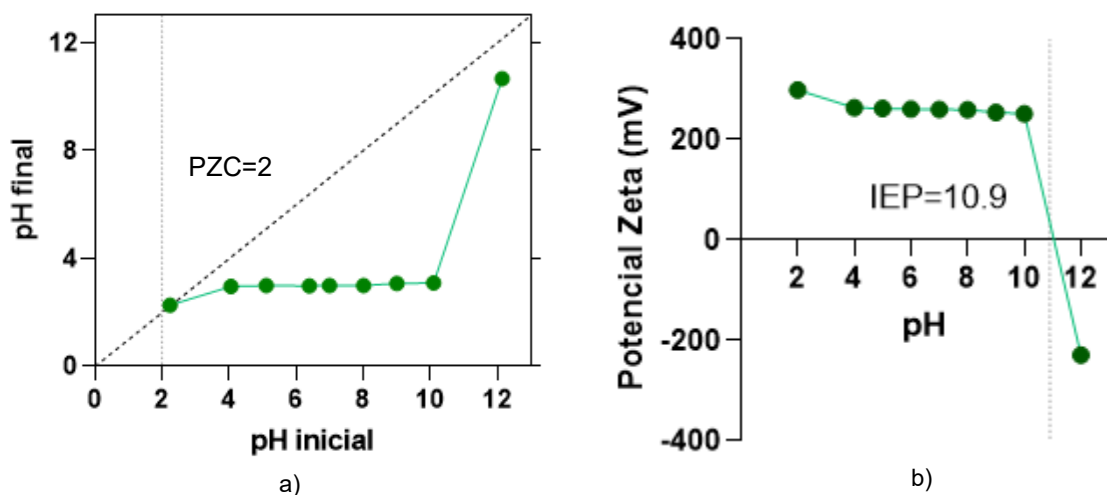


Figura 60. PCZ y IEP (a y b) del CA de s. palta.

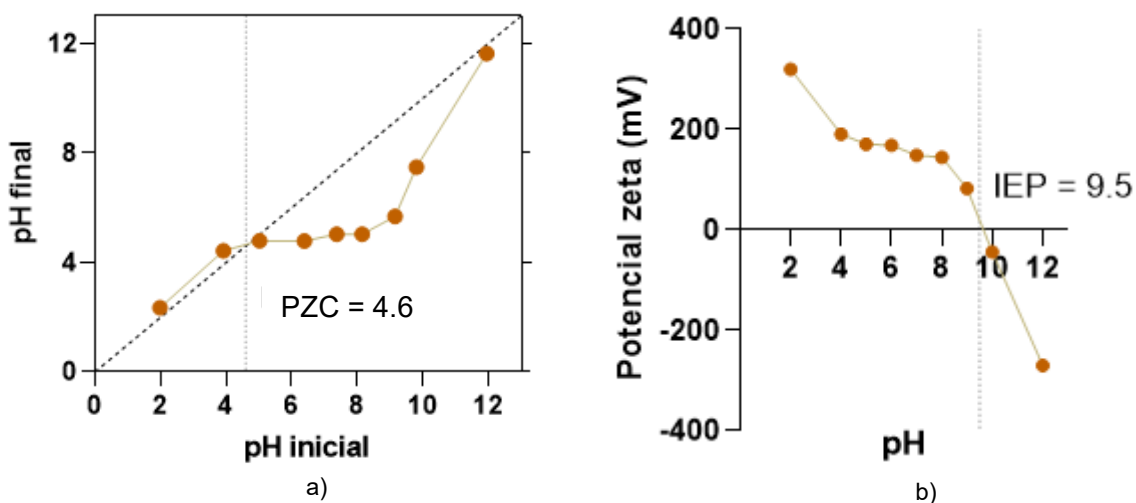


Figura 61. PCZ y IEP (a y b) del CA de corcho.

Como se observa en las Figuras 60a y 61a, para ambos CAs se observaron valores constantes de pH en el rango de 4 a 10. Los valores obtenidos para el PZC del CA de semilla de palta y del CA de corcho son 2,0 y 4,6 respectivamente. Es decir, a esos valores de pH existe la misma cantidad de sitios positivos y negativos. Estos datos nos indican que a pH inferiores que el PZC se favorecerán los sitios cargados positivamente y a pH superiores se favorecerán los sitios cargados negativamente. No obstante, de lo que se pudo observar en los espectros IR de los

dos CAs es que no presentan grupos funcionales en su estructura, por consiguiente, no debería afectarles el pH del medio, sin embargo, estos si pueden modificar el pH de la muestra de agua.

Finalmente, los valores del IEP para el CA de semilla de palta y el CA de corcho son 10,9 y 9,5 respectivamente, es decir, a estos valores de pH el potencial zeta de la fase es cero (Figuras 60b y 61b). Con respecto a las fases naturales, se obtuvieron datos similares.

5.5.3 Optimización de carbones activados en RDSE

Se optimizaron los distintos factores que podían influir en el proceso de extracción de los analitos utilizando los CAs de semilla de palta y de corcho como fases sorbentes en RDSE. Donde se evaluaron las variables químicas (pH y efecto salting-out) y las variables hidrodinámicas (volumen de muestra y tiempo de extracción) para ambas fases.

5.5.3.1. Estudio de variables químicas

pH

Tal como se mencionó anteriormente, el pH desempeña un papel importante en el proceso de extracción de compuestos ácidos. Los analitos poseen valores de pKa desde 3,9 a 5,3, es decir, para que estén neutros el $\text{pH} < \text{pKa}$.

La Figura 62 señala los resultados para el CA de semilla de palta.

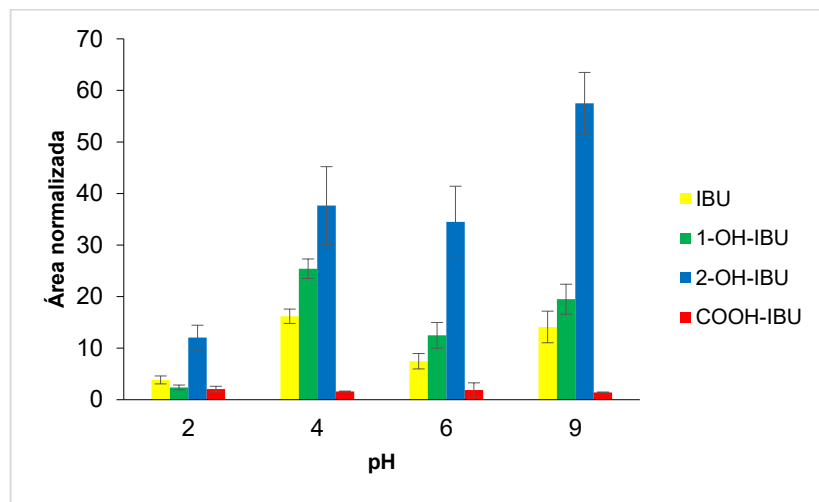


Figura 62. Respuesta analítica en función del pH para CA de semilla de palta. Se estudió con 20 mL de muestra, en un tiempo de 60 min a 2000 rpm.

Se evaluó en un rango de pH de 2 a 9 para el CA de semilla de palta en duplicado. Como se observa, las respuestas del compuesto 2-OH-IBU se encuentran interferidas por efecto matriz de la fase, dando áreas superiores al estándar (en la validación este efecto fue corregido por una muestra blanco). Al mirar los otros analitos, estos mostraron mayores eficiencias de extracción a pH 4. Los analitos IBU y 1-OH-IBU se encuentran protonados a este valor de pH, por el contrario, el COOH-IBU al tener un $pK_a = pH$ estará en un 50% protonado y en un 50% desprotonado, aun así, mostró la misma tendencia en todos los rangos estudiado. Por otro lado, el pH de la fase es 2 (PZC) lo que indica que podría estar en su forma ionizada y deberían existir interacciones de repulsión con el COOH-IBU. Sin embargo, a pH 2 los analitos mostraron eficiencias inferiores con respecto a los otros pH. Como no se sabe con certeza los grupos funcionales que conforman la fase, se asume que el medio amortiguado favorece las interacciones entre el adsorbente-adsorbato.

A continuación, se observan las respuestas analíticas de los compuestos para el CA de corcho.

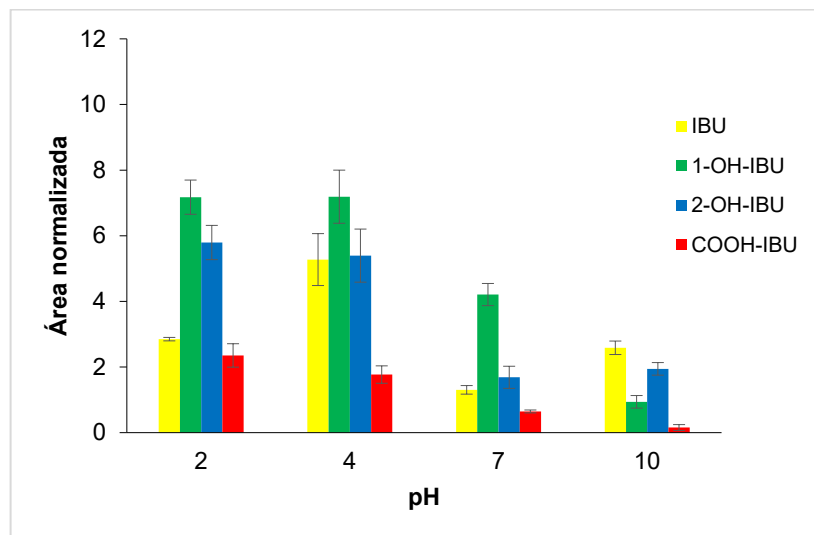


Figura 63. Respuesta analítica en función del pH para CA de corcho. Se estudió con 20 mL de muestra, en un tiempo de 60 min a 2000 rpm.

En este caso se estudió en un rango de pH de 2 a 10, también por duplicado. Como se puede ver, a pH 4 se obtuvieron mayores dispersiones de los analitos donde solo el IBU mostró áreas superiores, para los otros compuestos se obtuvieron números similares de áreas y con menos error a pH 2. A pH 7 y 10 las eficiencias fueron bajas para los compuestos 1-OH-IBU, 2-OH-IBU y COOH-IBU. Por lo tanto, se consideró como óptimo utilizar pH 2 para la extracción de los analitos. La fase tiene un pH de 4,6 (PZC) lo que indica que a pH 2 se encontrará en su forma neutra o más bien protonada, favoreciendo las interacciones.

