

Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas



“Uso de un biosorbente carbonizado derivado de la cáscara de plátano para la microextracción de contaminantes emergentes en muestras acuosas”

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

Giovanni Alejandro Torres Bettini

Director de tesis: Pablo Richter Duk

Santiago-CHILE

Agosto 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

Giovanni Alejandro Torres Bettini

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química y Título de Química

Director de Tesis:

Dr. Pablo Richter Duk

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Tatiana Garrido

Dra. Sandra Orellana

Dr. Pablo Jaque

*“La paciencia es la
madre de la ciencia”*

AGRADECIMIENTOS

Desde y para siempre agradezco a mi familia por el apoyo y amor que me dan, me faltará vida para agradecerle a mis padres por ser tan apañadores, siempre apoyándome en mis proyectos y metas. Sin ellos, nada de esto sería posible. Les agradezco por incentivar a practicar la natación, deporte que me abrió todas las puertas para llegar a escribir estos agradecimientos.

A mis hermanos, Nico y Maxi por aguantar a la oveja de color de la casa jeje, por escucharme y tratar de aprender todas las ideas deconstructivas con las que llego a la casa, al Lu que, si bien no compartimos sangre, es familia, a mis primos y tíos queridos que siempre me hacen reír hasta llorar, a la Feña por apoyarme y amarme en este último proceso.

A mi abuela querida, mi segunda madre, me regalaba siempre y quería estar presente el día de mi titulación, pero el destino quiso que descansara en paz y se que lo esta haciendo, te lo mereces Mimi.

A mi amiga Valevalesita, se merece un párrafo completo, ya que, fuimos apoyo mutuo para poder llegar a terminar la carrera, siempre recordaré los estudios hasta horas avanzadas de la noche en el bus, con el Benja y Polsito, la ansiedad antes de las pruebas y como no, las celebraciones después de las pruebas, los paseos a llorar al cementerio para que pasara piola nuestra tristeza después de echarnos un ramo. Además, te agradezco por siempre recordarme y organizarme con las cosas de la u, te quiero mucho amiga.

A mis compañerxs de laboratorio, Naty, Vale y Ivan, que nos quedábamos todo el día en el laboratorio sacando experimentos (ellos más que yo), que lo pasamos super bien en el congreso. Pero un especial agradecimiento a la Naty que al igual que la Valevalesita me recordaba todas las fechas académicas importantes, además de siempre apañar a las cosas divertidas.

Al laboratorio completo de química ambiental que me abrieron las puertas, siempre dispuestos a ayudar. Ale y Dani muchas gracias por aguantarme y enseñarme tanto, a la Inma por siempre apoyar y contarnos sobre sus anécdotas divertidas que ha vivido, a la Betza que siempre realizaba milagros con el GC y que siempre nos sacaba de apuros.

A todos los amigos que conocí en la facultad, al Jose y Chokita, los primeros amigos que hice y que hasta el día de hoy los veo seguidos, a Rayhen y Nacha mis panas gracias por los momentos, aprendizajes y risas, al Josele y Sando por dejarlos llevar por el buen camino de la U, al Palma que sin él me hubiera echado más ramos, siempre dispuesto a enseñarme, al Pol y Benja que compartimos tantos buenos momentos, al Lupo, Renzo y Bob, los mejores ayudantes que terminaron siendo amigos, JF, Ernesto y Cote que nos hicimos más amix estando en el magister, a mi equipo de futbol C.A.nabis que siempre lo dábamos todo en cada partido (después también), podría llenar la plana nombrando gente de la facultad, desde el corazón agradezco haber compartido tantos momentos y viernes.

A mis panas del agua, Andy, Pablito, Nacho, Cacho, Camilita, Vipi, por disfrutar la misma pasión y amor por el deporte más exigente y hermoso que hay, por apoyarnos a acelerar un poco antes de llegar a la meta, por darnos animo cuando ya no podíamos más, por celebrar los triunfos y por estar en las derrotas, los amigos del agua son para siempre.

A mis equipos de natación, ADH y en especial a la selección de la universidad. En mi paso por la selección aprendí lo que es la pasión por un equipo y creo que los sentimientos más fuertes que he vivido los pasé con ustedes, soy privilegiado por vivir momentos tan intensos emocionalmente en las competencias, el sentimiento de no poder más nadando y, al respirar, ver a toda una hinchada que te está alentando con banderas, lienzos y bombo; no tiene precio. A mis entrenadores Cesar, Cris y Álvaro que siempre creyeron en mí y sabían que yo creía en ellos.

A todos los funcionarios de la facultad, a don Marcelo que siempre atento a los requerimientos del laboratorio, a las tías del aseo que esperaban a que nos fuéramos de los cementos para poder terminar la pega, a la Natalia A que me ayudó incontables veces, muchas gracias por soportar.

A mi director de tesis, profe Pablo gracias por abrirme las puertas del laboratorio y siempre ayudarnos, gracias por siempre preocuparse por nosotros, aunque no tuviera mucho tiempo y siempre tener las correcciones en tiempo record.

A los profesores miembros de la comisión evaluadora, por sus críticas constructivas e ideas a tener en cuenta para realizar mi tesis. En especial al profe Pablo Jaque, que siempre que me lo encontraba me sacaba muchas risas.

A todos los profesores que me entregaron todos los conocimientos que se de química, pero a la vez mezclados con una cuota de humanidad, profe Loreto, Tati, María Carolina, Ines, German, Jorge y Vicente.

Al proyecto FONDECYT regular 1220225 y 1180742 por el financiamiento realizado para esta investigación.

Los autores también agradecen al Proyecto FONDEQUIP EQM170141 por el financiamiento de esta investigación.

A todas las personas que no alcance a nombrar, pero que fueron importantes en este proceso, muchas gracias.

Giovanni Torres Bettini

RESUMEN

Hoy en día la emisión de contaminantes emergentes se ha convertido en un gran problema medioambiental. Estos derivan principalmente de productos utilizados cotidianamente, tales como productos farmacéuticos de uso humano, veterinario, de cuidado personal, plastificantes y aditivos industriales. La problemática principal de estos contaminantes no se enfoca tan solo en su persistencia, sino que también en sus productos de degradación, los cuales pueden ser incluso más dañinos para el ecosistema.

En la actualidad se han buscado formas más económicas y ecoeficientes para la adsorción y posterior remoción de estos contaminantes. Dentro de estas alternativas se presentan investigaciones que analizan el uso de sorbentes naturales para la extracción de estos compuestos, ya sean del tipo orgánicos e inorgánicos. Generalmente la separación de contaminantes se enfocaba principalmente en el tratamiento de aguas, pero en las últimas dos décadas se han desarrollado importantes avances en el área de la química analítica, en particular en tecnologías de microextracción por ser más concordantes con la química verde.

Para esta investigación se seleccionó la cáscara de plátano como fase biosorbente para la extracción y preconcentración de contaminantes emergentes en muestras acuosas, usando como técnica la microextracción por sorción en disco rotatorio (RSDE). Además, este trabajo apuntó a la generación de carbones a partir de la fase natural a través de un proceso de pirólisis, el cual aumentó su porosidad y área de contacto, mejorando considerablemente la eficiencia de extracción de los analitos. En esta investigación se prepararon dos tipos de carbones, el primero sin activación (biochar), carbonizado a distintas temperaturas. Mientras que el segundo, activado en medio neutro formando una sal fundida con $ZnCl_2$ a distintas proporciones, evaluado también a distintas temperaturas.

El alcance de la presente investigación se basa en el desarrollo de metodologías analíticas para la extracción de triclosán, bisfenol A, 17- α -etinilestradiol, propilparabeno e ibuprofeno; a través de la utilización de la cáscara del plátano limpia y seca (CPLS), biochar (BIO) y carbón activado (CA), como fases sorbentes naturales. A continuación, la determinación se lleva a cabo por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

Dentro de los resultados obtenidos, se logró la optimización y validación del método analítico usando la fase cruda, biochar y carbón activo. La primera fase mostró ser apropiada para la extracción de 3 contaminantes emergentes, 17- α -etinilestradiol, bisfenol A y triclosán. La segunda y tercera fase demostró ser pertinente para la sorción de los 5 contaminantes emergentes en estudio. Esto permite concluir que las fases carbonizadas presentan una mayor capacidad de sorción de compuestos polares con respecto a la fase natural. Las fases desarrolladas demostraron ser una adecuada alternativa a las fases comerciales sintéticas tradicionales.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. FUNDAMENTO TEÓRICO	13
2.1 Contaminantes emergentes (CEs).....	13
2.1.1 Triclosán (TCS).....	14
2.1.2 Bisfenol A (BPA).....	14
2.1.3 17- α -etinilestradiol (EE2)	15
2.1.4 Propilparabeno (PP)	15
2.1.5 Ibuprofeno (IBU).....	16
2.2 Técnicas de interés para la investigación.....	16
2.2.1 Cromatografía de gases / Espectrometría de masas (GC-MS).....	16
2.2.2 Microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE).....	17
2.3 Fase sorbente	17
2.3.1 Biochar y carbón activado	18
2.3.2 Cáscara de plátano	19
3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	20
3.1 Hipótesis.....	20
3.2 Objetivo general.....	20
3.3 Objetivos específicos.....	20
4. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS.....	21
4.1 Estándares.....	21
4.2 Reactivos	21
4.3 Solventes y gases.....	21
4.4 Materiales	21
4.5 Equipos principales	21
5. METODOLOGÍA.....	22
5.1 Identificación de los analitos mediante GC-MS	22
5.2 Condiciones cromatográficas	23
5.3 Derivatización de los analitos.....	23
5.4 Preparación de fase cruda (CPLS).....	23
5.5 Preparación del biochar	23
5.6 Selección de agente activante para obtener carbón activo.....	24

5.7 Selección de condiciones de preparación del CA.....	24
5.8 Caracterización de fases naturales.....	24
5.9 Metodología general de la microextracción por RDSE	25
5.9.1 Preparación del disco	25
5.9.2 Acondicionamiento del disco	25
5.9.3 Extracción	25
5.9.4 Desorción	26
5.10 Optimización de condiciones de extracción usando CPLS, biochar y CA	27
5.10.1 <i>Tiempo de extracción</i>	27
5.10.2 Tiempo de elución.....	27
5.10.3 Cantidad de fase.....	27
5.10.4 Solvente de elución	27
5.10.5 Fuerza iónica	27
5.10.6 pH de extracción	27
5.11 Validación del método analítico usando CPLS, biochar y CA	28
5.11.1 Curva de calibración	28
5.11.2 Límites de detección y cuantificación	28
5.11.3 Precisión	28
5.11.4 Exactitud.....	29
5.11.5 Efecto matriz	29
5.12 Comparación fase natural vs fases sintéticas.....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	30
6.1 Desarrollo de una metodología cromatográfica	30
6.2 Resultados usando la cáscara de plátano limpia y seca.....	32
6.2.1 Caracterización de la CPLS.....	32
6.2.2 Optimización del método analítico usando la CPLS	36
6.2.3 Validación del método analítico.....	40
6.3 Resultados y discusión usando biochar.....	42
6.3.1 Caracterización del biochar	42
6.3.2 Optimización del método analítico usando BIO.....	45
6.3.3 Validación del método analítico usando biochar	48
6.3.4 Comparación biochar vs fases sintéticas comerciales	49
6.4 Resultados y discusión usando carbón activado.....	50

6.4.1 Estudio de variables en la preparación del CA	50
6.4.1.1 Selección de la activación.....	50
6.4.1.2 Selección de temperatura de carbonización.....	51
6.4.1.3 Estudio de activaciones	51
6.4.2 Caracterización del carbón activo	52
6.4.3 Optimización carbón activado.....	54
6.4.4 Validación usando carbón activado	58
6.4.5 Comparación del CA vs fases sintéticas comerciales	59
7. CONCLUSIONES	60
8. BIBLIOGRAFIA	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Molécula orgánica TCS	14
Figura 2: Estructura molecular del BPA.....	14
Figura 3: Estructura molecular del EE2.	15
Figura 4: Molécula orgánica del PP	16
Figura 5: Estructura molecular del IBU	16
Figura 6: Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de masas ISQ.....	21
Figura 7: Espectrómetro ATR-FT-IR.	22
Figura 8: Preparación disco rotatorio.....	24
Figura 9: Resumen de metodología general.	26
Figura 10: Cromatograma del multiestándar que contiene a los analitos.....	30
Figura 11: Elección de iones para el BPA	31
Figura 12: Espectro FT-IR de la CPLS	32
Figura 13: Comparación CPLS (espectro rojo) con cáscara de plátano cruda (espectro azul).	33
Figura 14: TGA de la cáscara de plátano limpia y seca.....	34
Figura 15: DTG de la CPLS.....	34
Figura 16: Punto de carga cero de la CPLS	35
Figura 17: SEM de la CPLS a 500um.	36
Figura 18: SEM de la CPLS a 500um.	36
Figura 19: Perfil de extracción usando CPLS.	36
Figura 20: Perfil de elución usando CPLS.	37
Figura 21: Efecto del pH extracción usando CPLS.	38
Figura 22: Efecto de la fuerza iónica usando CPLS.....	39
Figura 23: Optimización del solvente de elución usando CPLS.....	39
Figura 24: Efecto de la cantidad de fase usando CPLS.....	40
Figura 25: Comparación del FT-IR de los biochar.....	39
Figura 26: Comparación biochar de 400 vs 600°C.....	43
Figura 27: Punto de carga cero del biochar.	44
Figura 28: SEM de BIO a 800X.	44

Figura 29: SEM de BIO a 4000 X.	44
Figura 30: Perfil de extracción del TCS.	45
Figura 31: Perfil de extracción del BPA.	45
Figura 32: Perfil de extracción del PP.	45
Figura 33: Perfil de extracción del EE2.	45
Figura 34: Efecto del pH de extracción usando biochar.	46
Figura 35: Efecto de la fuerza iónica de extracción usando biochar.	46
Figura 36: Optimización del solvente de elución usando biochar.	47
Figura 37: Efecto de cantidad de biochar usando biochar.	48
Figura 38: Comparación fases comerciales con biochar.	49
Figura 39: Selección de la reacción de activación.	50
Figura 40: Estudio de temperatura de carbonización.	51
Figura 41: Estudio de concentración de activación.	52
Figura 42: FT-IR del carbón activado.	52
Figura 43: Punto de carga cero del CA.	53
Figura 44: SEM del CA ampliado 1300X.	54
Figura 45: SEM del CA ampliado 30000X.	54
Figura 46: Perfil de extracción del BPA.	55
Figura 47: Perfil de extracción del PP.	55
Figura 48: Perfil de extracción del EE2.	55
Figura 49: Perfil de extracción del IBU.	55
Figura 50: Perfil de extracción del TCS.	56
Figura 51: Efecto del pH de extracción usando CA.	56
Figura 52: Efecto de la cantidad de fase usando CA.	57
Figura 53: Efecto de la fuerza iónica usando CA.	57
Figura 54: Comparación fases comerciales con CA.	59
Figura 55: Análisis estadístico de comparación de fases comerciales vs CA.	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones de optimización para cada fase bio-sorbente.	27
Tabla 2: iones cuanti y cualificadores de cada analito junto a sus tiempos de retención.	30
Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas de los analitos.	32
Tabla 4: Cifras de mérito del método analítico usando CPLS.	40
Tabla 5: Valores en porcentajes de efecto matriz, recuperación absoluta y relativa.	41
Tabla 6: Coeficientes de variación (CV) para cada analito a 400 y 600°C.	43
Tabla 7: Cifras de mérito usando biochar como fase sorbente.	48
Tabla 8: Porcentajes de recuperación y efecto matriz usando biochar.	49
Tabla 9: Valores obtenidos por el análisis BET.	54
Tabla 10: Cifras de mérito usando carbón activado.	58
Tabla 11: Recuperaciones y efecto matriz usando CA.	58

ABREVIATURAS

-ACN: Acetonitrilo	-MeOH: Metanol
-AcOEt: Acetato de etilo	-MS: Espectroscopia de masas
-AINE: Medicamento antiinflamatorio no esteroideo	-MSTFA: N-metil-N-trimetil-trifluoro acetamida
-BET: Análisis Brunauer-Emmett-Teller	-NaHCO ₃ : bicarbonato de sodio
-BIO: Biochar de cáscara de plátano	-PP: Propilparabeno
-BPA: Bisfenol A	-Pyr: Piridina
-CA: Carbón activado de cáscara de plátano	-PZC: Análisis del punto de carga cero
-CEs: Contaminantes emergentes	-RDSE: Extracción por sorción en disco rotatorio
-COP: Contaminantes orgánicos persistentes	-Re (%): Recuperación absoluta
-CPLS: Cáscara de plátano limpia y seca	-rpm: Revoluciones por minuto
-DE: Disruptores endocrinos	-RSD (%): Desviación estándar relativa
-DMA: Directiva marco del agua	-s-DVB: Estireno divinil benceno
-DTG: Derivada del termograma	-SIM: Monitoreo selectivo de iones
-EDAR: Efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales	-SEM: Microscopia electrónica de barrido
-EE2: Etenilestradiol	-SMPE: Microextracción en fase solida
-EM (%): Efecto matriz	-SPE: Extracción en fase solida
-FT-IR: Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier	-TCS: Triclosán
-GC: Cromatografía gaseosa	-TGA: Análisis termogravimétrico
-HLB: Hidrofilic-lipofilic balance	-t _r : Tiempo de retención
-IBU: Ibuprofeno	
-Kow: Constante octanol/agua	
-LOD: Limites de detección	
-LOQ: Limites de cuantificación	

1. INTRODUCCIÓN

La química analítica verde (GAC, Green Analytical Chemistry) consiste en el desarrollo de la química con el propósito de hacer las prácticas de laboratorio menos agresivas, implementando nuevas metodologías e instrumentos que sean amigables con el medio ambiente, sin perder calidad en el análisis. En concreto, diferentes autores definieron 12 principios al respecto. Dentro de estos principios destacan el uso de metodologías miniaturizadas, evitar generar gran cantidad de desechos y priorizar materiales de fuentes naturales (Gałuszka et al., 2013).

En la química analítica, el muestreo, la preparación de muestra y la técnica de medición son pasos fundamentales al momento de desarrollar una metodología, especialmente si lo entrelazamos con el concepto y principios de la química analítica verde, como disminuir los elementos utilizados, evitar desechos y priorizar materiales de fuentes naturales (Pena-Pereira et al., 2021). Lo anterior, se relaciona directamente con las técnicas de microextracción, debido a que, estas usan bajos volúmenes de muestra, reactivos y de fase sorbente; esta última puede proceder de fuentes naturales, por lo tanto, es una alternativa sustentable a la hora de elegir una metodología analítica.

En función de lo anterior, esta investigación busca entregar antecedentes relevantes en torno a la utilización de la cáscara de plátano cruda y carbonizada como fase sorbente para el proceso de microextracción de estos contaminantes emergentes. Su poder de retención se debe a la presencia de hemicelulosa, lignina, lípidos, proteínas, azúcares e hidrocarburos en su estructura.

Se ha demostrado que las fases sorbentes naturales son eficientes para el tratamiento de aguas residuales (Rodríguez-Mozaz, et al., 2004). En este contexto, es factible utilizar la cáscara de plátano limpia y seca (CPLS) para microextraer los contaminantes emergentes (CEs) ya mencionados; principalmente por medio de interacciones hidrofílicas e hidrofóbicas, mediante interacciones del tipo π - π y puentes de hidrógeno.

Por otro lado, las muestras de aguas residuales, se consideran matrices complejas, debido al alto número de otras sustancias que contienen en concentraciones mucho más altas que los analitos a determinar. Es por ello que la preparación de muestras es un proceso muy importante para separar y concentrar a los analitos, con el fin de obtener cromatogramas limpios que permitan su identificación y cuantificación. Estos compuestos llegan a los efluentes de agua debido a su baja retención en plantas de tratamientos de aguas residuales (Petrovic, et al., 2003). Tal como su nombre lo indica, al ser emergentes no existen normas que promuevan nuevas tecnologías para su retención en las plantas de tratamiento, por ello llegan a los cuerpos de agua naturales, contaminándolos y alterando la biodiversidad del lugar (Fabbri, 2015). Pese a que, aún no existan certezas respecto al grado de concentración del contaminante emergente que afecta a los seres vivos, si se presenta como consenso el potencial que mantienen algunos de ellos como disruptores endocrinos (DE), lo que significa que pueden causar anomalías en el sistema endocrino, provocando efectos adversos en los organismos (Eertmans et al., 2003).

