



FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES

Universidad Nacional de La Pampa

**“DESARROLLO DE UNA TÉCNICA DE  
MICROEXTRACCIÓN AMIGABLE CON EL MEDIO  
AMBIENTE PARA EL ANÁLISIS DE MUESTRAS  
AGROALIMENTARIAS POR MIP-OES”**

**AUTOR: GIACOMINO, VALENTINA**

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER  
EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIADO EN QUÍMICA

**SANTA ROSA, LA PAMPA**

**ARGENTINA**

**2023**

## **PRÓLOGO**

Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el laboratorio de Espectrometrías Atómicas dependiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, durante el período comprendido entre el 26/08/22 y 17/04/23 bajo la dirección de la Lic. **CORA JOFRÉ, FLORENCIA** y bajo la co-dirección de la Dra. **SAVIO, MARIANELA**.

*Giacomino, Valentina.*

**Departamento de Química**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA**

**03/04/23**

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a la Directora de esta tesis por el apoyo, dedicación y acompañamiento a lo largo de toda esta etapa, no solo en lo académico, sino también en lo personal.

A mi co-Directora, por su ayuda, consejos y paciencia que me brindo durante todo el trabajo de laboratorio y escritura.

Agradecer a la Universidad Nacional de La Pampa por haberme formado tanto en lo académico como en lo personal para hoy obtener el título de Licenciado en Química, y que además me permitió conocer personas hermosas que hoy son parte de mi círculo más cercano.

Por último, no por ser las personas menos importantes, darle gracias a mi familia por haberme apoyado desde el inicio y haber dado todo para que pueda obtener el título. Orgullosa de cada uno de ellos

*Giacomino, Valentina*

**03/04/23**

## RESUMEN

La composición mineral del alimento porcino es un criterio primordial para la evaluación de la calidad del producto, y de ahí la importancia de su cuantificación.

La determinación elemental suele realizarse por medio de técnicas espectrométricas atómicas (EA) como la Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inducido por Microondas (MIP-OES) que presenta alta velocidad de análisis y permite la detección multielemental, sin embargo, los Límites de Detección (LODs) para algunos analitos suelen ser mayores a los obtenidos mediante ICP-OES. Esto podría sobrellevarse al acoplar EA a técnicas de preconcentración/extracción. En las últimas décadas se ha implementado la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) ganando una aceptación generalizada por su simplicidad de operación, efectividad, rapidez, alto factor de preconcentración y eficiencia de extracción, sumado al bajo consumo de solventes orgánicos; en concordancia con los principios de la Química Analítica Verde (GAC).

El objetivo de este trabajo fue investigar el uso de un Solvente Eutéctico Profundo Natural (NaDES) como solvente de extracción para la determinación de Cr, Mn y Ni en muestras agroalimentarias mediante DLLME-MIP-OES. Para ello, se realizó la optimización de las condiciones experimentales de extracción (volumen de dispersante, concentración de quelante, pH de extracción y fuerza iónica del medio) mediante diseño experimental y se seleccionaron adecuadamente los parámetros instrumentales de MIP-OES.

Este trabajo de tesis demostró que no existe limitación experimental para el uso de NaDES (Mentol:Ácido acético) como solvente extractante y su posterior análisis mediante MIP-OES. El método desarrollado permitió mejorar los LODs de Cr, Mn y Ni.

## SUMMARY

The mineral composition of swine feed is a primary criterion for the evaluation of product quality; therefore, its quantification is extremely important.

Elemental determination is usually performed by atomic spectrometric (AE) techniques such as Microwave-Induced Plasma Optical Emission Spectrometry (MIP-OES) that features high speed of analysis and allows multi-elemental determination, however, detection limits for some analytes are usually higher than those obtained by IP-OES. This disadvantage could be overcome by using AE coupled to preconcentration/extraction techniques. In recent decades, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) has been implemented, gaining widespread acceptance for its simplicity of operation, effectiveness, speed, high preconcentration factor and extraction efficiency, added to the low consumption of organic solvents; in accordance with the principles of Green Analytical Chemistry (GAC).

The objective of this work is to investigate the use of Natural Deep Eutectic Solvents (NaDES) as a solvent of extraction for the analysis of Cr, Mn y Ni in agrifood samples via DLLME coupled to MIP-OES. To this end, the optimization of the experimental conditions of the extraction method was carried out (type and volume of dispersant, chelating concentration, pH of extraction and ionic strength of the medium) by experimental design and instrumental parameters of MIP-OES were appropriately selected.

In this work it was shown that there is no experimental limitation to the use of NaDES (Menthol:Acetic Acid) as extracting solvent and its subsequent analysis through MIP-OES. The method developed allows to improve the Limits of Detection (LODs) of Cr, Mn and Ni.

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....</b>	
1.1. ALIMENTACIÓN ANIMAL .....	1
1.2. DETERMINACIÓN MULTIELEMENTAL Y LÍMITES DE DETECCIÓN .....	2
1.2.1. ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ÓPTICA CON PLASMA INDUCIDO POR MICROONDAS (MIP-OES).....	3
1.3. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	5
1.3.1 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME).....	5
1.4. SOLVENTES EMPLEADOS EN DLLME.....	7
1.4.1. SOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES).....	7
1.5. ACOPLAMIENTO DE DLLME CON ESPECTROMETRÍAS ATÓMICAS.....	9
1.6. HIPÓTESIS:.....	11
1.7. OBJETIVO:.....	11
<b>CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	
2.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES.....	12
2.1.1. Solución patrón de elementos.....	12
2.1.2. Material de proficiencia.....	12
2.1.3. Solvente eutéctico profundo natural.....	12
2.1.4. Reactivos utilizados en la microextracción .....	12
2.2. MUESTREO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	13
2.3. DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS .....	14
2.4. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME).....	15
2.5. INSTRUMENTAL.....	16
2.5.1. DIGESTOR IR .....	16
2.5.2. MIP-OES .....	16
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	17

2.7. EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL .....	18
<b>CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	
3.1. DESCRIPCIÓN DEL NaDES (+)-MENTOL:ÁCIDO ACÉTICO.....	19
3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) EMPLEANDO NaDES .....	21
3.3. DESEMPEÑO ANALÍTICO .....	30
3.4. ÍNDICES VERDES .....	33
3.5. APLICACIÓN ANALÍTICA.....	35
<b>CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES.....</b>	
4.1. CONCLUSIONES .....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

## 1.1. ALIMENTACIÓN ANIMAL

En la producción ganadera los costos en alimentación representan alrededor del 70% del total [1], dependiendo del tamaño de la producción, tasa de ganancia, eficiencia alimentaria, entre otros factores. Así, la calidad de los productos de origen animal (carne, leche, huevos) está directamente relacionada con las prácticas alimentarias; por lo tanto, los ingredientes utilizados en los productos empleados en la alimentación animal son fundamentalmente importantes en términos de calidad y el potencial impacto en la salud humana [2].

Los animales necesitan de ciertos requerimientos nutricionales acordes al período de vida que atraviesan, los cuales deben satisfacerse por completo para una productividad rentable y eficiente [3]. Estos pueden definirse como la cantidad de nutrientes (orgánicos e inorgánicos) que los animales necesitan para el crecimiento, mantenimiento, producción, reproducción y demás funciones; y dependen de varios factores como: linaje genético, raza, sexo, estado fisiológico del animal, temperatura y humedad ambiente, presencia de toxinas o antinutrientes en la dieta, disponibilidad de nutrientes, entre otros [4]. Pueden mencionarse seis clases de nutrientes que son requeridos: carbohidratos, proteínas, grasas, minerales, vitaminas y agua. La carencia de alguno de ellos, puede producir la disminución en la tasa de crecimiento, alteraciones en la actividad reproductiva, mayor predisposición de los animales a contraer enfermedades, etc.; ocasionando una incidencia negativa para la producción [3].

En particular, los minerales son elementos inorgánicos vitales para el correcto desarrollo de los procesos metabólicos y fisiológicos del ganado; además de ser los principales componentes formadores de huesos y dientes [5]. Pueden clasificarse en dos grandes grupos, macro y micro elementos, basados en la cantidad de ingesta requerida en la dieta y no en su importancia para las funciones fundamentales del animal. Los denominados macroelementos son aquellos necesarios en grandes proporciones ( $\geq 400$  mg/kg de peso corporal), entre ellos se encuentran; Calcio (Ca), Fósforo (P), Magnesio (Mg), Sodio (Na), Potasio (K), Azufre (S) y Cloro (Cl). Por su parte, los microelementos u oligoelementos, son imprescindibles en pequeñas concentraciones o trazas ( $< 100$  mg/kg de peso corporal), por ejemplo, Hierro ( $Fe^{+2}$ ,  $Fe^{+3}$ ), Zinc (Zn), Cobre ( $Cu^{+}$ ,  $Cu^{+2}$ ), Cobalto (Co), Yodo (I). Manganeseo ( $Mn^{+2}$ ), Selenio (Se), Cromo ( $Cr^{+3}$ ), Molibdeno (Mo), Flúor (F), Silicio ( $Si^{+2}$ ,  $Si^{+4}$ ), Vanadio (Va), Boro (B), Níquel (Ni) y Estaño (Sn). Ciertos minerales como Bario (Ba), Bromo, (Br), Rubidio (Rb) y Estroncio (Sr) se requieren en concentraciones aún más bajas, por lo que reciben el nombre de ultra trazas. Otros elementos como Mercurio (Hg), Plomo (Pb),

Cadmio (Cd) y Arsénico (As) no cumplen ningún rol nutricional, presentándose como contaminantes en los alimentos y pudiendo ser tóxicos para el ganado aún en concentraciones realmente bajas [5].

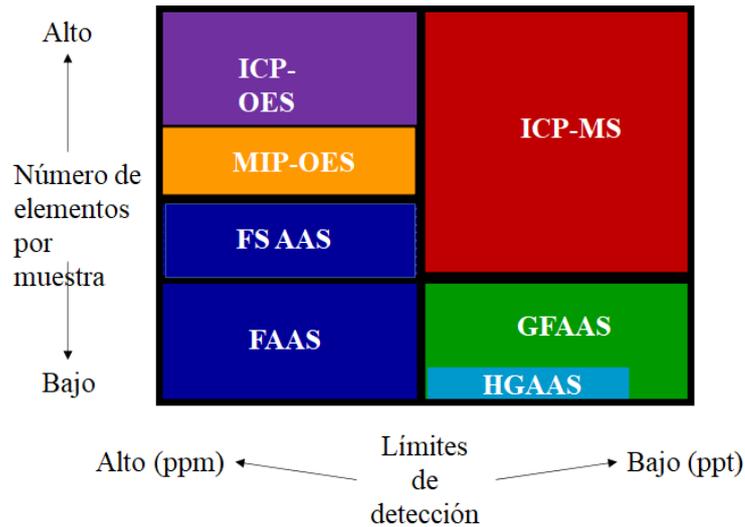
De esta manera, la composición mineral del alimento animal es un criterio primordial para la evaluación de la calidad del producto, y de ahí la importancia de su cuantificación [6].

## **1.2. DETERMINACIÓN MULTIELEMENTAL Y LÍMITES DE DETECCIÓN**

Varias técnicas analíticas modernas se han desarrollado permitiendo la determinación de la composición elemental en los alimentos. En este sentido, las EA son las más utilizadas debido a que se destacan por su capacidad de análisis elemental, elevada sensibilidad, LODs bajos, amplio intervalo dinámico, precisión, exactitud y velocidad de análisis. Entre las más empleadas se encuentran: Espectrometría de Absorción Atómica con llama (FAAS), Espectrometría de Absorción Atómica con Horno de Grafito (GFAAS), Espectrometría de Emisión Óptica con plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), Espectrometría de Emisión Óptica con plasma inducido por microondas (MIP-OES) y Espectrometría de Masa con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

Las técnicas de plasma permiten la detección multielemental de manera simultánea o secuencial, lo que conlleva una mejora de la velocidad de análisis, pudiendo realizar la medida de todos los elementos en minutos. Además, presentan un mayor intervalo lineal, buena sensibilidad, versatilidad, y bajos LODs para la mayoría de los elementos. En contraste, FAAS y GFAAS al tratarse de técnicas monoelementales, requieren de mayor tiempo de análisis para realizar la cuantificación de varios elementos.

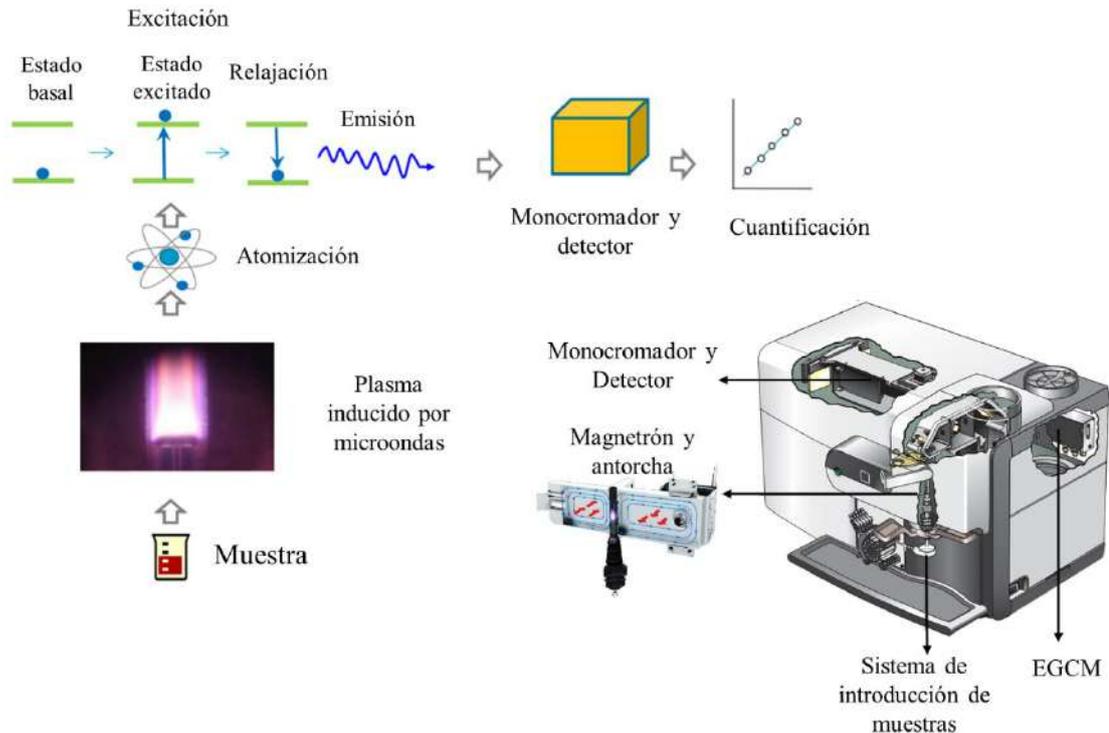
En la Figura 1 se ilustra la relación entre los LODs alcanzados por distintas EA y el número de analitos que se pueden determinar por muestra.



