



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Química Inorgánica y Analítica

Laboratorio de Química Ambiental.

**“APLICACIÓN DE QUITOSANO COMO FASE SORBENTE DE ORIGEN NATURAL EN
LA MICROEXTRACCIÓN POR SORCIÓN EN DISCO ROTATORIO (RDSE) DE
TRICLOSÁN Y METILTRICLOSÁN DESDE MUESTRAS ACUOSAS”**

Memoria para optar al título de Químico

por

Iván Gonzalo Vera Quero

Profesor Patrocinante

Ms. C. Inés Ahumada T.

Codirector

Dr. Daniel Arismendi

Santiago, Chile

2022

RESUMEN

Recientemente, las fases sorbentes de origen natural emergen como una alternativa verde para la preparación de muestras con ventajas significativas sobre las fases tradicionales. Entre los materiales utilizados destacan los biopolímeros, principalmente la familia de los polisacáridos, por sus propiedades acordes a los requerimientos de la química analítica verde y los métodos de microextracción. En este estudio se emplea la técnica de extracción por sorción de disco rotatorio (RDSE) utilizando el biopolímero de quitosano (CHS) para la extracción de triclosán (TCS) y metiltriclosán (MTCS), contaminantes emergentes introducidos al medio ambiente a través de las aguas residuales domésticas, y su posterior detección y cuantificación por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Se estudiaron las vías de preparación del material sorbente de CHS y las variables químicas y de extracción involucradas en el proceso de preparación de muestras para establecer las mejores condiciones para la microextracción. También se caracterizó la lámina de CHS para determinar sus propiedades biodegradables y de estabilidad al momento de usarlo como material extractante.

Las láminas de CHS se prepararon disolviendo el compuesto en ácido acético (5% v/v). Este producto se puede reticular fácilmente, proceso que le da estabilidad, elasticidad, resistencia y dureza al material, formando una película delgada hidrofóbica. Se usó glutaraldehído (GLU) para la reacción de reticulación, la condición óptima de GLU es 0,1% en una proporción de 4:1 (CHS:GLU) a pH 5 para la preparación del biopolímero entrecruzado. La lámina se formó directamente en la cavidad del disco rotatorio depositando 500 μL de la mezcla CHS/GLU y secado durante 24 horas en estufa a 37°C.

Las condiciones óptimas de extracción se encontraron mediante diseño experimental y estudios univariados. Los valores óptimos de extracción establecidos como condiciones operacionales fueron: volumen de muestra de 40 mL, pH 4 de muestra, concentración de NaCl de 20% (p/v) para efecto salting out, velocidad de rotación de 2000 rpm y tiempo de extracción de 30 minutos. Para la elución, se emplearon 20 mL de una mezcla 1:1 de metanol y acetato de etilo. Los límites de detección y cuantificación para MTCS y TCS oscilaron entre 0,11 – 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0,27 – 0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente y las cifras de mérito dan cuenta de un método preciso, exacto y selectivo. La aplicación de láminas CHS-GLU como fase sorbente natural para microextracción conduce al uso de un material biodegradable que es fácilmente adaptable, eficiente y reutilizable.

ABSTRACT

Recently, sorbent phases of natural origin emerge as a green alternative for sample preparation with significant advantages over traditional phases. Among these materials used, biopolymers stand out, mainly the family of polysaccharides, due to their properties in accordance with the requirements of green analytical chemistry and microextraction methods. This study employs the rotating disk sorption extraction (RDSE) technique using the chitosan (CHS) biopolymer for the extraction of triclosan (TCS) and methyl triclosan (MTCS), emerging pollutants introduced into the environment through the domestic wastewater, and its detection by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The preparation routes of the CHS sorbent material and the chemical and extraction variables involved in the sample preparation process were studied to establish the best conditions for microextraction. The CHS film was also characterized to determine its biodegradable properties and stability when used as an extractant material.

CHS films were prepared by dissolving the compound in acetic acid (5% v/v), this film can be easily crosslinked, this process gives it stability, elasticity, strength, and hardness to the material, forming a hydrophobic film. Glutaraldehyde (GLU) was used for crosslinking, the optimum condition for GLU was concentration of 0.1% in a 4:1 ratio (CHS:GLU) at pH 5. The film is formed directly in the cavity of the rotating disk by depositing 500 μL of the CHS-GLU mixture and drying it for 24 hours in an oven at 37°C.

The optimal extraction conditions were found by experimental design and univariate studies. The optimal extraction values established as operational conditions were a sample volume of 40 mL, pH 4, NaCl concentration of 20% (w/v) for salting out effect, rotating speed of 2000 rpm, and extraction time of 30 minutes. For elution, 20 mL of a 1:1 mixture of methanol and ethyl acetate were used. The detection and quantification limits for MTCS and TCS ranged from 0.11 – 0.19 $\mu\text{g L}^{-1}$ and 0.27 – 0.36 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. The figures of merit account for a precise, exact and selective method. The application of CHS-GLU films as a natural sorbent phase for microextraction leads to the use of a biodegradable phase that is easily adaptable, efficient and reusable.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN.....	2
ABSTRACT	3
INDICE DE FIGURAS	6
INDICE DE TABLAS	7
ABREVIATURAS.....	8
1.- INTRODUCCIÓN	9
1.1.- Química analítica verde	9
1.2.- Preparación de Muestras	10
1.2.1.- Microextracción en fase sorbente	11
1.2.2.- Microextracción por sorción en disco rotatorio	12
1.2.3.- Fases sorbentes naturales	14
1.2.4.- Quitosano	15
1.3.- Contaminantes emergentes	19
1.3.1.- Matriz: Aguas Residuales	19
1.3.2.- Triclosán	21
1.3.3.- Metiltriclosán	24
2.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	26
2.1.- Hipótesis	26
2.2.- Objetivo general	26
2.3.- Objetivos específicos	26
3.- MATERIALES Y REACTIVOS	27
3.1.- Estándares	27
3.2.- Reactivos	27
3.3.- Solventes	27
3.4.- Gases	27
3.5.- Materiales	27
3.6.- Equipos e instrumentos	28
4.- METODOLOGÍA	29
4.1.- Protocolos y procedimientos	29
4.1.1.- Preparación de los analitos	29
4.1.2.- Condiciones cromatográficas e identificación por GC-MS	29
4.1.3.- Protocolo de derivatización	30
4.1.4.- Protocolo de extracción	30

4.2.- Propuestas de estudio y optimización de procesos	31
4.2.1.- Optimización condiciones de derivatización	31
4.2.2.- Estudios preliminares de la fase sorbente quitosano	32
4.2.3.- Caracterización de la fase CHS/GLU	33
4.2.4.- Optimización del proceso de extracción	34
4.3.- Validación del método	37
4.4.- Medición en muestras reales	39
5.- RESULTADOS Y DISCUSIONES	41
5.1.- Condiciones de derivatización	41
5.2.- Estudios preliminares de la fase sorbente	44
5.2.1.- Método de preparación de la fase CHS/GLU	44
5.2.2.- Optimización de la fase sorbente	46
5.2.3.- Caracterización de la fase CHS/GLU	48
5.3.- Optimización del proceso de extracción	53
5.4.- Validación del método	59
5.5.- Medición en muestras reales	61
6.- CONCLUSIÓN	62
Bibliografía	64

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Doce principios de la química analítica verde.....	10
Figura 2: Configuración y diseño de un disco rotatorio.....	13
Figura 3: A) Estructura del biopolímero CHS; B) Puentes de hidrogeno intramoleculares entre cadenas de CHS.....	15
Figura 4: A) Reacción primaria de CHS con glutaraldehído; B) Reacción secundaria de CHS con glutaraldehído.....	19
Figura 5: Ecociclo de aguas y nutrientes proveniente de áreas urbanas (extraído de [28]).....	20
Figura 6: Estructura molecular de TCS y su transformación ambiental a TCS-fenolato.....	24
Figura 7: Diagrama método de extracción.....	31
Figura 8: Métodos propuestos de incorporación de glutaraldehído para la formación de la lámina reticulada CHS/GLU.....	32
Figura 9: Origen de las muestras reales: Canoa, Esperanza, Afluente y Efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales “El Trebal” [49]......	40
Figura 10: Comparación de cromatogramas TIC derivatizando a las condiciones propuestas.....	41
Figura 11: Señales absolutas de los analitos TCS y MTCS a distintas condiciones de derivatización, solvente y temperatura.....	42
Figura 12: Cromatograma en modo SIM de TCS y MTCS obtenidos por el método de derivatización optimizado a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ con sus respectivos iones de cuantificación y calificación.....	44
Figura 13: Comparación de CHS/GLU 1% y CHS/GLU 0,1% por método de reticulación previo al secado.....	45
Figura 14: Discos de CHS/GLU reticulados por rotación en GLU 1%.....	45
Figura 15: Estudio de comparación del método de reticulación de CHS/GLU.....	46
Figura 16: Estudio %GLU incorporado en la fase CHS/GLU.....	47
Figura 17: Estudio de volumen de fase sorbente CHS/GLU.....	48
Figura 18: Espectro FT-IR de las membras de CHS y CHS/GLU.....	50
Figura 19: Imágenes SEM superficiales de las membras de CHS (A1 – A3) y CHS/GLU (B1-B3).....	51
Figura 20: Estudio de reutilización de la fase CHS/GLU.....	52
Figura 21: Estudio de comparación de fases sorbentes.....	53
Figura 22: Estudio de solvente de elución.....	54
Figura 23: Estudio de pH de muestra.....	55
Figura 24: Superficie de respuesta óptima para el estudio de variables de modificación iónica y salting-out.....	57
Figura 25: Superficie de respuesta óptima para el estudio de variables hidrodinámicas. El símbolo (+) en el diagrama representa la respuesta óptima encontrada por el software.....	58
Figura 26: Perfil de extracción de los analitos TCS y MTCS por RDSE.....	58
Figura 27: Curva de calibración.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Aplicaciones analíticas representativas de CHS en métodos de microextracción basada en sorbentes (extraída de [15])	17
Tabla 2: Propiedades generales y estructura del TCS (extraído de [30])	22
Tabla 3: Propiedades generales y estructura del MTCS [41].....	24
Tabla 4: Condiciones optimizadas de GC-MS.....	29
Tabla 5: Tiempo de retención (min) y iones (m/z) para cuantificación y calificación en modo SIM de los analitos.....	30
Tabla 6 : Condiciones experimentales de derivatización de los analitos TCS y MTCS.	31
Tabla 7: Solventes orgánicos empleados para la elución de los analitos.	35
Tabla 8: Matriz compuesto central para el estudio de modificación iónica y salting-out.	36
Tabla 9: Matriz Doehlert para el estudio de variables hidrodinámicas	37
Tabla 10: Repetibilidad de las condiciones de derivatización (n=2) incluyendo corrección de temperatura a la condición 3.....	43
Tabla 11: El contenido de humedad (MC), el poder de hinchamiento (SP) y la solubilidad (S) calculados (n=4) para las diferentes etapas de elaboración del sorbente CHS.....	49
Tabla 12: Carta Pareto estandarizada del efecto de %MeOH y %NaCl para TCS y MTCS.....	56
Tabla 13: Cifras de mérito del método.....	60
Tabla 14: Concentración de TCS y MTCS en muestras reales.	61

ABREVIATURAS

RDSE	Microextracción por sorción en disco rotatorio
TCS	Triclosán
MTCS	Metiltriclosán
CHS	Quitosano
GLU	Glutaraldehído
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
MSTFA	N-metiltrimetilsililtrifluoroacetamida
MC	Contenido de humedad
S	Solubilidad
SP	Poder de hinchamiento
FT-IR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
SEM	Microscopía electrónica de barrido
C18	Sílice enlazada a grupos octadecilo
DVB	Divinilbenceno
MeOH	Metanol
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
RSD	Desviación estándar relativa
EM	Efecto matriz
Re	Recuperación

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Química analítica verde

Las ciencias químicas durante años atravesaron una época de excesivo uso de recursos y falta de conocimiento sobre toxicidad, seguridad, costo y producción de desechos involucrados en sus experimentos, metodologías y procesos. Es por esto por lo que surge el concepto de química verde a fines de la década de los 90, cuando el paradigma del impacto ecológico que tienen los procesos químicos y los distintos pasos que estos conllevan comienza a tomar fuerza. La química verde se define como “el uso de técnicas y metodologías que reducen o eliminan el uso o generación de productos, subproductos, solventes, residuos, reactantes, etc. que son dañinos para la salud humana o para el medio ambiente” [1].

Bajo este marco las metodologías químico-analíticas entran en una contradicción, ya que, si bien el desarrollo de estas permite la identificación, cuantificación y monitoreo de sustancias que pueden ser perjudiciales para el bienestar del medio ambiente y del ser humano, estos métodos conllevan la generación de grandes cantidades de desechos químicos, esto debido al uso de solventes que, muchas veces, son más tóxicos que las especies que se buscaban estudiar [2]. Por esto podemos tratar la relación de la química analítica con la química verde de dos maneras. Los métodos analíticos son una herramienta esencial para la conformación y control de resultados verdes en productos químicos y tecnologías. Sin embargo, el análisis químico requiere de solventes, reactivos, energía y genera desperdicios [3].

Para subsanar esta situación se han hecho múltiples propuestas que buscan disminuir el impacto ambiental adverso que supone el análisis químico. A raíz de ello es que se formularon doce principios de la química analítica verde (Figura 1) [4] centrados en ser una guía para el desarrollo de metodologías sustentables y esencialmente convertir a los laboratorios analíticos en centros de estudio más verdes.

El desarrollo de dichas metodologías verdes depende en gran medida de la naturaleza de la muestra, la complejidad de su matriz y de la disposición de sus analitos, por este motivo es que estos principios no se pueden aplicar universalmente ya que la metodología adecuada varía según la especie química que se busque estudiar. Una metodología analítica puede ser evaluada durante todo su ciclo, según los residuos generados o el impacto al medio ambiente inducido producto de sus reactivos, por lo

tanto, cualquier evaluación ambiental debe considerar el ingreso y el resultado de cada etapa del procedimiento.



Figura 1: Doce principios de la química analítica verde.

1.2.- Preparación de Muestras

Una muestra ambiental se define como una porción de ambiente que puede ser del tipo biotopo (aire, agua o suelo) o biogénesis (plantas o animales) y que es representativa del lugar y momento del muestreo [5]. Contendida en esta muestra se encuentra la molécula o conjunto de moléculas que son de interés de análisis denominada(s) analito(s) junto a otro grupo de especies químicas que lo acompañan denominado matriz.

Como etapa fundamental de la metodología se encuentra la preparación de muestras, cuyo objetivo primario es el de remover las interferencias e incrementar la concentración de analito(s) para su medición. El uso de un procedimiento de preparación de muestras adecuado permite el análisis de muestras complejas, así como la

determinación de analitos en niveles trazas. Esto puede lograrse mediante el uso de métodos de extracción basados en la transferencia de un analito desde una fase donante a una segunda fase aceptora o de extracción, la cual debe ser compatible con el instrumento analítico que se utiliza [6]. Además de estos procedimientos de concentración/extracción, con el objetivo de traer las muestras a una forma adecuada para el análisis químico, algunas veces puede ser necesario implementar etapas de purificación y derivatización de los analitos [7].

Debido a que se pueden encontrar una enorme variedad de analitos, con distintas naturalezas y concentraciones, en matrices más o menos complejas, es que no existen métodos universales de preparación y separación de muestras. Esta misma complejidad es la que ha impulsado numerosos estudios en esta área, convirtiendo a la separación de muestras en una tendencia de desarrollo en los laboratorios analíticos. Principalmente se espera diseñar estrategias que busquen:

- (i) Minimizar, sustituir o eliminar los solventes orgánicos nocivos en los procesos de preparación de muestras analíticas [8].
- (ii) Mejorar las metodologías mediante enfoques de automatización y microextracción [9].

De esta forma se permite una disminución en los costos, número de pasos y tiempo de análisis, mientras que a su vez se desarrollan métodos de alto rendimiento.

1.2.1.- Microextracción en fase sorbente

Los métodos de microextracción son aquellos en los que se utilizan bajas cantidades de material extractante y de muestra. Han sido implementados para superar los problemas de sostenibilidad asociados a los métodos tradicionales de preparación de muestras [10]. La microextracción en fase líquida (LPME) y la microextracción en fase sorbente son algunas de las técnicas desarrolladas para reemplazar las clásicas metodologías de extracción líquido-líquido (LLE), extracción Soxhlet y extracción en fase sólida (SPE) las cuales acarreaban problemas de optimización y de impacto ambiental [6,11].

En general, ambos métodos de microextracción mencionados son las principales técnicas miniaturizadas utilizadas hoy en día. Se clasifican simplemente en base a la naturaleza del material de extracción: líquido o sólido respectivamente. Si bien la LPME

es simple y no requiere de costosos aparatos, es un proceso laborioso y de difícil automatización. A diferencia de la microextracción en fase sorbente, el cual es fácilmente automatizable y presenta otras importantes ventajas, incluyendo la recuperación y reutilización de la fase sorbente, minimización del uso de solventes orgánicos en todo el proceso, altas capacidades de preconcentración [11] y principalmente permite aprovechar las tecnologías de la ciencia de materiales para preparar sólidos diseñados para tareas específicas que pueden presentar una selectividad ajustable e interacciones de afinidad con los compuestos objetivos que se busquen extraer [12].