En Chile, el crecimiento de los procesos productivos y la actividad industrial han incrementado la concentración de los contaminantes emergentes en los efluentes de aguas residuales debido al abuso y a la deficiente remoción de estos compuestos en plantas de tratamiento de aguas residuales. Consecuentemente, estos contaminantes llegan a las aguas naturales alterando la

biodiversidad y el ecosistema, especialmente cuando se trata de compuestos hidrofílicos, ya que su separación consta de un proceso más complejo producto de su alta solubilidad en agua.

Adicionalmente, estos contaminantes no forman parte de la norma de descarga de efluentes líquidos a cuerpos de agua superficiales (D.S. N°90/2000), lo que, sumado a su gran afinidad con el agua, dificulta su remoción en las aguas servidas, generando que estos contaminantes lleguen a los efluentes de ríos.

Consecuentemente, es de vital importancia levantar información sobre estos contaminantes, con el fin de promover la elaboración de normas que permitan modificar las tecnologías actualmente utilizadas en las plantas de tratamientos de agua residual. Para ello, en esta investigación se desarrollará un método de microextracción basado en el uso del sorbente natural (basado en la cáscara de plátano) que permita separar y concentrar CEs para ser determinados por cromatografía gaseosa acoplada a un detector de masas (GC-MS). La aplicación de este método en aguas residuales permitirá generar información de los niveles de concentración de estos analitos en los efluentes de las plantas de aguas residuales de la Región Metropolitana. Además, se comparará la eficiencia de estas fases naturales con fases sintéticas, de manera de poder sustituir éstas últimas en los procesos de preparación de muestra y proveer un carácter mucho más verde en la metodología analítica.

2. FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1 Contaminantes emergentes (CEs)

Hasta principios de 1990, los “compuestos peligrosos no polares” (es decir, los contaminantes orgánicos persistentes (COP) y los metales pesados) eran un foco de interés y concienciación como contaminantes prioritarios, por lo que formaban parte de programas intensivos de vigilancia. Hoy en día, estos compuestos son menos relevantes para los países industrializados, ya que, se ha logrado una reducción dramática de las emisiones mediante la adopción de medidas apropiadas y eliminación de las fuentes dominantes de contaminación.

Sin embargo, la emisión de los llamados CEs, que, por su naturaleza, no han sido regulados se ha convertido en un problema ambiental, donde existe un consenso generalizado de que este tipo de contaminación debe requerir una intervención legislativa (Petrie, et al., 2015). Este grupo comprende principalmente productos utilizados en grandes cantidades en la vida cotidiana, como productos farmacéuticos humanos y veterinarios, productos de cuidado personal, tensioactivos, residuos de surfactantes, plastificantes y diversos aditivos industriales. La característica de estos contaminantes es que no necesitan ser persistentes en el medio ambiente para causar efectos negativos, ya que sus altas tasas de transformación y eliminación pueden compensarse con su continua introducción en el medio ambiente (Fabbri, 2015).

Una de las principales fuentes de contaminantes emergentes son los efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR). La mayoría de las EDAR actuales no están diseñadas para tratar este tipo de sustancias y una gran parte de los compuestos emergentes y sus metabolitos pueden escapar a la eliminación en las EDAR y entrar en el medio acuático a través de los efluentes de aguas residuales (Petrovic, 2003).

2.1.1 Triclosán (TCS)

El triclosán posee una masa molar de 289,5 g/mol, una solubilidad de $3,45 \times 10^{-5}$ mg L⁻¹, un pKa de 7,9, valor que es bastante importante cuando se quiere seleccionar un pH de extracción, ya que, a pH muy básico este se encontrará en su forma ionizada, lo que dificultaría su extracción. Por último, el TCS posee un valor de log Kow de 4,76, valor que mide la solubilidad de este analito en octanol y agua. Por lo tanto, lo califica como un compuesto hidrofóbico y, por lo tanto, tiene una baja solubilidad en agua.

En la bibliografía existente, se ha puesto de manifiesto la presencia de triclosán en distintas matrices medioambientales, tales como aguas residuales y superficiales, sedimentos, lodos, e incluso muestras de material biológico (grasa de pescado, leche materna, plasma y orina). En el caso de muestras acuosas, las concentraciones varían enormemente entre aguas residuales y aguas superficiales, pero también en distintas zonas del planeta. Salvo alguna excepción, el nivel medio de triclosán en el agua residual sin tratamiento es del orden de 2 ng mL⁻¹, mientras que, en el agua residual tratada, los niveles son inferiores a 0,1 ng mL⁻¹ (Halden, 2007). En la figura 1 se muestra la estructura molecular del TCS.

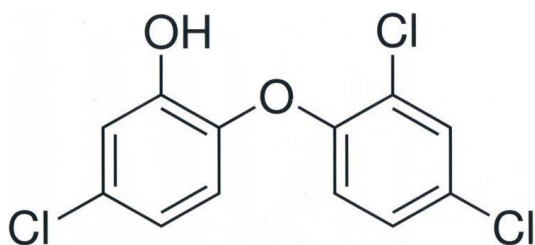


Figura 1: Estructura molecular del TCS

2.1.2 Bisfenol A (BPA)

El bisfenol A (BPA) es el nombre común para el 2,2-(4,4'-dihidroxidifenil) propano, es una sustancia ubicua utilizada principalmente en la producción de resinas epoxi y plásticos de policarbonato. La actividad estrogénica del BPA ha sido ampliamente conocida desde 1938 (Staples et al., 1998). Sin embargo, el BPA se ha detectado en muestras de efluentes de EDAR y también en sedimentos y peces (Huang, et al., 2012). En la figura 2, se presenta la estructura molecular del BPA.

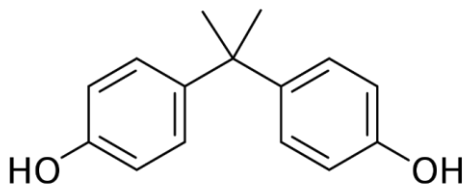


Figura 2: Estructura molecular del BPA

El BPA tiene una masa molar de 336,23 g/mol, posee muy baja solubilidad en agua, ya que posee un log Kow de 4,47. Además, posee un pKa de 9,2 encontrándose principalmente en su forma ionizada en medios acuosos.

2.1.3 17- α -etinilestradiol (EE2)

El etinilestradiol es un estrógeno derivado del estradiol, principio activo de las pastillas anticonceptivas. Este fue el primer análogo del estrógeno sintetizado en Berlín en 1938, y es uno de los medicamentos más utilizados en el mundo. (Sneader, 2005). El EE2 posee una masa molar de 296,4 g/mol, su solubilidad es de 3,6 mg L⁻¹, tiene un log Kow de 4,01, lo que nos indica que es un compuesto hidrofóbico. Además, posee un pKa de 10,46. En la figura 3 se aprecia su estructura molecular.

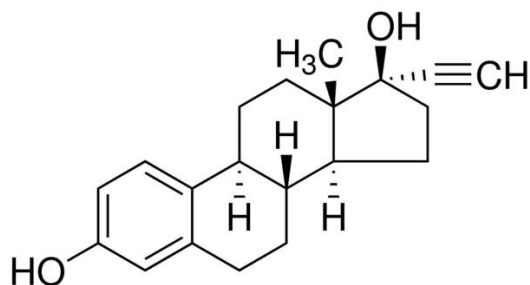


Figura 3: Estructura molecular del EE2.

Un ejemplo claro de la necesidad de normar estos contaminantes son los numerosos estudios científicos que han informado que los estrógenos esteroideos, estrona, 17-estradiol, (hormona natural), y 17-etinilestradiol (EE2) (hormona sintética) en forma inalterada se vierten en las aguas superficiales junto con los efluentes de las EDAR. Estas hormonas tienen una actividad biológica muy alta y causan toxicidad reproductiva en la población (Sasco, 2001). Debido a los efectos adversos en especies acuáticas sensibles, estos estrógenos esteroideos fueron incluidos en la Directiva Marco del Agua (DMA) de la Unión Europea (Könemann, et al., 2018).

2.1.4 Propilparabeno (PP)

El Propilparabeno es un éster sólido perteneciente a la familia química de los parabenos, que se produce de forma natural. Su finalidad es ser usado como conservante, enfocado en retrasar el proceso de descomposición, evitando el crecimiento de microorganismos como hongos, bacterias, levaduras y mohos (Haman, et al., 2015). Este es usado principalmente en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. El PP al ser una sustancia de origen natural, debe someterse a un proceso de síntesis para su adecuada comercialización, mediante la conversión del ácido p-hidroxibenzoico. En la figura 4, se presenta la estructura molecular del PP.

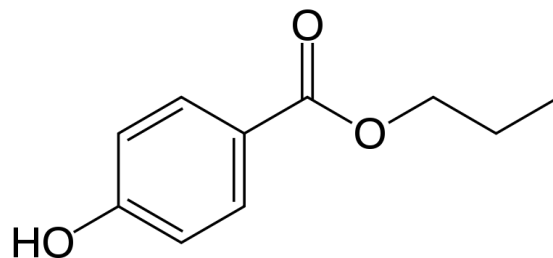


Figura 4: Estructura molecular del PP

El PP posee una masa molar de 180,2 g/mol, posee un log Kow de 3,04, por lo tanto, es un poco menos hidrofóbico que los contaminantes ya mencionados. Finalmente, el PP posee un pKa de 8,5.

2.1.5 Ibuprofeno (IBU)

El ibuprofeno (ácido 2-[4-(2-metilpropil) fenil]propanoico) es el tercer fármaco más utilizados en Chile según el ISP (ISP, 2021). Es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE) que no requiere receta médica. Es ampliamente utilizado para tratar el dolor y la inflamación en enfermedades reumáticas y otros trastornos musculoesqueléticos (Aslam, 2010). En la figura 5 se presenta la estructura molecular del IBU.

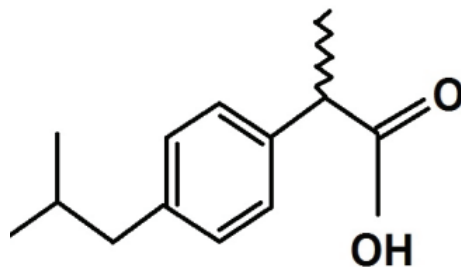


Figura 5: Estructura molecular del IBU

El ibuprofeno tiene una masa molar de 206,28 g/mol, posee un log Kow de 3,97, siendo poco soluble en agua con una solubilidad de 2,1 mg L⁻¹, pero al tener un pKa de 4,45 hace que sea fácilmente ionizable al pH de las aguas.

2.2 Técnicas de interés para la investigación

2.2.1 Cromatografía de gases / Espectrometría de masas (GC-MS)

La cromatografía de gases es una técnica separativa que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Sin embargo, una vez separados los componentes, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en muestras acuosas ambientales.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Con respecto a mezclas complejas, el cromatograma obtenido puede presentar muchos picos, algunos de ellos muy próximos, resultando difícil la identificación rápida y fiable de algún compuesto de interés. Cuando se desea explícitamente localizar la presencia de uno o varios compuestos determinados, de espectro conocido, con la mayor rapidez o con la máxima sensibilidad posible se recurre a la técnica de detección SIM (*“selected ion monitoring”*). En esta modalidad de trabajo se detectan solamente algunas masas de interés, en lugar de trabajar con el total de los iones (TIC). De esta forma, se aumenta la selectividad del método, reduciéndose las interferencias. Sin embargo, esta técnica analítica está fuertemente limitada a la volatilidad y polaridad de los analitos. En algunos casos, es posible disminuir la polaridad y aumentar la volatilidad de los compuestos mediante protocolos de derivatización previos a la inyección cromatográfica.

2.2.2 Microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE)

Las técnicas de extracción juegan un papel fundamental en la química analítica, porque permiten tanto el enriquecimiento del analito como la separación de interferentes en un solo paso (Costa, et al., 2021). Consecuentemente, las acciones van encaminadas hacia una búsqueda constante de optimización de los procesos, para poder mejorar las falencias operativas de las técnicas tradicionales. Entre las novedosas técnicas de microextracción disponibles hoy en día, la microextracción por sorción con disco rotatorio (RDSE) ha demostrado ser eficiente en procesos analíticos de determinación de contaminantes emergentes en muestras acuosas. Esta técnica consiste en un disco de teflón de 1,5 cm de diámetro en cuyo interior hay una barra magnética que permite su rotación mediante agitación magnética. Además, en su superficie posee una cavidad donde se deposita la fase sorbente. En el caso de utilizarse con fases sorbentes en polvo, se depositan aproximadamente 50 mg de fase en la cavidad y se recubre con filtro de lana de vidrio sujeto con ayuda de un anillo de teflón. Este disco se deposita en un vial con muestra acuosa, donde por medio de agitación ocurre la extracción de los analitos desde la matriz hacia la fase sorbente, estos analitos se mueven por la convección generada por el vortex, lo que aumenta considerablemente la eficiencia y eficacia de extracción (Richter et al., 2021). Hasta ahora, RDSE ha sido utilizada principalmente con sorbentes sintéticos comerciales, típicamente diseñados para extracción en fase sólida (SPE). Es por ello, que nuestro grupo de investigación se encuentra investigando la funcionalidad de fases naturales para la microextracción de estos CE.

2.3 Fase sorbente

Actualmente, existen varias fases sintéticas en el mercado, las cuales cubren una amplia gama de polaridades, por ejemplo, fases poliméricas como Oasis-HLB, polidimetilsiloxano, polímeros de impresión molecular (*Molecular Imprinted Polymer*), compuestos de estructuras metalorgánicas (*Metal-organic Frameworks*), líquidos iónicos, etc. Estas fases sorbentes son eficientes para la extracción de trazas de contaminantes emergentes desde matrices complejas. Sin embargo, son muy costosas y no son amigables con el medioambiente. Es por ello, que en los últimos años se ha

promovido el diseño de fases de origen natural como una gran alternativa al momento de elegir una fase sorbente (Gao, et al., 2020).

Por otro lado, un grupo importante de fases sorbentes naturales se producen a partir de la biomasa, las cuales poseen gran variedad de biopolímeros como la celulosa, lignina, suberina y hemicelulosa que presentan grupos funcionales y estructuras 3D, esto permite la retención de los contaminantes en su superficie, mediante interacciones pi-pi, puentes de hidrogeno y fuerzas de Van der Waals (Gurav, et al., 2020).

Cabe destacar, que además de todos los beneficios ya nombrados de usar este tipo de fases sorbentes, estas provienen de los desechos y subproductos de la industria agrícola, lo que favorece a la economía circular mediante el reciclaje y reutilización de estos subproductos (Mafra, et al., 2020).

Para la aplicación de fases naturales con fines analíticos, en general se procede a realizar un tratamiento previo a su uso como sorbente. En general, se debe realizar un lavado riguroso para eliminar todos los compuestos solubles en medio acuoso y orgánico para evitar que los extractos finales de las muestras analizadas contengan interferencias, lo que dificultaría el análisis cromatográfico. Por otra parte, varias de estas fases naturales presentan baja porosidad generando ineficiencia al momento de calcular el rendimiento analítico. En este contexto, hay estudios que muestran que la carbonización de estos materiales es una gran alternativa al momento de modificar su estructura, debido a que, aumenta su porosidad y área de contacto, además incrementa la cantidad de grupos funcionales que están unidos al grafito, como carboxílicos, carbonílicos, fenólicos, quinónicos, lactónicos entre otros (Jiang, et al., 2016), lo que aumenta considerablemente la eficiencia de extracción.

2.3.1 Biochar y carbón activado

Las características tanto físicas como químicas de los carbones van a variar dependiendo del material de origen, y de las condiciones en que se realiza la pirólisis: presión, temperatura, velocidad de calentamiento, tiempo de residencia, tipo de atmósfera (inerte o reactiva), entre otros (Tan, et al., 2017). El tamaño de poro del material obtenido puede evaluarse por microscopía electrónica de barrido SEM, clasificándose en microporos, mesoporos y macroporos. Cada tamaño de poro contribuye a propiedades como el área superficial y la capacidad del carbón como material adsorbente (Brewer & Brown, 2012).

Respecto a las propiedades químicas, la superficie de las biomásas de origen lignocelulósico posee principalmente grupos hidroxilo, carboxilo y carbonos alifáticos. A medida que la biomasa pasa por procesos termoquímicos como pirólisis lenta o flash pirólisis, se carboniza perdiendo oxígeno e hidrógeno, lo que genera estructuras aromáticas que aumentan su cantidad a medida que aumenta la temperatura de pirólisis (Brewer & Brown, 2012). Luego, producto de la volatilización de grupos con oxígeno e hidrógeno, prácticamente quedan sólo estructuras aromáticas. Si este material se expone al aire, el carbón se oxida creando grupos aromáticos con oxígeno como hidroxilo, carboxilo y ácidos carboxílicos, cuya carga varía dependiendo del pH del medio en que se trabaje. A altos pH, los grupos se encuentran desprotonados, presentando cargas negativas. En cambio, a bajos valores de pH, los grupos se encuentran protonados. Esto genera, por ejemplo, diferencias en la afinidad por cationes en el medio en que se encuentra el carbón. Además, las secciones hidrofílicas e

hidrofóbicas del carbón pueden servir como sitios de adsorción para moléculas polares y apolares en el medio. Estos cambios en la superficie pueden monitorearse utilizando espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), con diferencias evidentes entre la biomasa inicial (rica en grupos hidroxilo, carbonilos y grupos alifáticos) y el producto de las carbonizaciones, donde disminuyen los hidroxilos, los carboxilatos y los grupos C-H alifáticos disminuyen y pasan a ser C-H aromáticos (Brewer & Brown, 2012).

El biochar o bio-carbón es el producto del proceso de pirólisis de materia orgánica en atmósfera reductora, su fuente es comúnmente de desechos de agricultura, residuos forestales, entre otros; por ello, se considera un material producido de manera sustentable (Yaashikaa, et al., 2020).

Por su parte, el carbón activado también es un material derivado de la biomasa. Este también es oscuro, poroso, presenta gran área superficial, alto grado de reactividad superficial y amplia distribución de tamaños de poro. La síntesis de este carbón activado se logra por medio de dos pasos fundamentales: la carbonización y la activación. La carbonización consiste en reducir el contenido de compuestos volátiles vía pirólisis a temperaturas entre 300 y 900°C, donde el producto es un carbón con una leve porosidad. Mientras que la activación consiste en desarrollar el área superficial específica o el volumen de poros abriendo nuevos poros o desarrollando los ya existentes, además de entregar la posibilidad de modificar la naturaleza química de la superficie (Fu, et al., 2019), para ello, existen tres tipos de activación; física, mixta y química. Dentro de los agentes activantes, destacan los alcalinos, ácidos, neutros y auto activantes. Dentro de estos, el agente más utilizado es el álcali KOH, dada la gran área superficial específica que se puede lograr. Esto se da ya que, sobre los 762°C, los compuestos de potasio generan vapor de potasio metálico, el cual se deposita en el carbón y favorece el desarrollo de poros ya que penetra en el carbón, expandiendo el espacio en la capa aromática y la distorsiona (Gao, et al., 2020).

2.3.2 Cáscara de plátano

En relación con lo presentado anteriormente, este proyecto busca entregar antecedentes relevantes en torno a la utilización de la cáscara de plátano como fase adsorbente. El plátano es una fruta tropical procedente del árbol que recibe el mismo nombre o banano, perteneciente a la familia de las musáceas, tiene forma alargada o ligeramente curvada, de 100-200 g de peso, donde la cáscara del plátano se compone del 30-40% del total, por lo tanto, cada 4 toneladas de plátano se producen alrededor de 1 tonelada de cáscara, que generalmente se queman después del secado, causando varios problemas medioambientales (Fabre, et al., 2020). Consecuentemente, su reutilización en procesos de adsorción permite avanzar en una mejor gestión de los desechos, los cuales, además, si no son secados, crean un olor molesto y forman gases de efecto invernadero (Shah, et al, 2005).

Además, al ser un subproducto de la agronomía, es de fácil acceso, fuentes abundantes, de bajo costo y fácil preparación. También, va de la mano con los principios de la química analítica verde por su reutilización y reciclado, lo que da una connotación ecológica al momento de que termine su vida útil como fase sorbente.