**Figura 1.** Capacidad multielemental vs LODs de diversas EA.

### 1.2.1. ESPECTROMETRÍA DE EMISIÓN ÓPTICA CON PLASMA INDUCIDO POR MICROONDAS (MIP-OES)

En los últimos años, MIP-OES ha ganado gran atención como una alternativa a ICP-OES [7], siendo una técnica analítica basada en la medida de los espectros de emisión emitidos por los átomos presentes en una muestra y que previamente se encontraban en estado excitado. MIP-OES emplea microondas como fuente de energía para la producción del plasma, el cual es encendido mediante una descarga eléctrica y mantenido a través de un flujo de nitrógeno. El principio de funcionamiento puede describirse de la siguiente manera: la muestra líquida es trasladada mediante una bomba peristáltica hacia el nebulizador, el cual introduce en forma constante la muestra en forma de una fina dispersión de pequeñas gotas, denominada aerosol. A continuación, son introducidas a una cámara de nebulización que permite el paso de las gotas más pequeñas hacia el atomizador (en este caso, un plasma) y las de mayor tamaño se reúnen en el fondo de la cámara drenando hacia un recipiente de desechos. En el plasma, la muestra es atomizada y los electrones son promovidos al estado excitado por medio de la energía térmica. Al regresar a su estado fundamental, los electrones emiten radiación que es característica para cada analito. La intensidad de cada línea de emisión se mide en el detector y es proporcional a la concentración [8]. El proceso descrito se representa en la Figura 2.



**Figura 2.** Esquema y principios del funcionamiento de MIP-OES.

El plasma a base de nitrógeno opera desde un suministro de aire comprimido y un generador de nitrógeno, lo que resulta en una reducción significativa en los costos operativos y de infraestructura. Sin embargo, esta fuente de plasma aún sufre fuertes efectos de matriz debido a elementos fácilmente ionizables (Na, K, Ca, etc.) y los LODs para algunos elementos son mayores a los alcanzados por ICP-OES [8]. Estos inconvenientes podrían sobrellevarse al emplear EA acopladas a técnicas de preconcentración.

A pesar de las ventajas mencionadas anteriormente la principal limitación de las EA es el sistema de introducción de muestras [9]. En la mayoría de los espectrómetros de emisión equipados con fuentes de plasma es requisito fundamental la disolución completa de la muestra previo a la determinación elemental, es decir, están adaptados para el análisis de muestras líquidas. En comparación con ICP-OES o FAAS, MIP-OES es más susceptible a los cambios en la composición del plasma que resultan de la introducción de la muestra ya que la baja temperatura del gas del plasma no promueve una desolvatación o atomización eficiente del aerosol [8].

La extracción de analitos desde la muestra sólida a la solución, depende en gran medida de su interacción con los reactivos y la matriz en la que residen. Para esto se requieren procedimientos que impliquen una extracción/preconcentración eficaz, para mejorar la selectividad y la sensibilidad del método y eliminar la contaminación y las interferencias.

Los métodos analíticos convencionales, como la extracción en fase sólida (SPE), la extracción del punto de enturbiamiento (CPE), la coprecipitación (CP) y la extracción líquido-líquido (LLE), se han considerado como procesos que son caros, consumen tiempo y grandes volúmenes de reactivos, conduciendo a mayores volúmenes de residuos. Los métodos de microextracción basados en fase líquida y fase sólida con solventes verdes minimizan el consumo de reactivos mediante la menor utilización de solventes y brindan máximas aplicaciones analíticas [10].

### **1.3. PRETRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS: MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO**

En el proceso analítico, las etapas de muestreo y preparación de muestra son responsables de la mayoría de los errores en los resultados analíticos [11]. El porcentaje de error generado en el pretratamiento de la muestra puede alcanzar entre 100–300%; por lo tanto, es necesario el desarrollo de métodos de preparación de muestras que proporcionen resultados analíticos precisos [12]. Los insumos utilizados en dietas animales, poseen una matriz orgánica compleja, debido a su alto contenido en fibras, almidón, grasa, entre otros; y estas muestras son un desafío para los sistemas de introducción de muestras convencionales, como se mencionó en la sección precedente. De allí que cuando se utilizan EA para la detección es requisito fundamental la mineralización completa de la muestra previo al análisis [13,14].

La microextracción en fase líquida (LPME) puede definirse como una miniaturización de la LLE, en donde el volumen de solución extractante es del orden de los microlitros ( $\mu\text{L}$ ) en contraposición a las técnicas convencionales que emplean cantidades del orden de los mililitros (mL) [15]. Estos métodos minimizan los extensos procedimientos debido a la menor utilización de reactivos, y a su vez, brindan máximas aplicaciones analíticas [10].

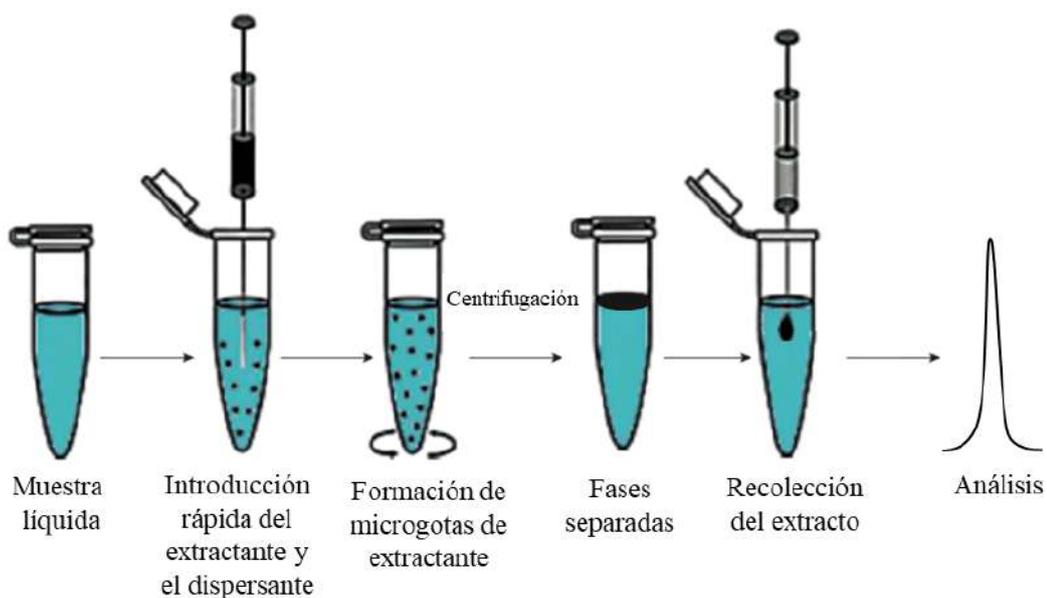
El empleo de técnicas de microextracción ha sido desarrollado ampliamente durante las últimas décadas [15], ganando una aceptación generalizada por su simplicidad de operación, efectividad, rapidez, alto factor de preconcentración, lo que conlleva a mejores LODs [16,17] y eficiencia de extracción, sumado al bajo consumo de solventes orgánicos [18-21]. Todo esto en concordancia con los principios de la GAC. [22].

#### **1.3.1 MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)**

En el año 2006, Assadi y colaboradores introdujeron la DLLME [23]. Esta técnica se basa en la utilización de pequeños volúmenes de solvente de extracción, normalmente un solvente orgánico inmiscible en agua, el cual se dispersa homogéneamente en forma de finas gotas

en la muestra acuosa con la ayuda de un agente dispersante, este último es miscible tanto en la fase orgánica como en la acuosa. La gran superficie de contacto entre la muestra y el extractante provoca la transferencia rápida y eficiente de los analitos de interés de una fase a otra, permitiendo la determinación de los mismos mediante técnicas analíticas convencionales, luego del proceso de centrifugación. El principio de este procedimiento se ilustra en la Figura 3.

Esta metodología presenta las propiedades de las técnicas LPME tales como bajo costo, consumo de muestra y solventes, simplicidad de operación, menor generación de residuos lo que genera un menor impacto para el ambiente y la salud humana [24]. Además, el tiempo de preparación de muestras, los requisitos de energía y mano de obra, así como los gastos analíticos se reducen significativamente. Finalmente, DLLME es potencialmente compatible con la automatización [25]. Todas las características recién nombradas confieren a esta técnica un aspecto sustentable o “verde” cumpliendo con los principios de la Química Verde propuestos por Anastas y Warner [26].



**Figura 3.** Principio de procedimiento de DLLME.

A pesar de las ventajas del procedimiento de microextracción, este puede verse afectado por factores tales como: solvente de extracción y de dispersión y los volúmenes de ambos. La selección del solvente de extracción apropiado es el parámetro de mayor relevancia en DLLME, mientras que su volumen tiene un efecto importante en el factor de enriquecimiento (EF). Al aumentar el volumen del extractante, aumenta el volumen de la fase obtenida por centrifugación, lo que resulta en una disminución del EF. Por lo tanto, el volumen óptimo de solvente de extracción debe garantizar altos EF y suficiente volumen de la fase orgánica para el análisis posterior. La elección del dispersante adecuado es esencial debido a que este

tiene que ser miscible tanto en la fase acuosa como en la orgánica. Normalmente se emplean acetona, metanol o acetonitrilo como líquidos dispersantes. A su vez, el volumen del mismo afecta directamente el grado de dispersión del solvente de extracción en la fase acuosa y, posteriormente, la eficiencia de extracción [27].

Asimismo, otros parámetros que afectan la microextracción son pH, fuerza iónica y concentración del agente quelante en la solución.

## **1.4. SOLVENTES EMPLEADOS EN DLLME**

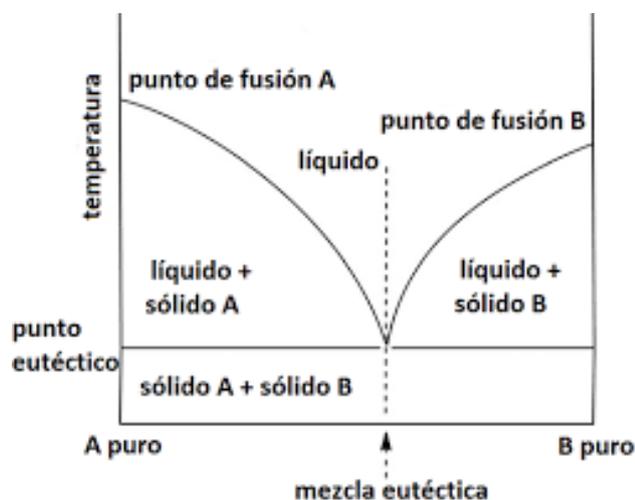
En DLLME la selección de un solvente de extracción adecuado puede ser considerado el parámetro de mayor relevancia. Comúnmente, se han utilizado compuestos orgánicos aromáticos o halogenados (cloroformo, tetracloruro de carbono, tolueno); sin embargo, estos solventes se han reemplazado, debido a su alta toxicidad en humanos y sus efectos nocivos en el ambiente. Durante la última década el surgimiento de los solventes eutécticos profundos (DES) los ha posicionado como alternativas ecológicas, con el fin de reducir o eliminar el uso de los compuestos orgánicos volátiles utilizados clásicamente en DLLME.

### **1.4.1. SOLVENTES EUTÉCTICOS PROFUNDOS (DES)**

Un tipo de solventes formados por cationes orgánicos (piridina, imidazol, amonio, etc.) y por aniones inorgánicos (cloruros, hexafluorofosfato, tetrafluoroborato) u orgánicos (trifluorometanosulfonato, trifluoroacetato) denominados líquidos iónicos (ILs) han sido ampliamente estudiados como sustitutos a los solventes empleados convencionalmente en LLE, sin embargo, existen varias desventajas en su uso como biodegradabilidad cuestionable, toxicidad asociada y síntesis costosa y tediosa [28]. En vista de estas limitaciones para su uso en aplicaciones prácticas, los DES pueden considerarse una alternativa perfecta a sus predecesores.

Los solventes eutécticos pueden definirse como mezclas de al menos dos sustancias, un agente aceptor de hidrógeno (HBA) y un donador de hidrógeno (HBD) que al combinarse generan un compuesto con un punto de fusión menor al de los componentes individuales (Figura 4) [29]. La dislocación de cargas que ocurre a través de los enlaces de hidrógeno entre ambos componentes es la responsable de la disminución en el punto de fusión del eutéctico [27]. Los DES presentan naturaleza dipolar, estabilidad térmica, bajo costo y alta disponibilidad de materias primas [29], menor presión de vapor e inflamabilidad, además de ser biodegradables y poseer baja toxicidad, por lo que resultan seguros para el ambiente y el

operador [30-32]; convirtiéndolos en solventes alternativos valiosos para aplicaciones que satisfagan los principios GAC [22,33].