Efecto salino (Salting-out)

Dado que el IBU y sus metabolitos son medianamente polares, es importante evaluar el efecto de la fuerza iónica para que disminuya su solubilidad en el sistema acuoso y así asegurar de que estos sean extraídos por la fase.

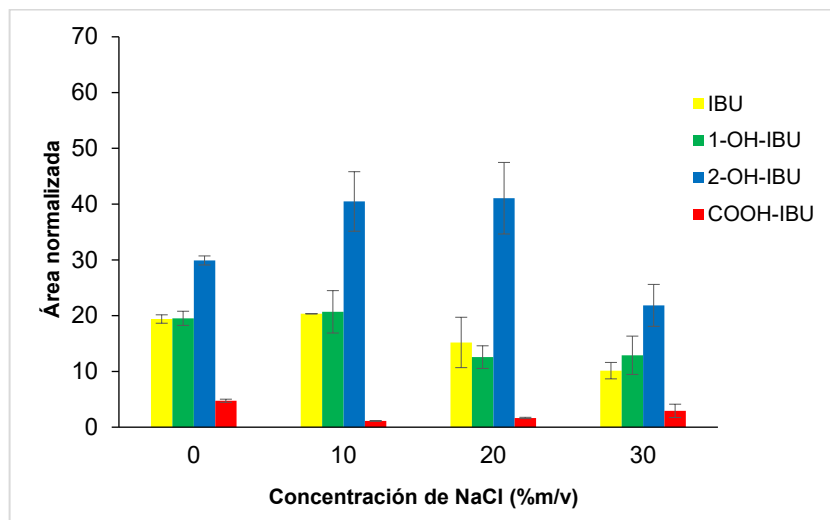


Figura 64. Respuesta analítica en función de la concentración de NaCl (%m/v) para CA de semilla de palta. Se estudió con 20 mL de agua, ajustado a un pH 4, en un tiempo de 60 min a 2000 rpm.

Al evaluar las distintas concentraciones de NaCl en el proceso de extracción, empleando la fase de CA de semilla de palta, se obtuvieron para los analitos eficiencias de extracciones mayores para un 0 y un 10% de NaCl. Al realizar un ANOVA de una vía entre el 0 y 10% se tuvo que no hay diferencia significativa ($p > 0,05$) para el IBU, 1-OH-IBU y 2-OH-IBU, sin embargo, en el compuesto COOH-IBU si hubo diferencia significativa ($p < 0,05$) entre las dos condiciones. En consecuencia, se decidió no utilizar sal en la extracción para evitar grandes dispersiones y problemas de arrastre durante el proceso.

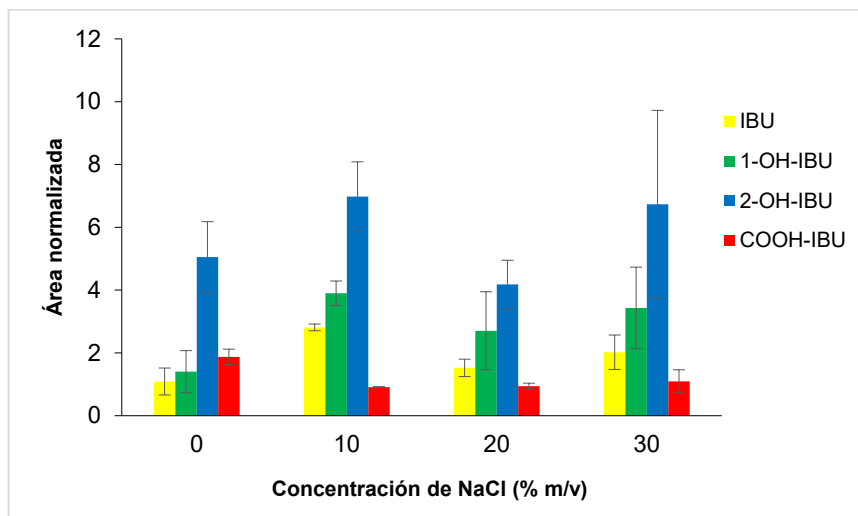


Figura 65. Respuesta analítica en función de la concentración de NaCl (%m/v) para CA de corcho. Se estudió con 20 mL de agua, ajustado a un pH 2, en un tiempo de 60 min a 2000 rpm.

Con respecto al CA de corcho, si afectó la presencia de sal en la solubilidad de los analitos, ya que las respuestas de los compuestos fueron más bajas al no utilizar sal (0%) por lo que se descartó esta condición. Al hacer un ANOVA de una vía entre las concentraciones 10, 20 y 30% de NaCl se obtuvo que para los cuatros analitos no existe diferencia significativa ($p > 0,05$), por consiguiente, se consideró como óptimo utilizar el mínimo de sal (10% m/v de NaCl) para evitar los problemas mencionados anteriormente.

Solvente de elución

Además de las variables químicas, se evaluó el solvente de elución a fin de encontrar un óptimo solvente en el proceso de desorción de los analitos. Para encontrar el solvente de elución adecuado se consideraron algunos factores: que no se sea tan corrosivo tanto para el medio ambiente como para el operador y que logre solubilizar a los analitos para llevar a cabo una desorción rápida y cuantitativa. Se probaron tres solventes (MeOH, MeCN y CHCl_3) y una mezcla de MeOH:AcOEt (3:7) que se evaluaron en base a la mejor respuesta analítica y eficiencia de extracción.

La Figura 66 muestra los resultados para el CA de semilla de palta.

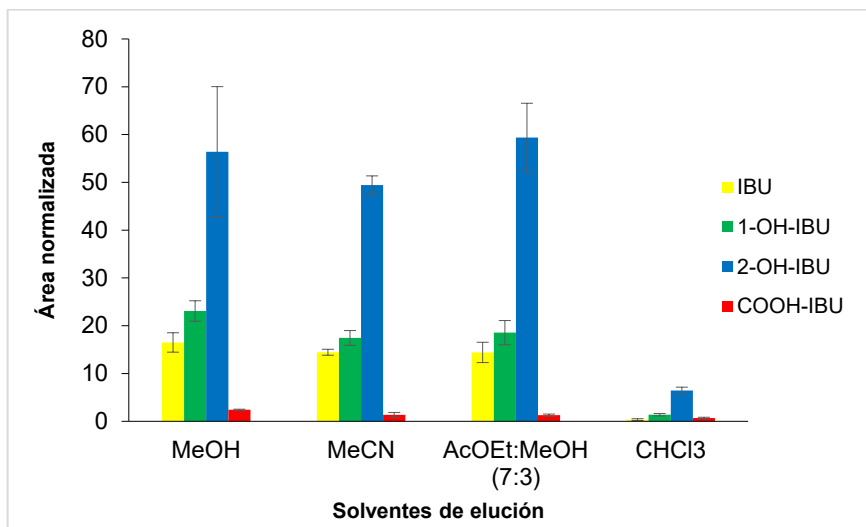


Figura 66. Respuesta analítica en función de los solventes de elución para el CA de semilla de palta.

Como se observa, se obtuvieron respuestas de los analitos muy bajas con CHCl_3 , el cual fue descartado. Para los otros solventes, se obtuvieron respuestas bastante similares para los analitos, donde el MeOH mostró eficiencias relativamente mayores y se consideró como solvente óptimo en la etapa de desorción.

En la Figura 67 se observan los resultados de los analitos utilizando CA de corcho.

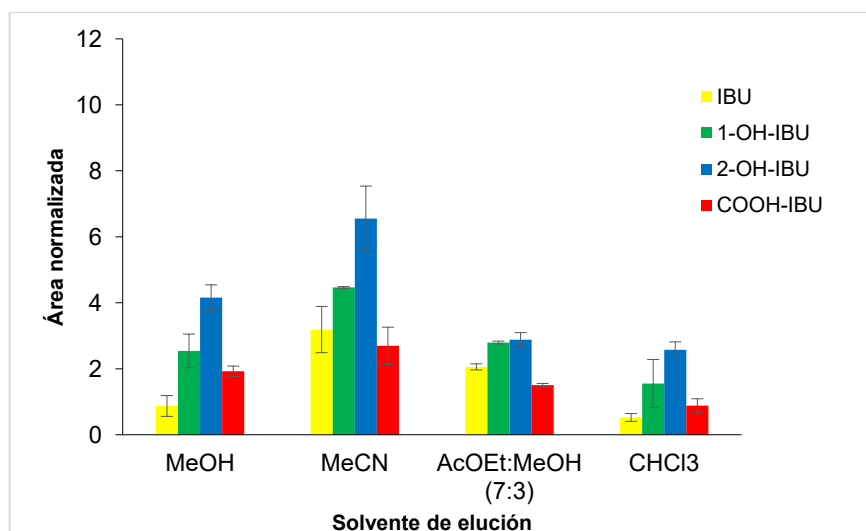


Figura 67. Respuesta analítica en función de solvente de elución para CA de corcho.

En el caso del CA de corcho las respuestas fueron más variadas, ya que tanto el MeOH como el CHCl_3 obtuvieron bajas eficiencias de extracción. Entre el MeCN y la mezcla de solventes (AcOEt:MeOH), las eficiencias de extracción fueron mayores con MeCN, por ende, fue escogido para eluir los analitos luego del proceso de extracción.

5.5.3.2. Estudio de variables hidrodinámicas

Volumen de muestra y tiempo de extracción

Se estudiaron las variables volumen de muestra y tiempo de extracción para maximizar aún más la eficiencia de extracción de cada CA. La velocidad de agitación se mantuvo constante durante el proceso de optimización porque ya se demostró que, a mayor velocidad de agitación, mayor es la transferencia de masa. Se aplicó un diseño experimental de Doehlert en la optimización de las variables, al tiempo de extracción se le asignaron 5 niveles de trabajo (X1) y al volumen de muestra 3 (X2). Se tomaron las áreas cromatográficas normalizadas de los analitos como variable de respuesta y se realizaron 9 experimentos en total, incluyendo 3 centros para ambos CAs. La matriz de experimentos se muestra en la Tabla 8 (ver en metodología). Para evaluar la calidad de los modelos se realizaron análisis estadísticos ANOVA de la regresión (descrito anteriormente en la optimización del corcho laminar). Las respuestas obtenidas se muestran a continuación en la Tabla 27.

Tabla 27. ANOVA de la regresión para los analitos utilizando los CAs como fases sorbentes.