3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La cáscara de plátano carbonizada, debido a su composición química, es un prometedor material sorbente para la microextracción (utilizando RDSE) de distintas familias de contaminantes emergentes en muestras acuosas con eficiencia comparable a las observada en fases sintéticas comerciales.

3.2 Objetivo general

Desarrollar una metodología analítica de microextracción, usando RDSE, para distintas familias de contaminantes emergentes en muestras de aguas residuales, basado en el uso de cáscara de plátano carbonizada y sin modificar, usando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

3.3 Objetivos específicos

1. Desarrollar metodología cromatográfica para la determinación de los 5 contaminantes emergentes ya mencionados en muestras acuosas empleando GC-MS.
2. Preparar fases sorbentes naturales a partir de cáscara de plátano, evaluando distintas metodologías, temperaturas y tiempos tanto de secado como de carbonización.
3. Caracterizar las fases por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FT-IR), microscopía electrónica de barrido (SEM), análisis termogravimétrico (TGA) y análisis BET.
4. Desarrollar una metodología para la extracción de los 5 contaminantes emergentes en muestras acuosas utilizando la microextracción por disco rotatorio (RDSE).
5. Validar las metodologías analíticas utilizando fases sorbentes naturales en las técnicas de microextracción a evaluar para la determinación de 5 contaminantes emergentes en muestras acuosas.
6. Comparar estas fases con los parámetros obtenidos para distintas fases sorbentes comerciales.

4. MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS

4.1 Estándares

- Propil parabeno, 17 α -Etinilestradiol, Triclosan, Bisfenol A, PCB 77, Triclosan-2,3,5-D3 (Dr. Ehrenstorfer GmbH).
- Ibuprofeno (Sigma-Aldrich).

4.2 Reactivos

- N-Metil-N-trimetil-trifluoroacetamida (MSTFA), bicarbonato de sodio, piridina, cloruro de sodio, fosfato ácido de sodio, fosfato di ácido de potasio, agua MilliQ, ácido acético (Merck).

4.3 Solventes y gases

- Metanol, acetonitrilo, acetato de etilo (Merck).
- Nitrógeno, N₂ 99,995%. (Linde), Helio, He 99,9999% (Indura).

4.4 Materiales

- Fases sorbentes: Oasis[®] HLB, Sílice enlazada a grupos octadecilo (C18) y estireno-divinilbenceno St-DVB (Merck).
- Discos rotatorios de Teflón con cavidad y soporte con anillo. Filtros de fibra de vidrio. Tubos eppendorf de 1,5 mL.
- Fases sorbentes naturales: Cáscara de plátano obtenida del comercio local.
- Viales de vidrio de extracción de 10, 25, 30 mL
- Viales cromatográficos y de derivatización de 2 mL.

4.5 Equipos principales

- Cromatógrafo de Gases (Trace 1300) con detector selectivo de masas. *Thermo Scientific*. Columna capilar Restek RTX-5MS (30m×0.25mm; 0.25 μ m), 5% phenyl - 95% methylpolysiloxane.



Figura 6: Cromatógrafo de Gases-Espectrómetro de masas ISQ. *Thermo Scientific*.

- Espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Nicolet iS5, *Thermo Scientific*. Acoplado a un accesorio de muestreo inteligente de reflectancia total atenuada iTX-iD7 con cristal de diamante.



Figura 7: Espectrómetro ATR-FT-IR. *Thermo Scientific*.

- Equipos auxiliares: pH-metro, multi agitador magnético de 10 posiciones (hasta 2000 rpm), vórtex, evaporador con corriente de nitrógeno y temperatura controlada, placa calefactora para derivatización, destilador de agua desionizada.

5. METODOLOGÍA

5.1 Identificación de los analitos mediante GC-MS

Para la identificación de los CE por GC-MS se utilizaron multiestándares de 10 mg L^{-1} y de 1 mg L^{-1} de cada analito. Se realizó un ensayo en barrido completo de masas (modalidad *FULL SCAN*) en un rango de 40-500 m/z, se seleccionó un ion cuantificador en orden de abundancia y un ion cualificador para cada analito. El ion cuantificador o target ion, corresponde al ion de mayor abundancia y el ion cualificador o qualifer ion que confirma la presencia del analito. Luego se realizó el monitoreo selectivo de dichos iones (modalidad SIM), se utilizó como parámetro de confirmación de la presencia del analito en la muestra: el tiempo de retención y la razón de áreas de ambos iones (área cuantificador/área cualificador), la cual debe corresponder al mismo valor que se ha determinado en la medición de un estándar (+/- 20%).

5.2 Condiciones cromatográficas

El programa de temperaturas del horno inicia en 75°C por 1 min, luego alcanza los 150°C a una razón de 30°C/min manteniéndose por 5 min, finalmente llega a una temperatura de 300°C a 25°C/min por 2 min, con un solvent delay de 5 min. La temperatura del inyector es de 300°C en modalidad splitless, la línea de transferencia a 300 °C, la fuente de ionización a 250°C, y el flujo del gas portador helio es de 1 mL/min. La duración total del programa cromatográfico es de 28 minutos.

5.3 Derivatización de los analitos

Previo a la inyección de los analitos, se implementa una metodología de derivatización, con el fin de aumentar la estabilidad térmica de los analitos, y así obtener cromatogramas con señales más sensibles. Esta metodología ya se encontraba optimizada para estos analitos, la cual consiste en llevar a sequedad el extracto, usando nitrógeno gaseoso, luego se reconstituye con 70 µL N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) y 50 µL de piridina y se agita en un vortex por 1 min. Posteriormente, esta mezcla se calienta a 80°C por 35 min, luego se agregó 20 µL de PCB-77, el cual es utilizado como estándar interno, para normalizar las áreas de las señales de interés. En la ecuación 1 se muestra el cálculo de las áreas normalizadas.

$$\text{Área normalizada} = \frac{\text{Área analito}}{\text{Área PCB}} \quad (1)$$

5.4 Preparación de fase cruda (CPLS)

Se recolectó la cáscara de plátano del negocio local, se lavó con agua desionizada 3 veces en el sonicador por 30 min y se dejó 24 h en la estufa a 45°C para su secado. Luego, la cáscara es triturada en un molinillo de café y se tamiza en una malla 200 mesh, con el fin de obtener un tamaño de partícula homogéneo, y así, poder aumentar la reproducibilidad de las extracciones. Finalmente, la fase cruda se lavó rigurosamente con metanol y acetato de etilo en ultrasonido, para remover la mayor cantidad de interferentes. Finalmente se seca a 45°C por 24h. Cabe destacar, que los solventes orgánicos son recuperados para futuros lavados.

5.5 Preparación del biochar

Para la obtención del biochar, se utiliza la cáscara de plátano cruda esta es introducida en crisoles de porcelana y se introducen en la mufla, luego se realiza un purgado con nitrógeno por 20 min, con el fin de obtener una atmósfera inerte. Se evaluaron 3 temperaturas de carbonización, 400, 600 y 800 °C, donde todas siguen la misma velocidad de calentamiento (10°C/min). Una vez terminado el proceso, el biochar resultante es lavado con una solución de ácido clorhídrico 1 mol L⁻¹ por 24 horas, con el objetivo de eliminar la ceniza que se encuentra mezclada con el carbón; luego, se lavó con agua desionizada hasta la neutralización del biochar. Finalmente, se filtra, seca a 45°C por 24 h y se tamiza en una malla de 200-400 mesh.

Con el fin de saber cuánto es el porcentaje de material que se volatiliza dentro de la mufla, se pesó el crisol junto con la cáscara de plátano limpia y seca (CPLS) antes y después de ser ingresados a la mufla y usando la ecuación 2 se calcula el rendimiento de carbonización de la fase natural.

$$\%R = \frac{(X_{inicial} - X_{final})}{X_{inicial}} * 100 \quad (2)$$

5.6 Selección de agente activante para obtener carbón activo

Se estudiaron 3 tipos de activación para el carbón, las cuales fueron escogidas mediante bibliografía, para ello, se escogió una temperatura de carbonización fija de 400°C y 3 tipos de activaciones.

(i) Solución de K_2CO_3 al 40% la cual se mezcla con la fase natural en un crisol de porcelana y se deja en la incubadora agitándose por 12h, luego son ingresados a la mufla.

(ii) Activación usando una solución al 40% de $ZnCl_2$ la cual se mezcla en un crisol de porcelana con la CPLS y se deja en agitación por 12h, para luego ser ingresados a la mufla.

(iii) Activación realizada en seco, formando una sal fundida de CLPS con $ZnCl_2$. En un crisol de porcelana se mezcla la CPLS con el activante, en una proporción de 1:4. Esta mezcla se deja calentándose a 200°C por 30 min en una placa calefactora, luego el crisol es ingresado a la mufla para su carbonización.

Posteriormente, los carbones son lavados en agitación con HCl 1M por 24h, con el fin de eliminar las cenizas. Una vez transcurrido este tiempo, estos se llevan a pH neutro con reiterados lavados usando agua desionizada. Finalmente, los carbones se secan a 40°C dentro en la estufa.

5.7 Selección de condiciones de preparación del CA

Con el fin de seleccionar el carbón activado que presente mejores recuperaciones para los siguientes estudios, se realizó un experimento en el cual se abordan distintas temperaturas de carbonización y distintas concentraciones de activantes.

Por el lado de la temperatura, se evaluaron a 400 y 600°C, en atmosfera inerte, las cuales fueron activadas a 3 concentraciones distintas de $ZnCl_2$; a una proporción de 1:2, 1:3 y 1:4 de CPLS en $ZnCl_2$, respectivamente.

5.8 Caracterización de fases naturales

Se realizaron múltiples caracterizaciones de las fases sorbentes, con el fin de estudiar sus propiedades fisicoquímicas como sus grupos funcionales, características térmicas, punto de carga 0, punto isoeléctrico, morfología superficial y porosidad.

Para el análisis de grupos funcionales, se utilizó un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Nicolet iS5, Thermo Scientific, acoplado a un accesorio de muestreo inteligente de reflectancia total atenuada iTX-iD7 con cristal de diamante. Donde se depositan aproximadamente 10 mg de muestra y se activa el haz de luz.

Mientras tanto, la morfología de las fases bio-sorbente se estudió usando un microscopio electrónico de barrido, donde los electrones producidos por un cañón de electrones golpean la muestra que se está irradiando.

A continuación, se realizó un análisis termogravimétrico a la fase cruda utilizando un instrumento TA (TGA: modelo TGA 550). Donde se usaron alrededor de 20 mg de CPLS que se calentó de 25 a 800°C durante 10 min. Los datos del análisis térmico gravimétrico (TGA) y diferencial térmico (DTA) se registraron en función de la temperatura de la muestra, utilizando el software Trios.

También, se realizó un experimento para calcular el punto de carga cero (PZC), el cual se define como el valor del pH en el cual la carga neta total (externa e interna) de las partículas sobre la superficie del material adsorbente es neutra, es decir, el número de sitios positivos y negativos es igual (Franks & Meagher, 2003). Este parámetro es muy valioso para determinar la afinidad particular de un determinado adsorbente por un adsorbato específico. Para este experimento, se tomaron 20 mL de agua desionizada en viales ámbar, ajustando el pH de cada solución entre 2-12 unidades, adicionando cantidades adecuadas de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M. A estas soluciones se añadió 0,2 g de fase biosorbente y trascurridas 48 horas bajo agitación y a temperatura ambiente se procedió a medir el valor de pH final. El punto de carga 0 corresponde al punto donde la curva de pH final en función del pH inicial corta la diagonal.

Finalmente, la caracterización de la morfología y porosidad superficial se realizó mediante la determinación de la isoterma de adsorción-desorción de nitrógeno con medición de adsorción de gas de múltiples puntos de Brunauer, Emmet y Taller (BET) utilizando el Micrometics ASAP 2020 operado a 77K.

5.9 Metodología general de la microextracción por RDSE

5.9.1 Preparación del disco

En la figura 8 se muestran las partes del disco rotatorio, donde a la cavidad del disco se le agregó 40 mg de fase bio-sorbente, luego se recubre con un filtro de fibra de vidrio y se fija con una camisa de teflón.

5.9.2 Acondicionamiento del disco

El disco se acondicionó con aproximadamente 5 mL de acetato de etilo por 5 minutos a 2000 rpm. Luego se descarta el acetato de etilo y se acondiciona con 5 mL de metanol nuevamente por 5 minutos a 2000 rpm. Finalmente, con 5 mL de agua desionizada en las mismas condiciones anteriormente descritas.

5.9.3 Extracción

El disco rotatorio con la fase seleccionada se colocó dentro de un vial ámbar con 20 mL de agua desionizada, posteriormente, se le agrega una alícuota de 40 µL de multiestándar que se encuentra a una concentración de 10 mg L⁻¹ y se agitó a 2000 rpm por 60 min a temperatura ambiente.

5.9.4 Desorción

La desorción se realizó con acetato de etilo por 20 min. Los extractos fueron evaporados a sequedad en ambiente de nitrógeno y se reconstituyeron en 400 μ L de acetato de etilo. Finalmente, el eluato es trasvasiado a viales ámbar de 2 mL para ser derivatizados.

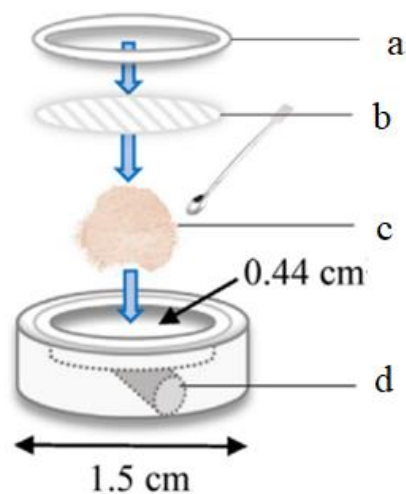


Figura 8: Preparación disco rotatorio. Donde a=camisa de teflón; b= filtro de lana de vidrio; c=fase bio-sorbente; d= barra magnética. P Richter, et al., (2021). *Trends in Analytical Chemistry*, 116209.

Por otro lado, la figura 9 muestra un resumen general del proceso de preparación de muestra, microextracción e inyección en el instrumento cromatográfico.



Figura 9: Resumen de metodología general.

5.10 Optimización de condiciones de extracción usando CPLS, biochar y CA

Se realizó una optimización del método de extracción de los analitos para cada fase bio-sorbente, con el fin de aumentar su eficiencia de extracción, usando el método univariado. Para ello, todos los experimentos siguieron la metodología general de extracción presentada en el punto 7.11. En la tabla 1 se muestra un resumen de las condiciones a optimizar al usar cada fase.

Tabla 1: Condiciones de optimización para cada fase bio-sorbente.

Condición	CPLS	BIO	CA
Tiempo de extracción (min)	15 – 90	15 – 90	15 – 90
Tiempo de elución (min)	5 - 60	-	-
Cantidad de fase (mg)	10 - 50	10 - 40	10 - 40
Solvente de elución	AcOEt/MeOH/ACN	AcOEt/MeOH/ACN/AcOEt:MeOH	-
Fuerza iónica (g)	0 - 6	0 - 6	0 - 6
pH	2 - 9	2 - 9	2 - 9

5.10.1 Tiempo de extracción

Para las 3 fases bio-sorbentes se estudiaron tiempos de extracción entre 15 a 90 min.

5.10.2 Tiempo de elución

El tiempo de elución solo se estudió para la fase cruda (sin tratar), al observar que al aumentar el tiempo de elución no aumentaba la respuesta cromatográfica, se seleccionó un tiempo de 20 min para las fases carbonizadas.

5.10.3 Cantidad de fase

Para el caso de la CPLS se estudiaron cantidades de fase que fluctúan entre 10 y 50 mg, mientras que para las dos fases carbonizadas se estudiaron en un rango entre 10 y 40 mg.

5.10.4 Solvente de elución

El estudio del solvente de elución se realizó solo para la CPLS y el BIO, ya que, luego de analizar los resultados de las otras dos fases, se seleccionó la relación 1:1 de MeOH/AcOEt para la validación usando CA.

5.10.5 Fuerza iónica

Para el estudio de cómo afecta la fuerza iónica en la extracción de los analitos, se estudiaron cantidades de NaCl en un rango de 0 a 6 g para las 3 fases bio-sorbentes.

5.10.6 pH de extracción

El pH de extracción se estudió entre 2 a 9 unidades de pH para las 3 fases bio-sorbentes.

5.11 Validación del método analítico usando CPLS, biochar y CA

Una vez obtenidas las condiciones óptimas del método analítico para cada fase bio-sorbente, se procedió a su validación, para ello se realizan los experimentos usando agua del río Maipo obtenida en el puente Esperanza como matriz. Con el fin de garantizar la correcta cuantificación de los contaminantes emergentes en estudio, se evaluaron los parámetros de calidad de la metodología analítica propuesta: sensibilidad (curva de calibrado), linealidad (R^2), precisión (%RSD) límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ), recuperación (%Re) y efecto matriz (%EM). Los análisis por GC-MS se realizaron en modo SIM para mejorar la sensibilidad y selectividad de la determinación.

5.11.1 Curva de calibración

La curva de calibración se realizó en matriz y fue obtenida a partir del área cromatográfica en muestras de aguas dopadas entre 5 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de multiestándar. Se grafica la concentración de cada analito en función del área, para luego mediante regresión lineal, obtener la ecuación de la recta.

5.11.2 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se determinaron usando agua de la llave como muestra acuosa, primero se realiza la extracción a 6 muestras distintas (sin dopar), con las condiciones optimizadas y una vez se obtienen los resultados cromatográficos, se integran las áreas del pico que se encuentran en el tiempo de retención donde debería estar el analito. Con estos datos, se calcula el promedio y desviación estándar. Luego, estos se utilizan para calcular los límites según las ecuaciones 3 y 4. Posteriormente, estos valores son extrapolados en la curva de calibrado para obtener los valores de LOD Y LOQ.

$$Y_{LD} = \text{Prom} + 3 \cdot DS \quad (3)$$

$$Y_{LC} = \text{Prom} + 10 \cdot DS \quad (4)$$

Donde, el Y_{LD} y Y_{LC} son las señales en los límites de detección y cuantificación respectivamente, el Prom es el promedio de las áreas del pico donde debería estar el analito y DS son sus desviaciones estándar.

5.11.3 Precisión

Para evaluar la precisión a nivel de repetibilidad, se utilizó como muestra acuosa agua del río Maipo a la altura del puente esperanza, la cual fue enriquecida a una concentración final de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cada analito, aplicando el método propuesto a 6 viales distintos ($n=6$), utilizando diferentes discos rotatorios en las mismas condiciones y usando la misma fase bio-sorbente. La precisión es expresada como la desviación estándar relativa (%RSD) de las mediciones, la cual se calculó según la ecuación 5.

$$\%RSD = \frac{DS}{\text{Prom}} * 100 \quad (5)$$

Donde, DS es la desviación estándar y Prom es el promedio.

5.11.4 Exactitud

La exactitud del método fue determinada a partir de la recuperación absoluta y relativa, para la recuperación absoluta se aplicó el método de extracción a 6 muestras acuosas enriquecidas a una concentración final de 20 µg L⁻¹ de cada analito, las cuales fueron comparadas con un estándar, con el fin de calcular el porcentaje de recuperación. Para el cálculo de recuperación relativa, se realizó el mismo procedimiento, pero agregando 20 µg L⁻¹ de estándar surrogate (analito deuterado).

5.11.5 Efecto matriz

El efecto matriz (%EM) puede aumentar o disminuir la respuesta cromatográfica debido a la presencia de otros componentes en la muestra. Por lo tanto, se realizó una extracción por triplicado, donde después de la evaporación del reconstituyente se agregó una concentración de 20 µg L⁻¹ a los viales de derivatización y estos se comparan con otra extracción solo de la matriz, con el fin de poder calcular el porcentaje que podría afectar la matriz a la extracción. Para ello, se utilizó la ecuación 6 para calcular este porcentaje.

$$\%EM = \frac{\text{Dopado-Blanco}}{\text{Estandar}} \quad (6)$$

Donde dopado es el promedio de las 3 señales provenientes del vial dopado después de la evaporación del reconstituyente, blanco es el promedio de 3 señales provenientes de la extracción de la muestra acuosa sin dopar y estandar es el promedio de las señales que provee el estandar inyectado directo al GC-MS.