**Figura 4.** Diagrama de fases para la formación de la mezcla eutéctica.

Los líquidos eutécticos se clasifican en diferentes grupos de acuerdo a la naturaleza de los ácidos y bases de Lewis o Brönsted que los componen [34]:

- i) Eutécticos tipo I generalmente están formados por la combinación de sales cuaternarias de amonio con cloruros de metales siendo análogos a los líquidos iónicos.
- ii) Eutécticos tipo II, formados por haluros de metales hidratados cuyo punto de fusión es menor que el de su correspondiente sal anhidra. El agua de hidratación disminuye el punto de fusión de la sal debido al decrecimiento de la energía reticular.
- iii) Eutécticos tipo III constan de una sal, generalmente cloruro de colina, y de una especie donadora de enlaces de hidrógeno, principalmente ácidos carboxílicos, amidas y alcoholes. Son los más ampliamente utilizados dada su facilidad de preparación, biodegradabilidad, bajo costo, amplio rango de especies donadoras de enlace de hidrógeno, siendo las propiedades físicas dependientes de ellas y permitiendo al solvente que sea ampliamente adaptable a aplicaciones específicas.
- iv) Eutécticos tipo IV están basados en mezclas de haluros de metal con urea, derivados de urea o alcoholes.

Los DES incluidos en la clasificación anterior tienen un componente iónico y, en consecuencia, son hidrofílicos. Sin embargo, estos poseen limitaciones en cuanto a su aplicación para LLE en muestras acuosas. En este sentido, ha surgido un nuevo tipo de DES (tipo V o HDES) como resultado de una mezcla de, al menos, dos componentes moleculares

[34], permitiendo la obtención de DES hidrofóbicos que presentan mejor compatibilidad con DLLME [16].

En los últimos años diversos componentes naturales se han empleado en la formulación de nuevos DES, resultando así el término de “solventes eutécticos profundos naturales” (NaDES) [35]. El uso de compuestos de origen natural; como por ejemplo aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos y derivados de colina [36]; resulta más amigable con el ambiente debido a que son fácilmente biodegradables; además, presentan ventajas como baja toxicidad, estabilización de solutos, bajo costo, facilidad de preparación, gran número de combinaciones posibles y propiedades físicas (polaridad, miscibilidad, viscosidad, punto de congelación, conductividad y densidad) que los hacen atractivos para su empleo en los procedimientos de preparación de muestras. En la actualidad diversos investigadores han propuesto la utilización de terpenos (como mentol y timol) y terpenoides como candidatos para la creación de NaDES hidrofóbicos [36-39].

### **1.5. ACOPLAMIENTO DE DLLME CON ESPECTROMETRÍAS ATÓMICAS**

La determinación de metales y no metales luego de la extracción mediante DLLME resulta dificultoso mediante técnicas espectrométricas basadas en plasma debido al pequeño volumen de muestra obtenido [40]; además los solventes orgánicos volátiles convencionalmente utilizados [41] producen un efecto deletéreo en las condiciones del plasma que afecta negativamente las cifras de mérito y pueden conducir a la extinción del mismo [42]. Conjuntamente la viscosidad de estos provoca una baja eficiencia de nebulización de la muestra y generan fuertes efectos memoria. Por ello, con el fin de afrontar estos obstáculos se han propuesto diferentes estrategias [43]:

- (i) Evaporación del solvente extractante y posterior reconstitución con ácidos previo al análisis;
- (ii) Realización de una extracción posterior con agua;
- (iii) Dilución de la muestra con un solvente apropiado;
- (iv) Utilización de sistemas de introducción alternativos como inyección en flujo (FIA); vaporización electrotérmica o ablación láser.

Recientemente Martínez y col. [16] demostraron que es posible el acoplamiento de DLLME-ICP-OES mediante la selección adecuada del sistema de introducción de muestra, así como las condiciones experimentales del plasma. Estos autores observaron que, con la selección de parámetros experimentales adecuados, los LODs en ICP-OES fueron menores

debido a la preconcentración de los elementos y también debido a la mayor eficiencia de transporte de los mismos causado por los solventes orgánicos empleados. Asimismo, Serrano y col. [17] evidenciaron que es factible el acoplamiento de DLLME-MIP-OES para la determinación de Cu en muestras de agua.

**1.6. HIPÓTESIS:**

La técnica de pretratamiento de muestras propuesta (DLLME) junto al empleo de solventes eutécticos profundos naturales (NaDES) es una metodología eficiente, presentando ventajas frente a los procedimientos convencionales de pretratamiento de muestras para la determinación elemental por MIP-OES en muestras agroalimentarias que poseen matrices complejas.

**1.7. OBJETIVO:**

Evaluar el uso de NaDES como extractante para el análisis elemental en muestras de agroalimentos mediante DLLME-MIP OES.



# CAPÍTULO II

## MATERIALES Y MÉTODOS

## 2.1. REACTIVOS Y SOLUCIONES

### 2.1.1. Solución patrón de elementos

Se utilizó una solución patrón multielemental (AGILENT TECHNOLOGIES), matriz 5% ácido nítrico/0,2% fluoruro de hidrógeno, conteniendo 50 mg L<sup>-1</sup> de: Al, As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, Zn y 500 mg L<sup>-1</sup> de K. A partir de esta solución se realizaron las diluciones correspondientes para obtener las rectas de calibración de los elementos a analizar (Cr, Mn y Ni), abarcando un intervalo de concentraciones entre 25 y 1000 µg L<sup>-1</sup>. A modo de ejemplo, esta última concentración se preparó tomando 200 µL de la solución estándar, adicionando 15 µL de HNO<sub>3</sub> para simular la matriz ácida de la mineralización y enrasando a un volumen final de 10 mL. Para las concentraciones intermedias, 25 µg L<sup>-1</sup>, 50 µg L<sup>-1</sup>, 100 µg L<sup>-1</sup>, 250 µg L<sup>-1</sup> y 500 µg L<sup>-1</sup> se realizaron los mismos pasos de preparación, con los respectivos volúmenes de solución patrón. Todos los puntos de la curva se realizaron por triplicado, además de una solución blanco.

Para la preparación de todas las soluciones, se utilizó agua ultrapura obtenida mediante un ultrapurificador de agua Milipore® modelo ultrapureSystem (Mili-Q), con resistividad de 18,2 Ω cm, a 25°C.

### 2.1.2. Material de proficiencia

Para la validación del método de extracción propuesto se utilizó un material de proficiencia producido por EMBRAPA Pecuária Sudeste (São Carlos, SP, Brasil): Milho grãos moídos (MRC 20).

### 2.1.3. Solvente eutéctico profundo natural

Se emplearon para la preparación de NaDES, (+)-Mentol racémico (SIGMA-ALDRICH), Pureza ≥ 98% y Ácido acético glacial (CICARELLI), Pureza 99,5% en proporción 1:1. Se pesaron 13,6 g de mentol a los cuales se adicionaron 5 mL de ácido acético glacial. Posteriormente la mezcla se agitó con agitador magnético hasta que se formara una solución líquida homogénea.

### 2.1.4. Reactivos utilizados en la microextracción

Las microextracciones se llevaron a cabo utilizando los siguientes reactivos: pirrolidinditiocarbamato de amonio (APDC) como quelante (SIGMA-ALDRICH), Pureza 99%; y metanol (BIOPACK) como agente dispersante. Para el acondicionamiento de pH de

las distintas disoluciones se emplearon buffers preparados a partir de las sales correspondientes: acetato de sodio trihidratado ( $\text{CH}_3\text{COONa}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; ANEDRA), ácido acético glacial ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; CICARELLI), citrato de sodio dihidratado ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_6\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; MALLINCKRODT), ácido cítrico monohidratado ( $\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot \text{H}_2\text{O}$ ; MALLINCKRODT), ácido ortofosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ; BIOPACK), fosfato monobásico de sodio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; CICARELLI) y fosfato dibásico de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; CICARELLI). La fuerza iónica se ajustó con una solución de cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ; CICARELLI) al 10% m m<sup>-1</sup>.

## 2.2. MUESTREO Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El muestreo es considerado una de las etapas más importantes del procedimiento analítico, ya que los resultados finales del análisis dependen de la forma en la que fue llevado a cabo. La muestra analizada debe ser representativa tanto en calidad como en composición al lote original, para obtener resultados válidos, de lo contrario, se corre el riesgo de obtener resultados inciertos, que no reflejan la realidad y conducen a interpretaciones erróneas [14].

Fueron recolectadas muestras de agroalimentación que se emplean en las distintas etapas de crecimiento de los cerdos, procedentes de establecimientos agropecuarios, se analizaron 13 muestras pertenecientes a una empresa productora de alimentos para cerdos, correspondientes a formulados para las etapas fisiológicas de gestación, lactancia, desarrollo, cachorras, fase 3 y 4, alimento completo fase 2 y terminador.

Una vez recolectadas las muestras, se secaron en estufa a 60 °C y se almacenaron en envases de polietileno, cerrados herméticamente.

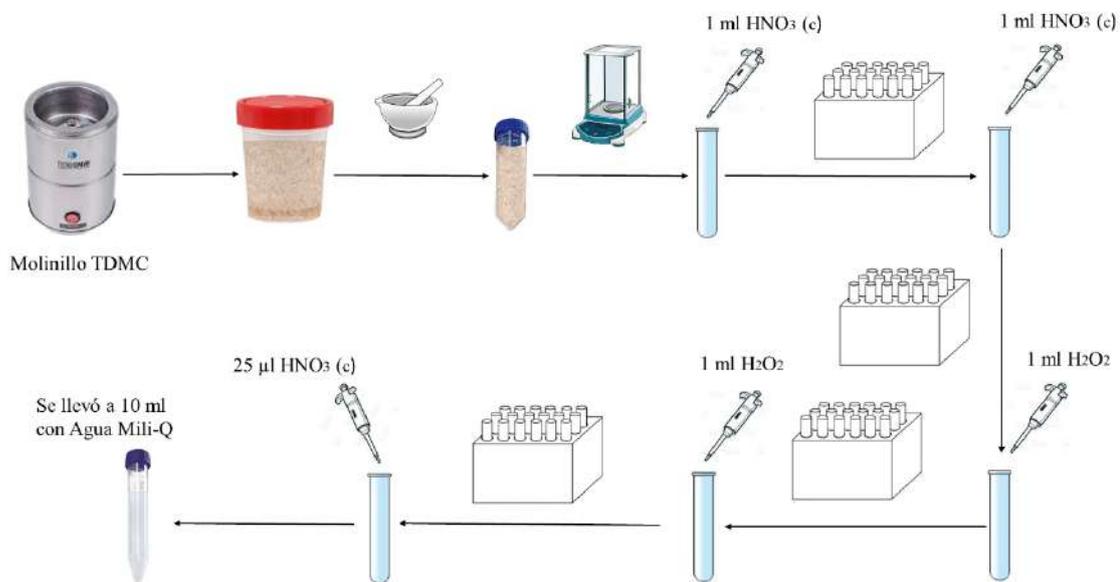
Previo el análisis, las muestras fueron premolidas en un Molinillo TDMC, potencia 190 Watt, durante 3 minutos a 22000 rpm; para reducir la heterogeneidad de las mismas. El tamaño de partícula se redujo a <10 µm utilizando una molienda criogénica; donde las muestras premolidas se mortearon utilizando nitrógeno líquido. Luego de ello se almacenaron en envases de polietileno.

En todos los casos, tanto para la manipulación, almacenamiento y tratamiento de las muestras, se empleó material de polipropileno para prevenir la contaminación por metales. El material de plástico que se utilizó, se lavó previamente con una solución de ácido nítrico al 5 % v v<sup>-1</sup>, y posteriormente con agua Mili-Q.

### 2.3. DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS

En el presente trabajo se pesaron con exactitud 0,15 g de muestra en un tubo de teflón PTFE modificado de 100 mL. Se adicionó 1 mL de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado y se expuso a radiación infrarroja mediante un prototipo de digestor de radiación IR [44], hasta casi sequedad del oxidante. Posteriormente se agregó otro mL de  $\text{HNO}_3$  y se repitió el procedimiento; luego de igual manera 2 mL de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ; SIGMA-ALDRICH) al 30%  $\text{m m}^{-1}$ , calentando mediante radiación IR hasta casi sequedad entre cada una de las adiciones. Una vez finalizada la digestión, el residuo obtenido se dejó enfriar a temperatura ambiente, se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{HNO}_3$  concentrado para redissolver la muestra y se llevó a volumen final de 10 mL con agua Mili-Q. El mismo procedimiento fue llevado a cabo con el material de proficiencia y blancos, todo por triplicado. El procedimiento se ilustra en la Figura 5.

Para la mineralización, se utilizó  $\text{HNO}_3$  (65%  $\text{m m}^{-1}$ , MERCK) purificado en destilador de ácidos minerales con sistema *sub-boiling* marca Berghoff®, con el fin de obtener ácido ultra puro, libre de metales.

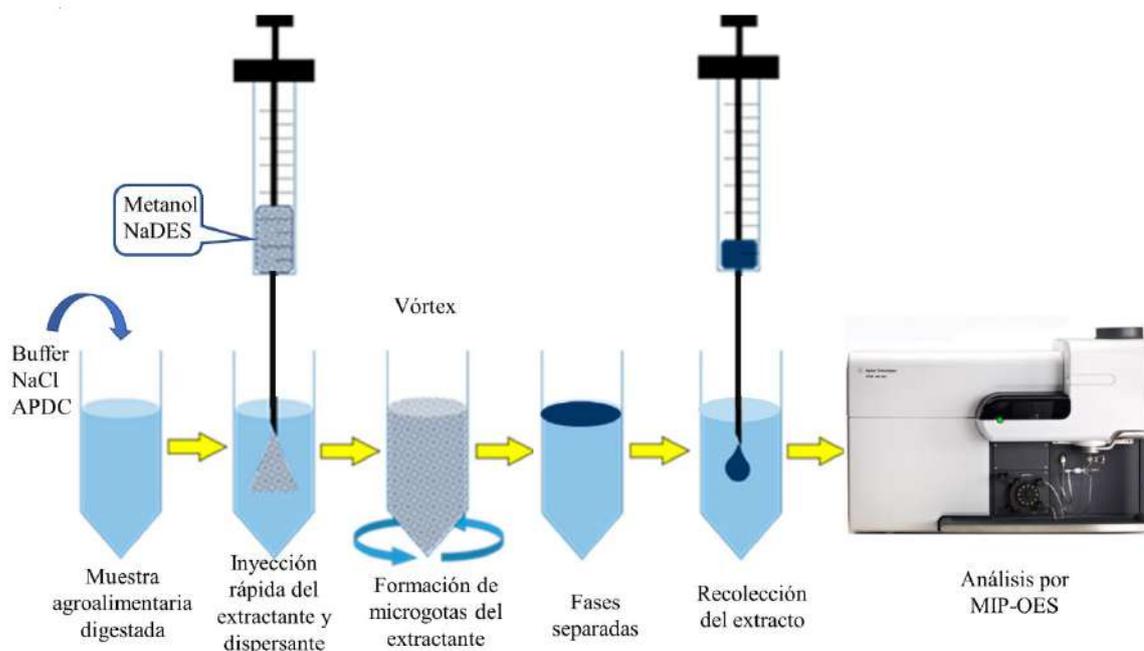


**Figura 5.** Representación del proceso de digestión de muestras.

## 2.4. MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME)

La microextracción de los elementos desde la muestra digerida se llevó a cabo mediante la formación de un quelato con APDC y su posterior extracción en el eutéctico mentol:ácido acético.