Para efectos de este estudio se buscó hacer uso de la capacidad de incorporación que tiene la microextracción en fase sorbente con nuevos materiales para desarrollar una metodología verde de extracción de contaminantes emergentes en muestras acuosas. Con el fin de estudiar la presencia y el impacto de estos analitos en el ambiente, se han empleado varias técnicas de preparación de muestras. Algunas de las más comúnmente usadas que cumplen con los principios de la química verde utilizadas en este tipo de matrices son la microextracción en fase sólida (SPME), extracción por sorción en barra de agitación (SBSE), dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y, la que es de interés para esta investigación, microextracción por sorción en disco rotatorio (RDSE).

1.2.2.- Microextracción por sorción en disco rotatorio

La microextracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) es un método alternativo de preparación de muestras propuesto en el año 2009 [13]. Similar a la SBSE, esta técnica está basada en la microextracción por equilibrio entre una fase sorbente y una fase acuosa que está en continuo contacto y movimiento durante la extracción [14]. El dispositivo utilizado en RDSE consta de un disco de teflón, típicamente con un diámetro de 1,5 cm, que posee una cavidad en una de sus caras en la cual es colocada la fase sorbente. En su interior, el disco contiene incrustado un imán en miniatura que permite que su rotación durante la extracción pueda ser llevada a cabo por cualquier agitador magnético común de laboratorio (Figura 2).

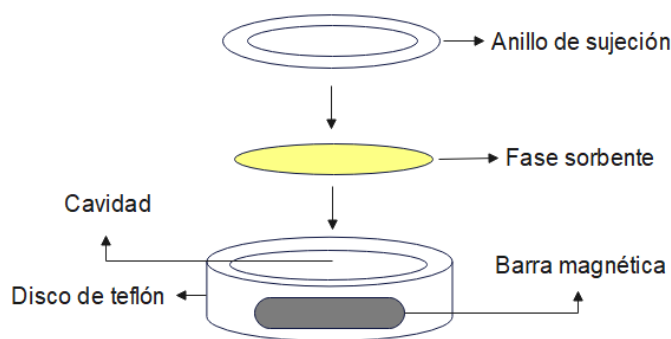


Figura 2: Configuración y diseño de un disco rotatorio.

Gracias al diseño del disco, esta metodología tiene importantes ventajas respecto a otros métodos análogos, por ejemplo, su configuración permite que la fase sorbente no tenga contacto directo con el vial de extracción, lo que la protege y facilita que el disco alcance altas velocidades sin dañar el material extractante. Esta característica, sumado a la gran área superficial de la fase sorbente respecto al volumen convierten a esta metodología de microextracción en una altamente eficiente desde el punto de vista cinético, pues la transferencia de masa de los analitos a la superficie sorbente se ve facilitada alcanzando velozmente el equilibrio de partición, optimizando así los tiempos de extracción.

Distintas estrategias de cuantificación han sido descritas para RDSE en muestras líquidas. Es de interés de esta investigación evaluar la capacidad de extracción que tiene el método en matrices de aguas residuales, lo cual incluye efluentes y afluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales. Las aplicaciones de RDSE en dicho tipo de matrices han sido principalmente por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, donde, dependiendo de las moléculas objetivo, puede ser requerida una reacción previa de derivatización para la determinación de los analitos. Se ha reportado la identificación y cuantificación con bajos límites de detección para distintas familias de contaminantes empleando fases sorbentes poliméricas y naturales [14], por lo que en este contexto se establece a la RDSE como una técnica de microextracción versátil que puede ser acoplado efectivamente con técnicas cromatográficas y es adecuada para el desarrollo de metodologías de medición de contaminantes ambientales orgánicos.

1.2.3.- Fases sorbentes naturales

Durante los últimos años la RDSE ha evolucionado siguiendo como tendencia el uso de nuevas fases sorbentes. Estos avances en el método han buscado incorporar nuevos materiales capaces de proporcionar extracciones eficientes, a la vez que se cumplen con los requisitos de la química analítica verde y se mantiene un desempeño analítico adecuado. Los adsorbentes convencionales en estas estrategias de microextracción se basan comúnmente en polímeros, como el polidimetilsiloxano (PDMS) o el divinilbenceno (DVB), que generalmente carecen de selectividad, exhiben poca capacidad de extracción hacia compuestos más polares y también muestran poca compatibilidad con la matriz y baja estabilidad térmica [11, 15].

En la enorme variedad de sorbentes explorados para la RDSE también se han utilizado otras fases comerciales como la Empore™ sílice enlazada con grupo octadecilo (C18) o el Oasis® HLB. A pesar del potencial que muestran estos sorbentes, existe una genuina preocupación respecto a su toxicidad y/o efecto nocivo de los reactivos usados en sus rutas sintéticas [8, 15], hay que tener en cuenta que el diseño de nuevas fases sorbentes solo reduce el impacto ambiental si estos materiales se aplican con la menor cantidad de modificaciones químicas posibles, por lo que es imperativo buscar verdaderas alternativas eco-amigables para la preparación de sorbentes de microextracción. Algunos de los materiales alternativos que se han implementado exitosamente son: nylon, corcho, gel de agarosa, resinas de intercambio catiónico, polímeros impresos molecularmente, quelantes, disolventes eutécticos profundos, quirales y montmorillonita modificada con líquido iónico [14].

Un tipo de material que constituye una buena fuente de recursos renovables y biodegradables son los biopolímeros, una clase de polímeros que tienen un origen natural. Este grupo incluye a los polisacáridos, proteínas y lípidos derivados de animales y plantas, siendo los polisacáridos los más comúnmente utilizados debido a sus propiedades de solubilidad en agua, gelificantes y emulsionantes [16]. Teniendo en cuenta estas características, los biopolímeros pueden cumplir con los requisitos de la química analítica verde y de los métodos de microextracción. Algunos de los polisacáridos que han sido explorados en este campo son el quitosano, celulosa, alginato y agarosa, siendo de interés para el desarrollo de la metodología propuesta en este trabajo el compuesto quitosano.

1.2.4.- Quitosano

La quitina es un polisacárido natural que tiene como unidad monomérica un *N*-acetil-D-glucosamina. Es ampliamente sintetizado en una serie de organismos vivos y, considerando la cantidad de quitina producida a escala mundial, es el segundo polímero más abundante después de la celulosa [16]. El quitosano (CHS) es un derivado desacetilado de la quitina, es obtenido bajo condiciones alcalinas o por hidrólisis enzimática en presencia de quitina deacetilasa. Cuando el grado de des acetilación es alrededor del 50% da lugar a un copolímero con unidades de *N*-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina (Figura 3A) [17], donde se ha reportado que los grupos acetilo se distribuyen de forma aleatoria a lo largo de la cadena polimérica.

Como la mayoría de los polisacáridos, el CHS es muy poco soluble en agua debido a la presencia de una gran cantidad de grupos hidroxilo (-OH) y aminos (-NH₂) en la molécula. Esto genera una tendencia a formar puentes de hidrogeno intramoleculares (Figura 3B) aumentando así su insolubilidad y entregando rigidez a la estructura del material [16, 18, 19].

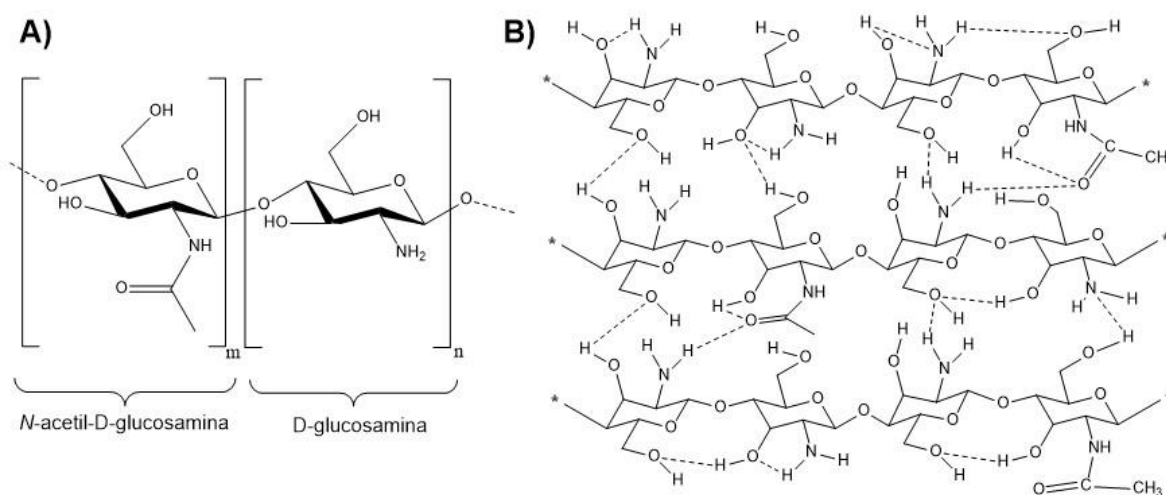


Figura 3: A) Estructura del biopolímero CHS; B) Puentes de hidrogeno intramoleculares entre cadenas de CHS.

En la práctica, el CHS solo es soluble en medios acuosos ácidos en condiciones bajo pH 6 [20]. La solubilización ocurre por la protonación del grupo funcional -NH₂ ubicado en la posición C2 de la unidad repetida D-glucosamina, formando así un polímero catiónico natural que favorece la solubilidad debido a la repulsión electrostática. Esta

característica fisicoquímica permite que el material pueda ser disuelto y procesado en diversos formatos como pueden ser geles, películas, fibras, perlas, etc. La forma catiónica de CHS facilita también los procesos de adsorción vía enlaces de coordinación, interacciones electroestáticas o iónicas (con -NH_2 en C2) y puentes de hidrogeno (con -OH en C3 y C6), esto sumado a sus características biodegradables y no tóxicas, lo vuelven un candidato ideal como material sorbente para procesos de preparación de muestras. En términos de la incorporación de este biopolímero en técnicas de extracción, se ha reportado su uso en diversas metodologías compiladas en la Tabla 1.

Tabla 1: Aplicaciones analíticas representativas de CHS en métodos de extracción basados en sorbentes tales como extracción en fase micro sólida (μ -SPE), extracción en fase micro sólida dispersiva (μ -dSPE), extracción en fase micro sólida dispersiva magnética (m- μ -dSPE) y microextracción de película delgada acoplada a extracción de cinta absorbente (TFME/STE) (extraída de [15]).

Método	Material adicional	Configuración	Analitos	Muestra	Técnica analítica	LOQ
μ -SPE	Nano tubos de carbono	Empaquetado en punta de pipeta	Sulfonamidas	Huevos y miel	LC-UV	2,15-2,98 ng g ⁻¹
μ -SPE	MIL-68(Al)	Nanofibras	Metales	Moluscos	ICP-OES	0,5 μ g L ⁻¹
μ -dSPE	Polianilina	Polvo	PAEs	Leche	LC-UV	0,4-0,5 μ g L ⁻¹
m- μ -dSPE	Fe ₃ O ₄ ; MNPs	Gel magnético	Cadmio	Plantas	FAAS	0,68 μ g L ⁻¹
m- μ -dSPE	Fe ₃ O ₄ ; MNPs; MWNCNTs & DES	Polvo magnético	ADN	Sangre	UV-Vis	-
m- μ -dSPE	MNPs & MIP	Polvo magnético	Carbamazepina	Suero y orina	LC-DAD	3,2-29,1 μ g L ⁻¹
m- μ -dSPE	Fe ₃ O ₄ ; MNP & poliofenol	Polvo magnético	Herbicidas	Aguas	GC-MS	100 ng L ⁻¹
TFME/STE	MWCNTs	Lámina	PBBs & PCBs	Aguas	GC-MS	0,12-0,6 ng L ⁻¹
TFME/STE	Nanotubos de Halloysita	Lámina	Hormonas	Aguas	LC-FD	1 μ g L ⁻¹

Hay que considerar que la estabilidad del material es muy dependiente de los cambios de pH, peso molecular y carácter hidrofílico del polímero, por lo que para controlar las propiedades mecánicas y químicas del CHS, con el fin de convertirlo en un producto factible para su uso en técnicas de preparación de muestras, es requerida una reacción de reticulación o entrecruzamiento [21, 22]. Este proceso consiste en la unión química de cadenas poliméricas a través de un enlace o secuencia de enlaces covalentes. La modificación da como resultado un aumento en la elasticidad, disminución de la solubilidad y viscosidad del polímero, además, da fuerza y tenacidad al biomaterial desarrollado [23].

Los agentes reticulantes empleados con mayor frecuencia para CHS son los dialdehídos, especies sumamente reactivas y capaces de polimerizar en medios acuosos. Entre estos reactivos el glutaraldehído (GLU) es considerado como uno de los más utilizados, ya que, además de su alta estabilidad, se ha demostrado que no afecta la biodegradabilidad del material [24]. En este caso, la reacción de entrecruzamiento transcurre de dos formas. Una reacción primaria a través de la formación de una base de Schiff entre los grupos aldehídos de la molécula de GLU y los grupos aminos libres del polímero CHS (Figura 4A) y una reacción secundaria vía formación de acetales entre los grupos hidroxilo de CHS y los aldehídos disponibles de GLU (Figura 4B) [21].

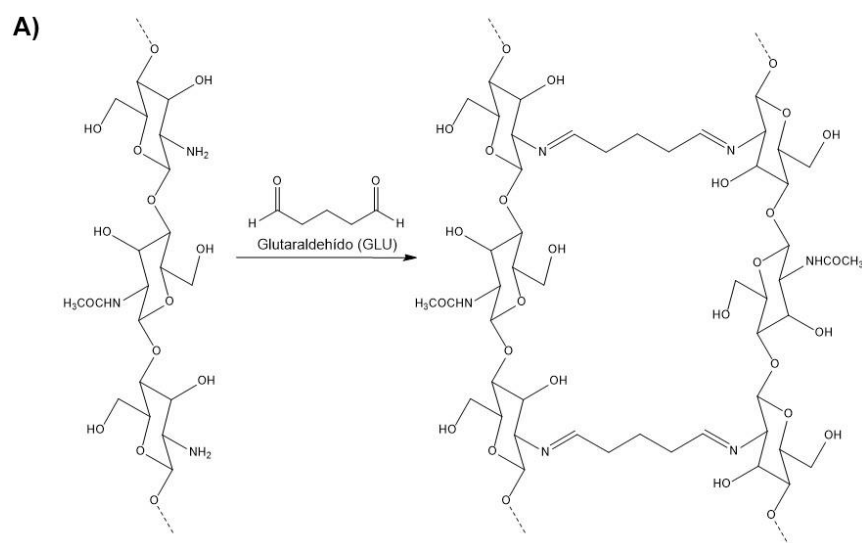


Figura 4: cont.

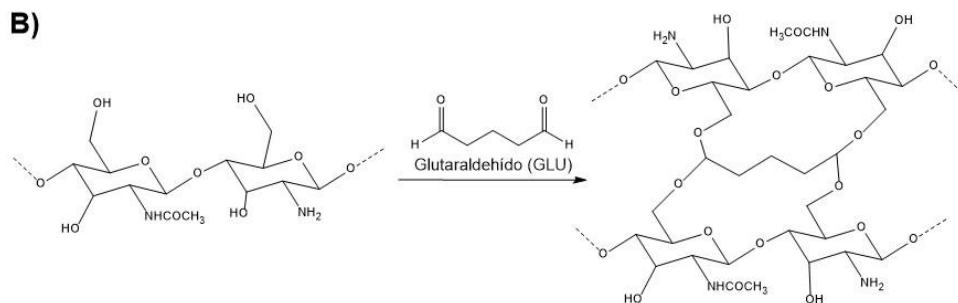


Figura 4: A) Reacción primaria de CHS con glutaraldehído; B) Reacción secundaria de CHS con glutaraldehído.

La reticulación con glutaraldehído produce estructuras hidrofóbicas en la cadena polimérica, las cuales interfieren en las propiedades higroscópicas y de permeabilidad iónica y cambian también las características mecánicas de la molécula de CHS [25]. Como resultado el producto CHS/GLU es más estable que el CHS puro, y su mayor hidrofobicidad lo convierte en un material adecuado para ser usado en medios acuosos.

La basta mayoría de los métodos desarrollados han sido usados para la extracción de analitos orgánicos que cubren desde fármacos antibióticos, pesticidas y otros contaminantes emergentes, hasta compuestos bioactivos de origen natural en distintas matrices acuosas (Tabla 1). El uso de fases sorbentes basadas en CHS nunca han sido implementadas en la técnica de RDSE, por lo que el presente trabajo constituye el primer estudio de este biomaterial asociado a dicho método de extracción.

