

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA  
CON FIBRA HUECA EN MODO BARRA DE SOLVENTE “HF-SBME”  
PARA EL ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EMERGENTES  
(BENZODIACEPINAS Y COMPUESTOS FENÓLICOS) EN MUESTRAS  
DE AGUAS RESIDUALES**

WILSON ALEJANDRO LARGO TABORDA

UNIVERSIDAD DE CALDAS  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
MAESTRÍA EN QUÍMICA  
MANIZALES  
2019

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA  
CON FIBRA HUECA EN MODO BARRA DE SOLVENTE “HF-SBME” PARA EL  
ANÁLISIS DE CONTAMINANTES EMERGENTES (BENZODIACEPINAS Y  
COMPUESTOS FENÓLICOS) EN MUESTRAS DE AGUAS RESIDUALES**

WILSON ALEJANDRO LARGO TABORDA

TESIS DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGÍSTER EN QUÍMICA

DIRECTOR: Dr. MILTON ROSERO MOREANO

UNIVERSIDAD DE CALDAS  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES  
MAESTRÍA EN QUÍMICA  
MANIZALES  
2019

Nota de Aceptación

---

---

---

Presidente del Jurado

---

Jurado

---

Jurado

A Dios, A mi familia por el apoyo  
incondicional, a mis compañeros  
de Maestría, y a mi tutor Milton  
Rosero Moreano.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a **DIOS** por todas las bendiciones recibidas en este proceso, por estar siempre presente en cada momento cuando requería paz y tranquilidad, a mi madre María Genoveva Taborda por su apoyo incondicional, dedicación, confianza y fe, a mis hermanos quienes han estado presentes en cada paso que doy ya que soy la fortaleza y un motor para continuar, a mi gran amigo Jorge Andrés Sánchez por la compañía, la paciencia y los consejos que me ofrece en cada momento difícil de este camino.

Este logro no hubiese sido posible sin el trabajo conjunto entre varias instituciones, tanto la Universidad de Caldas y su Vicerrectoría de Investigaciones y Postgrados, el Grupo de Investigación en Cromatografía y Técnicas Afines “GICTA”, el Instituto de Medicina Legal – Sede Pereira y al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación “Colciencias”. Al programa de Maestría en Química por el apoyo económico para la asistencia a varios eventos académicos.

A los docentes del Departamento de Química de la Universidad de Caldas y principalmente aquellos que aportaron en mi formación al Dr. Milton Rosero Moreano y la Mg. Ángela López por las constantes asesorías en el desarrollo de la tesis, a Juan David Rivera y Juan Pablo Penagos por los aprendizajes brindados, a mis amigos y compañeros de Maestría Jhon Alexander Fiscal Ladino quien siempre fue un pilar importante en mi proceso de formación por su constante acompañamiento, Laura Marcela Yathe quien siempre fue un símbolo de admiración por su inteligencia y constancia, y a todos aquellos que de alguna forma aportaron durante mi proceso.

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. OBJETIVOS.....	12
2.1. OBJETIVO GENERAL .....	12
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	12
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
3.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA.....	13
4. JUSTIFICACIÓN.....	15
5. CAPÍTULO I: GENERALIDADES.....	17
5.1. AGUAS RESIDUALES .....	17
5.1.1. AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS O AGUAS NEGRAS: .....	18
5.1.2. AGUAS BLANCAS: .....	19
5.1.3. AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES .....	19
5.1.4. AGUAS RESIDUALES AGRÍCOLAS:.....	19
5.1.5. INCONVENIENTES OCASIONADOS POR EL VERTIDO DE AGUAS RESIDUALES .....	19
5.1.6. MALOS OLORES Y SABORES:.....	20
5.1.7. TOXICIDAD: .....	20
5.1.8. COMPUESTOS ORGÁNICOS: .....	20
5.1.9. COMPUESTOS INORGÁNICOS Y MINERALES:.....	21
5.2. TIPOS DE CONTAMINANTES .....	25
5.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS CONTAMINANTES: .....	25
5.3. MOLÉCULAS DE INTERÉS (ANÁLISIS) .....	26
5.3.1. BENZODIACEPINAS.....	26
5.3.2. COMPUESTOS FENÓLICOS.....	30

5.4.	PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....	34
5.5.	OBJETIVOS Y TENDENCIAS DE LA MICROEXTRACCIÓN .....	36
5.6.	MICROEXTRACCIÓN.....	39
5.7.	TERMODINÁMICA DE LA EXTRACCIÓN Y MICROEXTRACCIÓN CON FIBRA HUECA.....	41
5.8.	PARÁMETROS ANALÍTICOS EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA CON FIBRA HUECA.....	44
5.8.1.	TIPO DE SOLVENTE .....	44
5.8.2.	AJUSTE DEL pH .....	44
5.8.3.	ADICIÓN DE SAL.....	45
5.8.4.	VELOCIDAD DE AGITACIÓN .....	45
5.8.5.	TIEMPO DE EXTRACCIÓN .....	46
5.8.6.	TEMPERATURA.....	46
5.9.	PARÁMETROS ANALÍTICOS.....	48
5.10.	CROMATOGRAFÍA .....	48
5.11.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIENCIA (UHPLC).....	49
5.12.	CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT).....	51
5.13.	PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES.....	56
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	58
6.1.	REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTÁNDAR .....	58
6.2.	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS EN UHPLC-UV .....	58
6.3.	ESPECIFICACIONES DE LA FIBRA HUECA.....	59
6.4.	CONDICIONES DE MICROEXTRACCIÓN DE LA HF-SBME .....	59
6.5.	PROCEDIMIENTO DE LA HF-SBME.....	61
7.	CAPÍTULO II: CUANTIFICACIÓN BENZODIACEPINAS.....	62

7.1.	FIBRA HUECA COMO BARRA DE SOLVENTE.....	62
7.1.1.	EFFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN DE LA MUESTRA...	62
7.1.2.	EFFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EXTRACCIÓN .....	63
7.1.3.	EFFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN PARA LA HF-SBME .....	63
7.1.4.	EFFECTO DE LA ADICIÓN DE SAL .....	64
7.2.	RECTA DE CALIBRACIÓN.....	67
7.3.	ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA DIAZEPAM .....	69
7.3.1.	CIFRAS DE MÉRITO DEL MÉTODO .....	71
7.4.	ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES .....	75
7.5.	RESULTADOS BENZODIACEPINAS.....	79
7.6.	MICROEXTRACCIÓN DE MUESTRAS REALES PTAR HOSPITAL.....	80
8.	CAPÍTULO III: CUANTIFICACIÓN DE COT RELACIONADO CON PRESENCIA DE FENOLES .....	83
8.1.	CONDICIONES CARBONO ORGÁNICO TOTAL – COT .....	83
8.2.	FIBRA HUECA COMO BARRA DE SOLVENTE.....	85
8.3.	REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTÁNDAR .....	85
8.4.	MUESTRAS .....	86
8.4.1.	MUESTRAS DE FUENTE SUPERFICIAL AFECTADA POR DECARGAS INDUSTRIALES.....	86
8.4.2.	MUESTRAS DE PTAR HOSPITAL RED PÚBLICA.....	86
8.5.	CROMATOGRAFÍA.....	87
8.5.1.	CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD).....	87
8.5.2.	CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS EN UHPLC-UV.....	88
9.	COMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS.....	92
10.	CONCLUSIONES .....	90

10.1. RECOMENDACIONES.....	92
11. BIBLIOGRAFÍA.....	95
12. ASISTENCIA A EVENTOS.....	116
12. PUBLICACIONES.....	117
13. ANEXOS.....	118
13.1. ANEXO 1. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA FLUNITRAZEPAM.....	118
13.2. ANEXO 2. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA NITRAZEPAM.....	119
13.3. ANEXO 3. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA TEMAZEPAM.....	120

## LISTA DE FIGURAS

Ilustración 1. Estructura general de las benzodiazepinas. ....	27
Ilustración 2. Estructura general de las benzodiazepinas. ....	28
Ilustración 3. Estructura molecular de interés: A. Fenol, B. Pirocatecol y C. Hidroquinona. ....	32
Ilustración 4. Publicaciones sobre preparación de muestras en los últimos años. Fecha de acceso: 15/02/2019. ....	35
Ilustración 5. Publicaciones sobre contaminantes de preocupación emergente en los últimos años. Fecha de acceso: 15/02/2019. ....	36
Ilustración 6. (A) Difusión de las moléculas de interés a través de la fibra. (B) Fibra hueca en dos fases. (C) Fibra hueca en tres fases ....	41
Ilustración 7. Esquema de funcionamiento de un analizador de combustión para carbón orgánico total COT. ....	54
Ilustración 8. Planta de tratamiento de Aguas Residuales de un Hospital de Salud Pública. ....	57
Ilustración 9. Micrografía de la fibra hueca accurel PP 300/1200 realizada con un microscopio de barrido electrónico SEM. ....	59
Ilustración 10. Procedimiento de la HF-SBME: 1-acondicionamiento fibra 2-sellamiento extremo e introducción de pin 3-llenado del lumen con 1-octanol 4-extracción en modo solvent bar 5-recuperación extracto. ....	61
Ilustración 11. Porcentajes de recuperación de los experimentos. ....	65
Ilustración 12. Cromatogramas superpuestos del método de microextracción con estándar de BZD [ $5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ ]. ....	65
Ilustración 13. Superficie de respuesta Nitrazepam. ....	66
Ilustración 14. Superficie de respuesta Temazepam. ....	66
Ilustración 15. Superficie de respuesta Diazepam. ....	67
Ilustración 16. Curva de calibración para las 4 benzodiazepinas. ....	68
Ilustración 17. Curva de calibración Carbono Orgánico Total. ....	77
Ilustración 18. Curva de calibración Nitrógeno Total. ....	77
Ilustración 19. Comparación benzodiazepinas. ....	79

Ilustración 20. Resultados de microextracción de una mezcla de los estándares de benzodiazepinas (0,5 mg.L <sup>-1</sup> ). .....	80
Ilustración 21. Cromatograma microextracción de benzodiazepinas en afluente PTAR Hospital.....	81
Ilustración 22. Cromatograma microextracción de benzodiazepinas en efluente PTAR Hospital.....	82
Ilustración 23. Equipo Teledyne Innovatek Tekmar.....	83
Ilustración 24. Montaje HF-SBME mezcla Fenoles 1-Octanol, 30 minutos, 700 rpm, 30°C. ....	86
Ilustración 25. Análisis preliminar en HPLC-DAD de una mezcla de estándar de Fenoles Cromatografía Líquida. ....	87
Ilustración 26. Cromatograma de la mezcla estándar de 100 µg mL <sup>-1</sup> de compuestos fenólicos y muestra después de descarga de vinazas a fuente superficial. ....	88
Ilustración 27. Cromatogramas superpuestos de una mezcla estándar de compuestos fenólicos (50 mg.L <sup>-1</sup> ) y muestra después de descarga de vinazas a fuente superficial. ....	90
Ilustración 28. Cromatograma microextracción de fenoles en afluente PTAR. ....	90
Ilustración 29. Cromatograma microextracción de fenoles en efluente PTAR. ....	91

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos según el DECRETO 3930 DE 2010 del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. ....	22
Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales .....	24
Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de algunas Benzodiazepinas. ....	29
Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de algunos fenoles. ....	33
Tabla 5. Diseño de experimento N + (N -1) .....	60
Tabla 6. Datos curva de calibración para las 4 benzodiazepinas. ....	68
Tabla 7. Características analíticas del método para la HF-SBME. ....	69
Tabla 8. Análisis de la varianza (Variable Diazepam). ....	70
Tabla 9. Curva de calibración Carbono Orgánico Total. ....	76
Tabla 10. Datos curva de calibración Nitrógeno Total. ....	77
Tabla 11. Resultados Carbono Orgánico Total ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) muestras reales. ....	78
Tabla 12. Resultados Nitrógeno Total ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) muestras reales. ....	78
Tabla 13. Curva de Calibración Carbono Orgánico Total. ....	84
Tabla 14. Resultados Carbono Orgánico Total en muestras. ....	85
Tabla 15. Gradiente de concentraciones para el análisis de fenoles. ....	89
Tabla 16. Aplicación de otras técnicas para el análisis de benzodiazepinas y compuestos fenólicos en matrices acuosas y biológicas. ....	89

## ACRÓNIMOS

BZD: Benzodiazepinas.

CH<sub>3</sub>CN: Acetonitrilo.

CNT: *Nanotubos de Carbono*.

COPs: Compuestos Orgánicos Persistentes.

FC: Factor de concentración.

HF: Fibra hueca.

HF-SBME: Microextracción como barra de solvente con fibra hueca.

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>: Ácido Fosfórico.

LLE: Extracción líquido-líquido.

LOD: Límite de detección.

LPME: Microextracción en fase líquida.

MOFs: *Metal organic frameworks*

ppb: Partes por billón (ng mL<sup>-1</sup>).

ppm: Partes por millón (µg mL<sup>-1</sup>).

ppt: Partes por trillón (pg mL<sup>-1</sup>).

R<sup>2</sup>: Coeficiente de regresión.

RSD: Desviación estándar relativa.

SBME: Microextracción como barra de solvente.

SPE: Extracción en fase sólida.

SPME: Microextracción en fase sólida.

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alta eficiencia.

UV: Ultravioleta.

%R: Porcentaje de recuperación.

## RESUMEN

Los contaminantes emergentes han ido ganando gran interés, no solo para las entidades gubernamentales que protegen y velan por el cuidado del ambiente sino también para las instituciones que se dedican a procesos de tratamientos de aguas o estudios de las mismas. Por esta razón, la detección de moléculas tanto orgánicas como inorgánicas en matrices acuosas y que adicionalmente presentan bajas concentraciones de los analitos de interés, crea la necesidad del desarrollo de técnicas analíticas que sean selectivas, sensibles y específicas, además deben estar enmarcadas dentro de una conciencia ambiental o la llamada química verde. Teniendo en cuenta lo anterior, se ha desarrollado un método de microextracción usando una fibra hueca de polipropileno hidrofóbica y porosa, funcionalizada como agitador (HF-SBME), la cual utiliza volúmenes pequeños de solvente orgánico el cual es introducido dentro de la fibra. Con este mecanismo, el proceso de preparación de muestra se realiza en un solo paso, se alcanzan altos niveles de eficiencia analítica, consiguiendo facilitar la transferencia de analito. Asimismo, la fibra permite a su vez la limpieza de la muestra ya que solo permite el paso de la o las moléculas de interés y se presenta un alto nivel de preconcentración, permitiendo alcanzar la sensibilidad y la selectividad necesarias para la medición. Finalmente, se concluyó que nuestro sistema HF-SBME presenta buenos resultados para la extracción de las moléculas de interés, al obtener porcentajes de recuperación entre el 87% y el 92%. Para los análisis de las benzodiazepinas se obtuvieron LOD como se muestran a continuación: Diazepam:  $0,125 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , Temazepam:  $0,112 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , Flunitrazepam:  $0,218 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  y Nitrazepam:  $0,124 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Para el caso de los fenoles se identificó concentraciones de Carbón Orgánico Total en un rango de  $28.3 - 63.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , muy por encima de la norma colombiana de vertimientos ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). El porcentaje de recuperación de dichos compuestos oscila entre el 85% y el 96%.

# 1. INTRODUCCIÓN

Los “contaminantes emergentes” son un grupo de compuestos que actualmente no cuentan con una regulación estricta, pero con una tendencia a tenerla por la incidencia que estos pueden tener en la salud. Algunos ejemplos de dichos compuestos son: productos de uso antropogénico (productos de aseo, farmacéuticos, productos de cuidado personal), aditivos de la gasolina, antiséptico, aditivos industriales, medicamentos, hormonas y subproductos de desinfección del agua. Los contaminantes emergentes han ido tomando cada vez más importancia por las diferentes implicaciones que estos tienen para la salud humana, ya que el proceso de remoción de estos se hace cada vez más difícil y complicado para las plantas de tratamiento que no fueron diseñadas para tal labor [1-3]. Algunos de estos compuestos son los productos farmacéuticos, productos de cuidado personal, surfactantes, aditivos industriales, plastificantes, plaguicidas, subproductos de desinfección y una gran cantidad de compuestos químicos los cuales toman importancia ya que a pesar de encontrarse en bajas concentraciones pueden llegar a alterar diversos procesos o afectar la salud humana [4-7].

De los contaminantes emergentes se conoce poco, hay poca información sobre su impacto, tratamiento y presencia en las fuentes hídricas y su impacto en la salud humana. En la mayoría de los casos son contaminantes no regulados, pero que posiblemente estarán sujetos a regulación muy pronto, esto permite que las investigaciones sobre los contaminantes de preocupación emergente cada vez sean más llamativas para la comunidad científica, buscando así estrategias que

permitan un análisis de diferentes matrices de una manera más amigable para el ambiente y con el menor número de tratamientos y pasos previo al análisis cromatográfico [8-10].

Desde otra perspectiva, las técnicas de preparación de muestras han permitido mejorar las condiciones con las cuales se llevan a cabo procesos de extracción de muestras, de forma tal que éstas puedan ser acondicionadas a las características con las cuales se desea trabajar. Asimismo, permite una preconcentración del analito de interés, ya que dichos compuestos se encuentran en las matrices de estudio en niveles traza, por otro lado permite llevar procesos más limpios y donde se pueden tener menos pasos en el proceso, se usan menos solventes orgánicos promoviendo así la química verde y sobre todo permitiendo que el analista pueda exponerse a menores riesgos por contacto con cantidades elevadas de solvente y por último, reducir el tiempo de análisis [11-14].

Por esta razón, los procesos miniaturizados de extracción permiten trabajar con pequeñas cantidades de muestra analizar contaminantes emergentes que se encuentran en concentraciones muy bajas, dichos contaminantes son susceptibles para un análisis utilizando dichos procesos de microextracción, proporcionando no solo un tratamiento de la muestra mucho más sencillo comparado con otros análisis, sino que además se pueden llevar a cabo análisis mucho más rápidos y sobre todo con una conciencia sobre el cuidado del ambiente.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un método de microextracción con fibra hueca en modo barra de solvente (HF-SBME) para el análisis de contaminantes emergentes (benzodiazepinas y compuestos fenólicos) en muestras de aguas residuales por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de ultravioleta.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Optimizar el método de microextracción en fase líquida (HF-SBME) mediante el estudio de las condiciones críticas de extracción en la determinación de benzodiazepinas y compuestos fenólicos por separado.
- Validar las características analíticas del método UHPLC-UV usando muestras dopadas con la mezcla de los analitos de interés para evaluar los parámetros: selectividad, especificidad, repetitividad, reproducibilidad, linealidad, sensibilidad, robustez y recuperación.
- Aplicar las metodologías analíticas desarrolladas, concretamente la técnica de HF-SBME a muestras de aguas residuales para el análisis de benzodiazepinas y de fenoles por separado, para ser comparadas con técnicas ya estudiadas convencionalmente.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

#### **3.1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA**

Actualmente los contaminantes emergentes representan un 70 % del total de compuestos y moléculas químicas vertidos a las fuentes hídricas, suelos y aire [15-16]. Si a esto se suma el aumento exponencial de su uso masivo que sobrepasa las 1000 toneladas al año y se incrementa insosteniblemente debido al desconocimiento o conocimiento parcial de sus efectos a la salud y al medio ambiente [1,17]. Además, las concentraciones de estos compuestos en las diferentes matrices a las que llegan por su descontrolado vertimiento son de traza y ultrazas. Circunstancia que agrava aún más la ya difícil situación de la falta de información sobre su biodisponibilidad y efectos secundarios en los ecosistemas (propagación de bacterias resistentes hacia aguas municipales). Así puesto el escenario, los retos analíticos respecto del análisis de contaminantes emergentes en matrices complejas demanda del desarrollo de técnicas analíticas que procuren el aislamiento del analito, la limpieza de la matriz y la preconcentración de la muestra todo esto reunido en su solo paso, y que su compatibilidad con sistemas de análisis habituales en los laboratorios sea alta, así es como responden los métodos modernos de análisis y preparación de muestras o técnicas de microextracción. Actualmente, las investigaciones en química han aumentado las exigencias que se tienen en los diferentes procesos y métodos químicos de análisis, poder lograr que en un solo paso se alcance no solo el aislamiento y simplificación de la matriz, sino también la limpieza de la muestra de posibles interferencias y para poder mejorar los resultados cuando hablamos de

preconcentración del analito de interés, estos son algunos de los objetivos y metas que cualquier método de preparación de muestra procura obtener, ampliando el rango de análisis a moléculas que poco a poco van tomando mayor interés entre las personas encargadas del proceso de análisis de muestra sobre todo en procesos donde la concentración se encuentra en niveles trazas, asimismo el alto impacto que generan no solo en la salud y el medio ambiente sino que vienen con un factor que influye de manera negativa y es la complejidad de las matrices en las que se hallan propiciando así un espacio de mayor exigencia.

Con el fin de poder darle cumplimiento a las exigencias que actualmente los procesos de investigación demandan, se evidencia además el cambio que tienen los procesos de microextracción los cuales además de ser versátiles a la hora del análisis, permite montajes simples y con solventes amigables con el medio ambiente dando prioridad a la llamada química verde. El Grupo de Investigación GICTA va muy de la mano con procesos relacionados con la química verde y ha generado algunos desarrollos en esta temática. De forma particular, en este estudio se desarrolló un método en microextracción en fase líquida usando una fibra o fibra hueca de polipropileno, hidrofóbica y porosa. Aquí concretamente se ha logrado disminuir el número de pasos en la preparación de la muestra y se ha aumentado la preconcentración del analito para luego poder analizar en equipos instrumentales de rutina (cromatógrafo de gases, líquidos, etc.).

## 4. JUSTIFICACIÓN

Los contaminantes emergentes o de preocupación emergente tienen un uso masivo y sin ninguna regulación, por otra parte, no se conoce una percepción real del daño que podrían presentar los consumidores debido a que son compuestos de uso diario y para el cuidado personal, la salud, la protección, además, dichos compuestos están en cantidades traza y ultratrazas en el agua, haciendo que sean difíciles de detectar con los métodos e instrumentos corrientemente utilizados. Los compuestos objetos de este estudio son compuestos que alcanzan las fuentes superficiales y subterráneas debido a la dispersión, escorrentía, lixiviación y lavado del suelo en aquellas zonas donde las fábricas y los desechos biológicos inciden dentro de un paisaje natural afectando así las fuentes naturales, lo cual genera afectaciones para la calidad de vida de los seres humanos. Es así como los métodos analíticos e instrumentales desempeñan un rol cada vez más importante en la mejora de procesos, y la preservación de la salud humana, de allí el interés por contribuir al desarrollo de dichos estudios.

De acuerdo con los principios fundamentales de la química analítica este proyecto busca desarrollar y mejorar un método de microextracción en fase líquida que permita la determinación de compuestos fenólicos y benzodiazepinas por separado a partir de muestras acuosas, compuestos que han ido tomando un gran interés por sus aportes como contaminantes emergentes en matrices acuosas. Teniendo en cuenta los parámetros medioambientales amigables y de química verde, que aumenten la sensibilidad de la técnica de microextracción minimizando el uso de solventes altamente tóxicos empleados en técnicas convencionales de

preparación de muestras, como la extracción en fase líquida (LLE) y extracción en fase sólida (SPE); de tal manera que sea posible entonces analizar diferentes aspectos sobre la composición y naturaleza química de determinados compuestos, ahorrar costos y evitarse un gran número de dificultades si se realiza un buen proceso de preparación de muestra. Implementar la técnica de microextracción en el proceso de recuperación, limpieza y concentración, de cuatro (4) benzodiacepinas y tres (3) fenoles, como nuevos representantes de los mencionados contaminantes de preocupación emergente, que poco a poco han ido tomando fuerza para el análisis de matrices acuosas por su aporte a la contaminación de las fuentes hídricas.

## **5. CAPÍTULO I: GENERALIDADES**

### **5.1. AGUAS RESIDUALES**

Con el paso de los años el ser humano se ha preocupado cada vez más por los procesos de eliminación de los residuos (excretas, desechos de alimentos y residuos de producción). Por esta razón, es de vital importancia verificar cuáles son los resultados del manejo que se le dan a este tipo de elementos y cuáles han sido los efectos que generan el uso de los mismos [18-21]. Por definición, se dice que las aguas residuales son aquellas que ya han tenido una intervención por alguna actividad humana y que en consecuencia de dicha intervención requiere un tratamiento previo para poder recuperar su calidad, posterior a esto pueden ser reusadas, ya sea a través del sistema de alcantarillado o por vertimiento a las fuentes hídricas [7,21].

El agua dulce tanto de ríos y de lagos equivalen al 0.01 % aproximadamente del total del agua del planeta. Las aguas retenidas en el hielo glaciar equivalen al 75 % de las aguas dulces de la Tierra, cantidad suficiente para llenar el mar Mediterráneo alrededor de 10 veces. El resto se encuentra en los lagos de agua dulce, los arroyos, los acuíferos, y en los organismos vivos. Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de agua dulce sólo una pequeña parte está disponible para cubrir las necesidades del ser humano y un porcentaje considerable de su uso se destina a la producción agrícola [16, 22-23].

Desafortunadamente, gran parte de la población mundial sufre enfermedades relacionadas con el agua esto debido a que un porcentaje de esta se encuentra contaminada. A pesar, del arduo trabajo que están haciendo los países

industrializados para mitigar el impacto de la contaminación en el agua, los productos químicos y biológicos (en su gran mayoría tóxicos) siguen llegando a los diferentes afluentes (ríos, lagos, arroyos), deliberada o accidentalmente. Las aguas residuales, aun sin depurar o sin ser tratadas, se siguen vertiendo en los cuerpos de agua generando un impacto ambiental considerable no solo en su fauna y flora sino en su entorno [24-27].

Las masas hídricas (ríos, corrientes subterráneas, lagos, estuarios, mar) han sido incapaces de neutralizar y de remediar la carga contaminante que los residuos producidos por aquellas zonas que están densamente pobladas y que a su vez cuentan con un desarrollo industrial que potencia la producción de contaminantes que en su mayoría van a dichas fuentes. En consecuencia, pierden su calidad ya que cambia su apariencia física y afecta directamente la vida acuática, generando problemas al equilibrio ecológico que es de vital importancia para la subsistencia de diversas especies marinas (fauna y flora). En ese orden de ideas, la calidad del agua se ve deteriorada descartando cualquier tipo de aprovechamiento ya sea como fuente de abastecimiento, vía de transporte o en otro sentido como fuente de energía. Las aguas residuales se clasifican teniendo en cuenta el lugar de donde se originan, es decir, aguas residuales domésticas, industriales y municipales [28].

Las aguas residuales pueden clasificarse con base en diversos orígenes:

- 5.1.1. AGUAS RESIDUALES DOMÉSTICAS O AGUAS NEGRAS:** proceden de la excreción (heces y orina), todo lo relacionado con el aseo del hogar aseo personal. Estos residuos pueden contener gran cantidad de

materia orgánica y adicional a eso gran carga de microorganismos, así como restos de jabones, detergentes, lejía y grasas.

**5.1.2. AGUAS BLANCAS:** son aquellas procedentes de la atmósfera, ya sea lluvias, nieve o hielo o también del riego y limpieza de calles, parques y lugares públicos.