El procedimiento experimental realizado fue el siguiente: (i) se tomaron 5 mL de muestra agroalimentaria digerida y se acondicionó la muestra al pH y fuerza iónica de trabajo; (ii) se adicionó el agente quelante APDC; (iii) se mezclaron NaDES (extractante) y metanol (dispersante); (iv) se adicionó con una microjeringa la mezcla extractante-dispersante sobre la muestra; (v) se agitó la solución con la ayuda de un vortex; y por último (vi) se extrajo la gota del extractante de la capa superior con una jeringa y se trasvasó a un Eppendorf (Figura 6).



**Figura 6.** Procedimiento de extracción mediante DLLME.

Finalmente, y previo a la determinación, se diluyó la gota con ácido acético en una proporción 1:1 y se analizó mediante MIP-OES. También se realizaron los mismos pasos de microextracción sobre blancos, todo por triplicado.

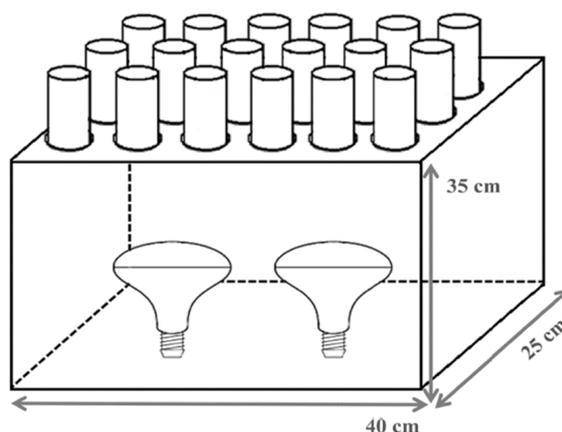
El procedimiento de microextracción fue optimizado, evaluando las variables: (i) pH, (ii) fuerza iónica (medida como % m m<sup>-1</sup> NaCl), (iii) concentración de quelante APDC (en % m m<sup>-1</sup>), (iv) volumen de dispersante. La optimización se realizó a través de Diseño Central Compuesto + estrella (Central Composite Design + star), evaluando las influencias de las

variables experimentales sobre el área de la señal de cada uno de los elementos estudiados, con el objetivo de maximizar dicho valor.

## 2.5. INSTRUMENTAL

### 2.5.1. DIGESTOR IR

Para la digestión de las muestras se empleó un prototipo digestor de radiación IR (Figura 7) [44]. Este prototipo está equipado con dos lámparas IR comerciales (250W, Francia, China) y presenta una temperatura de operación fija de 190°C aproximadamente.



*Figura 7. Digestor IR. Diseño esquemático. (Imagen adaptada de la Referencia 44).*

### 2.5.2. MIP-OES

Las determinaciones multielementales se realizaron con un espectrómetro de emisión óptica marca Agilent, modelo MPAES 4200, nebulizador OneNeb y una cámara de simple paso. Asimismo, este equipo cuenta con un módulo de control de gas externo (EGCM) que permite la inyección de aire en el plasma con el fin de evitar la inestabilidad en la misma y la deposición de carbón en la antorcha que pueden surgir del análisis de muestras orgánicas, como los NaDES, y a su vez, corregir las emisiones de fondo, lo que conlleva a mejores LODs.

Con el patrón de calibración de máxima concentración; en este caso 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , se optimizaron los parámetros instrumentales, posición de visualización y la presión de nebulización para todos los elementos. Las condiciones operacionales empleadas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros instrumentales utilizados en la determinación multielemental por MIP-OES

Parámetros instrumentales	Condiciones operacionales		
Potencia (W)	1000		
Tiempo de estabilización (s)	10		
Corrección de fondo	Automático		
Tiempo de lectura (s)	3		
Nebulizador	OneNeb®		
Cámara de nebulización	Simple paso		
Flujo de muestra (rpm)	15		
Réplicas	3		
Analito	Cr	Mn	Ni
Longitud de onda (nm)	425,433	403,076	352,454
Posición de visualización	10	0	0
Presión de nebulización (kPa)	160	160	100
Caudal de inyección de aire	Alto	Alto	Alto

Una vez optimizados los parámetros instrumentales, se continuó con la etapa de calibración analítica de los elementos a determinar. Se utilizó una solución estándar acuosa certificada, preparada tal como se indicó en el apartado 2.1.1.

## 2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos fueron realizados por triplicado y los resultados fueron expresados como el promedio de las medidas  $\pm$  un intervalo de confianza (95%). Los cálculos y test estadísticos se realizaron a través de Microsoft Office Professional Plus Excel® 2016. La optimización del proceso de microextracción se realizó mediante el programa Statgraphics Centurion®

El método propuesto fue validado en términos de los siguientes parámetros: linealidad, LODs, Límites de Cuantificación (LOQs), repetibilidad y recuperación. Los valores de LODs y LOQs fueron calculados en base a las ecuaciones (1) y (2), como [45]:

$$LOD = \frac{3,3 S_{y/x}}{A} \sqrt{1 + h_0 + \frac{1}{I}} \quad (1)$$

$$LOQ = \frac{10 Sy/x}{A} \sqrt{1 + h0 + \frac{1}{I}} \quad (2)$$

La repetibilidad y recuperaciones (nivel de confianza 95%) fueron calculadas en función al material de proficiencia analizado.

## **2.7. EVALUACIÓN DEL IMPACTO AMBIENTAL**

Con el fin de evaluar si la metodología desarrollada es amigable con el ambiente, se llevó a cabo un estudio de los índices verdes. Se utilizaron dos herramientas diferentes para este propósito, AGREE [46] empleada en el proceso analítico total y AGREEprep [47] que se enfoca principalmente en la etapa de preparación de la muestra, necesaria en la gran mayoría de los procedimientos analíticos.



# CAPÍTULO III

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. DESCRIPCIÓN DEL NaDES (+)-MENTOL:ÁCIDO ACÉTICO

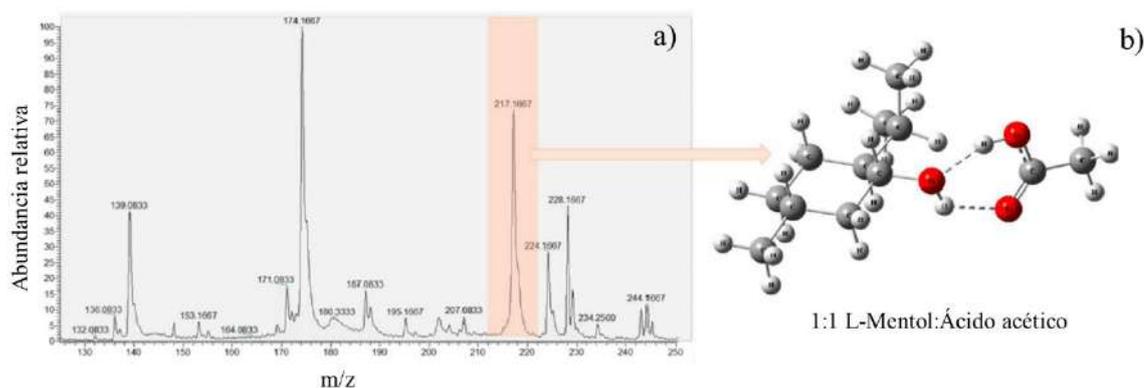
Los DES son muy populares y se cree que son agentes extractivos selectivos, baratos y fáciles de usar (debido a la baja presión de vapor) para la separación de ciertas especies orgánicas e inorgánicas [48]. Se los considera un solvente verde, donde dos o más compuestos se mezclan en una determinada proporción molar formando un solvente eutéctico, cuyo punto de congelamiento es inferior al de los componentes por separado. Comúnmente, el HBA y el HBD forman una compleja red de interacción no enlazante, inhibiendo el proceso de cristalización y, por lo tanto, reduciendo el punto de congelación de la fase solvente. La deslocalización de la carga a través de enlaces de hidrógeno es una de las principales razones detrás de este fenómeno [49].

Según la literatura, los solventes eutécticos obtenidos de recursos naturales son en su gran mayoría hidrofílicos, empleando, por ejemplo, cloruro de colina como HBA. En consecuencia, las mezclas eutécticas de recursos renovables con cierto carácter hidrofóbico, que muestran un equilibrio líquido-líquido con el agua, son necesarios para un gran número de aplicaciones [36].

Dadas las diferentes posibilidades de NaDES, centramos la atención en las mezclas eutécticas de mentol por ser este un compuesto natural que ofrece propiedades biodegradables y no presenta toxicidad. El mentol se obtiene extrayéndose a partir de la esencia de varias especies de plantas del género *Mentha*, por lo que es muy abundante y no representa un costo elevado. Asimismo, debido a su muy pequeña solubilidad en agua ( $0,46 \text{ mg mL}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ), el mentol es un buen candidato para preparar solventes sostenibles, baratos e hidrófobos mediante la formación de eutécticos. En el presente estudio, se empleó un NaDES formado por Ácido Acético y (+)-Mentol en proporción 1:1 para la extracción de Cr, Mn y Ni en muestras de alimentos porcinos.

Un sistema de solvente eutéctico profundo es difícil de explicar solo por las propiedades típicas del solvente (como lo son, constante dieléctrica o momento dipolar) porque posee un gran número de interacciones, como el efecto doblemente iónico, enlaces de hidrógeno, enlaces de halógeno, interacciones  $\pi$ - $\pi$  y Fuerzas de van der Waals. La mayoría de los métodos disponibles sólo pueden determinar un tipo principal de interacciones o propiedades. En el caso del NaDES en estudio, el ácido acético y mentol actúan como HBD y HBA, respectivamente [49].

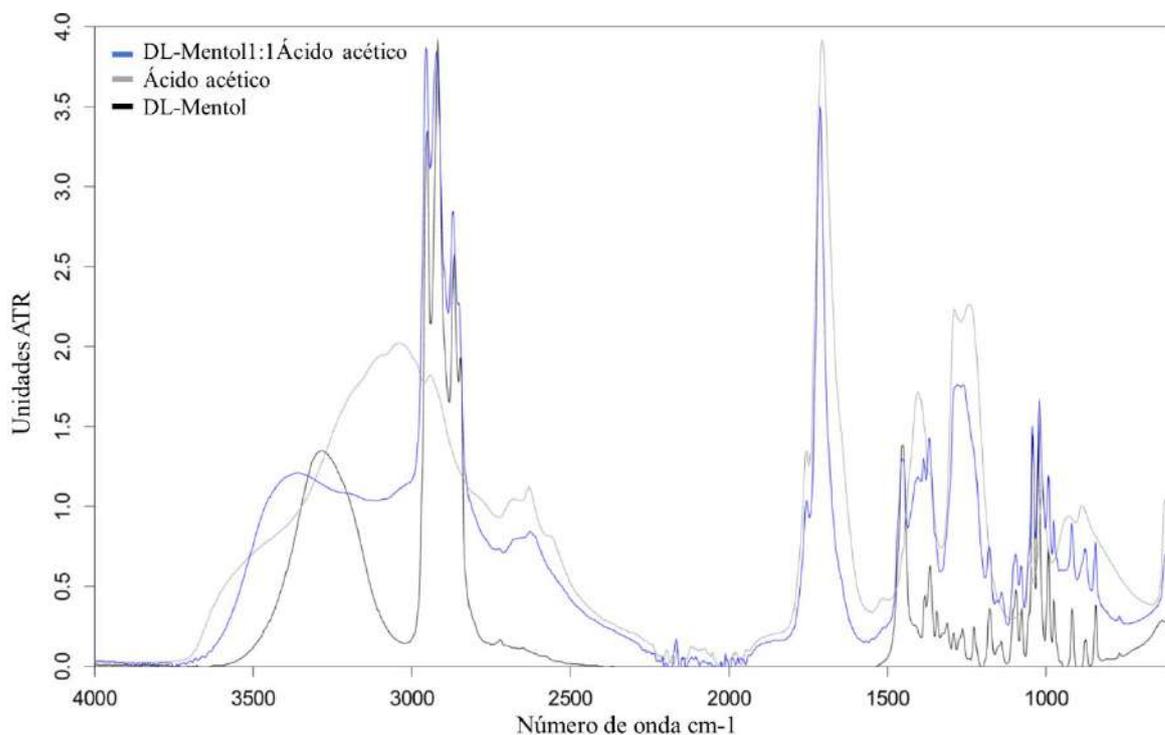
Ali y col., a través de espectrometría de masas confirmaron la formación del sistema NaDES 1:1 (+)-Mentol:Ácido acético a temperatura ambiente, sin embargo, dicho sistema no se observa cuando la temperatura se eleva a 50 °C durante la formulación (Figura 8). Al monitorear las estructuras y los espectros de vibración, concluyeron que las principales interacciones no enlazantes entre el mentol y el ácido acético son  $O(20)_{Men} \cdots H(39)-O(38)_{AA}$  y  $O(20)-H(21)_{Men} \cdots O(37)_{AA}$ , y son responsables de la formación del DES. Los cálculos de la función de distribución radial mostraron que, junto con los enlaces de hidrógeno clásicos, los enlaces de hidrógeno no clásicos (p. ej.,  $C-H \cdots O$ ) de las colas de alquilo del mentol y el ácido acético ayudan a formar una red sólida en todo el sistema NaDES y contribuyen a deslocalizar la nube de carga de un componente a otro [49]. Nashiretty y Panchagnula [50] reportaron también que el mentol interactúa con las colas de alquilo de lípidos y los grupos de cabeza polar de la mezcla, reduciendo su temperatura de fusión.