1.3.- Contaminantes emergentes

1.3.1.- Matriz: Aguas Residuales

El agua es una riqueza natural indispensable para la vida, la salud humana, los ecosistemas y el desarrollo socioeconómico de los asentamientos humanos. Durante décadas el aumento poblacional ha sido progresivo y ha estado delimitado por las condiciones geográficas del entorno donde este se desarrolla. Esto ha resultado en un desequilibrio entre las necesidades hídricas derivadas del crecimiento demográfico y económico y la disponibilidad de las aguas [26]. En consecuencia, el acceso al recurso hídrico es cada vez más escaso y ha presentado un claro deterioro en su calidad debido al uso de este como medio de eliminación de desechos de origen antrópico.

Las aguas cuya calidad se ha visto alterada por la actividad humana se denominan aguas residuales. En Chile, al año 1284 millones de m³ de aguas servidas son tratadas y se espera que esta demanda aumente a través de los años [27], siendo la principal causa la creciente urbanización e industrialización. Esta generación de grandes volúmenes de aguas residuales representa una preocupación ambiental, debido a que esto afecta negativamente a la demanda de agua dulce y, además, implica la liberación de grandes cantidades de desechos al medio ambiente.

Una forma de sobrellevar esta situación son las plantas de tratamientos de aguas residuales que, a través de operaciones de carácter fisicoquímico y biológico, buscan eliminar y/o reducir de contaminantes o características no deseables los desechos acuosos [28]. Los métodos de tratamientos de agua son capaces de aportar agua reutilizable y limpia captando las aguas depuradas como afluentes, y descargándola una vez tratada como efluente sobre los cuerpos receptores de agua. Además, permite la obtención de valiosos recursos como energía, biosólidos y fertilizantes. En la figura 5 se ilustra esquemáticamente el ciclo del agua residual y de nutrientes obtenidos por este proceso en centros urbanos.

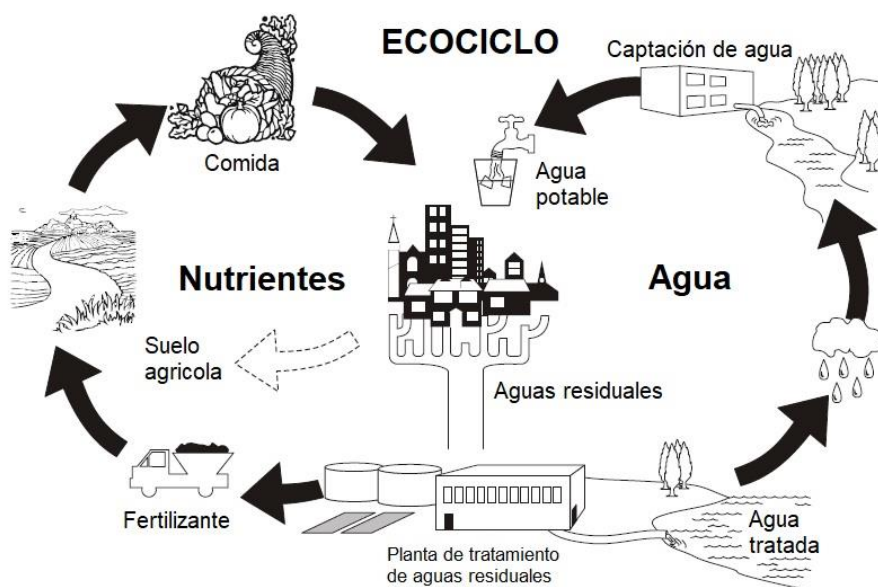


Figura 5: Ecociclo de aguas y nutrientes proveniente de áreas urbanas (extraído de [28]).

Tradicionalmente los estudios para mejorar la calidad del agua se han centrado en el tratamiento de nutrientes, bacterias, metales pesados y contaminantes prioritarios que tienen un conocido efecto nocivo para la salud como pesticidas o productos químicos

industriales [29]. Sin embargo, en décadas recientes se han detectado en ambientes acuáticos, una serie de contaminantes orgánicos sintetizados por el ser humano que afectan significativamente la calidad de las aguas y no son considerados en el control del tratamiento de aguas.

Estos nuevos contaminantes pertenecen a distintas clases de compuestos y poseen diversos orígenes. Se encuentran en cantidades trazas en los cuerpos de agua, típicamente se han detectado en concentraciones que van desde los ng L^{-1} hasta los $\mu\text{g L}^{-1}$. Este grupo de contaminantes es conocido como contaminantes emergentes, pues a pesar de estar presente en los sistemas de agua, solo recientemente se ha reconocido como contaminantes importantes.

Este grupo incluye compuestos derivados de productos farmacéuticos y de cuidado personal, pesticidas y hormonas, los cuales son persistentes ambientalmente y afectan negativamente a la salud humana y la biota acuática, pueden provocar genotoxicidad, disrupción endocrina y tienen la capacidad de bioacumularse en organismos de la cadena alimenticia acuática y en los seres humanos [29].

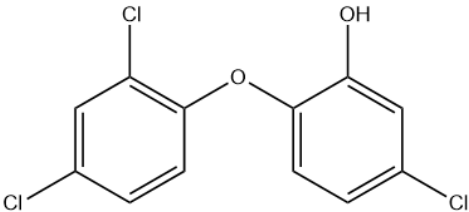
La atenuación natural y los procesos de tratamiento convencionales no son capaces de eliminar estos microcontaminantes de las aguas residuales, superficiales y potables. Es por esto que el desarrollo de nuevas metodologías analíticas de alta sensibilidad son la mejor herramienta para el estudio de estos compuestos como contaminantes y como biomarcadores de exposición en matrices ambientales y biológicas respectivamente, pudiendo así cumplir una función de biomonitoreo para la remediación y evaluación de cambios en el medio que el contaminante se encuentra y, a su vez, ayudar a comprender como interacciona este con su entorno.

1.3.2.- Triclosán

El triclosán (TCS), es un agente antimicrobiano sintético de amplio espectro utilizado en productos de cuidado personal como champús, jabones, desodorantes, cosméticos, lociones y cremas para el cuidado de la piel, enjuagues bucales y pastas dentales. Este compuesto corresponde a un éter bifenílico halogenado de fórmula molecular 5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol comercialmente distribuido como IRGASAN DP 300. La mayoría de los productos que tienen TCS se aplican de forma externa al cuerpo humano, por lo que no sufre alteraciones metabólicas en su uso y normalmente son vertidos en las aguas residuales domésticas, acabando así en las plantas de

tratamiento de aguas residuales. Las propiedades destacadas del TCS respecto a su efecto ambiental e importantes para el desarrollo de la metodología propuesta son presentadas en la Tabla 2.

Tabla 2: Propiedades generales y estructura del TCS (extraído de [30])

CAS No.	3380-34-5
Estructura	
Formula Molecular	$C_{12}H_7Cl_3O_2$
Uso	Antimicrobiano, antiséptico y desinfectante
Naturaleza	Hidrofóbica
Peso molecular	289,54
Constante de disociación (pKa) (20°C)	7,9
Constante de Henry (H_c) ($atm\ mol^{-1}\ m^{-3}$)	$1,5 \times 10^{-7}$ (25°C)
Coefficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$)	4,76
Solubilidad	$12\ mg\ L^{-1}$ (25°C)

El TCS es un compuesto poco soluble, poco volátil, hidrolíticamente estable y con una alta capacidad de adsorción debido a su alto valor de $\log K_{ow}$ 4,76. Estas características fisicoquímicas son indicadores de un potencial de bioacumulación y de persistencia ambiental. Se ha reportado que una gran parte del producto TCS queda retenido por sorción en los biosólidos producidos por sistemas de tratamientos de aguas que emplean lodos activados junto con digestión anaeróbica de biosólidos [31, 32] y otra fracción importante persiste y es liberada en los sistemas fluviales [33]. Por lo tanto, las vías importantes de liberación de TCS al medio ambiente incluyen la descarga de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales en aguas superficiales y la aplicación de biosólidos a la tierra cuando estos son empleados como fertilizantes en suelo agrícola.

En la bibliografía revisada, se ha expuesto que en las muestras acuosas correspondientes a los cursos de agua relacionados a las plantas de tratamiento de aguas

presentan concentraciones de TCS variadas a niveles traza, siendo informados los valores en el rango de 3,8 a 16,6 µg/L para el afluente y concentraciones en el rango de 0,2 a 2,7 µg/L para el efluente final [34].

Los productos que contienen TCS en su formulación, típicamente lo aplican en un rango de concentración que va desde los 0,1% a 0,3% (p/p). A estos niveles la molécula presenta una actividad bacteriostática de amplio espectro, inhibiendo la enzima enoil reductasa implicada en la síntesis de ácidos grasos y actuando efectivamente contra bacterias del tipo Gram positivo y Gram negativo, también es activo contra hongos y virus [35]. El mecanismo de acción del TCS es similar al de algunos fármacos antibióticos que afectan al mismo sistema enzimático, por lo que la interacción con objetivos fisiológicos conduce a numerosos mecanismos de resistencia que pueden provocar resistencia cruzada, provocando la aparición de cepas bacterianas resistentes tanto al TCS como a estos medicamentos antibióticos [35,36].

Toxicológicamente el TCS presenta una baja toxicidad aguda [37], sin embargo, posee similitudes estructurales respecto a las hormonas tiroideas, estrogénicas y androgénicas, volviéndolo un potencial disruptor del sistema endocrino. El TCS posee la capacidad de atravesar con facilidad las barreras biológicas, lo que le permite acumularse en tejidos lipídicos, hígado, cerebro, sangre e incluso leche materna de organismos vivos [38]. Esto puede ocasionar un efecto adverso en las hormonas tiroideas y sexuales incrementando el riesgo de padecer cáncer. Además, estudios han demostrado que el TCS afecta negativamente a la función endocrina, el control hormonal de la homeostasis y la resistencia antibiótica [37,39], es por esto que el compuesto es considerado un contaminante emergente prioritario y debe regularse su utilización en todos los productos.

A pesar de ser una molécula químicamente estable el TCS es capaz de degradarse en el medio ambiente bajo ciertas condiciones. Cuando el pH del medio en que se encuentra es mayor a su pKa, o sea, mayor a 7,9, predomina la forma TCS-fenolato del compuesto y se convierte a su estado fenólico cuando el pH del medio es inferior a 7,9 [30]. El fenolato del TCS corresponde a un producto reactivo fotodegradable, por lo que, ambientalmente, se espera la transformación y formación de derivados, subproductos o metabolitos dependiendo en el medio en que este se encuentre. En la Figura 6 se observa la transición desde el compuesto fenólico a su forma fenolato.

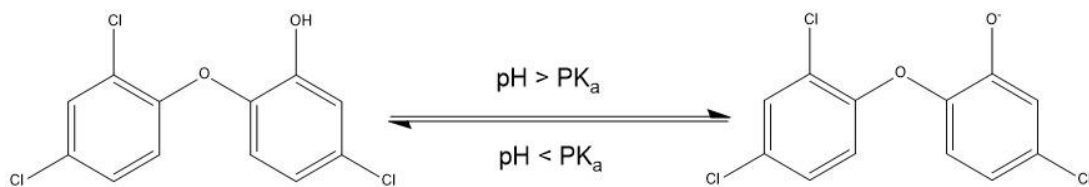


Figura 6: Estructura molecular de TCS y su transformación ambiental a TCS-fenolato.

1.3.3.- Metiltriclosán

El principal subproducto derivado del TCS es el metiltriclosán (MTCS), metabolito metilado de fórmula 2,4-dicloro-1-(4-cloro-2-metoxifenoxi)benceno cuya presencia ha sido detectada tanto en los efluentes como en los afluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales, siendo medida una concentración mayor en el primero de estos en cantidades traza cercanas a $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ [34]. La presencia de niveles más altos de MTCS en el efluente indica la formación de esta molécula *in situ* en la planta de tratamientos, la mayoría de los informes sugieren que el MTCS se forma a través de la metilación bacteriana del TCS y, a su vez, los peces y las plantas también tienen O-metilasa constitutivas que podrían producir MTCS a partir de TCS *in vivo* [40]. Las propiedades relevantes del MTCS son recogidas en la Tabla 3.

Tabla 3: Propiedades generales y estructura del MTCS [41].

CAS No.	4640-01-1
Estructura	
Formula Molecular	$\text{C}_{13}\text{H}_9\text{Cl}_3\text{O}_2$
Uso	Metabolito de la molécula TCS
Naturaleza	Hidrofóbica
Peso molecular	303.57
Constante de disociación (pKa) (20°C)	-3,7 (predicha)
Constante de Henry (H_c) ($\text{atm mol}^{-1} \text{m}^{-3}$)	-
Coefficiente de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$)	5,2
Solubilidad	$0,4 \text{ mg L}^{-1}$ (25°C)

El MTCS es solo un poco más hidrofóbico que el TCS ($\log K_{ow}$ 5,2), es relativamente lipofílico y estable en el medio ambiente, pues a diferencia de su par, este compuesto presenta una tendencia a resistir la fotodegradación a niveles de pH típicos de las aguas superficiales [39], lo que hace que sea más probable que se bioacumule en el tejido graso [30]. A pesar de que el MTCS presenta una mayor afinidad a bioacumularse y a persistir en el medio ambiente, los reportes indican que el efecto toxicológico de este es menor que el del TCS [40, 41].

Las concentraciones de MTCS basadas en lípidos detectadas en peces fueron considerablemente más altas que las concentraciones en las aguas superficiales [41], lo que indica una bioacumulación significativa del compuesto. Para los organismos acuáticos, los posibles mecanismos de absorción de contaminantes lipofílicos son la absorción directa del agua a través de las superficies expuestas, principalmente branquias (bioconcentración), y también a través del consumo de alimentos (biomagnificación). Se ha demostrado que algunas especies acuáticas son capaces de desmetilar el MTCS en un proceso lento, formando TCS y convirtiéndolo rápidamente en conjugados [42]. Este proceso de biotransformación puede ser un vector de transferencia de TCS a partir de MTCS desde el medio ambiente hasta los consumidores de mayor nivel en la cadena trófica, incluidos los humanos.

Conociendo las propiedades fisicoquímicas, estructurales y efectos ambientales de ambos analitos se evaluó y optimizó la eficiencia del método de extracción propuesto y se establecieron las condiciones cromatográficas adecuadas para la separación y detección de TCS y MTCS.

2.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1.- Hipótesis

“Triclosán y metiltriclosán podrán ser extraídos y cuantificados con alta precisión y exactitud mediante el uso de quitosano como fase sorbente de origen natural en la extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) acoplado a GC-MS”.

2.2.- Objetivo general

“Desarrollar una metodología analítica de extracción desde muestras acuosas que sea eficiente, precisa y eco-amigable para la preconcentración de TCS y MTCS, a través de la técnica analítica de RDSE con una fase sorbente de quitosano y posterior determinación con GC-MS”.

2.3.- Objetivos específicos

1. Desarrollar un método por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS) para la separación, identificación y cuantificación de TCS y MTCS.
2. Evaluar distintas condiciones experimentales para la formación de la lámina de CHS.
3. Caracterizar las propiedades físicas y químicas de la película delgada de CHS.
4. Estudiar las variables químicas que influyen en la extracción: pH, fuerza iónica y efecto *salting out*.
5. Optimizar las variables hidrodinámicas de extracción: Volumen de muestra, tiempo de extracción y velocidad de agitación mediante análisis univariado o multivariado.
6. Estudiar las condiciones de elución de los analitos desde la fase de CHS.
7. Determinar las cifras de mérito asociadas a la estrategia analítica desarrollada.
8. Aplicar la metodología propuesta para el análisis de matrices ambientales.

3.- MATERIALES Y REACTIVOS

3.1.- Estándares

- Triclosán (5-cloro-2-(2,4-diclorofenoxi)fenol), CAS 3380-34-5, Dr. Erhenstofer
- Metiltriclosán (2,4-dicloro-1-(4-cloro-2-metoxifenoxi)benceno), CAS 4640-01-1, Dr. Erhenstofer.
- TCS-D3 (5-cloro-2-(2,4-dicloro-3,5,6-trideuteriofenoxi)fenol), CAS 1020719-98-5, Dr. Erhenstofer.
- Estándar interno PCB 77, CAS 32598-13-3, Dr. Erhenstofer.

3.2.- Reactivos

- Quitosano (poli(D-glucosamina)), peso molecular medio, CAS 9012-76-4, Sigma-Aldrich.
- Glutaraldehído (C₅H₈O₂), 25% solución acuosa, CAS 111-30-8, Alfa Aesar.
- N-metil-N-trimetil-trifluoroacetamida (MSTFA) para derivatización en GC, LiChropur™ ≥ 98,5%, CAS No 24589-78-4, SIGMA-ALDRICH.
- Ácido acético glacial (CH₃COOH) 100% anhidro, CAS 64-19-7, Merck.
- Hidróxido de amonio (NH₄OH) 24,4% solución acuosa, CAS 1336-21-6, ChemiX.
- Ácido clorhídrico (HCl) fumante 37%, CAS 7647-01-0, Merck.
- Hidróxido de sodio (NaOH) en perlas EMSURE®, CAS 1310-73-2, Merck.

3.3.- Solventes

- Metanol (MeOH), Acetato de etilo (AcOEt), acetonitrilo (ACN), cloroformo (CHCl₃), grado LC-MS y HPLC, Merck.
- Agua ultrapura.