5.12 Comparación fase natural vs fases sintéticas

Con el fin de evaluar la eficacia de extracción del proceso de extracción de analitos usando cada fase bio-sorbente, se comparó la adsorción de los analitos en las fases sorbentes naturales y sintéticas comerciales. Para el caso de la CPLS, se comparó con 2 fases: Oasis-HLB y C18.

Para el BIO y CA se compararon con 3 fases sintéticas: Oasis-HLB, C18 y el estireno divinilbenceno (S-DVB).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Desarrollo de una metodología cromatográfica

En la Figura 10 se observa el cromatograma (GC-MS) del multiestándar preparado a una concentración de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ en modalidad SIM, obtenido en las condiciones descritas en la metodología. En esta modalidad de inyección se pueden verificar los iones masa/carga (m/z) del ion cuantificador y de identificación pertenecientes a cada analito, estos iones nos permiten asegurar que la señal que se integra posteriormente en las muestras corresponde inequívocamente a la del analito. En la tabla 2 se presentan los tiempos de retención de cada analito, junto a los iones cuanti y cualificadores que se seleccionaron.

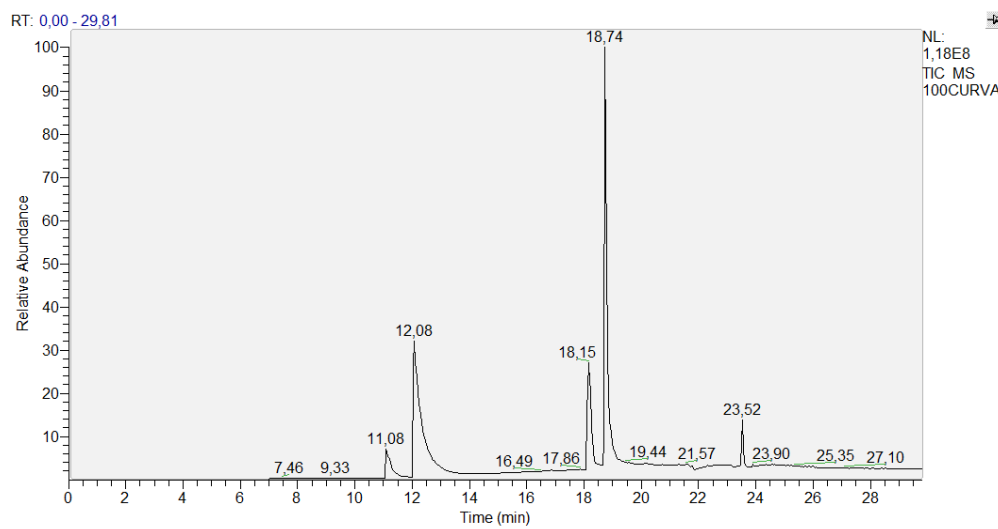


Figura 10: Cromatograma del multiestándar que contiene a los analitos.

Tabla 2: iones cuanti y cualificadores de cada analito junto a sus tiempos de retención.

Analito	ión cuantificador	ión cualificador	t_r . (min)
IBU	234	278	11,08
PP	210	195	12,08
TCS	345	347	18,15
BPA	357	358	18,74
PCB77	292	290	21,57
EE2	425	440	23,52

Una vez se determinaron los tiempos de retención (t_r), se procedió a estudiar las capacidades de sorción de la fase cruda, con el fin de observar las señales pertenecientes a la cáscara de plátano. Para ello, a modo de ejemplo, se realizó una extracción de los analitos en una muestra acuosa dopada a una concentración de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, usando la CPLS. En la figura 11a se muestra el cromatograma resultante.

Se puede observar que el número de señales cambia con relación al cromatograma del multiestándar, esto debido a la gran cantidad de otros compuestos que son eluidos de la fase bio-sorbente, esto puede presentar problemas a la hora de integrar las señales, debido a la superposición de señales. Sin embargo, el detector de masas permite seleccionar los iones de interés para identificar y cuantificar los analitos. En la figura 11b y 11c se muestra un ejemplo usando los iones del BPA para extraer los datos de importancia.

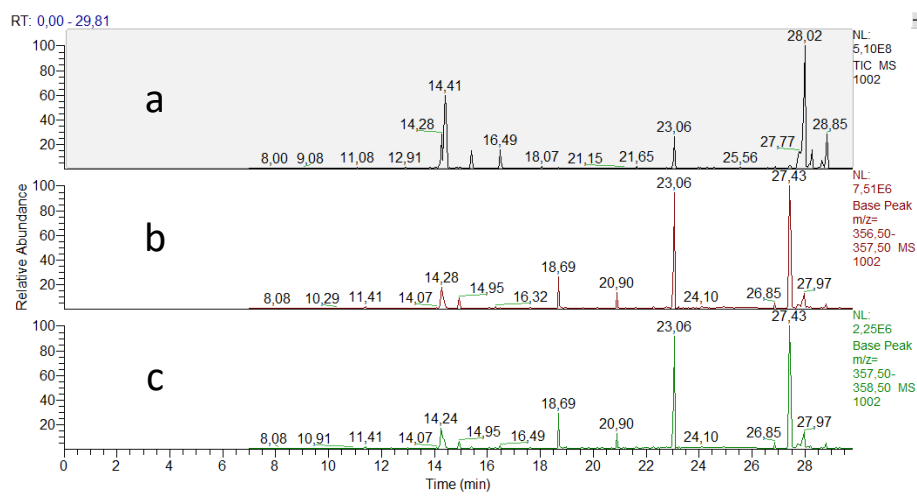


Figura 11: Cromatograma del eluato posterior a una extracción de los analitos en una muestra acuosa dopada a una concentración de $20 \mu\text{g L}^{-1}$, usando la CPLS. (a) TIC (b) $m/z = 357$ (c) $m/z = 358$.

Luego de seleccionar los iones, se escoge la señal característica del BPA, según su tiempo de retención, que en este caso sería la señal ubicada a los 18,69 min. Posteriormente, se procede a integrar esta señal para calcular el área del pico cromatográfico y, luego, normalizarla usando el área del estándar interno.

Por otro lado, en el cromatograma de la figura 11 se puede observar que el PP y IBU no están presentes, posiblemente debido a un deficiente reparto entre la fase sorbente y acuosa, siendo favorecida esta última, consecuentemente, su retención es menor. Esto nos da cuenta que la CPLS solo puede retener analitos más hidrofóbicos, que en este caso son el EE2, BPA y TCS. En la tabla 3 se muestran los analitos junto a sus log Kow y pKa, donde se observa que el más hidrofílico es el PP, por ende no se retiene en la fase bio-sorbente; en el caso de IBU, este es más hidrofóbico que el BPA, sin embargo, tiene la capacidad de ionizarse a pH 6 (al que se encuentra la muestra) y, por lo tanto, es más afín con la fase acuosa.

Tabla 3: Propiedades fisicoquímicas de los analitos.

Analito	Log Kow	pKa
BPA	3,32	9,6
TCS	4,76	7,6
EE2	4,01	10,22
PP	3,04	8,4
IBU	3,97	4,91

6.2 Resultados usando la cáscara de plátano limpia y seca

6.2.1 Caracterización de la CPLS

Se discutirán los resultados de la caracterización de la CPLS, con el fin de entender su naturaleza tanto física como química, la primera caracterización que se realizó fue una espectrometría FT-IR, la cual se observa en la figura 12.

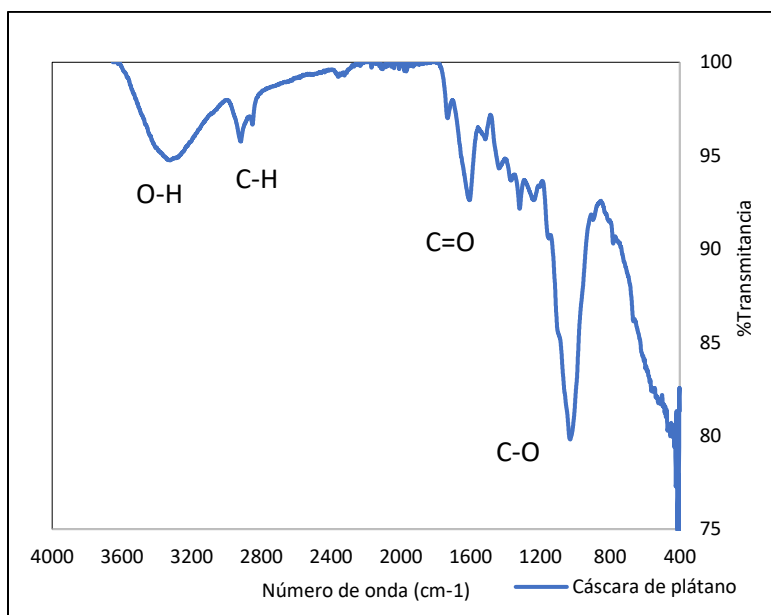


Figura 12: Espectro FT-IR de la CPLS

En la figura 12 se observan varias bandas, lo que deja en evidencia la presencia de varios grupos funcionales en la fase, la banda en los 1000 cm^{-1} corresponde a la absorción del *stretching* del C-O, en 1500 cm^{-1} se observa una banda correspondiente al *stretching* del enlace doble C=C, la siguiente banda que se puede reconocer es la de 1600 cm^{-1} , lo que deja en evidencia la presencia de grupos carbonílicos C=O, además se ven señales entre $[2800-2900\text{ cm}^{-1}]$ las que corresponden a señales C-H alifático. Por último, se puede apreciar la banda ancha que se forma después de los 3000 cm^{-1} característica de alcoholes.

Se puede concluir que la CPLS presenta variedad de grupos funcionales, los cuales se vinculan a los biopolímeros presentes en la fase cruda, que son los encargados de interactuar con los contaminantes en su estructura debido a las fuerzas intermoleculares del tipo π - π y puentes de hidrógeno (Mafra, et al., 2019).

Cabe destacar, que se realizó un lavado riguroso del biosorbente con solventes orgánicos (los cuales son recuperados) para evitar que interferentes puedan ser inyectados en el GC-MS, sin embargo, este proceso no se puede repetir muchas veces, ya que, se eluyen con el lavado, los compuestos responsables de la retención de los analitos, disminuyendo la eficacia de retención.

En la figura 13 se observa un IR el cual muestra la comparación de dos fases crudas, la primera fase lavada rigurosamente, mientras que la segunda es la fase cruda sin lavar. Se puede apreciar que las señales son menos intensas para la cáscara limpia y seca, lo que deja en evidencia que hay una mayor concentración de compuestos que presentan grupos funcionales en el bioadsorbente. Por lo tanto, se optimizó el lavado de la fase natural sin modificar, con el fin de obtener una fase sorbente que no libere pigmentos al momento de realizar la elución del método, pero que presente una cantidad significativa de grupos funcionales.

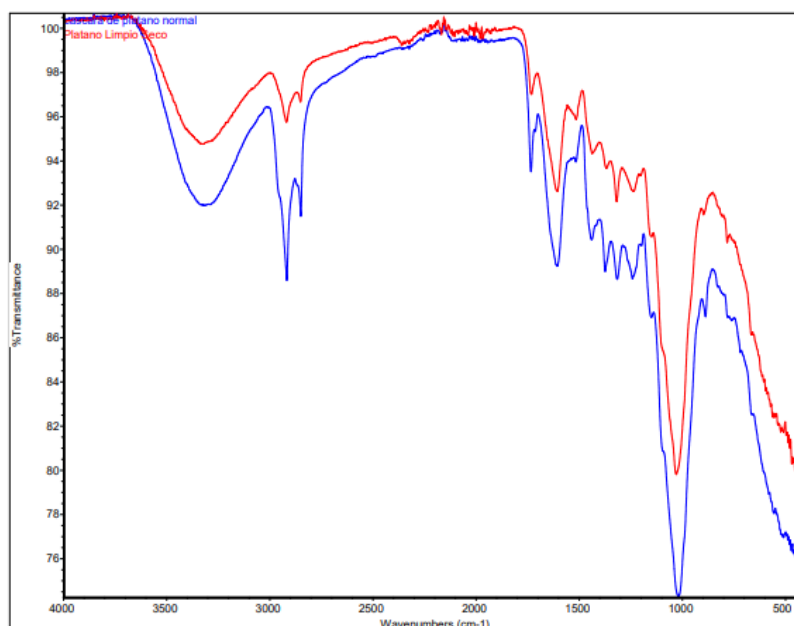


Figura 13: Comparación CPLS (espectro rojo) con cáscara de plátano normal (espectro azul).

Luego, con el fin de orientarnos en la composición de los constituyentes químicos de la CPLS, se realizó un análisis termogravimétrico, el cual nos entrega información sobre la pérdida de masa de la fase mientras aumenta la temperatura. En la figura 14 se muestra el TGA de la CPLS, mientras que en la figura 15 se muestra el DTG que es la derivada del termógrama.

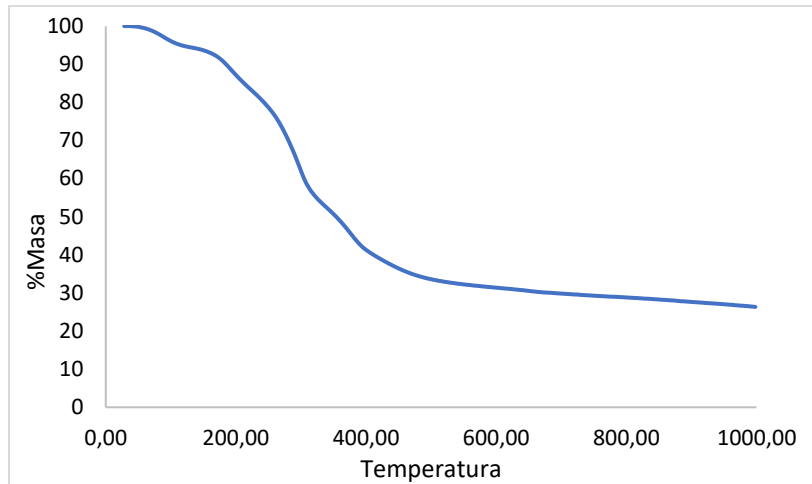


Figura 14: TGA de la cáscara de plátano limpia y seca.

El TGA nos informa sobre las pérdidas de masa en relación con la derivada del termograma (DTG), según el DTG hay pérdidas de masa en 4 rangos distintos de temperatura y junto con la información del TGA podemos calcular la pérdida de masa entre cada rango. En el primer rango que va desde 0 a 130°C hay una pérdida de masa del 5,6%, en el segundo rango que va desde 130 a 225°C hay una pérdida de masa de 13,1%, en el tercer rango que va desde 225 a 340°C hay una pérdida de más del 29,5%, finalmente en el rango que fluctúa entre 340 a 418°C hay una pérdida de masa del 12,9%.

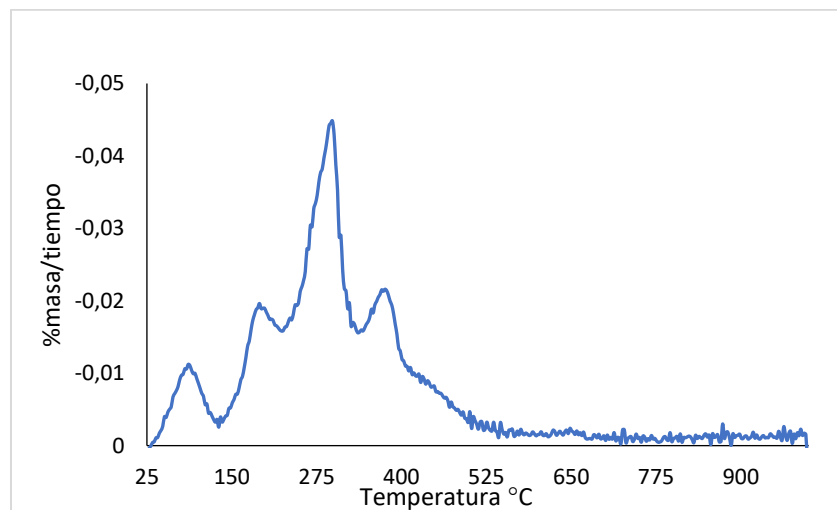


Figura 15: DTG de la CPLS.

Luego de estimar las pérdidas de masa entre cada rango, utilizando el DTG se puede estimar qué biopolímero corresponde cada pico, el primero que se encuentra a los 100°C pertenece a la pérdida de humedad (Saffe. Et al., 2000), el segundo pico, que se encuentra entre 150 y 275°C, se le atribuye a la despolimerización de la celulosa (Trilokesh & Uppuluri, 2001), así mismo la desaparición del

enlace glucosídico de la cáscara de plátano es el resultado de la despolimerización de la hemicelulosa dentro de la región que va entre 176,9 a 327,59°C (tercer pico) (Sundarraaj & Ranganathan, 2008). Finalmente, el cuarto pico corresponde a la ruptura de los enlaces de la protolignina (fibras de la lignina) (Guimaraes, et al., 2009).

Por otro lado, la capacidad de adsorción de la fase bio-sorbente está determinada por su composición química particular y por la distribución de cargas sobre su superficie (Menéndez et al., 1995; Appel et al., 2003). Así, la determinación del punto de carga cero del adsorbente de interés permite establecer dicha distribución de cargas global sobre su superficie y con ello su capacidad particular para retener contaminantes iónicos. Así mismo, el punto de carga cero señala el intervalo más adecuado del valor de pH para alcanzar la remoción eficiente de un determinado contaminante de naturaleza aniónica o catiónica. En la figura 16 se observa los resultados para el punto de carga cero (PZC).

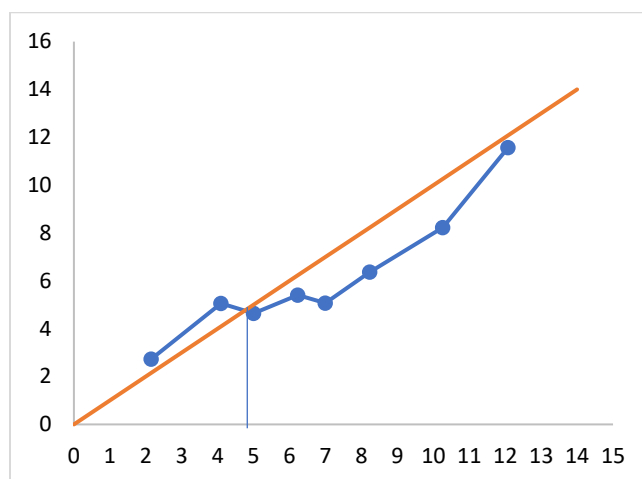


Figura 16: Punto de carga cero de la CPLS.

El PZC fue determinado por el método de la derivada del pH, evaluando un intervalo de pH entre 2.0 y 11. Donde el valor de PZC encontrado es de 4,8. Por lo tanto, a este valor de pH el material debería encontrarse en su forma neutra, favoreciendo la adsorción de los analitos mediante puentes de hidrógeno e interacciones pi-pi (Mafra, et al., 2019).

Por otro lado, se realizó una microscopia electrónica de barrido a la CPLS, con el objetivo de observar su estructura morfológica de la superficie, lugar donde debería ocurrir la mayor adsorción de los analitos. En la figura 17 y 18 se presentan las imágenes obtenidas.

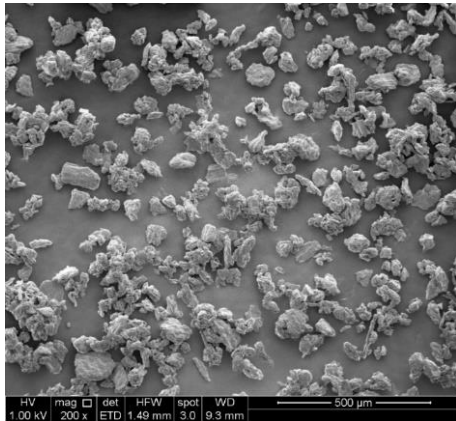


Figura 17: SEM de la CPLS a 500µm.