**Figura 8.** Espectro de masas del NaDES (+)-Mentol:Ácido acético (a), Conformero energéticamente más favorable de NaDES (+)-Mentol:Ácido acético (b). (Adaptada de referencia 49).

Ribeiro y col. (2015) estudiaron los espectros FTIR para la mezcla eutéctica de (+)-Mentol:Ácido acético y sus componentes individuales (Figura 9). El donante de enlaces de hidrógeno, tiene un grupo ácido carboxílico en su estructura que presenta una banda representativa (grupo cetona o carbonilo) alrededor de  $1700 \text{ cm}^{-1}$  en el espectro, mientras que el aceptor de enlaces de hidrógeno, (+)-Mentol, muestra solo una banda correspondiente al grupo hidroxilo, alrededor de  $3300 \text{ cm}^{-1}$ . Además, el espectro FTIR de la mezcla eutéctica muestra la interacción del enlace de hidrógeno intermolecular entre ambos compuestos principalmente en la región del grupo carboxilo, donde se puede observar (Figura 9) que la banda carbonilo del HBD que estaba originalmente ubicada a bajos valores de número de

onda ( $\sim 1692\text{ cm}^{-1}$ ) se amplía y cambia a valores más altos ( $\sim 1735\text{ cm}^{-1}$ ) en la mezcla eutéctica. Esto es una fuerte indicación de la creación de un nuevo enlace de hidrógeno, lo que demuestra que se formó un nuevo compuesto [36].



**Figura 9.** Espectros FTIR del (+)-mentol puro, ácido acético y la mezcla eutéctica de (+)-mentol y ácido acético (proporción molar 1:1). (Adaptada de referencia 36).

A pesar de que la mezcla eutéctica en estudio está compuesta de un ácido hidrofílico natural, generalmente también se usa en la preparación de solventes eutécticos profundos inmiscibles con el agua, lo que le confiere un lugar destacado entre los solventes verdes, que suelen ser muy hidrofílicos. Usando el carácter hidrofóbico de este eutéctico, se optimizó la DLLME con el objetivo de favorecer la extracción multielemental.

### 3.2. OPTIMIZACIÓN DE LA MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA (DLLME) EMPLEANDO NaDES

Una de las etapas críticas en la determinación elemental es la preparación de las muestras y, más concretamente, la etapa correspondiente a la extracción. Así, las condiciones de operación seleccionadas deben lograr una máxima extracción de los analitos; por ello, uno de los principales objetivos de este trabajo fue desarrollar un método de microextracción que a su vez sea amigable con el ambiente. En esta búsqueda, el uso de la optimización

multivariada se alinea con los principios de GAC, ya que el número de experimentos permite una reducción significativa en el consumo de muestras, reactivos, energía, entre otros. Considerando los diversos factores que afectan el procedimiento DLLME, el empleo del diseño de optimización multivariado ayuda a determinar el mejor modelo de relación entre ellos, así como las condiciones experimentales óptimas, estimando la determinación simultánea de tres analitos.

Para la optimización se prepararon soluciones estándar conteniendo  $500 \text{ ug L}^{-1}$  de los analitos de interés. Las cuatro variables significativas: pH, concentración de APDC, fuerza iónica expresada a través de la concentración de NaCl y volumen de dispersante se estudiaron aplicando un Diseño Central Compuesto + estrella (CCD + star) de 5 niveles por triplicado y de forma aleatoria, evitando así cualquier posible sesgo en la preparación de los mismos (Tabla 2). Esta metodología ofrece la posibilidad de evaluar la influencia de las variables experimentales individualmente, así como las posibles interacciones entre ellas y los efectos no lineales. Como resultado se obtuvo una superficie a partir de la cual se pueden definir perfectamente cuáles son las condiciones óptimas del experimento.

**Tabla 2.** Diseño CCD para la extracción de Cr, Mn y Ni mediante DLLME.

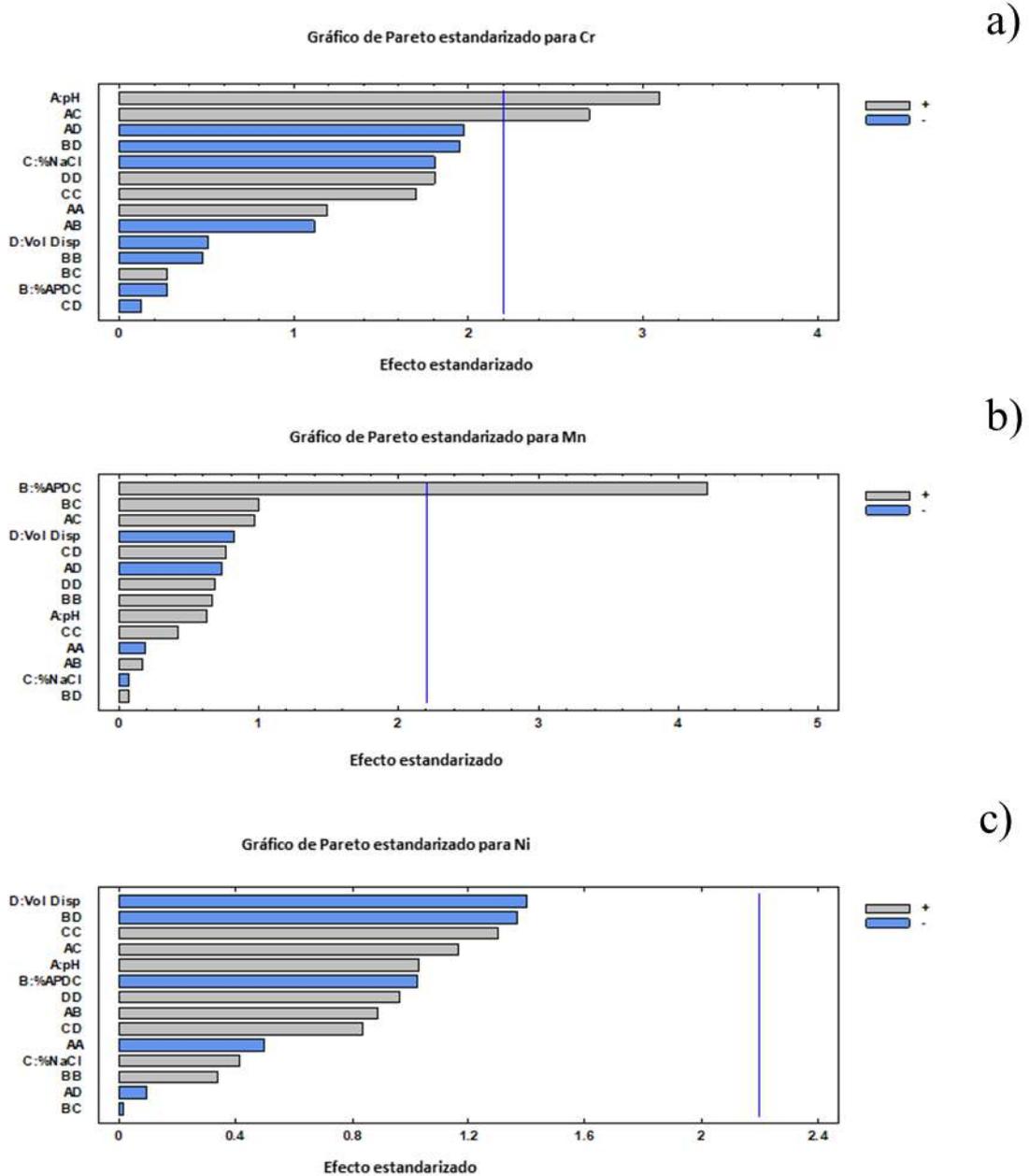
Factores		Nivel				
		++	+	0	-	--
pH	A	1,5	3,0	4,5	6,0	7,5
Concentración de APDC [% m m <sup>-1</sup> ]	B	0,35	0,50	0,65	0,80	0,95
Concentración de NaCl [% m m <sup>-1</sup> ]	C	0,5	2,0	3,5	5,0	6,5
Volumen de dispersante [μL]	D	50	200	350	500	650

Finalmente, mediante el programa Statgraphics Centurión ® se analizó la matriz de datos con los resultados obtenidos. Se realizaron un total de 26 experimentos para obtener las condiciones de extracción óptimas, estos y sus respuestas se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Condiciones de los experimentos realizados para el diseño experimental CCD + star y áreas de los picos obtenidos para cada analito.

Factores				Área Cr	Área Mn	Área Ni
A	B	C	D			
1,5	0,7	3,5	350	8595,77	4002,92	302,94
3,0	0,5	2,0	200	1522,88	1009,39	263,71
3,0	0,5	2,0	500	10115,79	7258,90	483,70
3,0	0,5	5,0	200	8781,69	10340,28	507,33
3,0	0,5	5,0	500	19865,74	10115,23	799,02
3,0	0,8	2,0	200	19947,79	12346,52	874,99
3,0	0,8	2,0	500	16185,75	18760,17	620,59
3,0	0,8	5,0	200	9164,62	2143,43	816,04
3,0	0,8	5,0	500	19259,34	4007,75	794,04
4,5	0,4	3,5	350	16561,30	5124,49	542,83
4,5	0,7	3,5	50	19249,23	9201,41	564,52
4,5	0,7	3,5	350	21510,05	6076,61	680,85
4,5	0,7	3,5	350	18985,61	9098,04	491,77
4,5	0,7	3,5	650	12319,59	8840,00	568,94
4,5	0,7	6,5	350	6376,02	4084,53	552,99
4,5	1,0	3,5	350	22757,16	12338,83	991,27
6,0	0,5	2,0	200	15039,62	14975,25	653,61
6,0	0,5	2,0	500	6992,68	2318,99	412,29
6,0	0,5	5,0	200	13437,92	3711,29	851,42
6,0	0,5	5,0	500	23431,42	3624,78	873,58
6,0	0,8	2,0	200	16133,65	6188,73	881,76
6,0	0,8	2,0	500	20832,29	4059,96	834,28
6,0	0,8	5,0	200	9544,47	3145,48	661,11
6,0	0,8	5,0	500	11353,38	2738,73	2738,73
7,5	0,7	3,5	350	19548,59	6340,15	793,31
4,5	0,4	3,5	350	7950,13	1148,22	703,09

La Figura 10 muestra los gráficos de Pareto, donde la altura de la barra del diagrama está directamente relacionada con el valor absoluto de los efectos estandarizados predecibles y la línea vertical indica efectos significativos al nivel de confianza del 95 % [51]. Para los tres analitos estudiados (Cr, Mn y Ni) la microextracción se ve favorecida a pH elevado (resultado positivo), así como para volúmenes pequeños de dispersante (resultado negativo). El producto de la fuerza iónica es diferente para los analitos, observándose un impacto positivo en Ni y negativo para Cr y Mn. De manera semejante, altos niveles de APDC favorecen la extracción de Mn y ocurre lo contrario para Cr y Ni. Sólo los factores pH y concentración de APDC muestran efectos significativos en la respuesta (Figura 10).



**Figura 10.** Gráficas de Pareto para Cr (a), Mn (b) y Ni (c).

La significación de los efectos se comprobó mediante el análisis de la varianza (ANOVA) y usando niveles de significancia de valor p. Esta cifra representa la probabilidad de que el efecto de un factor sea debido únicamente a un error aleatorio. Por lo tanto, si el valor p es inferior al 5%, el impacto del factor correspondiente es significativo [52]. Los resultados obtenidos mediante ANOVA se presentan en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Análisis de la Varianza para la optimización de Cr, Mn y Ni mediante DLLME.

