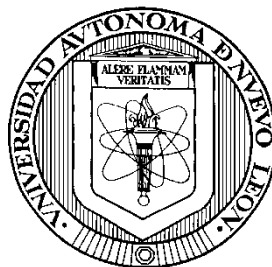


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



EVALUACIÓN DEL USO DE LÍQUIDOS IÓNICOS EN LA EXTRACCIÓN
MICELAR DE COMPUESTOS HIDROFÍLICOS

Por

Q.C.B. OMAR JASSIEL PORTILLO CASTILLO

Como requisito parcial para obtener el Grado de MAESTRO EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN QUÍMICA BIOMÉDICA

DICIEMBRE DE 2012

**EVALUACIÓN DEL USO DE LÍQUIDOS IÓNICOS EN LA EXTRACCIÓN
MICELAR DE COMPUESTOS HIDROFÍLICOS**

Aprobación de tesis:



Dra. C. Rocío Castro Ríos

Director de tesis



Dr. C. Abelardo Chávez Montes

Co-director de tesis



Dra. C. Ma. de la Luz Salazar Cavazos

Comisión de tesis



Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Subdirector de Estudios de Posgrado

EVALUACIÓN DEL USO DE LÍQUIDOS IÓNICOS EN LA EXTRACCIÓN MICELAR DE COMPUESTOS HIDROFÍLICOS

Presentado por:

Q. C. B. OMAR JASSIEL PORTILLO CASTILLO

Este trabajo se realizó en los Laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina y en el Laboratorio de Nanotecnología del Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Biológicas, ambas facultades de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Rocío Castro Ríos y la codirección del Dr. Abelardo Chávez Montes y la Dra. Ma. de la Luz Salazar Cavazos.

DIRECTOR

Dra. Rocío Castro Ríos

ÍNDICE

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN.	12
	1.1. Técnicas de Preparación de Muestra.	12
	1.2. Líquidos Iónicos.	16
	1.3. Extracción Micelar.	20
	1.4. Surfactantes y micelas.	25
	1.5. Líquidos iónicos y el ambiente micelar.	31
	1.6. Analitos modelo.	33
2	JUSTIFICACIÓN.	35
3	OBJETIVO GENERAL.	36
4	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	37
5	MATERIAL Y MÉTODOS.	38
	5.1. Reactivos.	38
	5.2. Equipos.	41
	5.3. Materiales.	43
	5.4. Metodología	45
	5.4.1. Concentración micelar crítica.	45
	5.4.2. Tamaño de micela.	49
	5.4.3. Desarrollo de métodos de análisis cromatográfico.	51
	5.4.3.1. Métodos cromatográficos para la acrilamida.	51
	5.4.3.2. Métodos cromatográficos para el ácido salicílico y la cafeína.	53
	5.5. Validación de los métodos cromatográficos.	55
	5.6. Desarrollo de métodos de extracción micelar.	58
	5.7. Comparación del desempeño del Tritón Tx-114 y Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio en la extracción micelar.	61
6	RESULTADOS.	63
	6.1. Concentración micelar crítica.	63
	6.2. Tamaño de micela.	70
	6.3. Desarrollo de métodos de análisis cromatográfico.	73
	6.3.1. Métodos cromatográficos para la acrilamida.	73
	6.3.2. Métodos cromatográficos para el ácido salicílico y la cafeína.	75
	6.4. Validación de los métodos cromatográficos.	78
	6.5. Desarrollo de métodos de extracción micelar.	81

	6.5.1.	Desarrollo del método de extracción con Tritón Tx-114.	81
	6.5.2.	Desarrollo del método de extracción con dodecil sulfato de sodio.	85
	6.5.3.	Desarrollo del método de extracción con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.	85
	6.6.	Comparación del desempeño del Tritón Tx-114 y Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio en la extracción micelar.	89
7		DISCUSIÓN.	90
	7.1.	Concentración micelar crítica.	91
	7.2.	Tamaño de micela.	97
	7.3.	Desarrollo de métodos de análisis cromatográfico.	100
	7.3.1.	Métodos cromatográficos para la acrilamida.	100
	7.3.2.	Métodos cromatográficos para el ácido salicílico y la cafeína.	103
	7.4.	Validación de los métodos cromatográficos.	105
	7.5.	Desarrollo de métodos de extracción micelar.	109
	7.6.	Comparación del desempeño del Tritón Tx-114 y Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio en la extracción micelar.	112
8		CONCLUSIONES Y PERSEPECTIVAS.	116
	8.1.	Conclusiones	116
	8.2.	Persepectivas	118
		BIBLIOGRAFÍA	119

LISTA DE TABLAS

Tabla	Nombre	Página
5.1.	Soluciones de líquidos iónicos para el cálculo de la CMC.	46
5.2.	Soluciones de líquidos iónicos para el cálculo del tamaño de micela.	50
5.3.	Fases móviles evaluadas para el análisis de acrilamida.	52
5.4.	Fases móviles evaluadas para el análisis de ácido salicílico y cafeína.	54
5.5.	Variables incluidas en el diseño de experimentos.	59
5.6.	Diseño de experimentos.	60
6.1.	CMC obtenida para los líquidos iónicos y valores reportados en la literatura.	69
6.2.	Tamaño promedio de las micelas obtenido por espectroscopía de correlación fotónica.	70
6.3.	Tiempos de retención obtenidos para la acrilamida.	73
6.4.	Condiciones óptimas para el análisis de la acrilamida.	74
6.5.	Tiempos de retención obtenidos para el ácido salicílico y la cafeína en las diferentes condiciones evaluadas.	75
6.6.	Condiciones óptimas para el análisis del ácido salicílico y la cafeína.	76
6.7.	Método cromatográfico óptimo para el ácido salicílico.	77
6.8.	Validación de los sistemas cromatográficos para los tres analitos.	79
6.9.	Cuantificación de acrilamida en presencia de surfactantes y del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.	80
6.10.	Condiciones óptimas para la extracción micelar de los analitos modelo con Tx-114.	83
6.11.	Condiciones óptimas de extracción para los analitos con el líquido iónico.	85
6.12.	Resultados de la extracción con el Tritón Tx-114 y el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.	89

LISTA DE FIGURAS

Figura	Nombre	Página
1.1.	Tendencias actuales en las técnicas de preparación de muestra.	14
1.2.	Cationes y aniones más comunes en los líquidos iónicos.	16
1.3.	Procedimiento general de la ME.	22
1.4.	Estructura general de un surfactante.	25
1.5.	Estructura general de los surfactantes aniónicos.	26
1.6.	Estructura general de los surfactantes catiónicos	27
1.7.	Estructura general de un surfactante zwitteriónico.	27
1.8.	Estructura general de los surfactantes no iónicos.	28
1.9.	Estructura química de la acrilamida	33
1.10.	Estructura química del ácido salicílico.	34
1.11.	Estructura química de la cafeína.	34
6.1.	Espectros de fluorescencia de emisión y de excitación obtenidos para el Tx-114 a diferentes concentraciones.	64
6.2.	Gráfica de la relación de la intensidad de la emisión (I_{371em}/I_{383em}) en función de la concentración de Tx-114.	64
6.3.	Gráfica de relación de la intensidad de la excitación (I_{332ex}/I_{335ex}) en función de la concentración de Tx-114.	65
6.4.	Espectros de fluorescencia de emisión y de excitación obtenidos a diferentes concentraciones de tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.	66
6.5..	Variación de la conductividad en función de la concentración del SDS.	67
6.6.	Variación de la conductividad en función de la concentración del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.	68
6.7.	Gráfica del tamaño de las micelas del Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.	71
6.8.	Micelas del Tx-114 (0.5 mM; 40X).	71
6.9.	Micelas de SDS (15 mM; 40X).	72
6.10.	Micelas del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio (50 mM; 100X).	72
6.11.	Cromatograma obtenido para una solución de la acrilamida (20 $\mu\text{g/mL}$) con el método desarrollado.	74

6.12.	Cromatograma obtenido para una solución de ácido salicílico y de cafeína (20 µg/mL) con el método desarrollado.	76
6.13.	Cromatograma obtenido para el ácido salicílico (20 µg/mL) con el método desarrollado.	77
6.14.	Diagrama de Pareto de la acrilamida obtenido del análisis del diseño de experimentos.	81
6.15.	Diagrama de Pareto del ácido salicílico obtenido del análisis del diseño de experimentos.	82
6.16.	Diagrama de Pareto de la acrilamida obtenido del análisis del diseño de experimentos.	82
6.17.	Cromatograma obtenido después de la extracción de acrilamida con Tx-114.	83
6.18.	Cromatograma obtenido después de la extracción de ácido salicílico con Tx-114.	84
6.19.	Cromatograma obtenido después de la extracción de cafeína con Tx-114.	84
6.20.	Cromatograma obtenido después de la extracción de acrilamida con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.	86
6.21.	Cromatograma obtenido después de la extracción de cafeína con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.	87
6.22.	Cromatograma obtenido después de la extracción de ácido salicílico con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, utilizando una columna Atlantis dC ₁₈ .	87
6.23.	Cromatograma obtenido después de la extracción de una muestra blanco con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, utilizando una columna Atlantis dC ₁₈ .	88
6.24.	Cromatograma obtenido después de la extracción de ácido salicílico con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio utilizando cromatografía de interacciones hidrofílicas.	88

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
[DDMIM] [BF ₄]	Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio
[DDMIM] [Cl]	Cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio
[DMIM] [BF ₄]	Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio
[DMIM] [Cl]	Cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio
[HDMIM] [Cl]	Cloruro de 1-hexadecil-3-metilimidazolio
ACN	Acetonitrilo
AS	Ácido salicílico
CAF	Cafeína
CFME	Microextracción en flujo continuo
CMC	Concentración micelar crítica
DAD	Detector con arreglo de diodos
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
FC	Factor de concentración
H ₂ O	Agua
HFME	Microextracción en fibra hueca
HILIC	Cromatografía de interacciones hidrofílicas
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
ILs	Líquidos iónicos
IsopOH	Isopropanol
KCl	Cloruro de potasio
LLE	Extracción líquido-líquido
LLSME	Microextracción líquido-líquido-sólido

LPME-SF	Microextracción en fase líquida basada en la solidificación de una gota flotante
ME	Extracción micelar
MeOH	Metanol
MLLE	Microextracción líquido-líquido
MMLLE	Microextracción líquido-líquido en membrana microporosa
NaCl	Cloruro de sodio
RTIL	Líquido iónico a temperatura ambiente
SBSE	Extracción en barra magnética
SDME	Microextracción en gota
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
Tx-114	Tritón Tx-114

RESUMEN

Q.C.B. Omar Jassiel Portillo Castillo

Fecha de graduación:

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina.**

Título de Estudio: EVALUACIÓN DEL USO DE LÍQUIDOS IÓNICOS EN LA EXTRACCIÓN MICELAR DE COMPUESTOS HIDROFÍLICOS.

Número de páginas: 128

Candidato para el grado de Maestro en Ciencias con Especialidad en Química Bioédica.

Área de estudio: Química Analítica.

Propósito y Método de estudio:

Cuando los procedimientos de preparación de muestra convencionales son aplicados para el análisis de compuestos de polaridad elevada, se presentan un gran número de dificultades, como lo son la necesidad del uso de grandes cantidades de solventes orgánicos tóxicos y que los procedimientos requieran múltiples pasos, lo que a su vez se traduce en que los métodos de análisis sean muy largos, laboriosos y poco eficientes. Los líquidos iónicos (ILs) son una nueva clase de sales orgánicas, que actualmente son considerados como solventes alternativos en los procesos de extracción convencionales debido a su miscibilidad con agua y solventes orgánicos, baja volatilidad y a su gran capacidad de solubilizar sustancias orgánicas e inorgánicas. Este elevado potencial como solventes y su similitud estructural con los surfactantes, permiten pensar que los líquidos iónicos pueden desempeñarse satisfactoriamente como nuevos medios extractantes para compuestos hidrofílicos en procedimientos de extracción micelar.

En este trabajo se presentan el desarrollo y optimización de procedimientos de ME para la extracción de acrilamida, ácido salicílico y caféina, utilizando el [DMIM] [BF₄] y el Tx-114, así como el desarrollo y validación de los métodos de análisis por HPLC. Se evaluaron 5 ILs, de los cuales se seleccionó el de mayor CMC y tamaño de micela. Por último, se comparó el desempeño del líquido iónico seleccionado y del Tx-114 en la extracción de los tres analitos.

Contribuciones y Conclusiones:

Se demostró que los líquidos iónicos pueden desempeñarse como medios de extracción para compuestos hidrofílicos con altos porcentajes de recuperación, por lo que pueden ser considerados como una alternativa a los solventes convencionales.

FIRMA DEL DIRECTOR

Dra. Rocío Castro Ríos

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Técnicas de Preparación de Muestra.

Los procedimientos analíticos consisten típicamente en una serie de pasos igualmente importantes como lo son: el muestreo, el tratamiento de la muestra, la identificación y/o cuantificación del analito, así como el tratamiento de los datos obtenidos del análisis (Ramos L. 2012).

Considerando que sus principales objetivos son la eliminación de las interferencias de la matriz, concentrar al analito y hacerlo compatible con el sistema de analítico, es evidente que esta parte del proceso analítico tiene una profunda influencia tanto en el tiempo total requerido para completar el análisis, así como en la calidad de los resultados obtenidos. Sin embargo, sólo ha sido en los últimos años que este paso ha tomado importancia en los protocolos de análisis, desarrollándose grandes avances en esta área de investigación, sobre todo por la creciente demanda de procedimientos para determinaciones más precisas, exactas y rápidas de un número cada vez mayor de analitos de bajas concentraciones en matrices complejas (Tankiewicz M. et al. 2011).

Las técnicas de preparación de muestra convencionales, tales como la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción Soxhlet, son ampliamente aceptadas y se utilizan para aplicaciones de rutina y/o con fines de referencia. En los últimos años, estas técnicas se han revisado y han sido actualizadas, llevando al desarrollo de nuevas técnicas de extracción más rápidas, eficientes, versátiles y amigables con el medio ambiente, esto dentro de los objetivos de la Química Verde (Sousa J et al. 2012).

La aplicación de los principios de la Química Verde en la preparación de muestra, conduce a la miniaturización de los procedimientos, al nulo uso de reactivos o al uso en menor cantidad y además a emplear aquellos que sean menos dañinos al analista y al medio ambiente. Como ejemplo de estos procedimientos tenemos la microextracción líquido-líquido (MLLE, por sus siglas en inglés micro liquid-liquid

extraction), la microextracción en gota (SDME, por sus siglas en inglés single drop microextraction), la microextracción en flujo continuo (CFME, por sus siglas en inglés continuous flow microextraction), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME, por sus siglas en inglés dispersive liquid-liquid microextraction), la microextracción en fibra hueca (HFME, por sus siglas en inglés hollow fiber microextraction), la microextracción en fase líquida basada en la solidificación de una gota flotante (LPME-SF, por sus siglas en inglés solid drop based liquid-phase microextraction), la extracción líquido-líquido en membrana microporosa (MMLLE, por sus siglas en inglés microporous membrane liquid-liquid extraction), la extracción micelar (ME, por sus siglas en inglés micellar extraction), la microextracción líquido-líquido-sólido (LLSME, por sus siglas en inglés liquid-liquid-solid microextraction), la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés solid phase extraction), la microextracción en fase sólida (SPME, por sus siglas en inglés solid phase microextraction) y la extracción en barra magnética (SBSE, por sus siglas en inglés stir-bar sorptive extraction) (Stocka J. et al. 2011).

En la figura 1.1, se presenta un diagrama que muestra las características que guían las tendencias actuales en el desarrollo de las técnicas de preparación de muestra para la determinación de constituyentes traza en muestras que se caracterizan por una gran complejidad de la matriz (Stocka J. et al. 2011).

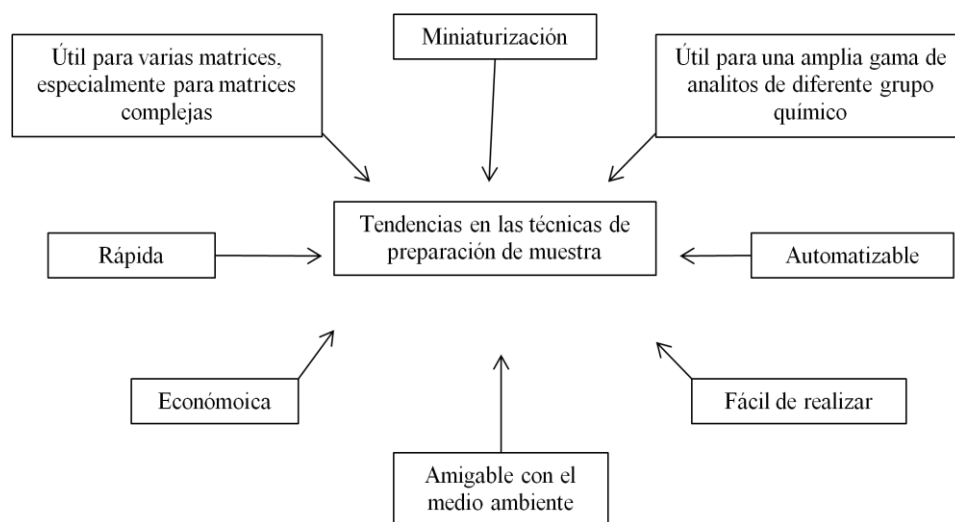


Figura 1.1. Tendencias actuales en las técnicas de preparación de muestra (Stocka J. et al. 2011).

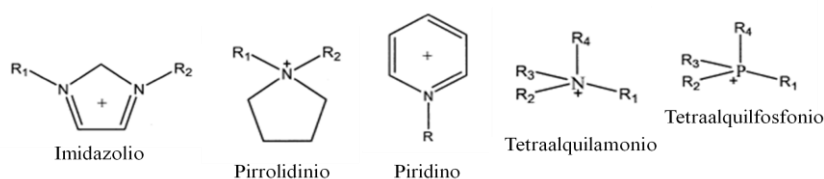
Cuando los procedimientos de preparación de muestra convencionales son aplicados para el análisis de compuestos de polaridad elevada, se presentan un gran número de dificultades, como lo son la necesidad del uso de grandes cantidades de solventes orgánicos tóxicos y que los procedimientos requieran múltiples pasos, lo que a su vez se traduce en que los métodos de análisis sean muy largos, laboriosos y poco eficientes (Melwanki M.B et al. 2008).

Los problemas mencionados han llevado a la búsqueda de técnicas más rentables, con especial énfasis en el uso de volúmenes insignificantes de solventes orgánicos y que además tengan la capacidad de separar analitos a niveles de concentración muy bajos. Esto ha hecho que en los últimos años, la investigación en la ciencia de las separaciones se centre en la miniaturización de los procesos de preparación de la muestra (Melwanki M.B et al. 2008).