3.4.- Gases

- Nitrógeno (N₂), pureza ≥ 99,995%, Linde.
- Helio (He), pureza ≥ 99,999%, Indura.

3.5.- Materiales

- Viales ámbar de vidrio de extracción de 10, 25, 40 y 60 mL.

- Viales ámbar de vidrio de derivatización de 2 mL con tapa sólida.
- Viales ámbar de vidrio de inyección cromatográfica de 2 mL con tapa con septa.
- Insertos de forma cónica con resortes de plástico.
- Disco rotatorio de teflón con cavidad y anillo de teflón.
- Micropipetas 20-200 μL .
- Micropipetas 100-1000 μL .
- Puntas de micropipetas de 200 y 1000 μL .
- Pipetas Pasteur, Hirschmann.
- Material de vidrio; probeta, vaso precipitado, botella, matraz de aforo (10mL, 25mL, 50mL), pipeta volumétrica (20 mL), placas de Petri.
- Unidades de filtro de vacío de PVDF.
- Papel indicador de pH.
- Fases sorbentes comparativas para RDSE: Sílice enlazada a grupos octadecilo (C18), estireno-divinilbenceno (St-DVB) y Oasis® HLB.

3.6.- Equipos e instrumentos

- Simplicity® Water Purification System, Millipore, Merck.
- Balanza analítica Precisa 125A, Swiss Quality
- Agitador magnético 0-1250 rpm, Heidolph.
- Estufa de secado, VWR.
- Multi agitador magnético de 10 posiciones, Lab Companion™.
- Vortex Mixer MX-S, DLab.
- Evaporador con corriente de nitrógeno y baño termostático TurboVap® LV, Biotage.
- Placa calefactora VWR® Standard Heatblock.
- Espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Nicolet iS5, Thermo Scientific.
- Cromatógrafo de gases (GC) Thermo Scientific TRACE 1300 con detector selectivo de masas (MS) Thermo Fisher Scientific ISQ.

4.- METODOLOGÍA

4.1.- Protocolos y procedimientos

4.1.1.- Preparación de los analitos

A partir de los estándares individuales de TCS y MTCS se preparó una solución multi estándar de 1 mg L^{-1} . Para ello, en primer lugar, se elaboró una solución *stock* de 10 mg L^{-1} que contiene ambos analitos en dicha concentración. En la elaboración de esta solución *stock* se tomaron alícuotas de aproximadamente $100 \mu\text{L}$ de cada estándar dependiendo de su pureza y se aforaron en un matraz volumétrico de 10 mL con metanol, la solución resultante fue almacenada en un vial ámbar sellado a 4°C . Posteriormente, se preparó la solución multi estándar de 1 mg L^{-1} tomando una alícuota de 1 mL de la solución *stock* de 10 mg L^{-1} y llevándola a un matraz de aforo de 10 mL con metanol. La solución multi estándar de 1 mg L^{-1} fue almacenada igualmente en un vial ámbar refrigerado y sellado para tenerla a disposición en los distintos experimentos realizados. De la misma forma se preparó una solución de PCB 77 1 mg L^{-1} que funcionó como estándar interno en todos los ensayos desarrolladas en este trabajo.

4.1.2- Condiciones cromatográficas e identificación por GC-MS

Las condiciones cromatográficas se tomaron de métodos previamente desarrollados en el mismo laboratorio de química ambiental [43] con ciertas modificaciones. En la Tabla 4 se muestran las condiciones de trabajo del sistema GC-MS.

Tabla 4: Condiciones optimizadas de GC-MS.

Cromatógrafo de Gases	Espectrómetro de Masas
Volumen de inyección: $2 \mu\text{L}$	Tipo de Fuente: Ionización
Modo Inyección: Splitless	Electrónica (EI)
Temperatura del inyector: 250°C	Analizador: Cuadropolo Simple
Rampas de calentamiento:	(ISQ)
$C_0 = 75^\circ\text{C} \times 1 \text{ min}$	Temperatura línea de
$C_1 = 220^\circ\text{C} \text{ a } 20^\circ\text{C min}^{-1}$	transferencia: 300°C
$C_2 = 240^\circ\text{C} \text{ at } 5^\circ\text{C min}^{-1}$	Temperatura de la fuente: 250°C
$C_2 = 300^\circ\text{C} \text{ at } 30^\circ\text{C min}^{-1} \times 2 \text{ min}$	Dwell time: $0,1 \text{ s}$ x cada m/z .

Gas de Arrastre: Helio (He)

Flujo: 1 ml min⁻¹

Tiempo de análisis: 16 min

Solvent delay: 6 min

Para llevar a cabo la identificación de los analitos y con el fin de eliminar interferencias y aumentar la sensibilidad se optó por utilizar el método SIM. El tiempo de retención (TR.) y los iones de cuantificación y calificación fueron determinadas mediante la inyección individual de los estándares analíticos siguiendo el correspondiente protocolo de derivatización. En la tabla 5 se resumen los TR de las señales registradas y los iones monitoreados para los analitos TCS y MTCS.

Tabla 5: Tiempo de retención (min) y iones (m/z) para cuantificación y calificación en modo SIM de los analitos.

Analito	TR. (min)	Ion cuantificador	Ion calificador
		m/z	m/z
TCS	11,80	302	304
MTCS	12,10	345	347

4.1.3- Protocolo de derivatización

La metodología de derivatización se desarrolló usando el multiestándar de los analitos preparado previamente. Para esto a 100 µL de la solución se añadieron a un vial de 2 mL y fueron evaporados a sequedad bajo corriente de N₂. Luego, la solución se reconstituyó en 100 µL de mezcla derivatizante 1:1 de MSTFA/AcOEt. La reacción se llevó a cabo en una placa calefactora a 70°C por 30 minutos, pasado este tiempo se dejó reposar hasta temperatura ambiente, y luego, se le agregaron 20 µL de estándar interno PCB 77. La muestra resultante se traspasó a los viales de inyección para su medición en el equipo GC-MS.

4.1.4.- Protocolo de extracción

A una alícuota de 20 mL de muestra dispuesta en un vial se le añadió el disco rotatorio en cuya cavidad se encuentra sujeta la fase sorbente propuesta de CHS. La

extracción se realizó aplicando una velocidad de rotación de 2000 rpm por 30 min. Posteriormente, la fase acuosa restante se desechó y el disco fue extraído, lavado cuidadosamente con agua desionizada y depositado en un nuevo vial. Posteriormente, se agregó 10 mL de una mezcla MeOH/AcOEt (1:1) para la elución de los analitos desde el disco, la cual se llevó a cabo a 2000 rpm por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, el eluato se traspasó a un vial ámbar donde se evaporó a sequedad para su derivatización y análisis por GC-MS de acuerdo a 4.1.3. El diagrama del proceso de extracción se muestra en la Figura 7.

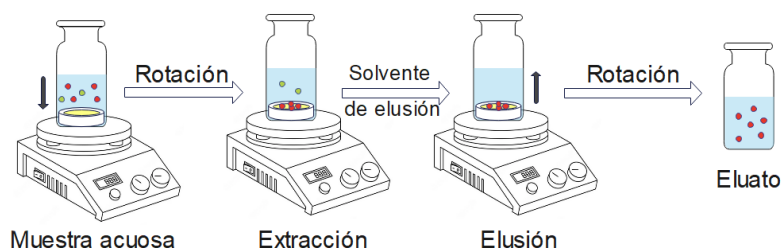


Figura 7: Diagrama método de extracción

4.2.- Propuestas de estudio y optimización de procesos

4.2.1.- Optimización condiciones de derivatización

Se evaluaron cuatro condiciones de derivatización de los analitos TCS y MTCS. Cada reacción de derivatización se desarrolló por duplicado con 50 μ L de MSTFA en las condiciones presentadas en la Tabla 6.

Tabla 6 : Condiciones experimentales de derivatización de los analitos TCS y MTCS.

Condición	Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)	Solvente (50 μ L)
1	80	30	Piridina
2	Ambiente	30	Piridina
3	80	30	AcOEt
4	Ambiente	30	AcOEt

4.2.2.- Estudios preliminares de la fase sorbente quitosano

Elaboración de solución de quitosano

Para la fase sorbente se preparó una solución 1% masa-volumen (p/v) de CHS en ácido acético (CH_3COOH) al 5% volumen-volumen (v/v) [20] en constante agitación. Transcurridas 24 horas aproximadamente se formó un gel ácido de CHS que fue usado para fabricar la lámina utilizada como material extractante.

Elaboración de la lámina de CHS/GLU

Como metodologías para la reacción de reticulación CHS/GLU y para la formación de la lámina sorbente, dos vías de incorporación del reactivo GLU fueron propuestas. Posterior a la preparación de la solución 1% de CHS, la mezcla se ajustó a pH 5 con gotas de solución de NH_4OH al 10%, ya que, a pH neutro o ligeramente inferior, los grupos NH_2 son protonados y, por lo tanto, están disponibles para una reacción eficaz con GLU. Una vez realizado este paso, se procedió a preparar la fase sorbente de CHS/GLU de dos formas distintas. En la primera alternativa se incorporó el reactivo GLU previo a la etapa de secado en estufa de la solución y en la otra se reticuló la lámina seca de CHS por rotación. Ambas propuestas se encuentran detalladas en la Figura 8.

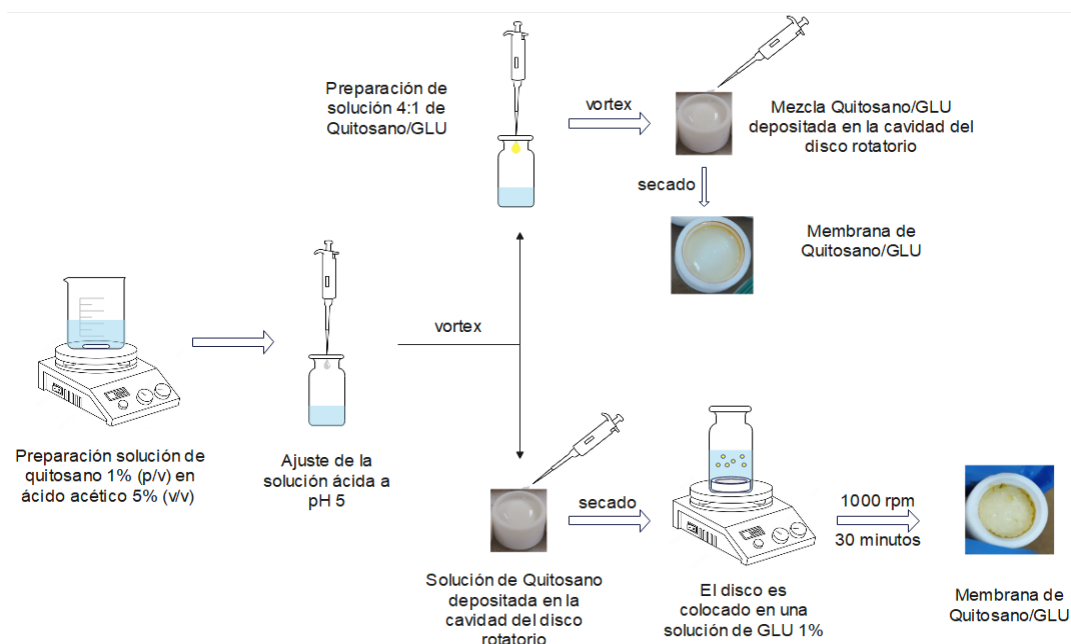


Figura 8: Métodos propuestos de incorporación de glutaraldehído para la formación de la lámina reticulada CHS/GLU.

Optimización del material extractante

Una vez se determinó cual es la mejor metodología para la preparación de la fase sorbente, las condiciones de preparación de esta fueron evaluadas. En primer lugar, se estudió el % de GLU óptimo para la reacción de reticulación. Se escogieron rangos de concentración con relación a la respuesta que tuvo el material al reaccionar con GLU, esto dependiendo del método finalmente seleccionado. Además, se consideró la cantidad de material extractante puesto en el disco rotatorio. Por triplicado, se colocaron 150, 300, 500 y 900 μL en la cavidad de los discos rotatorios y se evaluó la capacidad de extracción de las distintas cantidades de fase sorbente CHS/GLU. Ambos experimentos se desarrollaron implementado el método de extracción descrito usando agua ultrapura enriquecida con TCS y MTCS a una concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ como fase acuosa, variando solo la fase sorbente.

4.2.3.- Caracterización de la fase CHS/GLU

Contenido de humedad, poder de hinchamiento y Solubilidad

El contenido de humedad (MC), el poder de hinchamiento (SP) y la solubilidad (S) se calcularon utilizando la metodología reportada en [44]. Se elaboraron films de CHS, CHS con el pH ajustado a 5 y de CHS/GLU y se pesaron (W_0) en balanza analítica. Posteriormente, las piezas se secaron a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h y luego se pesaron nuevamente (W_1). Las películas delgadas secas se colocaron en viales de vidrio con agua destilada sometidas a agitación leve durante 24 h a temperatura ambiente ($\sim 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Cada película hinchada se secó cuidadosamente con papel de filtro; posteriormente, el peso de la película hinchada se midió (W_2). Finalmente, cada pieza se secó a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 h, y su peso final se registró (W_3). Los porcentajes de MC (%), SP (%) y S (%) se calcularon usando las ecuaciones (1), (2) y (3) respectivamente.

$$\text{MC} = \frac{(W_0 - W_1)}{W_0} \times 100\% \quad (\text{Ec. 1})$$

$$\text{SP} = \frac{(W_2 - W_1)}{W_1} \times 100\% \quad (\text{Ec. 2})$$

$$\text{S} = \frac{(W_1 - W_3)}{W_1} \times 100\% \quad (\text{Ec. 3})$$

FT-IR y SEM

Se preparó una solución concentrada de CHS al 2% y se elaboraron láminas de CHS sin reticular y CHS reticulado con GLU al 1%. Se utilizó la prueba FT-IR para evaluar los grupos funcionales presentes en el CHS y en el CHS/GLU. Las morfologías superficiales de los films de CHS se examinaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) y se comparó con su forma entrecruzada.

Estudio de reutilización de la fase sorbente

De forma consecutiva, se realizaron tres extracciones de soluciones acuosas con TCS y MTCS a concentraciones de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ por triplicado empleando el mismo disco rotatorio sin cambiar la fase sorbente CHS/GLU con el fin de evaluar la capacidad de reutilización de esta. Se observó como varió el desempeño extractante del material a medida que se usó en procesos de sorción y desorción sucesivos.

Estudio de comparación de fases sorbentes

Se comparó el rendimiento de extracción de la fase sorbente natural CHS/GLU con el ejecutado por fases sorbentes sólidas comerciales comúnmente empleadas en estos procesos. Se prepararon discos con las fases Oasis® HLB, C18 y DVB. Para ello se pesaron 50 mg de material en la cavidad del disco rotatorio y se cubrió con un filtro de fibra de vidrio sujetado al disco con un anillo de teflón. Los discos preparados con las fases sorbentes fueron acondicionados en AcOEt, MeOH y agua con agitación a 2000 rpm por 5 minutos en cada solvente. Cada material, incluyendo la lámina CHS/GLU, se empleó en extracción por triplicado usando 20 mL de solución acuosa con TCS y MTCS a $5 \mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.4.- Optimización del proceso de extracción

Todos los pasos de extracción fueron optimizados con agua ultrapura enriquecida con TCS y MTCS a una concentración de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ siguiendo el método descrito en el apartado de protocolos. Los estudios de las variables químicas e hidrodinámicas que influyen en el proceso de extracción y de elución son detallados a continuación.

Estudio de elución

Se determinó el solvente adecuado para eluir la muestra desde la fase extractante. Para ello se escogieron cuatro solventes orgánicos con distintas polaridades y se midió su capacidad de desorción en base a la recuperación de los analitos por triplicado. Los solventes utilizados con sus correspondientes polaridades se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7: Solventes orgánicos empleados para la elución de los analitos.

Solvente	Log K_{ow} [45]
Metanol (MeOH)	-0,77
Acetonitrilo (ACN)	-0,34
Cloroformo (CHCl ₃)	1,97
Acetato de etilo (AcOEt)	0,73

pH de muestra

Se evaluó el efecto del pH de la muestra en la extracción de los analitos, para esto se realizaron por triplicado cinco experimentos donde se llevó a cabo la extracción ajustando la muestra a pH 2, 4, 6, 9 y 12. La modificación del pH se realizó con gotas de solución HCl 1M y NaOH 0,01; 0,05 y 1M según corresponda dependiendo del pH deseado.