**5.1.3. AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES:** son el resultado de procesos realizados en fábricas y establecimientos industriales los cuales manejan, producen o requieren de aceites, detergentes, antibióticos, ácidos y grasas u otros productos y subproductos de origen mineral, químico, vegetal o animal. La composición de este tipo de aguas puede variar considerando el tipo de actividad de dichas empresas.

**5.1.4. AGUAS RESIDUALES AGRÍCOLAS:** van de la mano de las producciones agrícolas, serán el resultado de aquellos procesos donde se utiliza el agua como medio de producción en zonas urbanas.

El estudio de las aguas residuales toma importancia al ser un vector de transmisión de distintas enfermedades, ya que su carga de contaminantes es diversa (debido a la gran cantidad de sustancias, algunas de ellas tóxicas) y algunos microorganismos que se pueden encontrar [6, 7, 20, 29,30].

#### **5.1.5. INCONVENIENTES OCASIONADOS POR EL VERTIDO DE AGUAS RESIDUALES**

Adicional a esto, las aguas residuales debido a su composición generan diversos inconvenientes para quienes se ven inmersos dentro de este tipo de afluentes o aquellas regiones aledañas, algunos de estos inconvenientes son:

**5.1.6. MALOS OLORES Y SABORES:** los cuales son el resultado tanto de la descomposición de la materia orgánica que es vertida en el cuerpo de agua, así como aquella que proviene de procesos naturales como el crecimiento de microorganismos, plantas acuáticas, hongos, etc.

**5.1.7. TOXICIDAD:** es el resultado del vertimiento de sustancias a las fuentes de agua, estos compuestos generan procesos de oxidación, lo cual disminuye la concentración de oxígeno en dicho medio, por lo tanto, se favorecen las condiciones anóxicas perjudicando la vida acuática.

**5.1.8. COMPUESTOS ORGÁNICOS:** las fuentes pueden variar, pero en ambos casos los vertimientos no controlados de compuestos orgánicos generan en los cuerpos de agua un problema de contaminación que antes se creía ocasionaban pocos efectos en la vida humana. Actualmente tanto los residuos industriales como domésticos producen efectos adversos en la salud de aquellos que están en contacto con aguas residuales. Un ejemplo claro de este tipo de compuestos son los hidrocarburos, y más específicamente, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, donde muchos de ellos poseen producen cáncer. En procesos de cloración del agua otros de los compuestos que reacción al entrar en contacto con el cloro son los compuestos fenólicos lo cual provoca problemas de olor y sabor con gran intensidad. Otro ejemplo claro son los organoclorados, organofosforados y trihalometanos usados en gran parte en procesos agrícolas e industriales o formados por reacción del cloro usado como desinfectante con la materia orgánica, respectivamente.

**5.1.9. COMPUESTOS INORGÁNICOS Y MINERALES:** la minería y los productos químicos inorgánicos, al igual que los compuestos orgánicos, afectan directamente al ser humano, puesto que gran parte del alimento consumido por los seres vivos proviene del agua, generando intoxicaciones, enfermedades que pueden ser graves y en algunas ocasiones letales. Por otro lado, el tratamiento de aguas contaminadas por compuestos inorgánicos eleva los costos y el proceso de eliminación se hace más complejo.

Existen un sin número de sustancias químicas las cuales poseen un alto nivel de toxicidad y que son utilizadas en gran medida en el sector industrial, algunas de estas sustancias químicas son: los pesticidas, colorantes de textiles, los fármacos, los plásticos, los surfactantes, los explosivos y los fenoles. La presencia de estos últimos en aguas residuales puede ocasionar intoxicaciones corrosivas por la ingestión de compuestos tales como el fenol, el creosol, el guayacol y el naftol; este tipo de intoxicación se caracteriza por quemaduras en las membranas mucosas, debilidad, palidez, edema pulmonar, convulsiones e insuficiencia respiratoria, circulatoria y renal y, en raras ocasiones, estenosis esofágica como complicación de las lesiones tisulares [32]. Adicional a esto se debe tener en cuenta la calidad del agua, es decir, que parámetros fisicoquímicos hacen que el agua sea apta o no para el consumo humano. A continuación, se muestran algunos factores que se deben evaluar a la hora de poder verificar la calidad de los cuerpos de agua [31-34].

Características físicas y químicas:

- **FÍSICAS:** Algunas de las características que se deben evaluar son: la turbiedad, sólidos solubles e insolubles, color, olor, sabor y temperatura.
- **QUÍMICAS:** Algunas características que se deben tener en cuenta son: aceites y grasas, agentes espumantes, alcalinidad, moléculas inorgánicas, materia orgánica (DBO, DQO, COT), plaguicidas y pH.

Por otro lado, según lo establecido en el **DECRETO 3930 DE 2010** del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial y la **RESOLUCIÓN 0631 DE 2015** del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible [35-36], los parámetros que se deben evaluar son los que se relacionan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Parámetros fisicoquímicos según el **DECRETO 3930 DE 2010** del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.

• pH	• Grasas y aceites
• Temperatura	• Detergentes
• Sólidos totales disueltos	• Fenoles
• Sólidos suspendidos totales	• Cloruros
• Turbidez	• Nitratos
• Color	• Sulfatos
• Oxígeno disuelto	• Cianuros
• Carbono orgánico total	• Hierro
• Metales pesados	• Aluminio
• Demanda química de oxígeno	• Cobre, Zinc
• Demanda bioquímica de oxígeno	• Ácido sulfúrico

En la tabla 1 se muestran algunos parámetros fisicoquímicos que se establecen en el **Decreto 3930 del 25 de octubre de 2010**, en el cual se establecen las disposiciones relacionadas con los usos del recurso hídrico, el ordenamiento del recurso hídrico y los vertimientos al recurso hídrico, al suelo y a los alcantarillados. Dicho decreto aplica a las autoridades ambientales competentes, a los generadores de vertimientos y a los prestadores del servicio público domiciliario de

alcantarillado. Asimismo, en la **Resolución 0631 del 17 de marzo de 2015** del Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible; se disponen los parámetros y los valores límites máximos en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público.

Los parámetros de calidad de aguas residuales industriales que tienen importancia en los vertimientos son aquellos que se enmarcan dentro del análisis del oxígeno disuelto (OD), la materia orgánica, los sólidos disueltos, las bacterias, los nutrientes, el pH y los compuestos químicos tóxicos, entre los que se encuentran los compuestos orgánicos volátiles, los metales y los pesticidas.[36] Es importante aclarar que las muestras de este estudio se analizaron por triplicado, transportadas y preservadas según los criterios del Standard Methods de la APHA/AWWA WEF [37].

Cabe resaltar que la importancia del OD para la vida acuática es fundamental ya que al presentarse concentraciones por debajo de los 4 – 5 mg L<sup>-1</sup>, se pueden presentar consecuencias negativas en determinadas especies. En la tabla 2, podemos encontrar los parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales, los cuales permiten reconocer como se ven afectadas las fuentes de agua cuando reciben este tipo de desechos [38-41]. Por otro lado, se pueden presentar sedimentaciones en los cuerpos de agua de aquellos sólidos que se encuentran suspendidos, asimismo afectan la turbiedad de las fuentes de agua, lo cual puede dar lugar a un enriquecimiento bentónico, toxicidad y demanda de oxígeno de los sedimentos [40-41].

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las aguas residuales [38-41].

PARÁMETRO	DESCRIPCIÓN	MÉTODO/ INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	VALORES TOLERABLES
DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno)	La DBO <sub>5</sub> es la cantidad de oxígeno no disuelto consumido en una muestra de agua por los microorganismos cuando se descompone la materia orgánica a 20 °C en un periodo de 5 días. Mide sin dificultad el carbono orgánico biodegradable.	Método directo/titulometría  Método de dilución/Oxitop	Agua potable  1 mg L <sup>-1</sup> .
DQO (Demanda Química de Oxígeno)	La DQO determina la cantidad de oxígeno necesario para oxidar químicamente las sustancias orgánicas en el agua o en agua residual. El valor de la DQO es siempre superior al de la DBO <sub>5</sub> porque muchas sustancias orgánicas pueden oxidarse químicamente, pero no biológicamente.	Medición del exceso de agente oxidante/  Titulométrico- Espectrofotometría	
Temperatura	Magnitud del grado de calor del agua.	Termómetro.	Menor a 36 °C
pH	El pH se define como el logaritmo negativo (base 10) de la actividad química del ion hidrógeno y es adimensional.	Método potenciométrico/pHmetro	6 – 9
Sólidos suspendidos	La determinación de sólidos suspendidos es de gran valor en el análisis de aguas contaminadas; es uno de los principales parámetros para evaluar la concentración de las aguas residuales domésticas y para determinar la eficiencia de las unidades de tratamiento.	Método gravimétrico/sistema  de sólidos suspendidos	100 mg L <sup>-1</sup>
Grasas y aceites.	Altamente estables, proceden de desperdicios alimentarios en su mayoría. Son todas aquellas sustancias de naturaleza lipídica, que, al ser inmiscibles en el agua, van a permanecer en la superficie dando lugar a la aparición de natas y espumas.	Método de extracción  soxhlet/equipo soxhlet	0 mg L <sup>-1</sup>
Carbón orgánico total	Es la cantidad de contenido de carbón orgánico presente en las muestras acuosas, está asociado a presencia de materia orgánica biodegradable y refractaria proveniente esta última de compuesto químicos orgánicos no biodegradables	Oxidación o  combustión/Analizador de  combustión	5 mg L <sup>-1</sup>

## 5.2. TIPOS DE CONTAMINANTES

Cuando se habla de aguas residuales hay que considerar sus contaminantes los cuales son de diversos tipos y de diversos orígenes [38-41]. En términos generales, la contaminación de los cauces naturales tiene origen en:

- a. Vertimientos de aguas residuales domésticas.
- b. Vertimientos aguas residuales industriales.
- c. Contaminación difusa (lluvias, lixiviados, escorrentía).

**5.2.1 CLASIFICACIÓN DE LOS CONTAMINANTES:** Los vertimientos domésticos que llegan a las fuentes hídricas pueden contener diversos tipos de contaminantes como:

**5.2.1.1 Contaminantes orgánicos:** Este tipo de sustancias están constituidos principalmente por átomos de carbono, oxígeno, hidrógeno y nitrógeno. La industria agroalimentaria es una de las principales fuentes de producción de este tipo de contaminantes (mayoritariamente en aguas residuales domésticas e industriales). Los compuestos orgánicos que pueden aparecer en las aguas residuales son:

- **Proteínas**
- **Aceites y grasas**
- **Tensoactivos, fenoles, fármacos, compuestos organoclorados y organofosforados**

**5.2.1.2 Contaminantes inorgánicos:** Poseen diferente naturaleza y su origen varía según el tipo de proceso, por ejemplo: sales, óxidos, ácidos y bases inorgánicas, metales. Aparecen en cualquier tipo de agua

residual, aunque son más abundantes en aquellos que provienen de la industria.

a. Otros contaminantes habituales:

- **Arenas**
- **Residuos con requerimiento de oxígeno**
- **Nitrógeno y fósforo**
- **Agentes patógenos**

### **5.3. MOLÉCULAS DE INTERÉS (ANÁLISIS)**

#### **5.3.1. BENZODIACEPINAS**

Las benzodiazepinas (BZD) son las drogas psicotrópicas más ampliamente utilizadas en todo el mundo. Algunas de las propiedades terapéuticas de las benzodiazepinas es que pueden ser ansiolíticas, funcionan como sedantes, somníferos, anticonvulsivas, diastólicas y como relajante muscular [42-44]. Las benzodiazepinas son drogas hipnótico-sedantes las cuales presentan un costo muy bajo; esto permite adquirirlas de manera rápida y sencilla [45]. Las benzodiazepinas están constituidas por un anillo hexagonal bencénico (A) unido a un anillo heptagonal diazepina (B). Sin embargo, dado que todas las benzodiazepinas importantes contienen además un anillo 5-arilo como sustituyente (C), como se muestra en la figura 1.

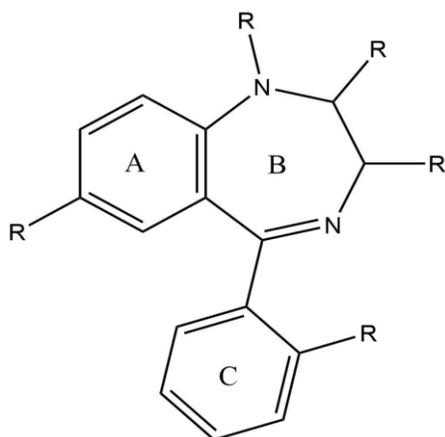


Ilustración 1. Estructura general de las benzodiazepinas.

El estudio de las benzodiazepinas se ha ido incrementando debido a que su uso pasó de ser netamente medicinal a usar como droga de abuso [46]. El abuso crónico puede causar adicción y disquinesia tardía. Cuando se tiene dosis más elevadas puede llevar a padecer somnolencia, mareo, relajación muscular, letargo, coma e inclusive la muerte [47]. Los efectos que generan las benzodiazepinas pueden llegar a durar entre 4 y 8 horas, esto va a depender del tipo de benzodiazepina que se use. Muchas de las benzodiazepinas comparten una ruta metabólica y se excretan en forma de oxazepam (figura 2) y glucurónido en la orina [42, 45,48]. En la tabla 3, se pueden verificar algunas propiedades fisicoquímicas de algunas benzodiazepinas de interés para el análisis de aguas residuales y contaminantes emergentes.

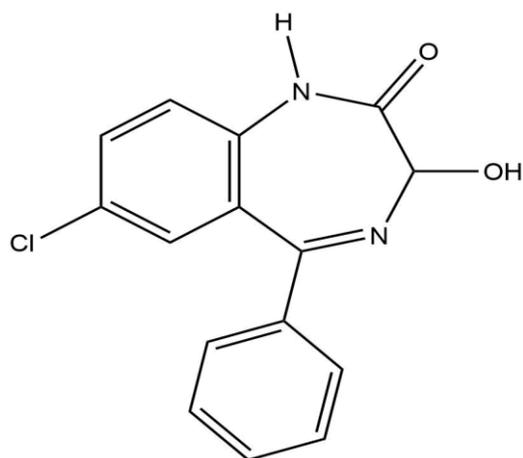
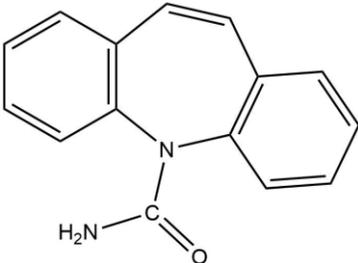
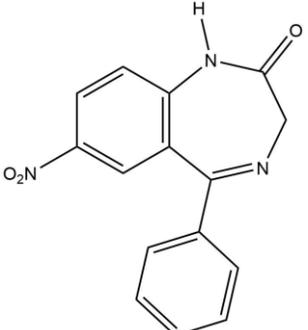
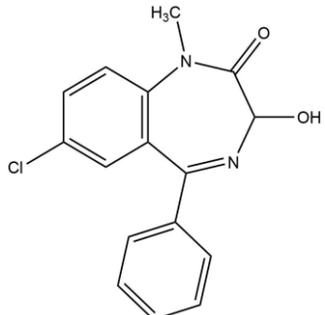
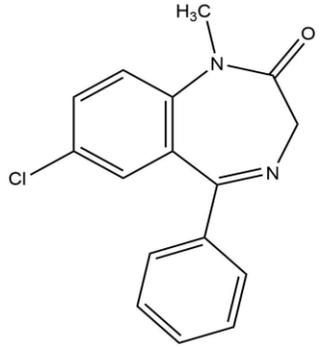


Ilustración 2. Estructura general de las benzodiazepinas.

En la actualidad los medicamentos se han convertido en material de fácil acceso a la hora de comercializar productos que generen algún tipo de satisfacción o reacción de euforia, relajación y letargo [49]. Las benzodiazepinas gracias a su efecto en el sistema nervioso central (SNC) han sido blanco de múltiples usos delictivos tales como accidentes de conducta criminal, peleas de trabajo y de transporte, robo, delitos sexuales y muertes por sobredosis accidental o criminal. Su abuso se ha convertido en un fenómeno social, agravado por problemas asociados al tráfico regional de drogas, el desempleo y el conflicto interno colombiano [50].

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de algunas Benzodiazepinas.

NOMBRE	ESTRUCTURA	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS
<b>Carbamacepina</b>		<p><b>Nombre IUPAC:</b> 5H-dibenzo-[b,f]-azepina-5-carboxamida.</p> <p><b>Fórmula:</b> C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O</p> <p><b>Peso molecular:</b> 236,27 g mol<sup>-1</sup></p> <p>pKa:13,9</p>
<b>Nitrazepam</b>		<p><b>Nombre IUPAC:</b> 7-nitro-5-fenil-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2(3H)-ona.</p> <p><b>Fórmula:</b> C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub></p> <p><b>Peso molecular:</b> 281,3 g mol<sup>-1</sup></p> <p>pKa: 11,9</p>
<b>Temazepam</b>		<p><b>Nombre IUPAC:</b> 7-cloro-1,3-dihidro-3-hidroxi-1-metil-5-fenil-1,4-benzodiazepin-2-ona</p> <p><b>Fórmula:</b> C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>ClO<sub>2</sub></p> <p><b>Peso molecular:</b> 300,7 g mol<sup>-1</sup></p> <p>pKa: 10,68</p>
<b>Diazepam</b>		<p><b>Nombre IUPAC:</b> 7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona</p> <p><b>Fórmula:</b> C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>ClO</p> <p><b>Peso molecular:</b> 284,7 g mol<sup>-1</sup></p>

### 5.3.2.COMPUUESTOS FENÓLICOS

Una de las preocupaciones mundiales siempre ha sido aquella que corresponde a la contaminación de fuentes acuáticas por sustancias orgánicas e inorgánicas. Los fenoles son considerados no solo como subproductos no deseados sino que también como materia prima en numerosas industrias. Los fenoles, sus derivados y aquellos que contienen dos anillos aromáticos condensados (naftaleno, antraceno, etc.) pertenecen al grupo de contaminantes más tóxicos y comunes de la industria de plásticos, tintes y papel [23]. Para mencionar otro ejemplo claro de la producción de compuestos fenólicos es la biodegradación de ácidos húmicos, taninos y ligninas. Como se mencionó anteriormente, una de las mayores preocupaciones corresponde a aquellas que involucran el agua, es allí donde los productos de desechos que se generan a partir de la destilación alcohólica se convierten en un foco de interés para el análisis de las aguas residuales, es decir, dichos residuos o vinazas como se les denomina a estos subproductos terminan en las fuentes de agua generando impactos negativos en dicho medio. La flora y la fauna son los que reciben el mayor impacto debido a este tipo de contaminantes (desechos orgánicos) afectan los territorios por la cantidad de residuos que allí llegan. Dicho problema nace a partir de la producción de alcohol a partir de la miel final, es decir, por cada hectolitro de alcohol producido a partir de esta, se obtienen de manera adicional 15 hectolitros de vinaza como residuo, con una Demanda Química de Oxígeno (DQO<sub>5</sub>) que oscila entre 60 y 70 g L<sup>-1</sup> y un pH alrededor de 4. En el mismo sentido, la vinaza es vertida en las fuentes hídricas (ríos, lagos, presas y canales) sin ningún tipo de tratamiento contaminando de

esta manera las fuentes tanto superficiales como subterráneas produciendo de esta manera un impacto sobre el ambiente [8,23,51]. Estos compuestos son tóxicos y se sospecha de su efecto carcinógeno en humanos. Por este motivo, la Directiva de la Comunidad Europea (ECD) y en la Agencia de Protección Ambiental Americana (EPA) han compilado muchos de estos compuestos fenólicos debido a los problemas de salud que causan. Solo por mencionar una de las consecuencias que producen los compuestos antes mencionados es la emisión de olores y sabores desagradables e irritantes (aún en concentraciones de trazas), si los fenoles son ingeridos en concentraciones entre 10 a 240 mg L-1 por largo tiempo causan irritación bucal, diarreas y excreción de orina oscura, así como problemas en la visión [52]. Los compuestos fenólicos son sustancias químicas que contienen un anillo aromático bencénico, con uno o más grupos hidroxilos incluyendo derivados funcionales. Generalmente este tipo de compuestos químicos se encuentran en la naturaleza en forma de glicósidos, siendo solubles en agua y solventes orgánicos [25,53-54].

Los fenoles se utilizan en la industria como antioxidantes, productos químicos intermedios, desinfectantes, agentes de curtido, reveladores fotográficos y aditivos de lubricantes y gasolina. Se emplean ampliamente en las industrias de fotografía, petróleo, pinturas, explosivos, caucho, productos farmacéuticos y productos agrícolas. La fabricación de resinas fenólicas, la producción de bisfenol A y de caprolactama son 3 de los principales usos que tienen los compuestos fenólicos [53,55-56].

Un factor a resaltar de los dichas moléculas es su capacidad antioxidante. En primera instancia, permiten su oxidación fácilmente y por otro lado, impiden que los elementos como los metales sean catalizadores de las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad que el doblete electrónico del átomo de oxígeno interaccione con los electrones del anillo, lo que le confiere unas características especiales respecto al resto de alcoholes (figura 3). Adicionalmente, dichos compuestos pueden traer complicaciones e implicaciones a nivel nutricional ya que pueden actuar como quelantes (sobre todo los fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el hierro y el aluminio. En cuanto a sus características organolépticas, los taninos son conocidos por dar sensación de astringencia (p. ej., en el vino), ya que son capaces de unirse a las proteínas lubricantes de la saliva por enlaces de hidrógeno [53,55-56].

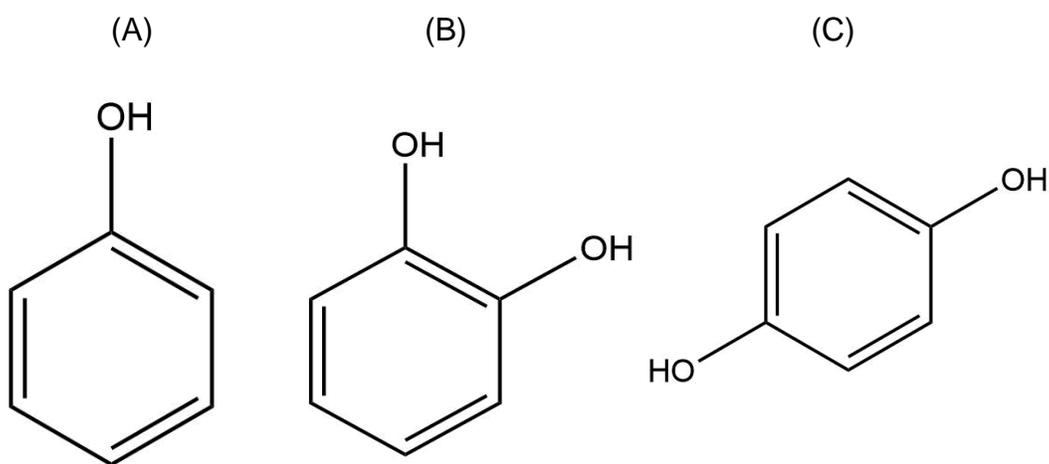
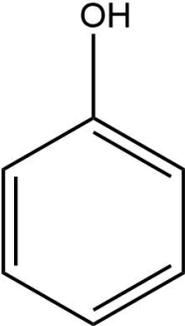
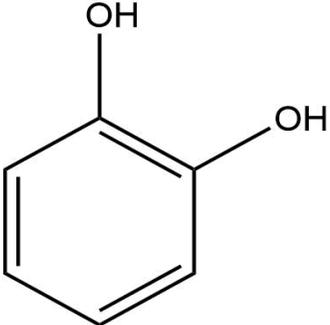
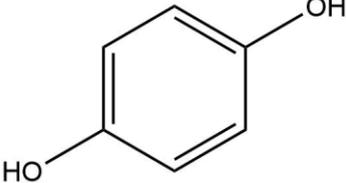


Ilustración 3. Estructura molecular de interés: A. Fenol, B. Pirocatecol y C. Hidroquinona. [9]

En la tabla 4, se pueden verificar algunas propiedades fisicoquímicas de algunos fenoles de interés para el análisis de aguas residuales y contaminantes emergentes.

Tabla 4. Propiedades fisicoquímicas de algunos fenoles.

NOMBRE	ESTRUCTURA	PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS
<b>Fenol</b>		<p><b>Nombre IUPAC:</b> Fenol</p> <p><b>Fórmula:</b> C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH</p> <p><b>Peso molecular:</b> 94,11 g mol<sup>-1</sup></p> <p><b>pKa:</b> 10,0</p>
<b>Pirocatecol</b>		<p><b>Nombre IUPAC:</b> 1,2-dihidroxibenceno.</p> <p><b>Fórmula:</b> C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub></p> <p><b>Peso molecular:</b> 110,037 g mol<sup>-1</sup></p> <p><b>pKa:</b> 9,5</p>
<b>Hidroquinona</b>		<p><b>Nombre IUPAC:</b> 1.4-dihidroxibenceno.</p> <p><b>Fórmula:</b> C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(OH)<sub>2</sub></p> <p><b>Peso molecular:</b> 110,11 g mol<sup>-1</sup></p> <p><b>pKa:</b> 10,85</p>

#### 5.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las técnicas de preparación de muestras han permitido mejorar las condiciones con las cuales se llevan a cabo procesos de extracción de muestras de forma tal que éstas puedan ser acondicionadas a las características con las cuales se desea trabajar, así mismo permite una preconcentración del analito de interés y por lo tanto se lleven procesos más limpios y donde se pueden tener menos pasos en el proceso, se usan menos solventes orgánicos promoviendo así la química verde y sobre todo permitiendo que el analista pueda tener menos riesgos a exponerse a cantidades elevadas de solvente y reduciendo el tiempo de análisis [13].

Se puede evidenciar en los últimos años como la preparación y extracción de muestras ha ido tomando cada vez más fuerza, por eso cada vez las publicaciones sobre preparación de muestras incrementa año tras año (Ver gráfica 4). Por este motivo, cabe resaltar la importancia del análisis previo que se debe realizar a la hora de estudiar matrices complejas, matrices con distintos analitos o muestras que deben tener un tratamiento previo a su análisis [57-58]. Para dicho análisis se realizó una búsqueda sistemática en la base de datos *Science Direct* utilizando como palabra clave: "sample preparation" y se realizó una búsqueda sistemática usando como palabras clave "Contaminants of emerging concern". Se obtuvieron los siguientes resultados (figura 4 y 5). Para la primera búsqueda, se puede observar como se ha ido acrecentando el interés por el análisis de diversas matrices considerando como foco principal la preparación de muestras, ya que esta enmarca un sinnúmero de posibilidades para reducir el uso de compuestos

tóxicos, la reducción de pasos para el análisis de matrices de interés y sobre todo aportarle a una química amigable con el ambiente, en ese orden de ideas, es importante también considerar el interés que año tras año se puede evidenciar frente al estudio de contaminantes de preocupación emergente que están generando un impacto que cada vez busca ser regulado debido a los daños que estos pueden causar no solo al ambiente sino a los seres humano.