1.2 Líquidos Iónicos.

Los líquidos iónicos (ILs) son una nueva clase de sales orgánicas y como tales están compuestas por cationes y aniones. En la figura 1.2, se muestran los iones más comúnmente utilizados en los líquidos iónicos (Ping Sun et al. 2010). Las sales inorgánicas convencionales, como las formadas por átomos de halógenos con sodio, son sólidas con puntos de fusión altos, en ocasiones, por encima de 500 °C. La novedad de los líquidos iónicos, es que presentan una baja temperatura de fusión. Por convención para ser parte de la familia de los líquidos iónicos, una sal, debe tener un punto de fusión cercano a 100 °C o por debajo de esta temperatura. Si el punto de fusión de la sal es inferior o igual a la temperatura ambiente (~ 25 °C), al líquido iónico se le llama “líquido iónico a temperatura ambiente” (RTIL, por sus siglas en inglés room temperature ionic liquids) (Berthod A. et al. 2008, Freire M. et al. 2007).

Cationes más comunes:



Aniones más comunes:

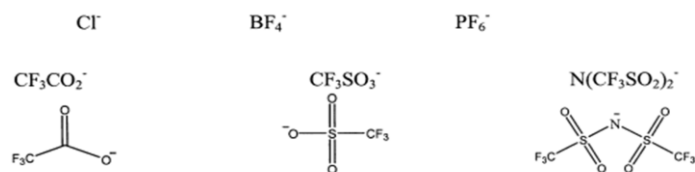


Figura 1.2. Cationes y aniones más comunes en los líquidos iónicos (Ping Sun et al. 2010).

La composición asimétrica de los líquidos iónicos, generada por los grandes cationes orgánicos y los más pequeños aniones, hace que disminuya su energía reticular y por tanto el punto de fusión del líquido iónico. En algunos casos, incluso los aniones son relativamente grandes y juegan un papel importante en la reducción de la temperatura de fusión. Así pues, las propiedades de los líquidos iónicos dependerán de la combinación específica de catión y anión, por lo que literalmente existen miles de estructuras diferentes que se pueden formar para sintetizar un líquido iónico con un rango muy amplio de propiedades según las necesidades (Buszewski B. et al. 2008).

La intrínseca naturaleza no molecular de los líquidos iónicos y la posibilidad de tener una gran combinación de cationes y aniones para sintetizarlos proporcionan a los líquidos iónicos propiedades únicas como disolventes, siendo útiles para compuestos que solo son solubles en mezclas de solventes orgánicos tóxicos (Revelli A. et al 2010). Los líquidos iónicos tienen la capacidad de disolver una enorme cantidad de materiales orgánicos e inorgánicos en un amplio rango de temperaturas, además algunos presentan miscibilidad con agua y otros con una gran variedad de solventes orgánicos, debido a esto se piensa que puedan reemplazar a los solventes orgánicos volátiles comunes (Soukup-Hein R. et al. 2009). Su baja presión de vapor, su alta estabilidad térmica y miscibilidad dependen principalmente del anión, mientras que otras propiedades tales como la tensión superficial, la viscosidad y la densidad, dependen de la longitud de la cadena de alquilo en el catión y/o la forma o simetría. La presión de vapor baja de la mayoría de los líquidos iónicos es la principal razón de su utilidad en la Química Verde, debido a que no se producen

emisiones de gases tóxicos al medio ambiente, siendo además más seguros para el analista (Vanyúr R. et al. 2007, Zhao Q. et al. 2011).

Dentro de la Química Analítica se han propuesto diversas aplicaciones para los líquidos iónicos, entre las que destacan, las técnicas de preparación de muestra, las separaciones cromatográficas, en electroquímica y en la electroforesis capilar. Los líquidos iónicos, poseen muchas propiedades favorables, tales como el ser no volátiles, el tener viscosidad y polaridad variables; estas características los convierten en buenos candidatos como fases estacionarias en cromatografía de gases, como ha pasado con el hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio y con el cloruro de 1-butil-3-metilimidazolio. La naturaleza iónica de los líquidos iónicos ha favorecido su aplicación en la Electroforesis Capilar, ya que pueden solubilizar muchos compuestos y su carga permanente favorece la separación y movilidad electroforética de analitos en medio no acuoso. También se han reportado un gran número de estudios para su aplicación como sensores en Electroquímica (Liu J. et al. 2005). En Cromatografía de Líquidos, los líquidos iónicos se han utilizado como aditivos o modificadores de la fase móvil para evitar el coleo en los picos de analitos de carácter básico en la cromatografía de fase inversa, se han utilizado en combinación con la sílica para la creación de nuevas fases estacionarias (Wang Y. et al. 2009).

En la preparación de muestra, los líquidos iónicos se han utilizado tanto en procedimientos convencionales, así como en las nuevas técnicas en miniatura, que están tomando gran auge debido a la sustentabilidad de los procedimientos. Hay reporte del uso de líquidos iónicos en la microextracción líquido-líquido (MLLE), en la microextracción en gota (SDME), en la microextracción líquido-líquido dispersiva

(DLLME) y en la microextracción en fase sólida (SPME). Los líquidos iónicos empleados en estas técnicas son muy variados, dependiendo del principio de separación y han sido aplicados para separar tanto compuestos orgánicos como inorgánicos (Liu R. et al. 2009, Poole C. et al. 2010, Farré M. et al 2010).

Los líquidos iónicos ayudan a mejorar la selectividad y el rendimiento en las extracciones de diferentes compuestos al emplearlos en las distintas técnicas de preparación de muestra, pero su principal ventaja es que contaminan menos que los solventes orgánicos convencionales, debido a sus despreciables presiones de vapor (Bi W. et al. 2011, Fan Y. et al. 2011).

1.3 Extracción Micelar.

La extracción micelar (ME), introducida por Watanabe y colaboradores en 1976 (Ling W. et al. 2007), ha tenido gran aceptación en la Química Analítica, representando una alternativa a las técnicas convencionales de extracción. La ME es una técnica ambientalmente amigable y probablemente sea una de las más versátiles y simples. Inicialmente se desarrolló para la separación de sustancias hidrofóbicas, sobre todo para la separación de metales en forma de complejos, en soluciones acuosas y después se aplicó a la purificación de proteínas. Actualmente se aplica para separar compuestos orgánicos e inorgánicos (Citak D. et al. 2010).

La ME se basa en la formación de una fase micelar en el seno de una fase acuosa heterogénea en donde se encuentra suspendido el analito a extraer. La partición del analito se lleva a cabo entre las dos fases. La fase micelar está compuesta por micelas y éstas a su vez se forman por surfactantes o también llamados tensoactivos, esto hace que la solución homogénea original, por la simple agregación de los monómeros de los surfactantes se convierta en una solución heterogénea (Paleologos E. et al. 2005).

Los surfactantes en medio acuoso tienden a formar agregados llamados micelas. La concentración mínima de surfactante necesario para que se produzca este fenómeno se llama concentración micelar crítica (CMC). Por encima de la CMC, se produce un equilibrio dinámico entre el monómero de surfactante y la micela. Cada

micela consta de cierto número de moléculas de surfactante, este número es conocido como número de agregación (Maniasso N. et al. 2001).

Cuando las condiciones de la solución inicial, como la temperatura, la presión o la fuerza iónica son alteradas, ocurre la separación de fases. En otras palabras los agregados micelares se separan de la solución acuosa, dispersando la luz y haciendo que la solución se observe turbia (Hung K. et al. 2007, Madej K. et al. 2009).

Cuando en el sistema ocurre la separación, se forma una fase de pequeño volumen llamada “fase rica en surfactante” que contiene a las micelas y una “fase acuosa”, que contiene el surfactante a una concentración cercana a la CMC. Este fenómeno es reversible y el restablecer las condiciones de la solución inicial, hace que las unidades de las micelas de la fase rica en surfactante tiendan a fusionarse con la solución acuosa para formar una fase homogénea (Shi Z. et al. 2007).

Hasta ahora no se conoce el mecanismo de la separación, pero se han propuesto varias teorías. La más aceptada, dice que la separación se da por el aumento de la agregación de las micelas, que se genera por una disminución de la repulsión intramicelar, resultante por una baja en la hidratación del grupo polar del surfactante debido al aumento de temperatura (Tani H. et al. 2007). Otra teoría propone que la separación de fases en el sistema se da por la competencia entre la entropía (que favorece la miscibilidad de las micelas en el agua) y la entalpía (que favorece la separación de las fases), por lo que el fenómeno de punto de nube y la separación de fases son procesos reversibles (Blankshtein D. et al. 1996). En la figura 3, se muestra un procedimiento general de ME (Xie S. et al. 2010).

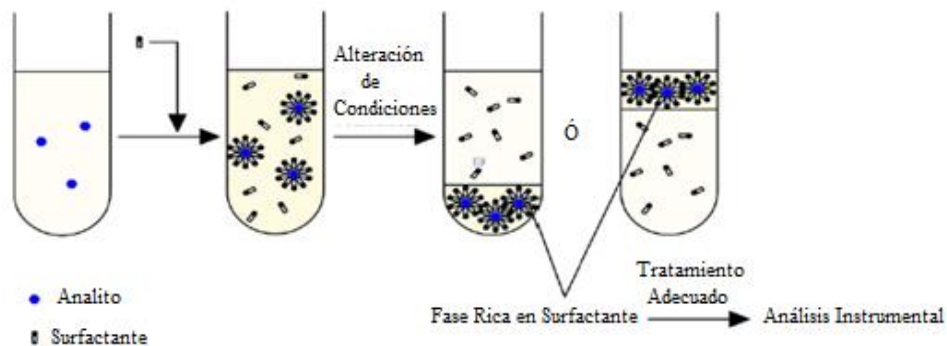


Figura 1.3. Procedimiento general de la ME.

En un procedimiento de ME, el agente tensoactivo se añade a la solución acuosa que contiene al analito a extraer o preconcentrar. La concentración de tensoactivo final en la solución acuosa debe exceder la CMC, para garantizar la formación de los agregados micelares. A continuación, las condiciones del sistema se alteran, por lo general se sube la temperatura y/o se añaden sales u otros aditivos para obtener la separación de fases. Después se separa el sistema bifásico, ya sea por sedimentación por gravedad o centrifugación, quedando los analitos concentrados en la fase rica en surfactante. Dependiendo de la densidad del surfactante, la fase rica en surfactante puede permanecer en el fondo o en la parte superior del sistema bifásico. La fase rica en surfactante con los analitos es muy viscosa y puede ser que no sea apropiado introducirla directamente en un instrumento para su análisis, por lo que tiene que ser diluida con solventes acuosos u orgánicos (Wang Z. 2007, Huddleston J. G. et al. 1999).

Como se describió anteriormente, para la separación de las fases, se requiere la alteración de las condiciones experimentales. Por lo general la alteración de la temperatura da como resultado la separación de las fases en surfactantes no iónicos y

en zwitteriónicos, mientras que para los surfactante iónicos la separación se logra principalmente por el fenómeno de salting out, es decir por la presencia de sales (Sicilia D. et al, 2002).

Para garantizar una buena eficiencia de extracción, las variables que deben de optimizarse en la ME son:

- La concentración y el tipo de surfactante: este parámetro es de suma importancia, porque de él dependerá la formación de las micelas; por lo general se recomienda trabajar una concentración de surfactante 10 veces más de la CMC. Además, se debe elegir un surfactante para que el analito tenga una buena afinidad.
- El pH de la solución: de este factor depende la partición del analito en la fase micelar, sobre todo cuando se trata de analitos ionizables.
- La temperatura de la separación y el tiempo de equilibrio: la temperatura a la cual se va a llevar a cabo los experimentos debe controlarse para garantizar una adecuada separación de las fases, además debe darse suficiente tiempo para que el sistema llegue al equilibrio y haya una buena partición del analito. Al mismo tiempo se debe garantizar que no se produzca algún cambio no deseado en el analito, como la descomposición.
- La fuerza iónica: es otro parámetro que se debe evaluar en el procedimiento, ya que al aumentarla, por lo general, se favorece la separación de las fases debido al fenómeno de salting out.
- La velocidad y tiempo de centrifugación: si bien estos parámetros no afectan directamente la formación de las micelas, si contribuyen a la separación

adecuada de las fases, en general a mayor tiempo y velocidad de centrifugación mayor separación de las fases (Paleologos E. et al. 2005).

1.4 Surfactantes y micelas.

Los surfactantes, también conocidos como detergentes o tensoactivos son sustancias cuya principal característica es presentar una estructura anfipática, es decir, una misma molécula posee dos o más grupos con propiedades antagónicas respecto a su solubilidad en un determinado disolvente. Así, un monómero de surfactante o tensoactivo tiene una estructura de la forma R-X en la que R es una cadena hidrocarbonada denominada cola, de carácter hidrofóbico y X es un grupo polar, de naturaleza iónica o no iónica, denominado cabeza (Rosen M. 2004). La parte hidrofílica, o cabeza polar, permite clasificar los surfactantes en cuatro grupos: aniónicos, catiónicos, zwitteriónicos y no iónicos (Pino V. 2002, Padrón C. 2005). En la figura 4, se muestra la estructura general de un surfactante

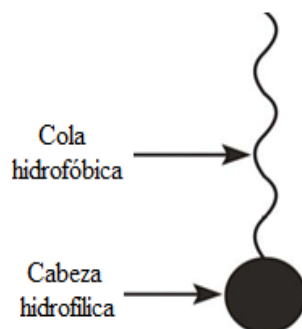


Figura 1.4. Estructura general de un surfactante (Pino V. 2002)

Surfactantes aniónicos: son aquellos que en solución acuosa se disocian en un anión anfifílico y un catión, el cual es generalmente un metal alcalino o un amonio cuaternario. A este tipo pertenecen los surfactantes de mayor producción: detergentes

como alquilbenceno sulfonatos, jabones o sales de ácidos carboxílicos grasos, espumantes como el lauril éter sulfato de sodio o SDS, etc. En la figura 5 se muestran estructuras generales de este tipo de surfactantes.

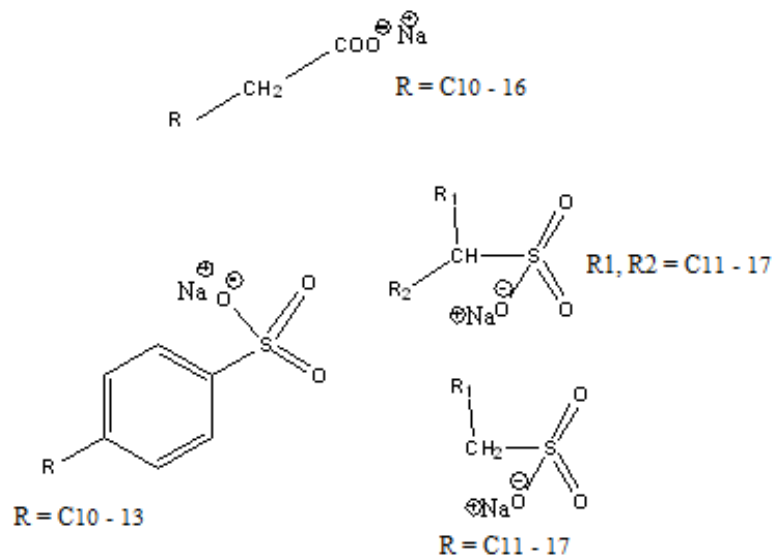


Figura 1.5. Estructura general de los surfactantes aniónicos.

Surfactantes catiónicos: son aquellos que se disocian en un catión anfifílico y un anión generalmente de tipo halogenado. Estos surfactantes se usan solamente en aplicaciones especiales donde la carga positiva del catión produce ventajas como en enjuagues o emulsiones asfálticas. En la mayoría de los casos corresponden a un grupo amonio cuaternario. La figura 6, representa de manera general la estructura de un surfactante catiónico.

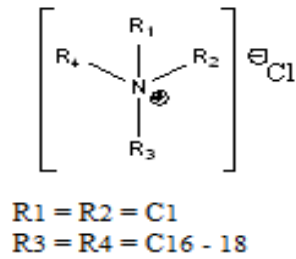


Figura 1.6. Estructura general de los surfactantes catiónicos.

Surfactantes zwitteriónicos: la combinación en la misma molécula de un grupo con tendencia aniónica y de un grupo con tendencia catiónica produce un surfactante anfotérico, como por ejemplo los aminoácidos, las betaínas o los fosfolípidos. Dependiendo del pH del medio una de las dos disociaciones prevalece o puede que se presenten las dos. Este tipo de surfactantes se usan sólo en casos particulares debido a su alto costo. En la figura 7, se muestra la estructura de un surfactante de este tipo.

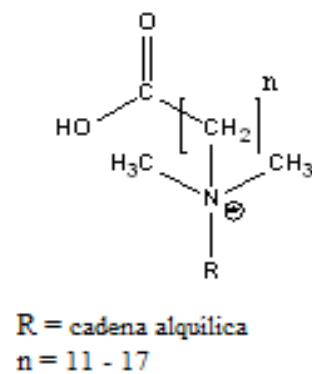


Figura 1.7. Estructura general de un surfactante zwitteriónico.

Surfactantes no iónicos: en solución acuosa no forman iones, ya que su parte hidrofílica está formada por grupos polares no ionizados como alcohol, tiol, éter o éster. Una gran parte de estos surfactantes son alcoholes o fenoles etoxilados, como la serie de los tritones. En la figura 8, se muestra la estructura general de los surfactantes no iónicos.

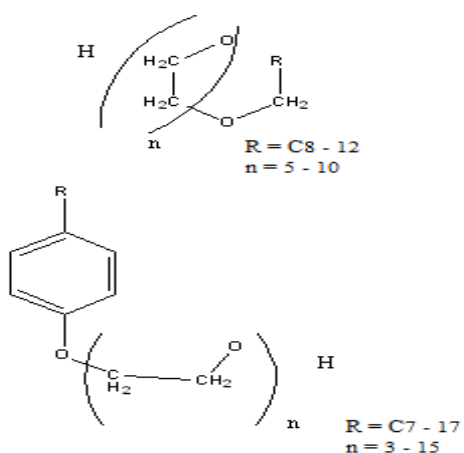


Figura 1.8. Estructura general de los surfactantes no iónicos.

Existen diferentes tipos de micelas, el término " micela normal" se utiliza para referirse a grupos de tensoactivos en medio acuoso. La estructura de la micela formada indica que el grupo hidrófilo o cabeza, se sitúa hacia la solución acuosa formando un área polar, mientras que la cadena lineal (cola) se localiza al interior de la micela, formando un núcleo no polar. Cuando la formación de micelas ocurre en disolventes no polares, los agregados de tensoactivos son conocidos como "micelas inversas", en donde la cola hidrófoba se localiza hacia el disolvente y la cabeza o parte hidrófila hacia el interior de la micela (Ávila R., et al, 2003).