Diseño compuesto central para evaluar el efecto de modificación iónica (%MeOH) y salting-out (%NaCl) en el proceso de extracción

El diseño compuesto central es una metodología de análisis quimiométrico que conduce a las condiciones de operación óptimas de un proceso mediante diseños de tratamiento factoriales de dos niveles 2^k (puntos -1,1) con $2k$ combinaciones adicionales llamados puntos axiales o “estrella” (puntos $-\alpha$, $+\alpha$) y n_c puntos centrales (nivel 0 para todas las variables), siendo k el número de variables. Dentro de las propiedades que tiene este diseño se encuentra la rotabilidad, que consiste en que la varianza de los valores estimados sea constante en puntos equidistantes del centro del diseño. Esto se logra estableciendo que $\alpha = (2^k)^{1/4}$ [46]. En este caso se realizó un estudio multivariante por diseño compuesto central rotable de las variables %MeOH y %NaCl en el rango de 0 a 25%, por lo que $\alpha = 1,41421$. La matriz experimental con los valores codificados se

elaboró a través del software Statgraphics y en la Tabla 8 se resume con sus correspondientes valores reales.

Tabla 8: Matriz compuesto central para el estudio de modificación iónica y salting-out.

Experimentos	Valores codificados		Valores reales	
	%NaCl	%MeOH	%NaCl	%MeOH
1	-1	-1	5	5
2	1	-1	20	5
3	-1	1	5	20
4	1	1	20	20
5	0	0	12,5	12,5
6	-1,41421	0	0	12,5
7	1,41421	0	25	12,5
8	0	-1,41421	12,5	0
9	0	1,41421	12,5	25
10	0	0	12,5	12,5

Diseño Doehlert para la optimización de las variables hidrodinámicas de extracción: velocidad de rotación, tiempo de extracción y volumen de muestra

El diseño Doehlert o de celda uniforme es una metodología de análisis quimiométrico que facilita efectuar pocos experimentos con una alta eficiencia mediante un dominio experimental esférico enfatizando la uniformidad en el llenado del espacio, permitiendo la detección de pérdida de ajuste para el modelo. El número de experimentos se rige por la expresión $k^2 + k + 1$, donde k es el número de variables. La principal característica de este método es que los factores tienen distinto número de nivel, por lo que se puede asignar un mayor número de niveles a los factores que se requiera conocer con más detalle su efecto [47]. Para este ensayo se desarrolló un diseño experimental de Doehlert para la optimización de tres variables hidrodinámicas implicadas en el proceso de extracción: velocidad de rotación 200 - 2000 rpm, tiempo de extracción 0 – 120 min y volumen de muestra 20 – 60 mL, estableciendo la velocidad de rotación como la variable con mayor número de niveles. La matriz experimental con los valores codificados se

elaboró a través del software Statgraphics y en la Tabla 9 se muestra junto a los correspondientes valores reales.

Tabla 9: Matriz Doehlert para el estudio de variables hidrodinámicas

Exp.	Valores codificados			Valores reales		
	Tiempo (min)	Velocidad (rpm)	Volumen (mL)	Tiempo (min)	Velocidad (rpm)	Volumen (mL)
1	0	0	0	60	1100	40
2	1	0	0	120	1100	40
3	0,5	0,866	0	90	2000	40
4	-0,5	0,866	0	30	2000	40
5	-1	0	0	0	1100	40
6	-0,5	-0,866	0	30	200	40
7	0,5	-0,866	0	90	200	40
8	-0,5	-0,289	-0,816	30	800	20
9	0	0,577	-0,816	60	1700	20
10	0,5	-0,289	-0,816	90	800	20
11	-0,5	0,289	0,816	30	1400	60
12	0	-0,577	0,816	60	500	60
13	0,5	0,289	0,816	90	1400	60
14	0	0	0	60	1100	40
15	0	0	0	60	1100	40

Perfil de extracción

Se generó un perfil de extracción a partir del cual se corroboró el tiempo de equilibrio del paso de los analitos desde la fase acuosa a la fase sorbente. Se determinaron puntos de 1, 5, 10, 30, 60 y 90 minutos como tiempos de extracción desarrollando por duplicado cada procedimiento a 2000 rpm.

4.3.- Validación del método

Para la validación del método analítico se estimaron las cifras de mérito como parámetros de calidad de la metodología propuesta. Se consideraron los resultados de

linealidad, límites de detección (LOD), límites de cuantificación (LOQ), repetibilidad (%RSD), efecto matriz (%EM) y porcentaje de recuperación (%Re) de los analitos en matrices acuosas.

Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración para TCS y MTCS dopando las muestras reales de agua usadas en la extracción con multi estándar a concentraciones en el rango de 1 – 20 $\mu\text{g L}^{-1}$, obteniendo así, a través del coeficiente de correlación (r^2), los valores de linealidad del método. Cada punto de concentración de la curva se hizo por duplicado.

LOD y LOQ

Los valores de LOD y LOQ se calcularon integrando hasta diez picos cromatográficos a baja concentración cercanos a la señal cromatográfica de los analitos usando el método señal/ruido como guía. El cálculo se determinó con el promedio y la desviación estándar (σ) de estas señales usando las siguientes ecuaciones:

$$Y_{LD} = \bar{X} + 3\sigma \quad (\text{Ec. 4})$$

$$Y_{LQ} = \bar{X} + 10\sigma \quad (\text{Ec. 5})$$

Los resultados de Y_{LD} e Y_{LQ} hacen referencia al área de los límites de detección y cuantificación respectivamente, estas cifras se interpolaron en la ecuación lineal de la curva de calibrado:

$$Y_{LD,LQ} = b + m(X_{LD,LQ}) \quad (\text{Ec. 6})$$

De este procedimiento se obtuvieron los valores de X_{LD} y X_{LQ} los cuales fueron divididos por el factor de enriquecimiento de las muestras para la obtención de los límites de detección y de cuantificación reales en $\mu\text{g L}^{-1}$. El factor de enriquecimiento se calculó en base al factor de concentración teórico de la técnica y las recuperaciones absolutas para cada analito.

%RSD, %EM y %Re

La repetibilidad del método fue medida en 5 réplicas de muestra ($n=5$) con la matriz acuosa de agua de río preparada a 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de los analitos. Los %Re y el %EM fueron calculados de acuerdo con la metodología reportada en [48]:

$$\text{Re (\%)} = \frac{(A_{S4} - A_{S3})}{A_{S2}} \quad (\text{Ec. 7})$$

$$\text{EM (\%)} = \frac{(A_{S2} - A_{S3})}{A_{S1}} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde, A es el área o área relativa de los términos:

- S1: Multi estándar a concentración $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito.
- S2: Extracción de agua de río (blanco) a través del método propuesto de RDSE y dopado con $5 \mu\text{g L}^{-1}$ de analitos antes de la inyección cromatográfica.
- S3: Extracción de agua de río (blanco) sin dopar.
- S4: Extracción de agua de río dopada con $5 \mu\text{g L}^{-1}$ desde el inicio del proceso de extracción por RDSE.

Además de TCS y MTCS, las muestras a las que se le añadió el multi estándar también fueron dopadas con TCS-d3 como estándar surrogate.

4.4.- Medición en muestras reales

El método de extracción por RDSE con la fase sorbente CHS/GLU se implementó para la medición de TCS y MTCS en muestras reales. En este caso se usaron como matrices acuosas, muestras de agua del río Mapocho, en concreto, aguas arriba: Canoa, aguas abajo: Puente esperanza y afluyente y efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales "El Trebal". Todas las muestras fueron filtradas al vacío para eliminar impurezas y almacenadas en frío. Cada muestra se analizó por duplicado. Los sitios de muestreo se pueden observar en la Figura 9.

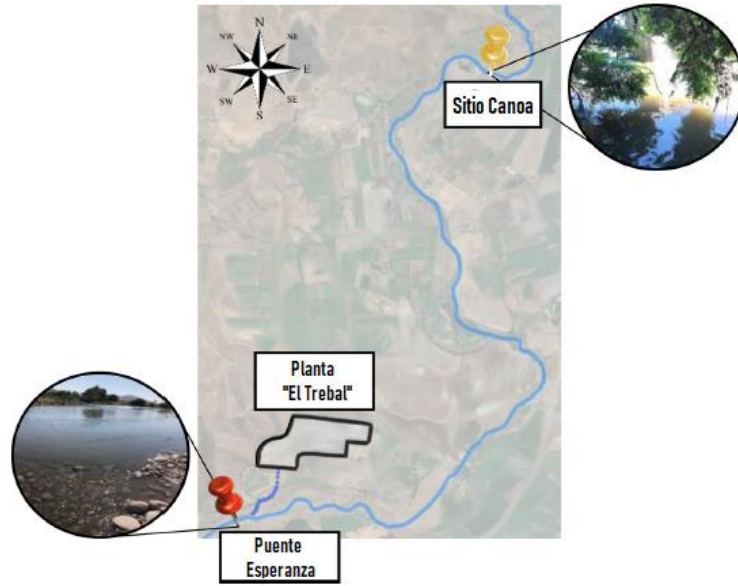


Figura 9: Origen de las muestras reales: Canoa, Esperanza, Afluente y Efluente de la planta de tratamiento de aguas residuales “El Trebal” [49].

5.- RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1.- Condiciones de derivatización

Como un acercamiento importante al método cromatográfico se estudiaron las condiciones de derivatización descritas previamente en la Tabla 6. El desarrollo de un proceso de derivatización adecuado es un paso de suma importancia para la correcta identificación cromatográfica. Este permite la obtención de picos definidos a través de la derivatización completa de los componentes.

La estructura química de TCS y MTCS son bastante similares, sin embargo, el TCS tiene un grupo -OH polar en su estructura que disminuye su volatilidad. Por este motivo se realizó la sililación con MSTFA donde el grupo hidroxilo del TCS es remplazado por el grupo trimetilsilil para formar el producto derivatizado. La mezcla derivatizante generalmente se acompaña con un solvente polar aprótico o catalizador que mejora la susceptibilidad de salida del hidrogeno objetivo. Es por esto que en las condiciones evaluadas se tomaron en cuenta dos solventes de este tipo piridina y AcOEt a 80°C y a temperatura ambiente por 30 minutos. El resultado cromatográfico se muestra en la Figura 10.

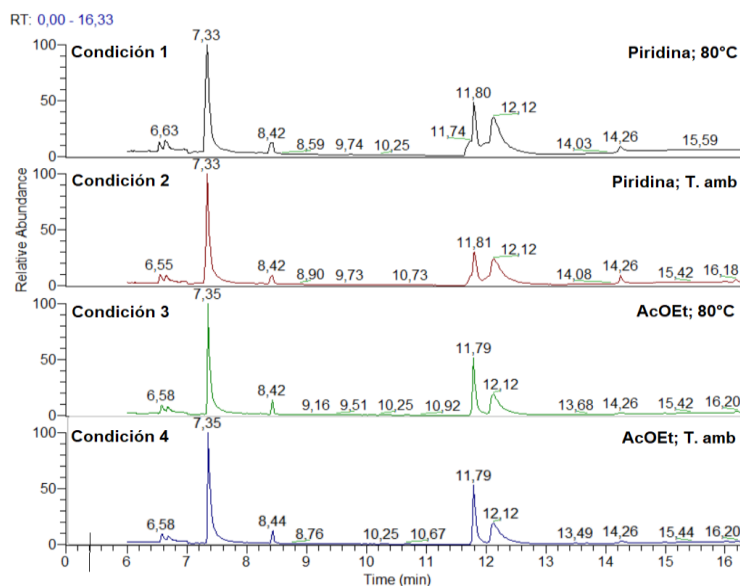


Figura 10: Comparación de cromatogramas TIC derivatizando a las condiciones propuestas.

La temperatura de derivatización no resultó ser un factor influyente en la definición de los picos cromatográficos, sin embargo, el uso de solvente AcOEt para la mezcla derivatizante aparentemente reduce las interferencias en la elución de los analitos TCS y MTCS entregando señales más definidas en el cromatograma.

A continuación, en la Figura 11, se compararon las áreas absolutas obtenidas de la medición por GC-MS de cada condición de derivatización para los analitos TCS y MTCS

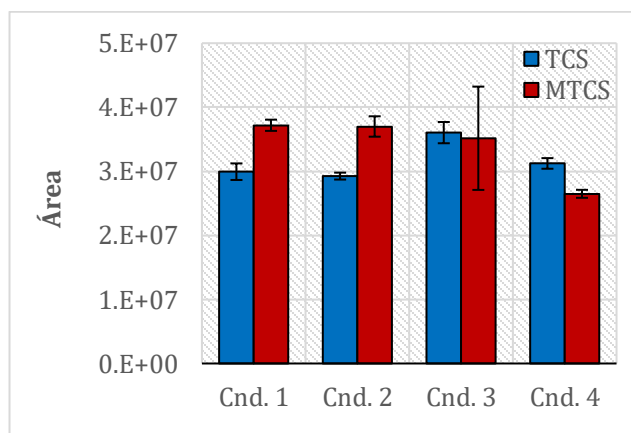


Figura 11: Señales absolutas de los analitos TCS y MTCS a distintas condiciones de derivatización, solvente y temperatura.

Según los resultados obtenidos la condición que obtuvo una mejor relación de áreas para TCS y MTCS fue la condición 3, a su vez que se utilizó un solvente mucho más amigable como lo es el AcOEt respecto a la piridina. Sin embargo, este método presentó problemas de repetibilidad, por lo que se optó por disminuir la temperatura de derivatización de 80°C a 70°C. Este efecto negativo en la medición se debió a que la temperatura de evaporación del AcOEt es de 77°C, lo cual no fue considerado en el diseño experimental en un principio.

El experimento se repitió con esta nueva temperatura para la reacción de derivatización en la condición 3 y se compararon los %RSD para evaluar la repetibilidad de las metodologías de derivatización. Los resultados se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10: Repetibilidad de las condiciones de derivatización (n=2) incluyendo corrección de temperatura a la condición 3.

Analitos	Condiciones	Promedio áreas absolutas	%RSD
TCS	1	29941573 ± 1292785	4,32%
	2	29256028 ± 537741	1,84%
	3 (repetido)	3896178,333 ± 166682	4,39%
	4	31231981,5 ± 829216	2,66%
MTCS	1	37188434,5 ± 875059	2,35%
	2	36998919,5 ± 1593470	4,31%
	3 (repetido)	3237858 ± 32200	0,99%
	4	26487049 ± 621374	2,35%

La repetibilidad en todas las condiciones es menor al 5% para el total de los analitos estudiados. A partir de estos resultados se estableció que la condición optima de derivatización para este trabajo son 30 minutos, 70°C con 100 µL de mezcla derivatizante 1:1 MSTFA/AcOEt.

Una vez se optimizó el método de derivatización, se aprovechó de la medición del multi estándar de los analitos realizada en este estudio con la condición escogida para corroborar las propiedades cromatográficas mostradas en la sección 4.1.2 en la Tabla 5. Para ello se tomó el cromatograma SIM con los respectivos iones de cuantificación e identificación para TCS y MTCS y se integró el área de las señales, donde, efectivamente, el ion cuantificador es el más abundante (mayor área) y se confirmaron los tiempos de retención previamente mencionados. El cromatograma en modo SIM se muestra en la Figura 12.

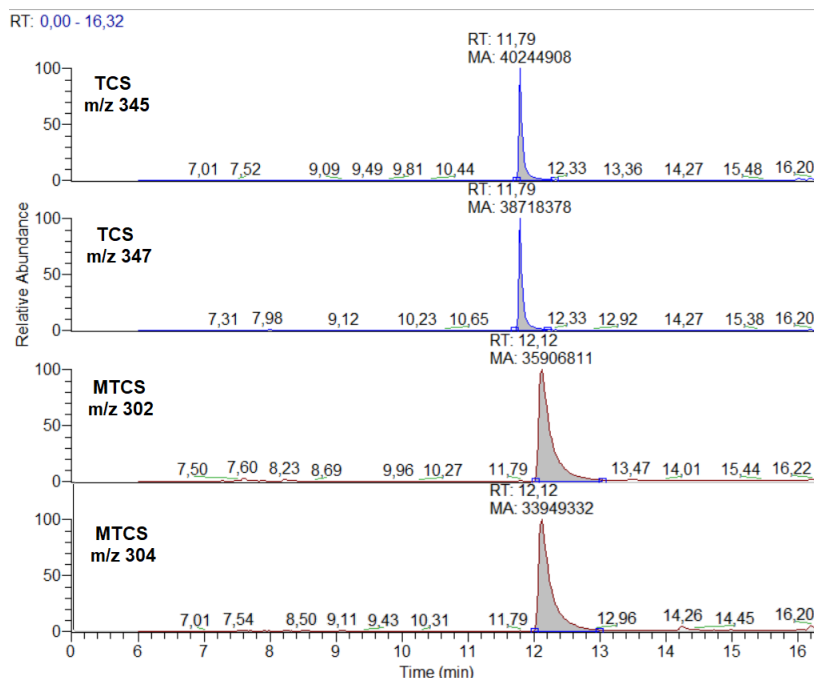


Figura 12: Cromatograma en modo SIM de TCS y MTCS obtenidos por el método de derivatización optimizado a $5 \mu\text{g L}^{-1}$ con sus respectivos iones de cuantificación y calificación.