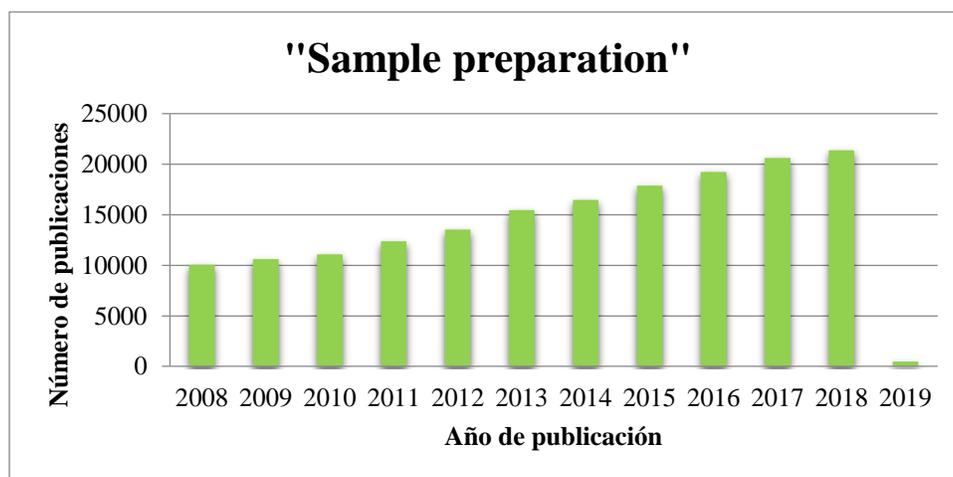


Ilustración 4. [Publicaciones sobre preparación de muestras en los últimos años](#). Fecha de acceso: 15/02/2019.

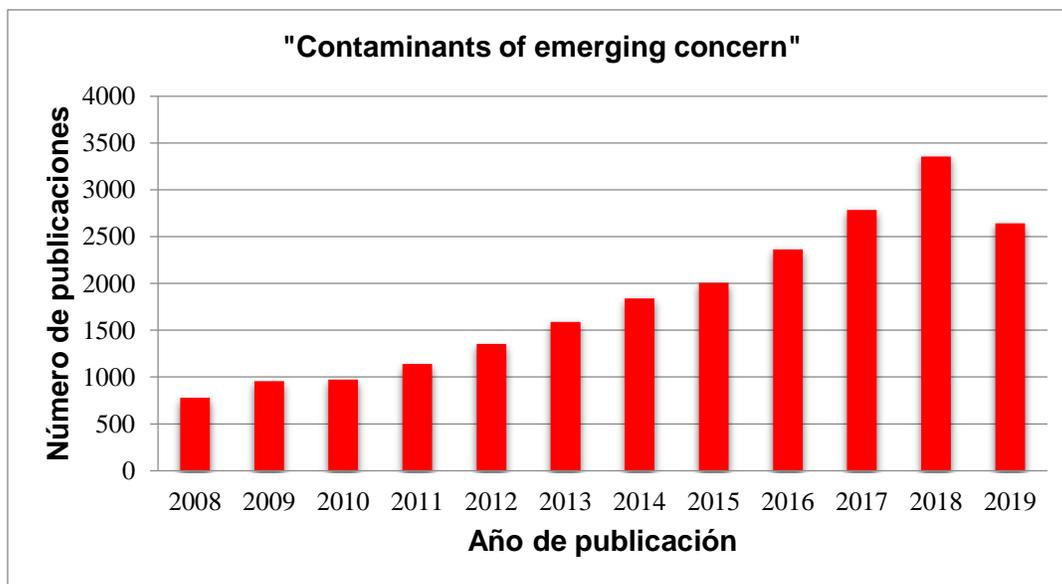


Ilustración 5. Publicaciones sobre contaminantes de preocupación emergente en los últimos años. Fecha de acceso: 15/02/2019.

### 5.5. OBJETIVOS Y TENDENCIAS DE LA MICROEXTRACCIÓN

Todo proceso de análisis químico cuantitativo debe apuntar a las nuevas tendencias en química analítica, apuntando de esta manera hacia la reducción del uso de solventes orgánicos y así poder reducir el impacto ambiental [59-60], consiguiendo reevaluar las técnicas actuales utilizadas para la determinación de cualquier analito en diversas matrices y que se busquen nuevas metodologías que cumplan con este objetivo además que se eliminen el mayor número de etapas para la simplificación del procedimiento analítico en la fase de preparación de las muestras, donde se cometen la mayor cantidad de errores y se invierte hasta un 70% del tiempo de todo el proceso de análisis.

Debido a que la mayoría de los análisis que se realizan sobre muestras contienen mezclas complejas con pequeñas cantidades de las sustancias químicas como los subproductos de la desinfección “SPD”, los plaguicidas, productos de cuidado

personal y farmacéuticos, entre otros analitos de interés ambiental, se plantean verdaderos retos analíticos para su análisis por cuanto estas moléculas deben ser identificadas y/o cuantificadas dado su rol de posibles agentes de afección a la salud o al medio ambiente. Al mismo tiempo, la mayoría de las matrices de estudio, tales como suelos o aguas residuales, son también en su mayoría complejas [61-62]. Por lo tanto, un método de preparación de muestras que sea eficiente y que logre resultados sin pérdida del analito de interés debe cumplir los siguientes objetivos:

✓ **LA SIMPLIFICACIÓN DE LA MATRIZ**

Esto permite manipular la matriz de una manera sencilla logrando que el analista pueda reducir el tiempo de análisis y así lograr una extracción de los analitos de una manera más simple, logrando separar el analito de la matriz de estudio (matriz biológica, acuosa, orgánica, suelos) y se puede lograr una mejor eficiencia en los resultados.

✓ **CONCENTRACIÓN DEL ANALITO**

Uno de los objetivos de la preparación de muestras es extraer el analito de la matriz de estudio para que este puede ser analizados por equipos de laboratorio, pero al estar en concentraciones tan bajas (nivel trazas) el poder concentrar el compuesto de interés permite al equipo leerlo con mayor facilidad y obtener de esta manera resultados más precisos.

### ✓ **LIMPIEZA DE LA MUESTRA**

El método de extracción a utilizar debe en lo posible eliminar todas aquellas interferencias que se encuentran en la matriz, es decir, lograr tener solo el o los analitos que se desean estudiar independientemente de la matriz de estudio, siendo lo más selectivo posible.

Al hablar de los objetivos que tiene la preparación de muestras, es importante considerar que se requiere una búsqueda continua de la mejora de los procedimientos de preparación de muestras, por esta razón también se plantean los siguientes retos:

### ✓ **REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE PASOS NECESARIOS PARA EL PROCEDIMIENTO**

La disminución de pasos en el proceso de preparación de la muestra logra disminuir todos aquellos errores que se pueden cometer, ya que esta es la parte más crítica de la extracción [72].

### ✓ **LA CAPACIDAD DE ADAPTACIÓN DEL ANÁLISIS AL CAMPO DE MUESTREO**

Todo análisis debe apuntar a las necesidades del analista, es decir, lograr realizar el análisis en el mismo sitio del muestreo, evitando el traslado y transporte de muestras. Con esto se busca minimizar la contaminación cruzada y los errores habituales por manipulación y rotulación.

### ✓ **AUTOMATIZACIÓN**

Todas las técnicas actuales de extracción de analitos en las diferentes matrices deben buscar en lo posible la integración y automatización, ya que se eliminan los posibles errores que pueda realizar el analista al momento de hacer la inyección manual en el equipo de análisis y aumenta el número de muestras a analizar.

### ✓ **REDUCCIÓN O ELIMINACIÓN TOTAL DE SOLVENTES ORGÁNICOS NECESARIOS PARA LA EXTRACCIÓN**

Siendo una de las nuevas tendencias de la química verde, ayudando a minimizar el daño causado al planeta, además de minimizar gastos y que a su vez estos compuestos orgánicos pueden llegar a afectar la salud humana debido a la constante exposición [63].

### **5.6. MICROEXTRACCIÓN**

Cuando se habla de microextracción utilizando un sistema con fibra hueca implica que los analitos que se encuentran en la muestra se distribuyan entre el solvente orgánico impregnado en los poros de la fibra hueca generando así una partición y luego la difusión de estos a través de la fibra hacia el lumen donde se encuentra la solución orgánica o aceptora. Por esta razón, para que se pueda dar el proceso de extracción, el analito de interés debe disolverse con el mismo solvente orgánico con el cual se impregnaron los poros de la fibra para que así puedan difundir hacia el seno de la solución aceptora (figura 6). De tal modo, la extracción depende de la diferencia de coeficiente de partición del analito entre el agua y el solvente

orgánico. En ese sentido este modo de extracción es conveniente para compuestos con elevado coeficiente de partición en la fase orgánica [64-65].

En un sistema de extracción se tienen dos alternativas, como la solución aceptora puede ser un disolvente orgánico este proporciona un sistema de extracción de dos fases ya que se tiene un solvente orgánico que humedece el lumen de la fibra generando un proceso de difusión, que es directamente compatible con cromatografía de gases (GC). Por otro lado, la solución aceptora puede ser una solución acuosa que proporciona un sistema de extracción en tres fases y es compatible con cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) [66-68] o electroforesis capilar (CE) [69]. Los sistemas de dos y tres fases de LPME se basan ambos en difusión, en el que la extracción es promovida por altos coeficientes de partición (figura 6). [70-71].

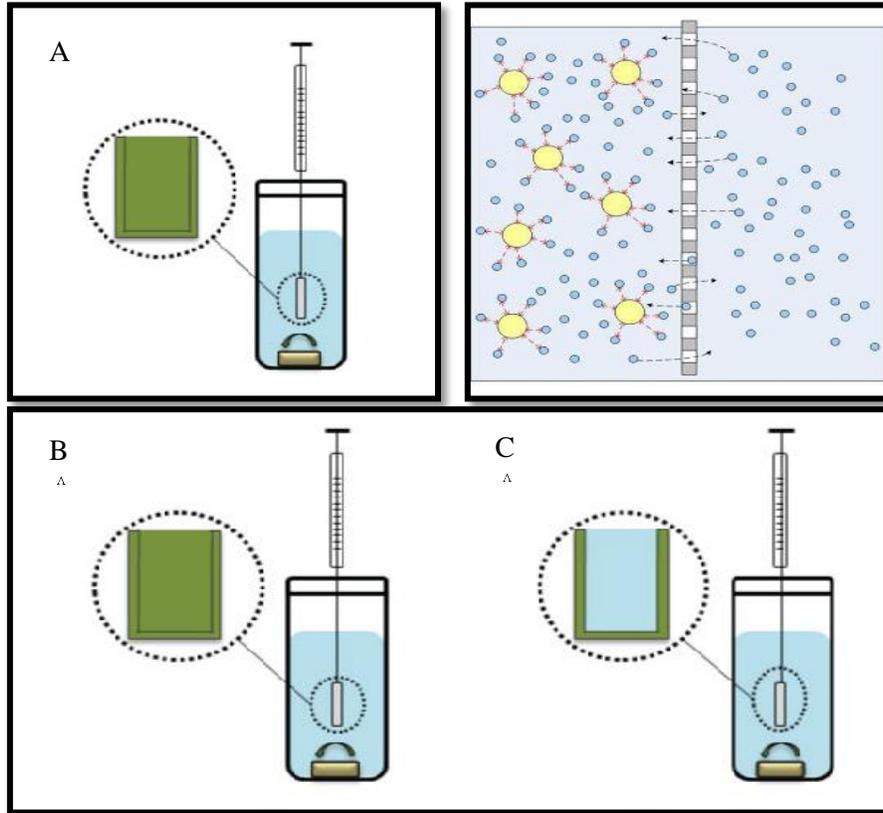


Ilustración 6. (A) Difusión de las moléculas de interés a través de la fibra. (B) Fibra hueca en dos fases. (C) Fibra hueca en tres fases [70-72]

## 5.7. TERMODINÁMICA DE LA EXTRACCIÓN Y MICROEXTRACCIÓN CON FIBRA HUECA

Para realizar un proceso de microextracción, donde la base para dicho sistema es la fibra hueca, se requiere de la partición de los analitos desde la muestra hacia el solvente orgánico con el cual se impregnaron los poros de dicha fibra, para posteriormente poder realizar una difusión a través de esta, hacia la solución aceptora orgánica (en este caso 1-octanol) por lo cual para el análisis realizado se dispuso de la fibra hueca en modo dos fases. Por tanto, para que el proceso de

extracción ocurra, el analito se debe disolver en el líquido orgánico como se mencionó anteriormente [65, 69-70].

En ese sentido, este modo de extracción es conveniente para compuestos con elevado coeficiente de partición en la fase orgánica. Dicho proceso de extracción puede ser explicado mediante la ecuación, en la cual se muestra el equilibrio químico de un analito A entre las fases, una acuosa (muestra) y la otra fase aceptora (fase orgánica). El coeficiente de partición para A se define con respecto a la ecuación 1, siendo  $C_{eq. \text{ fase aceptora}}$ , la concentración en equilibrio de A en la solución aceptora (fase orgánica) y  $C_{eq. \text{ muestra}}$ , es la concentración en equilibrio de A en la muestra (fase acuosa).



El coeficiente de partición (K), definido como el cociente o razón entre las concentraciones de un analito en las dos fases de la mezcla formada por dos disolventes inmiscibles en equilibrio que mide la solubilidad diferencial del analito en los dos disolventes, está representado como:

Ecuación 1.

$$K_{\text{fase aceptora/muestra}} = \frac{C_{eq. \text{ fase aceptora}}}{C_{eq. \text{ muestra}}}$$

Según la ecuación 1 y el balance de masas del sistema HF-LPME, la recuperación (R) de A en el equilibrio se puede calcular de acuerdo a la ecuación 2 [70].

Ecuación 2.

$$R = \frac{(K_{fase\ aceptora/muestra}) * V_{fase\ orgánica}}{((K_{fase\ aceptora/muestra}) * V_{fase\ orgánica}) + V_{muestra}} \times 100\%$$

Donde  $V_{fase\ orgánica}$  es el volumen total de la fase orgánica en el sistema (suma de disolvente orgánico presente en la pared porosa de la fibra hueca y en el lumen de la fibra hueca) y  $V_{muestra}$  es el volumen de la muestra. De acuerdo con la ecuación 2, la recuperación depende del coeficiente de partición del analito, del volumen de solvente orgánico, y del volumen de la muestra. Altas tasas de recuperación se obtienen para los compuestos con coeficientes de partición elevados. Esto se puede lograr mediante la selección apropiada del solvente orgánico extractor, del pH de la muestra para los analitos ácidos y bases débiles que deben estar en su forma no ionizada y en algunos casos por la adición de cloruro de sodio en altas concentraciones en la muestra (efecto salting-out). Además, pequeños volúmenes de muestra son beneficiosos para obtener altas tasas de recuperación para las extracciones basadas en el equilibrio químico.

Dos aspectos importantes que se obtienen en la HF-LPME, es que puede proporcionar muy altos factores de enriquecimiento, porque las extracciones HF-LPME son relativamente sensibles a la magnitud de los coeficientes de reparto y además, la HF-LPME varía con respecto a la tradicional extracción líquido-líquido (ELL) para sustancias de baja polaridad, que proporciona altos enriquecimientos y excelente discriminación de las sustancias polares [69].

## **5.8. PARÁMETROS ANALÍTICOS EN MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA CON FIBRA HUECA**

Como se mencionó anteriormente, obtener altas recuperaciones depende de varios criterios como la elección adecuada del solvente orgánico, la selección del pH, cantidad de sal adicionada, velocidad de agitación, tiempo de extracción y efecto de la temperatura. A continuación, se describe cada uno y se reporta los valores que han sido estudiados.

### **5.8.1. TIPO DE SOLVENTE**

El disolvente orgánico utilizado dentro de los poros de la fibra hueca debe ser: inmisible con agua para evitar las fugas, debe ser fuertemente inmovilizado en los poros de la fibra hueca para evitar fugas y debe proporcionar una selectividad de extracción adecuada, para proporcionar recuperaciones altas. Para las extracciones de tres fases, 1-octanol y éter de dihexilo han sido los más reportados, se recomienda un disolvente de baja volatilidad para evitar pérdidas durante la extracción. Para la extracción de dos fases, el solvente que ha sido más usado es el 1-octanol. Tanto el tolueno como el hexano han sido estudiados para ambos tipos de extracción [64-65].

### **5.8.2. AJUSTE DEL pH**

Con respecto a la selección del pH, la muestra se ajusta a un valor en el que los analitos son desionizados (forma neutra, por debajo de su  $pK_a$  si son moléculas ácidas y por encima de su  $pK_a$  si son moléculas básicas) para reducir su solubilidad dentro de la muestra acuosa y para mejorar su capacidad de migrar a

la fase orgánica. Soluciones de NaOH y HCl son usados para ajustar el pH en la muestra y en la solución aceptora [65].

### **5.8.3.ADICIÓN DE SAL**

Otro criterio importante es la cantidad de sal adicionada, se han reportado diferentes concentraciones de sal (5, 10, 15, 20 y 30 % v/v). Asimismo, dentro del grupo de investigación se han realizado estudios que permiten una mejor elección de la concentración de sal a usar, además los análisis muestran que la recuperación de extracción del analito aumenta con el incremento de la concentración de sal al 15%, debido al incremento en la solubilidad del analito en la fase orgánica. Aumentar más la concentración posibilita que las moléculas puedan precipitar debido a la interacción electrostática con los iones de sal en la solución y así decrece la transferencia de los analitos a través de la fibra hueca [72-73].

### **5.8.4.VELOCIDAD DE AGITACIÓN**

La velocidad de agitación es un parámetro fundamental para lograr alta eficiencia en la extracción debido a la continua renovación de la interfase entre la fase acuosa y fase orgánica por la agitación [74]. Se ha reportado como valor óptimo 700 rpm, porque incrementa la tasa de difusión y reduce el tiempo requerido para llegar al equilibrio del analito, entre la solución de muestra y el solvente de extracción, velocidades más altas generan burbujas de aire en la fibra que dificulta la cuantificación [73]. Es necesario disminuir la capa estancada de agua que se encuentra presente entre la solución acuosa y la fase aceptora; esto se logra aumentando la velocidad de agitación, ya que, a mayor velocidad de rotación, el

equilibrio de partición se alcanza más rápido, dado que la velocidad de transferencia del analito hacia la fase orgánica aumenta [75-76].

#### 5.8.5. TIEMPO DE EXTRACCIÓN

Así mismo el tiempo de extracción es un criterio a evaluar para obtener altas recuperaciones, en muestras por debajo de 2 mL está en un rango de 15 a 45 min. Para muestras de 1 L puede tardar hasta 2 h para alcanzar el equilibrio y obtener alto factor de enriquecimiento ya que son técnicas que al no ser exhaustivas se debe tener en cuenta el equilibrio [65,74].

#### 5.8.6. TEMPERATURA

Por último, la temperatura cuando está por encima de 45 °C el coeficiente de partición decrece y el agotamiento del solvente aumenta. Por tanto, decrece la eficiencia de la extracción y cuando la temperatura está por debajo de 45 °C se incrementa la tasa de transferencia entre la fase acuosa y la fase orgánica [77-78]. Para explicar un poco mejor la influencia de la temperatura en el proceso de extracción no solo desde el punto de vista termodinámico sino también cinético, se debe tener en cuenta la ecuación de Svante Arrhenius [79] como se muestra en la siguiente ecuación:

Ecuación 3. 
$$k = Ae^{-E_a/RT}$$

Donde **A** es el factor de frecuencia y sus unidades coinciden con las unidades de **k** (constante de velocidad), es típica para cada reacción. **E<sub>a</sub>** es la energía de activación de la reacción y sus unidades son cal mol<sup>-1</sup>, es la mínima energía requerida por un reactivo para transformarse en producto **R** es la constante

universal de los gases ideales y equivale a  $1,9872 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$  y  $T$  es la temperatura absoluta en K.

Se mencionó anteriormente los parámetros analíticos a tener en cuenta para obtener altas recuperaciones en HF-LPME. Sin embargo, hay otras condiciones que determinan el éxito de esta técnica, por ejemplo, HF-LPME dinámico mejora la velocidad de extracción, en comparación con HF-LPME estático, pero necesita mejor instrumentación y añade parámetros experimentales a optimizar y controlar. También la composición de la fibra hueca juega un papel importante, la mayoría de los estudios se han realizado con fibras de polipropileno, pero también se han reportado algunos estudios con difluoropolivinilideno, tubos de sílica monolíticos e incluso fibras de polihidroxialcanoato PHA, sin embargo, el polipropileno es seleccionado por ser compatible con una amplia gama de disolventes orgánicos [65,69].

Además del tipo de material que compone la fibra, también influye el espesor de la pared de la fibra y se ha encontrado como valor estándar 200 micrómetros, valores menores a este pueden resultar en una mala estabilidad mecánica, y valores por encima pueden resultar en tiempos de extracción prolongados y la reducción de las recuperaciones a causa de los aumentos en el volumen y el espesor de la fase orgánica [65].

## **5.9. PARÁMETROS ANALÍTICOS**

Para evaluar el método analítico fue necesario determinar los siguientes parámetros: sensibilidad, linealidad, precisión y exactitud, como lo describen la guía para la validación de metodologías analíticas y de equipos de calibración empleados para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos [80] y la guía de validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición [81-83].

## **5.10. CROMATOGRAFÍA**

La cromatografía nace en 1906 por el botánico ruso Mikhail Tswett quien realizó un experimento el cual llevo a la creación de esta técnica de separación de compuestos químicos. En dicho experimento colocó un extracto de pigmentos vegetales ubicándolos encima de una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) y al agregar éter, pudo observar como aquella mezcla se separaba en diversas bandas de diferentes colores que descendían a través de la columna a diferentes velocidades [84-85].

Un factor importante de la cromatografía y que es un punto clave en la separación de los compuestos es la presencia de dos fases (una permanece estática dentro del sistema -fase estacionaria-, la otra se desplaza a lo largo de la primera -fase móvil-). Por este motivo, el equilibrio de distribución toma su importancia ya que la velocidad con la cual se separen las moléculas en cromatografía depende de su afinidad relativa por ambas fases [86].

En el experimento de Tswett, la separación de los pigmentos vegetales se logró gracias a que cada uno de ellos tenía una afinidad diferente por las fases. En general, los componentes más afines a la fase estacionaria avanzan lentamente (son más retenidos) mientras que los más afines a la fase móvil (los menos retenidos) se mueven con mayor rapidez. Por consecuencia, el medio cromatográfico (columna, placa o papel) funciona como un controlador de la velocidad de cada sustancia que constituye la mezcla, logrando así su separación, y mediante el uso de un detector se da la caracterización química de los analitos que componen la muestra. Aunque los principios fundamentales son los mismos, los diversos procesos cromatográficos se nombran de acuerdo al estado físico de la fase móvil; es así como en cromatografía de gases (GC) la fase móvil es un gas y en cromatografía líquida la fase móvil es un líquido (LC) [84-85].

#### **5.11. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA EFICIENCIA (UHPLC)**

En la cromatografía líquida de alta eficiencia (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC por sus siglas en inglés) la inyección de la muestra se hace en el punto de inicio donde esta ubicada la fase móvil (la cual debe ser soluble) y esta es transportada a través de una columna por el flujo continuo de la fase móvil a alta presión. Las partículas que conforman la fase estacionaria poseen un diámetro pequeño, por tanto, con una gran superficie de interacción, contenidas en la columna, allí es donde se llama a cabo el proceso cinético conocido como elución. La velocidad a la que un analito se mueve a través de la

columna, con respecto a los demás componentes de la mezcla, está determinada por el tiempo que permanece en la fase móvil [87-88].

La cromatografía UHPLC se puede utilizar como técnica preparativa y como técnica analítica, permitiendo la purificación, identificación y cuantificación del analito deseado. Es relevante y de vital importancia elegir de manera apropiada la fase estacionaria, la fase móvil, el flujo con el cual se va a impulsar la fase móvil a través de la fase estacionaria e incluso seleccionar la temperatura a la que se va a realizar el proceso, permitirán la correcta separación del analito de interés de los otros compuestos. Existen diversas condiciones cromatográficas para cada componente de una muestra y debe asegurar que la migración del componente y de los contaminantes a través de la columna sea lo suficientemente distinta para que dicho compuesto sea separado de los demás y así lograr su posterior identificación y cuantificación [89].

Para identificar los compuestos de una muestra se debe seleccionar un sistema de detección que mida alguna propiedad fisicoquímica de las moléculas en análisis. Entre los detectores más empleados se encuentran los de absorbancia, conductividad, fluorescencia, relación masa/carga, entre otros. Cualquiera que sea el sistema empleado, detecta la presencia del soluto y convierte esta información en una señal eléctrica que puede ser tratada por un procesador de datos y registrada como un cromatograma, el cual representa la señal obtenida frente al tiempo o al volumen de elución. Cada uno de los analitos se visualiza como un pico tipo gaussiano [84,90-91].

Para la cuantificación de compuestos se utiliza la señal del detector haciendo que sea proporcional a la cantidad o a la concentración inyectada de un analito; en los cromatogramas obtenidos se muestra un pico, cuyas áreas se correlacionan con la concentración del compuesto inyectado, con esta información se elabora una curva de calibración que establece el factor de respuesta de la medida del detector frente a una serie de soluciones del compuesto de interés con concentraciones conocidas. También se puede trabajar con estandarización interna, en este caso, tanto a los compuestos con concentraciones conocidas como a las muestras a cuantificar, se les añade una cantidad conocida de un segundo compuesto conocido, el cual se designará como estándar interno. La curva de calibración con estándar interno corrige las pérdidas analíticas sufridas durante todo el proceso analítico (extracción, cromatografía, etc.), las cuales son constantes para todos los compuestos [89].

## **5.12. CARBONO ORGÁNICO TOTAL (COT)**

Nuestro planeta está formado por agua (lo cual equivale a las tres cuartas partes); pero como es conocido no toda esta agua la podemos utilizar los humanos, del 100% de agua que existe en nuestro planeta tenemos que el 97% de dicha cantidad de agua es la que conforma los mares y debido a su composición salada no es recomendable su consumo ni tampoco es apta para una gran variedad de especies animales y de plantas que se encuentran en la superficie de la tierra; en el mismo sentido un 2% del agua dulce se encuentra confinada en acuíferos subterráneos y en los glaciares, conformándose en reservorios de vida y del líquido como tal a los cuales no podemos tener acceso directamente para la

utilización en los diferentes procesos ya sea biológicos o de carácter antrópico por parte del hombre. Este recurso hídrico es uno de los compuestos más abundantes en la naturaleza ya que cubre aproximadamente un 75% de la superficie total de la tierra. Sin embargo y a pesar de la aparente abundancia, existen diferentes factores que limita la cantidad de agua disponible para el consumo humano. Por consiguiente, el total de agua útil para el desarrollo y sostenimiento de la vida humana con sus actividades industriales y agrícolas se dispone aproximadamente de 0,62% del agua restante, que se encuentra en lagos de agua fresca, ríos y mantos freáticos. El agua dulce es indispensable para la vida. Todo ser humano necesita de ella, así pues, todas las personas de la tierra demandan, al menos, una mínima cantidad. Desde un punto de vista mercantil, el agua es un producto con una gran demanda, por lo tanto, el agua dulce es un gran negocio que debe regirse por las leyes del mercado. Según esta visión comercial, la mala repartición de los recursos hídricos, su desperdicio y la contaminación son males atribuibles únicamente a los Estados. Actualmente, la connotación que se le da a dicho recurso ha generado cambios, llevando a los gobiernos a adoptar enfoques comerciales sobre la utilización del agua, esto debido a la escasez de esta en algunas regiones del mundo [92-94].