El proceso de micelización, produce cambios en las propiedades físico-químicas de la disolución como la tensión superficial, la presión osmótica, la conductividad, el comportamiento espectroscópico de alguna sonda añadida a la solución, el índice de refracción y la densidad, entre otras. Gracias a ello se puede determinar experimentalmente la CMC, al monitorear el cambio de alguna de estas propiedades producida en las soluciones por la variación de la concentración del surfactante. Hay varios factores que pueden afectar notablemente la CMC como la estructura del surfactante, la temperatura de la solución, la presencia de aditivos orgánicos y la presencia de electrolitos. Los valores típicos de CMC, se encuentran en el rango de 10^{-4} a 10^{-2} M. En general, las micelas constituidas por surfactantes no iónicos suelen tener CMC menores. Esto se debe, en parte, a la ausencia de repulsiones electrostáticas entre las cabezas de los surfactantes (Domínguez A. et al 1997, Furton K. et al 1993, Romani A. et al. 2009).

El poder solubilizante de las micelas es probablemente la propiedad de mayor importancia desde el punto de vista analítico. Pueden solubilizar analitos de diferente carácter y naturaleza, ya sea por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno o interacciones electrostáticas (Merino F. et al. 2002). La solubilización de un analito en una micela es un proceso de equilibrio dinámico y depende tanto de la naturaleza del soluto como del medio micelar empleado. En general, la cantidad de soluto solubilizado es directamente proporcional a la concentración de surfactante utilizado.

Dependiendo del balance hidrofílico/hidrofóbico del soluto solubilizado y del sistema micelar, existen varios sitios posibles de la solubilización del soluto, ya que

este proceso se da por interacciones electrostáticas, hidrofóbicas o por combinación de ambas, lo que hace que tenga lugar en ciertos puntos del agregado micelar:

- Sobre la superficie micelar, en la interfase micela-disolvente.
- Entre los grupos o cabezas hidrofílicas, también llamada capa Stern.
- En la zona comprendida entre los grupos hidrofílicos y los primeros átomos de carbono de las cabezas hidrocarbonadas.
- En el núcleo de la micela.

La localización de los compuestos solubilizados en la micela o su entorno depende de la polaridad de los solutos. Aunque el mecanismo real de solubilización es complejo, se puede aceptar, de una manera simple, que los sustratos iónicos con carga opuesta a los grupos cabeza de micela, pueden enlazarse fuertemente a ellos. Las especies no polares que poseen electrones polarizables, como sucede en los compuestos aromáticos, residen cerca del grupo cabeza, mientras que los radicales alquílicos parece ser que interaccionan con el núcleo de la micela, de modo que las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas micela-soluto sean máximas. En disolventes no polares, el agua y los solutos polares se localizan en el núcleo de las micelas inversas, mientras que los solutos no polares se disuelven en el disolvente no polar (Chen L. et al 2010, McLntire G et al.1990, B. Lindman et al. 1980).

1.5 Líquidos iónicos y el ambiente micelar.

Debido a su estructura y a su carga inherente, algunos líquidos iónicos son estructuralmente similares a los tensoactivos iónicos convencionales. Es decir, el anión del líquido iónico consistirá en una cabeza o grupo hidrófilo y el catión de una o más colas hidrófobas. Considerando estas similitudes algunos líquidos iónicos tienen propiedades que son comparables a los tensoactivos. Estas propiedades incluyen la formación de micelas (Jungnickel C. et al. 2008, Qiu Z. et al 2008).

Se ha demostrado que los líquidos iónicos de la familia 1-alkil-3-metilimidazolio muestran un comportamiento similar a los compuestos anfifílicos en solución acuosa. Este comportamiento se debe a la presencia de una cadena alquílica generalmente larga (hidrofóbica) y un grupo polar con carga deslocalizada (hidrofilico). A partir de datos obtenidos a través de las mediciones de conductividad eléctrica y tensión superficial de líquidos iónicos de esta familia en solución acuosa, se sabe que a medida que aumenta la longitud de la cadena carbonada disminuye su CMC. Por el contrario, para líquidos iónicos con cadenas carbonadas cortas no se produce agregación. En general, cuando en el catión de los líquidos iónicos, el número de carbonos es igual o menor a 4, no hay agregación, si es igual a 6, empieza la agregación y si es mayor a 8 la agregación es contundente. El hecho de emplear un anión cada vez más grande reduce la tensión superficial, pero no favorece la formación de agregados. A medida que se aumenta el tamaño del anión, se reduce la solubilidad del líquido iónico en agua de forma drástica. La CMC disminuye rápidamente con el incremento del volumen molecular del anión (Guzmán N. et al. 2010, Vanyur R. et al. 2007, Li Z. et al. 2010).

Debido a los reportes de la capacidad de los líquidos iónicos de formar micelas y la aplicación de estos agregados en la extracción micelar, es que se han desarrollado diferentes métodos utilizando esta característica de los líquidos iónicos en la extracción de diferentes compuestos presentes en diferentes matrices. Por ejemplo, se han empleado en la extracción micelar en punto de nube asistida con ultrasonido para la separación de fenoles sintéticos (Chen M. et al.2012), para la extracción micelar asistida con ultrasonido del triclosán (Cabaleiro N. et al. 2011), se han podido extraer algunas toxinas como la microcistina (Pavagadhi S. et al. 2011) y también se han empleado para extraer diferentes compuestos de plantas como la *Salvia miltiorrhiza* (Bi W. et al. 2011).

Como agregados los líquidos iónicos pueden solubilizar muchas sustancias no solubles en líquidos iónicos sin agregar. Lo que origina perspectivas para las aplicaciones en la síntesis química, la catálisis, la electroquímica, las técnicas de extracción y la cromatografía (Smirnova N. et a. 2010, Pino V. et al. 2008).

1.6 Analitos modelo.

Los analitos seleccionados para el desarrollo de este trabajo, se eligieron de acuerdo a su ionización y a su coeficiente de partición octanol/agua (Machatha S. et al, 2005).

La acrilamida, es un polvo cristalino, de color blanco, cuya estructura química se muestra en la figura 9. La determinación de la acrilamida es difícil debido a su baja masa molecular (71.08 g/mol), a su elevada polaridad ($\log P_{o/w}$: -0.67), a su gran solubilidad en agua (2155 g/L) y a su baja volatilidad (Oracz J. et al. 2011, Knox C. et al. 2011).

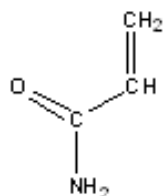


Figura 1.9. Estructura química de la acrilamida.

El ácido salicílico es un polvo cristalino blanco, inodoro. Su masa molecular es de 138.12 g/mol, su $\log P_{o/w}$: 2.4, su solubilidad en agua es de 2240 mg/L, presenta un pKa de 2.97 y es semi-volátil. En la figura 10, se presenta su estructura (Knox C. et al. 2011).

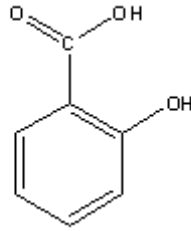


Figura 1.10. Estructura química del ácido salicílico.

La cafeína es un alcaloide del grupo de las xantinas, es un sólido cristalino, blanco y de sabor amargo. Su masa molecular es de 194.19 g/mol, su solubilidad en agua es de 22000 mg/L y presenta un pKa de 10.4. En la figura 11, se presenta la estructura química de la cafeína.

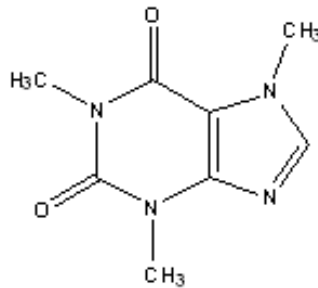


Figura 1.11. Estructura química de la cafeína.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Actualmente, los líquidos iónicos son considerados como solventes alternativos en los procesos de extracción convencionales debido a su miscibilidad con agua y solventes orgánicos, baja volatilidad y a su gran capacidad de solubilizar sustancias orgánicas e inorgánicas.

Este elevado potencial como solventes y su similitud estructural con los surfactantes, permiten pensar que los líquidos iónicos pueden desempeñarse satisfactoriamente como nuevos medios extractantes para compuestos hidrofílicos en procedimientos de extracción micelar, proporcionando métodos eficientes y confiables, amigables con el medio ambiente y seguros para el analista.

CAPÍTULO 3

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño de los Líquidos Iónicos en la Extracción Micelar.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar los líquidos iónicos, mediante la determinación de su concentración micelar crítica y el tamaño de micela.
2. Implementar y validar métodos por HPLC para la determinación de los analitos modelo incluidos en el estudio en presencia de surfactantes o líquidos iónicos.
3. Establecer las condiciones óptimas de trabajo para la extracción micelar de los analitos modelo utilizando surfactantes y líquidos iónicos como extractantes.
4. Comparar el funcionamiento de los líquidos iónicos y de los surfactantes en la extracción micelar.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos.

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes líquidos iónicos:

- Cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio ([DMIM] [Cl]), Sigma-Aldrich, 96%.
- Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio ([DMIM] [BF₄]), Sigma-Aldrich, 96 %.

- Cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio ([DDMIM] [Cl]), Iolitec, 98 %.
- Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio ([DDMIM] [BF₄]), Iolitec, 98 %.
- Cloruro de 1-hexadecil-3-metilimidazolio ([HDMIM] [Cl]), Iolitec, 98 %.

Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey.

Agua desionizada, Pure Lab UHQII, Elga II, Veolia.

Pireno, Sigma-Aldrich, 99 %.

Tritón X-114, Sigma-Aldrich.

Dodecil sulfato de sodio, J.T. Baker, 95 %.

Cloruro de Potasio, Merck, 99.5 %.

Acetonitrilo, J. T. Baker, grado HPLC.

Ácido acético, Fluka, 99.8 %.

Metanol, J. T. Baker, grado HPLC.

Isopropanol, Merck, grado HPLC.

Ácido trifluoroacético, Sigma-Aldrich, 99 %.

Ácido fórmico, Merck, 99 %.

Ácido Clorhídrico 12 N, Jalemk, 99.5 %.

Hidróxido de amonio, Sigma-Aldrich, 25 %.

Ácido fosfórico, CTR, 85 %.

Fosfato diácido de sodio, Productos Químicos Monterrey, 99.2 %.

Fosfato monoácido de sodio dihidratado, CTR, 99.6 %.

Fosfato de sodio, CTR. 99.5 %.

Aceite de inmersión.

Los estándares utilizados fueron:

Acrilamida, Sigma-Aldrich, 95 %.

Ácido salicílico, Sigma-Aldrich, 99 %.

Cafeína, Sigma-Aldrich, Reagent Plus.

5.2 Equipos.

En el desarrollo del trabajo se utilizaron los siguientes equipos:

Plataforma de agitación, Nutating mixer, VWR International.

Incubadora, Combi-SVI2DX, DAIGGER.

Espectrofluorómetro LS 45 de Perkin Elmer.

Conductímetro Conductivity/TDS Meter Sprite Industries 6000.

Espectrofotómetro de correlación fotónica Zetasizer Nanoseries Nano-Zs90,
Malvern.

Microscopio Macromaster, Fisher Scientific, equipado con el software Micron USB
2 de Westover Scientific.

Vortex Thermolyne Tipo 37600, Barnstead International.

Balanza analítica GR-120, AND.

Balanza semianalítica, GX-200, AND.

Plancha de calentamiento y agitación magnética, CIMAREC, Thermo Scientific.

Baño de ultrasonido, Bransonic 3510, Branson.

Bomba de vacío, Modelo SA55NXGTE-4870.

Bomba de doble pistón D-14163, Knauer.

Potenciómetro SensION pH, Hach.

Centrífuga con control de temperatura, IEC Centra CL3, Thermo Scientific.

Purificador de agua, Pure Lab UHQII, Elga, Veolia.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hewlett Packard Serie 1100, equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, inyector automático, controlador de temperatura de columna y detector UV de longitud de onda variable.

Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters, modelo 2695, equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, inyector automático, controlador de temperatura de la columna y detector de arreglo de diodos.

Las columnas utilizadas en el trabajo fueron:

Atlantis dC₁₈ (2.1 x 150 mm, 3 µm; Waters)

Primesep S (2.1 x 150 mm, 5 µm; SIELC)

Discovery HS F5 (2.1 x 150 mm, 3 µm; Supelco)

ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 x 150 mm, 5µm; Agilent)

Luna CN (2 x 150 mm, 3 µm; Phenomenex)

5.3 Materiales.

En el desarrollo del trabajo se utilizaron de manera general los siguientes materiales:

Microjeringas de 100 μ L, Hamilton.

Microjeringas de 500 μ L, Hamilton.

Pipeta automática de volumen variable de 100 a 1000 μ L, Eppendorf.

Viales transparentes de 2 mL de tapa de rosca, Agilent.

Matraces de aforación de 5 mL, Pyrex.

Matraces de aforación de 10 mL, Pyrex.

Matraces de aforación de 25 mL, Pyrex.

Matraces de aforación de 50 mL, IVA.

Matraces de aforación de 250 mL, Pyrex.

Frascos reservorios para la fase móvil de 500 mL con tapa rosca. Schott Duran.

Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4 y 5 mL, Pyrex.

Tubos de ensaye de 13x100 mm.

Pipetas Pasteur.

Bulbo para pipeta Pasteur.

Sistema de filtración al vacío de Millipore.

Cubreobjetos.

Portaobjetos.

Tubos cónicos con tapa rosca de 5 mL, Kimble Chase.

Termómetros -20°C a 110°C, Brannan.

Programa Excel 2007.

Paquete estadístico STATISTICA 8.

5.4 Metodología.

5.4.1. Concentración micelar crítica.

Para el cálculo de la CMC de Tritón Tx-114 ($d = 1.068 \text{ g/mL}$), se preparó una solución concentrada 5 mM, se transfirió un volumen de 0.063 mL de esta sustancia con una microjeringa de 100 μL y se llevó al aforo con 25 mL con agua desionizada. Las soluciones de trabajo se prepararon por dilución con agua desionizada en un rango de concentración de 0.02 a 0.5 mM. Del dodecil sulfato de sodio (SDS) se preparó una solución 50 mM, se pesó 0.758 g y se disolvió en 50 mL de agua desionizada. A partir de esta solución, por dilución se prepararon las soluciones de trabajo de 0.1 a 30 mM en agua desionizada.

Para la determinación de la CMC se utilizaron soluciones de líquidos iónicos a distintas concentraciones. Para ello se pesó una cantidad determinada de cada líquido iónico y se aforó a 50 mL. Las soluciones de trabajo de cada líquido iónico se prepararon por dilución de la más concentrada. En la tabla 5.1 se presenta la información de las soluciones de líquidos iónicos concentradas y de las soluciones de trabajo.

Tabla 5.1. Soluciones de líquidos iónicos para el cálculo de la CMC.

Líquido Iónico	Solución concentrada	Soluciones de trabajo
	Concentración (mM)	Concentración (mM)
Cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio	100	1 a 70
Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio	50	1 a 36
Cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio	50	1 a 30
Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio	40	1 a 18
Cloruro de 1-hexadecil-3-metilimidazolio	10	0.1 a 2

- **Método de fluorescencia**

Se preparó una solución metanólica de pireno a una concentración de 2.46 mM. A partir de esta solución se preparó una dilución a 1.23 mM, con agua desionizada. Finalmente, la solución acuosa de trabajo fue de una concentración de 1.2×10^{-3} mM.

Se utilizó un espectrofluorómetro LS 45 de Perkin Elmer, se emplearon soluciones acuosas de los líquidos iónicos y de Tritón Tx-114, en presencia de pireno. Las concentraciones de líquidos iónicos empleadas se muestran en la tabla 5.1, mientras que el Tx-114 fue evaluado entre 0.02 y 0.5 mM. Para la determinación se tomaron 2.5 mL de la solución de pireno 1.2×10^{-3} mM y se le adicionaron diferentes volúmenes de las soluciones concentradas de cada uno de los líquidos iónicos y del Tx-114. Las mezclas se agitaron y se leyeron en el espectrofluorómetro. Se determinó la intensidad en las bandas 371 nm (I_{371em}) y 383 nm (I_{383em}) en el

espectro de emisión del pireno, a una longitud de onda de excitación de 332 nm y por otra parte se midió la intensidad de las bandas 332 nm (I_{332ex}) y 335 nm (I_{335ex}) en el espectro de excitación, fijando a 374 nm la longitud de onda de emisión. Se calculó la relación de las intensidades entre los pares de bandas y se representaron gráficamente en función del logaritmo de la concentración de las soluciones. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. La CMC corresponde al punto en cual se presenta un cambio brusco en la relación de las intensidades (Ashjari M. et. al, 2012). Para la realización de las curvas se utilizó el programa Microsoft Excel 2007.

- **Método conductimétrico**

Se preparó una solución 10 mM, para esto se pesaron 0.037 g de KCl y se llevaron al aforo con agua desionizada a 50 mL. Esta solución se utilizó para ajustar el conductímetro a una conductividad específica de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$.

Se trabajó con un conductímetro Conductivity/TDS Meter Sprite Industries 6000, el cual se calibró con una solución 10 mM de KCl a una conductividad de 1413 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Se midió la conductividad de 5 mL de soluciones de los diferentes líquidos iónicos a las concentraciones que se muestran en la tabla 5.1, mientras que el SDS se evaluó en un intervalo de concentración de de 0.1 a 30 mM. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Los valores de conductividad obtenidos se representaron gráficamente en función de la concentración de la solución

correspondiente. La CMC corresponde al punto donde se produce un cambio en la pendiente de la curva. Para calcular la CMC, se obtuvieron las ecuaciones de las rectas considerando como mínimo 3 puntos antes (Recta 1) y 3 puntos después (Recta 2) del cambio de pendiente de la curva obtenida con las mediciones. Las ecuaciones que se obtuvieron se igualaron para obtener el valor de “x”, correspondiente al valor de concentración micelar. Todos los cálculos se realizaron con el programa Excel 2007 (Miskolczy Z. et al, 2004).

5.4.2. Tamaño de micela.

Para la evaluación del tamaño de la micela y la microscopía, se preparó una solución concentrada de 5 mM de Tritón Tx-114 ($d = 1.068 \text{ g/mL}$), midiendo 0.063 mL de esta sustancia con una microjeringa de 100 μL y se llevó al aforo con 25 mL con agua desionizada. Las soluciones de trabajo se prepararon por dilución con agua desionizada en un rango de concentración de 0.02 a 0.5 mM. Para dodecil sulfato de sodio (SDS) se preparó una solución 50 mM, pesando 0.758 g y disolviendo en 50 mL con agua desionizada. A partir de esta solución, por dilución se prepararon las soluciones de trabajo de 0.1 a 30 mM en agua desionizada.