Fase	Analito	p-value REG/RE*	p-value LOF/EP*	R ² (%)
CA de semilla de palta	IBU	0,0051	0,3181	98,67
	1-OH-IBU	0,0049	0,0366	98,71
	2-OH-IBU	0,0005	0,9424	98,72
	COOH-IBU	0,0500	0,8339	59,81
CA de corcho	IBU	0,0258	0,0756	96,05
	1-OH-IBU	0,0762	0,1084	91,62
	2-OH-IBU	0,0241	0,7734	96,22
	COOH-IBU	0,0340	0,4507	74,15

* REG: varianza de la regresión (modelo), RE: residuo (varianza error total), LOF: carencia de ajuste (lack of fit), EP: error puro.

Como se observa, tanto el CA de semilla de palta como el CA de corcho obtuvieron un $p < 0,05$ entre la varianza del modelo y los residuos y un valor de $p > 0,05$ entre la carencia de ajuste y el error puro, lo que indica que el modelo es adecuado para describir los datos.

Los gráficos de Pareto obtenidos del diseño experimental se muestran a continuación:

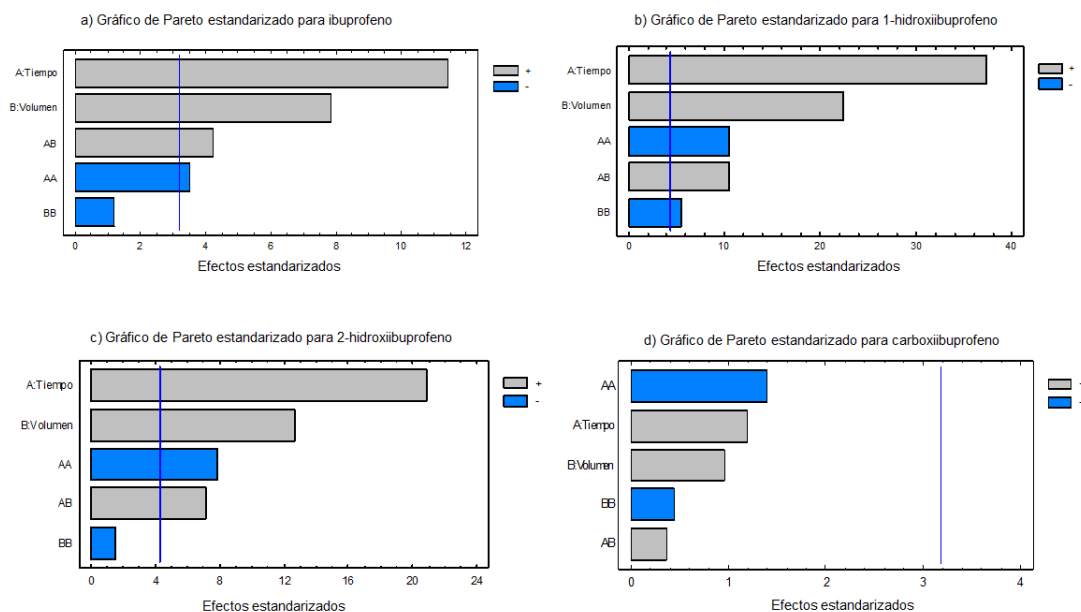


Figura 68. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido de la optimización de las variables hidrodinámicas usando CA de s. de palta como fase sorbente.

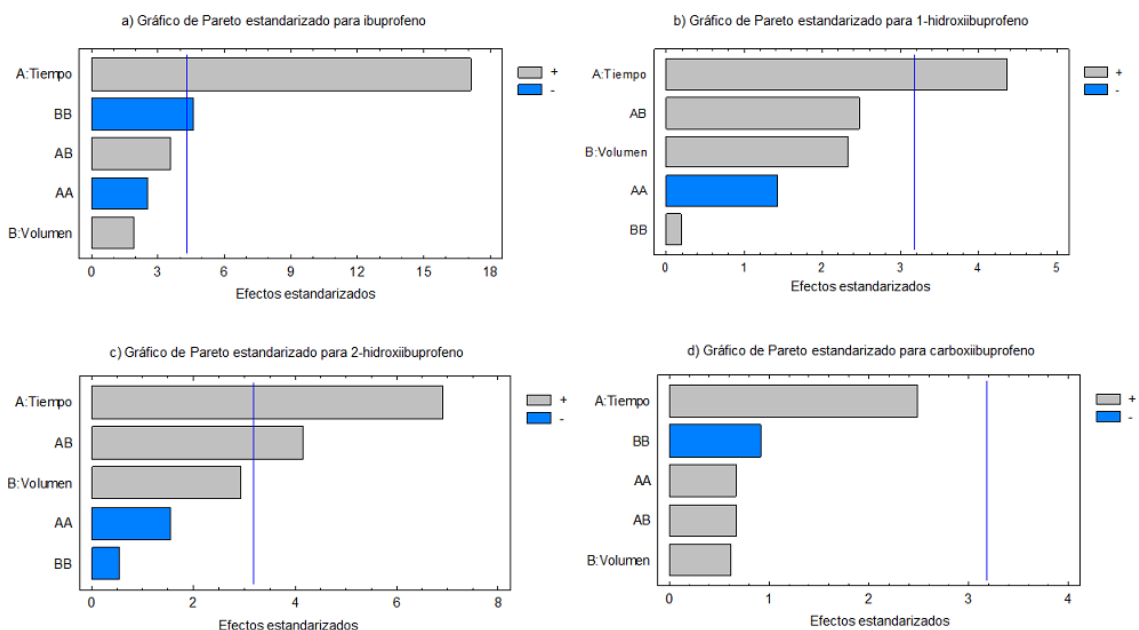


Figura 69. Diagrama de Pareto estandarizado obtenido de la optimización de las variables hidrodinámicas usando CA de corcho como fase sorbente.

Se observa que cuando se utiliza el CA de semilla de palta, los factores tiempo y volumen de muestra son significativos (positivamente) para el IBU y sus metabolitos hidroxilados. En cambio, cuando se utiliza el CA de corcho como fase, solo el factor tiempo es significativo en las respuestas de estos mismos compuestos y afecta de manera positiva. En ambos casos, ningún factor mostró tener significancia en la respuesta del COOH-IBU.

Finalmente, para encontrar el punto óptimo de las dos variables se llevó a cabo el análisis multirespuesta de la optimización a través de la función de deseabilidad (D) dando un impacto de uno a cada factor. En la Figura 70 se muestran las superficies de contorno para los analitos de estudio utilizando CA de semilla de palta (a) y CA de corcho (b).

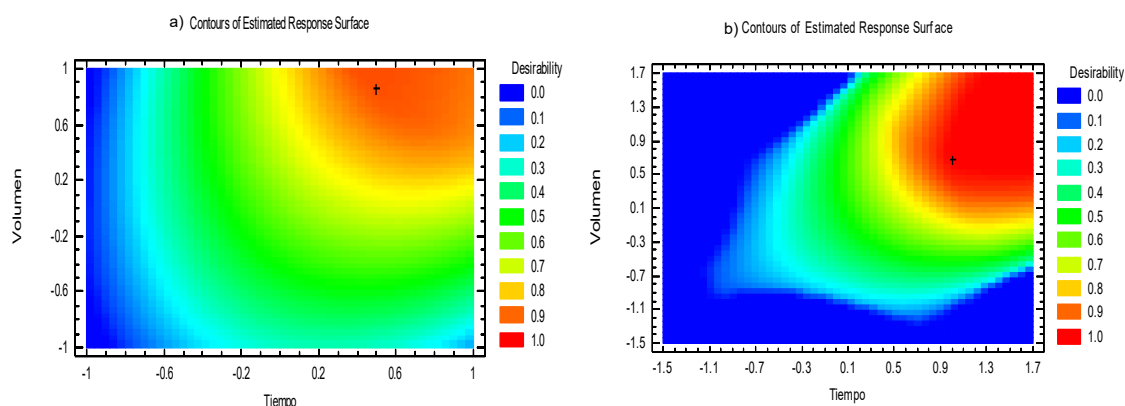


Figura 70. Superficies de contornos de deseabilidad para los analitos de estudio usando CA de s. de palta (a) y CA de corcho (b) como fases sorbentes.

Para la fase CA de semilla de palta se obtuvo una deseabilidad general de 0,918435 y para el CA de corcho se obtuvo un valor de 0,796609. En ambos casos coincidió que los valores óptimos para lograr una mayor respuesta analítica se obtienen con un volumen de muestra de 25 mL y con un tiempo de extracción de 90 min.

La Tabla 28 resume las condiciones optimizadas para los CAs.

Tabla 28. Recopilación de las variables optimizadas en RDSE empleando las fases CA de s. de palta y CA de corcho.

Variables	Condiciones optimizadas	
Material de partida	Polvo de semilla de palta	Corcho molido
Disco	Con camisa	
Activantes	ZnCl ₂	K ₂ CO ₃
Concentración activante (%m/v)	30	20
T _f (°C)	600	
pH	4	2
Concentración de NaCl (%m/v)	0	10
Solvente de elución	MeOH	MeCN
Volumen de muestra, tiempo de extracción y velocidad de agitación	25 mL, 90 min y 2000 rpm	

5.6. Validación del método analítico para CAs

A diferencia de las fases naturales de semilla de palta y de corcho, con los CAs se lograron detectar los cuatro analitos propuestos en muestras de aguas aplicando la técnica de RDSE, dando a entender que las fases en su forma de carbón activado mejoran sus propiedades adsorbentes.

5.6.1. Determinación de las cifras de mérito

La determinación de las propiedades analíticas se detallará por separado para cada CA.

CA de semilla de palta

Se calcularon las cifras de mérito para validar el método propuesto empleando el CA de semilla palta como fase sorbente en RDSE. Para la determinación se utilizaron matrices de agua de río.

La Figura 71 muestra las curvas de adición estándar de los analitos.