5.2.- Estudios preliminares de la fase sorbente

5.2.1.- Método de preparación de la fase CHS/GLU

Los métodos de incorporación de glutaraldehído propuestos para la formación de la lámina reticulada CHS/GLU detallados en la Figura 8 fueron desarrollados bajo las metodologías propuesta. Se buscó determinar cuál alternativa es la óptima para elaborar una lámina CHS/GLU para la extracción de TCS y MTCS. Sin embargo, previo a implementarlas como fases sorbentes fue necesario determinar en qué rango de concentraciones de GLU se puede trabajar en cada vía de elaboración, evaluando la respuesta del material CHS con el agente entrecruzante GLU. En primer lugar, se determinó que el rango de concentración de GLU para la opción de reticulación previo al secado de la mezcla sorbente debe ser en el rango del 0,1% aproximadamente, pues un exceso de GLU previo al secado puede alterar significativamente el contenido de humedad de la lámina, llevando a un secado excesivo de la misma a tal punto de promover su calcinación. Este efecto se muestra en la Figura 13, donde se comparan los discos fabricados por dicha metodología de reticulación con GLU al 1% y al 0,1%.



Figura 13: Comparación de CHS/GLU 1% y CHS/GLU 0,1% por método de reticulación previo al secado.

En cambio, cuando el procedimiento se hace por rotación, se lograron utilizar concentraciones más altas de GLU, pues de esta forma la reacción está mediada por la cinética del procedimiento. En la Figura 14 se puede observar el resultado de este proceso, sometiendo la lámina de CHS a rotación en una mezcla 1% de GLU.

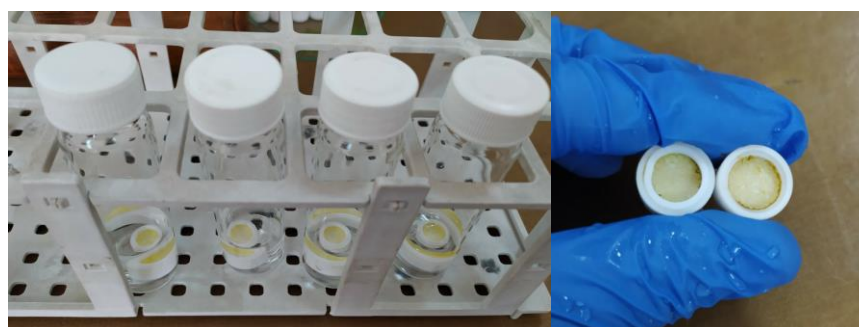


Figura 14: Discos de CHS/GLU reticulados por rotación en GLU 1%

A primera vista, lo que se logró observar es que por la primera vía propuesta correspondiente a la elaboración de la lámina CHS/GLU incorporando el GLU antes del secado se obtuvo una lámina mucho más homogénea aparentemente, comparada con la obtenida por la alternativa de entrecruzado por rotación. A continuación, una vez preparados los discos, se comparó la capacidad de extracción de las fases sorbentes elaboradas por las vías propuestas a través de RDSE por quintuplicado. Este experimento se muestra en la Figura 15.

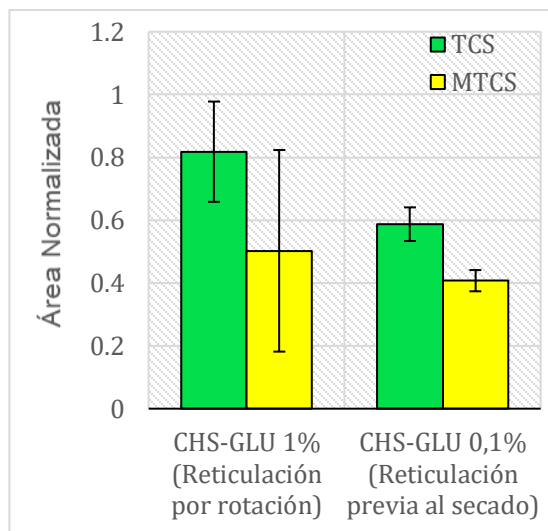


Figura 15: Estudio de comparación del método de reticulación de CHS/GLU.

Como resultado, a primera vista la fase CHS/GLU 1% formada por rotación muestra una mayor capacidad de extracción para los analitos TCS y MTCS, sin embargo, la repetibilidad del método es muy baja producto de la poca homogeneidad de la fase obtenida a través de este método. La mejor alternativa para la elaboración de la fase sorbente es la primera vía propuesta, pues presenta niveles adecuados de recuperación con una alta tasa de repetibilidad para el proceso de extracción por RDSE.

5.2.2.- Optimización de la fase sorbente

Una vez definido el método de preparación del film CHS/GLU, se procedió a estudiar las siguientes variables involucradas en la implementación de la fase sorbente como material extractante para RDSE.

%GLU

Se midió la capacidad extractante del material CHS/GLU incorporando GLU a las concentraciones de 0,01 – 0,1 – 0,25%. A su vez, se comparó el material reticulado CHS/GLU con CHS sin reticular con el fin de apreciar el efecto del entrecruzamiento en el proceso de extracción de TCS y MTCS. Cada experimento se desarrolló por triplicado. El efecto del %GLU incorporado a la lámina de CHS se presentan en la Figura 16.

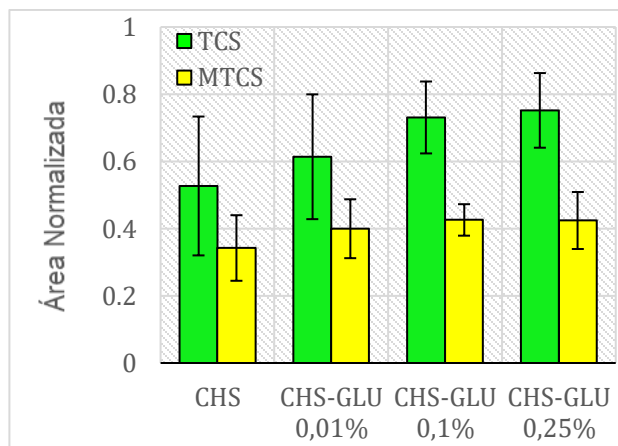


Figura 16: Estudio %GLU incorporado en la fase CHS/GLU.

Se observa una mejora en el desempeño del CHS/GLU como fase sorbente respecto a la lámina de CHS puro debido a la estabilidad y el cambio en las propiedades fisicoquímicas que implica este procedimiento. En cuanto a la concentración de GLU utilizado en la mezcla, no hubo una diferencia significativa en la respuesta asociada a los analitos. Se escogió continuar el trabajo usando GLU al 0,1%, esto debido a que la concentración inferior correspondiente al 0,01% presenta un mayor %RSD y la concentración superior de 0,25% no es necesaria si se toman en cuenta los principios de la química analítica verde donde se promueve el menor gasto de reactivo posible.

Cantidad de fase sorbente

Para determinar el efecto sobre la extracción que tiene de la cantidad de la fase sorbente CHS/GLU depositada en la cavidad del disco rotatorio se consideraron las limitaciones propias del tamaño del disco. Se utilizaron distintos tipos de discos con el fin de ajustar de forma adecuada el volumen que ocupa la fase en solución previa al secado y, posteriormente, el área superficial de contacto que se forma con el film seco. Una vez se elaboraron los discos con los films de CHS/GLU, el estudio procedió de la forma descrita previamente en la sección 4.2.2. El resultado final se detalla en la Figura 17.

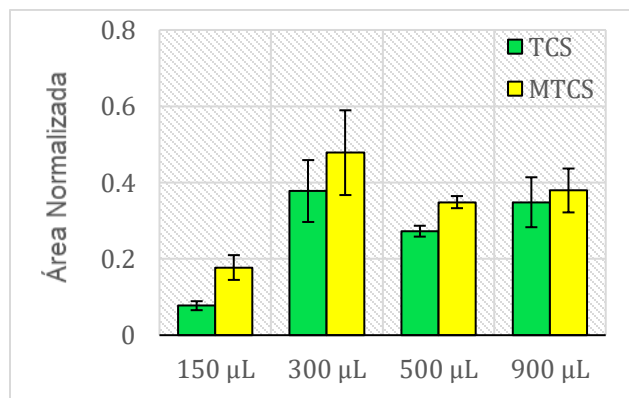


Figura 17: Estudio de volumen de fase sorbente CHS/GLU.

Significativamente, a partir de los 300 µL en adelante la respuesta de los analitos es similar por lo que se puede afirmar que el proceso de extracción no está mediado en gran parte por la cantidad de fase sorbente depositada en solución (entre 300 y 900 µL) si no por el sitio de interacción que tiene esta con la fase acuosa utilizada, en donde, además, interfieren muchas otras variables como las hidrodinámicas o modificación iónica. En base a los resultados, se escogió trabajar con 500 µL de fase sorbente, ya que fue el volumen que presentó un mejor RSDE en el estudio.

5.2.3.- Caracterización de la fase CHS/GLU

Contenido de humedad, Poder de hinchamiento y Solubilidad

Los parámetros MC, SP y S fueron determinados a través de las ecuaciones 1, 2 y 3 respectivamente para CHS puro (CHS 1%), CHS 1% a pH 5 y CHS reticulado con GLU 0,1% (CHS/GLU). De esta forma se observó como varían las características higroscópicas del material a través de las distintas etapas del proceso de elaboración. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla 11.

Tabla 11: El contenido de humedad (MC), el poder de hinchamiento (SP) y la solubilidad (S) calculados (n=4) para las diferentes etapas de elaboración del sorbente CHS.

Film	MC (%)	SP (%)	S (%)
CHS 1%	22 ± 6	866 ± 123	30 ± 7
CHS pH 5	25 ± 8	830 ± 157	37 ± 3
CHS/GLU 0,1%	24 ± 9	49 ± 13	45 ± 1

Como primer parámetro medido se obtuvo el contenido de humedad, el cual hace referencia a la capacidad de retención de las moléculas de agua que presenta el material en el proceso de secado. Como resultado, el MC es significativamente el mismo en las tres condiciones estudiadas, siendo esto un indicio de que el reordenamiento del agua es similar en todas las fases del film.

Luego, se midió el SP de las distintas láminas. Esta propiedad se refiere a la capacidad del film de retener agua en su matriz, donde, estos al ser materiales previamente secados a 37°C por 24 horas existe un aumento de la afinidad por las moléculas de agua, haciéndolos susceptibles al hinchamiento. Desde el punto de vista del uso de la lámina CHS como fase sorbente para muestras acuosas en RDSE, es necesario considerar que una estructura con menor SP permite un mejor acople al disco rotatorio, lo cual es fundamental para una extracción eficiente. Se logró observar que el material que cumple con este requerimiento es el CHS/GLU, a diferencia del CHS y CHS a pH 5 que presentan un poder de hinchamiento del orden del 800%. La reacción de reticulación con GLU disminuye considerablemente esta propiedad debido a que los sitios polares activos de la estructura molecular del CHS reaccionan con el agente entrecruzante formando estructuras hidrofóbicas y aumentando la compactación del material.

Finalmente, el valor obtenido S corresponde a una medida relacionada con la afinidad del film para disolverse en el medio acuoso. Se reportó que esta propiedad aumentó de un 30 a un 45% en las distintas etapas de elaboración de la lámina de CHS, esto debido en gran parte al aumento en la hidrofobicidad que implica la reticulación, puesto que un material mayormente hidrofóbico incorpora menos moléculas de agua a su matriz facilitando la pérdida de peso al final del proceso. Esta capacidad de solubilidad da cuenta de las características biodegradables del film y corrobora la conservación de estas a través de las distintas fases del material sorbente.

FT-IR y SEM

Los espectros FT-IR de las fases CHS y CHS-GLU se muestran en la Figura 18. Con respecto al CHS, exhibió una banda ancha entre 3200 y 3600 cm^{-1} correspondiente al estiramiento simétrico de los grupos hidroxilo (O-H) y amina (N-H). La banda bifurcada en 3312 y 3275 cm^{-1} puede implicar la presencia de una amina primaria (-NH₂). Ambos espectros IR también muestran una banda en 2875 cm^{-1} asociada a la vibración de estiramiento de un enlace C-H alifático. Las bandas observadas en 1651, 1557 y 1374 cm^{-1} se pueden atribuir al estiramiento de los grupos C=O, a modos de deformación en enlace N-H y a modos de estiramiento C-N, respectivamente, los cuales están asociados a grupos funcionales amidas y son representativos de la estructura molecular del CHS. La banda en 1310 cm^{-1} está asociada a modos de deformación del enlace C-H, la señal intensa en 1024 cm^{-1} y la banda en 895 cm^{-1} se pueden atribuir a los modos de estiramiento C-O de los enlaces de los grupos alcohol y del sitio de unión β -1,4-glucosídico del polisacárido CHS.

En cuanto a la película CHS-GLU, la disminución de la intensidad de la banda elástica OH, además de la disminución de la banda C-O-C, demuestra la formación de acetal como posible mecanismo de entrecruzamiento. El aumento de la intensidad de la señal a 2935 cm^{-1} del estiramiento C-H es consecuencia de la adición de cadenas alifáticas de GLU. Además, la nueva señal en 1710 cm^{-1} indica los modos de estiramiento asociados con el enlace imina C=N.

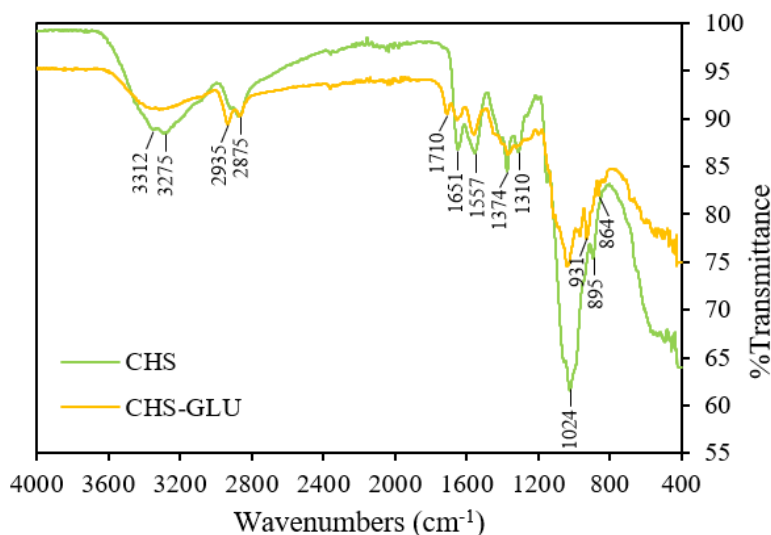


Figura 18: Espectro FT-IR de las membras de CHS y CHS/GLU.

Las características morfológicas de CHS y CHS-GLU se muestran en la Figura 19. La parte superior de la figura, A1 - A2 - A3, corresponde al film de CHS puro y la parte inferior, B1 - B2 - B3, se refiere a la película CHS-GLU. Cada imagen se amplió de 400x a 4000x. Como se puede observar en las figuras A1 a A3, el CHS presenta una estructura irregular con pequeñas partículas sólidas distribuidas a través de toda la superficie del material. Esto puede deberse al hecho de que el CHS presenta una solubilidad limitada en agua, tiende a formar estructuras de lámina amorfa con zonas solubilizadas de forma incompleta.

En cambio, en la película de CHS-GLU mostrada en las figuras B1 a B3 se observa una estructura clara, lisa y uniforme, o sea, con muy pocas partículas sólidas presentes. Esto permite inferir que, a raíz de la reacción de entrecruzamiento del GLU con el biopolímero CHS, la morfología de la estructura resultante parece ser mucho más cohesiva, alterando significativamente las características superficiales de la lámina. Esto se condice con las propiedades de MC, SP y S previamente estudiadas, pues la lámina CHS/GLU al tener una estructura más rígida y uniforme, tendrá una menor permeabilidad de las moléculas de agua, lo que resulta en valores bajos de SP.

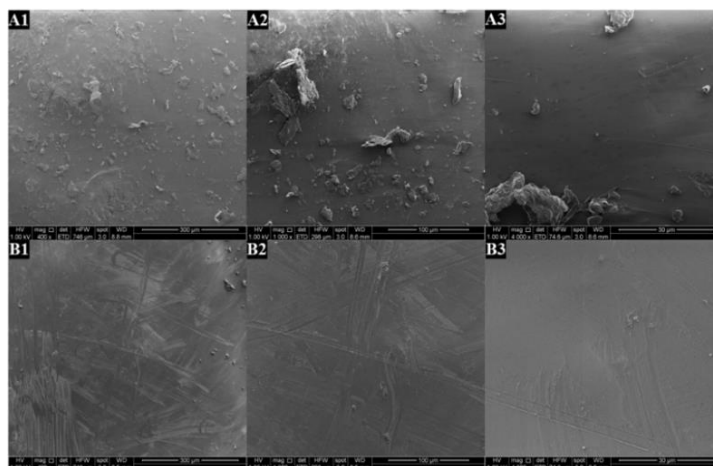


Figura 19: Imágenes SEM superficiales de las membras de CHS (A1 – A3) y CHS/GLU (B1-B3) magnificadas desde 400x a 4000x.

Capacidad de reutilización de la fase sorbente

En el contexto de la química analítica verde se estudió la reutilización de la lámina CHS/GLU a través de tres procesos de sorción y desorción empleando la misma concentración inicial de los analitos. El resultado del estudio se muestra en la Figura 20.