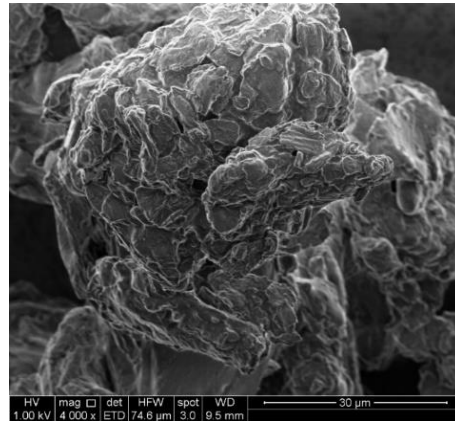


Figura 18: SEM de la CPLS a 30µm.

En la figura 17, se pudo observar que las partículas de la CPLS son de forma esférica desigual, también se puede apreciar que el tamaño de partícula de la CPLS es uniforme, lo que se debe a un proceso efectivo del tamizado, lo cual afecta directamente con la reproducibilidad de las extracciones.

En la figura 18, corresponde a una ampliación de la figura 17 hacia una partícula de la CPLS, donde podemos apreciar que una estructura irregular, con presencia de poros y rugosa; esta morfología ayudaría a retener a los analitos en su estructura. Por ende, la fase cruda es una buena candidata como fase adsorbente.

6.2.2 Optimización del método analítico usando la CPLS

Una vez que se optimizaron las condiciones cromatográficas y caracterizada la CPLS, se procedió a optimizar el proceso de extracción de los analitos de manera univariada, con el fin de validar el procedimiento analítico. Donde el área normalizada se calculó usando la ecuación 1.

6.2.2.1 Optimización del tiempo de extracción

Para el estudio del perfil de extracción se estudiaron los siguientes tiempos de extracción: 5, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. En la figura 19, se presentan los resultados para los analitos retenidos.

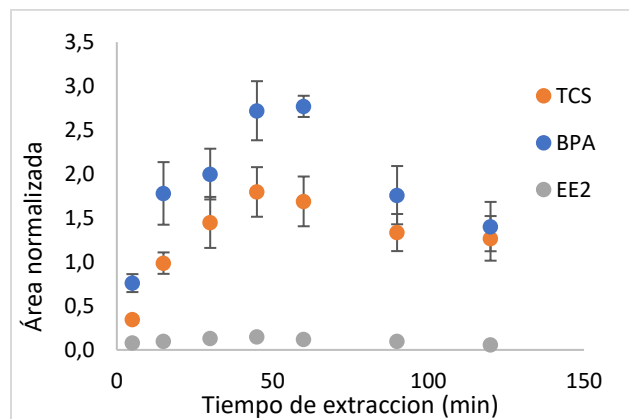


Figura 19: Perfil de extracción usando CPLS.

Se puede verificar que la CPLS solo puede retener 3 analitos, los cuales presentan una tendencia similar de extracción. Donde se llega a un valor máximo de recuperación a los 45 min, luego de la hora los valores empieza a disminuir la señal, ya que, comienza un proceso de desorción de los analitos desde la fase sorbente. Por lo tanto, para los próximos experimentos se seleccionó el tiempo de extracción de 45 min.

6.2.2.2 Perfil de elución

En la figura 20, se pueden observar los resultados usando tiempos de 15, 30, 45 y 60 min, los valores se expresan como área normalizada en función del tiempo de elución, donde se aprecia que a los 15 min se alcanza la elución de los analitos, luego se mantienen constante las señales.

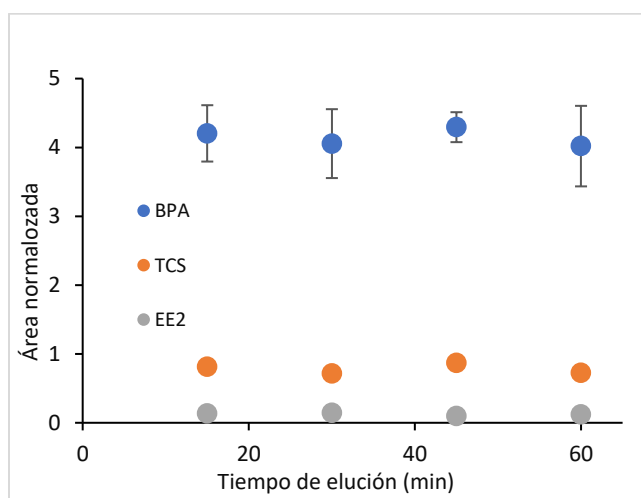


Figura 20: Perfil de elución usando CPLS.

6.2.2.3 pH de extracción

El pH es una de las variables más importantes al momento de realizar la extracción de diversos analitos que presenten características ácido-base, ya que, trabajando a pH alto, los grupos funcionales de los analitos se encuentran desprotonados, presentando en su mayoría cargas negativas (o neutra si se desprotona una amina), las cuales van a afectar la extracción, dependiendo de la fase de extracción y los analitos. A bajos valores de pH, los grupos funcionales se encuentran protonados, los cuales podrían estar en su forma neutra, o catiónica (protonación de aminas) lo que también afectaría el rendimiento de extracción. Por lo tanto, según el medio en que se realice la extracción podría facilitar o dificultar la extracción de los analitos. En relación a nuestro objetivo de extracción, se prefiere que la fase y los analitos se encuentren en su forma neutra, para que puedan retenerse vía puentes de hidrogeno. Para ello, se estudiaron 4 valores de pH distintos.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21, se puede apreciar que la mayor respuesta cromatografica para el BPA es a pH 8, sin embargo, para el TCS y EE2 la mayor respuesta es a pH 4 y, además, estas presentan menor desviación estándar y, por lo tanto, menor error. Por ende, se selecciona el valor de pH 4 para validar el método analítico.

Este resultado tiene coherencia, debido a que, los analitos son adsorbidos por puentes de hidrógeno, entonces, al trabajar en un pH donde la mayoría de los analitos se encuentren es su forma neutra, aseguramos que estos sean retenidos en la estructura de la fase. En la tabla 3 se observan los pKa y log Kow de los 3 analitos, como el pH es menor en dos unidades a sus pKa, se espera que estos se encuentren protonados, y consecuentemente, haya factibilidad de formar puentes de hidrógeno entre los analitos y la fase bio-sorbente.

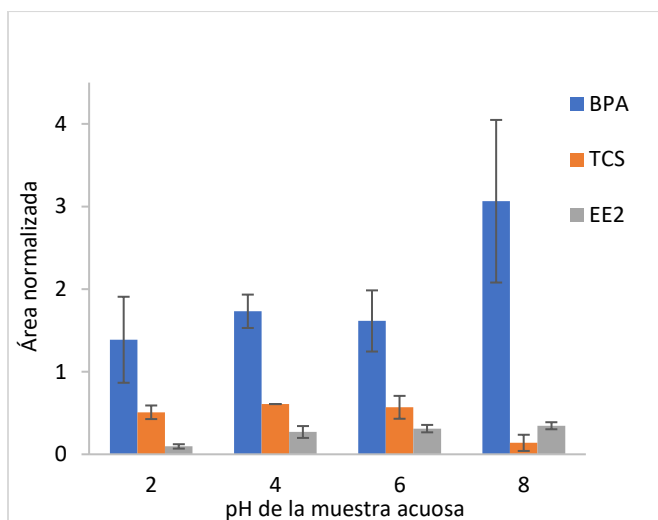


Figura 21: Efecto del pH en la extracción usando CPLS.

6.2.2.4 Salting-out

La presencia de sal en la muestra acuosa facilita la extracción de los analitos, debido al efecto del *salting-out*. El resultado es la extracción del soluto menos soluble, que en nuestro caso son los analitos. Consecuentemente, los analitos van a ser retenidos con mayor facilidad por la fase biosorbente. Para este experimento, se evaluaron 4 concentraciones de sal distintas, sin sal, con 2, 4 y 6 g; estas fueron añadidas a la muestra acuosa, para el proceso de extracción, antes de agregar los discos. En la figura 22 se presentan los resultados, donde se puede apreciar que a una cantidad de 6 g de NaCl se presenta una mayor área normalizada, pero a la vez la respuesta es menos reproducible.

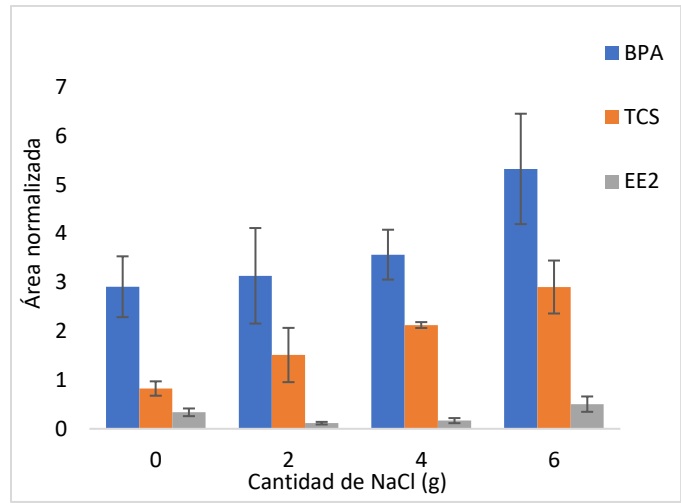


Figura 22: Efecto de la cantidad de NaCl en la extracción usando CPLS.

6.2.2.5 Solvente de elución

Se puede observar en la figura 23 la comparación de 3 solventes de elución para aumentar la eficiencia de elución de los analitos. El acetato de etilo presenta áreas normalizadas mayores que el metanol para el caso del BPA y TCS. Además, usando el acetato de etilo el eluato sale sin pigmentación, en cambio, usando metanol sale con pigmentación, lo que podría dañar el equipo cromatográfico, ya que, estos pigmentos podrían entrar a la columna. Consecuentemente, para experimentos posteriores se seleccionó al acetato de etilo como solvente de elución.

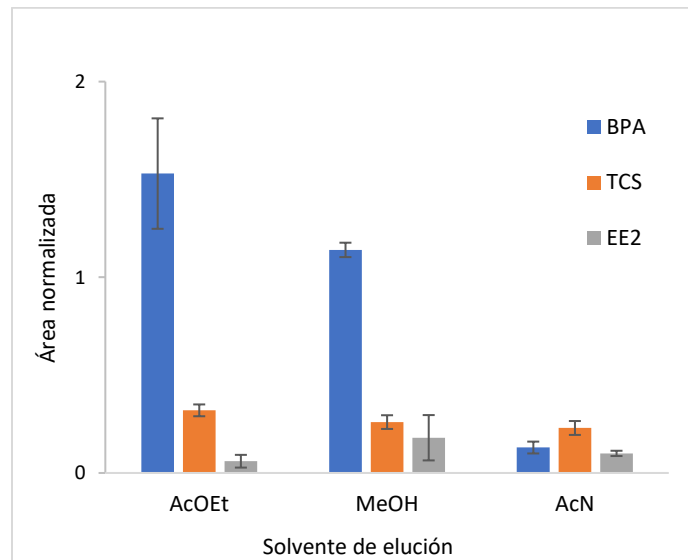


Figura 23: Efecto del solvente de elución usando CPLS.

6.2.2.6 Cantidad de fase

Es de esperar que a una mayor cantidad de fase habrá mayor retención de analitos, esto debido a que hay mas partículas que generen mas contacto entre la fase y el analito. Sin embargo, la evaluación de esta variable es importante para verificar si un contenido muy alto de fase puede compactarla demasiado y hacerla perder eficiencia. De acuerdo a lo observado en la figura 24, se elige la cantidad de 50 mg para los siguientes experimentos.

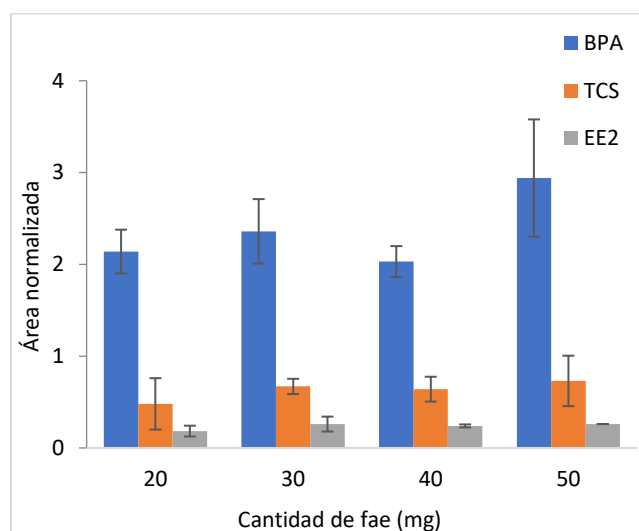


Figura 24: Efecto de la cantidad de fase en la extracción usando CPLS.

Una vez realizado este estudio de las variables se procede a la validación de este, se usó agua del río Maipo a la altura del puente esperanza para realizar la curva de calibración y los experimentos de repetibilidad, exactitud y efecto matriz.

6.2.3 Validación del método analítico

En la tabla 4 se presentan la ecuación de la recta para cada analito, el coeficiente de correlación, la precisión (%RSD) y los límites de detección y cuantificación.

Tabla 4: Cifras de mérito del método analítico usando CPLS.

Analitos	Ecuación de la recta	R ²	LOD	LOQ	Precisión
			(µg L ⁻¹)	(µg L ⁻¹)	(RSD, %)
EE2	y = 0,0024x + 0,0091	0,8618	0,15	0,32	35
BPA	y = 0,0405x + 0,2811	0,9269	0,14	0,42	22
TCS	y = 0,0222x - 0,0507	0,9245	0,49	1,21	19

Observando la tabla 4 se concluye que el método es adecuado para la extracción de los 3 contaminantes más hidrofóbicos, se obtuvieron valores de coeficiente de correlación entre 0,86 y 0,92. Estos valores son aceptables considerando que se realiza la extracción con la fase sin tratar y, además, se trabaja a concentraciones bajas, en el orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$, lo que genera mayor dispersión de los valores de la curva de calibración.

Por otro lado, los valores del límite de detección fluctúan entre los 0,14 y 0,49 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que los valores del límite de cuantificación están entre 0,32 y 1,21 $\mu\text{g L}^{-1}$. Sin embargo, los valores de precisión son elevados, como consecuencia del origen vegetal (sin tratar) del material.

Además, en la tabla 5 se muestran los resultados de los experimentos de efecto matriz, recuperación absoluta y relativa. Se puede observar que los valores de recuperación son bajos (< 23%). Por lo tanto, se realizó una corrección usando estándares deuterados, con el fin de calcular la recuperación relativa, obteniéndose valores entre 73 y 96%. Cabe destacar, que RDSE es una técnica basada en el equilibrio de partición (no exhaustiva), por lo tanto, luego de alcanzar el equilibrio de extracción, una parte de los analitos generalmente permanecen en la muestra acuosa. Teniendo esto en cuenta, junto con que se usa una fase bio-sorbente sin tratar, se justifican las recuperaciones absolutas menores al 50%.

Para compensar los efectos de la matriz, la curva de calibración se obtuvo utilizando muestras de agua de río enriquecidas en 5 niveles de concentración. Los valores de efecto matriz (%EM) oscilaron entre 85-112%, donde %EM cercanos al 100% indican un bajo efecto matriz, mientras que cercanos a 0% reflejan un elevado efecto matriz. Como se obtuvieron valores mayores al 85% el efecto de la matriz es bajo (por supresión), en el caso del TCS que el valor supera el 100%, se espera un efecto aditivo de la matriz.

Tabla 5: Valores en porcentajes de efecto matriz, recuperación absoluta y relativa.

Analito	% Recuperación		% Efecto matriz
	Absoluta	Relativa	
TCS	15	88	108
BPA	23	96	93
EE2	10	73	85

6.3 Resultados y discusión usando biochar

6.3.1 Caracterización del biochar

Primero, se calculó el rendimiento de carbonización, el rendimiento suele definirse como el peso final de carbón producido después de carbonizarlo, lavarlo y secarlo; luego se divide por el peso inicial de materia prima (Hussaro, 2014). En este experimento se masó una cantidad inicial de 12,04g y se obtuvieron 3,62g de biochar listo para utilizarse. Por lo tanto, se calculó un rendimiento de carbonización de 30%.

Luego, se realizaron los espectros FT-IR a los biochar preparados a distintas temperaturas, la primera, al biochar preparado a 400°C y la segunda al preparado a 600°C, estos espectros fueron comparados con el fin de orientar la selección del mejor biochar a utilizar. El resultado se muestra en la figura 25.

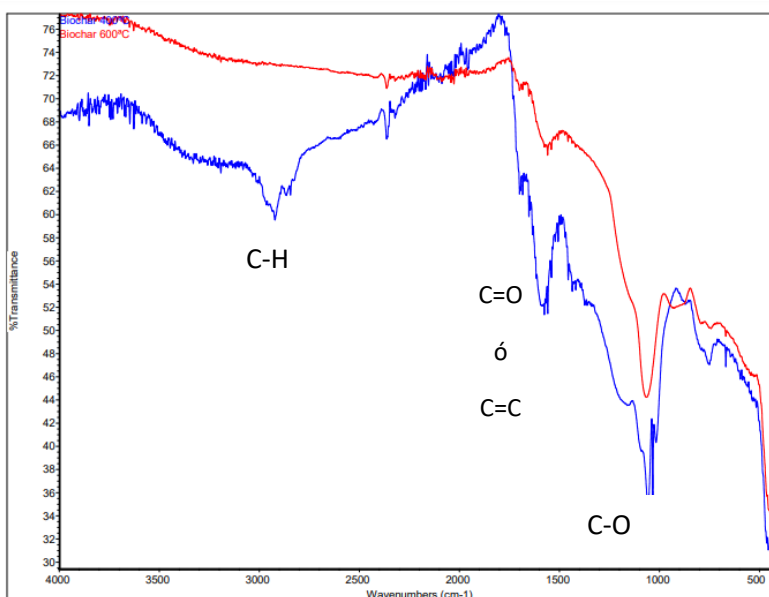


Figura 25: Espectros FT-IR de los biochar (rojo) BIO preparado a 600°C (azul) BIO preparado a 400°C.

Se identificó cada señal al respectivo grupo funcional, observando el espectro queda en evidencia la presencia del *bending* C-O en la señal de 1000 cm⁻¹, la señal que se encuentra en 1600 cm⁻¹ puede pertenecer a una tensión del enlace C=O o al *stretching* del enlace C=C aromático. Además, la señal que se encuentra en 3000 cm⁻¹ pertenece al *stretching* del enlace C-H alifático. Por lo tanto, al no observarse la presencia del *stretching* del enlace O-H, se puede concluir que el biochar presenta más estructuras aromáticas y grupos funcionales oxidados en relación a la CPLS, según (Brewer & Brown, 2012) esto se debe que mientras la biomasa pasa por procesos termoquímicos, se pierde oxígeno e hidrógeno, lo que genera estructuras aromáticas que aumentan su cantidad a medida que aumenta la temperatura de pirólisis.

Otra información que nos presenta el espectros recae en la intensidad de las bandas, él biochar obtenido a los 400°C presenta señales más intensas que el preparado a 600°C, esto demuestra que presenta mayor concentración de grupos funcionales, que son los responsables de la adsorción de

analitos. Para corroborar esta información, se realizó una extracción de los analitos en una muestra acuosa dopada a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ usando las dos fases carbonizadas, en la figura 26 se exponen los resultados.

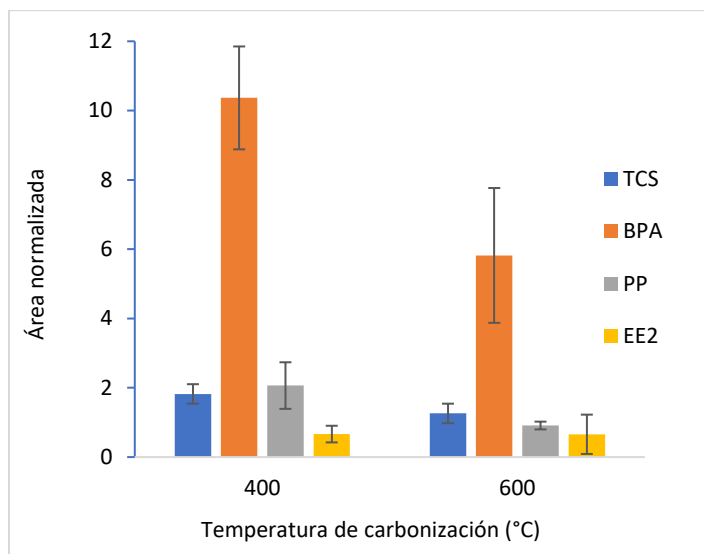


Figura 26: Comparación biochar de 400 vs 600°C.