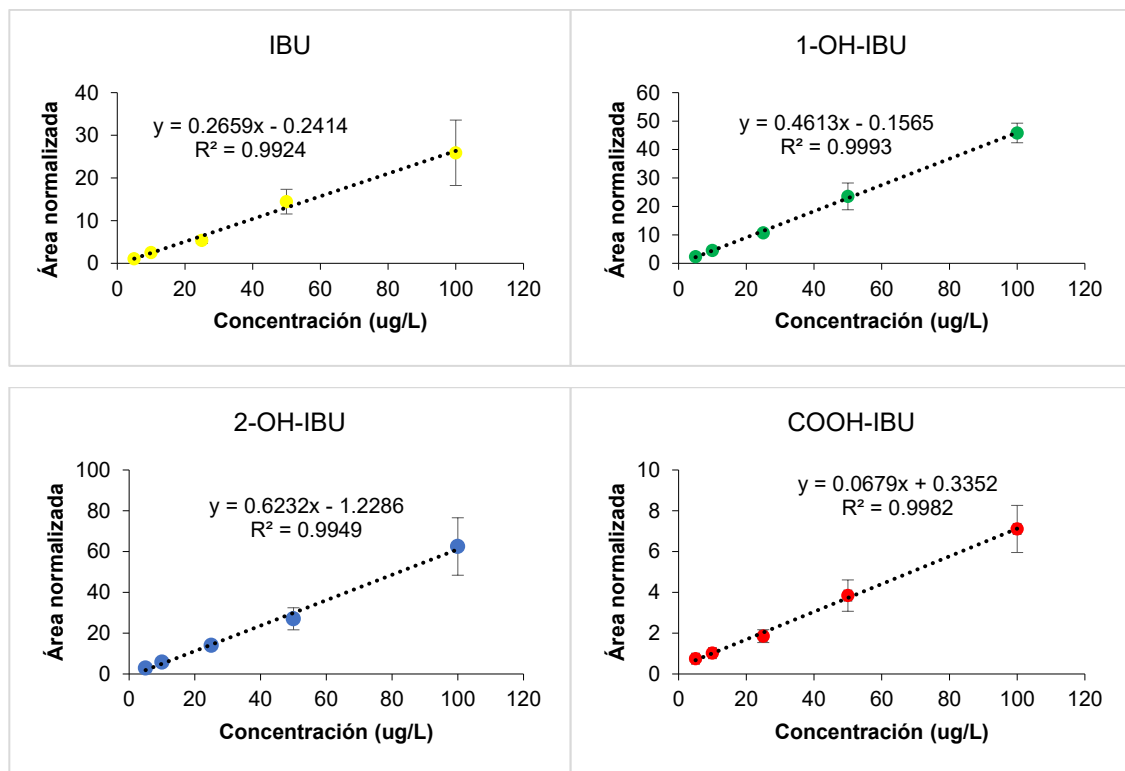


Figura 71. Curvas de adición estándar en matriz (5-100 µg/L) para los analitos utilizando la fase CA de s. de palta.

Las figuras de mérito se muestran en la Tabla 29. Se estudió en un rango lineal de concentración para los cuatro analitos en cinco niveles diferentes (5-100 µg/L) por duplicado. Se obtuvo un buen ajuste lineal ($R^2 = 0,99$) en todos los casos. Los límites de detección y de cuantificación se determinaron en agua potable, se aplicó un FC de 192 y se hallaron en el orden de los ng/L. Para el IBU y sus metabolitos los LD están en el rango de 0,45 a 13,55 ng/L y los LQ están en el intervalo de 1,57 a 17,09 ng/L. La precisión fue estudiada en términos de la repetibilidad a través del parámetro del %RSD. Para todos los analitos se obtuvieron $RSD \leq 10\%$. La exactitud se evaluó mediante las recuperaciones de los compuestos. Se obtuvieron % de recuperación absolutas entre 16 y 46%. Al comparar con la fase natural de semilla de palta, las recuperaciones absolutas para el IBU y 1-OH-IBU fueron 3 y 1% respectivamente, que fueron registradas anteriormente relativas al estándar subrogante. Por tanto, con el CA de semilla de palta se recuperaron entre 11 y 46 veces más los analitos IBU y 1-OH-IBU, además, se logró la detección del 2-OH-IBU y del COOH-IBU. Los porcentajes menores al 100% se deben a que la técnica RDSE se basa en un equilibrio de partición.

Finalmente, se determinó el efecto matriz de cada analito extraído en base a la ecuación 4 (ver en metodología). Se observa que hay un efecto negativo de la matriz en la respuesta de cada analito, lo genera una supresión de las señales analíticas.

Tabla 29. Figuras de mérito para el método propuesto del CA de semilla de palta.

Analito	Sensibilidad (L/µg)	Linealidad (R^2)	LD ^a (ng/L)	LQ ^a (ng/L)	Re absoluta ^b (%)	RSD (%) ^b (n = 6)	EM (%)
IBU	0,2659	0,9924	6,51	8,98	34	8	-76
1-OH-IBU	0,4613	0,9993	2,36	3,31	46	9	-69
2-OH-IBU	0,6232	0,9949	13,55	17,09	40	10	-74
COOH-IBU	0,0679	0,9982	0,45	1,48	16	4	-91

^a agua potable, ^b agua de río (Canoa).

CA de corcho

Para la validación del método propuesto con el CA de corcho también se utilizaron muestras de aguas de río. A continuación, la Figura 72 muestra las curvas de adición estándar en matriz para los analitos.

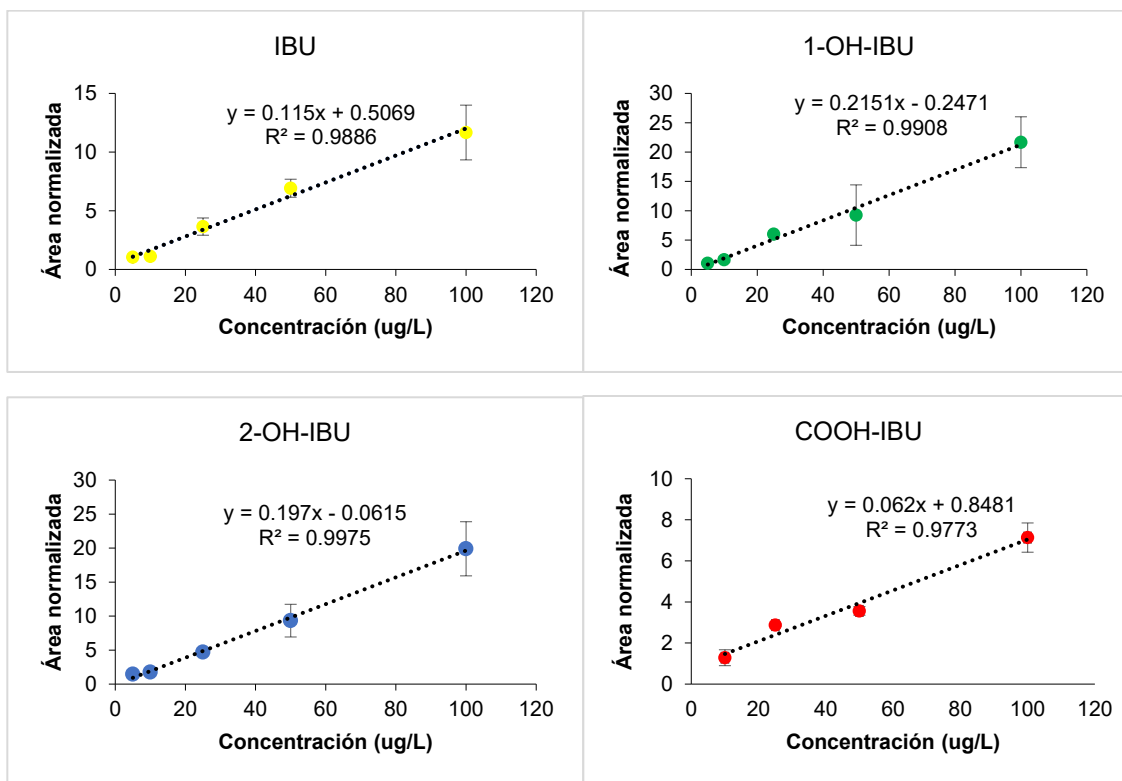


Figura 72. Curvas de adición estándar en matriz (5-100 $\mu\text{g/L}$) para los analitos utilizando la fase CA de corcho.

Las cifras de mérito del método se resumen en la Tabla 30. La ecuación lineal para cada analito se construyó en un rango de 5 a 100 $\mu\text{g/L}$ (por duplicado) y la linealidad obtenida (R^2) fue mayor a 0,97, el cual se encuentra adecuado al considerar la matriz de estudio. Los límites de detección y de cuantificación encontrados para el CA fueron menores comparados a los informados anteriormente para la fase natural de corcho. Se obtuvieron recuperaciones absolutas desde 19 al 55%. Del mismo modo de cómo se explicó para el CA de semilla de palta, las recuperaciones absolutas para el corcho laminar fueron 2 y 1% para el IBU y 1-OH-IBU, anteriormente se reportaron las recuperaciones relativas en base al estándar subrogante,

por tanto, se recuperaron 11 y 19 veces más con la fase carbonizada. En cuanto a la precisión, se lograron $RSD \leq 22\%$ para los analitos.

Finalmente, se determinó el efecto matriz de acuerdo con la ecuación 3 (ver en metodología). Se obtuvieron valores mayores al 100% para el IBU y el COOH-IBU lo que indica un efecto positivo de la matriz, el cual se ve reflejado en un aumento de la señal, siendo el COOH-IBU el más afectado. Los compuestos hidroxilados tuvieron efecto matriz menor al 100% lo que indica un efecto negativo de la matriz, no obstante, existe poca supresión de la respuesta de los analitos.

Tabla 30. Figuras de mérito para el método propuesto del CA de corcho.

Analito	Sensibilidad (L/ μ g)	Linealidad (R ²)	LD ^a (ng/L)	LQ ^a (ng/L)	Re absoluta ^b (%)	%RSD ^b (n = 6)	EM (%)
IBU	0,1150	0,9886	1,29	4,26	21	13	109
1-OH-IBU	0,2151	0,9908	7,08	8,65	19	13	86
2-OH-IBU	0,1970	0,9975	4,89	8,65	33	3	70
COOH-IBU	0,0620	0,9773	1,38	4,54	55	22	180

^a agua potable, ^b agua de río (Esperanza), * se aplicó un FC de 192.

Con respecto a las recuperaciones (absolutas) utilizando la técnica RDSE notamos que a pesar de la gran variedad de grupos funcionales presentes en las fases naturales estos porcentajes son muy bajos, tanto para el corcho como para la semilla de palta. Por otro lado, los CAs de estas dos fases naturales dieron recuperaciones mayores, concluyendo que la extracción se ve afectada, en gran parte, por el área superficial del material y no por los grupos funcionales.

5.6.2. Muestras reales

Se aplicó el método de una de las fases en muestras reales. Puesto que con las fases naturales solo se logró detectar dos analitos, se utilizó el CA de semilla de palta como fase sorbente. Se emplearon muestras de afluente y efluente de la PTAR El Trebal. Se realizaron curvas de adición estándar en matriz fortificadas desde 0 a 100 μ g/L en duplicado.