Para la evaluación del tamaño de la micela y la microscopía se utilizaron soluciones de líquidos iónicos a distintas concentraciones. Para ello se pesó una cantidad determinada de cada líquido iónico y se aforó a 50 mL. Las soluciones de trabajo de cada líquido iónico se prepararon por dilución de la más concentrada. En la tabla 5.2, se presenta la información de las soluciones de líquidos iónicos concentradas y de las soluciones de trabajo.

Tabla 5.2. Soluciones de líquidos iónicos para el cálculo del tamaño de micela.

Líquido Iónico	Solución concentrada	Soluciones de trabajo
	Concentración (mM)	Concentración (mM)
Cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio	100	10
Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio	50	12
Cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio	50	14
Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio	40	6
Cloruro de 1-hexadecil-3-metilimidazolio	10	1.5

La determinación del tamaño de las micelas de los líquidos iónicos, se llevó a cabo por espectroscopía de correlación fotónica, mediante el uso de un espectrómetro Zetasizer Nanoseries Nano-Zs90, Malvern. Se colocaron en la celda del espectrómetro, alícuotas de las diferentes soluciones (tabla 5.2) de los líquidos iónicos y de los surfactantes control. El Tx-114 se evaluó con soluciones de entre 0.02 y 0.5 mM y el SDS de entre 0.1 y 30 mM.

Para la observación de las micelas de los líquidos iónicos y los surfactantes se utilizó un Microscopio Macromaster, Fisher Scientific, equipado con el software MicronUSB2 de Westover Scientific. Se utilizaron portaobjetos, y en cada uno de ellos se colocó una gota de las diferentes soluciones de los surfactantes (Tx-114 0.02 a 0.5 mM; SDS 0.1 a 30 mM) y de los líquidos iónicos (tabla 5.2), por separado. Las gotas se cubrieron con cubreobjetos y se observaron al microscopio con aumentos de 10X, 40X y 100X.

5.4.3. Desarrollo de métodos de análisis cromatográfico.

5.4.3.1. Métodos cromatográficos para la acrilamida.

Para el desarrollo de los métodos cromatográficos se empleó un estándar acuoso de 40 µg/mL de acrilamida. La detección del analito se realizó a una longitud de onda de 210 nm. Todas las eluciones se llevaron a cabo en modo isocrático, utilizando un cromatógrafo HP 1100.

Las fases móviles, acuosas y orgánicas, que se emplearon en el desarrollo experimental fueron filtradas con membranas nylon (47 mm, 0.45 µm de poro; Pall Corporation, USA) y sonicadas por 15 minutos para su desgasificación.

Las fases móviles acuosas fueron preparadas con agua desionizada en un equipo Pure Lab UHQII, Elga II (Veolia). En la tabla 5.3 se presenta el listado de las columnas evaluadas así como las soluciones acuosas y modificadores orgánicos empleados como fases móviles.

Tabla 5.3. Fases móviles evaluadas para el análisis de acrilamida.

Columna	Fase Móvil
Atlantis dC₁₈ Waters, 2.1 x 150mm, 3µm	H ₂ O (100) H ₂ O – ACN (99:1) Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 (100) Buffer de acetatos 20 mM, pH 4 (100) Ácido trifluoracético 40 mM, pH 4 – ACN (99:1) Ácido trifluoracético 20 mM, pH 4 – ACN (99:1)
Primsep S SIELC, 2.1 x 150mm, 5µm	ACN – Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 (95:5) y (90:10) ACN – MeOH (90:10) y (97:3) ACN – IsopOH (97:3)
Discovery HS F5 Supelco, 2.1 x 150mm, 3µm	ACN – Buffer de acetatos, 40 mM, pH 4 (95:5) y (99:1)

Con la columna Atlantis dC₁₈ las pruebas se realizaron a un flujo de 0.15 mL/min, la columna se mantuvo a 40 °C y el volumen de inyección fue de 5 y 10 µL. Con la columna de fase mixta Primsep S las pruebas se realizaron a un flujo de 0.4 mL/min, una temperatura de columna de 30 °C y el volumen de inyección fue de 10 µL. Para la columna Discovery HS F5 se empleó un flujo de 0.15 mL/min, la columna se mantuvo a 40 °C y se utilizó un volumen de inyección de 10 µL.

5.4.3.2. Métodos cromatográficos para el ácido salicílico y la cafeína.

La optimización de los métodos cromatográficos se realizó utilizando estándares acuosos de 40 µg/mL de ácido salicílico y cafeína, el ácido salicílico se preparó en buffer de formiatos pH 5. La detección se realizó a una longitud de onda de 280 nm para el ácido salicílico y a 254 nm para la cafeína. Se trabajó en modo isocrático y de gradiente. Se utilizaron los cromatógrafos HP 1100 y Waters 2695.

Todas la fases móviles, acuosas y orgánicas, que se emplearon en el desarrollo experimental fueron filtradas con membranas nylon (47 mm, 0.45 µm de poro; Pall Corporation, USA) y sonicadas por 15 minutos para su desgasificación.

Las fases móviles acuosas fueron preparadas con agua desionizada en un equipo Pure Lab UHQII, Elga II (Veolia). En la tabla 5.4 se presenta el listado de las columnas evaluadas así como las soluciones acuosas y modificadores orgánicos empleados como fases móviles.

Tabla 5.4. Fases móviles evaluadas para el análisis de ácido salicílico y cafeína.

Columna	Fase Móvil
Atlantis dC₁₈ Waters, 2.1 x 150mm, 3µm	Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 - ACN (70:30) Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 - ACN (75:25) 0 a 4 min, 100 % buffer de acetatos 40 mM, pH 4, del min 4 al 14, 70 % buffer de acetatos 40 mM, pH 4 30 % ACN 0 a 4 min, 100 % buffer de acetatos 40 mM, pH 4, del min 4 al 9, 75 % buffer de acetatos 40 mM, pH 4 y 25 % de ACN
ZORBAX Eclipse XDB- C₁₈ Agilent, 2.1 x 150 mm, 5µm	Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 - ACN (75:25) Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 - ACN (90:10) Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 - ACN (95:5) 0 a 5 min, 5 % buffer de formiatos 100 mM, pH 4, del min 5 al 10, 10 % buffer de formiatos 100 mM, pH 4 y 90 % de ACN, durante 40 min Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 - ACN (93:7)
Luna CN Phenomenex, 2 x 150 mm, 3 µm	ACN - Buffer de acetatos 250 mM, pH 5 (95:5) ACN - Buffer de acetatos 500 mM, pH 5 (95:5)

Con la columna Atlantis dC₁₈, las pruebas se realizaron a un flujo de 0.15 mL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 40 °C y el volumen de inyección fue de 10 µL. Para la columna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, se utilizó un flujo de 0.2 mL/min, una temperatura de columna de 40 °C y un volumen de inyección de 5µL. Con la columna Luna CN, se empleó un flujo de 0.4 mL/min, la columna se mantuvo a 40 °C y se inyectaron 10 µL y 5 µL. La detección se realizó a 295 nm.

5.5. Validación de los métodos cromatográficos.

Los métodos desarrollados para los 3 analitos se validaron considerando las recomendaciones de la IUPAC (2006). Los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

Para la validación de los métodos se prepararon soluciones concentradas de acrilamida, de ácido salicílico y de cafeína a un nivel de 400 $\mu\text{g/mL}$, todas disueltas en agua desionizada; las soluciones de trabajo para los tres analitos fueron de 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$ y se prepararon a partir de la solución madre de 400 $\mu\text{g/mL}$. Los estándares para la curva de calibración de ácido salicílico para el modo cromatográfico HILIC se prepararon de la misma manera solo que en acetonitrilo.

- Linealidad

Se construyó una curva de calibración por estándar externo a 5 niveles de concentración (5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/mL}$) por triplicado. Con las áreas de las señales obtenidas de los cromatogramas, se realizó una regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y se confirmó la relación de linealidad con los coeficientes de correlación y de determinación.

- Precisión

Se evaluó con el porcentaje de desviación estándar relativa de los factores de respuesta de los estándares de calibración, de acuerdo a la ecuación 1.

$$\% DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1.}$$

$\% DER$ = Desviación estándar relativa en porcentaje

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media

- Exactitud

La evaluación de la exactitud se realizó mediante la pendiente de la curva resultante al graficar la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración establecida como real. Para ello se recalculó la concentración de los estándares utilizando la ecuación obtenida por la curva de calibración. Se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados para la concentración calculada en función de la concentración establecida como real.

- Límite de detección y de cuantificación

El límite de detección se determinó considerando una relación Señal/Ruido de 3 y el límite de cuantificación se determinó considerando una relación Señal/Ruido de 10.

- Interferencia de los surfactantes y del líquido iónico en la cuantificación de los analitos

Para evaluar la posible interferencia cromatográfica de los surfactantes modelo y del líquido iónico seleccionado en la cuantificación de los analito se procedió de la siguiente manera:

Se prepararon estándares acuosos de acrilamida a dos niveles de concentración (25 y 80 $\mu\text{g/mL}$) y de cafeína y ácido salicílico a 15 y 40 $\mu\text{g/mL}$. A cada una de soluciones estándar de diferente concentración se les añadió Tx-114, SDS y por ultimo el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio a un nivel de 40 $\mu\text{g/mL}$. Las soluciones se inyectaron por triplicado al cromatógrafo.

A los resultados obtenidos (áreas) se les realizó la prueba estadística T de Student de dos colas, con un nivel de confianza del 95 % ($\alpha = 0.05$), para comparar las medias obtenidas de las diferentes muestras independientes.

5.6. Desarrollo de métodos de extracción micelar.

En el desarrollo de los métodos de extracción micelar, el Tx-114 se trabajó a una concentración de 2 mM, que se preparó a partir de una solución madre 20 mM. El SDS se trabajó a una concentración de 100 mM, que se preparó a partir de una solución madre 1 M. El tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, se trabajó a una concentración de 120 mM, el cual se preparó por dilución de una solución madre 1 M del líquido iónico, que fue preparada pesando 7.754 g del líquido iónico los cuales se llevaron a un aforo de 25 mL con agua desionizada.

La solución amortiguadora 100 mM de pH 2, se preparó a partir de ácido fosfórico 85 %, midiendo 1.715 mL, aforando con agua desionizada a 250 mL y ajustando el pH con hidróxido de amonio al 25 %.

La solución amortiguadora 100 mM de pH 12, se preparó pesando 2.327 g de fosfato monoácido de sodio dihidratado y 2.629 g de fosfato de sodio que se disolvió en agua desionizada, se aforaron a 250 mL y el pH se ajustó a 12 con hidróxido de amonio.

Para establecer las condiciones óptimas se utilizó un diseño factorial fraccionado 2^{5-1} con 1 replicado, las variables incluidas así como los valores evaluados se presentan en la tabla 5.5. Los experimentos planteados en el diseño se presentan en la tabla 5.6. Los tres analitos se trabajaron a una concentración de 80

$\mu\text{g/mL}$, el Tritón Tx-114 a 2 mM, el SDSa 100 mM y el líquido iónico a 120 mM. El volumen final de trabajo de las soluciones fue de 5 mL.

Tabla 5.5. Variables incluidas en el diseño de experimentos.

Variable	Nivel Bajo (-1)	Nivel Alto (1)
pH	2	12
% NaCl	0.5	5
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	40	100
Agitación	Ultrasonido	Vórtex
Tiempo de Extracción (min)	10	30

En todos los experimentos, la separación de la fase rica en surfactante y de la fase acuosa se realizó por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos a 40 $^{\circ}\text{C}$. Del volumen de fase rica en surfactante recuperado, se tomó una alícuota que se diluía hasta cierto volumen con agua o acetonitrilo y se inyectaba al HPLC. Cuando se trabajó con el Tx-114 se tomaron 10 μL y se les agregaron 90 μL de agua, en todos los analitos, por otra parte al trabajar con el líquido iónico se tomaron 25 μL de la fase rica en surfactante y se la añadieron 25 μL de agua desionizada. Para la inyección del ácido salicílico después de la extracción con en el líquido iónico, en el modo cromatográfico HILIC, se tomaron 25 μL de la fase rica en surfactante y se la añadieron 25 μL de acetonitrilo.

Tabla 5.6. Diseño de experimentos.*

REPLICADO	pH	NaCl	Agitación	Temperatura	Tiempo
1	-1	-1	1	1	1
1	1	1	-1	-1	1
1	1	-1	1	-1	1
1	-1	1	-1	-1	-1
1	-1	1	1	-1	1
1	-1	1	-1	1	1
1	1	-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1	1	-1
1	-1	-1	1	-1	-1
1	1	-1	1	1	-1
1	1	1	-1	1	-1
1	-1	-1	-1	-1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	-1	-1	1	1
1	1	1	1	-1	-1
1	-1	1	1	1	-1
1	-1	-1	1	1	1
1	1	1	-1	-1	1
1	1	-1	1	-1	1
1	-1	1	-1	-1	-1
1	-1	1	1	-1	1
1	-1	1	-1	1	1
1	1	-1	-1	-1	-1
1	-1	-1	-1	1	-1
1	-1	-1	1	-1	-1
1	1	-1	1	1	-1
1	1	1	-1	1	-1
1	-1	-1	-1	-1	1
1	1	1	1	1	1
1	1	-1	-1	1	1
1	1	1	1	-1	-1
1	-1	1	1	1	-1

*Distribución aleatoria.

Los resultados obtenidos en el diseño de experimentos fueron tratados en el programa estadístico STATISTICA 8, para obtener los diagramas de Pareto para seleccionar las condiciones óptimas de extracción para cada analito.

5.7. Comparación del desempeño del Tritón Tx-114 y Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio en la extracción micelar.

Para comparar el desempeño del Tx-114 y del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio en la extracción micelar se realizaron extracciones por triplicado de soluciones acuosas de cada uno de los analitos (80 µg/mL), utilizando las condiciones óptimas de extracción establecidas.

Se calcularon la eficiencia en la extracción como porcentaje de recuperación y la precisión de las extracciones.

La recuperación se calculó mediante la comparación de las áreas de estándares extraídos y no sometidos al proceso de extracción, utilizando la ecuación 1.

$$\% R = \left(\frac{\text{Área de estándar extraído}}{\text{Área de estándar no extraído}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

La precisión se calculó como la desviación estándar relativa de las respuestas obtenidas (áreas) de cada uno de los estándares extraídos por medio de la ecuación 3.

$$\% DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

donde:

$\% DER$ = Desviación estándar relativa

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media

Se calculó el factor de concentración (FC) para los analitos de acuerdo a la ecuación 4.

$$FC = \frac{\text{Concentración de estándar}}{\text{Concentración extraída}}$$

Ecuación 4.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1. Concentración micelar crítica.

- **Método de fluorescencia**

En la figura 6.1 se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos para el Tx-114. En la figura 6.2 y 6.3 se presentan las gráficas de la relación de intensidad de emisión (I_{371em}/I_{383em}) y de excitación (I_{332ex}/I_{335ex}) en función del logaritmo de la concentración del Tx-114.

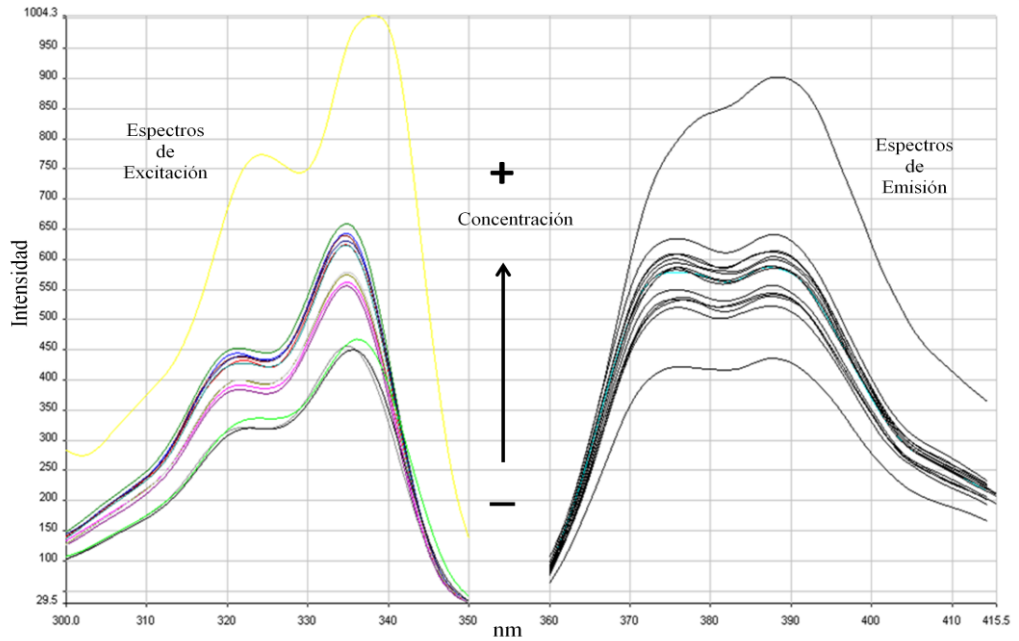


Figura 6.1. Espectros de fluorescencia de emisión y de excitación obtenidos para el Tx-114 a diferentes concentraciones.

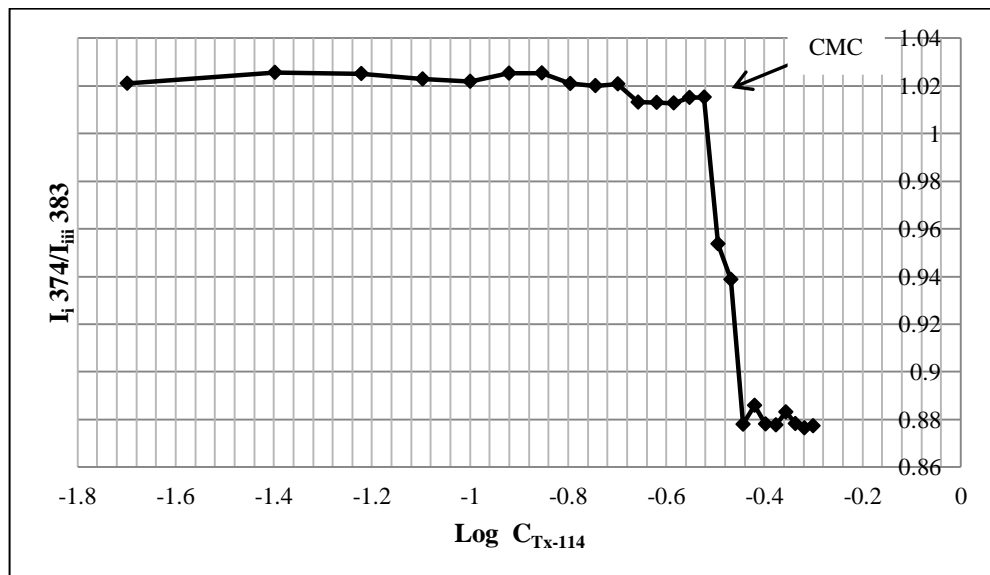


Figura 6.2. Gráfica de la relación de la intensidad de la emisión (I_{371em}/I_{383em}) en función de la concentración de Tx-114.