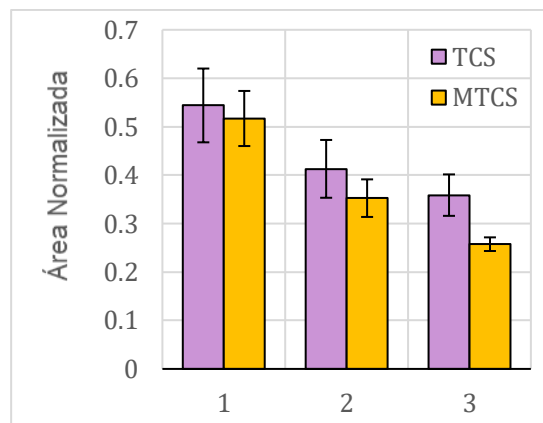


Figura 20: Estudio de reutilización de la fase CHS/GLU.

Se observó el decrecimiento de la capacidad extractiva del material para ambos analitos al terminar cada ciclo de extracción, teniendo un efecto mucho más significativo para el MTCS. Este resultado está relacionado con la propiedad de solubilidad que tiene la lámina CHS/GLU, donde la pérdida de capacidad de sorción se debe a la degradación de la fase sorbente propia de su uso en medios acuosos. Sin embargo, a pesar de esto, los analitos pueden seguir siendo extraídos con una alta precisión y un desempeño aceptable a medida que los discos con el film son reutilizados, por lo que, la identificación y cuantificación de las moléculas objetivo a través RDSE utilizando una fase CHS/GLU reutilizada, dependerá netamente de la concentración de estos y de la sensibilidad de los instrumentos empleados. Además, que se puede agregar un estándar surrogate para corregir este efecto.

Comparación de fases sorbentes

Se llevó a cabo el estudio comparativo de la fase sorbente en base al biopolímero CHS con fases sorbentes poliméricas típicas de uso comercial. El desempeño de extracción de TCS y MTCS de cada material está ilustrado en la Figura 21.

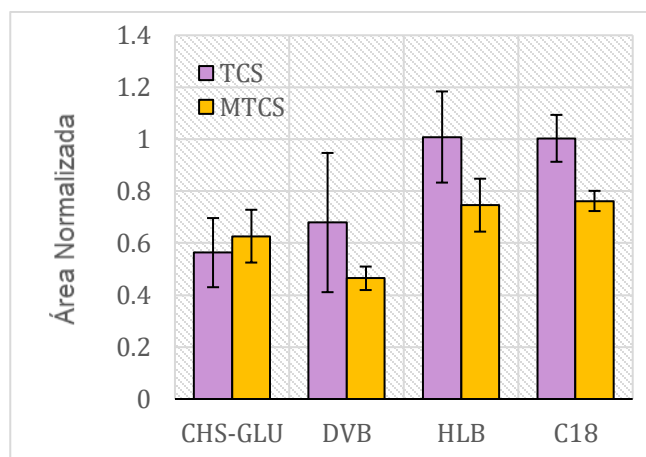


Figura 21: Estudio de comparación de fases sorbentes.

Para el caso del TCS, las fases Oasis® HLB y C18 extraen este compuesto de forma más eficiente, sin embargo, la extracción de la lámina CHS/GLU es similar a la realizada con DVB. La diferencia se vuelve mucho menos significativa al momento de comparar la recuperación del MTCS, pues para este analito la capacidad de extracción es similar al de las fases comerciales e incluso mayor en el caso del DVB. Esto puede indicar que el film de CHS/GLU presenta mayor afinidad con analitos más apolares respecto a otros materiales sorbentes comúnmente utilizados. Es importante considerar que a pesar de presentar valores inferiores en comparación a Oasis® HLB y C18, la fase sorbente en base a CHS no deja de ser un material biodegradable con un peso aproximado de $6,3 \pm 0,8$ mg, a diferencia de los 50 mg usados, recomendados en la literatura, al emplear los otros materiales.

5.3.- Optimización del proceso de extracción

Estudio de elución

La elución es el proceso que permite llevar al extracto desde la fase sorbente a una forma adecuada para el análisis instrumental, por lo que establecer las condiciones adecuadas de elución para los analitos estudiados es de interés para el correcto desempeño del método. Los resultados del estudio empleando solventes orgánicos de distinta naturaleza como solventes de elución se resumen en la Figura 22.

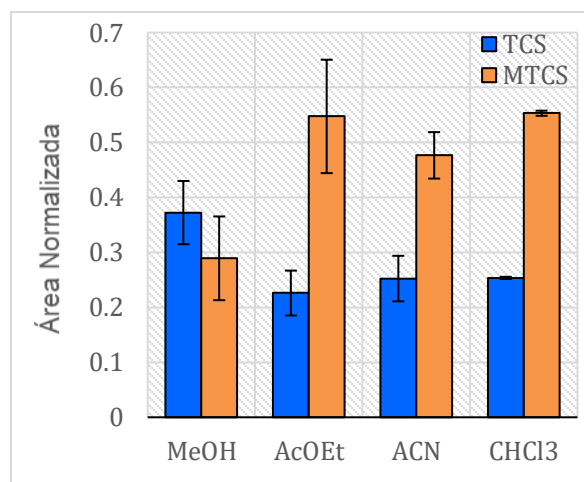


Figura 22: Estudio de solvente de elución.

Los solventes que mejor extraen a los compuestos de interés desde la fase sorbente son, en el caso del TCS, el MeOH y para el metabolito MTCS, el AcOEt y el CHCl₃. Estos resultados experimentales están relacionados con la polaridad de los compuestos que interactúan en el proceso, el TCS, al ser una molécula con características más polares, presenta una mayor afinidad con el MeOH como solvente de elución por su alta polaridad (Log K_{ow} -0,77), así como, el MTCS, al tener propiedades más apolares, interactúa de mejor manera con solventes menos polares como el AcOEt (Log K_{ow} 0,73) o el CHCl₃ (Log K_{ow} 1,97). Basado en esto, se decidió usar una mezcla de solvente de elución de MeOH:AcOEt de 1:1 para favorecer la recuperación de ambos analitos. El CHCl₃ a pesar de tener buenos resultados para el compuesto MTCS, se descartó su uso por ser más tóxico, volátil e inmiscible con mezclas acuosas.

pH de muestra

Se llevó a cabo un estudio univariado del efecto del pH de la muestra sobre la eficiencia de extracción del método. La influencia de esta variable está ilustrada en la Figura 23.

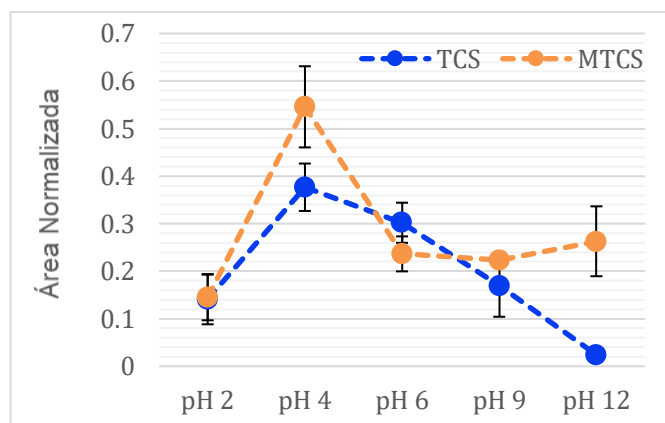


Figura 23: Estudio de pH de muestra

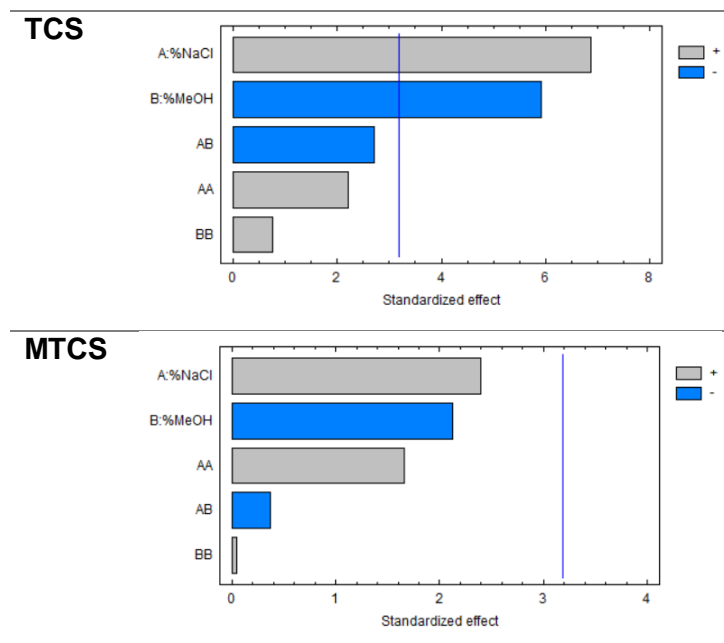
Se encontró que la mejor respuesta en el desempeño de extracción de TCS y MTCS por el método propuesto se llevó a cabo a pH 4. Desde el punto de vista del TCS, al ser un ácido débil $pK_a = 7,9$ se extrae mejor a pH 4, o sea, en su forma neutra o no ionizada. En cuanto al MTCS, se esperaba que el efecto en la extracción al variar el pH fuera menos significativo por ser una especie no ionizable, sin embargo, se encontró la misma respuesta que en el caso del TCS. Por lo tanto, se infirió que la difusión de los analitos hacia la fase sorbente no solo se ve alterada por la forma de las especies en solución, sino que la lámina CHS también juega un rol importante debido a la presencia de grupos funcionales libres $-OH$ y $-NH_2$ en su estructura que, al igual que los analitos, pueden ser alterados por cambios en el pH, lo que conduce a distintas interacciones entre la fase y las moléculas de TCS y MTCS.

Diseño compuesto central para evaluar el efecto de modificación iónica (%MeOH) y salting out (%NaCl) en el proceso de extracción

La eficiencia de extracción del método puede verse beneficiada por la adición de modificadores de matriz dependiendo de los analitos extraídos y su polaridad. El solvente utilizado como modificador iónico es el MeOH, ya que su naturaleza polar, permite que los analitos apolares no queden retenidos por adsorción en las paredes del vial. También se utilizó el efecto salting out como modificador de la fuerza iónica de la muestra. La presencia de NaCl en la matriz puede aumentar la eficiencia de extracción por modificación de la solubilidad de los analitos favoreciendo su sorción en la fase sorbente. Por lo tanto, en este experimento se desarrolló un estudio factorial considerando las concentraciones de NaCl y MeOH propuestas en la matriz de la Tabla 8 para establecer el

efecto de estos factores en la extracción de TCS y MTCS. En la Tabla 12 se presenta la carta pareto del efecto de ambos modificadores en la extracción.

Tabla 12: Carta Pareto estandarizada del efecto de %MeOH y %NaCl para TCS y MTCS.



Para este procedimiento la adición de NaCl benefició la extracción mientras que el modificador orgánico MeOH tuvo el resultado opuesto sobre la eficiencia de recuperación reportando un efecto negativo. Ambos efectos mostraron ser significativos solo para la recuperación del analito TCS, ya que para %NaCl $p\text{-value} = 0,0063$ y para %MeOH $p\text{-value} = 0,0097$, cumpliéndose con $p\text{-value} < 0,05$ con un ajuste de modelo de $R^2 = 0,969$, a diferencia del MTCS donde este valor no se cumple con un ajuste de $R^2 = 0,820$. Se ejecutó la función de deseabilidad para ambos compuestos y se obtuvo la respuesta para la condición óptima de concentración de los modificadores. La superficie de respuesta de la función de deseabilidad estimada se muestra en la Figura 24.

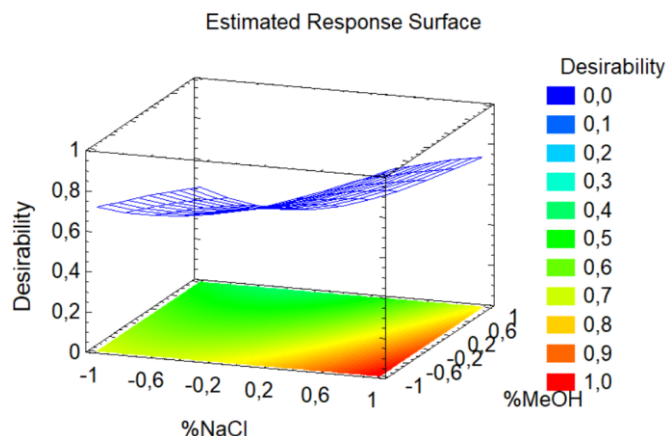


Figura 24: Superficie de respuesta óptima para el estudio de variables de modificación iónica y salting-out.

Como respuesta se obtuvo que la función de deseabilidad incrementa cuando aumenta el %NaCl y disminuye con el %MeOH para ambos analitos. De la función de Deseabilidad se extrae como condición óptima 20% NaCl y 0% MeOH.

Diseño Doehlert para la optimización de las variables hidrodinámicas de extracción: velocidad de rotación, tiempo de extracción y volumen de muestra

La influencia de las variables hidrodinámicas involucradas en la RDSE es un aspecto a considerar para establecer las condiciones óptimas de extracción. La RDSE es una técnica basada en un equilibrio de partición, por lo tanto, la máxima cantidad de analito se extrae una vez transcurrido el tiempo necesario para alcanzar dicho equilibrio. A su vez, la cinética indica que, al aumentar la velocidad de rotación del disco, aumenta la transferencia de masa de los analitos hacia la fase sorbente, disminuyendo el espesor de la capa estancada de agua y disminuyendo los tiempos de extracción, por lo que el equilibrio se alcanza más rápido. En cuanto al volumen de muestra, su papel en la extracción está relacionado con la concentración de los analitos. Volúmenes más grandes de muestra incrementan el factor de preconcentración de los compuestos de interés, sin embargo, esto puede ralentizar los tiempos de extracción, mientras que volúmenes más pequeños tienen el efecto contrario. El estudio evaluó el efecto de las tres variables: velocidad de rotación, tiempo de extracción y volumen de muestra de forma simultánea para la extracción de TCS y MTCS utilizando la matriz propuesta en la Tabla 9. La Figura 25 muestra el diagrama de superficie de respuesta obtenido.

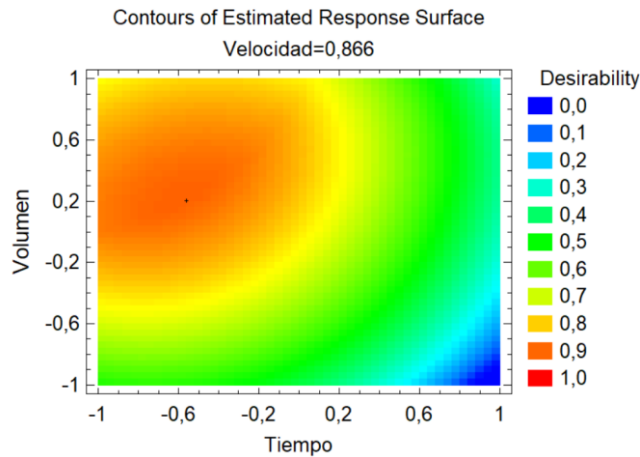


Figura 25: Superficie de respuesta óptima para el estudio de variables hidrodinámicas. El símbolo (+) en el diagrama representa la respuesta óptima encontrada por el software

Se estimó que las condiciones óptimas de extracción son: 2000 rpm, 40 mL y 30 minutos para la velocidad de rotación, volumen de muestra y tiempo de extracción respectivamente, con una función de Deseabilidad general para ambos analitos de 0,865.

Perfil de extracción

De forma complementaria se desarrolló un estudio univariado del tiempo de extracción para corroborar el tiempo de equilibrio obtenido previamente. El tiempo de extracción es fuertemente influenciado por la naturaleza de la fase sorbente, pues dependiendo de sus características la difusión de los analitos ocurrirá de distinta forma alterando los tiempos en el que el equilibrio es alcanzado. El perfil de extracción obtenido en el rango de 1 a 90 minutos a 2000 rpm se enseña en la Figura 26.

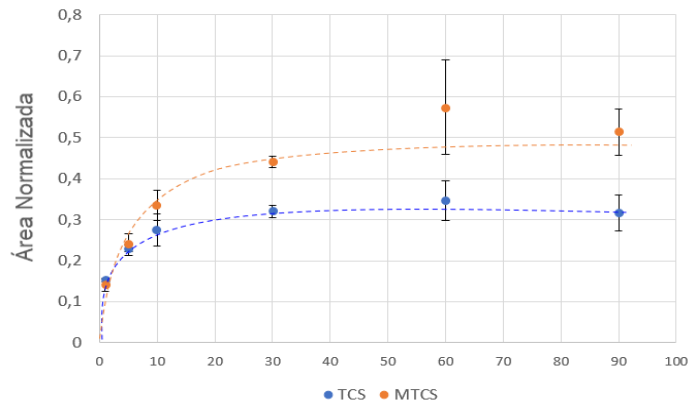


Figura 26: Perfil de extracción de los analitos TCS y MTCS por RDSE.