Como se observa en la Tabla 31, se encontró la presencia de los cuatro analitos en las matrices estudiadas. Se detectó en mayor cantidad el compuesto COOH-IBU el cuál concuerda con que es uno de los principales metabolitos del IBU y se excreta en mayor proporción, siendo el 1-OH-IBU el que se elimina en menor medida.

Tabla 31. Concentración (\pm SD) de fármacos en afluentes y efluentes de la PTAR El Trebal, usando CA de semilla de palta como fase sorbente (n=2).

Analito	Concentración ($\mu\text{g/L}$)	
	Afluente	Efluente
IBU	$0,47 \pm 0,09$	$0,59 \pm 0,01$
1-OH-IBU	$0,17 \pm 0,03$	$0,192 \pm 0,006$
2-OH-IBU	$0,3 \pm 0,2$	$1,12 \pm 0,03$
COOH-IBU	5 ± 2	$4,3 \pm 0,2$

SD: Desviación estándar.

Por otra parte, se observa que la planta de tratamientos de aguas servidas del Trebal no logra una eliminación exhaustiva de los compuestos que ingresan a las aguas residuales de la ciudad de Santiago, llegando alcanzar las aguas naturales. Por tanto, con este estudio es posible concluir que la planta no se encuentra diseñada para eliminar de manera completa este tipo de contaminantes (clasificados como contaminantes emergentes), aunque a pesar de que estén presentes en pequeñas cantidades, su baja concentración no indica un estado seguro para el sistema vivo y no deberían estar en las aguas ambientales, lo cual es preocupante ya que tal como se mencionó en la introducción, los metabolitos del ibuprofeno han sido considerados más tóxicos que el compuesto original. Si bien, las muestras fueron tomadas en el período 2018-2021, se especula que actualmente podría haber una mayor presencia de estos compuestos debido a la pandemia de COVID-19.¹⁵

5.7. Comparación de fases

Se procedió a realizar la comparación de los CAs con las fases comerciales Oasis HLB, C18 y St-DVB. Se efectuó el metodo propuesto de cada CA en la evaluación.

Las Figuras 73 y 74 muestran los resultados obtenidos para el CA de semilla de palta y para el CA de corcho.

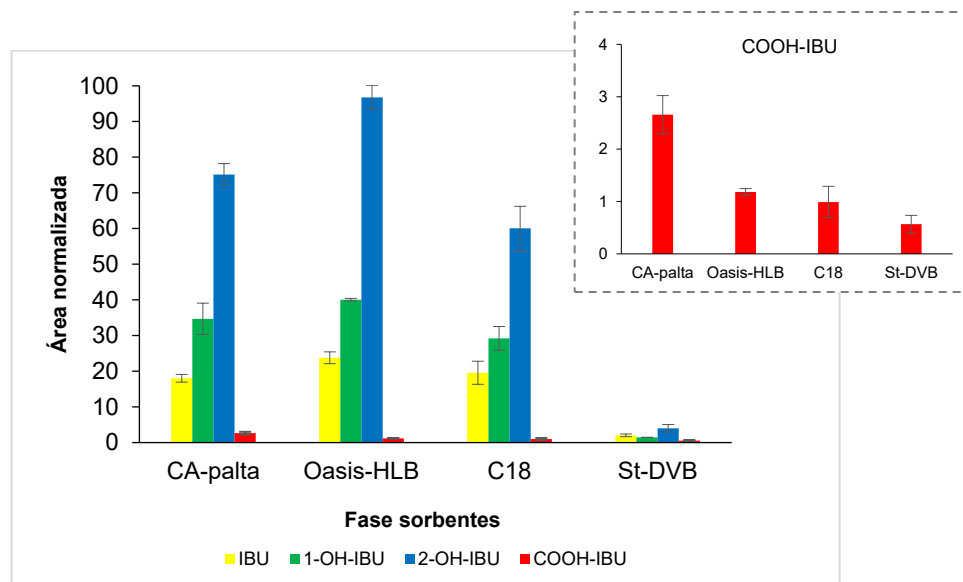


Figura 73. Comparación de fases comerciales con CA de s. de palta. Se estudió con 25mL de muestra, pH 4, en un tiempo de 90 min a 2000rpm.

Como se puede notar, el CA de semilla de palta extrajo en mayor medida los analitos comparados con la fase de St-DVB, ya que se observaron mayores respuestas cromatográficas. Con respecto a las fases de Oasis HLB y C18, el CA obtuvo respuestas similares para los compuestos. En el caso del COOH-IBU el CA mostró mayores eficiencias de extracción.

De lo observado, se concluye que el CA de semilla de palta demuestra ser una alternativa para ser empleada como fase sorbente, ya que tiene eficiencias semejantes (a Oasis HLB y C18) e incluso superiores (a St-DVB) que las fases comerciales, siendo una opción más económica, puesto que el CA proviene de un residuo agrícola.

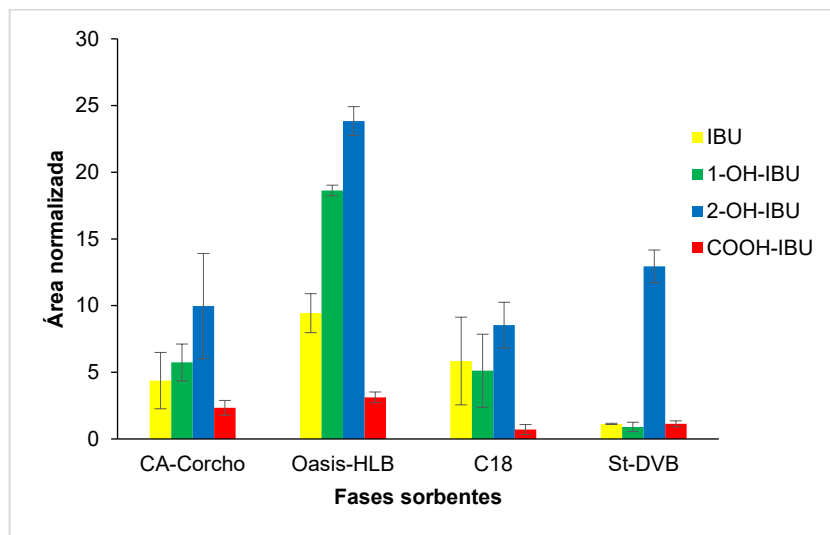


Figura 74. Comparación de fases comerciales con CA de corcho. Se estudió con 25mL de muestra, pH 2, 10%*m/v* de NaCl en un tiempo de 90 min a 2000rpm.

Con respecto al CA de corcho, debido a que se observaron grandes barras de error, se realizó un ANOVA de una vía para hacer una comparación más fiable. Solo el IBU no mostró diferencias significativas entre las fases ($p > 0,05$). En el caso de los analitos 1-OH-IBU y 2-OH-IBU el Oasis HLB tuvo una respuesta significativamente mayor ($p < 0,05$) comparadas con los otros sorbentes. Para el compuesto COOH-IBU no hubo diferencia significativa entre usar el Oasis HLB o el CA de corcho, pero si hubo diferencia significativa entre estas fases y las otras restantes, donde fueron estadísticamente superior para el CA y el Oasis HLB ($p < 0,05$).

Finalmente, a partir de lo descrito se puede considerar el CA de corcho como una opción entre las fases para determinar IBU y sus metabolitos, ya que a pesar de no mostrar respuestas superiores a Oasis HLB para algunos compuestos, permitió mostrar respuestas estadísticamente semejantes para IBU y COOH-IBU, en otros casos exhibió eficiencias de extracciones mayores que C18 y St-DVB.

Por otra parte, además de la comparación que se hizo entre los CAs y las fases comerciales, se llevó a cabo la comparación con los respectivos biochar. El biochar es el término que se le da a un material con un alto contenido de carbono, en el cual se somete a una temperatura fija de

pirólisis. Principalmente, proviene de un residuo agrícola que tiene como destino ser desechado.

Los biochar de semilla de palta y de corcho se sintetizaron utilizando los programas de temperaturas mencionados en el Esquema 11 (ver en metodología). Se aplicó el método propuesto de los correspondientes CAs y se compararon en base a las respuestas cromatográficas. Los experimentos se llevaron a cabo en duplicado. En las Figuras 75 y 76 se observan los resultados de la comparación.

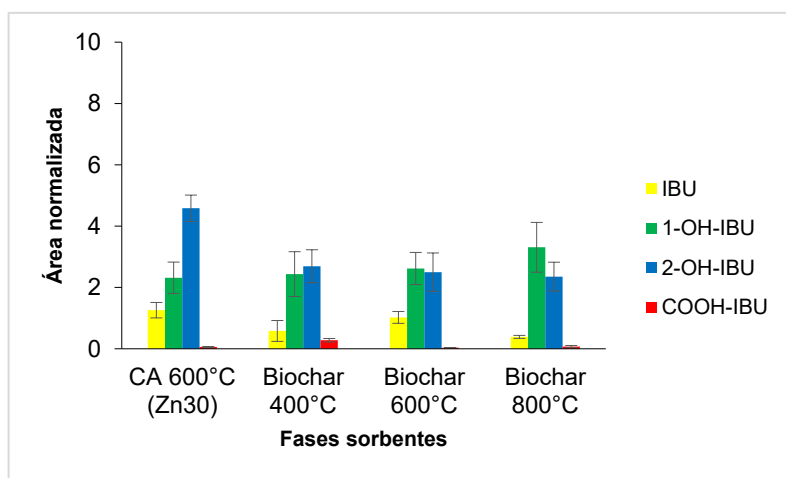


Figura 75. Comparación de CA de s. de palta con biochar sintetizado a distintas temperaturas.

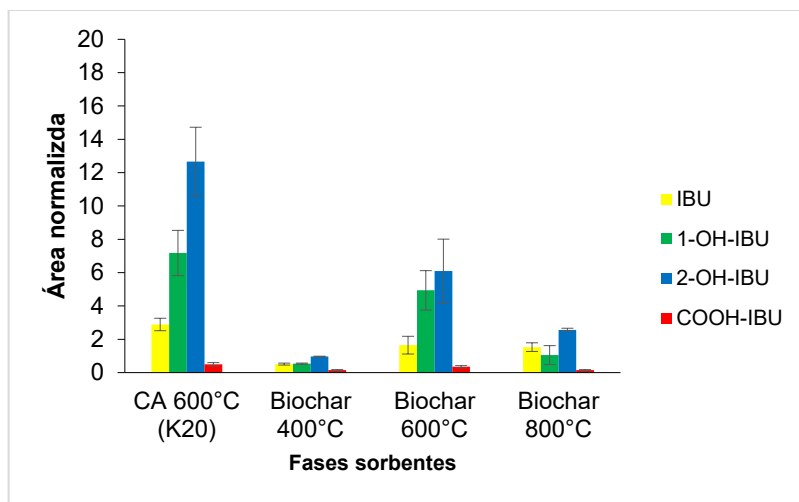


Figura 76. Comparación de CA de corcho con biochar sintetizado a distintas temperaturas.