Con estos resultados, sumando la información obtenida en la figura 25, podemos concluir que el biochar carbonizado a 400°C es más eficaz para la microextracción de los analitos que aquel carbonizado a 600°C. Además, los coeficientes de variación que se muestran en la tabla 6, son más bajos para el biochar de 400°C, lo que da a entender que sus valores fueron más homogéneos. Por lo tanto, se utilizó el biochar carbonizado a 400°C para los estudios de caracterización y validación del método.

Tabla 6: Coeficientes de variación (CV) para cada analito a 400 y 600°C.

T° Biochar (°C)	CV (%) BPA	CV (%) TCS	CV (%) PP	CV (%) EE2
400	11,02	13,64	6,5	2,9
600	33,94	17,00	15,54	36,26

Cabe destacar, que el carbón resultante a 800°C no se utilizó para este experimento, ya que el producto es en su mayoría era ceniza. Por otro lado, la señal del ibuprofeno no alcanzó a ser integrada de manera que den datos significantes para el estudio, lo que puede deberse a que se encuentre cerca del límite de cuantificación.

Por otro lado, la capacidad de adsorción del biochar fue determinada mediante el cálculo del PZC, donde en la figura 27 se observa que a pH 2,5 la fase bio-sorbente se encuentra en su forma neutra. A valores mayores la fase debería presentar mayor cantidad de cargas negativas, mientras que a valores menores debería haber mayor cantidad de cargas positivas.

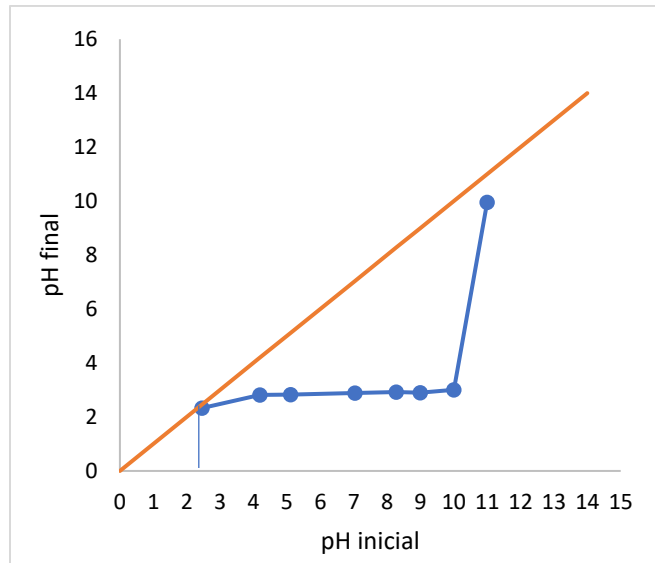


Figura 27: Punto de carga cero del biochar.

Finalmente, se realizó una espectroscopia electrónica de barrido al biochar, en las figuras 28 y 29 se presentan las imágenes obtenidas, donde se le da prioridad a observar la anatomía de las partículas, la presencia de poros (sitios activos de adsorción) y homogeneidad en su tamaño.

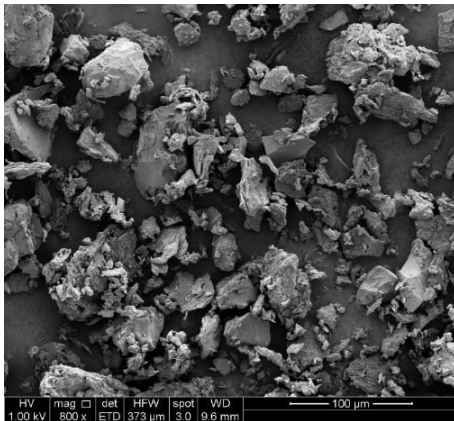


Figura 28: SEM de BIO a 800X.

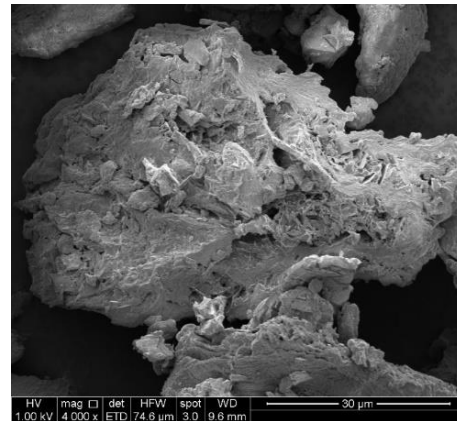


Figura 29: SEM de BIO a 4000X.

En la figura 28 se aprecian las partículas de biochar ampliadas a 800X se puede observar una morfología irregular y poco homogénea, mientras que en la figura 29 se aprecia una partícula de biochar ampliada a 4000X, se observa una superficie rugosa y con varios microporos, mayor cantidad que la observada en la CPLS, lo que nos indica que presenta más sitios de adsorción, ya que, lo microporos son los responsables de la mayoría de la adsorción de los analitos (Bakar. et al., 2015). Por lo tanto, se concluyó que la carbonización aumenta la cantidad de poros y, además, modifica la estructura de cada partícula, volviéndose más irregular y rugosa. Esta información hace pensar que la fase carbonizada es más eficaz que la CPLS para la extracción de los analitos.

6.3.2 Optimización del método analítico usando BIO

Una vez se seleccionó y caracterizó el biochar, se procede a la optimización del método analítico, para ello, se utiliza el método univariado, optimizando las variables presentadas en la tabla 2.

6.3.2.1 Tiempo de extracción

Primero, se estudia el perfil de extracción, en las figuras 30, 31, 32 y 33 se observan las tendencias de extracción de cada analito, donde se estudiaron tiempos de los 5 hasta los 90 min.

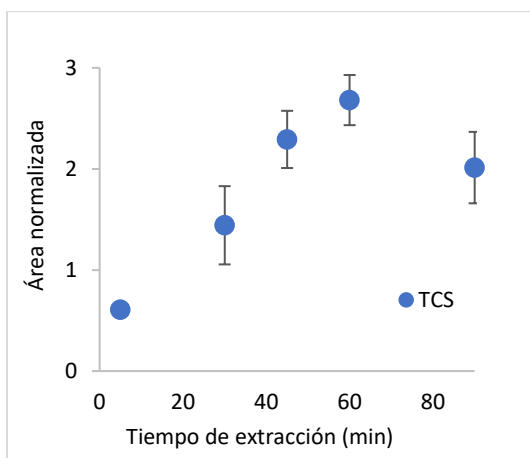


Figura 30: Perfil de extracción del TCS.

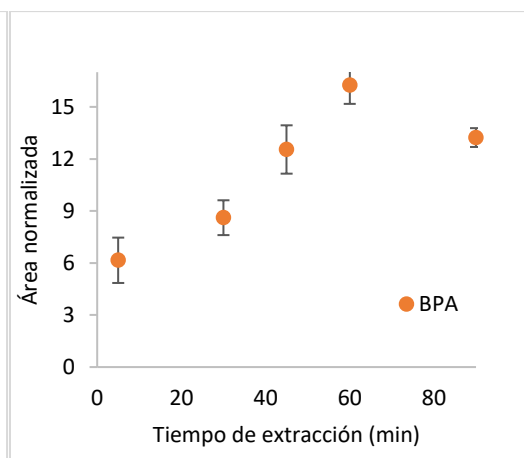


Figura 31: Perfil de extracción del BPA.

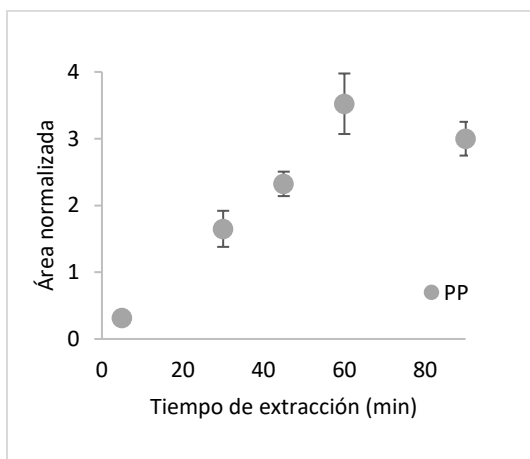


Figura 32: Perfil de extracción del PP.

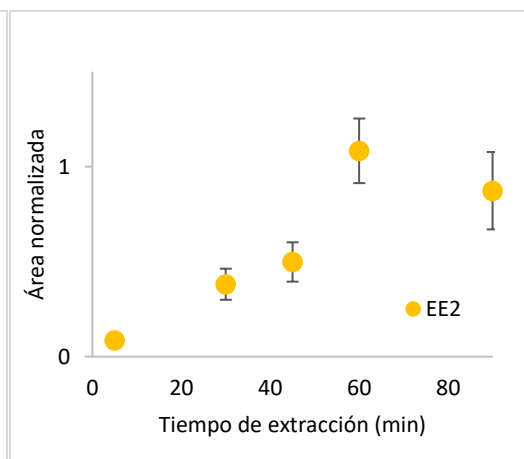


Figura 33: Perfil de extracción del EE2.

Se puede observar una clara tendencia en los 4 perfiles de extracción, donde la respuesta aumenta a medida que pasa el tiempo de extracción, llegando a un equilibrio a los 60 min, luego se observa que empieza a disminuir la recuperación, debido al proceso de desorción. Por lo tanto, se utiliza este tiempo de extracción para los siguientes experimentos de optimización y validación.

6.3.2.2 pH de extracción

En la figura 34 se presentan los resultados de la microextracción de los analitos a distintos pH.

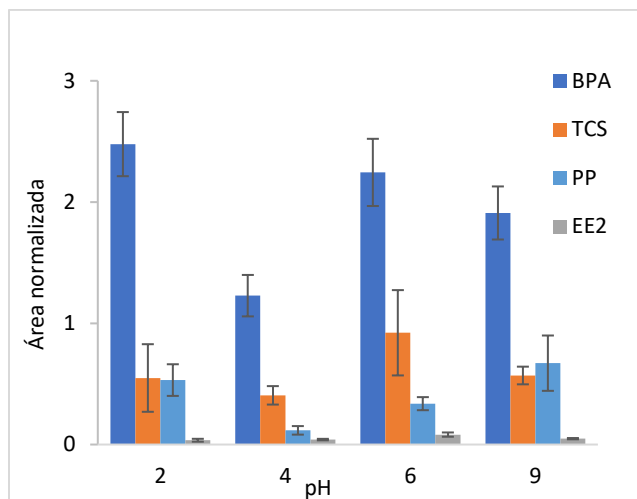


Figura 34: Efecto del pH de extracción usando biochar.

Los resultados dejan en evidencia que la mejor respuesta cromatográfica para el BPA, TCS y EE2 se encuentra a pH 6, mientras que el PP alcanza la mayor área normalizada a pH 9, esto tiene sentido, ya que, observando los pKa de la tabla 3, a pH 6, todos los analitos se encontrarían en su forma neutra, lo cual facilitarían la extracción de estos.

6.3.2.3 Fuerza iónica

Como ya se mencionó la adición de sal a la muestra acuosa desplaza la reacción hacia la fase biosorbente, debido al efecto del *salting-out*, donde el agua solvata los iones de sal, ayudando a los analitos a desplazarse a la fase sortiva. Por lo tanto, se estudiaron 4 concentraciones distintas de NaCl. En la figura 35 se muestran los resultados.

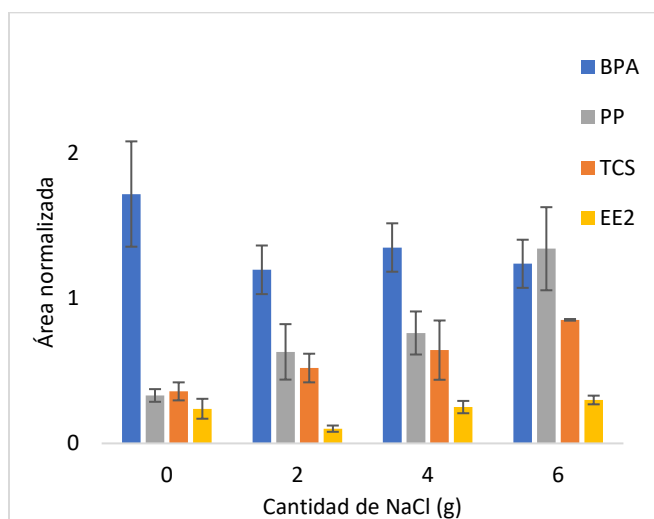


Figura 35: Efecto de la fuerza iónica de extracción usando biochar.

Se puede observar que añadiendo 6,0 g de NaCl hay una mayor respuesta cromatográfica, por lo tanto, se concluye que adicionando esta cantidad de sal se favorece la extracción de los analitos. Además, se presentan desviaciones estándar menores a esta cantidad de sal. Por lo tanto, se escogió la concentración al 30% m/v de NaCl para el proceso de validación del método.

6.3.2.4 Solvente de elución

A diferencia de la optimización del solvente de elución para la CPLS, se agregó como variable una relación 1:1 de MeOH/AcOEt, que fueron los solventes que presentaron mejores áreas normalizadas, con el fin de tener un solvente de variada polaridad. En la figura 36 se observa que la mayor extracción de analitos se logra al usar esta mezcla de solventes. Por consiguiente, se usa esta mezcla para la elución de los analitos en el proceso de validación.

Cabe mencionar, que además se consideró esta mezcla de solventes para la reconstitución de la muestra, etapa previa a la evaporación del solvente.

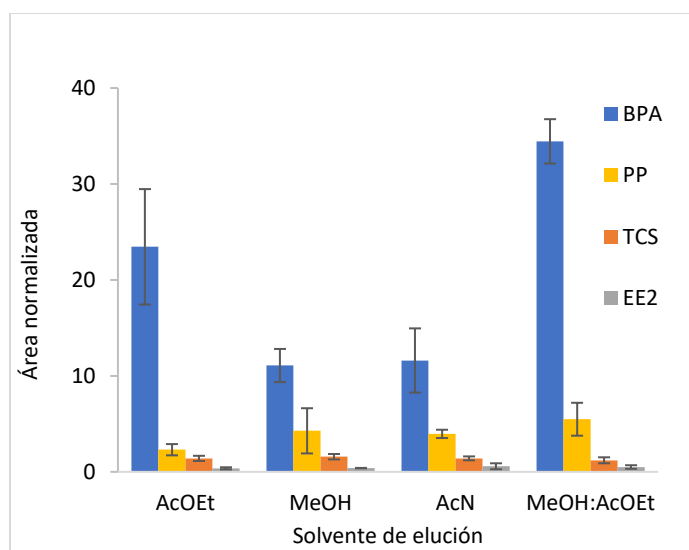


Figura 36: Optimización del solvente de elución usando biochar.

6.3.2.5 Cantidad de fase

En la figura 37, se presentan los resultados de la optimización de la cantidad de biochar a utilizar en la extracción, se puede apreciar que los resultados usando 40 mg de fase son muy semejantes a los resultados usando 50 mg. Sin embargo, los coeficientes de variación usando 40 mg son menores, lo cual ayuda a la repetibilidad del método. Esto se puede deber a que la fase no se encuentra tan compacta como con una mayor cantidad de fase, lo que dificulta la adsorción de los analitos. Por lo tanto, al presentar una respuesta cromatográfica similar, menor valor de error y menor uso de fase bio-sorbente, se selecciona los 40 mg de fase para la validación del método.

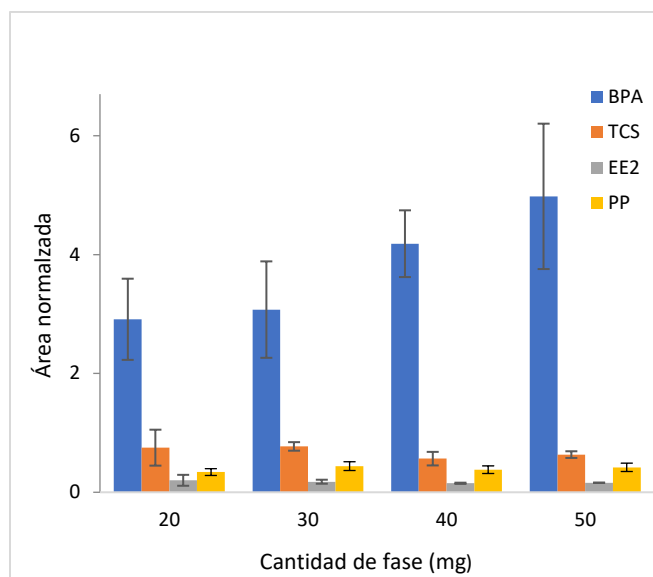


Figura 37: Efecto de cantidad de biochar usando biochar.

6.3.3 Validación del método analítico usando biochar

Luego de optimizar las variables que más afectan la extracción, usando biochar como fase bio-sorbente, se procedió a calcular las cifras de mérito del método analítico, para ello se realizó una curva de calibración, entre 5 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, usando como muestra acuosa agua del río Maipo, a la altura del puente esperanza, los valores se observan en la tabla 8. Se obtuvieron valores de coeficientes de correlación entre 0,9487 y 0,9921. Estos valores nos indica que el método es lineal.

Para el cálculo de LOD y LOQ se utilizó agua de la llave como muestra acuosa y se realizó la metodología usando biochar como fase sorbente ($n=6$). En la tabla 7, se observan valores de LOD entre 0,52 y 37,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que los valores de LOQ fluctúan entre 0,001 y 15,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estos límites nos dicen que el método es sensible y adecuado para cuantificar las bajas concentraciones en las que se encuentran los analitos. En cuanto a la precisión se encontraron valores entre 11 y 23%, los cuales son inferiores a los encontrados con la CPLS.

Tabla 7: Cifras de mérito usando biochar como fase sorbente.

Analitos	Ecuación de la recta	R^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisión, RSD (%)
TCS	$y = 583941x + 4125645$	0,9872	0,06	0,13	11
EE2	$y = 350582x + 3254632$	0,9581	0.12	0.41	23
BPA	$y = 710778x + 1354865$	0,9935	0,05	0,09	12
PP	$y = 165831x - 119492$	0,9785	0.15	0.43	18

Con respecto al ibuprofeno, este no se alcanzó a cuantificar en todos los puntos de la curva, esto se podría deber a que, a concentraciones bajas, el IBU se encuentra cercano al límite de detección, impidiendo ser cuantificado.

Por otro lado, en la tabla 8 se muestran los resultados de los experimentos de efecto matriz, recuperación absoluta y relativa del método analítico.

Tabla 8: Porcentajes de efecto matriz, recuperación absoluta y relativa usando biochar.

	% Recuperación absoluta	% Recuperación relativa	% Efecto matriz
TCS	22	95	108
BPA	28	108	97
PP	46	91	117
EE2	15	83	79

Se pueden observar recuperaciones absolutas entre 15,4 y 45,8%, mientras que los valores de recuperaciones relativas (recuperaciones corregidas con estándar deuterado) fluctúan entre 83,2 y 108%. Estas recuperaciones son mayores a las encontradas usando la CPLS, lo que indica la mejora de la capacidad sorbente del material carbonizado (mayor porosidad).

En este contexto, para compensar los efectos de la matriz, la curva de calibración se obtuvo utilizando muestras de agua enriquecidas en 5 niveles de concentración. El efecto matriz se midió en muestras de agua de río, y se encontraron valores entre 79-117%, lo que indica un bajo efecto de la matriz.

6.3.4 Comparación biochar vs fases sintéticas comerciales

Por último, se realizó la comparación del biochar con 3 fases sintéticas comerciales, Oasis HLB, C18 y SD-DVB. Los resultados se muestran en la figura 38.