Por esta razón cada vez más el análisis de aguas residuales y el tratamiento de estas han ido tomando gran importancia no solo en procesos industriales sino además en las aguas residuales producto de las actividades humanas.

Tanto en las aguas superficiales como en las aguas que están relativamente poco profundas podemos encontrar materia orgánica natural (MON). Esto se debe a la

acumulación de materia vegetal la cual se origina en el suelo, pero dicha materia vegetal (orgánica) no solo se acumula, sino que además se divide finamente y en muchas ocasiones está en descomposición. Otra gran parte la aportan los procesos que generan animales como resultado de su digestión. Los fondos sumergidos o periódicamente recubiertos son lugares de una vida activa que proporciona una gran variedad de productos orgánicos complejos. Asimismo, podemos encontrar que el metabolismo de organismos vegetales como algas y hongos son los responsables en muchas ocasiones de malos olores y sabores [94-96].

Las aguas a menudo son ácidas y están muy poco mineralizadas generalmente tienen una importante concentración de materia orgánica de procedencia natural, ya que provienen de terrenos que poseen cuarzo y con minerales. Algunas aguas como las que conforman las regiones de turba tienen una alta concentración de materia orgánica proporcionando un notorio color marrón rojizo [94-97].

La MON está formada generalmente, por sustancias químicas que pueden tener un peso molecular bajo o moderado (polielectrolitos aniónicos), cuya carga se debe principalmente a los grupos carboxílico y fenólico [98-100].

En términos generales, se hace indispensable el uso de técnicas específicas con las cuales se pueda determinar la materia orgánica y así expresarla como contenido o concentración de carbono orgánico, haciendo la aclaración de que “ninguno de los métodos de demanda de oxígeno da una estimación precisa del carbono orgánico disuelto en el agua” [101].

Se utiliza como técnica de combustión total de la materia orgánica a  $\text{CO}_2$  y detección de este producto con detector infrarrojo no dispersivo. La muestra se prepara por acidificación y aireación para remover el carbono inorgánico, luego se inyecta la muestra tratada en un horno donde se evapora el agua y el carbono orgánico hace combustión catalítica a  $\text{CO}_2$ , el cual es transportado por una corriente de aire grado ultrapuro (UP) hasta el detector, cuya señal es una variación de voltaje proporcional a la concentración de carbono orgánico total (COT) [102-104].

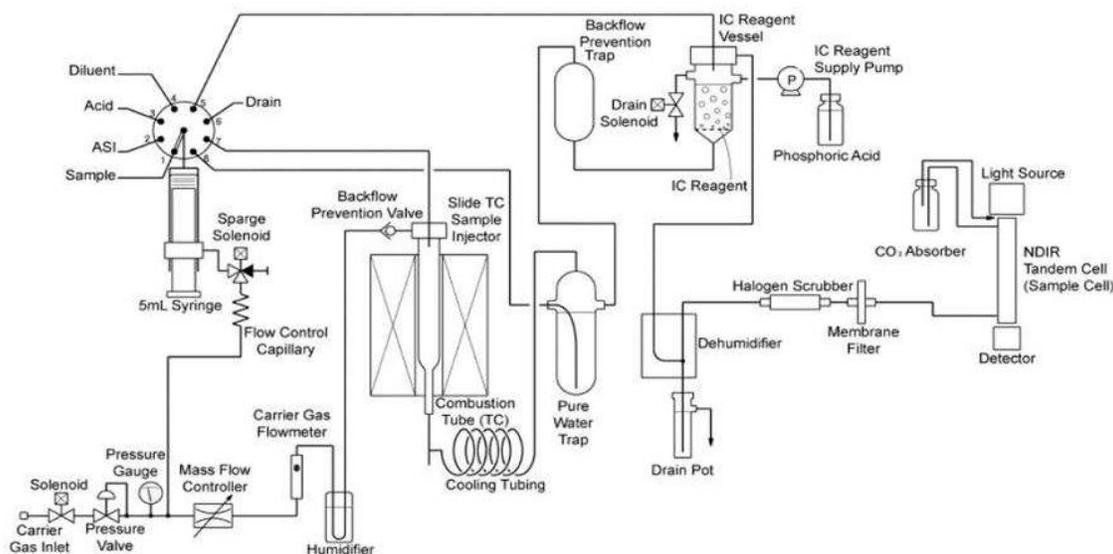


Ilustración 7. Esquema de funcionamiento de un analizador de combustión para carbón orgánico total COT.

Cuando hablamos de compuestos de carbono es importante reconocer la habilidad que posee dicho elemento para formar moléculas largas en forma de cadena, es decir, el número de compuestos de carbono posibles es prácticamente infinito. Para análisis que requieren métodos cromatográficos como la cromatografía de gases (GC) o la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), es

de vital importancia que el usuario conozca cuáles son los compuestos específicos que busca y así poder realizar determinaciones cuantitativas para compuestos específicos. El carbono orgánico total (COT) es una prueba no específica, es decir, el COT no determinará qué compuestos concretos están presentes (la mayoría de las muestras son mezclas complejas que contienen miles de compuestos de carbono orgánico diferentes) [96]. En lugar de ello, el usuario podrá conocer la suma de todo el carbono orgánico presente en estos compuestos. Existen dos categorías que enmarcan el uso y la medición del COT es diferentes matrices y cambia según el sector, una de ellas es el control de procesos y por otro lado el cumplimiento de las normativas. Las aplicaciones más habituales de la medición de COT incluyen: Agua potable municipal: el carbono orgánico reacciona con los compuestos químicos que se utilizan para la desinfección, como el cloro, y forma subproductos de la desinfección (SPD) que pueden ser cancerígenos. La reducción del carbono orgánico antes de realizar la desinfección puede disminuir de forma significativa la exposición perjudicial del público a SPD [105]. Aguas residuales municipales: la monitorización del carbono orgánico del influente facilita el control de los procesos para maximizar la eficacia de la planta, mientras que la monitorización del vertido suele ser un requisito para la descarga en aguas superficiales [105]. Aguas residuales industriales: las industrias que descargan residuos líquidos en una masa de agua superficial están obligadas a monitorizar el COT. Centrales de energía: limitar las fuentes potenciales de compuestos corrosivos puede evitar daños costosos a equipos de gran valor económico [106]. Fabricantes de productos farmacéuticos: el agua es el ingrediente más utilizado para producir fármacos. La normativa limita la

concentración de carbono orgánico para evitar el crecimiento de bacterias perjudiciales. Fabricantes de productos electrónicos: se utiliza agua ultrapura en la fabricación de microprocesadores y chips para ordenadores. Cuanto más se reduce el tamaño de los procesadores y circuitos, más limpia debe mantenerse el agua para evitar daños microscópicos a estos minúsculos circuitos. [19, 96,105-106].

### **5.13. PLANTAS DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES**

Uno de los factores que se hacen necesarios para la prevención de la contaminación ambiental y del agua, así como lo relacionado con la protección de la salud pública es el tratamiento de aguas residuales. De acuerdo con las necesidades particulares de cada región, se tendrán métodos de tratamientos para las aguas residuales, cierto número de opciones tradicionales y modernas de tratamiento se encuentran disponibles al diseñar una planta de tratamiento. El objetivo del tratamiento de las aguas residuales es poder darle un manejo efectivo dando como resultado un efluente que pueda usarse de nuevo, o uno que pueda ser descargado de manera segura en el medio ambiente [1, 107-109].

Para el análisis desarrollado en el presente trabajo se tomaron muestras simples y compuestas de aguas residuales en la entrada (afluente) y salida (efluente) de una planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de un hospital público de la ciudad de Manizales. El Hospital público es de primer nivel de complejidad, 68 camas, su PTAR posee un tratamiento por medio de lodos activados, tiene un flujo de  $0,5 \text{ L s}^{-1}$ , posee un DQO de  $1203 \text{ mg L}^{-1}$ , DBO de  $397 \text{ mg L}^{-1}$ , un índice de biodegradabilidad de 0,3 (típico de este tipo de aguas residuales) y una remoción

del 71% de DQO. Los medicamentos más formulados según informaciones del encargado de compras y suministros son: pregabalina, paracetamol, metformina y tamsulosin.

En la figura 8 se muestran algunas fotografías de la planta de tratamiento de aguas residuales de donde se obtuvo la muestra para el análisis.



Ilustración 8. Planta de tratamiento de Aguas Residuales de un Hospital de Salud Pública.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTÁNDAR**

Todos los reactivos y patrones se adquirieron a Sigma Aldrich Company a través de las empresas autorizadas en Colombia Quimirel Ltda y Outsourcing Comercial S.A.S. A partir de los reactivos estándar puros de los compuestos de cuatro (4) benzodiazepinas: diazepam, flunitrazepam, temazepam y nitrazepam y (3) compuestos fenólicos tales como: fenol, hidroquinona y pirocatecol, se prepararon soluciones madre de 5 mg L<sup>-1</sup> de cada compuesto con agua ultrapura tipo I (Millipore sistema MilliQ). Las soluciones madre y de trabajo de los analitos del estudio se almacenaron a 4 °C.

### **6.2. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS EN UHPLC-UV**

Para el análisis cromatográfico de los fenoles se usó un equipo UHPLC Thermo U-Dionex con un detector ultravioleta (UV). Se utilizó una columna C-18 (100 mm × 2,1 mm ID x 5,0 µm tamaño de partícula) Pinnacle II; para la fase móvil se usó una mezcla de agua-ácido fórmico 0,01 % (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). Se llevó a cabo el análisis con un método de gradiente usando una velocidad de flujo de 0,2 mL min<sup>-1</sup>, el tiempo de análisis fue de 15 minutos monitoreando a una longitud de onda de 245 nm.

En el caso de las benzodiazepinas se usó el mismo equipo monitoreando a una longitud de onda 238 nm usando como fase móvil  $\text{H}_3\text{PO}_4 - \text{CH}_3\text{CN}$  (acetonitrilo) en una proporción de 68:32.

### 6.3. ESPECIFICACIONES DE LA FIBRA HUECA

La fibra hueca está hecha de polipropileno Accurel PP 300/1200 adquirida de Polypore Cia GmbH, Alemania, el espesor de la película era 300  $\mu\text{m}$ , con un tamaño de poro de 0,2  $\mu\text{m}$  y el diámetro interno de 1,2 mm. El área superficial específica era de 17,3  $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$ , como se muestra en la figura 9.

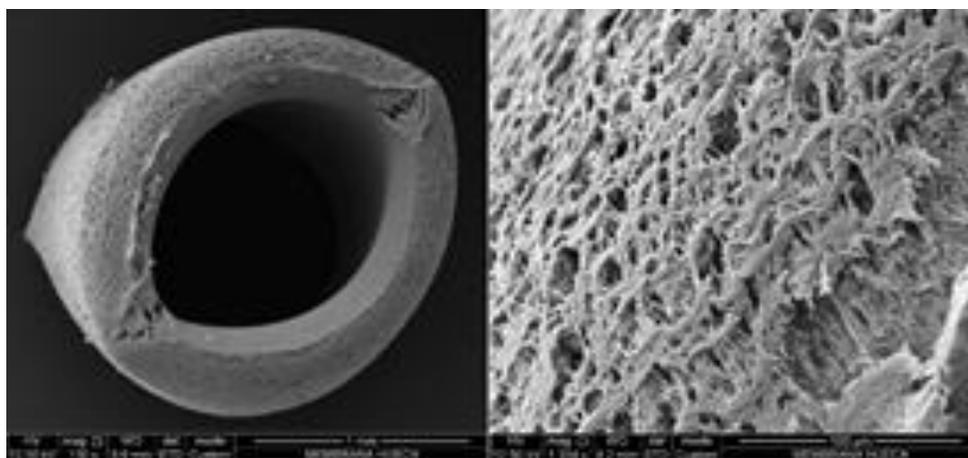


Ilustración 9. Micrografía de la fibra hueca accurel PP 300/1200 realizada con un microscopio de barrido electrónico SEM.

### 6.4. CONDICIONES DE MICROEXTRACCIÓN DE LA HF-SBME

Para la optimización de las variables críticas en el procedimiento de microextracción, se planteó un diseño de experimento del tipo  $N + (N - 1)$  (tabla 5) con cuatro variables de control cada una de estas en tres niveles; a través de este diseño se logró implementar un máximo de 9 experimentos que se realizaron en

triplicado, a fin de obtener las mejores condiciones para operar el sistema HF-SBME [9,110-112].

Tabla 5. Diseño de experimento N + (N -1) [113]

Experimento Número	Temperatura (° C) N1			Velocidad de Agitación (rpm) N2			Tiempo de extracción (min) N3			% NaCl (%p/v) N4		
	30	40	50	400	700	1000	10	20	30	10	15	20
1	X				X				X	X		
2		X			X				X	X		
3			X		X				X	X		
4	X			X					X	X		
5	X					X			X	X		
6	X				X		X			X		
7	X				X			X		X		
8	X				X				X		X	
9	X				X				X			X

El diseño se aplicó tanto para el análisis de fenoles como para las benzodiazepinas.

En la figura 10 se puede observar el montaje para el proceso de microextracción con fibra hueca como barra de solvente. Asimismo, se observan algunos de los pasos que se realizaron para dicho procedimiento, cabe recalcar que se debe sellar de forma adecuada la fibra para garantizar que el solvente permanezca dentro de la misma.



Ilustración 10. Procedimiento de la HF-SBME: 1-acondicionamiento fibra 2-sellamiento extremo e introducción de pin 3-llenado del lumen con 1-octanol 4-extracción en modo solvent bar 5-recuperación extracto.

## 6.5. PROCEDIMIENTO DE LA HF-SBME

El nuevo método desarrollado requiere que se lleve a cabo un acondicionamiento de la fibra usando acetona y ultrasonido durante 30 segundos, luego se introduce el pin metálico (10 mm) dentro de la fibra el cual permite que esta gire. Posteriormente, se introduce 40  $\mu\text{L}$  de 1-octanol en la fibra hueca y se sellan ambos extremos con presión mecánica. Al tener la fibra lista, se sumerge en la muestra que se analizará. Se pone el sistema de microextracción en marcha teniendo en cuenta las condiciones óptimas de extracción y finalmente, el solvente recuperado después de la microextracción se inyecta en el cromatógrafo de líquidos equipado con detector de Ultravioleta (UHPLC-UV) para su análisis [112].

## **7. CAPÍTULO II: CUANTIFICACIÓN BENZODIACEPINAS**

### **7.1. FIBRA HUECA COMO BARRA DE SOLVENTE**

Para esta técnica se tuvieron en cuenta las principales variables críticas de extracción tales como la velocidad de agitación, el efecto de la temperatura, la adición de sal y el tiempo de la extracción, esta técnica fue una modificación de una desarrollada en otro grupo [114].

#### **7.1.1. EFECTO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN DE LA MUESTRA**

Para este parámetro se consideraron las velocidades de agitación de 500, 700 y 1000 rpm, de las cuales 400 rpm arrojó los mejores resultados de extracción (ver figura 12) ya que a 1000 rpm en muchos de los casos se presentaban pérdidas del solvente orgánico inmovilizado en los poros o introducido en el lumen.

Cuando se habla del sistema de fibra hueca funcionalizada como barra de solvente, la velocidad de agitación es un factor crucial para la extracción del analito, ya que se debe considerar la capa de difusión de Nernst (capa estancada de agua) puesto que la velocidad de agitación aumenta la transferencia de los analitos desde la fase donora (acuosa) hasta la fase aceptora (orgánica) disminuyendo dicha capa estancada [115-116]; dicho proceso permite que la transferencia de masas de los analitos puedan interactuar entre las dos fases (orgánica y acuosa), es necesario tener en cuenta que una velocidad de agitación muy elevada puede provocar pérdidas significantes del solvente de extracción o la formación de burbujas de aire que ocupan los poros de la HF-SBME impidiendo el intercambio entre las fases, este fue un factor a tomar en consideración como la limitación de la extracción [65,117-118].

### **7.1.2.EFECTO DE LA TEMPERATURA EN LA EXTRACCIÓN**

El control de temperatura es un parámetro esencial en el procedimiento de extracción, ya que puede afectar la tasa de transferencia y los coeficientes de partición de los analitos, ya que afecta la cinética y a su vez la termodinámica del proceso de adsorción de los analitos hacia la fase aceptora, aumentando la selectividad y sensibilidad del proceso. Se realizó con una variación de temperatura a 20 °C, 30 °C y 40 °C, en la extracción de la muestra de agua enriquecida con 5 µg mL<sup>-1</sup> de las benzodiazepinas con una velocidad de agitación de 400 rpm ya establecida, durante 30 minutos. El efecto de la temperatura en la eficiencia de la extracción fue investigado en el rango de 20 – 40 °C. Cuando la temperatura alcanza los 30 °C se incrementa la tasa de transferencia entre la fase acuosa y la fase orgánica [77,119-121], lo que produjo un aumento de la eficiencia de la extracción. Por último, la temperatura cuando está por encima de 30 °C el coeficiente de partición decrece y el agotamiento del solvente aumenta, por tanto, disminuye la eficiencia de la extracción. De esta manera, 30 °C fue seleccionada como temperatura óptima en los subsiguientes experimentos (ver figura 12).

### **7.1.3.EFECTO DEL TIEMPO DE EXTRACCIÓN PARA LA HF-SBME**

Buscando alcanzar el equilibrio de distribución del sistema en el menor tiempo posible para extraer siempre la mayor cantidad de analito, ya que el sistema una vez alcanza el equilibrio, no se consiguen mejoras sustanciales, porque la extracción llega a ser constante, pero si se puede producir una pérdida del solvente orgánico, para lo cual el rango a evaluar fue de 10 min, 20 min y 30 min.

El tiempo óptimo en la extracción de la muestra de agua a 30 °C como temperatura de extracción y 400 rpm como velocidad de agitación óptimos, se consigue a los 30 minutos (ver figura 11) [9,110].

#### **7.1.4.EFECTO DE LA ADICIÓN DE SAL**

En general, la extracción de compuestos con este método arrojó resultados adecuados en una muestra de agua dopada con  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , bajo las condiciones ya establecidas como óptimas: temperatura de extracción a 30 °C, velocidad de agitación de 400 rpm, durante 30 min de tiempo de extracción, se quiere ver el efecto de la adición de sal "salting out". La mejora de la extracción de los compuestos que son de interés para el análisis, se consigue teniendo en cuenta además el efecto salting out o adición de NaCl, mediante el aumento de la fuerza iónica de la solución, y facilitando la solubilidad del analito en la fase orgánica, es decir, disminuye la solubilidad de los compuestos no electrolitos y favorece de esta manera su afinidad con el solvente orgánico, mejorando así la recuperación y concentración de analitos, porque las moléculas de agua solvatan a los iones presentes, mas no a los analitos de interés, modificando el coeficiente de distribución permitiendo el paso a través de la fibra hacia la fase aceptora. En la figura 12 se pueden evidenciar los resultados obtenidos de cada una de las Benzodiazepinas por triplicado [9,110]. En la figura 12 se puede observar un experimento de microextracción con los estándares a utilizar con las condiciones para dicho proceso.

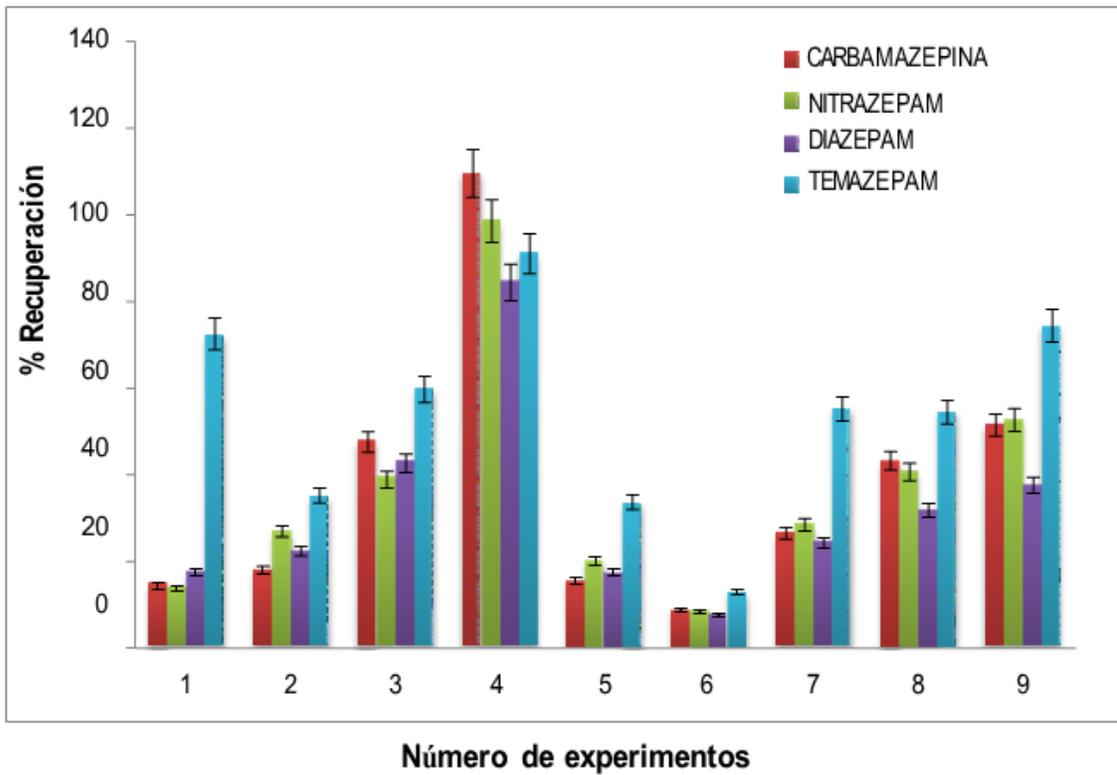


Ilustración 11. Porcentajes de recuperación de los experimentos.

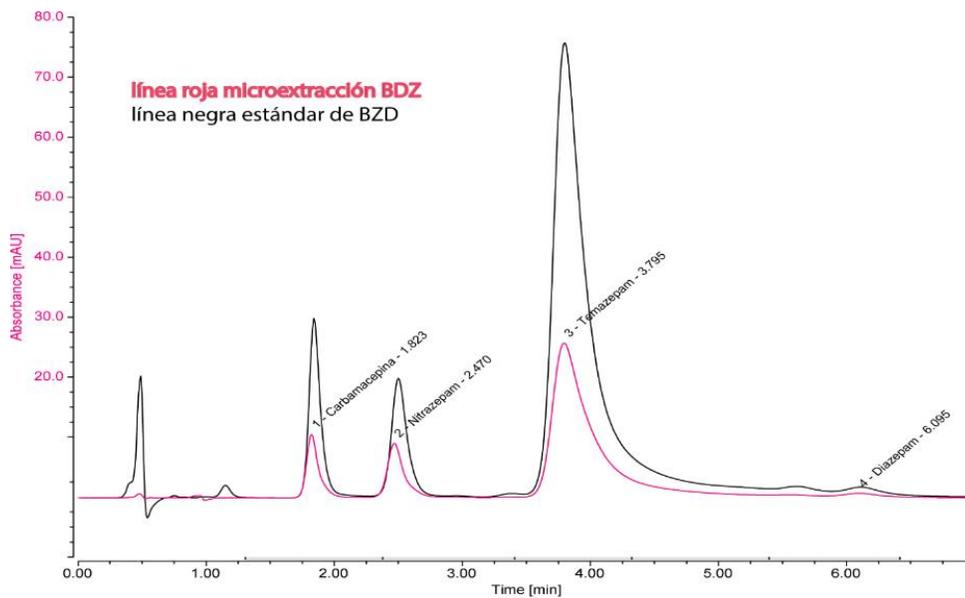


Ilustración 12. Cromatogramas superpuestos del método de microextracción con estándar de BZD [ $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ].

## 7.2. SUPERFICIES DE RESPUESTA

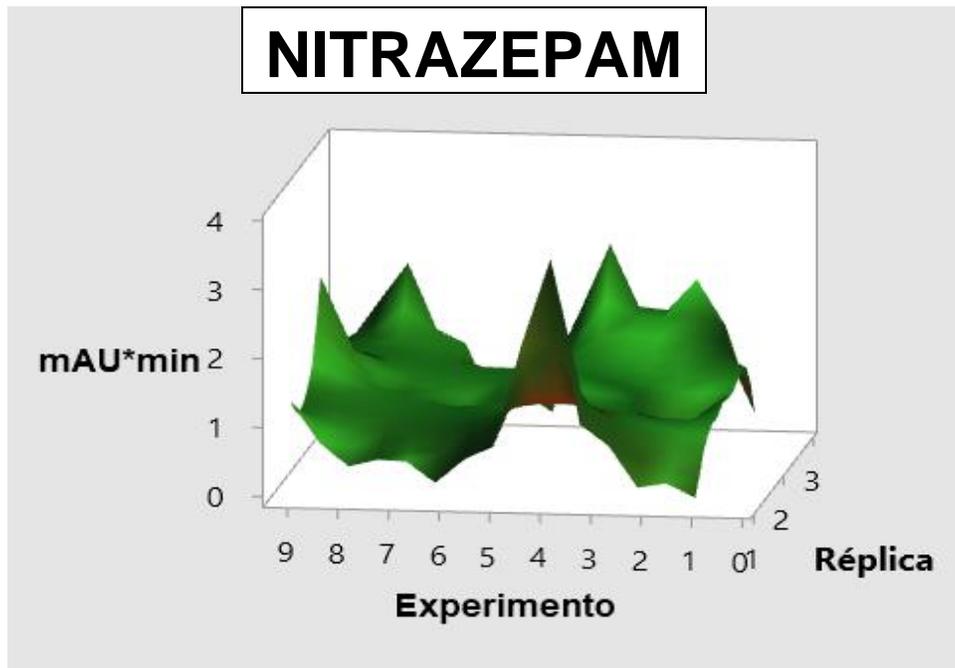


Ilustración 13. Superficie de respuesta Nitrazepam.