En las dos situaciones se realizaron ANOVA de una vía para comparar las respuestas cromatográficas de los analitos. Comenzando con las fases de semilla de palta, ningún analito mostró diferencia significativa en sus respuestas ($p > 0,05$), lo que indica que independiente de la fase que se utilice, las respuestas de los analitos serán similares. Sin embargo, en términos de eficiencias de extracción fueron estadísticamente mayores con el CA y el biochar a 600°C de semilla de palta.

Por otra parte, para las fases de corcho el CA mostró respuestas analíticas significativamente mayores para el IBU y el 2-OH-IBU ($p < 0,05$). En cambio, en las respuestas de los analitos 1-OH-IBU y COOH-IBU no hubo una diferencia significativa. No obstante, las eficiencias de extracción fueron mayores para todos los analitos utilizando el CA de corcho como fase.

Por tanto, se concluye que el biochar de semilla de palta a 600°C tiene una eficiencia similar a la del CA. En el otro caso, el CA de corcho mostró mejores respuestas de los analitos comparados con los biochar y por ende tiene una eficiencia mayor.

Para hacer una comparación más completa, los biochar se caracterizaron por espectroscopia IR (Figura 77).

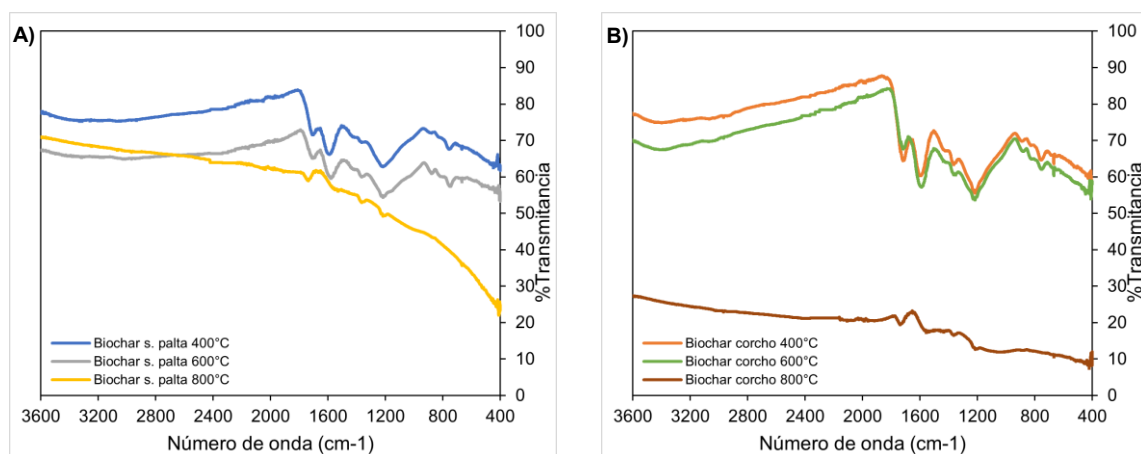


Figura 77. Espectros FTIR de diferentes biochar de s. de palta (A) y biochar de corcho (B) a distintas temperaturas.

Comenzando por los espectros **A**, se observa que los biochar de semilla de palta contienen más grupos funcionales que el propio CA de ZnCl_2 . Se puede ver que las bandas vibracionales van perdiendo sus intensidades a medida que se incrementa la temperatura de pirólisis. Se aprecia una pequeña banda vibracional alrededor de los 1700 cm^{-1} que se asocia a $\text{C}=\text{O}$, en 1600 cm^{-1} se detecta una banda correspondiente a $\text{C}=\text{C}$ y entre $1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ se logran ver bandas asociadas a $\text{C}-\text{O}$.

Por otro lado, en **B** se observa que los biochar muestran un espectro muy semejante a los carbones de corcho activados con ZnCl_2 al 20%, ya que muestran las mismas bandas vibracionales, por lo que se deduce que el corcho no se logra activar con la sal de ZnCl_2 debido a que no muestra cambios en sus espectros. Los principales grupos que se distinguen son $\text{C}=\text{O}$ (1700 cm^{-1}), $\text{C}=\text{C}$ (1600 cm^{-1}) y $\text{C}-\text{O}$ (1200 cm^{-1}).

Por último, se caracterizaron los biochar de semilla de palta y corcho mediante microscopía electrónica de barrido.

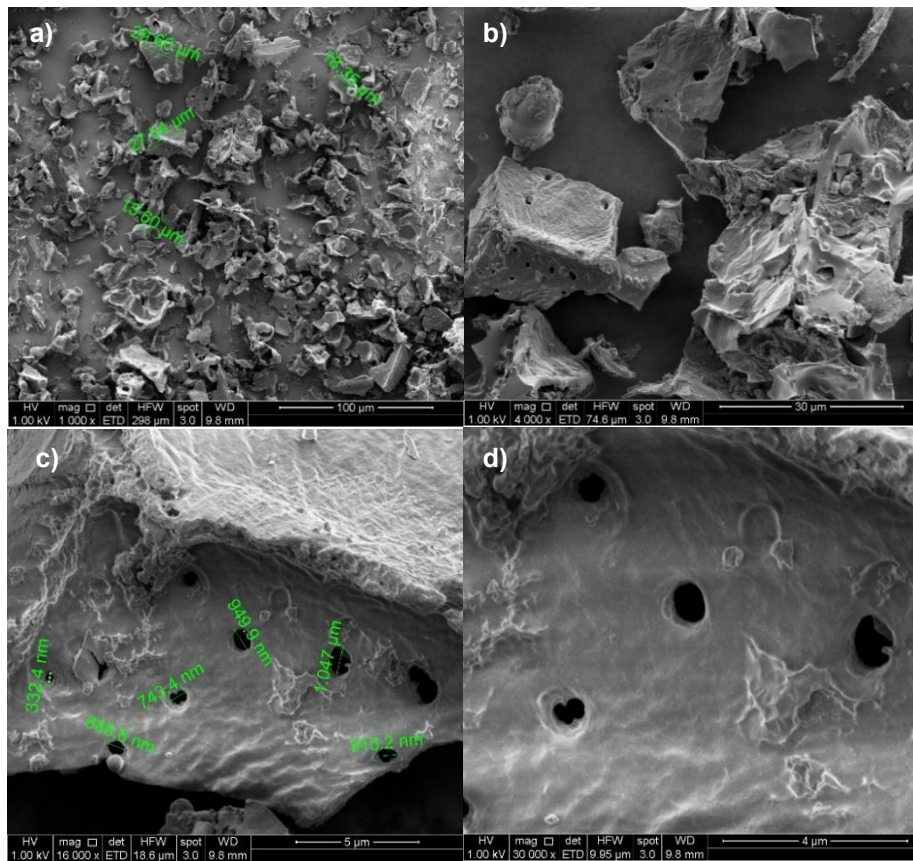


Figura 78. Micrografías SEM de biochar de semilla de palta a 600°C: a) 1000 x, b) 4000 x, c) 16000 x, d) 30000 x.

En la Figura 78 se observan las micrografías del biochar de semilla de palta a 600°C que fueron capturadas en diferentes aumentos (1000 x a 30000 x). Como se puede notar, el biochar posee una morfología similar a la del CA como el de una especie de roca amorfa, pero con superficies altamente porosas. Los tamaños de poros varían desde 332 nm a 1047 μm y los tamaños de partículas se encontraron en el rango de 15 a 27 μm. Las buenas eficiencias de extracción que se obtuvieron al compararlo con el CA se asocian principalmente a una mayor presencia de poros.

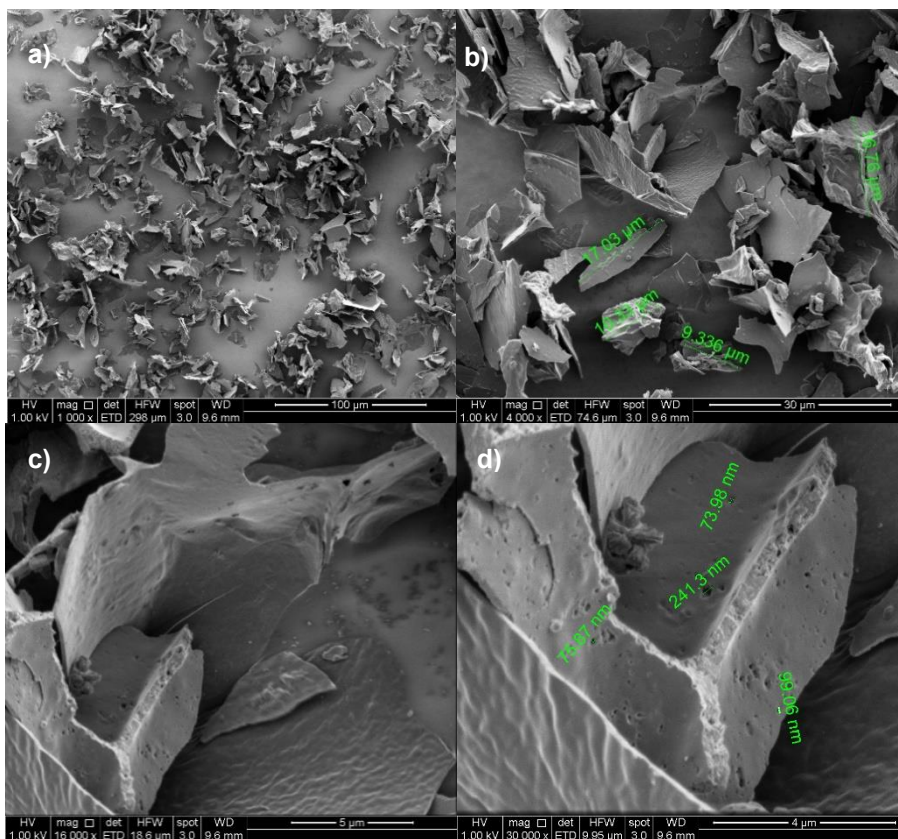


Figura 79. Micrografías SEM de biochar de corcho a 600°C: a) 1000 x, b) 4000 x, c) 16000 x y d) 30000 x.