El punto de equilibrio, correspondiente al tiempo de extracción en donde se maximiza la concentración de los analitos en la fase sorbente, se estimó en un tiempo de 30 – 45 minutos aproximadamente, resultado que es acorde a los obtenidos en el estudio de las variables hidrodinámicas. En comparación, otros trabajos reportan un tiempo de equilibrio de 60 – 90 minutos para la extracción de TCS y MTCS en RDSE usando PDMS y Oasis® HLB como fase sorbente [43], por lo que se puede inducir que los grupos funcionales disponibles de la lámina CHS/GLU permiten que la difusión ocurra más velozmente que con otras fases sorbentes de origen comercial. Finalmente, el tiempo de extracción de 30 minutos se eligió como condición operacional óptima.

5.4.- Validación del método

La curva de calibración se hizo sobre las muestras de efluente, considerando un blanco analítico y tres puntos dopados con el multi estándar a concentraciones de 1, 10 y 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. La regresión lineal correspondiente a la curva de calibrado de TCS y MTCS con sus respectivas ecuaciones lineales se observa en la Figura 27.

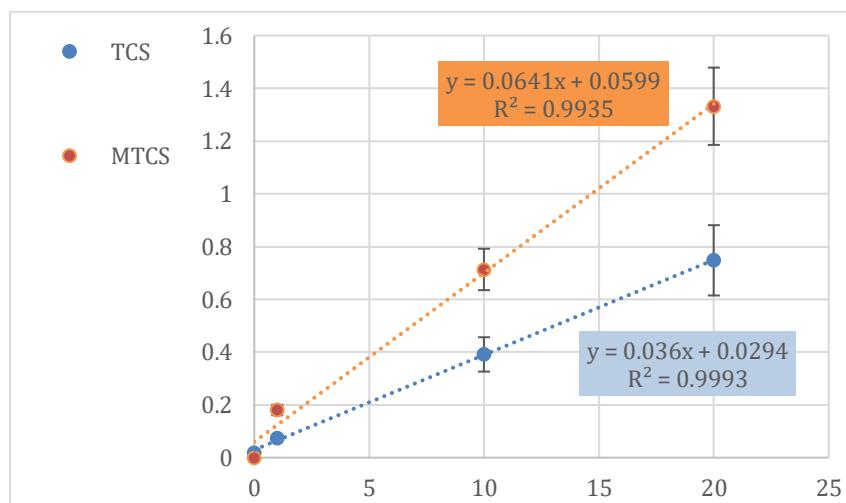


Figura 27: Curva de calibración

Tanto para TCS como para MTCS se obtuvieron altas linealidades con coeficientes de correlación de 0,999 y 0,994 respectivamente.

LOD y LOQ

Los valores de LOD y LOQ fueron calculados siguiendo el principio de 3σ y 10σ planteado en las Ec. 4 y 5 del apartado 4.3. La función Y_{LD} e Y_{LQ} obtenida se interpoló en

la correspondiente ecuación de curva para cada analito y el resultado fue dividido por el factor de enriquecimiento. Con esta información se estimó que la muestra fue enriquecida de 30 a 33,4 veces para cada analito respectivamente. Los valores de LOD fueron 0,11 y 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$ y los LOQ fueron 0,27 y 0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente para MTCS y TCS. Estos límites demuestran un alto índice de preconcentración de los analitos a través de la metodología propuesta para su cuantificación e identificación en muestras reales. Los resultados se resumen en la Tabla 13.

%RSD, %EM y %Re

Teniendo en consideración que el RDSE es un método basado en el equilibrio de partición, se empleó un estándar subrogado TCS-d³ en adición al multi estándar con los analitos de interés como forma de determinar la eficiencia de extracción mediante el %Re relativa de los analitos usando la Ec. 7. Se obtuvieron %Re relativa en el rango de 90 – 100%, indicando una alta exactitud del método para determinar simultáneamente MTCS y TCS. Los valores de precisión se expresaron como la RSD de los resultados de los experimentos de recuperación. Considerando un n=5, los %RSD obtenidos son del rango de 11 a 14%, cifras que describen un método de tratamiento de muestra con una precisión adecuada para la extracción de estos analitos a bajas concentraciones en muestras acuosas. Finalmente, el %EM estimado utilizando la Ec. 8 arrojó como resultado un efecto en el rango de 98 al 102%, mostrando que las interferencias producidas por la matriz de las muestras reales son prácticamente nulas, siendo este un indicio de una alta selectividad de la fase sorbente CHS/GLU sobre los analitos estudiados. Las cifras de mérito aquí descritas se resumen en la Tabla 13.

Tabla 13: Cifras de mérito del método.

Analitos	Sensibilidad ($\text{L } \mu\text{g}^{-1}$)	Linealidad	LOD	LOQ	%Re	%RSD	%ME
		(R^2)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	($\mu\text{g L}^{-1}$)	(Relativa)	(n=5)	(n=3)
TCS	0,036	0,999 ($p>0,05$)	0,19	0,36	100	14	98 (-2)
MTCS	0,064	0,993 ($p>0,05$)	0,11	0,27	90	11	102 (+2)

5.5.- Medición en muestras reales

Una vez garantizada la calidad analítica del método, la aplicabilidad de la extracción por RDSE utilizando la fase sorbente CHS/GLU se demostró analizando las muestras de agua del río Mapocho asociadas a la planta de tratamiento de aguas residuales “El Trebal” previamente descritas en el apartado 4.4. Los resultados obtenidos con la aplicación del método propuesto en este trabajo se recopilan en la Tabla 14.

Tabla 14: Concentración de TCS y MTCS en muestras reales.

Muestras reales Analitos	Efluente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Afluente ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Canoa ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Esperanza ($\mu\text{g L}^{-1}$)
TCS	0,67 \pm 0,2	1,30 \pm 0,07	0,84 \pm 0,1	1,07 \pm 0,03
MTCS	No detectado	No detectado	No detectado	No detectado

Los niveles de TCS encontrados están en rangos de concentración de 0,67 a 1,30 $\mu\text{g L}^{-1}$. Siendo el valor más alto el correspondiente al afluente de la planta de tratamiento de aguas y el más bajo al efluente de esta. Estos niveles considerables de TCS indican que la remoción de este contaminante de las aguas a través de plantas de tratamiento es incompleta, y la disminución en su concentración se puede deber a la capacidad de sorción a los lodos sedimentados que posee el compuesto y a su metabolización en MTCS, procesos descritos previamente en esta investigación. A su vez, en las aguas de río correspondientes a los sitios “Canoa” y “Esperanza” se deberían esperar niveles inferiores de TCS, sin embargo, se encontraron concentraciones de 0,84 y 1,07 $\mu\text{g L}^{-1}$, cifras cercanas al valor cuantificado del afluente. Estos niveles de TCS en las aguas pueden deberse al aumento del uso de productos de higiene que contienen este compuesto como antiséptico por el contexto de la pandemia del Covid-19. En cuanto al MTCS, no fue detectado en ninguna de las muestras estudiadas. Dicho resultado se corresponde a la formación del metabolito metilado de triclosán en la misma planta de tratamiento, sus características más apolares hacen que la molécula de MTCS tienda a depositarse mayoritariamente en los lodos y sedimentos.

6.- CONCLUSIÓN

El método analítico desarrollado de RDSE utilizando una fase sorbente natural de CHS/GLU para la extracción de TCS y MTCS en matrices acuosas y posterior identificación y cuantificación por GC-MS demostró ser adecuado. Las propiedades de la lámina de CHS reticulada con GLU mostró un buen acoplamiento con el disco rotatorio, presentando estabilidad gracias a sus características físicas e higroscópicas obtenidas por el correcto método de formación de la lámina propuesto.

Los estudios de optimización, tanto de derivatización, como del material extractante y del proceso de extracción permitieron establecer las condiciones adecuadas para mejorar la extracción de los analitos y optimizar los recursos del proceso para que este sea concorde a una metodología verde de extracción, obteniendo cifras de mérito aceptables, considerando que se utilizó un material de origen natural y biodegradable como fase sorbente. La derivatización se llevó a cabo con 100 μL de solución MSTFA/AcOEt por 30 minutos a 70°C. Las condiciones operacionales determinadas son: volumen de muestra de 40 mL, pH 4 de muestra, concentración de NaCl de 20% (p/v) para efecto salting out, velocidad de rotación de 2000 rpm y tiempo de extracción de 30 minutos. Para la elución, se emplearon 20 mL de una mezcla 1:1 de metanol y acetato de etilo. Los límites de detección y cuantificación para MTCS y TCS fueron determinados en el rango de 0,11 – 0,19 $\mu\text{g L}^{-1}$ y 0,27 – 0,36 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

La determinación de los contaminantes emergentes en muestras reales arrojó niveles de concentración que van desde los 0,67 $\mu\text{g L}^{-1}$ hasta los 1,30 $\mu\text{g L}^{-1}$ para TCS y bajo los límites de detección para el MTCS. La concentración de TCS resultó ser mayor en el afluente que en el efluente de la planta de tratamiento de aguas, sin embargo, en los sitios “Canoa” y “Esperanza” los niveles cuantificados son similares al efluente, presentando concentraciones más altas de lo esperado considerando que son mediciones llevadas a cabo en agua de río.

El uso de este material basado en CHS, constituye una clara alternativa verde que permite detectar y medir con gran precisión los analitos TCS y MTCS en muestras ambientales como son las muestras de río y de aguas residuales. Los bajos límites de detección y cuantificación son un parámetro que indica que el trabajo a niveles traza de esta clase de compuestos es posible, lo que lo convierte en una herramienta útil para el monitoreo de moléculas orgánicas altamente apolares con características de

contaminantes emergentes, garantizando un resultado de calidad analítica adecuado por su nulo efecto matriz, buena precisión y alta exactitud y con un menor impacto ecológico respecto a otros métodos de preparación de muestra.

Bibliografía

- [1] Anastas, P. T. (1999). *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), 167–175.
- [2] Armenta, S., Garrigues, S., & Guardia, M. (2008). *Trends in Analytical Chemistry – TrAC*, 27, 497-511.
- [3] Koel, M., & Kaljurand, M. (2006). *Pure and Applied Chemistry*, 78(11), 1993–2002.
- [4] Gałuszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78–84.
- [5] Kramer, K. J. M. (1995). *Quality assurance of sampling and sample handling for trace metal analysis in aquatic biota*, 179-214, Weinheim, Germany: VCH.
- [6] Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Sajid, M., & Andruch, V. (2019). *Microchemical Journal*, 149, 103989.
- [7] Chirila, E. S., Draghichi, C., & Dobrinas, S. (n.d.). *NATO Security through Science Series*, 7–28.
- [8] Pacheco-Fernández, I., & Pino, V. (2019). *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 18, 42-50.
- [9] Rutkowska, M., Płotka-Wasyłka, J., Sajid, M., & Andruch, V. (2019). *Microchemical Journal*, 149.
- [10] Poole, C., Mester, Z., Miró, M., Pedersen-Bjergaard, S., & Pawliszyn, J. (2016). *Pure Appl. Chem.*, 88, 649-687.
- [11] Trujillo-Rodríguez, M. J., Pacheco-Fernández, I., Taima-Mancera, I., Díaz, J. H. A., & Pino, V. (2020). *Journal of Chromatography A*, 461670.
- [12] Płotka-Wasyłka, J., Szczepańska, N., de la Guardia, M., & Namieśnik, J. (2015). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, 19–38.
- [13] Richter, P., Leiva, C., Choque, C., Giordano, A., & Sepúlveda, B. (2009). *Journal of Chromatography A*, 1216(49), 8598–8602.
- [14] Richter, P., Arismendi, D., & Becerra-Herrera, M. (2021). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116209.

- [15] Pacheco-Fernández, I., Allgaier-Díaz, D. W., Mastellone, G., Cagliero, C., Díaz, D. D., & Pino, V. (2020). *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 115839.
- [16] Rinaudo, M. (2008). *Polymer International*, 57(3), 397–430.
- [17] Rinaudo, M. (2007). *Progress in Polymer Science*, 38, 603-632.
- [18] Chen, M., Runge, T., Wang, L., Li, R., Feng, J., Shu, X.-L., & Shi, Q.-S. (2018). *Carbohydrate Polymers*, 200, 115–121.
- [19] Mahmoudzadeh, M., Fassihi, A., Emami, J., Davies, N. M., & Dorkoosh, F. (2013). *Journal of Drug Targeting*, 21(8), 693–709.
- [20] Pillai, C., Paul, W., & Sharma, C. (2009). *Prog. Polym. Sci.*, 34, 641–78.
- [21] Xu, L., Huang, Y.-A., Zhu, Q.-J., & Ye, C. (2015). *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), 18328–18347.
- [22] Shah, R., Stodulka, P., Skopalova, K., & Saha, P. (2019). *Polymers*, 11(12), 2094.
- [23] Maitra, J., & Shukla, V.K. (2014). *Am. J. Appl. Polym. Sci.*, 4, 25–31.
- [24] Pavoni, J. M. F., dos Santos, N. Z., May, I. C., Pollo, L. D., & Tessaro, I. C. (2020). *Polymer Bulletin*, 138, 693-703.
- [25] Beppu, M. M., Vieira, R. S., Aimoli, C. G., & Santana, C. C. (2007). *Journal of Membrane Science*, 301(1-2), 126–130.
- [26] Cruz, A. C. P., & Martínez, P. C. C. (2015). El recurso agua en el entorno de las ciudades sustentables. *Cultura Científica y Tecnológica*, 31.
- [27] Ministerios de obras públicas. 2020. Mesa nacional del agua – Primer informe. Cap. 4, 16.
- [28] Marsalek, J., Jiménez, B., Malmquist, P.-A, Karamouz, M. Goldenfum, J. & Chocat, B. (2007). UNESCO-IHP, CRC press, Vol. 2, Cap. 3, 17.
- [29] Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., & Gin, K.Y.-H. (2014). *Environment International*, 71, 46–62.
- [30] Dhillon, G., Kaur, S., Pulicharla, R., Brar, S., Cledón, M., Verma, M., & Surampalli, R. (2015). *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 12(5), 5657-84.

- [31] Bock, M., Lyndall, J., Barber, T., Fuchsman, P., Perruchon, E., & Capdevielle, M. (2010). *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6(3), 393–404.
- [32] Heidler, J., & Halden, R.U. (2007). *Chemosphere*, 66(2), 362-369.
- [33] Ricart, M., Guasch, H., Alberch, M., Barceló, D., Bonnineau, C., Geiszinger, A., & Sabater, S. (2010). *Aquatic Toxicology*, 100(4), 346–353.
- [34] McAvoy, D. C., Schatowitz, B., Jacob, M., Hauk, A., & Eckhoff, W. S. (2002). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(7), 1323–1329.
- [35] Ciba Specialty Chemicals. (2001). Publication AgB2520e.02.2001, Brochure 2520.
- [36] McMurry, L. M., Oethinger, M., & Levy, S. B. (1998). *Nature*, 394(6693), 531–532.
- [37] Lee, J. D., Lee, J. Y., Kwack, S. J., Shin, C. Y., Jang, H.-J., Kim, H. Y., & Kim, K.B. (2019). *Toxicological Research*, 35(2), 137–154.
- [38] Tran, D. N., Jung, E.M., Yoo, Y.M., Lee, J.-H., & Jeung, E.B. (2020). *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11), 4009.
- [39] Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., & Le Bot, B. (2012). *Environmental Science and Pollution Research*, 19(4), 1044-1065.
- [40] Lyndall, J., Fuchsman, P., Bock, M., Barber, T., Lauren, D., Leigh, K., & Capdevielle, M. (2010). *Integrated Environmental Assessment and Management*, 6, 419-40.
- [41] Balmer, M. E., Poiger, T., Droz, C., Romanin, K., Bergqvist, P.-A., Müller, M. D., & Buser, H.-R. (2004). *Environmental Science & Technology*, 38(2), 390–395.
- [42] James, M. O., Marth, C. J., & Rowland-Faux, L. (2012). *Aquatic Toxicology*, 124-125, 72–82.
- [43] Jachero Abril, L. M. (2017). *Microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) y su aplicación en la estimación de la fracción biodisponible de triclosán y metiltriclosán en suelos enmendados con biosólido* [Tesis de doctorado, Universidad de Chile]. Repositorio ANID.
- [44] Homez-Jara, A., Daza, L. D., Aguirre, D. M., Muñoz, J. A., Solanilla, J. F., & Váquiro, H. A. (2018). *International Journal of Biological Macromolecules*, 113, 1233–1240.
- [45] Hansch, C., Leo, A., & Hoekman, D. (1995). *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 9782.

- [46] Jimenez, C., & María Gilka. (2015). *Revista Varianza*, 11, 31-36.
- [47] Araujo, P., & Janagap, S. (2012). *Journal of Chromatography B*, 910, 14–21.
- [48] Arismendi, D., Díaz, K., Aguilera-Marabolí, N., Sepúlveda, B., & Richter, P. (2020). *Microchemical Journal*, 158, 105149.
- [49] Cerrato, I., Molina-Balmaceda, A., Arismendi, D., Ahumada, I., & Richter, P. (2022). *Green Analytical Chemistry*. 1, 100008.