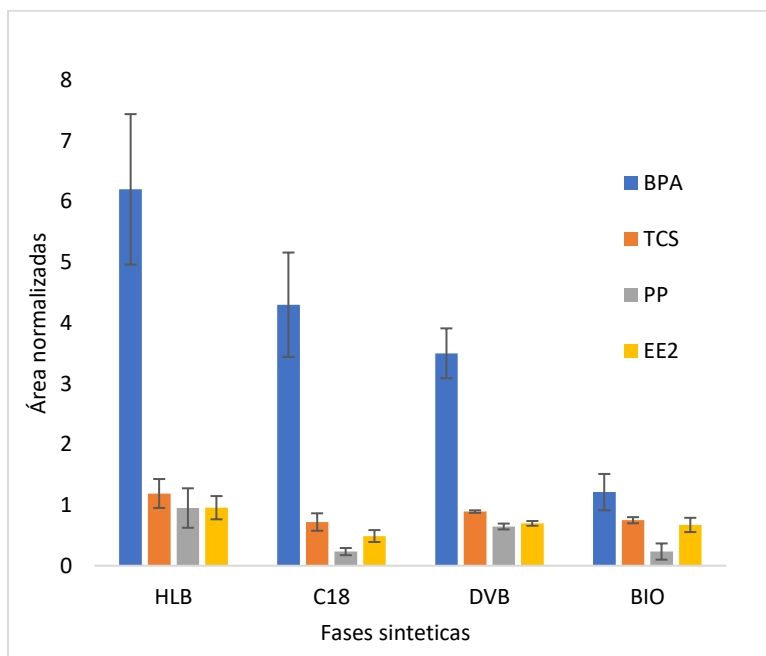


Figura 38: Comparación fases comerciales con biochar.

Queda en evidencia que el TCS y el EE2 presentan recuperaciones comparables con las 3 fases comerciales, mientras que el PP solo es comparable solo con el C18 como fase sortiva. Sin embargo, la recuperación del BPA por parte del biochar es menor que las otras fases. Por lo tanto, el BIO es una alternativa prometedora a la hora de elegir una fase sorbente, esto dependerá del analito seleccionado para el estudio, además, se puede seguir con el desarrollo de la metodología analítica, con el fin de aumentar la sensibilidad cromatográfica y poder superar las recuperaciones de las fases comerciales.

6.4 Resultados y discusión usando carbón activado

6.4.1 Estudio de variables en la preparación del CA

Antes del proceso de carbonización de la fase bio-sorbente, se procedió a estudiar la reacción de activación, para ello, se seleccionaron 3 tipos de activaciones distintas, las cuales fueron buscadas en bibliografía.

6.4.1.1 Selección de la activación

Para este experimento se estudió la activación del carbón activado, para ello se escogieron 3 activaciones químicas distintas, la primera consiste en formar una sal fundida, la cual se preparó mezclando la CPLS con $ZnCl_2$ en una relación 1:4, respectivamente. Para la segunda activación se mezcló la CPLS con una solución de K_2CO_3 al 40% y la última consiste en mezclar la CPLS con una solución de $ZnCl_2$ al 40%. Posterior al proceso de activación, estas mezclas fueron carbonizadas a $400^\circ C$. Finalmente, los carbones se lavaron con HCl 1M y llevados a pH neutro. En la figura 39 se muestran los resultados.

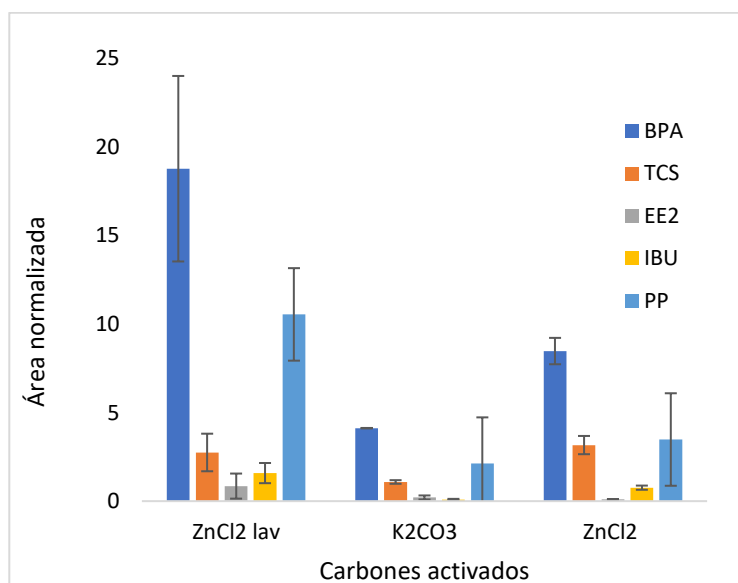


Figura 39: Selección de la reacción de activación.

La figura 39 deja en evidencia que la activación formando una sal fundida con $ZnCl_2$ presenta mejor es respuestas cromatográficas para todos los analitos, además las barras de error son menores para la mayoría de los analitos en relación a las otras preparaciones. Por lo tanto, se selecciona esta activación para el estudio de temperatura de carbonización y concentración de activante.

6.4.1.2 Selección de temperatura de carbonización

Luego de seleccionar el tipo de activación que se utilizará, se procede a buscar la temperatura de carbonización que presente mejores señales cromatográficas, para ello, se seleccionó una concentración constante de 1:4 fase sorbente/activante y se carbonizaron a 400 y 600°C. Finalmente, se realizaron extracciones de muestras acuosas dopadas a $20 \mu\text{g L}^{-1}$ por triplicado. Los resultados se presentan en la figura 40.

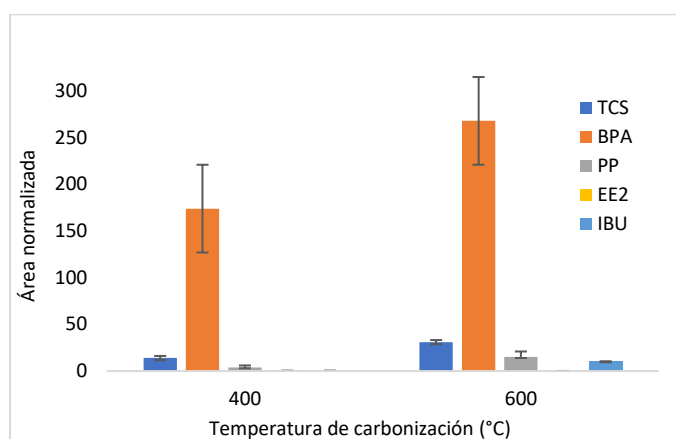


Figura 40: Estudio de temperatura de carbonización.

Se puede observar que el carbón preparado a 600°C presenta áreas normalizadas mayores para el BPA, TCS, PP y IBU. Solo el EE2 presenta mejor respuesta cromatográfica en el carbón preparado a 400°C, sin embargo, no se observa la barra perteneciente al EE2, ya que, en relación a las otras barras esta presentaba valores muy chicos. Por lo tanto, se seleccionó los 600°C como temperatura de carbonización para el estudio de concentración de activante.

6.4.1.3 Estudio de activaciones

Finalmente, se estudiaron 3 proporciones distintas de fase sorbente/activante para la preparación del carbón que se usó en los experimentos de optimización y validación, las concentraciones fueron 1:2, 1:3, 1:4. Los valores se presentan en la figura 41.

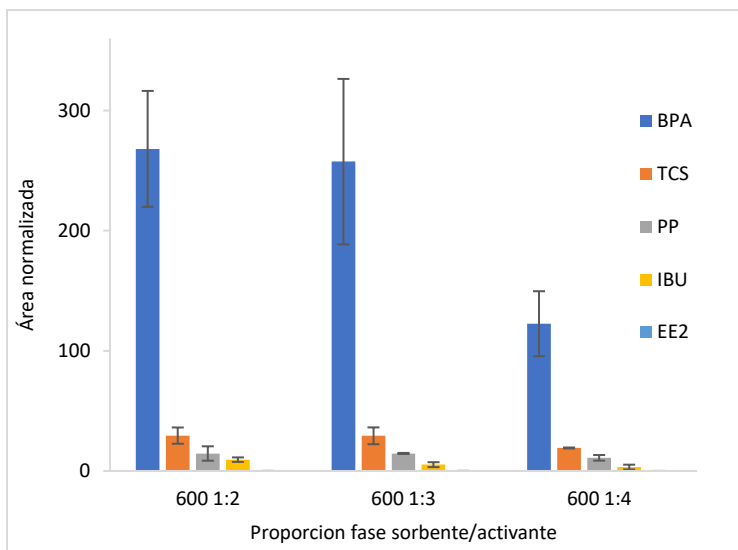


Figura 41: Estudio de concentración de activación.

Se puede observar que entre las 3 proporciones estudiadas la relación 1:2 y 1:3 presentan respuestas cromatográficas parecidas. Sin embargo, se prioriza el menor uso de reactivos para la preparación del CA. Por lo tanto, se seleccionó la proporción 1:2 para la preparación del CA.

6.4.2 Caracterización del carbón activo

Luego de seleccionar las condiciones óptimas de carbonización y activación del material crudo, se procede a caracterizar el CA resultante, para ello, lo primero fue realizar una espectroscopia infrarroja, con el fin de orientar sobre los grupos funcionales que puede tener el CA. En la figura 42 se muestra el espectro.

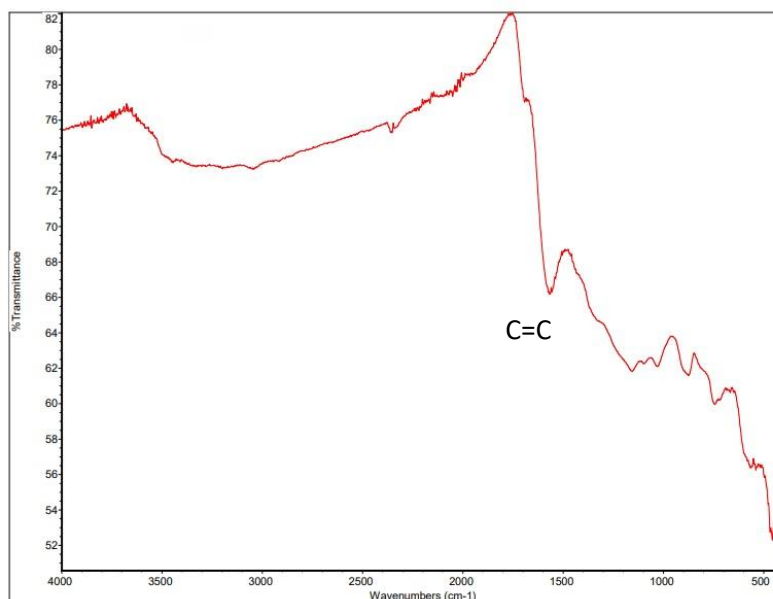


Figura 42: FT-IR del carbón activado.

Queda en evidencia la ausencia de grupos funcionales que contengan oxígeno, solo se observa una señal en los 1600 cm^{-1} lo que nos indica la presencia de la tensión C=C aromático. Por lo tanto, al no presentar grupos funcionales capaces de realizar puentes de hidrogeno, se asume que el CA adsorbe a los analitos mediante fuerzas de Van der Waals o o interacciones π - π .

Luego, se realizó un estudio para determinar el punto de carga cero. El resultado se muestra en la las figuras 43, donde se puede observar que el CA se encuentra en su forma neutra a pH 2,4. Este valor de PZC es muy parecido al obtenido para el biochar, esto nos hace inferir que el proceso de carbonización acidifica las fases bio-sorbentes.

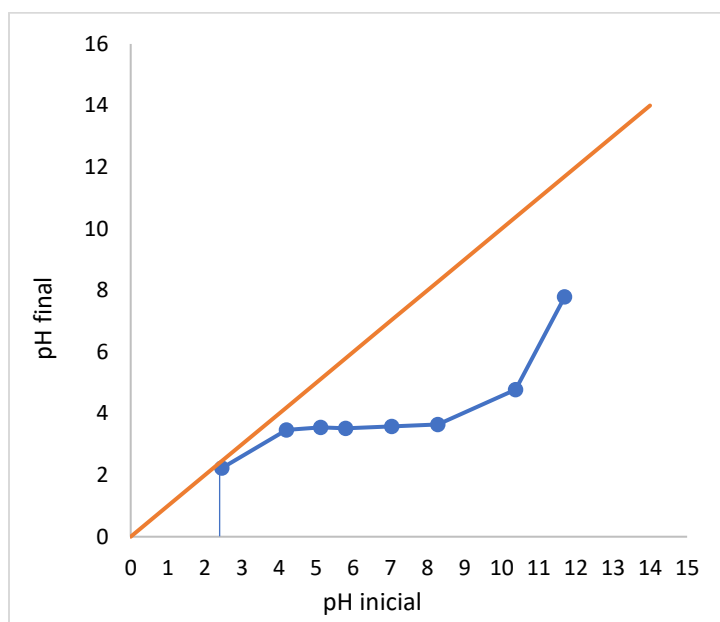


Figura 43: Punto de carga cero del CA.

Posteriormente, se le realizó una microscopia electrónica de barrido al CA, con el fin de discutir sobre la morfología del material, las imágenes se aprecian en las figuras 44 y 45.

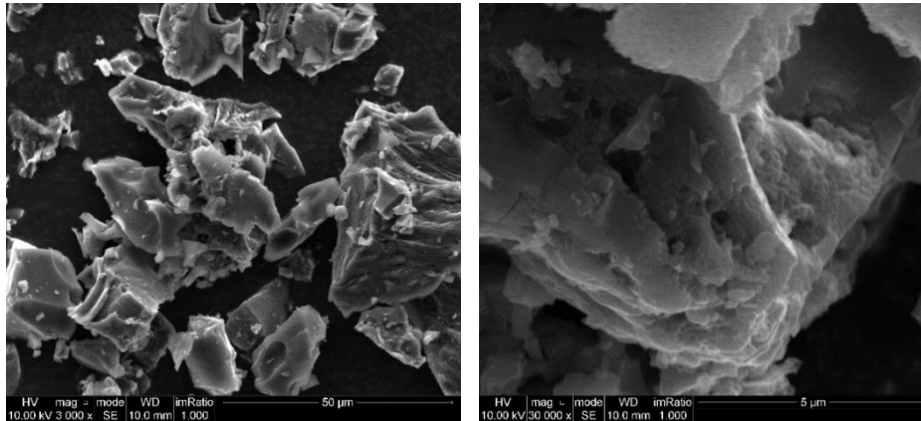


Figura 44: SEM del CA ampliado 1300X. Figura 45: SEM del CA ampliado 30000X.

En la figura 44 se puede apreciar la morfología de cada partícula de CA, las cuales son irregulares, algunas lisas y otras rugosas. Sin embargo, al observar la figura 45 queda en evidencia la presencia de una gran cantidad de microporos. Por lo tanto, se puede concluir que el CA presenta una mayor cantidad de microporos en relación a la CPLS, no obstante, las partículas de CA presentan menos sitios de adsorción que el biochar.

Finalmente, al CA se le realizó un análisis de Brunauer-Emmett-Teller (BET) con el objetivo de obtener el área superficial, volumen y tamaño de los poros. En la tabla 9 se muestran los resultados.

Tabla 9: Valores obtenidos por el análisis BET para CA.

BET	
Área superficial	1307,58 m ² g ⁻¹
Volumen de poro	0,767 cm ³ g ⁻¹
Tamaño poro	2,344 nm

El promedio del tamaño de poro informado nos da cuenta de la presencia de mesoporos (entre 2 y 50 nm), además, el área superficial y volumen de poro es mayor en comparación con investigaciones anteriores, donde usaron cáscara de plátano cruda y carbonizada-activada (Bakar, et al., 2021), esto nos da cuenta de una activación más eficiente y, por lo tanto, una superficie más adecuada para la adsorción de los analitos.

6.4.3 Optimización carbón activado

Luego de caracterizar el CA, se procede a optimizar las variables que más afectan al proceso de extracción, para ello, se estudiaron 4 variables, perfil de extracción, pH de extracción, cantidad de fase e influencia de fuerza iónica. Cabe destacar, que no se estudió el tiempo de elución, ya que, en los experimentos de optimización de la CPLS quedó en manifiesto que a medida que aumenta el tiempo, la elución de analitos no aumenta. Además, se utilizó como solvente de elución una proporción 1:1 de AcOEt/MeOH para todos los experimentos.

6.4.3.1 Tiempo de extracción

El perfil de extracción se evaluó entre los 15 y 90 min de extracción, observando las figuras 46, 47, 48, 49 y 50 queda en evidencia que la extracción usando CA como fase bio-sorbente llega a un equilibrio a los 60 min para la mayoría de los analitos, exceptuando el EE2. Por lo tanto, se utilizó este tiempo de extracción para la validación del método analítico.

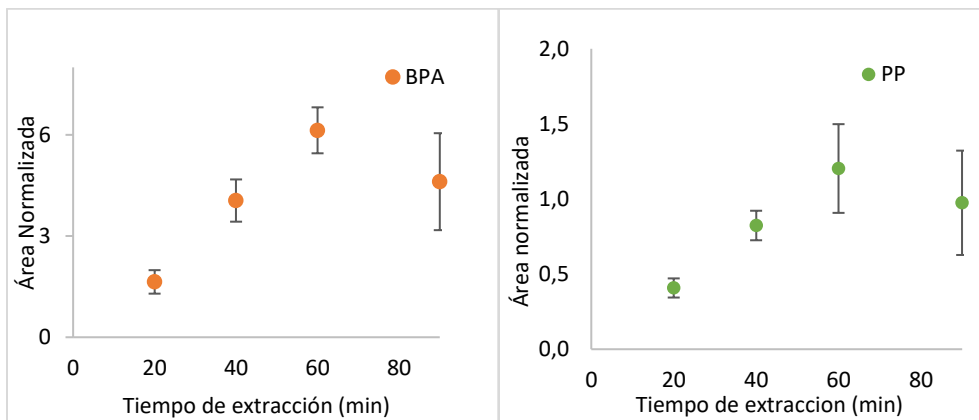


Figura 46: Perfil de extracción del BPA.

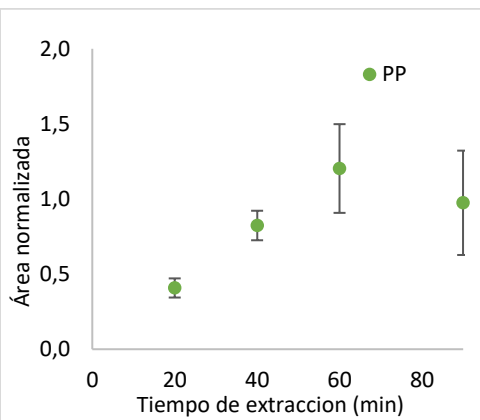


Figura 47: Perfil de extracción del PP.

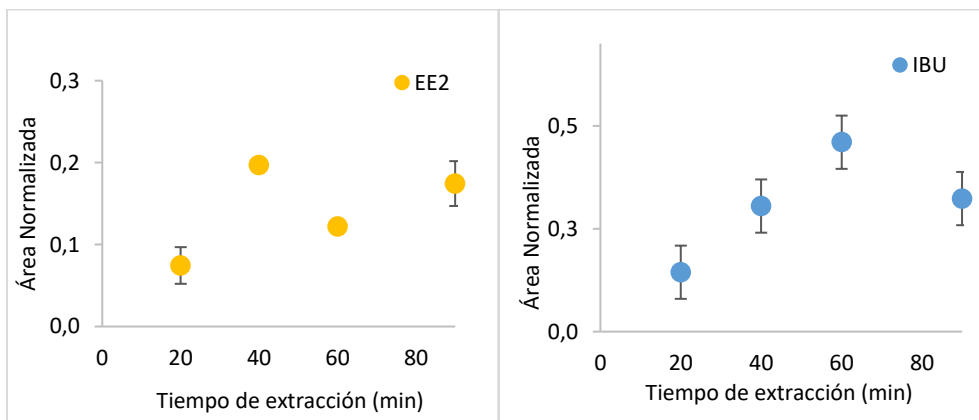


Figura 48: Perfil de extracción del EE2.

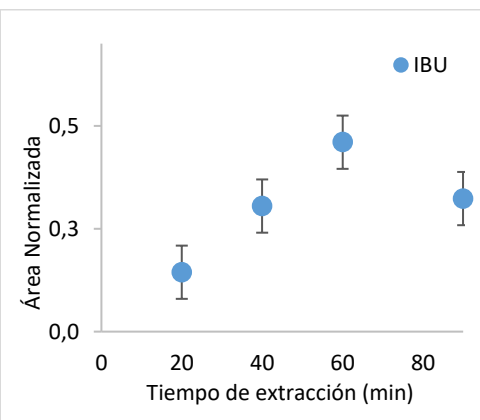


Figura 49: Perfil de extracción del IBU.