La Figura 79 muestra el análisis SEM para el biochar de corcho a 600°C con aumentos de 1000 x a 30000 x. El biochar de corcho posee una estructura totalmente diferente al CA debido a que se observan morfologías similares al de una hoja o una lámina fisurada con una superficie rugosa y con pequeños poros en su estructura. Los tamaños de las partículas se encontraron entre 9-17 µm y los poros entre 74- 241 nm.

Dado que el foco de este estudio estaba en encontrar nuevas metodologías utilizando los carbones activados, se pretende a futuro profundizar en las condiciones óptimas de un método empleando los biochar de corcho y/o semilla de palta como fases sorbente en RDSE.

6. CONCLUSIONES

- Las fases naturales, tanto corcho como semilla de palta, usadas en la técnica de RDSE permitieron extraer solo dos analitos de interés, ibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno, desde muestras de aguas reteniéndolos con una eficiencia más baja que las fases comerciales y que los carbones activados. Sin embargo, los carbones activados de estas mismas fases permitieron extraer de forma más eficiente, comparados con su respectiva fase natural, los cuatro analitos de estudio mediante la técnica del disco-rotatorio.
- Se optimizó un método cromatográfico para determinar ibuprofeno y sus metabolitos mediante GC-MS.
- Se optimizó la extracción de los analitos utilizando la técnica de RDSE con fases sorbentes naturales (corcho y semilla de palta).
- Se demostró que el corcho laminar y la semilla de palta tienen mayor afinidad por los analitos más apolares, como ibuprofeno y 1-hidroxiibuprofeno, cuyas interacciones principales se deben a Fuerzas de Van der Waals y/o apilamiento π - π .
- Se optimizó la extracción de los analitos utilizando carbones activados como fases, a partir de materiales naturales, en RDSE.
- Se demostró que los carbones activados mejoraron la capacidad de sorción de las fases sorbentes naturales.
- Se logró la activación de los carbones dado que al compararlos con los biochar se encontraron diferencias en sus espectros FTIR y cambios en su morfología.
- Se encontró la presencia de los analitos en muestras de afluentes y efluentes, lo que indica que la planta de tratamiento de aguas El Trebal no retiene o elimina de forma exhaustiva este tipo de compuestos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., Hartemann, P. (2011). Emerging pollutants in wastewater: A review of the literatura. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 214, 442-448.
2. Jacobo-Marín, D., Santacruz de León, G. (2021). Contaminantes emergentes en el agua: Regulación en México, principio precautorio y perspectiva comparada. *Revista de Derecho Ambiental*, 1, 51-75.
3. Boshir, M., Zhou, J., Hao, H., Guo, w., Thomaidis, N., Xu, J. (2017). Progress in the biological and chemical treatment technologies for emerging contaminant removal from wastewater: A critical review, *Journal of Hazardous Materials*, 323, 274-298
4. Khan, N., Ullah, S., Ahmed, S., Haq, I., Yousefi, M., Akbar, A., Changani, F. (2020). Recent trends in disposal and treatment technologies of emerging-pollutants- A critical review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 122, 115744.
5. Moreno-Ortiz, V., Martínez, J., Kravzov-Jinich, J., Pérez-Hernández, L., Moreno-Bonett, C., Altagracia-Martínez, M. (2013). Los medicamentos de receta de origen sintético y su impacto en el medio ambiente. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 44. 17-29.
6. Petrovic, M., González, S., Barceló, D. (2002). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*. 22, 685-696.
7. Gil, M., Soto, A., Usma, J., Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + limpia*, 7, 52-73.
8. Barceló, D., López, M. (2007). Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Informe de "Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes".
9. AntoniĆ, J., Heath, E. (2007). Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 387, 1337-1342.
10. Azzouz, A., Souhail, B., Ballesteros, E. (2010) Continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals and hormones in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2956-2963.
11. Petrović, M., Hernando, M., Díaz-Cruz, M., Barceló, D. (2005). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review. *Journal of Chromatography A*, 1067, Pages 1-14.
12. Santos, L., Araújo, A., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M. (2010). Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 175, 45-95.
13. Parolini, M., Binelli, A., Provini, A. (2011). Chronic effects induced by ibuprofen on the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 74, 1586-1594.
14. Gutiérrez-Noya, V., Gómez-Oliván, M., Ramírez-Montero, M., Islas-Flores, H., Galar-Martínez, M., Dublán-García, O., Romero, R. (2020). Ibuprofen at environmentally relevant concentrations alters embryonic development, induces teratogenesis and oxidative stress in *Cyprinus Carpio*, *Science of The Total Environment*, 710,136327.
15. Instituto de Salud Pública de Chile, *Gob.cl*. (2021). Available at: <https://www.ispch.cl/noticia/isp-informa-sobre-los-medicamentos-mas-vendidos-durante-el-ano-2021/>. Consultado en diciembre, 2022.
16. Borges, K., de Oliveira, A., Barth, T., Polizel, V., Pupo, M., Bonato, P. (2011). LC-MS-MS determination of ibuprofen, 2-hydroxyibuprofen enantiomers, and carboxyibuprofen stereoisomers for application in biotransformation studies employing endophytic fungi. *Analytical and Bioanal Chemistry*, 399, 915-925 (2011).

17. Buser, H., Poiger, T., Müller, M. (1999). Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environmental Science & Technology*, 33, 2529–2535.
18. Vane, R., Botting R. (1998). Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflammation Research*, 47, 78-87.
19. Ferrando-Climent, L., Collado, N., Buttiglieri, G., Gros, M., Rodriguez-Roda, I., Rodriguez-Mozaz, S., Barceló, D. (2012). Comprehensive study of ibuprofen and its metabolites in activated sludge batch experiments and aquatic environment. *Science of The Total Environment*, 438, 404–413.
20. Burcea, A., Boeraş, I., Mihaş, C., Bănăduc, D., Matei, C., Curtean-Bănăduc, A. (2020). Adding the Mureş River Basin (Transylvania, Romania) to the List of Hotspots with High Contamination with Pharmaceuticals. *Sustainability*, 12, 10197.
21. Chopra, S., Kumar, D. (2020). Ibuprofen as an emerging organic contaminant in environment, distribution and remediation. *Heliyon*, 6, e04087.
22. Pomati, F., Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R., Vigetti, D., Rossetti, C., Calamari, D. (2006). Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells. *Environmental Science & Technology*, 40, 2442–2447.
23. Schnell, S., Kawano, A., Porte, C., Lee, L., Bols, N. (2009). Effects of ibuprofen on the viability and proliferation of rainbow trout liver cell lines and potential problems and interactions in effects assessment. *Environmental Toxicology*, 24, 157–165.
24. Marco-Urrea, E., Pérez-Trujillo, M., Vicent, T., Caminal, G. (2009). Ability of white-rot fungi to remove selected pharmaceuticals and identification of degradation products of ibuprofen by *Trametes versicolor*. *Chemosphere*, 74, 765–772.
25. Chen, Y., Guo, Z., Wang, X., Qiu, C. (2008). Sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 1184, 191-219.
26. Żwir-Ferenc, A., Biziuk, M. (2006). Solid Phase Extraction Technique – Trends, Opportunities and Applications. *Polish Journal of Environmental Studies*. 15, 677-690.
27. Psillakis, E., Kalogerakis, N. (2003). Developments in liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22, 565–574.
28. Pawliszyn, J. (2001). Solid Phase Microextraction. *Headspace Analysis of Foods and Flavors*, 73–87.
29. Cordero, C., Sgorbini B., Liberto, E., Bicchi, C., Rubiolo, P. (2009). Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Headspace Sorptive Extraction (HSSE): An Overview. *LCGC North America*, 27, 375-390.
30. Zuloaga, O., Etxebarria, N., González-Gaya, B., Olivares, M., Prieto, A., Usobiaga, A. (2020). Stir-bar sorptive extraction. Solid-Phase Extraction, *Elsevier*, 493–530.
31. Camino-Sánchez, F., Rodríguez-Gómez, R., Zafra-Gómez, A., Santos-Fandila, A., Vilchez, J. (2014). Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends, *Talanta*, 130, 388-399.
32. Richter, P., Leiva, C., Choque, C., Giordano, A., Sepúlveda, B. (2009). Rotating-disk sorptive extraction of nonylphenol from water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8598-8602.
33. A) Manzo, V., Honda, L., Navarro, O., Ascar, L., Richter, P. (2014). Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from wastewater samples by rotating-disk sorptive extraction. *Talanta*, 128, 486–492.
 B) Corrotea, Y., Aguilera, N., Honda, L., Richter, P. (2016). Determination of hormones in wastewater using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Letters*, 49, 1344–1358.
 C) Corrotea, Y., Sánchez, K., Rubio, M., Richter, P. (2014). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples into a rotating-disk microextractor and the subsequent determination by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 59, 2477–2480.
 D) Manzo, V., Ulisse, K., Rodríguez, I., Pereira, E., Richter, P. (2015). A molecularly imprinted polymer as the sorptive phase immobilized in a rotating disk extraction device

- for the determination of diclofenac and mefenamic acid in wastewater. *Analytica Chimica Acta*, 889, 130–137.
34. A) Cañas-Müller, A., Vargas del campo, M., Richter, P. (2016). Determination of triclabendazole in cattle plasma as its sulphoxide and sulphone metabolites by rotating disk sorptive extraction combined with high-performance liquid chromatography and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 61, 3195–3200.
 B) Castillo-Aguirre, A., Cañas, A., Honda, L., Richter, P. (2021). Determination of veterinary antibiotics in cow milk using rotating-disk sorptive extraction and liquid chromatography. *Microchemical Journal*. 162, 105851.
 C) Arismendi, D., Díaz, K., Aguilera-Marabolí, N., Sepúlveda, B., Richter, P. (2020). Rotating-disk sorptive extraction for the determination of sex hormones and triclosan in urine by gas chromatography-mass spectrometry: Clean-up integrated steps and improved derivatization. *Microchemical Journal*, 158, 105149.
 35. Richter, P., Arismendi, D., Becerra-Herrera, M. (2021). The fundamentals, chemistries and applications of rotating-disk sorptive extraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116209.
 36. Godage, N., Gionfriddo, E. (2020). Use of natural sorbents as alternative and green extractive materials: A critical review. *Analytica Chimica Acta*, 1125, 187-200.
 37. Chaukura, N., Gwenzi, W., Tavengwa, N., Manyuchi, M. (2016). Biosorbents for the removal of synthetic organics and emerging pollutants: Opportunities and challenges for developing countries. *Environmental Development*, 19, 84–89.
 38. Liu, J., Willför, S., Xu, C. (2015). A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 5, 31–61.
 39. Silva, S., Sabino, M., Fernandes, E., Correlo, V., Boesel, L., Reis, R. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50, 345–365.
 40. Pintor, A., Ferreira, C., Pereira, J., Correia, P., Silva, S., Vilar, V., Boaventura, R. (2012). Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Research*, 46, 3152–3166.
 41. Franke, R., Schreiber, L. (2007). Suberin — a biopolyester forming apoplastic plant interfaces. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 252–259.
 42. Graça, J. (2015). Suberin: the biopolyester at the frontier of plants. *Frontiers in Chemistry*, 3, 62.
 43. Prieur, B., Meub, M., Wittmann, M., Klein, R., Bellayer, S., Fontaine, G., Bourbigot, S. (2017). Phosphorylation of lignin: characterization and investigation of the thermal decomposition. *RSC Advances*, 7, 16866–16877.
 44. Manzo, V., Goya-Pacheco, J., Arismendi, D., Becerra-Herrera, M., Castillo-Aguirre, A., Castillo-Felices, R., Richter, P. (2019). Cork sheet as a sorptive phase to extract hormones from water by rotating-disk sorptive extraction (RDSE). *Analytica Chimica Acta*, 1087, 1-10.
 45. A) Dias, A., Simão, V., Merib, J., Carasek, E. (2013). Cork as a new (green) coating for solid-phase microextraction: determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Chimica Acta*, 772, 33–39.
 B) Dias, A., Simão, V., Merib, J., Carasek, E. (2015). Use of green coating (cork) in solid-phase microextraction for the determination of organochlorine pesticides in water by gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, 134, 409–414.
 C) Dias, A., da Silva, A., Simão, V., Merib, J., Carasek, E. (2015). A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta*, 888, 59–66.