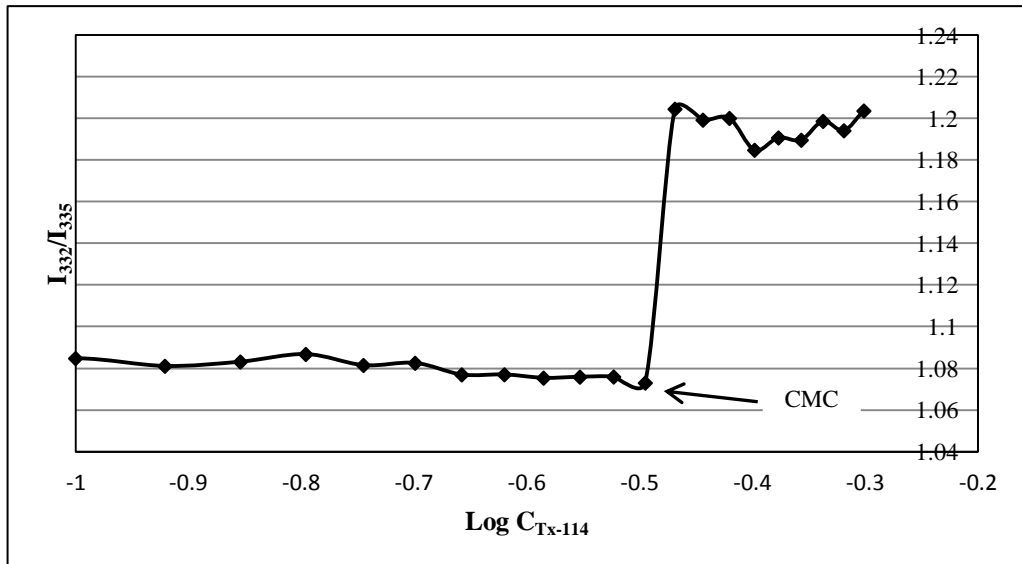


Figura 6.3. Gráfica de relación de la intensidad de la excitación ($I_{332\text{ex}}/I_{335\text{ex}}$) en función de la concentración de Tx-114.

La concentración micelar crítica obtenida para el Tx-114 fue de 0.3 mM.

En la figura 6.4 se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos para el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

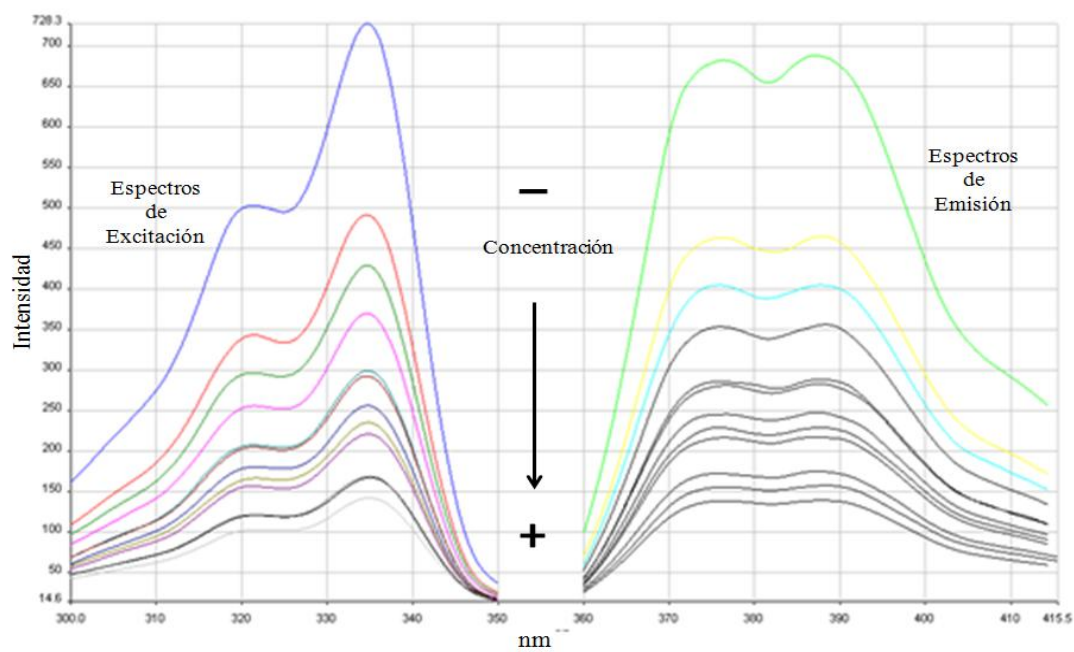


Figura 6.4. Espectros de fluorescencia de emisión y de excitación obtenidos a diferentes concentraciones de tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

- **Método conductimétrico**

En la figura 6.5, se presenta la gráfica de la conductividad de las soluciones de SDS en función de su concentración.

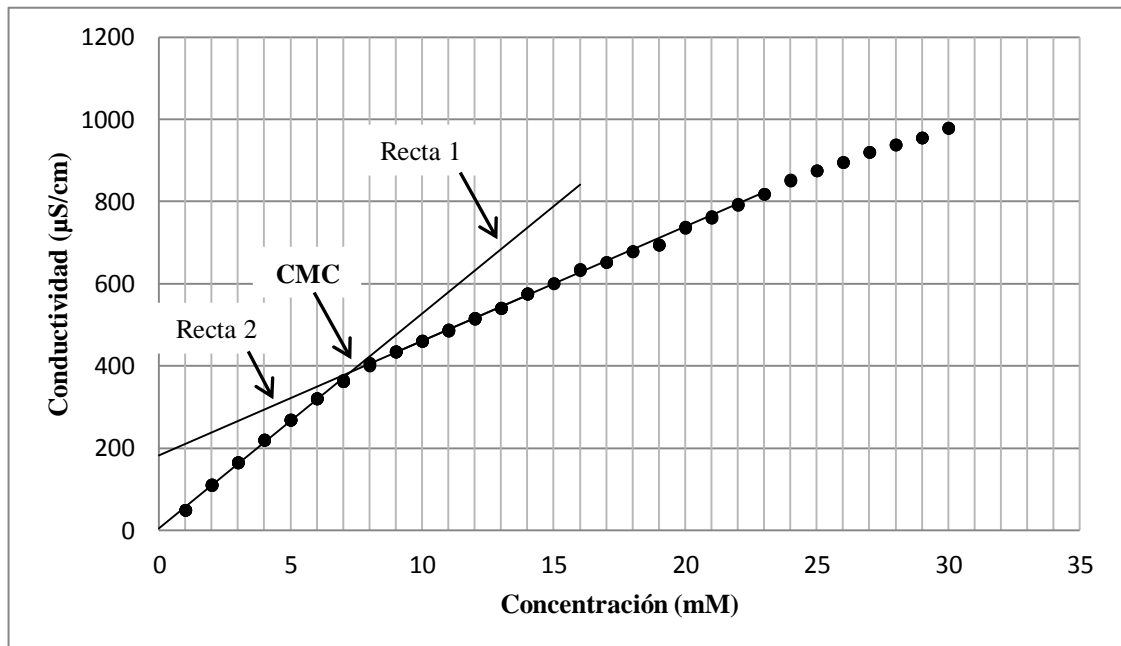


Figura 6.5. Variación de la conductividad en función de la concentración del SDS.

La concentración micelar crítica obtenida para el SDS fue de 7.24 mM.

En la figura 6.6, se presenta la gráfica obtenida para la variación de la conductividad en función de la concentración del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio. En la tabla 6.1, se presentan la concentración micelar crítica obtenida para los diferentes líquidos iónicos.

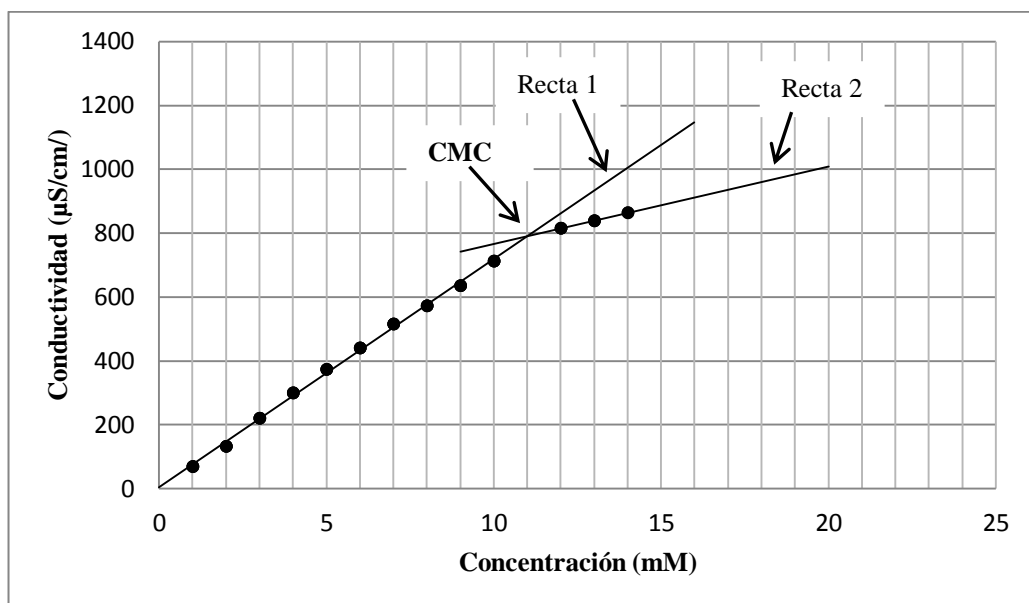


Figura 6.6. Variación de la conductividad en función de la concentración del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

Tabla 6.1. CMC obtenida para los líquidos iónicos y valores reportados en la literatura.

Líquido Iónico	CMC calculada	CMC reportada*
Cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio	8.87 mM	10 – 59.9 mM
Cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio	12.12 mM	13 – 20 mM
Cloruro de 1-hexadecil-3-metilimidazolio	1.13 mM	0.86 – 1.3 mM
Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio	11.19 mM	No reportada
Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio	4.68 mM	7.6 – 9.6 mM

*Pino V. et al. 2012

6.2. Tamaño de micela

En la tabla 6.2, se presenta el tamaño de micela obtenido para los líquidos iónicos, así como para los surfactantes que se utilizaron como control.

Tabla 6.2. Tamaño promedio de las micelas obtenido por espectroscopía de correlación fotónica.

Líquido Iónico	Tamaño
Cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio	177.3 nm
Cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio	4.02 nm
Cloruro de 1-hexadecil-3-metilimidazolio	104.6 nm
Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio	619.6 nm
Tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio	199.0 nm
Tritón Tx-114	922.6 nm
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	788.2 nm

En la figura 6.7, se muestra la gráfica obtenida en la determinación del tamaño de las micelas del Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

En las figuras 6.8, 6.9 y 6.10 se presentan microfotografías obtenidas para una solución de Tx-114 (0.5 mM), SDS (0.15 mM) y tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio (50 mM).

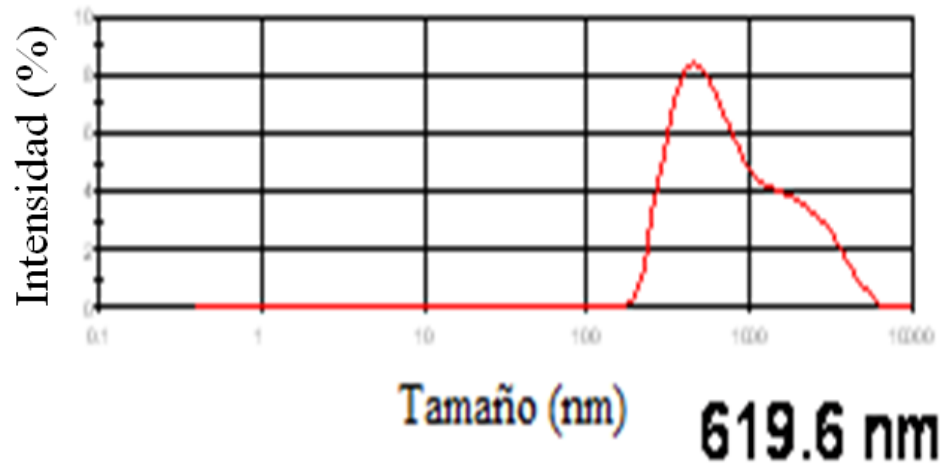


Figura 6.7. Gráfica del tamaño de las micelas del Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

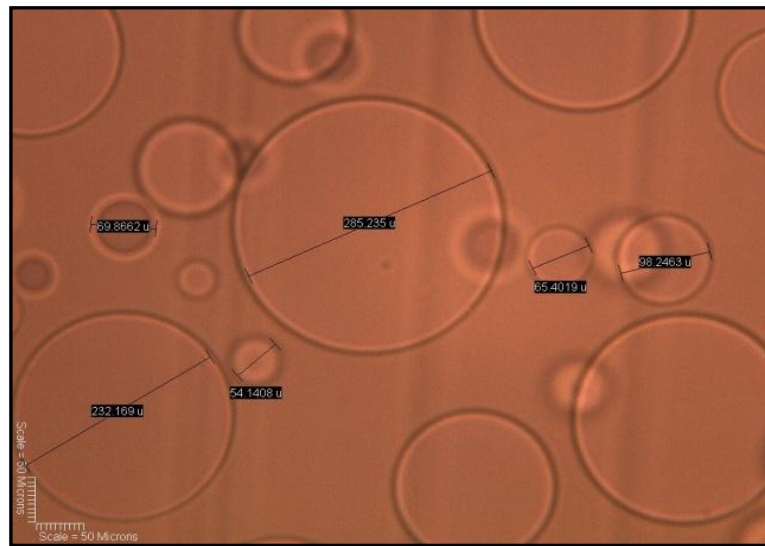


Figura 6.8. Micelas del Tx-114 (0.5 mM; 40X).

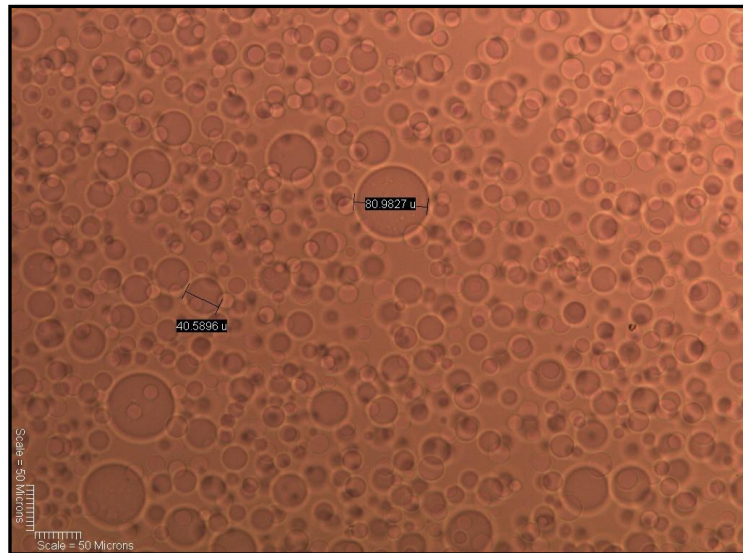


Figura 6.9. Micelas de SDS (15 mM; 40X).

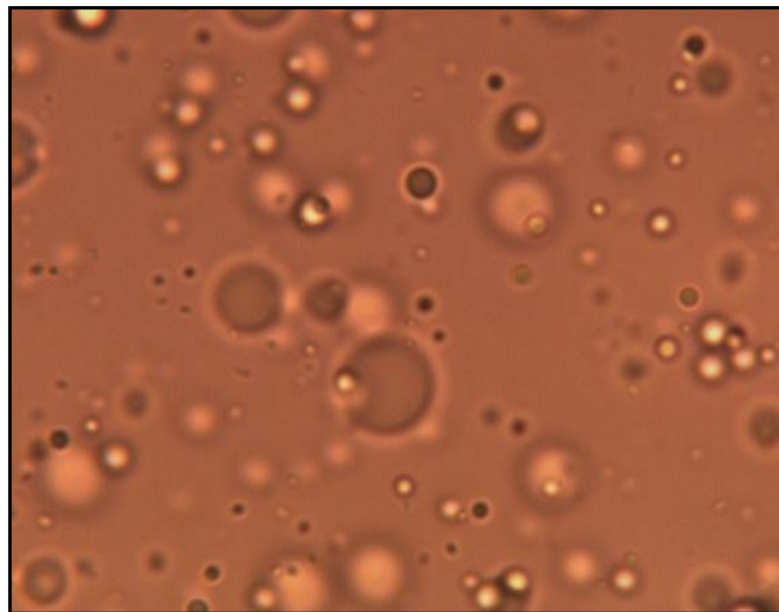


Figura 6.10. Micelas del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio (50 mM; 100X).

6.3. Desarrollo de métodos de análisis cromatográfico.

6.3.1. Métodos cromatográficos para la acrilamida

La tabla 6.3 presenta los tiempos de retención obtenidos para la acrilamida en las condiciones evaluadas.

Tabla 6.3. Tiempos de retención obtenidos para la acrilamida.

Columna	Fase Móvil	Tiempo de retención (min)
Atlantis dC ₁₈	H ₂ O (100)	t _M
	H ₂ O – ACN (99:1)	t _M
	Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 (100)	t _M
	Buffer de acetatos 20 mM, pH 4 (100)	t _M
Primsep S	ACN – Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 (95:5)	t _M
	ACN – Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 (90:10)	t _M
	ACN – MeOH (90:10)	t _M
	ACN – MeOH (97:3)	t _M
	ACN – IsopOH (97:3)	t _M
Discovery HS F5	ACN – Buffer de acetatos, 40 mM, pH 4 (95:5)	t _M
	ACN – Buffer de acetatos, 40 mM, pH 4 (99:1)	t _M
Atlantis dC ₁₈	Ácido trifluoracético 40 mM, pH 4 – ACN (99:1)	5.41
	Ácido trifluoracético 20 mM, pH 4 – ACN (99:1)	5.41

En la tabla 6.4, se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis de la acrilamida y en la figura 6.11 un cromatograma obtenido con el método desarrollado.

Tabla 6.4. Condiciones óptimas para el análisis de la acrilamida.