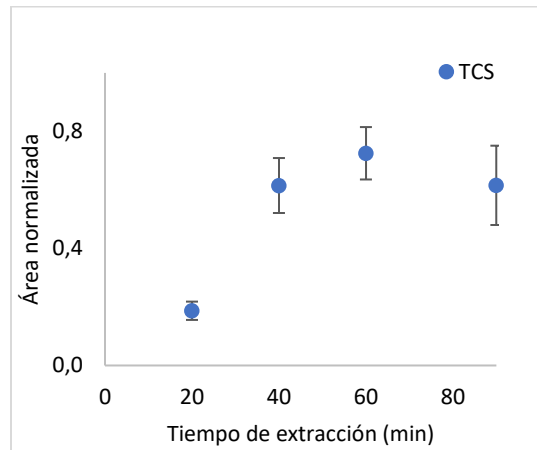


Figura 50: Perfil de extracción del TCS.

6.4.3.2 pH de extracción

Luego de optimizar el tiempo de extracción se procede a optimizar el pH, para ello, se estudió un rango de pH de 2-9, los resultados se muestran en la figura 51. Como era de esperar, el CA demostró la misma tendencia de extracción que las otras dos fases, donde se logró una extracción más eficiente a un valor 6 de pH. Consecuentemente, se usa este pH para los siguientes experimentos.

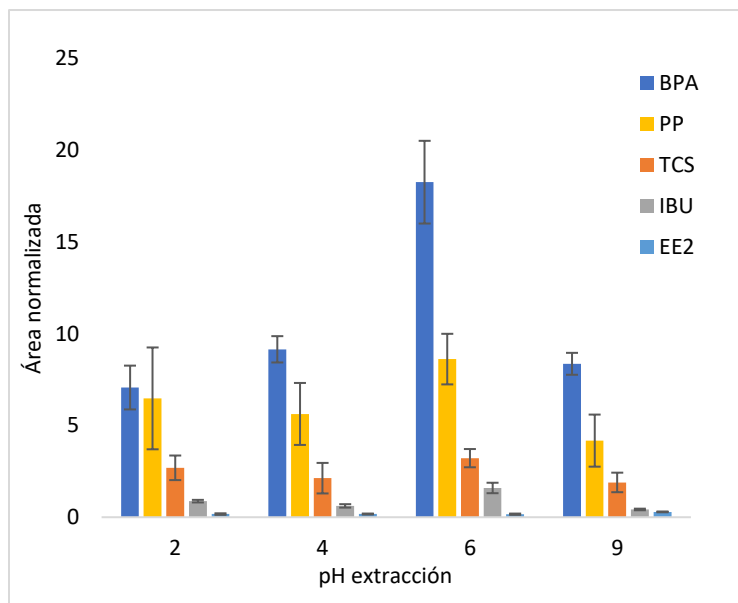


Figura 51: Efecto del pH de extracción usando CA.

6.4.3.3 Cantidad de fase

Se estudió distintas cantidades de fases, entre un rango de 10 a 40 mg. Los resultados se muestran en la figura 52, los resultados no muestran diferencias significativas entre cada cantidad utilizada, por lo tanto, se escogió la cantidad de 20 mg, ya que, presenta las menores desviaciones estándar y, además, se usa menos cantidad de CA. En este caso, una cantidad baja de fase bio-sorbente puede presentar mayores sitios de adsorción (mayor área de contacto) y, por lo tanto, mejores recuperaciones de analitos.

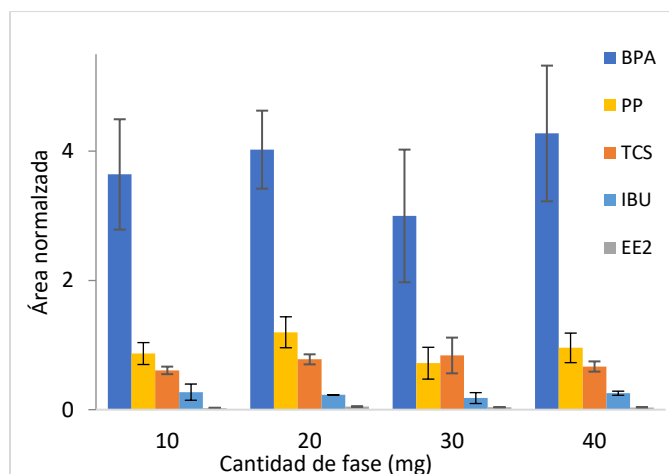


Figura 52: Efecto de la cantidad de fase usando CA.

6.4.3.4 Fuerza iónica.

En el caso del efecto de la incorporación de sal a la muestra, se obtuvieron valores distintos a las otras fases. En la figura 53, se observa que al agregar 2,0 g de NaCl se alcanzaron mejores recuperaciones para la mayoría de los analitos, esto nos indica que el CA es más eficiente para la adsorción de los analitos que las otras dos fases, ya que, necesita menor cantidad de sal para alcanzar una recuperación óptima.

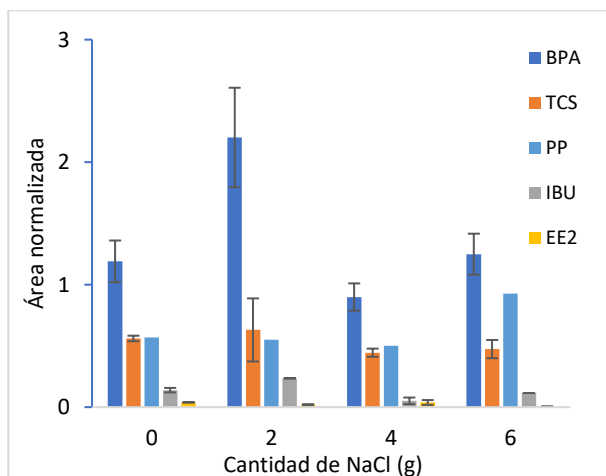


Figura 53: Efecto de la fuerza iónica usando CA.

6.4.4 Validación usando carbón activado

Luego de optimizar el método analítico, se procedió a calcular las cifras de mérito usando el CA, para ello se realizó una curva de calibración, entre 5 y 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, usando como muestra acuosa agua del río Maipo, a la altura del puente Esperanza, donde se obtuvieron regresiones lineales con un R^2 que fluctúan entre los 0,9471 y los 0,9998, lo que nos dice que el método es más lineal usando CA que al usar BIO.

Para el cálculo de LOD y LOQ se utilizó agua de la llave como muestra acuosa y se realizó la metodología usando biochar como fase sorbente ($n=6$), los valores de los límites de detección están entre 1,4 y 25 $\mu\text{g L}^{-1}$, mientras que los límites de cuantificación se obtuvieron en un rango entre 2,9 y 35 $\mu\text{g L}^{-1}$, lo que nos indica que el método es sensible y adecuado para cuantificar las bajas concentraciones en las que se encuentran los analitos.

Tabla 10: Cifras de mérito usando carbón activado.

Analitos	Ecuación de la recta	R^2	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Precisión, RSD (%)
TCS	$y=160397x + 113285$	0,9987	0.01	0,05	10
BPA	$y=216370x + 306556$	0,9998	0,03	0.08	3
EE2	$y=29186x + 45921$	0,9994	0.04	0,09	11
PP	$y=94680x + 148217$	0,9482	0,02	0.07	15
IBU	$y= 19683x + 57293$	0,9985	0,21	0.46	6

Además, se calcularon los porcentajes de recuperación absoluta, recuperación relativa y efecto matriz. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11: Recuperaciones y efecto matriz usando CA.

Analitos	% Recuperación absoluta	% Recuperación relativa	% Efecto matriz
EE2	44	87	112,2
BPA	58	104	128,0
TCS	50	85	80,7
PP	75	98	97,9
IBU	30	106	91,3

Se puede apreciar recuperaciones absolutas que varían entre 30 y 75%, mientras que las recuperaciones relativas (recuperaciones corregidas con estándar deuterado) fluctúan entre 85 y 106%. Donde las recuperaciones absolutas son mayores que al usar BIO, esto nos indica que el proceso de activación es eficiente y adecuado para aumentar la retención de los analitos.

Por otro lado, se calculó el efecto matriz, donde se obtuvieron valores mayores a 80,7%, lo que indica un efecto bajo de la matriz.

6.4.5 Comparación del CA vs fases sintéticas comerciales

Finalmente, se comparó el CA con 3 fases sintéticas comerciales, los resultados se muestran en la figura 54, donde se pudo observar una eficiencia del CA casi comparable con la fase comercial Oasis-HLB, siendo mejor que las otras dos fases, este resultado es muy prometedor, ya que, se presenta como una opción comparable con fases sintéticas comerciales, pero al ser origen natural, le da una connotación más verde al procedimiento analítico.

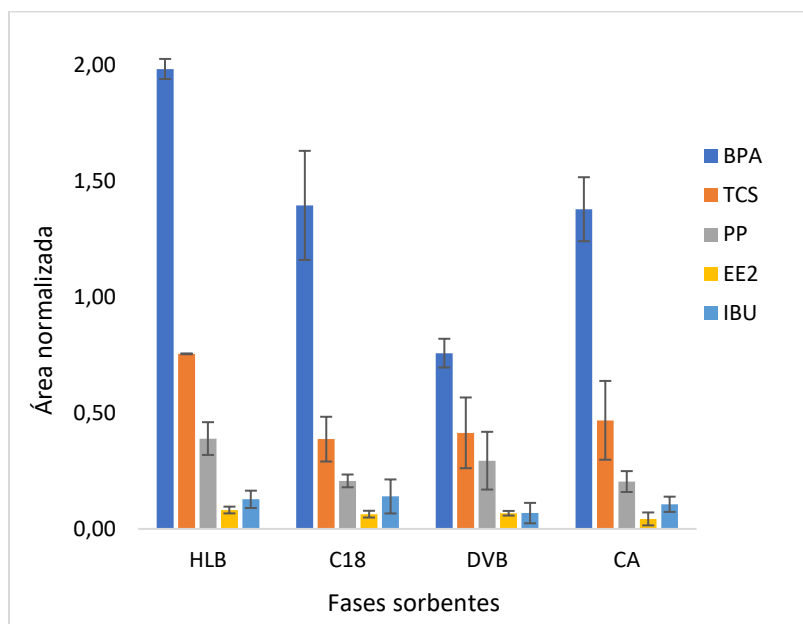


Figura 54: Comparación fases comerciales con CA.

Finalmente, se realizó un análisis estadístico a la comparación del CA (mejor fase bio-sorbente) con las 3 fases sintéticas en estudio, a través de un ANOVA de una vía, con significancia de un 95%. Con el fin de observar diferencias significativas (p -value < 0,05) entre cada fase. En la figura 55 se observan los resultados.

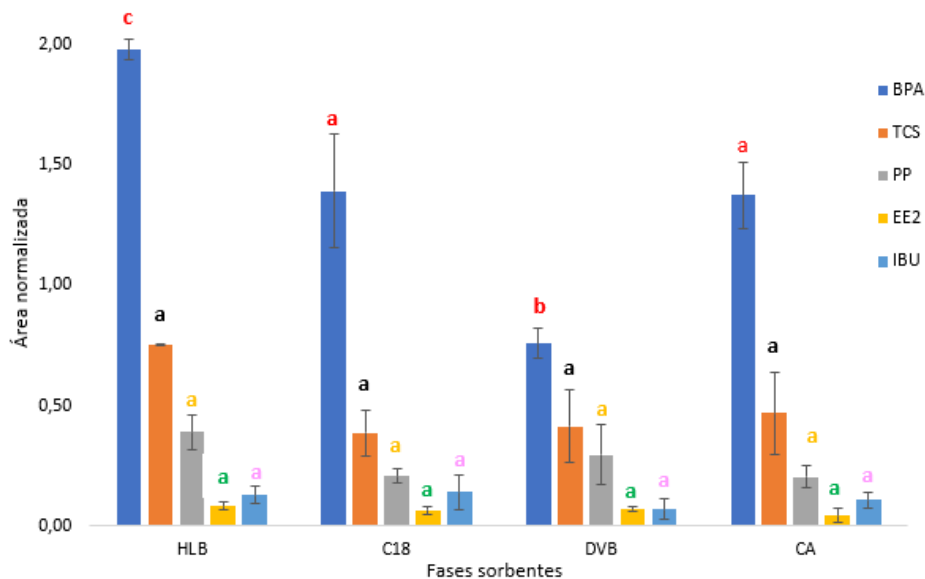


Figura 55: Análisis estadístico de comparación de fases comerciales vs CA.

En la figura 55, se puede observar que, para el TCS, PP, EE2 y IBU no hay diferencias significativas entre cada fase sorbente ($p\text{-value} > 0,005$), solo para el BPA se encuentran diferencias significativas para el Oasis-HLB y para el SD-DVB. En conclusión, el CA es una alternativa verde frente a las fases comerciales, con eficacias comprobables.

7. CONCLUSIONES

- Se logró desarrollar una metodología cromatográfica, la cual identifica a los 5 analitos en estudio, además, se registraron los tiempos de retención y los iones de identificación y cuantificación.
- Se prepararon las 3 fases adsorbentes a partir de la cáscara de plátano. El biochar es la mejor fase desde el punto de vista de la química analítica verde, ya que, no hay usos de solventes ni de reactivos en su preparación. Mientras que el CA es la mejor fase visto desde la eficiencia de extracción.
- Se logró desarrollar y optimizar una metodología de extracción para los analitos de estudio usando las 3 fases. Para el caso de la CPLS solo se pudo optimizar para el BPA, TCS y EE2. Mientras que para el BIO se optimizó para el BPA, TCS, EE2 y PP. Finalmente, al usar CA como fase bio-sorbente se pudieron retener y optimizar todos los analitos propuestos en esta investigación.
- Finalmente, las 3 fases fueron comparadas con fases comerciales, el CA presentó valores comparables con las fases sintéticas para todos los analitos. No obstante, las otras dos fases también tuvieron valores comparables con las fases sintéticas para algunos analitos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Aslam, R. B. (2010). An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal*, 6, 155-162.

Bakar, N. A., Othman, N., Yunus, Z. M., & Altowayti., W. A. (2021). Nipah (Musa Acuminata Balbisiana) banana peel as a lignocellulosic precursor for activated carbon: characterization study after carbonization process with phosphoric acid impregnated activated carbon. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 12, 1056.

Brewer, C. & Brown, R. (2012). Biochar. *In Comprehensive Renewable Energy*, 5, 357–384.

Costa, L. F., Ruotolo, L. A. M., Ribeiro, L. S., Pereira, M. C., Camargo, E. R., & Nogueira, F. G. E. (2021). Low-cost magnetic activated carbon with excellent capacity for organic adsorption obtained by a novel synthesis route. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 105061.

Daughton, C. G., & Ternes, T. A. (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? *Environmental health perspectives*, 107(suppl 6), 907-938.

Díaz, T. & Heselaars, C. (25 de octubre de 2021). Emol. Obtenido de <https://www.emol.com/noticias/Tecnologia/2019/09/25/962245/aumento-nivelmar-crisis-climatica.html>.

Eertmans, F., Dhooge, W., Stuyvaert, S., & Comhaire, F. (2003). Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicology in Vitro*, 17, 515–524.

Fabrizi, E. (2015). Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1), 10-28.

Fabre, E., Lopes, C. B., Vale, C., Pereira, E., & Silva, C. M. (2020). Valuation of banana peels as an effective biosorbent for mercury removal under low environmental concentrations. *Science of the total environment*, 709, 135883.

Fu, Y., Shen, Y., Zhang, Z., Ge, X., & Chen, M. (2019). Activated bio-chars derived from rice husk via one-and two-step KOH-catalyzed pyrolysis for phenol adsorption. *Science of the Total Environment*, 646, 1567-1577.

Gałuszka, A., Migaszewski, Z., & Namieśnik, J. (2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78–84.

Gao, Y., Yue, Q., Gao, B., & Li, A. (2020). Insight into activated carbon from different kinds of chemical activating agents: A review. *Science of the Total Environment*, 746, 141094.

Gurav, R., Bhatia, S., Choi, T., Park, J., Park, Y., Han, G., Vyavahare, J., Jadhav, H., & Yang, P. (2020). Treatment of furazolidone contaminated water using banana pseudostem biochar engineered with facile synthesized magnetic nanocomposites. *Bioresource Technology*, 297, 122472.

Guimaraes JL, Frollini E, Da Silva CG, Wypych F, Satyanarayana KG. (2009). Characterization of banana, sugarcane bagasse and sponge gourd fiber of Brazil. *Ind Crops Prod*, 30(3), 407-415.

Halden, J. H. (2007). "Mass balance assessment of triclosan removal during conventional sewage treatment". *Chemosphere*, 66(2), 362–369.

Haman C., Dauchy X., Rosin C., Munoz JF., (2015) Occurrence, fate and behavior of parabens in aquatic environments: a review. *Water Research*, 68, 1-11.

Huang, Y. Q., Wong, C. K. C., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B. & Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment international*, 42, 91-99.

Hussaro, K., (2014). Preparation of activated carbon from palm oil shell by chemical activation with NaCO_3 and ZnCl_2 as impregnated for H_2S adsorption. *Am J Environ Sci*, 10(4), 336-346.

ISP. (27 de Diciembre de 2021). *ISP informa sobre los medicamentos más vendidos durante el año 2021*. Obtenido de <https://www.ispch.gob.cl/noticia/isp-informa-sobre-los-medicamentos-mas-vendidos-durante-el-ano-2021>.

Jiang, Z., Zhu, W., Qian, K. & Xie, J. (2016). Constructing graphitelike carbon nitride modified hierarchical yolk-shell TiO_2 spheres for water pollution treatment and hydrogen production. *Journal of Materials Chemistry A*, 4(5), 1806-1818.

Könemann, S., Kase, R., Simon, E., & Carere., M. (2018). Effect-based and chemical analytical methods to monitor estrogens under the European Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 102, 225-235.

Kneppera, T., Sacherb, F., Lange, F., Brauch, H., Karrenbrock, F., Roerden, O., & Lindner, K. (1999). Detection of polar organic substances relevant for drinking water. *Waste Management*, 19(2), 77-99.

Mafra, G., García-Valverde, M. T., Millán-Santiago, J., Carasek, E., Lucena, R., & Cárdenas, S. (2020). Returning to nature for the design of sortive phases in solid-phase microextraction. *Separations*. 7(1), 2.

Petrovic M., González S., Barceló D. (2003) Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry*, 22(10), 685-696.

Petrie, B., Barden, R., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*, 72, 3-27.

Pena-Pereira, F., Lavilla, I., & Bendicho, C. (2021). Greening Sample Preparation: An overview of cutting-edge contributions. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 30, 100481.

Ramírez-Morales D, Masís-Mora M, Montiel-Mora JR, Cambronero-Heinrichs JC, Briceño-Guevara S, Rojas-Sánchez CE, Méndez-Rivera M, Arias-Mora V, Tormo-Budowski R, Brenes-Alfaro L, Rodríguez-Rodríguez CE. (2020). Occurrence of pharmaceuticals, hazard assessment and ecotoxicological evaluation of wastewater treatment plants in Costa Rica. *Science of the Total Environment*, 765, 141200.

Richter, P., Arismendi, D., & Becerra-Herrera, M. (2021). The Fundamentals, Chemistries and Applications of Rotating-Disk Sorptive Extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 137, 116209.

Rodríguez-Mozaz, S., Alda, M. J., & Barceló., D. (2004). Monitoring of estrogens, pesticides and bisphenol A in natural waters and drinking water treatment plants by solid phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2), 85-92.

Sasco, A. J. (2001). Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? *Apmis*, 109(S103), S80-S92.

Shah, M., Reddy, G., Banerjee, R., Ravindra, B. & Kothari, L. (2005). Microbial degradation of banana waste under solid state bioprocessing using two lignocellulolytic fungi. *Process Biochemistry*, 40(1), 445-451.

Sundarraaj AA and Ranganathan TV (2017). Physicochemical characterization of Jackfruit peel. Pharmaceutical. *Biological and Chemical Sciences*, 8(3), 2285-2295.

Sneader, W. (2005). *Drug discovery: a history*. John Wiley & Sons.

Trilokesh C, Uppuluri KB. (2019). Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from jackfruit peel. *Scientific Reports*, 9(1), 1-8.

Yaashikaa, P. R., Kumar, P. S., Varjani, S., & Saravanan, A. (2020). A critical review on the biochar production techniques, characterization, stability and applications for circular bioeconomy. *Biotechnology Reports*, 28, e00570.