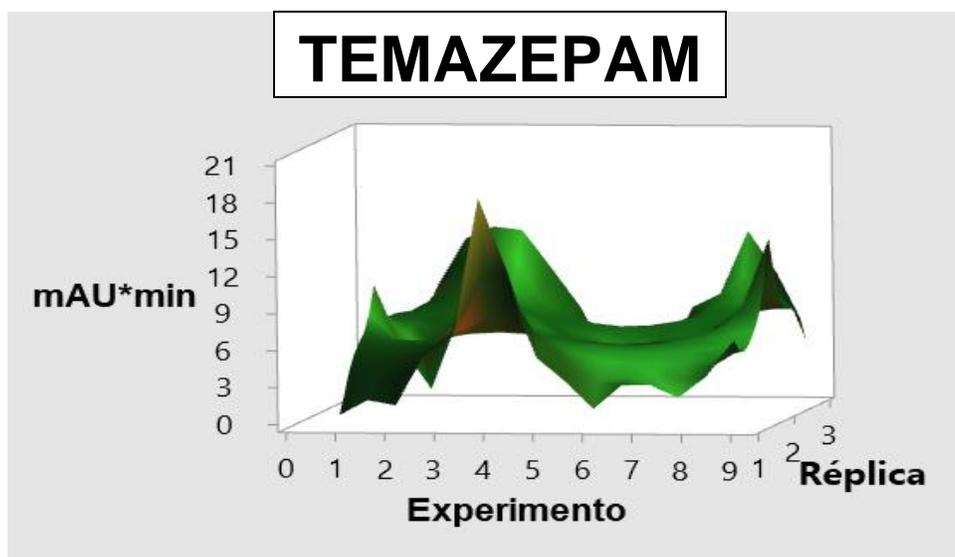


Ilustración 14. Superficie de respuesta Temazepam.

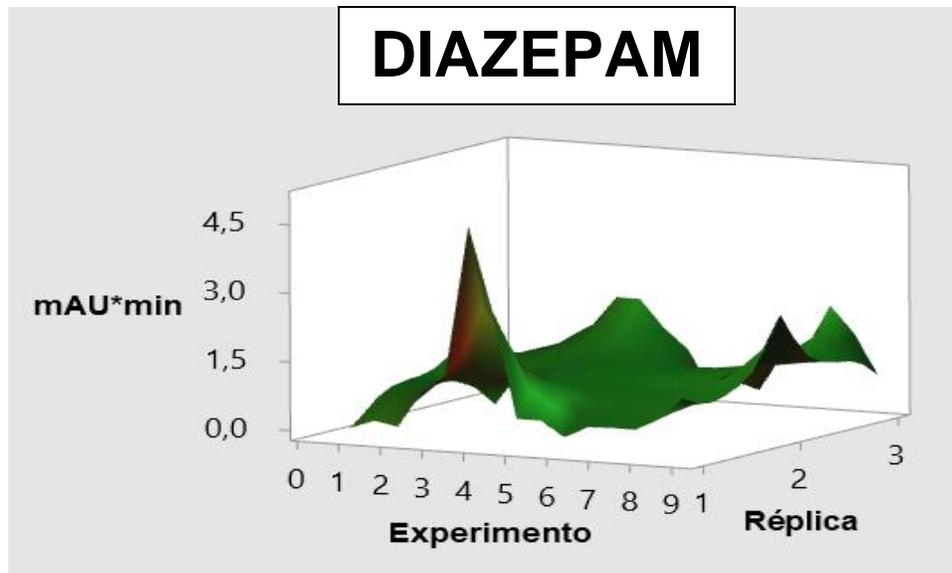


Ilustración 15. Superficie de respuesta Diazepam.

### 7.3. RECTA DE CALIBRACIÓN

La recta de calibración fue elaborada usando los 4 estándares de Benzodiazepinas (Sigma Aldrich), utilizando 6 puntos de calibrado con las siguientes concentraciones  $0,505 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $1,071 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $2,082 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $3,079 \mu\text{g.g}^{-1}$ ,  $4,073 \mu\text{g g}^{-1}$  y  $5,079 \mu\text{g g}^{-1}$  como se muestra en la figura 13, en la tabla 6 se muestran cada uno de los resultados de la curva de calibración.

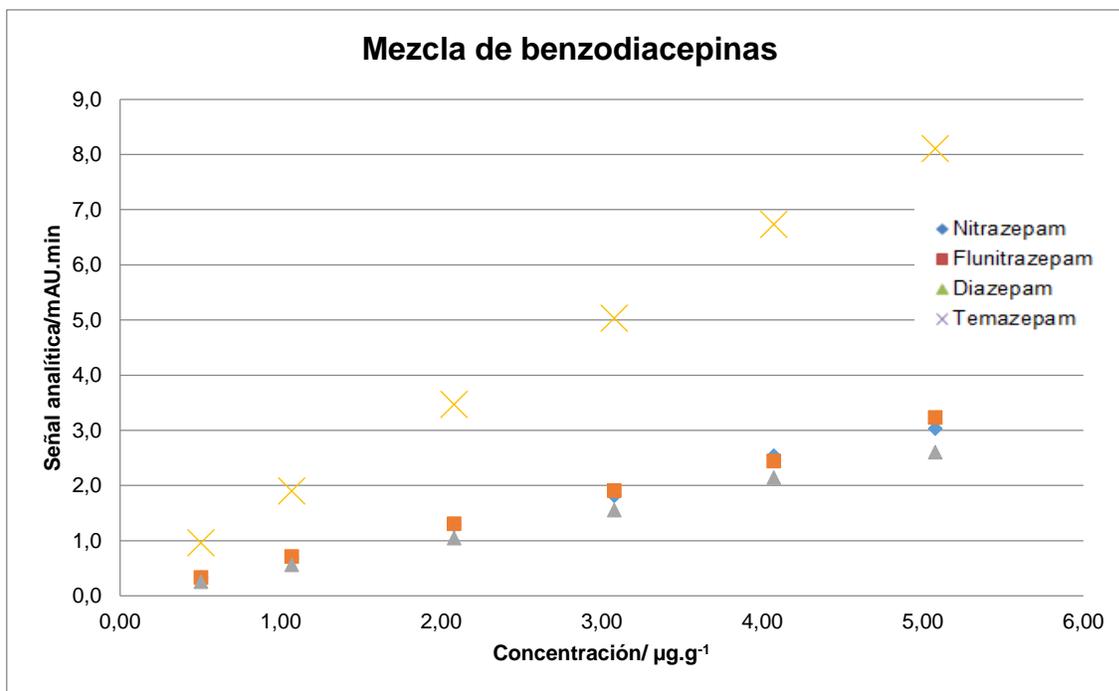


Ilustración 16. Curva de calibración para las 4 benzodiazepinas.

La recta de calibración permitió plantear la ecuación del modelo para cada una de las benzodiazepinas (ecuaciones 5, 6, 7 y 8) respectivamente.

**Ecuación 5.** Temazepam  $Y = 1.5751X + 0.1969$

**Ecuación 6.** Flunitrazepam  $Y = 0.617X + 0.0202$

**Ecuación 7.** Nitrazepam  $Y = 0.5971X + 0.03$

**Ecuación 8.** Diazepam  $Y = 0.5213X + 0.0106$

Donde Y es el área de pico en mUA.min y X la concentración en  $\mu\text{g.g}^{-1}$  del analito.

Tabla 6. Datos curva de calibración para las 4 benzodiazepinas.

Concentración $\mu\text{g.g}^{-1}$	mAU.min			
	Nitrazepam	Flunitrazepam	Diazepam	Temazepam
0,505	0,3329	0,3319	0,2592	0,9633
1,071	0,6697	0,7116	0,5607	1,8987
2,082	1,2815	1,3048	1,0443	3,4681
3,079	1,8135	1,9053	1,5565	5,0346
4,073	2,5408	2,4408	2,1407	6,7369
5,079	3,0293	3,2305	2,6051	8,1074

En la tabla 7 se van a mostrar las figuras de mérito de cada una de las Benzodiazepinas analizadas con la técnica de microextracción HF-SBME. Allí se puede evidenciar los porcentajes de recuperación entre el 87% y el 92%, asimismo, se pueden observar los límites de detección de cada compuesto.

**Tabla 7. Características analíticas del método para la HF-SBME.**

Compuesto	LOD [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	Rango lineal [ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]	$R^2$	RDS [%] N=5	Recuperación [%]
<b>Diazepam</b>	0,125	0,299 - 5,078	0,9991	2,7	89
<b>Temazepam</b>	0,112	0,268 - 5,078	0,9994	2,7	91
<b>Flunitrazepam</b>	0,218	0,520 - 5,078	0,9974	8,1	87
<b>Nitrazepam</b>	0,124	0,297 - 5,078	0,9981	3,0	92

#### **7.4. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA DIAZEPAM [87,122]**

Para la curva de calibrado se dispuso de 6 niveles de concentración, iniciando en  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  pasando luego por  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  y aumentando secuencialmente con variaciones en aumento de  $1 \mu\text{g g}^{-1}$  hasta alcanzar una concentración final de  $5 \mu\text{g g}^{-1}$ . Se somete a prueba, con una significancia del 5%, el siguiente conjunto de hipótesis:

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Donde  $\beta_1$  corresponde con la pendiente del modelo de regresión lineal simple:

$$A_{ij} = \beta_0 + \beta_1 C_i + \varepsilon_{ij}$$

el cual se obtuvo con el fin de explicar la variabilidad de la señal analítica a medida que varía la concentración de Diazepam. Se evidencia en dicho modelo que el factor concentración,  $C$ , presenta 7 niveles  $i = 0,5 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}, 1 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}, \dots, 5 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}}$ ; la respuesta  $A_{ij}$

corresponde con el área de pico para el nivel  $i$  de concentración y en su réplica  $j$ , a cuya medida le corresponde el error  $\varepsilon_{ij}$  para el mismo nivel de concentración en la misma réplica. Finalmente, el término  $\beta_0$  corresponde con la señal cuando el analito de interés se encuentra ausente, y  $\varepsilon_{ij}$  es el error aleatorio, el que supone sigue una distribución normal con media cero y varianza constante  $\sigma^2(N(0, \sigma^2))$  y del que cuyos residuos son independientes entre sí.

Mediante la suma de cuadrados para efectos fijos (modelo tipo I) se realizó el ANOVA paramétrico con el fin de elucidar el resultado de someter a prueba el conjunto de hipótesis expuesto con anterioridad (tabla 8).

Tabla 8. Análisis de la varianza (Variable Diazepam).

Análisis de la varianza (Variable Diazepam):					
Fuente	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	1	17,1962	17,1962	9226,4864	< 0,0001
Error	19	0,0354	0,0019		
Total, corregido	20	17,2316			
<i>Calculado contra el modelo <math>Y=Media(Y)</math></i>					

Existe una relación estadísticamente significativa entre la concentración de Diazepam y la señal del equipo en términos de área ( $p$ -valor < 0,0001); es decir, a medida que varía la concentración de Diazepam también lo hace de manera significativa el área de pico, esto con una significancia del 5%.

El modelo de regresión en este caso particular, y que explica la variabilidad del área de pico en un 99,79%, corresponde con:

$$A = -0,0048(\pm 0,0154) + 0,5159(\pm 0,0054)C$$

Se verificaron los supuestos que corroboran la fidelidad de la información aportada por el ANOVA paramétrica. Respecto al supuesto de normalidad de los residuos se obtuvo que estos no provenían de una distribución normal según la prueba de Shapiro-Wilk (p-valor=0,0249), esto con una significancia del 5%; sin embargo, la curva de calibrado planteada está dotada de robustez, hablando en términos estadísticos, esto debido a que todos los niveles de concentración de interés evaluados tenían el mismo número de réplicas, teniendo como tal un diseño experimental balanceado, donde la prueba F es robusta para el error tipo I en el caso de no normalidad [122] Ahora bien, respecto a la prueba de homocedasticidad se seleccionó la prueba de Brown-Forsythe, la cual proporciona buena robustez cuando la distribución subyacente de los residuos no es normal, y mediante la que se obtuvo aprobación con una significancia del 5%, es decir que las varianzas entre los diferentes niveles de concentración son estadísticamente iguales (p-valor=0,0608). Finalmente, el supuesto de independencia fue comprobado de manera gráfica, y se hizo evidente que los residuos se distribuían de manera aleatoria.

#### **7.4.1.CIFRAS DE MÉRITO DEL MÉTODO**

##### **7.4.1.1. SENSIBILIDAD DE CALIBRACIÓN**

$$S_c = \hat{\beta}_1(\pm S_{\hat{\beta}_1}) = 0,5159(\pm 0,0054)u. a./(\mu g/g)$$

Expresada como la pendiente del modelo de regresión y su respectiva desviación estándar. Por otra parte, se determinan los límites inferior y superior del intervalo en el que varía dicha sensibilidad, y se evidencia que a medida que aumenta la concentración en  $1 \mu g g^{-1}$ , el área de pico presenta un incremento desde 0,5047

hasta 0,5272 unidades de absorbancia, intervalo obtenido con una confianza del 95% y para los grados de libertad correspondientes.

#### 7.4.1.2. SENSIBILIDAD ANALÍTICA

$$\gamma = \frac{S_c}{S_y} = 12,31 \text{ g}/\mu\text{g}$$

$$\gamma^{-1} = 0,0812 \mu\text{g}/\text{g}$$

Expresada como la relación entre la sensibilidad de calibrado y el ruido instrumental. Entre el intervalo de concentraciones evaluado, se entiende el inverso de la sensibilidad analítica como la mínima diferencia de concentración que debe presentarse para que se detecte una variación en la señal que sea apreciable. En este caso particular la diferencia mínima que debe presentarse entre las concentraciones, para detectar una variación apreciable en la señal del equipo, es de  $0,0812 \mu\text{g g}^{-1}$ .

#### 7.4.1.3. LÍMITE DE DETECCIÓN (LOD)

$$LOD = \hat{\beta}_0 + 2 \times t_{0,05;19} \times S_{\hat{\beta}_0} = 0,0597 \text{ u. a.}$$

La técnica es capaz de detectar Diazepam cuando existen señales superiores a  $0,0597 \text{ u.a.}$ ; es decir, cuando el analito presenta concentraciones superiores a  $0,125 \mu\text{g g}^{-1}$ . Lo descrito aquí determinado de manera teórica.

#### 7.4.1.4. LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LOQ)

$$LOQ = \hat{\beta}_0 + 10S_{\hat{\beta}_0} = 0,1493 \text{ u. a.}$$

El Diazepam se vuelve cuantificable mediante la técnica cuando su señal es superior a 0,1493 u.a.; es decir, cuando el analito está presente en concentraciones superiores a 0,299  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

#### 7.4.1.5. RANGO DINÁMICO

En cada nivel de concentración evaluado en la realización de la curva de calibrado, se analizó que no existieran desviaciones superiores al 15% y así poder definir los extremos mínimo y máximo en donde se hiciera posible la aplicabilidad de la técnica sin pérdida de linealidad. Para ello se hizo uso de la ecuación:

$$\%d = \frac{\bar{y}_i - \hat{y}_i}{\hat{y}_i} \times 100\%$$

Donde  $\bar{y}_i$  corresponde con la señal experimental promedio, mientras que  $\hat{y}_i$  es el valor de señal pronosticado por el modelo de regresión, en ambos casos para el nivel  $i$  de concentración. En el intervalo de concentraciones evaluado las desviaciones sistemáticas máxima y mínima, de los valores experimentales respecto a los teóricos, corresponden con 2,2694% y -2,3807% respectivamente. Es decir que la técnica puede utilizarse para todo el intervalo de concentraciones evaluado. Se declara en este caso particular entonces que el rango dinámico se extiende desde 0,125  $\mu\text{g g}^{-1}$  hasta 5,078  $\mu\text{g g}^{-1}$ , teóricamente hablando.

#### 7.4.1.6. RANGO LINEAL

Se determina el cumplimiento de linealidad al relacionar la variabilidad debida al ruido experimental, reflejado en el análisis de regresión, con la variabilidad debida al ruido instrumental.

$$F_{exp} = \frac{\hat{\sigma}^2}{S_y^2} = 1,0618$$

Concluyendo para este caso particular el cumplimiento de linealidad (p-valor=0,463 para  $F_{exp}$ ), esto con una significancia del 5%. Adicional a esto, se observa que mediante el coeficiente de determinación ajustado para el modelo de regresión lineal se explica el 99,784% de la variabilidad de la señal en función de la concentración; mientras que, al hacer uso de un modelo polinomial de segundo grado se explica 99,775% con lo que se pierde representación de la variabilidad de la respuesta en función del factor. Se define entonces el rango lineal desde  $0,299 \mu\text{g g}^{-1}$  hasta  $5,078 \mu\text{g g}^{-1}$ , teóricamente hablando.

#### 7.4.1.7. EXACTITUD

Se evaluó la existencia de posible error sistemático mediante la recta de calibrado. Para esto se sometió el intercepto de la curva de calibración a prueba de hipótesis, donde si resulta que es igual a cero es porque no hay existencia de variabilidad significativa en términos de exactitud. A continuación, el conjunto de hipótesis puesto a prueba:

$$\begin{aligned} H_0: \beta_0 &= 0 \\ H_1: \beta_0 &\neq 0 \end{aligned}$$

No debe rechazarse la hipótesis nula ( $p$ -valor=0,7581), es decir el intercepto no es diferente de cero, esto con una significancia del 5%.

#### **7.4.1.8. PRECISIÓN**

Se calculó la precisión evaluando la variabilidad en los niveles cuantificables bajo, medio y alto de la curva de calibrado y tomando en todos los casos el error estándar de estimación presentado en el análisis de regresión lineal simple, respecto a cada pronóstico para los  $i =$  bajo, medio, alto, como se muestra a continuación:

$$\%Variación = \frac{\hat{\sigma}}{\hat{y}_i} \times 100\%$$

En términos de precisión se obtuvo que para niveles bajos existe falta de precisión pues el porcentaje de variación en el LOQ es de 28,9%; mientras que para los niveles medio y alto de concentración ( $2,648 \mu\text{g g}^{-1}$  y  $5,078 \mu\text{g g}^{-1}$ ) las precisiones son buenas, con porcentajes de variación de 3,17% y 1,65% respectivamente. Esto es explicable desde el aspecto de que a menores concentraciones aumenta considerablemente la variabilidad en los resultados de cualquier tipo [121].

#### **7.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS REALES**

Una vez ajustadas las condiciones de microextracción y cromatográficas se analizaron dos muestras reales de aguas residuales con el fin de detectar y cuantificar el contenido de benzodiazepinas. Se analizaron además indicadores de contenido de materia orgánica representados en DQO y DBO, así como Carbono

Orgánico Total (COT) y nitrógeno total (NT). Como se muestra en las tablas 9 y 10 se llevó a cabo una curva de calibración.

Tabla 9. **Curva de calibración Carbono Orgánico Total.**

<b>Concentración COT <math>\mu\text{g mL}^{-1}</math></b>	<b>Resultado (Abs)</b>
2,000	9,1373
10,000	26,1447
25,000	60,9030
50,000	127,5317
100,000	264,5563

Se obtiene como resultado la ecuación 9 que se representa la ecuación de la recta obtenida con un  $R^2 = 0,9987$ .

**Ecuación 9.**  $Y = 2,6259X - 0,5546$

Las determinaciones de COT en las dos muestras del estudio reflejan que la carga de la materia orgánica en los dos puntos de muestreo seleccionados se corresponde con el tipo de efluente de plantas de agua residual [109]. En la figura 14 y 15 se observan las curvas correspondientes al análisis de muestras reales.

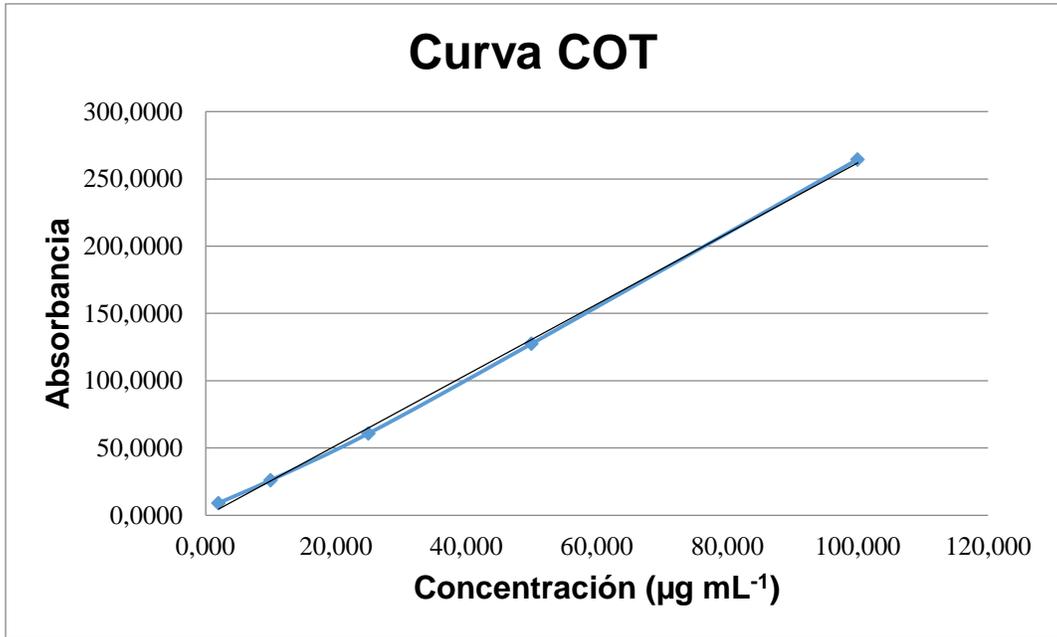


Ilustración 17. Curva de calibración Carbono Orgánico Total.

Tabla 10. Datos curva de calibración Nitrógeno Total.

Concentración µg mL <sup>-1</sup>	Señal quimioluminiscente
1,0	6344309
2,0	8816894
2,5	10650445
5,0	16187848

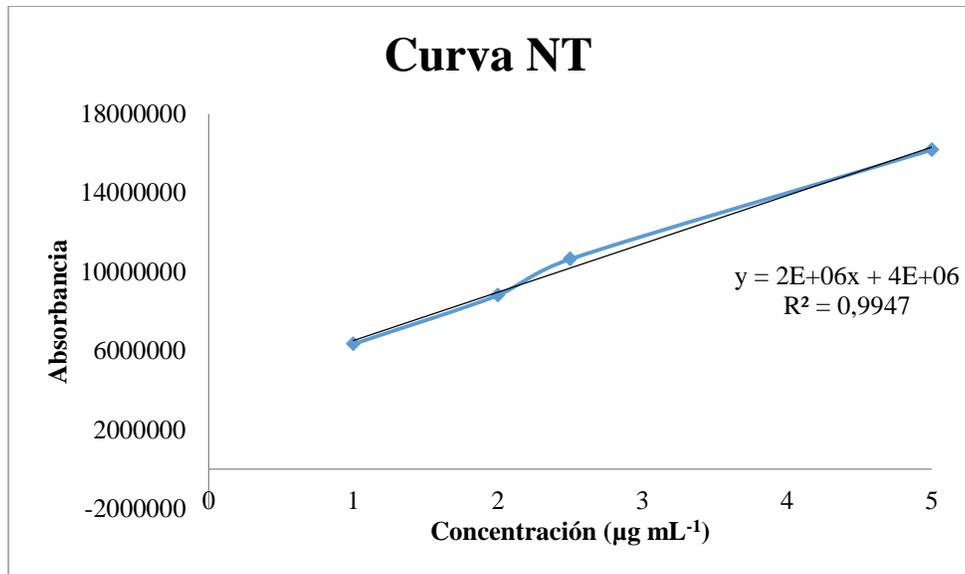


Ilustración 18. Curva de calibración Nitrógeno Total.

Se obtiene como resultado la ecuación 10 que se representa la ecuación de la recta obtenida con un  $R^2 = 0,9947$ .

**Ecuación 10.**  $Y = 2x10^6X + 4x10^6$

Las determinaciones de NT en las dos muestras del estudio correspondientes a la entrada y salida de la PTAR reflejan que una carga de materia orgánica correspondiente al tipo de efluente de aguas residuales domésticas [108]. En las tablas 11 y 12 se verifican los resultados obtenidos para las muestras de aguas residuales antes de llegar a la planta de tratamiento de aguas residuales y después de su tratamiento. Como se puede observar en la tabla, el proceso de remoción que realiza la PTAR permite evidenciar que el tratamiento que se está realizando en este tipo de aguas residuales reduce la concentración de compuestos orgánicos ya que las concentraciones no solo de carbono orgánico sino también las de nitrógeno se vieron reducidas luego que de la matriz se sometiera a los procesos de tratamiento de aguas residuales que implementa la PTAR del hospital.

Tabla 11. Resultados Carbono Orgánico Total ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) muestras reales.

	Replica 1	Replica 2	Replica 3	
	COT			COT <sub>prom</sub>
<b>Afluente</b>	15,31	19,91	17,95	17,72
<b>Efluente</b>	5,160	4,550	4,260	4,660

Tabla 12. Resultados Nitrógeno Total ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) muestras reales.

	Replica 1	Replica 2	Replica 3	
	NT			NT <sub>prom</sub>
<b>Afluente</b>	19,87	20,31	20,01	20,06
<b>Efluente</b>	15,50	16,15	16,01	15,89

## 7.6. RESULTADOS BENZODIACEPINAS

Como se puede evidenciar en la figura 16 se muestran las diferentes benzodiazepinas en diferentes concentraciones. Luego del proceso de optimización de los parámetros analíticos tanto para los compuestos de (benzodiazepinas), se realiza la microextracción de las muestras de interés. Las muestras reales y complejas son de una planta de tratamiento de aguas residuales de un hospital y allí se toman muestras del afluente y efluente.

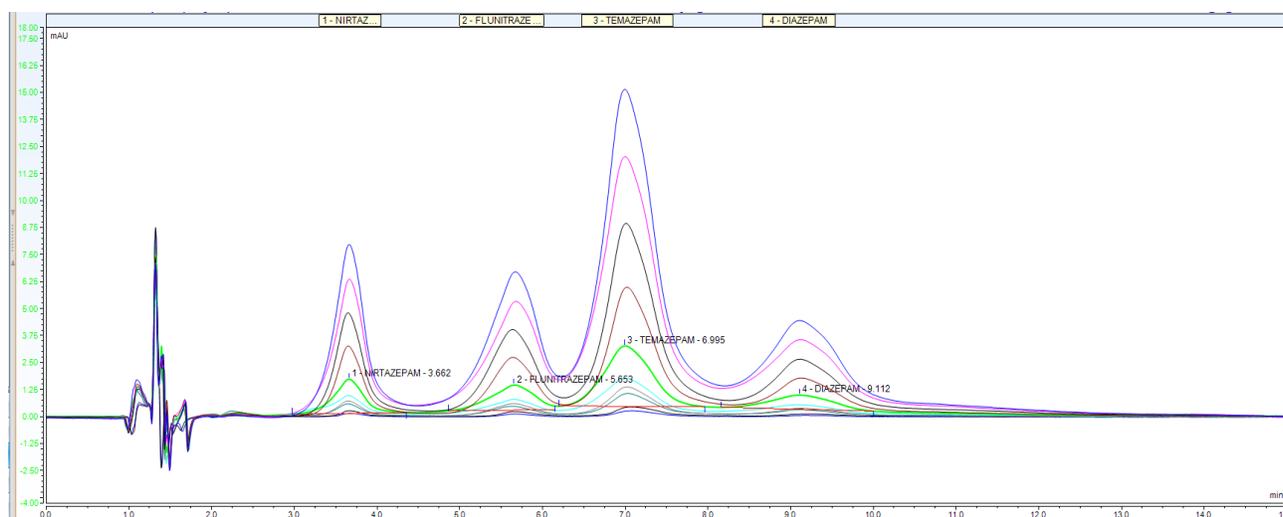


Ilustración 19. Comparación benzodiazepinas.