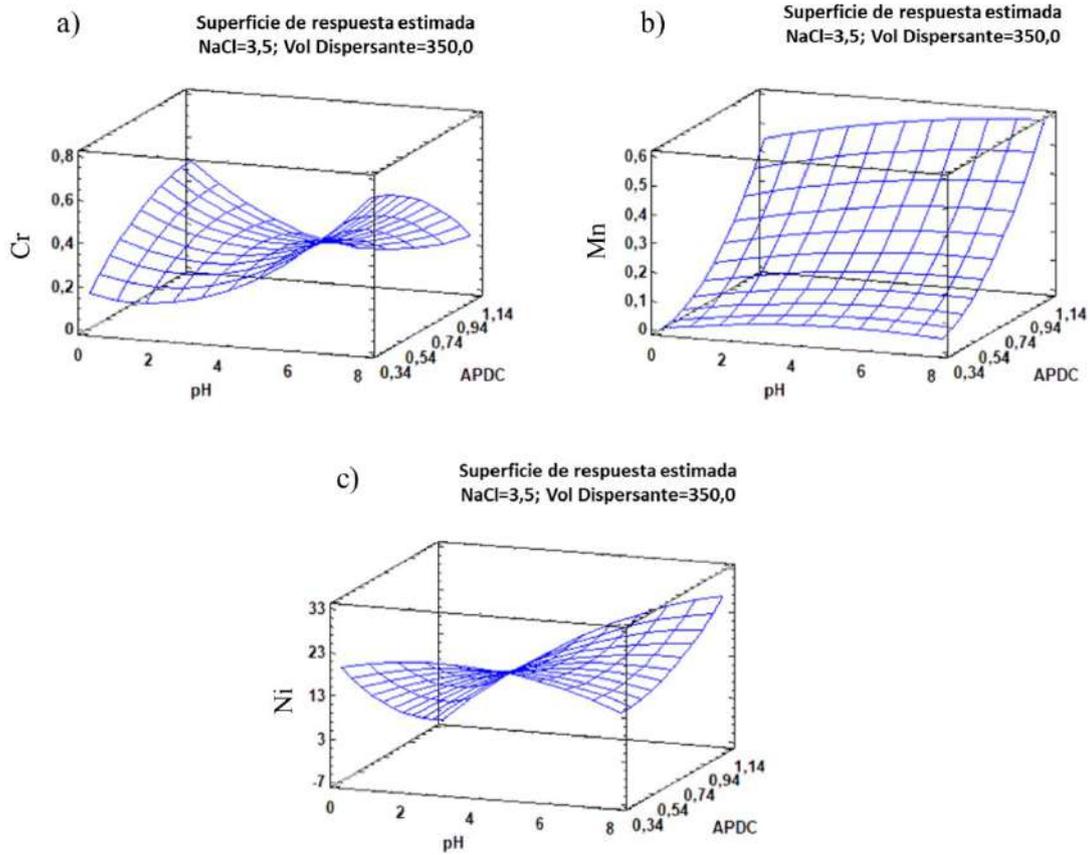
<b>Análisis de la Varianza</b>															
Cr						Mn					Ni				
	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p	Suma de Cuadrados	GI	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-p
A	942,507	1	942,507	9,580	0,010	33,135	1	33,135	0,400	0,540	0,398	1	0,398	1,060	0,325
B	7,260	1	7,260	0,070	0,791	1466,410	1	1466,410	17,750	0,002	0,393	1	0,393	1,050	0,328
C	321,202	1	321,202	3,260	0,098	0,482	1	0,482	0,010	0,941	0,063	1	0,063	0,170	0,690
D	26,042	1	26,042	0,260	0,617	54,602	1	54,602	0,660	0,434	0,739	1	0,739	1,970	0,188
AA	140,327	1	140,327	1,430	0,258	2,970	1	2,970	0,040	0,853	0,093	1	0,093	0,250	0,629
AB	122,102	1	122,102	1,240	0,289	2,250	1	2,250	0,030	0,872	0,294	1	0,294	0,790	0,394
AC	710,223	1	710,223	7,220	0,021	77,440	1	77,440	0,940	0,354	0,508	1	0,508	1,360	0,269
AD	382,203	1	382,203	3,880	0,075	44,223	1	44,223	0,540	0,480	0,003	1	0,003	0,010	0,927
BB	22,173	1	22,173	0,230	0,644	36,068	1	36,068	0,440	0,522	0,043	1	0,043	0,120	0,741
BC	7,290	1	7,290	0,070	0,791	81,903	1	81,903	0,990	0,341	0,000	1	0,000	0,000	0,990
BD	372,490	1	372,490	3,780	0,078	0,360	1	0,360	0,000	0,949	0,701	1	0,701	1,870	0,199
CC	284,240	1	284,240	2,890	0,117	14,138	1	14,138	0,170	0,687	0,636	1	0,636	1,700	0,219
CD	1,440	1	1,440	0,010	0,906	49,000	1	49,000	0,590	0,458	0,263	1	0,263	0,700	0,420
DD	320,549	1	320,549	3,260	0,099	38,621	1	38,621	0,470	0,508	0,347	1	0,347	0,930	0,357
Error total	1082,690	11	98,426			908,868	11	82,624			4,120	11	0,375		
Total (corr.)	4763,160	25				2815,300	25				8,946	25			

A su vez, el programa permite generar una ecuación de regresión que se ajusta a los valores obtenidos a partir de los diferentes experimentos. De esta forma, se puede modelar cuál va a ser el resultado para la medición del área de la señal del analito, en función de los valores de las diferentes variables bajo estudio. Los coeficientes de regresión para los analitos estudiados se ilustran en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Coeficientes de regresión asociados a las variables de extracción para Cr, Mn y Ni mediante DLLME.

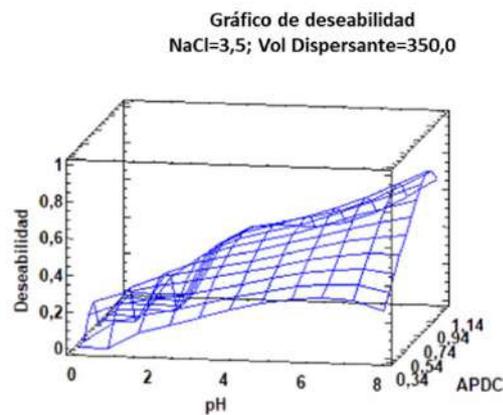
	Cr	Mn	Ni
Coefficiente	Estimado	Estimado	Estimado
Constante	7,325	60,440	5,658
A	-1,944	0,514	-0,269
B	181,259	-75,972	-3,150
C	-29,802	-16,553	-1,110
D	0,102	-0,055	-0,001
AA	1,260	-0,183	-0,032
AB	-12,278	1,667	0,603
AC	2,961	0,978	0,079
AD	-0,022	-0,007	0,000
BB	-50,093	63,889	2,208
BC	3,000	10,056	-0,008
BD	-0,214	0,007	-0,009
CC	1,794	0,400	0,085
CD	-0,001	0,008	0,001
DD	1,90E-04	6,61E-05	6,26E-06

Como puede observarse en la tabla anterior, las ecuaciones no son lineales sino que presentan términos cuadráticos, permitiendo obtener superficies de respuesta para Cr, Mn y Ni, donde se fijan dos variables y las otras dos se representan, como se muestra en la Figura 11. En ella, se puede observar que, para Cd y Ni los gráficos tienen una tendencia semejante. Las superficies no son planas debido a la existencia de dependencias entre las distintas variables estudiadas en la microextracción de los analitos. En este caso se mantuvieron fijos los valores del punto central para NaCl y volumen de dispersante.



**Figura 11.** Superficies de respuesta obtenidas por CCD para Cr (a), Mn (b) y Ni (c)

El siguiente gráfico de superficie representa los valores de pH frente a la concentración de APDC y muestra la mayor deseabilidad para condiciones elevadas de ambos factores (Figura 12).



**Figura 12.** Superficie de respuesta de la deseabilidad en función del pH y concentración de APDC.

Los valores de los factores optimizados se muestran en la Tabla 6 para los 3 analitos así como las condiciones finales, correspondientes a la microextracción conjunta. Como no hay diferencias significativas en los coeficientes A, B y D, estas condiciones fueron seleccionadas como las favorables para todos los analitos. Para el factor C se obtuvo el promedio de dichos valores (es decir, concentración de NaCl 6,2 % m m<sup>-1</sup>).

**Tabla 6.** Condiciones óptimas para la extracción de Cr, Mn y Ni.

Factores		Cr	Mn	Ni	Final
pH	A	7,5	7,5	7,5	7,5
Concentración de APDC [% m m <sup>-1</sup> ]	B	0,9	0,9	0,9	0,9
Concentración de NaCl [% m m <sup>-1</sup> ]	C	6,5	6,5	5,6	6,2
Volumen de dispersante [μL]	D	50	50	50	50

Tal como lo muestran diversas publicaciones, el pH de la muestra presenta un efecto para los procedimientos de extracción de metales, ya que tiene una influencia directa en la etapa de complejación, afectando a la química del analito, y la ionización del quelante, produciéndose una variación de la constante de unión metal-quelato [53-55].

Generalmente, un aumento en la concentración de quelante genera una mayor extracción de los metales, sin embargo, altas concentraciones pueden provocar la saturación del solvente orgánico del quelante disminuyendo la extracción [56].

La fuerza iónica no suele tener un efecto tan significativo en los diferentes estudios de optimización de DLLME hasta el momento, y se desconoce la influencia de NaCl en DLLME con NaDES hidrofóbicos. La adición de una sal a la solución acuosa puede aumentar su fuerza iónica, por lo que la solubilidad de los analitos en la fase acuosa se reduciría y, al mismo tiempo, podría reforzar la partición de los analitos en la fase orgánica. Farajzadeh y col., trabajaron con un DES hidrofílico (Cloruro de colina:4-clorofenol) y demostraron que la adición de NaCl no tuvo un efecto significativo sobre las señales analíticas hasta el 1% m v<sup>-1</sup>, luego las mismas disminuyeron gradualmente en presencia de altas concentraciones de NaCl. Los autores plantearon que este comportamiento podría deberse a un aumento en la viscosidad de la fase acuosa debido a la adición de NaCl, lo que provocó una disminución en los coeficientes de difusión de los analitos [27].

Por otro lado, el volumen de la fase separada varía con el volumen del solvente dispersante utilizado. Con volúmenes bajos de dispersante, las microgotas no se formarían satisfactoriamente, por lo que se alteraría el procedimiento DLLME. Con grandes volúmenes, aumentaría la solubilidad de los analitos y el DES en la fase acuosa y, por lo tanto, disminuirá la eficiencia de extracción [27].

### 3.3. DESEMPEÑO ANALÍTICO

Las cifras de mérito se calcularon a partir de los datos de emisión obtenidos. En la Tabla 7 puede observarse una comparación de las curvas de calibración,  $R^2$ , LODs y LOQs adquiridos mediante el método convencional y el propuesto. Los LODs y LOQs se calcularon mediante las ecuaciones descritas en el apartado 2.6.

**Tabla 7.** Comparación de Cifras de mérito mediante el método convencional y DLLME-MIP-OES para los analitos estudiados.

	Analito	Ecuación de recta	$R^2$	LODs ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQs ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
MIP-OES	Cr	$y = 3222,9 x + 77,15$	0,999	68	206
	Mn	$y = 26104,0 x + 787,57$	0,999	83	253
	Ni	$y = 357,4 x + 16,64$	0,999	63	190
DLLME-MIP-OES	Cr	$y = 24751,0 x - 295,86$	0,989	14	44
	Mn	$y = 59874,0 x + 2,82$	0,991	26	80
	Ni	$y = 1175,5 x + 12,78$	0,973	20	61

Si bien los LODs se encuentran en el mismo orden de magnitud para los tres analitos, puede observarse una mejora entre 20-30% en los mismos. Podrían obtenerse mejores límites al emplear mayores volúmenes de muestra, lo que daría lugar a mayores factores de preconcentración y, por tanto, menores LODs.

La determinación del factor de preconcentración o de enriquecimiento (EF) permite evaluar la efectividad o capacidad que presenta la metodología de DLLME para llevar a cabo la preconcentración de Cr, Mn y Ni. Se calculó mediante la ecuación 3:

$$EF = \frac{C_{gota}}{C_{muestra}} \quad (3)$$

donde  $C_{gota}$  es la concentración del analito en la gota obtenida luego de la extracción y  $C_{muestra}$  es la concentración en la muestra. El EF se determinó realizando una serie de microextracciones en condiciones óptimas de operación sobre patrones de concentración conocida de Cr, Mn y Ni.

Según nuestro conocimiento, este es el primer trabajo en el que se aplica DLLME utilizando NaDES como solvente extractante para la determinación elemental en muestras agroalimentarias. Debido a que no hay publicaciones previas sobre la determinación de Cr, Mn y Ni mediante DLLME-MIP-OES reportados hasta el momento, los datos de este trabajo han sido comparados con los informados para DLLME-ICP-OES [16,17,54,57,58] (Tabla 8). Si bien Serrano y col., emplearon DLLME-MIP-OES, solamente realizaron la cuantificación de Cd en muestras de agua. Se puede observar que de las publicaciones mencionadas, solamente dos de ellas utilizaron DES como solvente extractante y que, de todas las referencias, nuestro trabajo fue el que obtuvo un amplio rango de EF, pero con el mayor valor logrado para Ni.

**Tabla 8.** Comparación de las características analíticas del método propuesto con algunas publicaciones basadas en DLLME.

Analitos	Muestra	Extractante	Quelante	Dispersante	Técnica	EF	Ref.
As Cd Pb	Alimentos: mejillones, arroz, vino tinto, chocolate	1-decanol	APDC (0,2% m m <sup>-1</sup> )	THF	ICP-OES	10-45	[116]
Cd	Agua	1-decanol	DDTP (1,8% y 2,2% m m <sup>-1</sup> en etanol puro)	THF	MIP-OES	70	[17]
As Cd	Vino	DES (Ácido láctico + cloruro de trimetil cetil amonio 1:3)	DES	Metanol	FAAS	80	[57]
Cd Hg Pb	Drogas	Tolueno	DDTC (1,0% m v <sup>-1</sup> )	Sin reportar	ICP-OES	55-72	[54]
Cd Co Hg Ni Pb V Ni	Drogas orales y parenterales	DES (Ácido decanoico + (+)-Mentol 2:1)	8-HQ (1,0% m v <sup>-1</sup> )	Sin reportar	ICP-OES	22-86	[58]
Cr Mn Ni	Muestras agroalimentarias	DES ((+)-Mentol + Ácido acético 1:1)	APDC (0,9% m v <sup>-1</sup> )	Metanol	MIP-OES	4-96	Este trabajo

### 3.4. ÍNDICES VERDES

Los índices verdes son cada vez más importantes para obtener una clasificación integradora e informativa de un método, pero uno sólo no es suficiente para evaluar la sostenibilidad de un procedimiento analítico. Hoy en día, los softwares libres más populares son AGREE y AGREEprep; estos permiten obtener una puntuación que oscila entre 0 y 1 (peor a mejor rendimiento) junto con un pictograma codificado por colores (escala de rojo-amarillo-verde). La puntuación final surge de funciones matemáticas que se refieren a los 12 principios de GAC y las 10 bases de la preparación de muestras verdes (GSP) para AGREE y AGREEprep, respectivamente [46,47]. Las puntuaciones más altas (color verde) podrían considerarse metodologías más verdes, mientras que los valores bajos, corresponden a procedimientos menos ecológicos (color rojo). El pictograma presenta un círculo central indicando la puntuación global de la evaluación del verdor del método analítico y cada uno de los sectores exteriores corresponden a los principios de los cuales derivan, y se asigna un peso diferente a cada criterio según el impacto que tenga en el verdor de la metodología.

Las puntuaciones generales obtenidas por AGREE y AGREEprep se representan en las Tablas 9 y 10, obteniendo un valor de 0,50 para el proceso analítico total mediante AGREE y un puntaje de 0,69 en AGREEprep para el pretratamiento de muestras propuesto (Figura 13).

La Figura 13 (a) presenta el diagrama y el puntaje logrado mediante AGREE. Este resultado fue obtenido considerando que el procedimiento analítico total se realizó ex situ, de forma manual e incluyó una etapa de pretratamiento de muestra. Se consideró que el desecho total de muestra y reactivos fue mínimo. Para la cuantificación de los analitos se utilizó MIP-OES que, como se mencionó anteriormente, una de las ventajas que posee es la determinación multielemental, reduciendo considerablemente el tiempo de análisis, sumado al relativo bajo costo de operación al emplear  $N_2$  en lugar de Ar. Con respecto a la toxicidad de los reactivos solamente el  $HNO_3$  fue etiquetado como peligroso (oxidante).