Columna	Atlantis dC ₁₈ (2.1 x 150 mm, 3 μm; Waters)
Fase Móvil	Ácido trifluoroacético (20mM, pH 4) - Acetonitrilo 99:1
Flujo	0.15 mL/min
Temperatura de la columna	40 °C
Volumen de inyección	5 μL
Detección	210 nm

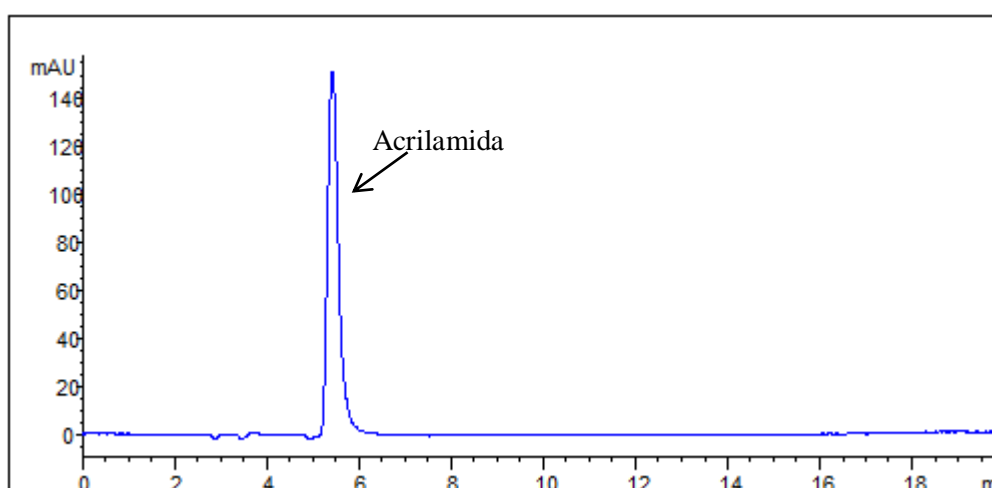


Figura 6.11. Cromatograma obtenido para una solución de la acrilamida (20 μg/mL) con el método desarrollado.

6.3.2. Métodos cromatográficos para el ácido salicílico y la cafeína.

La tabla 6.5, presenta los tiempos de retención obtenidos para el ácido salicílico y la cafeína en las condiciones evaluadas.

Tabla 6.5. Tiempos de retención obtenidos para el ácido salicílico y la cafeína en las diferentes condiciones evaluadas.

Columna	Fase Móvil	Tiempo de retención (min)	Resolución
Atlantis dC₁₈	Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 - ACN (70:30)	AS 19.30 min CAF 19.71 min	0.66
	Buffer de acetatos 40 mM, pH 4 – ACN (75:25)	AS 16.23 min CAF 17.06 min	1.36
	0 a 4 min, 100 % buffer de acetatos 40 mM, pH 4, del min 4 al 14, 70 % buffer de acetatos 40 mM, pH 4 30 % ACN , durante 45 min	AS 19.78 min CAF 21.80 min	2.61
	0 a 4 min, 100 % buffer de acetatos 40 mM, pH 4, del min 4 al 9, 75 % buffer de acetatos 40 mM, pH 4 y 25 % de ACN, durante 37 min	AS 18.16 min CAF 19.07 min	1.78
ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈	Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 – ACN (75:25)	AS 2.57 min CAF 2.82 min	0.41
	Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 – ACN (90:10)	AS 7.03 min CAF. 7.51 min	0.41
	Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 – ACN (95:5)	AS 12.13 min CAF 20.70 min	4.58
	0 a 5 min, 5 % buffer de formiatos 100 mM, pH 4, del min 5 al 10, 10 % buffer de formiatos 100 mM, pH 4 y 90 % de ACN, durante 40 min	AS 11.83 min CAF 16.46 min	4.37
	Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 – ACN (93:7)	AS 9.28 min CAF 11.12 min	1.61
Luna CN *	ACN - Buffer de acetatos 250 mM, pH 5 (95:5)	AS 2.59 min	-
	ACN - Buffer de acetatos 500 mM, pH 5 (95:5)	AS 2.59 min	-

*En esta columna solo se analizó el ácido salicílico.

En la tabla 6.6, se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas óptimas para el análisis del ácido salicílico y la cafeína, y en la figura 6.12 un cromatograma obtenido con el método desarrollado.

Tabla 6.6. Condiciones óptimas para el análisis del ácido salicílico y la cafeína.

Columna	ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2.1 x 150 mm, 5 μ m; Agilent)
Fase Móvil	Buffer de formiatos 100 mM, pH 4 – ACN (93:7)
Flujo	0.2 mL/min
Temperatura de la columna	40 °C
Volumen de inyección	5 μ L
Detección	Cafeína 254 nm Ácido salicílico 280 nm

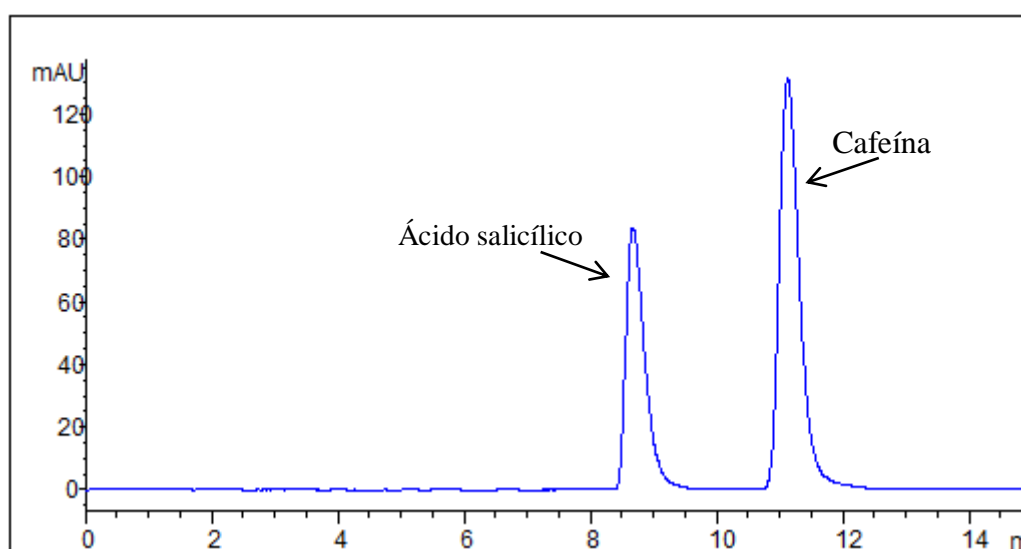


Figura 6.12. Cromatograma obtenido para una solución de ácido salicílico y de cafeína (20 μ g/mL) con el método desarrollado. Las condiciones son las que se presentan en la tabla 6.6.

Durante la optimización de la extracción micelar fue necesario el uso del modo cromatográfico HILIC para el ácido salicílico. En la tabla 6.7, se presenta un resumen de las condiciones cromatográficas óptimas y en la figura 6.13 un cromatograma obtenido con el método desarrollado.

Tabla 6.7. Método cromatográfico óptimo para el ácido salicílico.

Columna	Luna CN (Phenomenex, 2 x 150 mm, 3 μ m)
Fase Móvil	ACN - Buffer de acetatos 500 mM, pH 5 (95:5)
Flujo	0.2 mL/min.
Temperatura de la columna	40 °C
Volumen de inyección	5 μ L
Detección	Ácido salicílico 295 nm

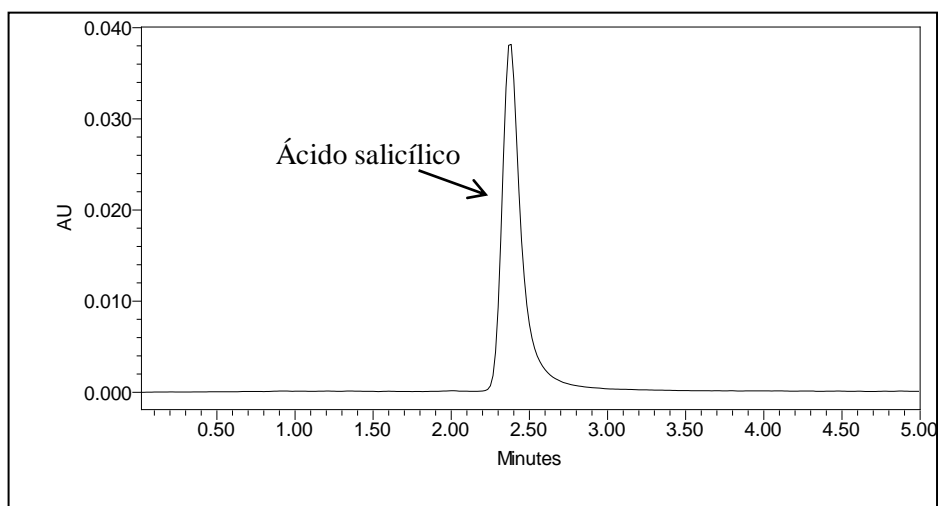


Figura 6.13. Cromatograma obtenido para el ácido salicílico (20 μ g/mL) con el método desarrollado.

6.4. Validación de los métodos cromatográficos.

Los sistemas cromatográfico desarrollados para los tres analitos fueron validados y los resultados se presentan en la tabla 6.8.

En la tabla 6.9, se presentan los resultados de las concentraciones obtenidas para los analitos en presencia de los surfactantes modelo y del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, así como también el valor crítico de “t” (t calculada) de las pruebas T de Student realizadas para la evaluación de la posible interferencia de la presencia de los surfactantes y del líquido iónico en la cuantificación de los analitos.

Tabla 6.8. Validación de los sistemas cromatográficos para los tres analitos.

Parámetro	Resultados			
	Acrilamida	Ácido salicílico	Cafeína	Ácido salicílico (HILIC)
Linealidad: Ecuación de la recta Coeficiente de determinación (r^2)	$y = 97.493x + 192.98$ $r^2 = 0.999$	$y = 21.546x + 0.1889$ $r^2 = 0.999$	$y = 36.656x + 10.078$ $r^2 = 0.999$	$y = 15175.2402x + 10617.1528$ $r^2 = 0.993$
Precisión: % DER de los factores de respuesta:	14.25 %	4.8 %	3.2 %	8.8 %
Exactitud: Coeficiente de determinación (r^2): de la curva de la concentración calculada vs la concentración real Pendiente:	$r^2 = 0.999$ $m = 1.1$	$r^2 = 0.999$ $m = 0.999$	$r^2 = 0.996$ $m = 0.999$	$r^2 = 0.993$ $m = 1.1$
Límite de detección (ppm)	0.45	0.26	0.17	0.32
Límite de cuantificación (ppm)	1.42	0.86	0.58	1.07

Tabla 6.9. Cuantificación de los analitos en presencia de surfactantes y del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

	Acrilamida			Ácido salicílico			Cafeína		
	Concentración (ppm)	Concentración calculada (ppm)	T calculada	Concentración (ppm)	Concentración calculada (ppm)	T calculada	Concentración (ppm)	Concentración calculada (ppm)	T calculada
Analito	25.0	25.37	0.010	15.0	15.02	0.450	15.0	15.12	0.751
Tx-114	25.0	24.73	0.008	15.0	14.75	0.526	15.0	14.93	0.022
SDS	25.0	24.7	0.004	15.0	14.79	0.432	15.0	14.91	0.206
[DMIM][BF ₄]	25.0	24.89	0.012	15.0	15.43	0.396	15.0	15.30	0.137
Analito	80.0	79.0	0.426	40.0	40.04	0.542	40.0	40.19	0.844
Tx-114	80.0	78.9	0.913	40.0	39.92	0.597	40.0	40.04	0.818
SDS	80.0	78.7	0.756	40.0	39.57	0.243	40.0	39.92	0.285
[DMIM][BF ₄]	80.0	78.51	0.671	40.0	40.08	0.410	40.0	40.34	0.901

6.5. Desarrollo de métodos de extracción micelar.

6.5.1. Desarrollo del método de extracción con Tritón Tx-114

Del diseño de experimentos, se obtuvieron las áreas de los picos de cada una de las pruebas y se realizó el análisis de los resultados. En las figuras 6.14, 6.15 y 6.16, se presentan los diagramas de Pareto obtenidos para la acrilamida, para el ácido salicílico y para la cafeína, respectivamente.

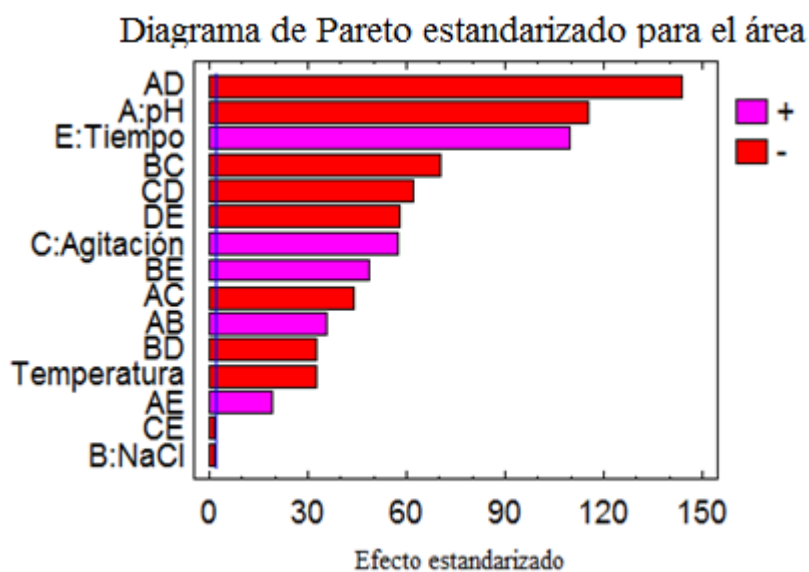


Figura 6.14. Diagrama de Pareto de la acrilamida obtenido del análisis del diseño de experimentos.

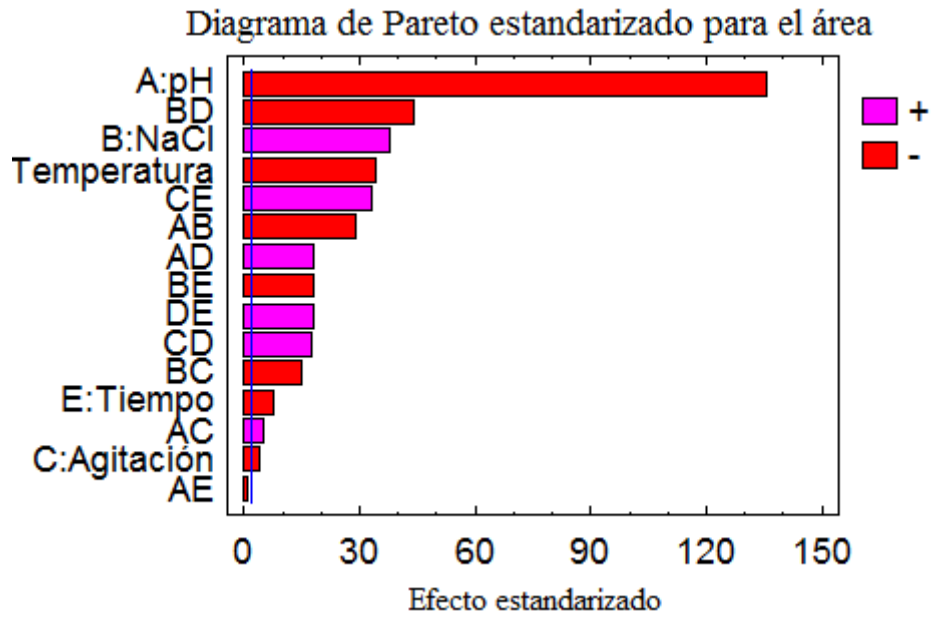


Figura 6.15. Diagrama de Pareto del ácido salicílico obtenido del análisis del diseño de experimentos.

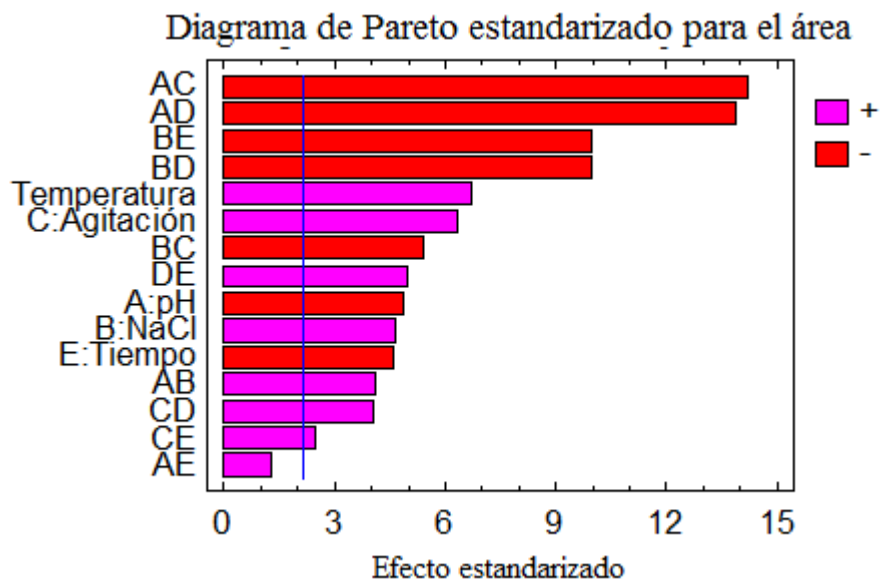


Figura 6.16. Diagrama de Pareto de la acrilamida obtenido del análisis del diseño de experimentos.

Al analizar los diagramas de Pareto, se obtuvieron las condiciones óptimas de extracción para cada uno de los analitos, las cuales se presentan en la tabla 6.10.

Tabla 6.10. Condiciones óptimas para la extracción micelar de los analitos modelo con Tx-114.

Anlito	Condiciones				
	pH	% NaCl	Agitación	Temperatura	Tiempo
Acrilamida	2	5 %	Vórtex	40 °C	30 min
Ácido Salicílico	2	5 %	Ultrasonido	40 °C	10 min
Cafeína	2	5 %	Vórtex	100 °C	10 min

En las figuras 6.17, 6.18 y 6.19 se muestran cromatogramas obtenidos de las extracciones de cada uno de los analitos con el Tritón Tx-114 en las condiciones óptimas.

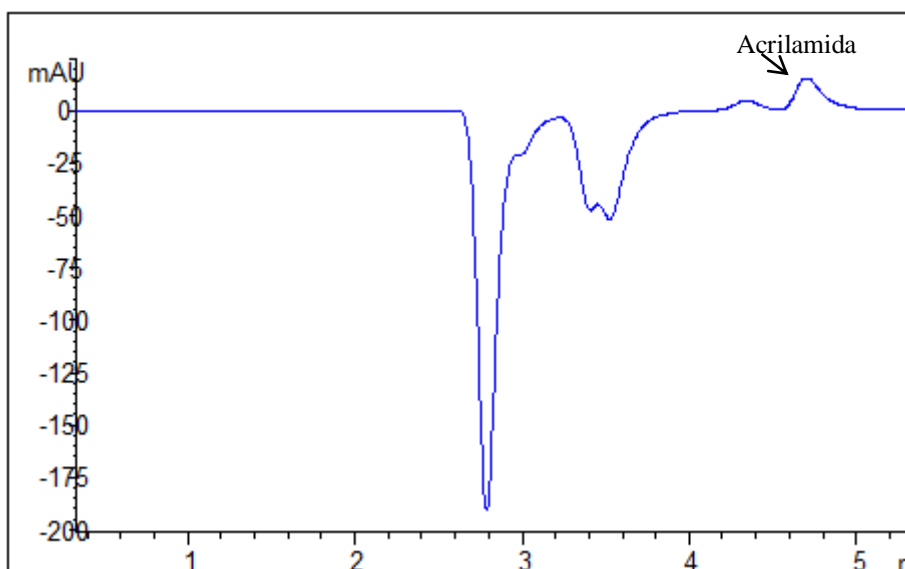


Figura 6.17. Cromatograma obtenido después de la extracción de acrilamida con Tx-114.