En la figura 17 se muestra una microextracción realizada a una muestra sintética la cual fue dopada con  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  de la mezcla de estándares de las cuatro benzodiazepinas. Se pueden observar las benzodiazepinas de interés y los diferentes tiempos de retención de cada una de ellas. Para dicha extracción se usan los parámetros establecidos por el diseño realizado.

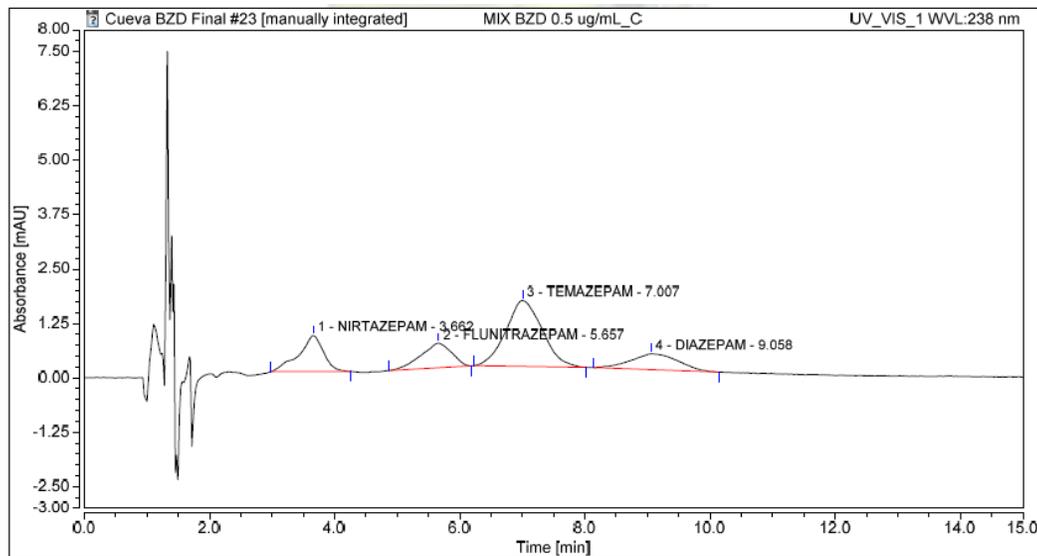


Ilustración 20. Resultados de microextracción de una mezcla de los estándares de benzodiazepinas (0,5 mg.L<sup>-1</sup>).

### 7.7. MICROEXTRACCIÓN DE MUESTRAS REALES PTAR HOSPITAL

Se utilizaron 5 mL de muestra de aguas residuales para el proceso de microextracción con los siguientes parámetros: temperatura de extracción: 30 °C, para el tiempo de extracción se iniciaron análisis usando 30 minutos; para la velocidad de agitación los parámetros estudiados fueron: 400 rpm y para el porcentaje de sal se usaron 10%.

Se establece además una longitud de la fibra de 25 mm, una longitud del pin metálico que equivale a la tercera parte del total de la fibra a usar, un volumen de muestra de 5 mL, un volumen de 1-octanol que se adiciona a la fibra de 40 µL.

En la figura 18 se puede observar que hay presencia de Diazepam, Nitrazepam y Flunitrazepam, dicho proceso de micro-extracción (ME) evidencia que dentro de la muestra analizada hay presencia de las moléculas de interés mencionadas

anteriormente, la muestra aún no ha sido sometida al proceso de remoción de materia orgánica que se lleva a cabo en la planta de tratamiento de aguas residuales.

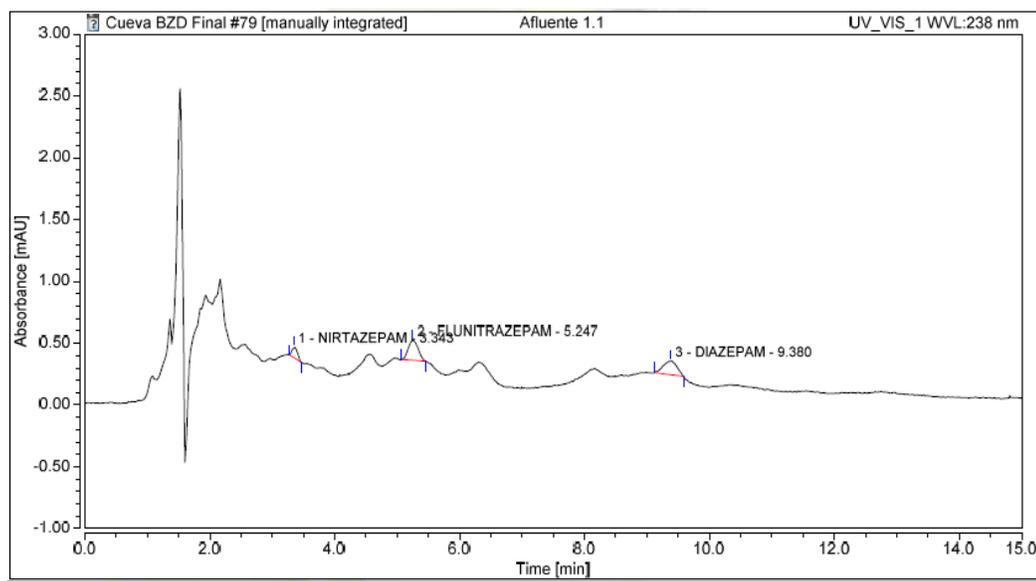


Ilustración 21. Cromatograma microextracción de benzodiazepinas en afluente PTAR Hospital.

Sin embargo, en la figura 19 se puede observar los resultados obtenidos después del proceso de microextracción de la muestra, allí no fueron detectadas las moléculas de interés, en este caso benzodiazepinas, es de aclarar que el agua analizada fue tratada previamente y se realizó la remoción de la materia orgánica presente en ella y en parte esta eliminación puede deberse a la adsorción de estos contaminantes en el lodo del sistema de lodos activados, (estudio complementario que se hace en el grupo analizando los lodos del sistema).

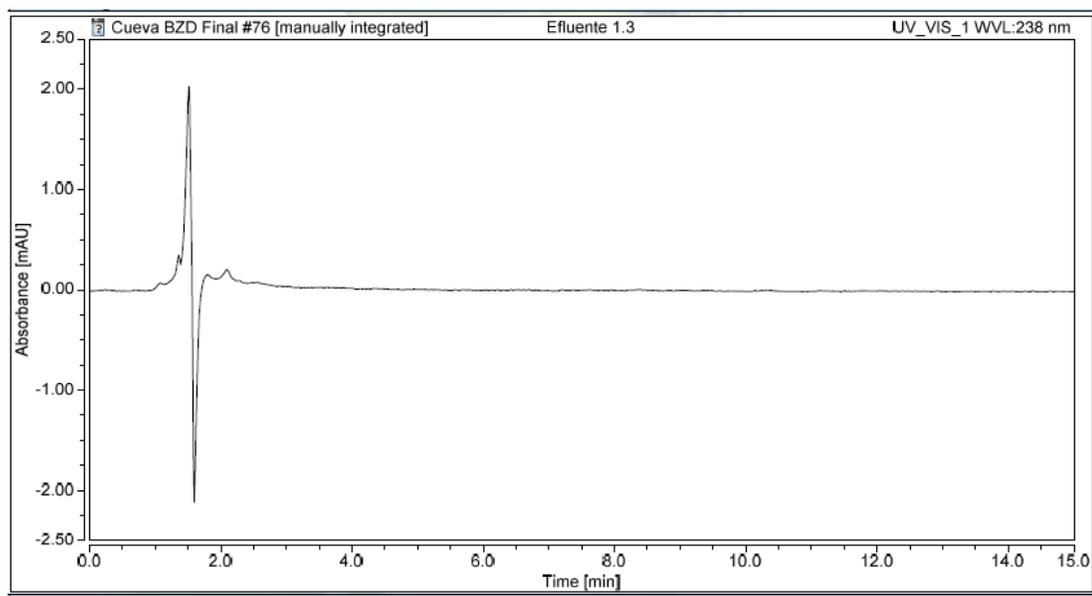


Ilustración 22. Cromatograma microextracción de benzodiazepinas en efluente PTAR Hospital.

## 8. CAPÍTULO III: CUANTIFICACIÓN DE COT RELACIONADO CON PRESENCIA DE FENOLES

### 8.1. CONDICIONES CARBONO ORGÁNICO TOTAL – COT

Para el análisis de carbono orgánico total se utilizó un equipo TELEDYNE Tekmar calibrado con estándar de ftalato ácido de potasio ( $C_8H_5KO_4$ ) (la curva de calibración se hace con base a la cantidad estequiométrica de carbono en el ftalato  $C_8H_5KO_4$ ), la temperatura del horno  $680^{\circ}C$  con un detector de infrarrojo no dispersivo NDIR (figura 20).

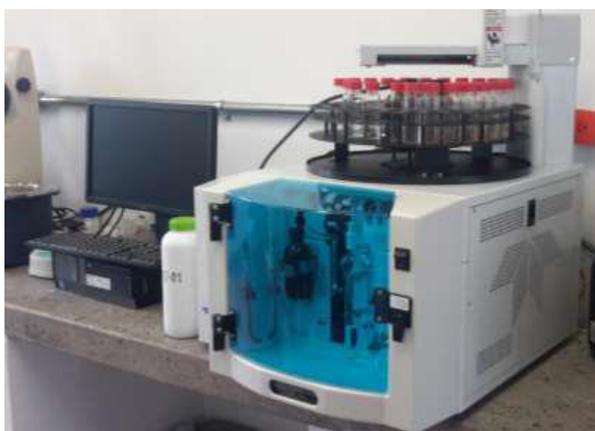


Ilustración 23. Equipo Teledyne Innovatek Tekmar.

#### 8.1.1. IMPACTO INDUSTRIAL

Para el análisis de carbono orgánico total, se preparó una concentración inicial de  $1000\text{ mg L}^{-1}$  del estándar ftalato ácido de potasio ( $C_8H_5KO_4$ ) para construir la curva de calibración. La calibración se realiza con el sistema autodilución a partir de una solución diluida de trabajo del estándar de  $100\text{ mg L}^{-1}$  (función especial con la que cuenta el equipo para asegurar una buena linealidad y buenos resultados a la hora de comparar los valores de concentración con muestras reales en el análisis).

El ftalato ácido de potasio ( $C_8H_5KO_4$ ) se utilizó como estándar para la curva de calibración. Para la curva de calibración se utilizan los datos registrados en la tabla 13.

Tabla 13. Curva de Calibración Carbono Orgánico Total.

Nivel	Concentración [ppm]	Resultado [Abs]
1	0,5	14,66
2	1,0	14,78
3	2,0	14,95
4	5,0	19,38
5	25,0	59,52
6	50,0	122,51
7	100,0	241,78

Se obtiene como resultado la ecuación 4 que representa la ecuación de la recta obtenida con un  $R^2 = 0,9962$ .

**Ecuación 4.** 
$$Y = 1,6201X + 3,743$$

Los vertimientos que se realizan dentro del cauce del río se puede evidenciar a la hora de analizar los resultados presentados en la Tabla 14, allí se puede observar las mediciones realizadas en el COT de las 3 muestras que fueron tomadas para el estudio.

Después de realizadas las mediciones se compararan las cantidades de materia orgánica total en el afluente donde se tomo la muestra mostrando una concentración de  $28,26 \text{ mg L}^{-1}$  y al realizar la misma medición de este parámetro en la fuente de agua después de pasar la zona industrial se obtuvo una concentración de  $63,07 \text{ mg L}^{-1}$ ; pero al realizar el contraste con una muestra que está fuera del trayecto de las zona industrial (500 m aguas abajo) se obtiene una

concentración de 8,06 mg L<sup>-1</sup>; mostrando que el río ha recuperado su capacidad mediante autodilución a pesar de la alta carga recibida por la actividad industrial en ese sector (tabla 14). Se puede entonces verificar que los vertimientos que están generando las industrias en dicho sector, están generando un impacto negativo aumentando la carga de compuestos contaminantes a partir de la producción de vinazas y compuestos fenólicos resultantes de sus procesos comerciales [8].

Tabla 14. Resultados Carbono Orgánico Total en muestras.

<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia relativa</b>	<b>Concentración [mg L<sup>-1</sup>]</b>
Afluente	49,54	28,26
Efluente	105,92	63,07
Fuera del vertimiento	16,8	8,06

## **8.2. FIBRA HUECA COMO BARRA DE SOLVENTE**

Igual que se analizó con las benzodiazepinas para el estudio de los fenoles se tuvo en cuenta las principales variables críticas de extracción tales como la velocidad de agitación, el efecto de la temperatura, la adición de sal y el tiempo de la extracción, esta técnica como se dijo anteriormente fue una modificación de una ya desarrollada [114].

## **8.3. REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTÁNDAR**

Se cuenta con 3 soluciones estándar de fenol, hidroquinona y pirocatecol (Figura 20) adquiridos a Sigma Aldrich (Importados a Colombia por Outsourcing Comercial S.A.S.), cada uno de ellos con una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> en 100 mL de agua ultrapura tipo I (sistema MilliQ).

## 8.4. MUESTRAS

### 8.4.1. MUESTRAS DE FUENTE SUPERFICIAL AFECTADA POR DESCARGAS INDUSTRIALES

Se eligieron tres muestras para el estudio: la primera antes de la descarga (afluente), otra después de la descarga (efluente) y otra en un río cercano lejos de la influencia de la factoría (500 m aguas abajo).

### 8.4.2. MUESTRAS DE PTAR HOSPITAL RED PÚBLICA

Se eligieron dos muestras de la planta: la primera a la entrada del tratamiento (afluente), y la segunda después del tratamiento (efluente)

Todas las muestras se tomaron según las especificaciones del Standar Methods de la AWWA WPF (figura 21).

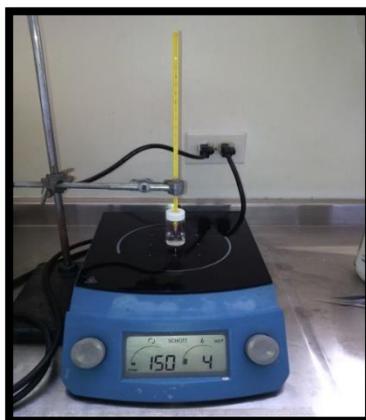


Ilustración 24. Montaje HF-SBME mezcla Fenoles 1-Octanol, 30 minutos, 700 rpm, 30°C.

## 8.5. CROMATOGRAFÍA

### 8.5.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICIENCIA CON DETECTOR DE ARREGLO DE DIODOS (HPLC-DAD)

Preliminarmente se lleva a cabo el análisis de las muestras provenientes de las descargas de aguas residuales (vinazas) del proceso en la industria destilera para el estudio de fenoles usando un cromatógrafo líquido con detector de arreglo de diodos, se utiliza una muestra con los estándares cuya concentración es de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$  como se muestran en la figura 22.

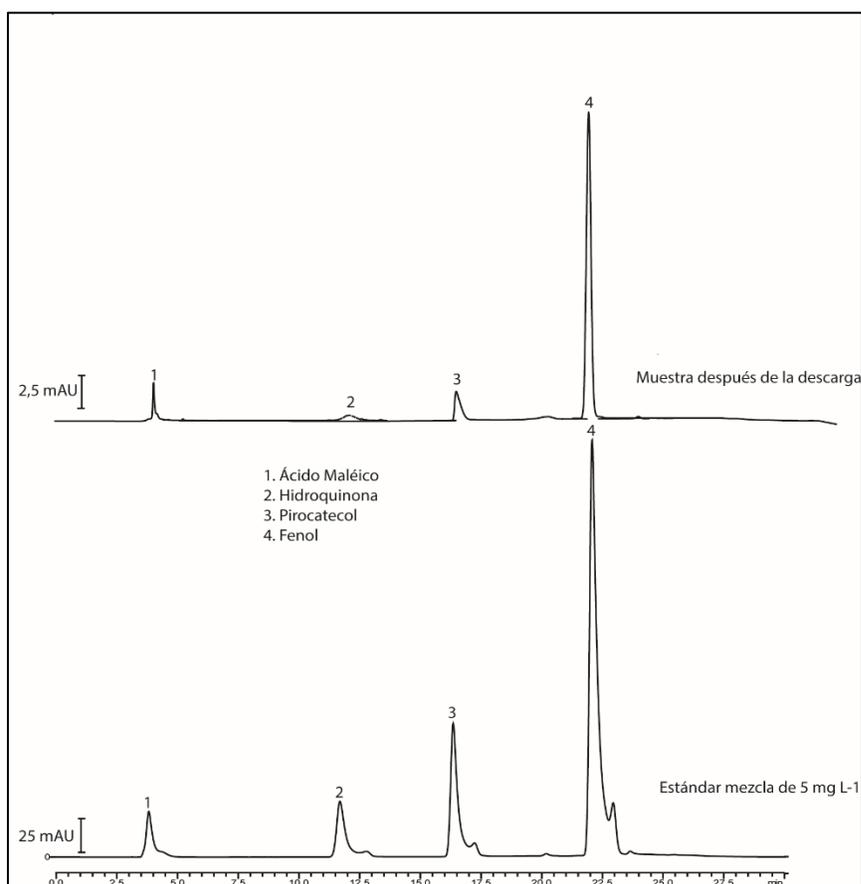


Ilustración 25. Análisis preliminar en HPLC-DAD de una mezcla de estándar de Fenoles Cromatografía Líquida.

### 8.5.2.CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS EN UHPLC-UV

Para el análisis cromatográfico de análisis definitivo, con la mejor condición de longitud de onda establecida arriba, se usó un equipo UHPLC Thermo U- Dionex con un detector ultravioleta (UV). Se utilizó una columna Pinnacle II C-18 (100 mm x 2,1 mm ID x 5,0  $\mu\text{m}$  tamaño de partícula); para la fase móvil se usó una mezcla de agua: ácido fórmico 0,01 % (solvente A) y metanol (solvente B) (Figura 23). Se llevó a cabo el análisis con un método de gradiente usando una velocidad de flujo de 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$ , el tiempo de análisis fue de 9 minutos con una longitud de onda de 264 nm, como se muestra en la Tabla 15.

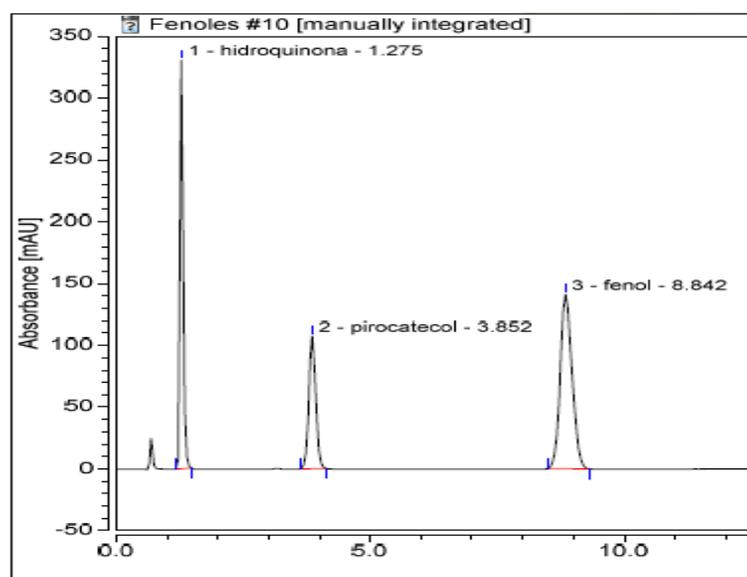


Ilustración 26. Cromatograma de la mezcla estándar de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de compuestos fenólicos y muestra después de descarga de vinazas a fuente superficial.

Es importante considerar que en la tabla 15 se muestran los gradientes que se utilizaron con el fin de analizar la longitud de onda que permitiera un mejor análisis de los fenoles (HPLC-DAD) para luego poder realizar dicha cuantificación en un

equipo UHPLC-UV donde se requiere de la longitud de onda que presente mejores resultados.

Como se mencionó anteriormente, las condiciones que se tuvieron en cuenta para la determinación de los compuestos fenólicos en aguas residuales fueron 30 minutos de tiempo de extracción, la temperatura de extracción: 30 °C, velocidad de agitación: 700 rpm, disolvente: 1-octanol y 5% adición de sal, posteriormente se realiza la microextracción en fase líquida con fibra hueca como barra de solvente (HF-SBME). El análisis cromatográfico se realizó por UHPLC-UV [8].

Tabla 15. Gradiente de concentraciones para el análisis de fenoles.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Concentración B (Gradiente)</b>
0,01	0,00
7	2,00
10	10,00
20	40,00
22	40,00
29	2,00
30	Stop

La figura 24 se pueden evidenciar algunos de los fenoles obtenidos en el análisis realizado por UHPLC-UV, allí se muestra el resultado del análisis cromatográfico de los extractos microextraídos a las condiciones óptimas de una mezcla de los estándares de compuestos fenólicos y una muestra a la salida de la descarga (efluente) [8].

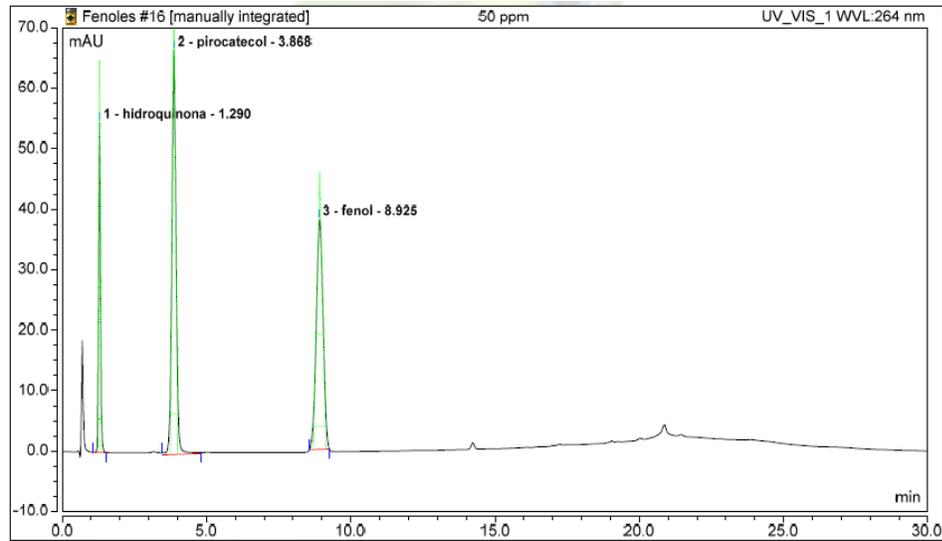


Ilustración 27. Cromatogramas superpuestos de una mezcla estándar de compuestos fenólicos (50 mg.L-1) y muestra después de descarga de vinazas a fuente superficial.

### 8.5.3. MUESTRAS PTAR

En la figura 25 se pueden observar la aparición de dos compuestos fenólicos en las muestras reales analizadas, cabe resaltar que la muestra no ha sido tratada y posee la descarga de materia orgánica que es vertida en las fuentes de agua.

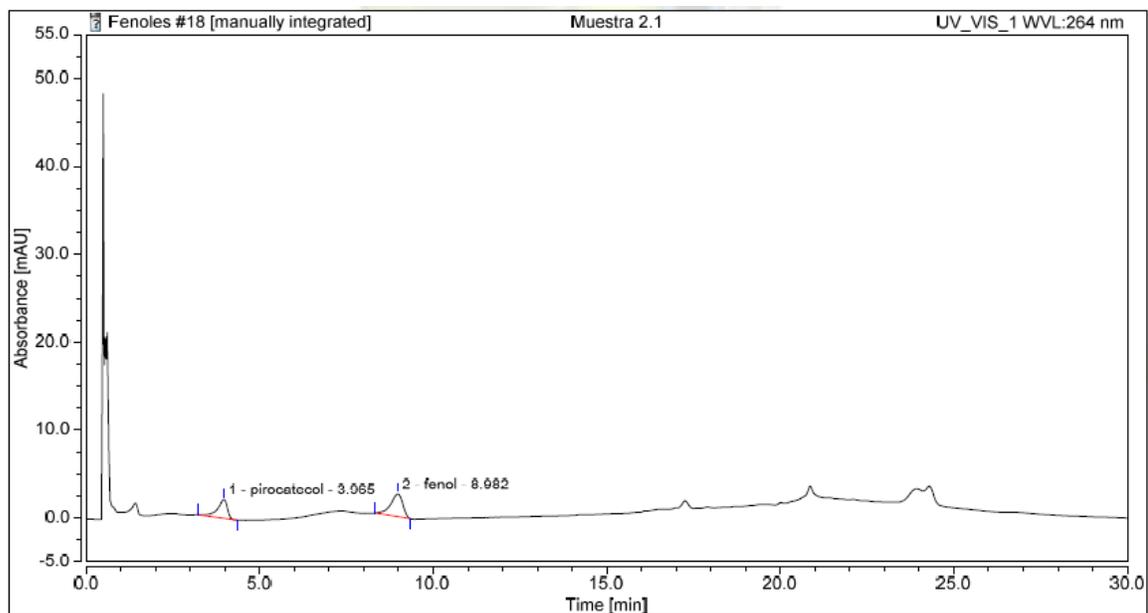


Ilustración 28. Cromatograma microextracción de fenoles en afluente PTAR.

En la figura 26 se pueden observar que no hay presencia de compuestos fenólicos, dicho proceso depuración en la PTAR mediante lodos activados permite determinar que el tratamiento posibilita la remoción de los compuestos orgánicos.

Allí es donde toma importancia la generación de sistemas de tratamientos de aguas residuales ya que favorecen procesos que buscan la protección de la salud pública y el ambiente. Si las aguas residuales van a ser vertidas a un cuerpo receptor natural (mar, ríos, lagos), será necesario realizar un tratamiento para evitar enfermedades causadas por bacterias y virus y contaminantes emergentes como los tratados en este estudio, en las personas que entran en contacto con esas aguas, y también para proteger la fauna y flora presentes en el cuerpo receptor natural.

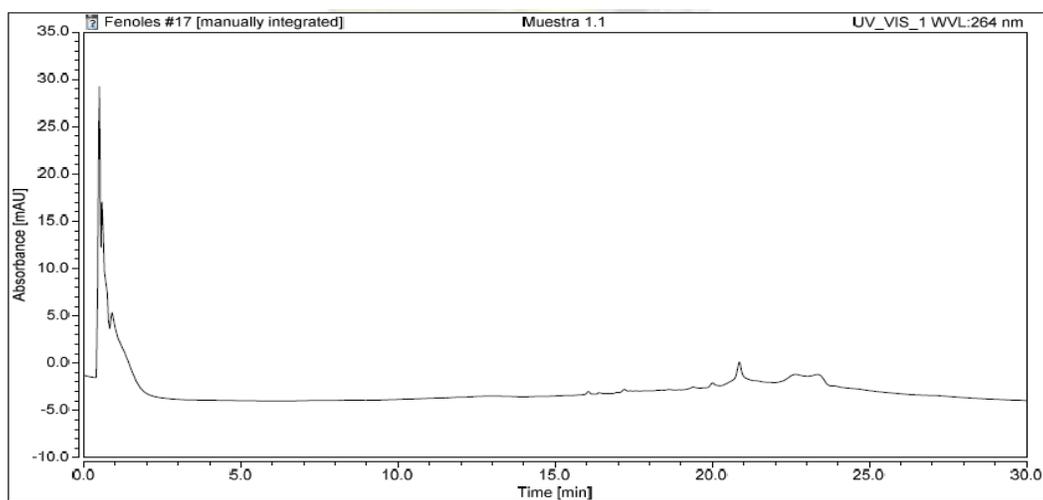


Ilustración 29. Cromatograma microextracción de fenoles en efluente PTAR.