Para el diagrama obtenido mediante AGREEprep ilustrado en la Figura 13 (b), el puntaje se alcanzó considerando que el procedimiento DLLME se realizó ex situ y no se utilizaron sustancias peligrosas. Se ha considerado un desecho total de 5 mL. En cuanto a otros residuos, las puntas de micropipetas no se tuvieron en cuenta como residuos ya que son reutilizables. El rendimiento del pretratamiento de muestra fue de 15 muestras/hora. Con respecto al procedimiento, este fue realizado manualmente e involucró cinco pasos principales; y se estimó que se consumieron  $\sim 0,6$  Wh de potencia por muestra. En el método

propuesto, se utilizó MIP-OES para la determinación de los analitos, y no se utilizaron reactivos considerados peligrosos.

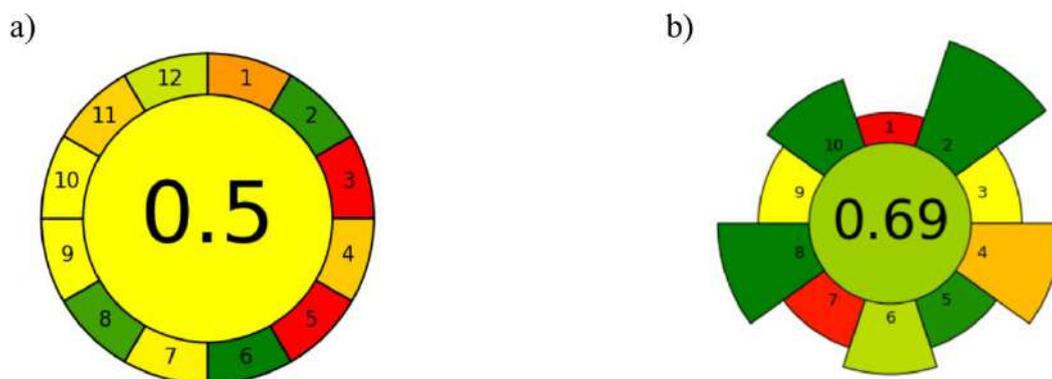
**Tabla 9.** Puntajes obtenidos para la metodología evaluada, para cada uno de los 12 principios de GAC según AGREE.

Criterios	Peso	Puntaje
1. Muestreo	2	0,30
2. Cantidad de muestra	2	0,92
3. Posicionamiento del dispositivo	2	0,00
4. Etapas de preparación de muestras	2	0,40
5. Automatización y miniaturización	2	0,00
6. Derivatización	2	1,00
7. Cantidad de residuos	2	0,48
8. Determinación de múltiples analitos y rendimiento de muestras	2	0,87
9. Consumo de energía	2	0,50
10. Naturaleza del reactivo	2	0,50
11. Toxicidad	2	0,41
12. Seguridad del operador	2	0,60

**Tabla 10.** Puntajes obtenidos para el pretratamiento de muestra, para cada uno de los 10 principios de GSP según AGREEprep.

Criterios	Peso	Puntaje
1. Colocación de la preparación de la muestra Ex situ	1	0,00
2. Materiales peligrosos	5	1,00
3. Sustentabilidad y renovabilidad	2	0,50
4. Residuos	4	0,37
5. Cantidad de muestra	2	0,94
6. Rendimiento de muestra (muestras hr <sup>-1</sup> )	3	0,64
7. Integración y automatización	2	0,06
8. Consumo de energía	4	1,00

9.	Equipamiento utilizado posterior al pretratamiento de muestra	2	0,50
10.	Seguridad del operador	3	1,00



**Figura 13.** Resultados obtenidos para AGREE (a) y AGREEprep (b) para DLLME-MIP-OES.

### 3.5. APLICACIÓN ANALÍTICA

Una vez validado el método propuesto de DLLME-MIP-OES, se procedió a analizar muestras reales. Se prepararon 13 muestras (como se indica en las secciones 2.3 y 2.4) por triplicado, lo que llevó a realizar 36 determinaciones de alimentos porcinos con el pretratamiento de muestra optimizado. En la Tabla 11 se presentan las concentraciones de los analitos obtenidos mediante DLLME-MIP-OES.

**Tabla 11.** Concentración ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) de Cr, Mn y Ni encontrados en muestras agroalimentarias.

Muestras	Cr	Mn	Ni
1	1,383 $\pm$ 0,251	141,730 $\pm$ 26,491	13,120 $\pm$ 2,330
2	1,055 $\pm$ 0,067	92,937 $\pm$ 19,367	6,883 $\pm$ 4,235
3	0,960 $\pm$ 0,297	124,205 $\pm$ 26,796	6,152 $\pm$ 1,049
4	1,346 $\pm$ 0,353	71,338 $\pm$ 7,178	13,508 $\pm$ 1,176
5	1,137 $\pm$ 0,433	121,033 $\pm$ 79,036	20,188 $\pm$ 8,130
6	0,913 $\pm$ 0,273	97,068 $\pm$ 5,892	9,142 $\pm$ 8,260
7	1,031 $\pm$ 0,485	55,106 $\pm$ 0,779	7,420 $\pm$ 1,617
8	1,741 $\pm$ 0,154	35,926 $\pm$ 4,307	34,042 $\pm$ 5,777
9	1,204 $\pm$ 0,109	62,260 $\pm$ 10,830	16,559 $\pm$ 2,189
10	0,857 $\pm$ 0,197	90,704 $\pm$ 13,539	10,829 $\pm$ 7,988

11	1,153 ± 0,427	37,898 ± 8,707	18,485 ± 27,411
12	0,907 ± 0,138	98,000 ± 0,309	11,497 ± 3,115
13	0,874 ± 0,177	70,355 ± 18,464	8,148 ± 2,106

Las propiedades químicas de los minerales afectan las funciones nutricionales y fisiológicas de los animales. Por lo tanto, el conocimiento de la química y el metabolismo de los minerales es esencial para comprender las prácticas de alimentación y nutrición animal.

El **Cromo** juega un papel importante en la regulación del metabolismo de la glucosa, proteínas y lípidos en los animales. La ingesta insuficiente de este mineral en la dieta se asocia con una menor sensibilidad a la insulina, concentraciones elevadas de glucosa en el plasma y dislipidemia. El Cr<sup>+6</sup> es mucho más tóxico que el Cr<sup>+3</sup>; de hecho, el cromo trivalente tiene un nivel de toxicidad tan bajo que existe un amplio margen de seguridad entre las cantidades que normalmente se ingieren y las que pueden inducir efectos nocivos. La exposición crónica al polvo de cromato se ha relacionado con una mayor incidencia de cáncer de pulmón, y la administración oral de 50 ppm de cromato se ha asociado con una depresión del crecimiento y daño hepático y renal en animales de experimentación. La toxicidad por cromo en animales incluye concentraciones elevadas de 8-hidroxideoxiguanosina (un indicador de daño en el ADN) y peroxidación lipídica. Las células cultivadas expuestas a niveles tóxicos presentan daño cromosómico, mutación de ADN, daño mitocondrial, estrés oxidativo e inducción de apoptosis [5,59]. Los ingredientes comúnmente utilizados en las dietas porcinas contienen una cantidad significativa de Cr, que oscila entre 1000 y 3000 µg kg<sup>-1</sup>, pero la biodisponibilidad suele ser baja. Las fuentes orgánicas de Cr, como el picolinato de Cr, el nicotinato de Cr, el propionato de Cr y la levadura de Cr, son las más utilizadas en las dietas porcinas que las fuentes inorgánicas, como el cloruro de cromo. El uso de suplementos a base de Cr está legalmente permitido en EE. UU. en dietas para cerdos en una concentración hasta 200 µg kg<sup>-1</sup> según la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA). La adición de Cr suele estar dirigida a cerdos y cerdas en finalización [60]. Este mineral no está aprobado para la suplementación de dietas animales en la Unión Europea [61]. Con respecto a este mineral, si bien las concentraciones encontradas sobrepasan los límites de ingesta admitidos, los valores se encuentran dentro de las permitidas para los alimentos.

El **Manganeso** es necesario para una serie de enzimas implicadas en el metabolismo de aminoácidos y glucosa, desintoxicación del amoníaco, reacciones antioxidantes, desarrollo óseo y cicatrización de heridas. En los animales, la deficiencia de manganeso provoca falta de apetito y restricción del crecimiento; metabolismo anormal de aminoácidos, glucosa y lípidos; malformación ósea en terneros y lechones; estrés oxidativo y sensibilidad reducida a la insulina; piel escamosa y dermatitis; degeneración de las vías reproductivas y función reproductiva reducida tanto en hembras como en machos; y deterioro de la inmunidad. En cambio, las altas concentraciones de este elemento en los tejidos, particularmente en el cerebro, provocan trastornos neurológicos en los animales. Los síntomas de toxicidad incluyen una ingesta reducida de alimento y restricción del crecimiento; dolores de cabeza, comportamiento psicótico violento y síntomas similares a los de Parkinson; rigidez muscular, calambres en las piernas e irritación [5,59]. En porcinos, los requerimientos de Mn son mayores para cerdos en estadios de reproducción que para desarrollo. Los requisitos de Mn en crecimiento y finalización se han estimado en 2 a 4 mg kg<sup>-1</sup> de dieta, mientras que las cerdas gestantes y lactantes requieren aproximadamente 25 mg kg<sup>-1</sup> [62]. Las concentraciones de este elemento encontradas en las muestras agroalimentarias analizadas, superan excesivamente los niveles máximos permitidos en dietas porcinas.

El **Níquel** es un elemento relativamente no tóxico, por lo que la contaminación de los alimentos no representa un peligro grave para la salud. Los resultados de algunos estudios en animales han demostrado que el Níquel actúa en conjunto con la vitamina B12 para estimular la síntesis de ADN y la hematopoyesis en la médula ósea. Una deficiencia de Ni<sup>+2</sup> en la dieta perjudica el crecimiento de varias especies animales, incluidos pollos, vacas, cabras, cerdos, ratas y ovejas. Debido a su contenido relativamente alto en alimentos y productos de origen animal y agua potable, este mineral normalmente no es deficiente en ganado, aves de corral o peces. Cuando la deficiencia se induce experimentalmente en seis especies animales (bovinos, pollitos, cabras, cerdos, ratas y ovejas), muestran restricción del crecimiento, alteración de la hematopoyesis, reducción del hematocrito, estrés oxidativo o anomalías estructurales de los tejidos. A su vez, el consumo excesivo de Ni<sup>+2</sup> en la dieta produce efectos tóxicos en animales; los síndromes incluyen una ingesta de alimentos deprimida en parte debido a la baja palatabilidad, restricción del crecimiento, diarrea, heces de color oscuro, cabello áspero y desgredado, vómitos, anemia y lesiones tisulares (p. ej., hígado, pulmón y piel). En animales, el alto contenido de Ni<sup>+2</sup> en la dieta reduce la absorción intestinal de hierro, cobre, zinc y magnesio y, en consecuencia, exacerba sus deficiencias

dietéticas [5,59]. Con respecto a este elemento, la NRC no cuenta con niveles recomendados para cada una de las etapas de crecimiento porcino analizadas, solamente considera la concentración máxima tolerable en general, siendo este valor de  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  [63]. En las muestras analizadas, las concentraciones encontradas presentan una carencia con respecto a los requerimientos nutricionales recomendados por el NRC.

La suplementación mineral de cualquier dieta animal debe realizarse siempre con cuidado, y en particular, debe evitarse el uso indiscriminado de oligoelementos. Idealmente, el suplemento debe adaptarse a un ganado en particular y evitarse un exceso de suministro, ya que ocasiona pérdidas económicas y los elementos en concentraciones mayores a la requeridas son potencialmente peligrosos.



# CAPÍTULO IV

## CONCLUSIÓN

#### 4.1. CONCLUSIONES

Se consiguió desarrollar una metodología analítica para la determinación de Cr, Mn y Ni en muestras agroalimentarias mediante el acoplamiento de MIP-OES y DLLME con líquidos eutécticos naturales; demostrándose que no hay ninguna limitación experimental para el uso de NaDES como solventes extractantes y su posterior análisis mediante MIP-OES.

El método de preparación de muestras propuesto es una alternativa novedosa y ecológica para la extracción cuantitativa de Cr, Mn y Ni de muestras agroalimentarias.

La elaboración del NaDES (+)-Mentol:Ácido acético fue un procedimiento sencillo, no consumió mucho tiempo y tuvo un costo asequible. Los NaDES a base de Mentol pueden utilizarse para la extracción de analitos de muestras de agroalimentarias para monitorear el nivel de minerales en alimentos de consumo animal.