46. A) Vieira, C., Mazurkiewicz, M., Lopez Calvo, A., Debatin, V., Micke, G., Richter, P., Rocha, E. (2018). Exploiting green sorbents in rotating-disk sorptive extraction for the determination of parabens by high performance liquid chromatography tandem electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 41, 4047-4054.
 B) Vieira, C., Mafra, G., Brognoli, R., Richter, P., Rosero-Moreano, M., Carasek, E. (2020). A high throughput approach to rotating-disk sorptive extraction (RDSE) using laminar cork for the simultaneous determination of multiclass organic micro-pollutants in aqueous sample by GC-MS. *Talanta*, 208, 120459.
47. Vivero, S., Valenzuela, B., Valenzuela B., Morales, G. (2019). Palta: compuestos bioactivos y sus potenciales beneficios en salud. *Revista Chilena de Nutrición*, 46, 491–498.
48. Araújo, R., Rodríguez-Jasso, R., Ruiz, H., Pintado, M., Aguilar, C. (2018). Avocado by-products: Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 80, 51–60.
49. Marcelo Muñoz, M. (2018). La palta chilena en los mercados internacionales. *Oficina de Estudios y Políticas Agrarias-ODEPA*, 3–4.
50. Perea-Moreno, A., Aguilera-Ureña, M., Manzano-Agugliaro, F. (2016). Fuel properties of avocado stone. *Fuel*, 186, 358–364.
51. Salazar-López, N., Domínguez-Avila, J., Yahia, E., Belmonte-Herrera, B., Wall-Medrano, A., Montalvo-González, E., González-Aguilar, G. (2020). Avocado fruit and by-products as potential sources of bioactive compounds. *Food Research International*, 109774.
52. Segovia, F., Corral-Pérez, J., Almajano, M. (2016). Avocado seed: Modeling extraction of bioactive compounds. *Industrial Crops and Products*, 85, 213–220.
53. Barbosa-Martín, E., Chel-Guerrero, L., González-Mondragón, E., Betancur-Ancona, D. (2016). Chemical and technological properties of avocado (*Persea americana* Mill.) seed fibrous residues. *Food and Bioproducts Processing*, 100, 457–463.
54. Salomón-Negrete, M., Reynel-Ávila, H., Mendoza-Castillo, D., Bonilla-Petriciolet, A., Duran-Valle, C. (2018). Water defluoridation with avocado-based adsorbents: Synthesis, physicochemical characterization and thermodynamic studies. *Journal of Molecular Liquids*, 254, 188–197.
55. Elizalde-González, M., Mattusch, J., Peláez-Cid, A., Wennrich, R. (2007). Characterization of adsorbent materials prepared from avocado kernel seeds: Natural, activated and carbonized forms. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 78, 185–193.
56. Bhaumik, M., Choi, H., Seopela, M., McCrindle, R., Maity, A. (2014). Highly Effective Removal of Toxic Cr (VI) from Wastewater Using Sulfuric Acid-Modified Avocado Seed. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53, 1214–1224.
57. Leite, A., Saucier, C., Lima, E., dos Reis, G., Umpierres, C., Mello, B., Sampaio, C. (2018). Activated carbons from avocado seed: optimisation and application for removal of several emerging organic compounds. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 7647–7661.
58. McDougall, G. (1991). The physical nature and manufacture of activated carbon. *Journal of The South African Institute of Mining and Metallurgy*, 91, 109-120.
59. Shamsabadi, A., Bazarganipour, M., Tavanai, H. (2021). An investigation on the pore characteristics of dates stone based microwave activated carbon nanostructures, *Diamond and Related Materials*, 120, 108662.
60. Gao, Y., Yue, Q., Gao, B., Li, A. (2020). Insight into activated carbon from different kinds of chemical activating agents: A review. *Science of The Total Environment*, 746, 141094.

61. González-García, P. (2018). Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1393–1414.
62. Brito, M., Veloso, C., Santos, L., Bonomo, R., Fontan, R. (2018). Adsorption of the textile dye Dianix® royal blue CC onto carbons obtained from yellow mombin fruit stones and activated with KOH and H₃PO₄: kinetics, adsorption equilibrium and thermodynamic studies. *Powder Technology*, 339, 334–343.
63. Kitson, F., Larsen, B., McEwen, C. (1996). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. Ed. *Academic Press*, 3-14.
64. Stashenko, E., Martínez, J. (2010). GC-MS: Más de un analizador de masas, ¿para qué? *Scientia Chromatographica*, 2, 25-48.
65. Moldoveanu, S., David, V. (2018). *Gas Chromatography: Derivatization, Sample Preparation, Application*. Ed. *IntechOpen*, 9-12
66. Orata, F. (2012). Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis, *Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, Ed. *InTech*, 84-104.
67. Becerra-Herrera, M., Honda, L., Richter, P. (2015). Ultra-high-performance liquid chromatography—Time-of-flight high resolution mass spectrometry to quantify acidic drugs in wastewater. *Journal of Chromatography A*, 1423, 96–103.
68. Arismendi, D., Becerra-Herrera, M., Cerrato, I., Richter, P. (2019). Simultaneous determination of multiresidue and multiclass emerging contaminants in waters by rotating-disk sorptive extraction–derivatization-gas chromatography/mass spectrometry. *Talanta*, 201, 480–489.
69. Neng, N., Mestre, A., Carvalho, A., Nogueira, J. (2011). Cork-based activated carbons as supported adsorbent materials for trace level analysis of ibuprofen and clofibrac acid in environmental and biological matrices. *Journal of Chromatography A*, 1218, 6263–6270.
70. Ng, L., Simmons, R. (1999). Infrared Spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 71, 343–350.
71. Vernon-Parry, K. (2000). Scanning electron microscopy: an introduction. *III-Vs Review*, 13, 40–44.
72. Amaringo, F., Hormaza, A. (2013). Determination of the point of zero charge and isoelectric point of two agricultural wastes and their application in the removal of colorants. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 4, 2145-6097.
73. De Blasio, C. (2019). Thermogravimetric Analysis (TGA). *Mathematische Begabungsförderung Am Gymnasium*, 91–102.
74. Mestre, A., Pires, J., Nogueira, J., Carvalho, A. (2007). Activated carbons for the adsorption of ibuprofen. *Carbon*, 45, 1979–1988.
75. Zhou, W., Yang, S., Wang, p. (2017). Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis*, 9, 1839-1844.
76. Pizzutti, I., Dias, J., Kok, A., Cardoso, C., Vela, G. (2016). Pesticide Residues Method Validation by UPLC-MS/MS for Accreditation Purposes. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27, 1165-1176.
77. Cerrato, I. Molina-Balmaceda, A., Arismendi, D., Ahumada, I. Richter, P. (2022). Cork-based passive samplers for monitoring triclosan in water samples. *Green Analytical Chemistry*, 1, 100008.
78. Hatzakis, E., Mazzola, E., Shegog, R., Ziegler, G., Lambert, J. (2019). Perseorangin: A Natural Pigment from Avocado (*Persea americana*) Seed. *Food Chemistry*, 293, 15-22
79. Yang, H., Yan, R., Chen, H., Lee, D., Zheng, C. (2007). Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*, 86, 1781–1788.

80. Pellerano, R., Romero, C., Acevedo, H., Vazquez, F. (2007). Un método de bajo costo para la determinación de cobre a nivel de vestigios en matrices de interés por espectrofotometría en fase sólida (EFS). *Química Nova*, 30, 2020-2024.
81. Cerqueira, U., Bezerra, M., Ferreira, S., de Jesus Araújo, R., da Silva, B., Novaes, C. (2021). Doehlert design in the optimization of procedures aiming food analysis – A review. *Food Chemistry*, 364, 130429.
82. Deng, H., Yang, L., Tao, G., Dai, J. (2009). Preparation and characterization of activated carbon from cotton stalk by microwave assisted chemical activation—Application in methylene blue adsorption from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 1514-1521.
83. González-García, P. (2018). Activated carbon from lignocellulosics precursors: A review of the synthesis methods, characterization techniques and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 82, 1393-1414.
84. Carvalho, A., Gomes, M., Mestre, A., Pires, J., Brotas de Carvalho, M. (2004). Activated carbons from cork waste by chemical activation with K₂CO₃. *Carbon*, 42, 672–674.
85. Ma, Y. (2016). Comparison of Activated Carbons Prepared from Wheat Straw via ZnCl₂ and KOH Activation. *Waste Biomass Valor*, 8, 549-559.
86. Xi, Y., Yang, D., Qiu, X., Wang, H., Huang, J., Li, Q. (2018). Renewable lignin-based carbon with a remarkable electrochemical performance from potassium compound activation. *Industrial Crops and Products*, 124, 747–754.
87. Hunsom, M., Autthanit, C. (2013). Adsorptive purification of crude glycerol by sewage sludge-derived activated carbon prepared by chemical activation with H₃PO₄, K₂CO₃ and KOH. *Chemical Engineering Journal*, 229, 334–343.