## 9. COMPARACIÓN ENTRE TÉCNICAS

Como se puede observar en la tabla 15 se han usado diferentes técnicas para el análisis de compuestos de preocupación emergentes con el fin de poder cualificar y cuantificar dichos analitos para su posterior estudio. Como se muestra en la tabla, técnicas como SPE, CNT y SPME logran procesos de extracción que oscilan entre el 80% y 99% de porcentajes de recuperación, cada una de las técnicas presentan matrices y parámetros analíticos que, gracias a la preparación de muestras se pueden optimizar para su posterior validación. Las diferentes condiciones de tratamiento de la muestra, el factor de concentración que proporciona la fibra hueca y que al funcionalizarla como barra de solvente, permite que la extracción y posterior análisis de la matriz permita obtener resultados que están dentro de aquellos que arrojan otro tipo de técnicas de extracción. Es importante recalcar, que las diferentes técnicas proporcionan resultados que permiten luego ser evaluados por técnicas cromatográficas que permiten un mayor nivel de precisión y de seguridad para el analista. Es decir, las técnicas de microextracción no solo apuntan cada vez al no uso de compuestos orgánicos en grandes cantidades, sino que además buscan funcionalizar y mejorar las condiciones de extracción para que puedan ser más versátiles a la hora de analizar no solo diferentes matrices, sino además obtener mejores porcentajes de recuperación y diferentes analitos. Con base en lo que se plantea en la tabla 16 se puede deducir que la técnica HF-SBME permite el estudio de diversos compuestos de interés, en este caso particular Benzodiazepinas y fenoles los cuales han ido tomando gran interés como contaminantes de preocupación emergente, así mismo

el método arroja porcentajes de recuperación que oscila entre los 87% y 92% comparada con otras técnicas que arrojan porcentajes de recuperación entre el 85% [124] o el 80,2% [125] se puede concluir que la microextracción con fibra hueca como barra de solvente puede ser una de las técnicas que permita el análisis de diversos compuestos de interés analítico que se encuentran en concentraciones muy bajas (nivel trazas) y que gracias a la técnica (buscando cumplir los objetivos y retos planteados en la preparación de muestras) se puedan analizar por métodos cromatográficos presentes en los laboratorios de análisis de este tipo de matrices, en el caso particular de aguas residuales.

Tabla 16. Aplicación de otras técnicas para el análisis de benzodiazepinas y compuestos fenólicos en matrices acuosas y biológicas.

MÉTODO	MATRIZ	TÉCNICA	LoD ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	LoQ ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	% RECUPERACIÓN	REFERENCIA
Se desarrolló y validó un método analítico simple usando SPE seguido por un HPLC-DAD.	Centros de Atención Psicosocial (CAPS) en las aguas de los ríos urbanos (subcuenca de Belém, Curitiba, PR, Brasil).	SPE	0,0670 (Carbamazepina) 0,130 (Carbamazepina)	0,209 (Diazepam) 0,435 (Diazepam)	85,8 % - 98,4%	[124]
Aplicaciones recientes de CNT como sorbentes eficientes para el análisis de muestras biológicas. (HPLU-UV)	Orina (Muestras Biológicas)	CNT	9 - 15	-	-	[123]
Utilización de MOFs para SPE y SPME de diferentes compuestos orgánicos e inorgánicos de medios biológicos.	Orina (Muestras biológicas)	$\text{Fe}_3\text{O}_4$ - $\text{NH}_2$ / bio-MOF <sup>1</sup>	0,00071–0,00249	-	-	[123]
Se desarrolló un método alternativo para sintetizar marcos organometálicos de adenato de cobalto magnético, y se examinaron los materiales sintetizados para determinar su posible aplicación para separar y enriquecer benzodiazepinas de muestras complejas. (LC-MS)	Orina (Muestras Biológicas) Aguas residuales	Fibras Metálicas.	0,71 - 2,49	-	80,2 % - 94,5% para orina 84,1 % - 94,4 % para aguas residuales	[125]
Aplicación de la microextracción en fase sólida (SPME), utilizando fibras como medio de extracción, acoplada a diferentes técnicas cromatográficas en el desarrollo de métodos analíticos para la determinación de diferentes familias de contaminantes orgánicos en aguas. (LC-MS) (GC-FID)	Orina (Muestras Biológicas) Aguas residuales	Fibras Supel-Q PLOT (BZD) BP-20 PEG Fenoles)	1-50	-	-	[126]
Estandarizar un método analítico para la extracción y determinación de cipermetrina en muestras de pastos utilizando microextracción en fase sólida (SPME) en modo de inmersión con posterior desorción y determinación por cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).	Muestras medioambientales o biológicas	SPME	1,53	4,97	99,08%	[127]
Técnica de microextracción para el análisis de contaminantes de preocupación emergente en aguas residuales. (HF-SBME)	Muestras de aguas residuales. PTAR de hospital.	HF-SBME	Diazepam: 0,125 Temazepam: 0,112 Flunitrazepam: 0,218 Nitrazepam: 0,124	Diazepam: 0,1493 Temazepam: 0,5488 Flunitrazepam: 0,3341 Nitrazepam: 0,1965	87 % – 92 %	Este trabajo

## 10. CONCLUSIONES

Teniendo como base el proceso de fibra hueca en modo “stir bar” se han desarrollado diferentes combinaciones modo “solvent bar”, “solid bar” y “hollow bar”. Para la técnica de fibra hueca en modo “solvent bar” se realizó el proceso de optimización sobre las variables críticas de extracción (velocidad de agitación, tiempo de extracción, concentración de sal y temperatura de extracción) llevándolo al campo del análisis de muestras dopadas y en algunos casos a muestras acuosas reales (aguas residuales).

Siendo una técnica que permite el análisis de diversas moléculas, las características analíticas fueron clave fundamental a la hora de obtener resultados que respondan a los procedimientos en el campo de la preparación de muestra, acercándose cada vez a tendencias que buscan como base principal la química verde, la preconcentración de los analitos estudiados son un factor importante a tener en cuenta, ya que dentro de las muestras analizadas se tienen bajas concentraciones de las moléculas de interés, problema que se suple con los buenos factores de preconcentración alcanzados permitiendo así una alta detectabilidad en los equipos de cromatografía utilizados, arrojando bajos límites de detección y de cuantificación, que se pueden incluso mejorar aún más con el solo aumento del volumen de muestra a manejar o disminuyendo el volumen de fase aceptora (solvente orgánico) o una combinación de ambos.

La microextracción “solvent bar” se destaca en el factor de concentración (FC) siendo aproximadamente entre 160 y 300 veces, por lo que para cada ensayo de

microextracción es posible utilizar una nueva fibra con ello se evita el efecto matriz y memoria, además el uso de una cantidad menor del solvente inferior a los 40  $\mu\text{L}$ , y que a la vez la fibra sirve de barrera para la limpieza de la muestra, aunque en muchas ocasiones en el momento de la extracción por el proceso de la agitación se puede perder parte del solvente o en algunos casos en su totalidad.

Al analizar la presencia de benzodiazepinas en las muestras de aguas residuales analizadas es importante resaltar que dichas concentraciones no superan la norma ya que son respectivamente: Flunitrazepam ( $0,026 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y para el Diazepam ( $0,04679 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) y el Nitrazepam se encuentra en trazas entre el LoD y el LoQ, por lo cual el equipo logra identificarlo dentro de las muestras de estudio, pero no se puede realizar su cuantificación.

Basado en los resultados se puede verificar que la carga de materia orgánica en el río seleccionado se ve afectada por los vertidos industriales que se llevan a cabo en el cauce del río. Estos resultados dan una evidencia de como el vertimiento de dichas vinazas genera un aumento de los compuestos fenólicos en el afluente afectando así sus propiedades fisicoquímicas generando un impacto negativo para el ambiente.

## 10.1. RECOMENDACIONES

La técnica desarrollada presentada en este trabajo de investigación hace parte de un pequeño aporte para la determinación de un sin número de compuestos orgánicos de interés ambiental (THM, compuestos fenólicos, drogas de abuso, compuestos organofosforados, plaguicidas, micotoxinas), lo cual demuestra la versatilidad de la técnica de microextracción la cual no solo aporta al medio ambiente sino para el análisis de diferentes tipos de moléculas en futuras investigaciones.

Debido a su versatilidad se debe buscar la implementación de la técnica en diferentes matrices acuosas más complejas (lixiviados, aguas residuales) y matrices biológicas (orina, sangre), para determinar la efectividad de la nueva técnica y cómo dicha metodología permitirá usos cada vez más variados, posicionándose sobre las demás técnicas de extracción convencionales.

Otro punto a tener en cuenta es el proceso de automatización del método de microextracción, el cual cumpliría con los propósitos de la preparación de muestras, logrando así una mayor facilidad para el manejo de un gran número de muestras en el laboratorio de rutina facilitando así que se pueda replicar y reproducir optimizando no solo tiempo sino diferentes tipos de moléculas. En este aspecto el grupo con el apoyo del programa de Mecatrónica ha desarrollado un prototipo en planos para avanzar en la automatización de la técnica solvent bar (<https://onedrive.live.com/?authkey=%21ABc0xu4YMoSwiFk&cid=28A79F1321162205&id=28A79F1321162205%213328&parId=28A79F1321162205%212974&o=OneUp>).

Cabe recalcar que la técnica de microextracción ya sea en modo barra de solvente, empacada con arcilla funcionalizada, en modo barra de agitación le permite al analista poder elegir diferentes formas de análisis, por esta razón se debe buscar aumentar el número de moléculas que puedan ser analizadas, generando así un mayor rango de posibilidades que permitirá generar resultados cada vez más satisfactorios y lograr un análisis más completo de las muestras, ya que siempre no se puede contar con equipos robustos como el GC-MS, para determinar las moléculas involucradas, ya que en nuestro país día a día siguen apareciendo moléculas que han tomado interés para su análisis por la connotación negativa que estas tienen para el medio ambiente, caso puntual el de los contaminantes de preocupación emergente.

Cumplir con las tendencias de la química verde y eco-eficiencia, no solo por la variedad de solventes que pueden ser utilizados tanto en modo dos fases como en tres fases, así se podrá mejorar la extracción de las moléculas al tener en cuenta su afinidad; asimismo esto puede mejorarse al desarrollar fibras que puedan extraer moléculas con afinidad a la fibra siendo más selectivas, sin la necesidad de utilizar solventes orgánicos o sistemas que sean muy complejos en el proceso de la extracción.

El análisis de los fenoles se realizó de forma preliminar tomando como base algunas de las condiciones ya establecidas para la cuantificación de moléculas para HPLC que se han realizado dentro del grupo de investigación y teniendo en cuenta la revisión bibliográfica realizada, por esta razón es importante considerar el estudio de dichos compuestos para su cuantificación considerando todas las

cifras de mérito y características analíticas para este tipo de muestras y moléculas en específico.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. **Díaz Cadavid, Abel.** *Diseño Estadístico de Experimentos.* Medellín. : Universidad de Antioquia., 2009.
2. **Lizarazo Becerra, Jenny Milena y Orjuela Gutiérrez, Martha Isabel.** *Sistemas de plantas de tratamiento de aguas residuales en Colombia.* Bogotá : Universidad Nacional de Colombia., 2013.
3. **Lozano Rivas, William Antonio.** *Fundamentos de diseño de plantas depuradoras de aguas residuales.* Bogotá : Universidad Piloto de Colombia, 2012.
4. **Schiappacasse, Eduardo Antonio.** *Planta de tratamiento de aguas residuales.* Buenos Aires. : Ministerio de Educación, Ciencia y Tecnología. INET., 2006. 950-00-0539-5..
5. *Contaminantes emergentes en el agua.* **Becerril Bravo, José Elías.** 8, Ciudad de México : Revista Digital Universitaria, 2009, Vol. 10. 1067-6079.
6. *Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM).* **Peña Álvarez, Araceli y Castillo Alanís, Alejandra.** 1, Coyoacán : Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 2015, Vol. 18. 2395-8723.
7. **Montagner Raimundo, Cassiana Carolina.** *Contaminantes emergentes em água tratada e seus mananciais: sazonalidade, remoção e atividade estrogênica.* Campinas : Universidade Estadual de Campinas, 2011.

8. *Contaminantes emergentes: efectos y tratamientos de remoción.* **García Gomez, C, Gortáres-Moroyoqui, P y Drogui, P.** 2, Buenos Aires : Química Viva, 2011, Vol. 10. 1666-7948.

9. *Determinación de compuestos fenólicos mediante microextracción con solventes usando HPLC-UV en muestras de aguas residuales contaminadas con vinazas.* **Largo Taborda, Wilson Alejandro y Rosero Moreano, Milton.** 2, Manizales : Scientia Chromatographica, 2016, Vol. 8. 1984-4433.

10. *DEVELOPMENT A LIQUID PHASE MICROEXTRACTION METHOD WITH HOLLOW FIBER HF- SBLPME FOR ANALYSIS OF ORGANOCHLORINE COMPOUNDS IN WATER SAMPLES BY GC-ECD.* **Fiscal Ladino, Jhon Alexander, y otros, y otros.** 4, Manizales : Scientia Chromatographica, 2014, Vol. 6. 1984-4433.

11. *Solventless Microextraction Techniques for Determination of Trihalomethanes by Gas Chromatography in Drinking Water.* **Rosero Moreano, Milton, y otros, y otros.** 2, Zaragoza - Manizales : Water, Air, & Soil Pollution, 2011, Vol. 223. 1573-2932.

12. *Automated dispersive liquid-liquid microextraction based on the solidification of the organic phase.* **Vargas Medina, Deyber Arley, y otros, y otros.** 1, Palma de Mallorca : Talanta, 2018, Vol. 189. 0039-9140.

13. *A microwave-assisted fluorescent labeling method for the separation and detection of amphetamine-like designer drugs by capillary electrophoresis.* **Chen,**

**Kuan Fu, y otros, y otros.** 1 - 3, s.l. : Forensic Science International, 2013, Vol. 228. 0379-0738.

14. *Extraction and sample preparation.* **Lee, Hian Kee y Chung, Doo Soo.** 1, s.l. : Journal of Chromatography A, 2013, Vol. 1200. 0021-9673.

15. *Application of nanomaterials in sample preparation.* **Tian, Jingyu, y otros, y otros.** 1, s.l. : Journal of Chromatography A, 2013, Vol. 1300. 0021-9673.

16. *Estudio del impacto ambiental del vertimiento de aguas residuales sobre la capacidad de autodepuración del río Portoviejo, Ecuador.* **Quiroz Fernández, Luis Santiago, Izquierdo Kulich, Elena y Menéndez Gutiérrez, Carlos.** 1, Portoviejo : Centro Azúcar, 2018, Vol. 45. 2223- 4861.

17. **Atencia Berbesi, Carlos Alberto.** *Diagnóstico de la contaminación por vertimientos de aguas residuales domésticas y residuos sólidos domésticos sobre la microcuenca monte dentro hasta el sector de la bocatoma del acueducto de la ciudad de Pamplona.* San Jose de Cucuta : Universidad Libre de Colombia, 2007.

18. **Hidalgo Santana, Maritza y Mejía Álvarez, Elizabeth.** *Diagnóstico de la contaminación por aguas residuales domésticas, cuenca baja de la quebrada La Macana, San Antonio de Prado. Municipio de Medellín.* Medellín : Universidad de Antioquia, 2010.

19. *Calidad Agronómica de efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales.* **Rodríguez Ortiz, J. C, y otros, y otros.** 3, Mérida, Yucatán : Tropical and Subtropical Agroecosystems, 2009, Vol. 10. 1870-0462.

20. *Photocatalytical polishing of paper-mill effluents*. **Moiseev, A, y otros, y otros**. 4, s.l. : Water Science and Technology, 2004, Vol. 49. 1996-9732.
21. *Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos*. **Gil, Miriam Janet, y otros, y otros**. 2, s.l. : Producción + Limpia, 2012, Vol. 7.
22. *Tratamiento de las aguas residuales de una industria textil utilizando colector solar*. **Garcés Giraldo, Luis Fernando y Peñuela Mesa, Gustavo Antonio**. 2, Medellín : Revista Lasallista de Investigación, 2007, Vol. 4. 1794-4449.
23. *Energy Generation Potential in Greece From Agricultural Residues and Livestock Manure by Anaerobic Digestion Technology*. **Vlyssides, Apostolos, Mai, Sofia y Barampouti, Elli María**. 5, s.l. : Waste and Biomass Valorization, 2015, Vol. 6. 1877-2641.
24. *Enhancement of the anaerobic digestion of wine distillery wastewater by the removal of phenolic inhibitors*. **Borja, R, y otros, y otros**. 2, Cordoba : Bioresource Technology, 1993, Vol. 45. 0960-8524.
25. *Sample treatment platform for automated integration of integration of microextraction techniques and liquid chromatography analysis*. **Vargas Medina, Deyber Arley, y otros, y otros**. Sao Paulo : HardwareX, 2019, Vol. 6. 2468-0672.
26. *Tratamiento de aguas contaminadas con residuos fenólicos mediante células de C. freundii con actividad tirosinfenoliasa*. **M.J, Rodríguez, S.G.J, Sosa y G.Y, Garza**. Coahuila : Federación Mexicana de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales;, 1997.

27. *Biodegradación de compuestos fenólicos del alpechín con Aspergillus terreus*. **Martínez Nieto, Leopoldo, y otros, y otros.** 2, Granada : Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), 1992, Vol. 43. 0017-3495.
28. *Tratamiento de aguas residuales fenólicas de refinería por métodos electroquímicos*. **Abreu Cuadra, Rebeca, y otros, y otros.** 3, Punto fijo : Multiciencias, 2016, Vol. 16. 1317-2255.
29. **Seoáñez Calvo, Mariano.** *Manual de tratamiento, reciclado, aprovechamiento y gestión de las aguas residuales de las industrias agroalimentarias*. España : Ediciones Mundi-Prensa, 2002. 9788484761044.
30. *Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: productos farmacéuticos*. **Jiménez Cartagena, Claudio.** 2, Medellín : Revista Lasallista de Investigación, 2011, Vol. 8. 1794-4449.
31. *Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation*. **Gavrilescu, María, y otros, y otros.** 1, s.l. : New Biotechnology, 2015, Vol. 32. 1871-6784.
32. *Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes*. **Barceló, L Damia y López de Alda, María José.** Barcelona : Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales.
33. *Índices de calidad de agua en fuentes superficiales utilizadas en la producción de agua para consumo humano. Una revisión crítica*. **Torres, Patricia, Cruz, Camilo Hernán y Patiño, Paola Janeth.** 15, Medellín : Revista Ingeniería Universidad de Medellín, 2009, Vol. 8. 1692-3324.

34. **Ministerio, de Salud Pública.** *Normas Oficiales para la calidad del agua.* Colombia. Bogotá : ICONTEC.
35. **Rosero, M, y otros, y otros.** *Presencia de materia orgánica y subproductos de la desinfección con cloro, caso sistema de tratamiento de agua para consumo humano, Puerto Mallarino, Cali - Colombia.* Cali : Seminario Internacional: Visión integral en el mejoramiento de la calidad del agua, 2005.
36. **Ministerio de Ambiente, Vivienda y desarrollo Territorial.** *Decreto 3930 de 2010 Nivel Nacional.* Bogotá : Propiedad de la Secretaría General de la Alcaldía Mayor de Bogotá D.C., 2010.
37. **Sostenible, Ministerio de Ambiente y Desarrollo.** *Resolución 631 de 2015.* Bogotá : Diario Oficial No. 49.486 de 18 de abril de 2015, 2015.
38. **APHA/AWWA/WEF.** *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.* Estados Unidos : Washington DC, 2012. 978-087553-013-0.
39. **Sostenible., Ministerio de Ambiente y Desarrollo.** *Resolución 0883.* Bogotá : s.n., 2018.
40. **REPÚBLICA DE COLOMBIA.** *Código Nacional de Recursos Naturales Renovables y de Protección. DECRETO 2811 DEL 18 DE DICIEMBRE DE 1974.* Bogotá : s.n., 1974.
41. **Ministerio de Medio Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial.** *Plan Nacional de manejo de aguas residuales municipales en Colombia.* Bogotá : Departamento Nacional de Planeación, 2004.

42. **Carvajal Jimenez, Elsa Victoria y Esparragoza Zárate, Rafael Alberto.** *Análisis de la normatividad ambiental colombiana para el vertimiento de aguas residuales al sistema de alcantarillado público.* Floridablanca : Universidad Pontificia Bolivariana, 2008.
43. **Ayuso Gutiérrez, José Luis.** *¿Está justificado el tratamiento prolongado con benzodiazepinas?* Madrid : Salud Mental, 2008. 0185-3325.
44. *Elevado consumo de benzodiazepinas en mujeres ancianas asignadas a centros de salud urbanos de atención primaria.* **Bejarano Romero, Ferran, y otros, y otros.** 12, Madrid : Atención Primaria, 2008, Vol. 40. 0212-6567.
45. *Solid-phase dispersive extraction method for analysis of benzodiazepine drugs in serum and urine samples.* **Saito, Kpichi, Kikuchi, Yuu y Saito, Rieko.** Tokyo : Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2014, Vol. 100. 0731-7085.
46. *Appropriate Use of Benzodiazepines Zolpidem and Zopidone in Diseases Attended in Primary Care.* **Granados Menéndez, M. Isabel, y otros, y otros.** 3, Madrid : Atención Primaria, 2006, Vol. 38. 0212-6567.
47. *High-performance liquid chromatographic method for the determination of benzodiazepines in plasma or serum using the column-switching technique.* **El Mahjoub, Anissa y Staub, Christian.** 2, Ginebra : Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications, 2000, Vol. 742. 1570-0232.
48. **Morales Sánchez, Viviana Andrea.** *Microextracción con membrana hueca en barra de solvente para el análisis de benzodiazepinas en muestras de orina por*

*cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de ultravioleta visible.*  
Manizales : Universidad de Caldas, 2018. Tesis de Maestría.

49. *Interventions for reducing benzodiazepine use in older people: meta-analysis of randomised controlled trials.* **Gould, Rebecca L., y otros, y otros.** 2, Londres : The British Journal of Psychiatry, 2014, Vol. 204. 1472-1465.

50. *Risk factors associated with benzodiazepine use among people who inject drugs in an urban Canadian setting.* **Tucker, Devin, y otros, y otros.** Vancouver : Addictive Behaviors, 2016, Vol. 52. 0306-4603.

51. **Caudevilla Gáligo, Fernando.** *Drogas: conceptos generales, epidemiología y valoración del consumo.* s.l. : Grupo de Intervención en Drogas semFYC.

52. **Lezcano, Pedro y M. Mora, Luís.** *Las vinazas de destilería de alcohol. Contaminación ambiental o tratamiento para evitarlo.* Guanare : VIII Encuentro de Nutrición y Producción de Animales Monogástricos, 2005. Conferencia.

53. *Aplicaciones ambientales de la adsorción mediante biopolímeros naturales: Parte 1-Compuestos fenólicos.* **Cuizano, Norma A., Llanos, Bertha P. y Navarro, Abel E.** 4, Lima : Revista de la Sociedad Química del Perú, 2009, Vol. 75. 1810-634X.

54. *The study of phenolic profiles of raw apricots and apples and their purees by HPLC for the evaluation of apricot nectars and jams authenticity.* **Dragovic-Uzelac, Verica, y otros, y otros.** 2, Croacia : Food Chemistry, 2005, Vol. 91. 0308-8146.

55. *Extraction, Separation, and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS.* **Tasioula-Margari, María y Tsabolatidou, Eleftheria.** 3, Ioánina : Antioxidants, 2015, Vol. 4. 2076-3921.
56. **Gonzalez Jimenez, Francisco Erik.** *Caracterización de compuestos fenólicos presentes en la semilla y aceite de chia (salvia hispánica l.) mediante electroforesis capilar.* s.l. : Instituto Politécnico Nacional, 2012. Tesis de Maestría.
57. *Determination of antioxidant activity in free and hydrolyzed fractions of millet grains and characterization of their phenolic profiles by HPLC-DAD-ESI-MS.* **Chandrasekara, Anoma y Shahidi, Fereidoon.** 3, Canada : Food Science & Technology Bulletin Functional Foods, 2011, Vol. 3. 1756-4646.
58. *An Overview About Recent Advances in Sample Preparation Techniques for Pesticide Residues Analysis in Cereals and Feedstuffs.* **Zanella, Renato, y otros, y otros.** s.l. : Recent Trends in Pesticide Residue Assay, 2012.
59. *Optimization of sample preparation variables for wedelolactone from Eclipta alba using Box-Behnken experimental design followed by HPLC identification.* **Patil, A. A., y otros, y otros.** 4, s.l. : Annales Pharmaceutiques Françaises, 2013, Vol. 71. 0003-4509.
60. *The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry.* **Armenta, Segio, Garrigues, Salvador y De la Guardia, Miguel.** Valencia : TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2015, Vol. 71. 0165-9936.

61. *Natural designer solvents for greening analytical chemistry.* **Espino, Magdalena, y otros, y otros.** Mendoza : Trends in Analytical Chemistry, 2016, Vol. 76. 0165-9936.
62. *Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry.* **Pena- Pereira, Francisco, Lavilla, Isela y Bendicho, Carlos.** 7, s.l. : Trends in Analytical Chemistry, 2010, Vol. 29. 0165-9936.
63. *Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry.* **Spietelun, Agata, y otros, y otros.** 20, Valencia : Journal of Chromatography A, 2013, Vol. 1321. 0021-9673.
64. *Impaired colour vision in workers exposed to organic solvents: A systematic review.* **Betancur-Sánchez, A.M., Vásquez-Trespalacios, E.M. y Sardi-Correa, C.** 1, Medellín : Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología., 2017, Vol. 92. 2173-5794.
65. *Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis.* **Pedersen-Bjergaard, Stig y Einar Rasmussen, Knut.** 14, Oslo : Analytical Chemistry, 1999, Vol. 71. 0003-2700.
66. *Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction.* **Pedersen-Bjergaard, Stig y Einar Rasmussen, Knut.** 1-2, Oslo : Journal of Chromatography A, 2008, Vol. 1184. 0021-9673.
67. *Three-phase hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with HPLC-UV for the determination of isothiazolinone biocides in adhesives used for*

*foodpackaging materials*. **Rosero-Moreano, Milton, Canellas, Elena y Nerín, Cristina**. 3, s.l. : Journal of Separation Science, 2013, Vol. 37. 1615-9314.