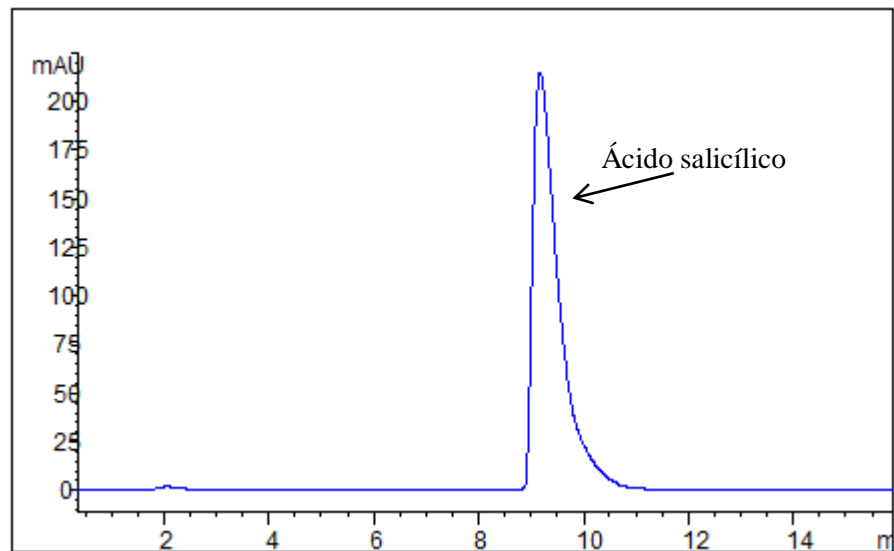


Figura 6.18. Cromatograma obtenido después de la extracción de ácido salicílico con Tx-114.

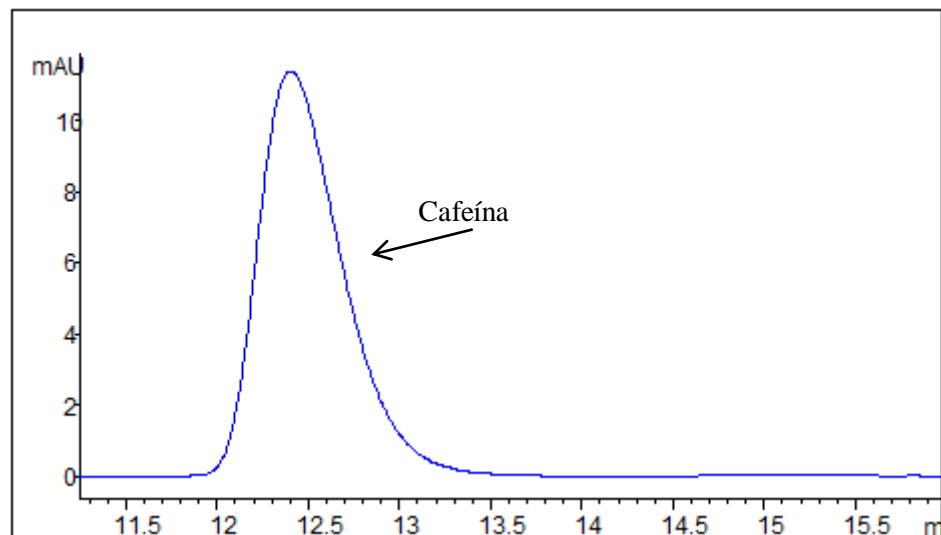


Figura 6.19. Cromatograma obtenido después de la extracción de cafeína con Tx-114.

6.5.2. Desarrollo del método de extracción con dodecil sulfato de sodio.

En los ensayos del diseño de experimentos, utilizando el SDS como medio de extracción, no se pudo obtener la separación entre la fase acuosa y la fase rica en surfactante. Se desarrollaron otras alternativas de extracción, pero se obtuvieron los mismos resultados. Por lo que se decidió no continuar el trabajo con este surfactante.

6.5.3. Desarrollo del método de extracción con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio

En los ensayos del diseño de experimentos, utilizando el líquido iónico como medio de extracción, no se pudo obtener la separación de la fase acuosa de la fase rica en surfactante.

En la tabla 6.11, se presentan las condiciones de extracción para los analitos empleando el líquido iónico como medio extractante.

Tabla 6.11. Condiciones óptimas de extracción para los analitos con el líquido iónico.

Parámetro	Condición
Muestra de cada analito	5 mL de solución acuosa (80 µg/mL)
Volumen de fase extractante	150 µL de líquido iónico
Tipo y tiempo de agitación	Vórtex / 5 min
Velocidad y tiempo de centrifugación	3500 rpm / 10 min
Temperatura de centrifugación	25 °C

De la fase rica en surfactante resultante de las extracciones de la cafeína y de la acrilamida se tomaron 25 μL y se adicionaron 25 μL de agua desionizada y la mezcla se analizó por HPLC. Para el ácido salicílico se tomaron 10 μL y se mezclaron con 90 μL de acetonitrilo para su análisis.

En la figura 6.20, 6.21, 6.22 y 6.24 se presentan cromatogramas de las extracciones de cada uno de los analitos con el líquido iónico evaluado y en la figura 6.23 un cromatograma de una extracción blanco, donde se pueden observar los picos correspondientes al líquido iónico.

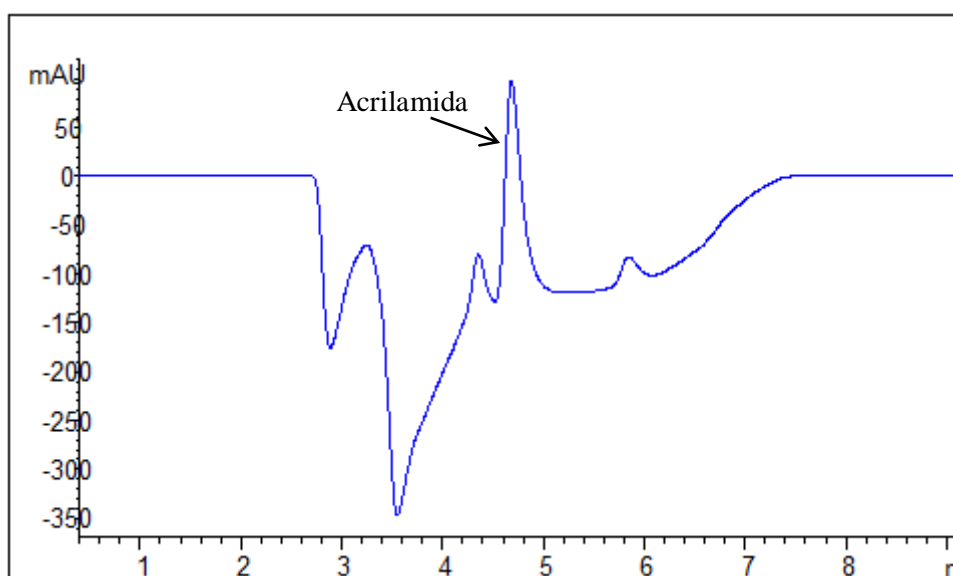


Figura 6.20. Cromatograma obtenido después de la extracción de acrilamida con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

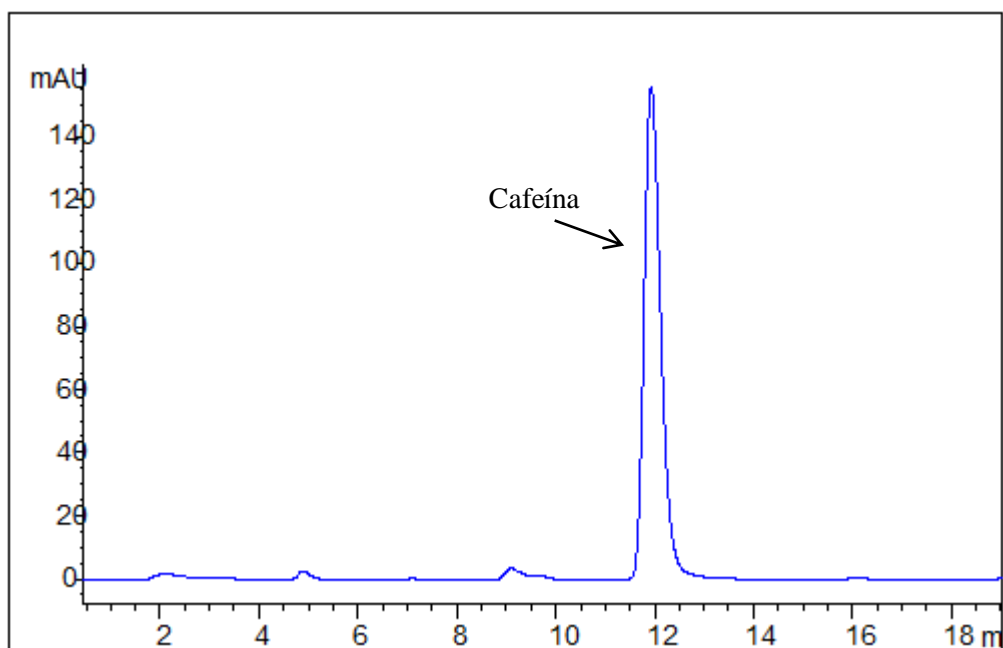


Figura 6.21. Cromatograma obtenido después de la extracción de cafeína con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

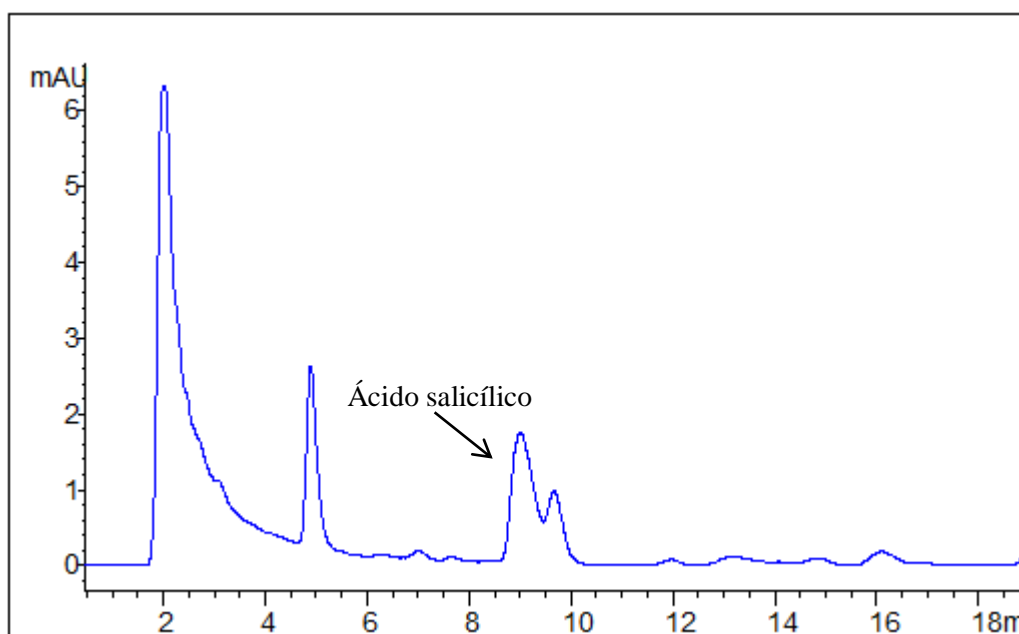


Figura 6.22. Cromatograma obtenido después de la extracción de ácido salicílico con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, utilizando una columna Atlantis dC₁₈.

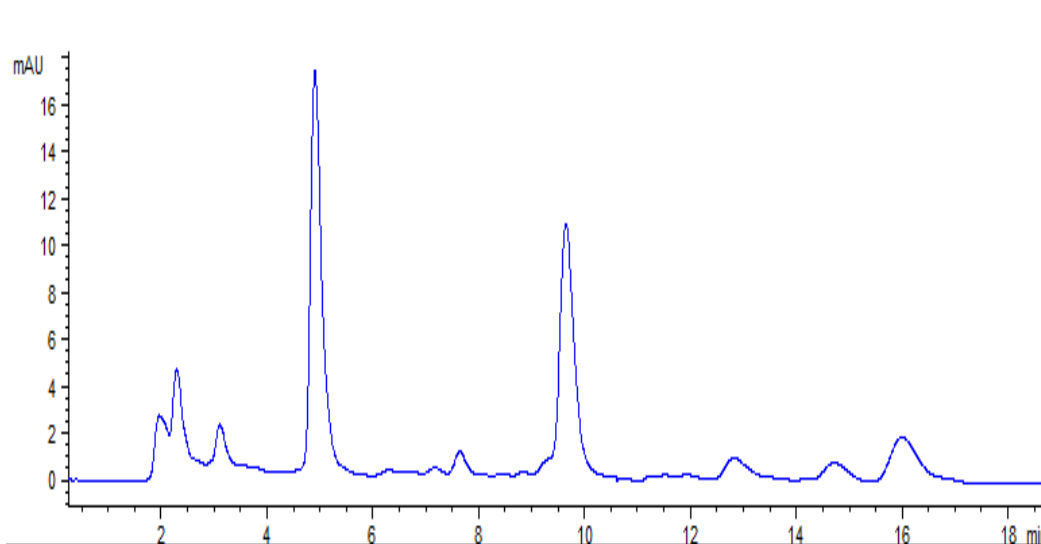


Figura 6.23. Cromatograma obtenido después de la extracción de una muestra blanco con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, utilizando una columna Atlantis dC₁₈.

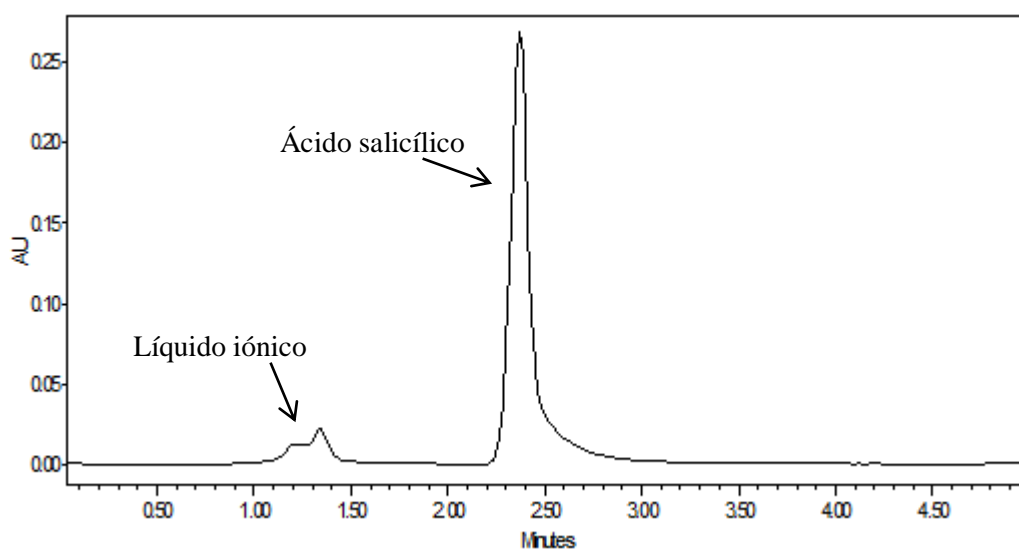


Figura 6.24. Cromatograma obtenido después de la extracción de ácido salicílico con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio utilizando cromatografía de interacciones hidrofílicas.

6.6. Comparación del desempeño del Tritón Tx-114 y Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio en la extracción micelar.

En la tabla 6.12 se presenta el porcentaje de recuperación y la correspondiente desviación estándar relativa en la extracción de cada uno de los analitos con el Tritón Tx-114 y con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

Tabla 6.12. Resultados de la extracción con el Tritón Tx-114 y el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

Analito	Extracción con Tritón Tx-114			Extracción con tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio		
	%	%		%	%	
	Recuperación	DER	FC	Recuperación	DER	FC
Acrilamida	2.69	15.12	-	39.46	2.86	-
Ácido salicílico	409.30	2.0	4.09	120	6.9	1.2
Cafeína	11.49	0.82	-	87.10	3.29	-

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo, fue evaluar el desempeño de los líquidos iónicos en la extracción micelar de compuestos hidrofílicos. Como primera etapa, se caracterizaron los líquidos iónicos de acuerdo a su CMC y tamaño de la micela, con el fin de seleccionar un líquido iónico como medio de extracción micelar. Posteriormente, se implementaron métodos cromatográficos para la identificación y cuantificación de los analitos modelo en presencia de los surfactantes y del líquido iónico seleccionado, estos métodos cromatográficos se emplearon en la optimización de la técnica de extracción micelar.

7.1. Concentración micelar crítica.

La extracción micelar se basa en la formación de micelas en el seno de una solución. Comúnmente en esta técnica se emplean surfactantes como el Tx-114 o el SDS como agentes de extracción, que a bajas concentraciones forman soluciones homogéneas con el agua. Debido a su estructura y carga inherente, algunos líquidos iónicos son estructuralmente similares a los tensoactivos catiónicos convencionales; el anión del líquido iónico constituye la cabeza o grupo hidrófilo mientras el catión contiene una o más colas hidrocarbonadas hidrófobas. Esto contribuye a que algunos líquidos iónicos presenten propiedades similares a los tensoactivos catiónicos, incluyendo la capacidad de formar micelas, ellos constituyen una nueva área de desarrollo de surfactantes sobre todo por el número tan limitado de tensoactivos catiónicos comunes (Mun J. et al. 2011; Guzmán N. et al. 2010).

En la literatura se ha reportado la capacidad de algunos líquidos iónicos de formar micelas. En particular, se sabe que la familia de los 1-alkil-3-metilimidazolio en los que la cadena alquílica tiene más de 8 carbonos, la agregación es espontánea (Geng F. et al. 2010; Dong B. et al. 2007). Considerando los antecedentes mencionados, en este trabajo se estudiaron 5 líquidos iónicos, formados por la combinación de los cationes 1-decil-3-metilimidazolio, 1-dodecil-3-metilimidazolio y 1-hexadecil-3-metilimidazolio con los aniones cloruro y tetrafluoroborato.