**BIBLIOGRAFÍA**

- [1] Makkar, H. P. S. (2018). Review: Feed demand landscape and implications of food-not feed strategy for food security and climate change. *Animal*, 12(8), 1744–1754. <https://doi.org/10.1017/S175173111700324X>
- [2] Sapkota, A. R., Lefferts, L. Y., McKenzie, S., & Walker, P. (2007). What do we feed to food-production animals? A review of animal feed ingredients and their potential impacts on human health. In *Environmental Health Perspectives* (Vol. 115, Issue 5, pp. 663–670). <https://doi.org/10.1289/ehp.9760>
- [3] McDonald, P., Edwards, R.A., Greenhalgh, J.F.D., Morgan, C.A., Sinclair, L.A. and Wilkinson, R.G. (2010) *Animal Nutrition*. 7th Edition
- [4] H.S. Rostagno, L.F. Teixeira Albino, J. Lopes Donzele, P.C. Gomes, R.F. de Oliveira, D.C Lopes, A. Soares Ferreira, S.L. de Toledo Barreto, *Tablas Brasileñas para Aves y Cerdos, Composición de Alimentos y Requerimientos Nutricionales*, Sitio Argentino de Producción Animal (2011)
- [5] Wu, G. (2017). *Principles of Animal Nutrition* (1st ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315120065>
- [6] Tavares, K. do N., Lucena, I. O. de, Toaldo, I. M., Haas, I. C. da S., Luna, A. S., & de Gois, J. S. (2020). Optimized Sample Preparation for Sulfur Determination in Animal Feed by Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry (ICP-OES) with Correlation to the Total Protein Content. *Analytical Letters*, 53(14), 2252–2265. <https://doi.org/10.1080/00032719.2020.1736090>
- [7] Fontoura, B. M., Jofré, F. C., Williams, T., Savio, M., Donati, G. L., & Nóbrega, J. A. (2022). Is MIP-OES a suitable alternative to ICP-OES for trace element analysis? *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. <https://doi.org/10.1039/d1ja00375e>
- [8] Jankowski, K. J., & Reszke, E. (2011). *Microwave Induced Plasma Analytical Spectrometry*. <http://www.rsc.org/Shop/Books/>
- [9] Sneddon, J. (1990). *Sample introduction in atomic spectroscopy*. Elsevier.
- [10] Sarafraz-Yazdi, A., & Amiri, A. (2010). Liquid-phase microextraction. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 29, Issue 1, pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/j.trac.2009.10.003>
- [11] Analytical Methods. (2013). What causes most errors in chemical analysis? *Analytical Methods*, 5(12), 2914–2915. <https://doi.org/10.1039/c3ay90035e>

- [12] Dantas, A. N. S., Matos, W. O., Gouveia, S. T., & Lopes, G. S. (2013). The combination of infrared and microwave radiation to quantify trace elements in organic samples by ICP OES. *Talanta*, *107*, 292–296. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.047>
- [13] Krug, F. J., & Piovezani Rocha, F. R. (2019). *Métodos de Preparo Amostras para Análise Elementar*.
- [14] Matusiewicz, H. (2017). Sample preparation for inorganic trace element analysis. In *Physical Sciences Reviews* (Vol. 2, Issue 5). De Gruyter. <https://doi.org/10.1515/psr-2017-8001>
- [15] Kokosa, J. M. (2013). Advances in solvent-microextraction techniques. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 43, pp. 2–13). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.09.020>
- [16] Martínez-Rubio, D., Grindlay, G., Llaver, M., Wuilloud, R. G., & Mora, J. (2020). Development of preconcentration strategies for the simultaneous ultratrace determination of As, Cd and Pb in foods by ICP-OES: Knotted-reactor: vs. dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *35*(5), 933–942. <https://doi.org/10.1039/c9ja00427k>
- [17] Serrano, R., Grindlay, G., Gras, L., & Mora, J. (2019). Evaluation of calcium-, carbon- and sulfur-based non-spectral interferences in high-power MIP-OES: Comparison with ICP-OES. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, *34*(8), 1611–1617. <https://doi.org/10.1039/c9ja00148d>
- [18] Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 105, pp. 225–239). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.05.001>
- [19] Santana, A. P. R., Andrade, D. F., Mora-Vargas, J. A., Amaral, C. D. B., Oliveira, A., & Gonzalez, M. H. (2019). Natural deep eutectic solvents for sample preparation prior to elemental analysis by plasma-based techniques. *Talanta*, *199*, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.083>
- [20] Ibrahim, A. S. A., Al-Farawati, R., Hawas, U., & Shaban, Y. (2017). Recent Microextraction Techniques for Determination and Chemical Speciation of Selenium. In *Open Chemistry* (Vol. 15, Issue 1, pp. 103–122). De Gruyter Open Ltd. <https://doi.org/10.1515/chem-2017-0013>
- [21] Das, P., Gupta, M., Jain, A., & Verma, K. K. (2004). Single drop microextraction or solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the determination of iodine in pharmaceuticals, iodized salt, milk powder and vegetables involving conversion

into 4-iodo-N,N-dimethylaniline. *Journal of Chromatography A*, 1023(1), 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.09.056>

[22] Anastas, P., & Eghbali, N. (2010). Green Chemistry: Principles and Practice. *Chemical Society Reviews*, 39(1), 301–312. <https://doi.org/10.1039/b918763b>

[23] Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M. R., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1–2), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.03.007>

[24] Fernández, E., & Vidal, L. (2014). Liquid-Phase Extraction and Microextraction. In *Ionic Liquids in Separation Technology* (pp. 107–152). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63257-9.00003-1>

[25] John M. Kokosa, Andrzej Przyjazny, Green microextraction methodologies for sample preparations, *Green Analytical Chemistry*, Volume 3, 2022, 100023, ISSN 2772-5774, <https://doi.org/10.1016/j.greeac.2022.100023>.

[26] Anastas, P. T.; Warner, J. C. Green Chemistry: Theory and Practice, *Oxford University Press*. New York, 1998, p.30. By permission of Oxford University Press.

[27] Farajzadeh, M. A., Afshar Mogaddam, M. R., & Aghanassab, M. (2016). Deep eutectic solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction. *Analytical Methods*, 8(12), 2576–2583. <https://doi.org/10.1039/c5ay03189c>

[28] Romero, A., Santos, A., Tojo, J., & Rodríguez, A. (2008). Toxicity and biodegradability of imidazolium ionic liquids. *Journal of Hazardous Materials*, 151(1), 268–273. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.10.079>.

[29] Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S., & Jérôme, F. (2012). Deep eutectic solvents: Syntheses, properties and applications. *Chemical Society Reviews*, 41(21), 7108–7146. <https://doi.org/10.1039/c2cs35178a>

[30] Smith, E. L., Abbott, A. P., & Ryder, K. S. (2014). Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. In *Chemical Reviews* (Vol. 114, Issue 21, pp. 11060–11082). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/cr300162p>

[31] Cui, Y., Li, C., Yin, J., Li, S., Jia, Y., & Bao, M. (2017). Design, synthesis and properties of acidic deep eutectic solvents based on choline chloride. *Journal of Molecular Liquids*, 236, 338–343. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.04.052>

[32] Kudłak, B., Owczarek, K., & Namieśnik, J. (2015). Selected issues related to the toxicity of ionic liquids and deep eutectic solvents—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(16), 11975–11992. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4794-y>

- [33] de la Guardia, M.; Garrigues, S. Chapter 1 Past, Present and Future of Green Analytical Chemistry. In *Challenges in Green Analytical Chemistry*; de la Guardia, M.; Garrigues, S., Eds.; Royal Society of Chemistry: London, 2020; Vol. 2, pp 1–18.
- [34] Santana-Mayor, Á., Rodríguez-Ramos, R., Herrera-Herrera, A. V., Socas-Rodríguez, B., & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2021). Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry. In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 134). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116108>
- [35] Paiva, A., Craveiro, R., Aroso, I., Martins, M., Reis, R. L., & Duarte, A. R. C. (2014). Natural deep eutectic solvents - Solvents for the 21st century. In *ACS Sustainable Chemistry and Engineering* (Vol. 2, Issue 5, pp. 1063–1071). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/sc500096j>
- [36] Ribeiro, B. D., Florindo, C., Iff, L. C., Coelho, M. A. Z., & Marrucho, I. M. (2015). Menthol-based eutectic mixtures: Hydrophobic low viscosity solvents. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 3(10), 2469–2477. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00532>
- [37] Martins, M. A. R., Crespo, E. A., Pontes, P. V. A., Silva, L. P., Bülow, M., Maximo, G. J., Batista, E. A. C., Held, C., Pinho, S. P., & Coutinho, J. A. P. (2018). Tunable Hydrophobic Eutectic Solvents Based on Terpenes and Monocarboxylic Acids. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 6(7), 8836–8846. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01203>
- [38] Martins, M. A. R., Silva, L. P., Schaeffer, N., Abranches, D. O., Maximo, G. J., Pinho, S. P., & Coutinho, J. A. P. (2019). Greener Terpene-Terpene Eutectic Mixtures as Hydrophobic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(20), 17414–17423. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b04614>
- [39] Van Osch, D. J. G. P., Dietz, C. H. J. T., Van Spronsen, J., Kroon, M. C., Gallucci, F., Van Sint Annaland, M., & Tuinier, R. (2019). A Search for Natural Hydrophobic Deep Eutectic Solvents Based on Natural Components. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 7(3), 2933–2942. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03520>
- [40] Kocot, K., Pytlakowska, K., Zawisza, B., & Sitko, R. (2016). How to detect metal species preconcentrated by microextraction techniques? In *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 82, pp. 412–424). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2016.07.003>
- [41] El-Shahawi, M. S., & Al-Saidi, H. M. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction for chemical speciation and determination of ultra-trace concentrations of metal ions. In

*TrAC - Trends in Analytical Chemistry* (Vol. 44, pp. 12–24). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.011>

[42] Ranjbar, L., Yamini, Y., Saleh, A., Seidi, S., & Faraji, M. (2012). Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction combined with ICP-OES for the determination of trace quantities of cobalt, copper, manganese, nickel and zinc in environmental water samples. *Microchimica Acta*, 177(1–2), 119–127. <https://doi.org/10.1007/s00604-011-0757-2>

[43] Martínez, D., Torregrosa, D., Grindlay, G., Gras, L., & Mora, J. (2018). Coupling dispersive liquid-liquid microextraction to inductively coupled plasma atomic emission spectrometry: An oxymoron? *Talanta*, 176, 374–381. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.036>

[44] Cora Jofre, F., Larregui, D. N., & Savio, M. (2020). An eco-friendly infrared method for rapid soil sample preparation for multielemental determination by microwave induced plasma atomic emission spectrometry. *Microchemical Journal*, 159. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105448>

[45] Olivieri, A. C. (2015). Practical guidelines for reporting results in single- and multi-component analytical calibration: A tutorial. In *Analytica Chimica Acta* (Vol. 868, pp. 10–22). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.017>

[46] F. Pena-Pereira, W. Wojnowski, M. Tobiszewski, AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software, *Anal. Chem.* 92 (2020) 10076–10082, doi: 10.1021/acs.analchem.0c01887.

[47] W. Wojnowski, M. Tobiszewski, F. Pena-Pereira, E. Psillakis, AGREEprep – analytical greenness metric for sample preparation, *TrAC Trends Anal. Chem.* 149 (2022) 116553, doi: 10.1016/J.TRAC.2022.116553.

[48] Bağda, E., Altundağ, H., & Soylak, M. (2017). Highly Simple Deep Eutectic Solvent Extraction of Manganese in Vegetable Samples Prior to Its ICP-OES Analysis. *Biological Trace Element Research*, 179(2), 334–339. <https://doi.org/10.1007/s12011-017-0967-5>

[49] Md Ackas Ali, Md Sajjadur Rahman, Ranen Roy, Paul Gambill, Douglas E. Raynie, and Mohammad A. Halim. Structure Elucidation of Menthol-Based Deep Eutectic Solvent using Experimental and Computational Techniques. *The Journal of Physical Chemistry A* 2021 125 (12), 2402-2412 DOI: 10.1021/acs.jpca.0c10735

- [50] Narishetty, S. T. K., & Panchagnula, R. (2005). Effect of L-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecular organization of SC lipids and skin permeation of zidovudine. *Journal of Controlled Release*, 102(1), 59–70. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.09.016>
- [51] Taşpınar, H., Elik, A., Kaya, S., & Altunay, N. (2021). Optimization of green and rapid analytical procedure for the extraction of patulin in fruit juice and dried fruit samples by air-assisted natural deep eutectic solvent-based solidified homogeneous liquid phase microextraction using experimental design and computational chemistry approach. *Food Chemistry*, 358. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129817>
- [52] García-Mesa, J. C., Montoro-Leal, P., Maireles-Rivas, S., López Guerrero, M. M., & Vereda Alonso, E. (2021). Sensitive determination of mercury by magnetic dispersive solid-phase extraction combined with flow-injection-cold vapour-graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 36(5), 892–899. <https://doi.org/10.1039/d0ja00516a>
- [53] Panhwar, A. H., Tuzen, M., & Kazi, T. G. (2018). Deep eutectic solvent based advanced microextraction method for determination of aluminum in water and food samples: Multivariate study. *Talanta*, 178, 588–593. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.09.079>
- [54] Pinheiro, F. C., Aguirre, M. Á., Nóbrega, J. A., & Canals, A. (2021). Dispersive liquid-liquid microextraction of Cd, Hg and Pb from medicines prior to ICP OES determination according to the United States Pharmacopeia. *Analytical Methods*, 13(46), 5670–5678. <https://doi.org/10.1039/d1ay01566d>
- [55] Zounr, R. A., Tuzen, M., Deligonul, N., & Khuhawar, M. Y. (2018). A highly selective and sensitive ultrasonic assisted dispersive liquid phase microextraction based on deep eutectic solvent for determination of cadmium in food and water samples prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 253, 277–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.167>
- [56] Bidari, A., Zeini Jahromi, E., Assadi, Y., & Milani Hosseini, M. R. (2007). Monitoring of selenium in water samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by iridium-modified tube graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 87(1), 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2007.04.003>
- [57] Ji, Y., Zhao, M., Li, A., & Zhao, L. (2021). Hydrophobic deep eutectic solvent-based ultrasonic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration and determination of trace cadmium and arsenic in wine samples. *Microchemical Journal*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.105974>

- [58] Pinheiro, F. C., Aguirre, M. Á., Nóbrega, J. A., González-Gallardo, N., Ramón, D. J., & Canals, A. (2021). Dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvent for elemental impurities determination in oral and parenteral drugs by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 1185. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.339052>
- [59] Underwood, E.J. (1977) Trace Elements in Human and Animal Nutrition. 4th Edition, *Academic Press*, New York.
- [60] Menegat, Mariana B., Robert D. Goodband, Joel M. DeRouchey, Mike D. Tokach, Jason C. Woodworth, and Steve S. Dritz. 2019. Kansas State University Swine Nutrition Guide: *Swine Nutrient Requirements*.
- [61] Spears, J. W. (2019). Boron, Chromium, Manganese, and Nickel in Agricultural Animal Production. *Biological Trace Element Research*, 188(1), 35–44. <https://doi.org/10.1007/s12011-018-1529-1>
- [62] National Research Council (NRC) (2012) Nutrient Requirements of Swine. 11th Edition, National Academies Press, Washington DC.
- [63] National Research Council (U.S.). Committee on Minerals and Toxic Substances in Diets and Water for Animals., & National Research Council (U.S.). Subcommittee on Mineral Toxicity in Animals. (2005). *Mineral tolerance of animals*. National Academies Press.