68. *Ionic liquid based three-phase liquid–liquid–liquid solvent bar microextraction for the determination of phenols in seawater samples*. **Guo, Liang y Kee Lee, Hian**. 28, Singapur : Journal of Chromatography A, 2011, Vol. 1218. 0021-9673.

69. *Application of Three Phase Hollow Fiber LPME Using an Ionic Liquid as Supported Phase for Preconcentration of Bisphenol A and Diethylstilbestrol from Water Sample with HPLC Detection*. **Zou, Yanmin, y otros, y otros**. 1, Jiangsu : Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2015, Vol. 38. 1082-6076.

70. *Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review*. **Lee, Jingyi, y otros, y otros**. 2, Oslo : Analytica Chimica Acta, 2008, Vol. 624. 0003-2670.

71. *Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques*. **Pedersen-Bjergaard, Stig y Einar Rasmussen, Knut**. 1, Oslo : Journal of Chromatography B, 2005, Vol. 817. 1570-1016.

72. *Liquid-phase microextraction as a sample preparation technique prior to capillary gas chromatographic-determination of benzodiazepines in biological matrices*. **Ugland, H.G., Krogh, M. y Einar Rasmussen, Knut**. 1, Oslo : Journal of Chromatography B, 2000, Vol. 749. 0378-4347.

73. *Selecting an Appropriate Solvent Microextraction Mode for a Green Analytical Method.* **Kokosa, John M.** s.l. : Trends in Analytical Chemistry, 2019, Vol. 118. 0165-9936.

74. *Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry.* **Basheer, Chanbasha y Kee Lee, Hian.** 1-2, Singapur : Journal of Chromatography A, 2004, Vol. 1057. 0021-9673.

75. *Application of fully automatic hollow fiber liquid phase microextraction to assess the distribution of organophosphate esters in the Pearl River Estuaries.* **Wang, Xiaowei, y otros, y otros.** Guangzhou : Science of the Total Environment, 2014, Vols. 470-471. 0048-9697.

76. **Ulisse Ulisse, Karla.** *Microextracción de fármacos antiinflamatorios no esteroideos desde matrices acuosas usando polímero de impresión molecular inmovilizado en un sistema de disco rotatorio.* Santiago de Chile : Universidad de Chile - Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2014. Tesis de Maestría.

77. **Muñoz Berlmar, Carlos Alberto.** *Determinación de metales en muestras de aguas por microextracción en fase polimérica soportada en un disco rotatorio y posterior cuantificación mediante espectrofotometría en fase sólida.* Santiago de Chile : Universidad De Chile/Facultad De Ciencias Químicas Y Farmaceuticas , 2013. Tesis de Maestría.

78. *Determination of polychlorinated biphenyls in water using dynamic hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry.* **Li, Guanhua, Zhang, Lijun y Zhang, Zhanen.** 1, Jiangsu : Journal of Chromatography A, 2008, Vol. 1204. 0021-9673.

79. *Application of hollow fiber liquid phase microextraction for simultaneous determination of regulated and emerging iodinated trihalomethanes in drinking water.* **Domínguez-Tello, A., y otros, y otros.** Huelva : Journal of Chromatography A, 2015, Vol. 1402. 0021-9673.

80. **Katz, Miguel.** *Capítulo 10: Cinética Química.* s.l. : DEPARTAMENTO DE QUÍMICA-CÁTEDRA DE QUÍMICA FÍSICA, 2011. Capitulo de libro.

81. **Delito, Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el.** *Directrices para la validación de métodos analíticos y la calibración del equipo utilizado para el análisis de drogas ilícitas en materiales incautados y especímenes biológicos.* New York : Oficina de las Naciones Unidas contra la droga y el delito, 2010. Sección de laboratorio y asuntos científicos.

82. **Duffau, Boris, y otros, y otros.** *Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: "Aspectos generales sobre la validación de métodos".* Santiago de Chile : Instituto de Salud Pública de Chile., 2010. Guía.

83. *Aplicación de diseño de experimentos para el análisis de secado de un producto(Experiment design application for analysis of the drying a product).* **Garza Villegas, Juan Baldemar.** 19, Monterrey : Innovaciones de Negocios, 2012, Vol. 10. 2007-1191.

84. *Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998)*. **Danzer, Klaus y Currie, L.A.** 4, Jena : ANALYTICAL CHEMISTRY DIVISION, 1998, Vol. 70. 1365-3075.

85. **México, Universidad Nacional Autónoma de.** *Técnicas Cromatográficas: Introducción a los métodos de separación*. s.l. : Facultad de Química, 2007. Curso Química Analítica III.

86. *Chromatographic techniques and their application to studies of conformational changes, stability and refolding of proteins*. **Mayolo-Deloisa, K., Martínez, L.M. y Rito-Palomares, M.** 3, Monterrey : Revista mexicana de ingeniería química, 2012, Vol. 11. 1665-2738.

87. **Esquivel Soto, Edgar Ernesto y Leal Guadarrama, Lidia Irene.** *Métodos fisicoquímicos en Biotecnología: Cromatografía en fase reversa*. Cuernavaca : Universidad Nacional Autónoma de México, 2004. Trabajo de Investigación.

88. **A. Skoog, Douglas, Holler, F. James y R. Crouch, Stanley.** *Principles of Instrumental Analysis*. Séptima. Boston : Cengage Learning, 2016. 978-1-305-57721-3.

89. —. *Principios de análisis instrumental*. Sexta. s.l. : Cengage Learning, 2007. 13:978-607-481-390-6.

90. **Rubinson, Kenneth A. y Rubinson, Judith F.** *Análisis Instrumental*. Madrid : Prentice Hall - Pearson Educación, 2001. 84-205-2988-5.

91. **Polo Diez, Luis María.** *Fundamentos de Cromatografía.* Primera. s.l. : DEXTRA EDITORIAL, 2015. pág. 390. 9788416277575.
92. *Learning chemical concepts: a vision from some practical works and learning styles.* **Rodríguez Cepeda, R.** 1, Bogotá : REVISTA DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN, 2016, Vol. 7. 2027-8306.
93. *Caracterización de las aguas residuales y la demanda bioquímica de oxígeno.* **Raffo Lecca, Eduardo y Ruiz Lizama, Edgar.** 1, Lima : Industrial Data, 2014, Vol. 17. 1560-9146 .
94. *Tratamiento de aguas para el consumo humano.* **Salamanca, Eduard.** 1, Manizales : Módulo Arquitectura CUC, 2016, Vol. 17. 2389-7732.
95. *Montaje y validación de método de análisis por combustión y detección por Infrarrojo no dispersivo para determinación de Carbono Orgánico Total (COT) en agua.* **CHAMORRO BOLAÑOS, XIMENA, y otros, y otros.** Manizales : Revista Luna Azul, 2010, Vol. 30. 1909-2474.
96. *Nutrientes y carbono orgánico disuelto en el agua natural para un proceso de potabilización y su relación con el nivel del embalse afluente.* **González Muñoz, María Cristina y Palacio Baena, Jaime Alberto.** 17, Medellín : Revista Politécnica, 2013, Vol. 9. 2256-5353.
97. *Flujo de Carbono Orgánico Total (COT) en una cuenca andina: caso subcuenca Río Las Piedras.* **Ordoñez Díaz, María Cristina, Bravo Realpe, Isabel y Figueroa Casas, Apolinar.** 24, Medellín : Revista Ingenierías Universidad de Medellín, 2014, Vol. 13. 1692 - 3324.

98. **Universidad de Alicante.** *Determinación simultánea de Carbono Orgánico Total, Carbono inorgánico y metales pesados en agua.* s.l. : Universidad de Alicante., 2014. Informe Técnico.
99. *Metodología para el análisis de vulnerabilidad en cuencas abastecedoras de agua ante la variabilidad climática.* **Valencia Rojas, Mónica Patricia, y otros, y otros.** 25, Medellín : Revista Ingenierías Universidad de Medellín, 2014, Vol. 13. 1692 - 3324.
100. **Arrubla Vélez, Juan Pablo.** *Remoción de productos farmacéuticos y de cuidado personal (PFCEPs), mediante humedales construidos a gran escala.* Pereira : Universidad Tecnológica de Pereira, 2016. Tesis de Doctorado.
101. **Duque Zambrano, Sara Lineth y Arango Ramírez, Leidy Johana.** *Desarrollo de la técnica de cromatografía de gases (GC-FID) para la determinación de contaminantes emergentes tipo productos farmacéuticos.* Pereira : Universidad Tecnológica de Pereira, 2015. Trabajo de grado - Tecnólogo Químico.
102. *Caracterización Química de la materia orgánica natural del Río Pasto.* **Rosero Moreano, Milton, y otros, y otros.** 136, Pasto : Revista de la Academia Colombiana de ciencias exactas, físicas y naturales, 2011, Vol. 35. 0370-3908.
103. *Determination of Total Carbon in Mixed Pine Forests (Pinus patula Schl. et Cham.).* **Acosta-Mireles, M., Carrillo-Anzures, F. y Díaz Lavariega, M.** 2, Chapingo : Terra Latinoamericana, 2019, Vol. 27. 2395-8030.

104. **Schumacher, Brian A.** *METHODS FOR THE DETERMINATION OF TOTAL ORGANIC CARBON (TOC) IN SOILS AND SEDIMENTS.* Estados Unidos : Ecological Risk Assessment Support Center, 2002. Informe Ambiental.
105. *Effects of sterilization treatments on the analysis of TOC in water samples.* **Shi, Yiming, y otros, y otros.** 5, Hangzhou : Journal of Environmental Sciences, 2010, Vol. 22. 1001-0742.
106. *The free-radical chemistry of persulfate-based total organic carbon analyzers.* **Peyton y R., Gary.** 1-3, Illinois : Marine Chemistry, 1993, Vol. 41. 0304-4203.
107. *EVALUACIÓN DE LA FACTIBILIDAD DE ACOPLAR DE UN SISTEMA FOTOCATALÍTICO BIOLÓGICO PARA EL TRATAMIENTO DE VINAZAS MEDIANTE ESTUDIOS DE TOXICIDAD.* **Barba Ho, Luz E. y García, Laura Alexandra.** Cali : Ingeniería de Recursos Naturales y del Ambiente, 2012, Vol. 11. 1692-9918.
108. *Assesment of a pilot plant for the treatment of domestic wastewater with a reactor of Downflow Hanging Sponge (DHS) for the posttreatment of a primary sedimentation effluent.* **Centeno Mora, Erick.** 1, San Jose : Ingeniería, 2018, Vol. 28. 2215-2652.
109. **Rjas, Ricardo.** *Sistemas de Tratamiento de Aguas Residuales.* s.l. : Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, 2002. Conferencia: ""GESTIÓN INTEGRAL DE TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES"".
110. **Reynolds, Kelly A.** *Tratamiento de Aguas Residuales en Latinoamérica. Identificación del Problema.* Arizona : Agua Latinoamericana, 2002. Reporte.

111. *Excessive trust in authorities and its influence on experimental design.* **Tung Tien, Sun.** 7, s.l. : Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004, Vol. 5. 1471-0080.

112. *Development of a new liquid phase microextraction method with hollow fiber HF-SBME for the analysis of the organochlorine compounds in water samples by GC-ECD.* **Fiscal Ladino, Jhon Alexander, y otros, y otros.** 4, Manizales : Scientia Chromatographica, 2014, Vol. 6. 1984-4433.

113. *Hollow-fiber solvent bar microextraction with gas chromatography and electron capture detection determination of disinfection byproducts in water samples.* **Chacón Correa, Sandra Liliana, y otros, y otros.** 22, Manizales : Journal of Separation Science, 2015, Vol. 38. 1615-9306.

114. *Application of three phase hollow fiber based liquid phase microextraction (HF-LPME) for the simultaneous HPLC determination of phenol substituting compounds (alkyl-, chloro- and nitrophenols).* **Villar-Navarro, Mercedes, y otros, y otros.** Sevilla : Talanta, 2012, Vol. 99. 0039-9140.

115. *Solvent Bar Microextraction.* **Jiang, Xianmin y Kee Lee, Hian.** 18, Singapur : Analytical Chemistry, 2004, Vol. 76. 0003-2700.

116. *Neuron loss after coronary artery bypass detected by SPECT estimation of benzodiazepine receptors.* **Rasmussen, Lara S., y otros, y otros.** 5, s.l. : The Annals of Thoracic Surgery, 2002, Vol. 74. 0003-4975.

117. *An improved hollow fiber solvent-stir bar microextraction for the preconcentration of anabolic steroids in biological matrix with determination by gas*

*chromatography-mass spectrometry. Liu, Wei, y otros, y otros.* 1-7, s.l. : Journal of Chromatography A, 2012, Vol. 1233. 0021-9673.

118. *A gradient HPLC method for the quality control of chlorogenic acid, linarin and luteolin in Flos Chrysanthemi Indici suppository. Zhang, Qunlin, y otros, y otros.* 2, China : Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2007, Vol. 43. 0731-7085.

119. *Dynamic headspace liquid-phase microextraction of alcohols. Sajari y Mohammad.* 1, Isfahan : Journal of Chromatography A, 2005, Vol. 1062. 0021-9673.

120. *Uso de la ecuación de Horwitz en laboratorios de ensayo NMX-EC-17025-IMNC-2006. Rivera Orozco, Carlos Antonio y Rodríguez Báez, María del Rosario.* Chihuahua : Bufete de Ingenieros Industriales., 2010.

121. *Ionic liquids intercalated in montmorillonite as the sorptive phase for the extraction of low-polarity organic compounds from water by rotating-disk sorptive extraction. Fiscla Ladino, Jhon Alexander, y otros, y otros.* Santiago de Chile : Analytica Chimica Acta, 2017, Vol. 953. 0003-2670.

122. *Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction. Manzo, Valentina, y otros, y otros.* s.l. : Talanta, 2014, Vol. 128. 0039-9140.

123. *Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. Hashemi, Beshare, Zohrabi, Parvin y Shamsipur, Mojtaba.* 2018, Talanta, Vol. 187, págs. 337-347. 0039-9140.

124. Determination of carbamazepine and diazepam by SPE-HPLC-DAD in Belém River water, Curitiba-PR/Brazil. **Böger, Beatriz, y otros. 2**, Curitiba-PR/Brazil: Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science., 2018, Vol. 13. 1980-993X.

125. **Zhang, S., Yao, W., Fu, D., Zhang, C., & Zhao, H.** (2018). Fabrication of magnetic zinc adeninate metal-organic frameworks for the extraction of benzodiazepines from urine and wastewater. *Journal of Separation Science*, 41(8), 1864–1870. <https://doi.org/10.1002/jssc.201701226>.

126. **Peñalver Hernando, A. M.** (2002). Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental (Tesis Doctoral en Química.). Recuperado de <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/8988/tesis.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

127. **Cardona, Yaneth, Chaparro, Amanda L, Calderón, Lilia S, Peláez, Manuel J, & García, Carlos H.** (2011). Estandarización de un método analítico para extracción y cuantificación de cipermetrina en pastos. *Revista Colombiana de Química*, 40(2), 211-226. Retrieved September 04, 2019, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0120-28042011000200006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-28042011000200006&lng=en&tlng=es).

128. **López Fuentes, A. L.** (2014). Analizador TOC. In E-RedING (Ed.), *Diseño y montaje de una instalación de laboratorio para la caracterización y desarrollo de absorbentes de CO<sub>2</sub> basados en aminas* (pp. 123–136). Recuperado de

<http://bibing.us.es/proyectos/abreproy/20214/fichero/8-Cap%C3%ADtulo+7%252FCap%C3%ADtulo7.pdf>

129. Borges, K. B., De Figueiredo, E. C., & Queiroz, M. E. C. (2015b). Preparo De Amostras Para Análise De Compostos Orgânicos.. Rio de Janeiro, Brasil: LTC.

## 12. ASISTENCIA A EVENTOS

1. XV Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Técnicas Afines; Cartagena de Indias, Colombia. Septiembre 29 al 3 de octubre del 2014. Asistente.
- 13.VII Congreso Colombiano de Cromatografía y Técnicas Afines; Cartagena de Indias, Colombia. Septiembre 29 al 3 de octubre del 2014. Asistente.
- 14.III Congreso Latinoamericano de Estudiantes de Química pura y aplicada. Universidad Santiago de Cali. 25 al 27 de marzo del 2015. Ponente.
- 15.XV Encuentro Nacional de estudiantes de Química pura y aplicada. Universidad Santiago de Cali. 25 al 27 de marzo del 2015. Ponente.
- 16.5th Workshop in Recent Advances on Sample Preparation WARPA 2015. Universidad de Caldas. Manizales 7 – 10 de septiembre del 2015. Ponente.
- 17.II Simposio de Química Aplicada (SIQUIA) Universidad del Quindío. Armenia 2015. Ponente.
- 18.I Simposio Nacional de Cromatografía, Universidad del Quindío. Armenia 2015. Ponente.
- 19.I Escuela Internacional de Cromatografía; Universidad del Quindío. Armenia 2015. Ponente.
- 20.V Congreso Iberoamericano de Productos Naturales; Bogotá 2016. Ponente.
- 21.XIII Congreso Colombiano de Fitoquímica - VIII Congreso Colombiano de Cromatografía; Bogotá 2016. Ponente.
- 22.XII LASEAC – Colombia 2017 (Manizales, Caldas). Ponente.
- 23.XIII LASEAC – Chile 2018 (La Serena, Coquimbo). Ponente.

## 12. PUBLICACIONES

### PUBLICADA

- Determinación de compuestos fenólicos mediante microextracción con “solvent bar” usando UHPLC-UV en muestras de aguas residuales contaminadas con vinazas. Wilson Alejandro Largo Taborda; Milton Hernando Rosero Moreano. *Scientia Chromatographica* 2016; 8(2):121-127. Instituto Internacional de Cromatografía. <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2016.023>. ISSN 1984-4433. DOI: 10.4322/sc.2016.023.

### ENVIADA

- Analysis of benzodiazepines by solvent bar microextraction using UHPLC-UV in forensic samples and spiked urine. Viviana Andrea Sánchez Morales; Wilson Alejandro Largo Taborda; Eleazar Vargas Mena; Grey Correa Álvarez y Milton Rosero-Moreano. *Journal of Forensic Sciences*, submitted on september 2019.

## 13. ANEXOS

### 13.1. ANEXO 1. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA FLUNITRAZEPAM

Análisis de la varianza (Variable Flunitrazepam).

Análisis de la varianza (Variable Flunitrazepam):					
Fuente	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	1	24,7613	24,7613	3044,9100	< 0,0001
Error	19	0,1545	0,0081		
Total, corregido	20	24,9158			

Calculado contra el modelo  $Y=Media(Y)$

	MODELO DE REGRESIÓN	SENSIBILIDAD DE CALIBRACIÓN
FLUNITRAZEPAM	$A = 0,0122(\pm 0,0322) + 0,6191(\pm 0,0112)C$	$S_C = \hat{\beta}_1 (\pm S_{\hat{\beta}_1}) = 0,6191(\pm 0,0112) u. a. / (\mu g / g)$
	<b>SENSIBILIDAD ANALÍTICA</b>	<b>LÍMITE DE DETECCIÓN (LoD)</b>
	$\gamma = \frac{S_C}{S_y} = 7,086 g / \mu g$ $\gamma^{-1} = 0,1411 \mu g / g$	$LOD = \hat{\beta}_0 + 2 \times t_{0,05;19} \times S_{\hat{\beta}_0} = 0,1470 u. a.$ es decir, cuando el analito presenta concentraciones superiores a $0,218 \mu g \cdot g^{-1}$ . Lo descrito aquí determinado de manera teórica.
	<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LoQ)</b>	<b>RANGO DINÁMICO</b>
	$LOQ = \hat{\beta}_0 + 10S_{\hat{\beta}_0} = 0,3341 u. a.$ es decir, cuando el analito está presente en concentraciones superiores a $0,520 \mu g \cdot g^{-1}$ .	En el intervalo de concentraciones evaluado las desviaciones sistemáticas máxima y mínima, de los valores experimentales respecto a los teóricos, corresponden con 5,3026% y -3,6950% respectivamente. Es decir que la técnica puede utilizarse para todo el intervalo de concentraciones evaluado. Se declara en este caso particular entonces que el rango dinámico se extiende desde $0,218 \mu g \cdot g^{-1}$ hasta $5,078 \mu g \cdot g^{-1}$ , teóricamente hablando.
	<b>RANGO LINEAL</b>	<b>EXACTITUD</b>
	Se define entonces el rango lineal desde $0,520 \mu g \cdot g^{-1}$ hasta $5,078 \mu g \cdot g^{-1}$ , teóricamente hablando.	No debe rechazarse la hipótesis nula ( $p$ -valor=0,7083), es decir el intercepto no es diferente de cero, esto con una significancia del 5%.
	<b>PRECISIÓN</b>	
En términos de precisión se obtuvo que para niveles bajos exista falta de precisión pues el porcentaje de variación en el LoQ es de 27,0%; mientras que para los niveles medio y alto de concentración ( $2,648 \mu g \cdot g^{-1}$ y $5,078 \mu g \cdot g^{-1}$ ) las precisiones son buenas, con porcentajes de variación de 5,46% y 2,85% respectivamente.		

### 13.2. ANEXO 2. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA NITRAZEPAM

Análisis de la varianza (Variable Nitrazepam).

Análisis de la varianza (Variable Nitrazepam):					
Fuente	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	1	23,2758	23,2758	9338,5627	< 0,0001
Error	19	0,0474	0,0025		
Total, corregido	20	23,3232			
<i>Calculado contra el modelo <math>Y=Media(Y)</math></i>					

	MODELO DE REGRESIÓN	SENSIBILIDAD DE CALIBRACIÓN
NITRAZEPAM	$A = 0,0183(\pm 0,0178) + 0,6002(\pm 0,0062)C$	$S_C = \hat{\beta}_1 (\pm S_{\hat{\beta}_1}) = 0,6002(\pm 0,0062) u. a. / (\mu g / g)$
	<b>SENSIBILIDAD ANALÍTICA</b>	<b>LÍMITE DE DETECCIÓN (LoD)</b>
	$\gamma = \frac{S_C}{S_y} = 18,58 g / \mu g$ $\gamma^{-1} = 0,0538 \mu g / g$	$LOD = \hat{\beta}_0 + 2 \times t_{0,05;19} \times S_{\hat{\beta}_0} = 0,0527 u. a.$  es decir, cuando el analito presenta concentraciones superiores a $0,124 \mu g.g^{-1}$ . Lo descrito aquí determinado de manera teórica.
	<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LoQ)</b>	<b>RANGO DINÁMICO</b>
	$LOQ = \hat{\beta}_0 + 10S_{\hat{\beta}_0} = 0,1965 u. a.$  es decir, cuando el analito está presente en concentraciones superiores a $0,297 \mu g.g^{-1}$ .	En el intervalo de concentraciones evaluado las desviaciones sistemáticas máxima y mínima, de los valores experimentales respecto a los teóricos, corresponden con 3,4350% y -2,8601% respectivamente. Es decir que la técnica puede utilizarse para todo el intervalo de concentraciones evaluado. Se declara en este caso particular entonces que el rango dinámico se extiende desde $0,124 \mu g.g^{-1}$ hasta $5,078 \mu g.g^{-1}$ , teóricamente hablando.
	<b>RANGO LINEAL</b>	<b>EXACTITUD</b>
	Se define entonces el rango lineal desde $0,297 \mu g.g^{-1}$ hasta $5,078 \mu g.g^{-1}$ , teóricamente hablando.	No debe rechazarse la hipótesis nula ( $p$ -valor=0,3176), es decir el intercepto no es diferente de cero, esto con una significancia del 5%.
	<b>PRECISIÓN</b>	
En términos de precisión se obtuvo que para niveles bajos exista falta de precisión pues el porcentaje de variación en el LoQ es de 25,4%; mientras que para los niveles medio y alto de concentración ( $2,648 \mu g.g^{-1}$ y $5,078 \mu g.g^{-1}$ ) las precisiones son buenas, con porcentajes de variación de 3,10% y 1,63% respectivamente.		

### 13.3. ANEXO 3. ANÁLISIS DE LA CURVA DE CALIBRADO PARA TEMAZEPAM

Análisis de la varianza (Variable Temazepam).

Análisis de la varianza (Variable Temazepam):					
Fuente	GDL	Suma de los cuadrados	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	1	164,5262	164,5262	11475,3856	< 0,0001
Error	19	0,2724	0,0143		
Total, corregido	20	164,7986			
<i>Calculado contra el modelo <math>Y=Media(Y)</math></i>					

	MODELO DE REGRESIÓN	SENSIBILIDAD DE CALIBRACIÓN
TEMAZEPAM	$A = 0,1214(\pm 0,0427) + 1,5958(\pm 0,0149)C$	$S_c = \hat{\beta}_1 (\pm S_{\hat{\beta}_1}) = 1,5958(\pm 0,0149) u. a. / (\mu g / g)$
	<b>SENSIBILIDAD ANALÍTICA</b>	<b>LÍMITE DE DETECCIÓN (LoD)</b>
	$\gamma = \frac{S_c}{S_y} = 16,742 g / \mu g$ $\gamma^{-1} = 0,0597 \mu g / g$	$LOD = \hat{\beta}_0 + 2 \times t_{0,05;19} \times S_{\hat{\beta}_0} = 0,3003 u. a.$ es decir, cuando el analito presenta concentraciones superiores a $0,112 \mu g \cdot g^{-1}$ . Lo descrito aquí determinado de manera teórica.
	<b>LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (LoQ)</b>	<b>RANGO DINÁMICO</b>
	$LOQ = \hat{\beta}_0 + 10S_{\hat{\beta}_0} = 0,5488 u. a.$ es decir, cuando el analito está presente en concentraciones superiores a $0,268 \mu g \cdot g^{-1}$ .	En el intervalo de concentraciones evaluado las desviaciones sistemáticas máxima y mínima, de los valores experimentales respecto a los teóricos, corresponden con 3,8225% y -1,4448% respectivamente. Es decir que la técnica puede utilizarse para todo el intervalo de concentraciones evaluado. Se declara en este caso particular entonces que el rango dinámico se extiende desde $0,112 \mu g \cdot g^{-1}$ hasta $5,078 \mu g \cdot g^{-1}$ , teóricamente hablando.
	<b>RANGO LINEAL</b>	<b>EXACTITUD</b>
	Se define entonces el rango lineal desde $0,268 \mu g \cdot g^{-1}$ hasta $5,078 \mu g \cdot g^{-1}$ , teóricamente hablando.	Debe rechazarse la hipótesis nula ( $p$ -valor=0,0105), es decir el intercepto es diferente de cero, esto con una significancia del 5%. Lo cual da razón de la existencia de un error de 0,1214 unidades de área por exceso en términos de señal.
	<b>PRECISIÓN</b>	
	En términos de precisión se obtuvo que para niveles bajos exista falta de precisión pues el porcentaje de variación en el LOQ es de 21,8%; mientras que para los niveles medio y alto de concentración ( $2,648 \mu g \cdot g^{-1}$ y $5,078 \mu g \cdot g^{-1}$ ) las precisiones son buenas, con porcentajes de variación de 2,75% y 1,46% respectivamente.	