La concentración micelar crítica (CMC) es un parámetro importante en la caracterización de la auto-agregación de compuestos anfifílicos. Cuando los surfactantes se disuelven en agua, al superar cierta concentración, conocida como concentración micelar crítica, tienden a formar espontáneamente agregados supramoleculares llamados micelas (Domínguez A. et al. 1997). Existen distintas técnicas para determinar la CMC y se basan en la observación de cambios en propiedades físicas o químicas de las soluciones de tensoactivo como la medición de la tensión superficial, que disminuye conforme se aumenta la concentración del surfactante en la solución; la determinación de espectros UV-Vis de la benzoin acetona; basada en el tautomerismo ceto-enólico de esta molécula, que al momento de agregar el surfactante predomina la forma enólica (la estabiliza) por el carácter hidrofóbico del medio, lo que hace que se incremente la absorción a 312 nm y disminuye la de 250 nm, la CMC corresponde al punto en donde se observa esta variación en las dos longitudes de onda, otra manera de conocer la CMC es por la medida de cambios en los espectros de emisión y/o excitación del pireno y, para los tensoactivos iónicos, por la medición de la conductividad eléctrica de soluciones de concentraciones conocidas (Furton K. et al. 1993).

Aunque en la literatura es posible encontrar la CMC para algunos líquidos iónicos, en la mayoría de los casos los valores reportados para un mismo compuesto difieren significativamente. El valor de la CMC depende de diversos factores, tales como la estructura del líquido iónico, la forma en que se constituyen los agregados y las características del medio en el cual se solubiliza el líquido iónico. Por otra parte, diversos autores mencionan que en soluciones de líquidos iónicos a concentraciones por debajo de la CMC los agregados micelares pueden existir, pero que a

concentraciones más elevadas es contundente su formación. Cuando se trabaja con líquidos iónicos con aniones muy voluminosos a altas concentraciones se disminuye su solubilidad lo que hace que termodinámicamente en el sistema se favorezca la separación de fases en vez de formar las micelas (Mun J. et al. 2011, Guzmán N. et al. 2010). Debido a que la CMC es el punto de partida para el desarrollo de métodos de extracción basados en la formación de micelas, en este trabajo se realizó la determinación de la CMC para una serie de líquidos iónicos del grupo de los 1-alkuil-3-metilimidazolios en soluciones acuosas.

En primera instancia se intentó determinar la CMC por fluorescencia, usando como sonda fluorescente al pireno. La fluorescencia del pireno dependerá del solvente en donde se encuentre disuelto, en solventes polares como el agua, la fluorescencia es relativamente nula, debido a su baja solubilidad (2-3 μM) en este solvente y a que en solventes polares las interacciones casi inexistentes con el soluto, hacen que los anillos bencénicos del pireno no se encuentren favorecidos para llevar a cabo la fluorescencia por la conformación que adquiere la molécula que hace que exista un impedimento en su excitación y posterior emisión (Kalyanasundaram K. et al, 1977). En medios no polares, este compuesto presenta en su espectro de emisión dos bandas principales a 374 y 383 nm, mientras que en el espectro de excitación estas bandas se presentan a 332 y 335 nm. En solución acuosa, la relación de intensidades de las bandas es pequeña tanto para la emisión como para la excitación. Pero, cuando en este medio se aumenta la concentración de una sustancia no polar, como por ejemplo los surfactantes, estos forman micelas, lo que hace que el medio se torne más hidrófobo, favoreciendo la excitación y la emisión del pireno por lo que la relación de intensidades (excitación/emisión) aumenta en ambos espectros, debido a

que el pireno se desplaza hacia el medio hidrófobo de la micela, lo que hace que el impedimento conformacional existente en el medio polar se resuelva y aumente su rendimiento cuántico de fluorescencia. Como control para esta prueba se realizó la determinación de la CMC del Tritón Tx-114, ya que es un surfactante no iónico ampliamente conocido y bien caracterizado. En la figura 6.1, se presentan los espectros de excitación y de emisión del pireno en presencia del Tx-114, donde se puede ver que la intensidad aumenta en ambos espectros conforme se incrementa la concentración del surfactante. En las figuras 6.2 y 6.3, se presentan la relación de intensidades de las bandas de emisión (I_{374em}/I_{383em}) así como la relación de intensidades de las bandas de excitación (I_{332ex}/I_{335ex}), ambas en función del logaritmo de la concentración del Tx-114. La CMC obtenida para este surfactante fue de 0.3 mM, valor que coincide con los reportados en la literatura (0.2 a 0.35 mM) (Thomas A. et al. 2007). Al trabajar con los líquidos iónicos se observó el comportamiento contrario al esperado, ya que al incrementar la concentración la intensidad disminuía, tanto para los espectros de emisión como de excitación, como se puede observar en la figura 6.4. Este fenómeno se debe probablemente a que la naturaleza salina de los líquidos iónicos disminuyen la solubilidad del pireno, haciendo que sus moléculas se compacten, los cuatro anillos del benceno forman dímeros y eso impide que interactúen con el medio micelar hidrofóbico, lo que evita su excitación y posterior emisión. Además, los líquidos iónicos de la serie de los metilimidazolio tienen fluorescencia intrínseca, que aumenta de acuerdo al anión que los conforma, como el cloruro, y que dependiendo de la cadena alquílica, al agregarse forman estructuras muy simétricas, aumentando la densidad de la región hidrofóbica lo que favorece su excitación y por lo tanto la intensidad de fluorescencia. Este fenómeno se observó desde bajas concentraciones lo que dificultó

observar diferencias en la fluorescencia de la de la sonda (pireno) y del líquido iónico (Pierola I. et al. 2012).

Debido a los problemas encontrados para establecer la CMC de los líquidos iónicos por el método de fluorescencia, se decidió realizar la determinación por conductimetría, una técnica ampliamente utilizada para surfactantes iónicos. Como se mencionó anteriormente, la micelización de un sistema hace que ocurran cambios bruscos en él, registrándose variaciones en algunas de las propiedades físicoquímicas del medio. En las disoluciones de tensoactivos iónicos, cuando comienza la asociación micelar se produce una disminución en el cambio de la conductividad eléctrica de dicha disolución. Este cambio de comportamiento se debe a que la micela no libera todos los contraiones al seno de la disolución como lo hace el monómero de tensoactivo libre, sino solamente un 20 o 30 %, según su grado de disociación y esto permite calcular ciertos parámetros como la CMC. Este fenómeno es fácilmente observable al representar gráficamente la variación de la conductividad de las soluciones en función de la concentración del surfactante, ya que se produce un cambio en la pendiente de la recta resultante. En este caso se utilizó como control al dodecilsulfato de sodio (SDS) y se obtuvo un valor de CMC de 7.24 mM (figura 6.5). El valor de CMC obtenido para el SDS coincide con el intervalo de 7-10 mM reportado en la bibliografía (Dominguez A. et al, 1997). El comportamiento de los líquidos iónicos fue similar al del surfactante control. A manera de ejemplo en la figura 6.6, se presenta la gráfica obtenida para el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, donde se puede ver la intersección de las rectas resultantes antes y después del cambio en la pendiente de la curva de la variación de la conductividad en función de la concentración. En la tabla 6.1, se presentan los valores resultantes de

CMC de los líquidos iónicos evaluados y los valores reportados en la literatura. En general, las CMC obtenidas en este trabajo para los líquidos iónicos de la serie de los 3-metilimidazolios son cercanas a los límites bajos del intervalo reportado en la literatura (Pino V. et al. 2012); y las diferencias observadas se atribuyen a la presencia de impurezas que pueden afectar la micelización. En el caso del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, la CMC encontrada fue de 11.19 mM y a nuestro entender es la primera vez que se reporta.

Los líquidos iónicos evaluados contenían aniones cloruro y tetrafluoroborato. De los cloruros, el que presentó la mayor CMC fue el cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio con un valor de 12.12 mM, luego el cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio con una CMC de 8.87 mM y por último el cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio con una CMC de 1.13 mM. Mientras que para los líquidos iónicos con el anión tetrafluoroborato el de mayor CMC fue el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio con una CMC de 11.19 mM y el tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio con una CMC de 4.69 mM. En cuanto a la influencia del catión, el líquido iónico que presentaba el 1-dodecil-3-metilimidazolio fue el de mayor CMC con un valor de 12.12 mM, después los que estaban conformados por el 1-decil-3-metilimidazolio con una CMC de 11.19 mM y 8.87 mM, luego uno con el 1-dodecil-3-metilimidazolio con una CMC de 4.69 mM y por último el del catión 1-hexadecil-3-metilimidazolio con la menor CMC de 1.13 mM. En la literatura se encontró reportado que a medida que aumenta la longitud de la cadena alquílica, disminuye el valor de CMC debido a que el componente hidrofóbico del catión se hace cada vez más grande y se necesita una menor concentración del compuesto para que se dé la formación de micelas, además que el volumen del anión también tiene influencia en

la agregación ya que a mayor volumen menor CMC, esto debido a que los aniones voluminosos son más fácilmente adsorbidos sobre la superficie de los agregados, reduciendo las repulsiones electrostáticas entre los cationes y facilitando la agregación. Los resultados encontrados concuerdan con lo mencionado en este párrafo, ya que el líquido iónico con mayor CMC fue aquel cuyo anión es menos voluminoso (cloruro) y el de menor CMC el que posee la cadena alquílica de mayor tamaño (hexadecil) (Guzmán N. et al. 2010; Inoue T et al. 2011).

7.2. Tamaño de Micela

Las micelas se forman cuando el surfactante supera cierta concentración, llamada Concentración Micelar Crítica (CMC). Las soluciones en las cuales se determinó el tamaño de las micelas fueron aquellas en las que ligeramente se sobrepasaba la CMC, como lo muestra la tabla 5.2, para garantizar la formación de estos agregados. Par el desarrollo de esta prueba se utilizó el espectrofotómetro de correlación fotónica, dicha técnica se basa en hacer pasar un rayo de luz por las partículas en solución. A partir de las fluctuaciones de la luz cuando las partículas se atraviesan, se determina la distribución de tamaños y se hace un promedio, entonces cuanto menor es la homogeneidad de las partículas en la solución hay mayores fluctuaciones y es más difícil realizar la determinación.

El tamaño promedio de micela obtenido para los líquidos iónicos y los surfactantes se presentan en la tabla 6.2. Como puede observarse las micelas del Tx-114 fueron las de mayor tamaño (922.36 nm), seguidas de las del SDS (788.22 nm). En cuanto a los líquidos iónicos, el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio presentó el mayor tamaño de la micela (619.6 nm), seguido del tetrafluoroborato de 1-dodecil-3-metilimidazolio (199.0 nm), después el cloruro de 1-decil-3-metilimidazolio (177.3 nm), luego el cloruro de 1-hexadecil-3-metilimidazolio (104.6 nm) y por último el cloruro de 1-dodecil-3-metilimidazolio (4.02 nm). Es importante destacar que no se encontró ningún reporte en la bibliografía sobre el tamaño de las micelas de los líquidos iónicos evaluados.

Los resultados encontrados para los surfactantes control concuerdan con lo reportado en cuanto a que las micelas de los surfactantes no iónicos, en este caso el Tx-114, presentan mayor tamaño de micela con respecto a los iónicos, como el SDS, debido principalmente a la ausencia de interacciones electrostáticas que desestabilicen a las micelas (Streletzky K. et al. 1995). En cuanto al tamaño de micela de los líquidos iónicos se observa un amplio rango, ya que la agregación de los líquidos iónicos dependerá de la longitud de la cadena alquílica así como del tipo de anión. Está reportado que tendrán mayor tamaño aquellas micelas que estén formadas por líquidos iónicos con aniones voluminosos (Guzmán N. et al. 2010), lo que se puede confirmar con los resultados encontrados en los que se puede ver que los líquidos iónicos con el anión más voluminoso (tetrafluoroborato) fueron los que formaron micelas de mayor tamaño en comparación con aquellos que contienen al cloruro como anión.

En la figura 6.8, se presenta una micrografía de las micelas del Tx-114 (0.5 mM) y en la figura 6. una micrografía de las micelas del SDS (15 mM), como se puede observar en las micrografías, las micelas del Tx-114 son las más grandes, pudiéndose ver que las micelas no son uniformes en ningún surfactante. Al observar las soluciones de los diferentes líquidos iónicos, no fue posible observar ninguna estructura con los aumentos con lo que cuenta el microscopio, se cree que se debe al tamaño nanométrico de las micelas de los líquidos iónicos y al bajo aumento del microscopio utilizado. Solamente fue posible observar las micelas del líquido iónico que en la espectroscopía de correlación fotónica demostró tener las estructuras micelares de mayor tamaño, el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, la figura 6.10 es una microfotografía de las micelas de este líquido iónico.

Debido a que las micelas del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolio fueron las más grandes y que además fueron las únicas que se pudieron observar por microscopía óptica, fue que se eligió a este líquido iónico como el medio extractante a evaluar en la extracción micelar.

7.3. Desarrollo de métodos de análisis cromatográfico.

7.3.1. Métodos cromatográficos para la acrilamida.

Muchos de los métodos reportados para el análisis de la acrilamida, emplean columnas de fase inversa C_{18} y fases móviles con un contenido acuoso muy alto, aunque algunos trabajos publicados se basan en el uso de la cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC). En este trabajo se tomaron como referencia algunos de estos métodos, evaluándose en la primera etapa, sin embargo con ninguno fue posible obtener una retención adecuada de la acrilamida y por ello fue necesario buscar alternativas.

El problema de retención de la acrilamida se debe a que es una sustancia altamente hidrofílica ($\log P_{o/w} -0.67$), su afinidad por fases no polares como la C_{18} es prácticamente nula, aún trabajando con fases móviles con baja fuerza de elución, lo que hace difícil retenerla.

El comportamiento de los líquidos iónicos frente a las columnas comunes de fase inversa es un poco más complejo, ya que están formados por iones y por lo tanto tienen carga permanente, lo que provoca que tengan baja afinidad por las fases no polares. Aunque, por otro lado, los cationes que los forman son compuestos

orgánicos que en general tienen un gran tamaño, como los imidazolios que pueden contribuir a su retención en fases no polares. Con el fin de tener un método cromatográfico que permitiera analizar a la acrilamida en presencia de surfactantes comunes como el SDS y el Tritón X-114 y del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolio, se evaluaron diferentes columnas de fase inversa (dC₁₈ y HS F5) y de fase mixta (fase inversa-intercambio catiónico débil, Primesep S) trabajando en modo convencional, de formación de pares iónicos y HILIC.

La columna Atlantis dC₁₈ está preparada para trabajar con contenidos acuosos muy altos y como se puede ver en la tabla 6.3, inicialmente se probó con una mezcla de agua acetonitrilo 99:1 como fase móvil, sin embargo en estas condiciones la acrilamida no se retuvo. Con el fin de disminuir la fuerza de elución, se eliminó totalmente el solvente orgánico de la fase y se evaluaron agua y buffer de acetatos (40 mM y 20 mM, pH 4) al 100%, pero no se observó ninguna mejora y con estas fases la acrilamida continuaba eluyendo con el tiempo muerto.

Dados los resultados mencionados, se optó por evaluar la separación utilizando cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC). Este tipo de cromatografía, es una alternativa para la separación de compuestos polares. La fase estacionaria es un material polar que puede ser la sílice pura o modificada y la fase móvil es un solvente orgánico con un contenido bajo de un solvente polar. La separación se da por la partición de los analitos entre una pequeña capa de solvente polar que se forma en la superficie de la fase estacionaria y la fase móvil (Guo Y. et al. 2011, L.N. van Nuijs A. et al. 2011, Buszewski B. et al. 2012).

En la tabla 6.3, se presentan los resultados obtenidos en HILIC y como se puede ver la separación de la acrilamida no fue adecuada, ya que ni cambiando la fase estacionaria ni la fase móvil, fue posible retener a la acrilamida.

Dados los escasos resultados logrados con las pruebas anteriores, se evaluó el uso de una columna Atlantis dC₁₈ pero con una fase móvil compuesta por 99 % de solución acuosa de ácido trifluoroacético (40mM, pH 4) y 1 % de acetonitrilo. Bajo estas condiciones la acrilamida presenta un tiempo de retención de 5.41 min y está separada aproximadamente 1.5 min del tiempo muerto. En la tabla 6.3, se presentan las condiciones evaluadas, sin embargo, en estas condiciones los cromatogramas presentaban mucho ruido. Por ello, se decidió disminuir la concentración del ácido trifluoroacético a 20 mM (pH 4) con lo que se eliminó el problema. En la tabla 6.4 se presenta un resumen con las condiciones óptimas establecidas para el análisis de la acrilamida y en la figura 6.11 un cromatograma obtenido con este método.

7.3.2. Métodos cromatográficos para el ácido salicílico y la cafeína.

Muchos de los métodos reportados para la cuantificación de cafeína y de ácido salicílico emplean columnas de fase inversa C₁₈. En el desarrollo de estas pruebas se tomaron como referencia algunos métodos anteriormente implementados en nuestro laboratorio (Garza M. et al, 2012). Con el fin de tener un método cromatográfico que permitiera analizar a la cafeína y al ácido salicílico de manera simultánea, en presencia de surfactantes comunes como el SDS y el Tritón X-114 y del líquidos iónico tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, se evaluaron diferentes columnas de fase inversa (dC₁₈ y XDB-C₁₈) trabajando en modo convencional.

Inicialmente en el desarrollo cromatográfico se pretendía separar a las tres analito en la misma columna es por eso que se inició el trabajo con las condiciones evaluadas. La columna Atlantis dC18 proporciona mayor retención para compuestos polares, en comparación con una columna de fase inversa convencional, ya que está preparada para trabajar con fases móviles con contenidos acuosos muy altos. Las condiciones de prueba y los resultados obtenidos con esta columna se presentan en la tabla 6.5. Como puede observarse, en esta columna los analitos pudieron separarse adecuadamente, como lo demuestran las resoluciones que se obtuvieron ($R_s = 2.61$ y 1.78), pero con tiempos de retención muy prolongados, esto debido a que como se ensayaron juntos con la acrilamida, que para la retención de esta molécula no podíamos utilizar una cantidad mayor de fase orgánica.

Debido a los resultados anteriores, se continuó el trabajo con una columna ZORBAX Eclipse XDB-C₁₈, esta columna está diseñada para separar compuestos ácidos, básicos y neutros, con muy buenas resoluciones, pudiendo trabajar en un amplio rango de pH, por lo tanto debido a los valores de pKa de los analitos a separar, esta columna se considera una buena opción para su separación. En la tabla 6.5, se muestran las condiciones evaluadas para esta columna y los resultados obtenidos. Como puede verse, con esta columna se obtuvieron en general menores tiempos de retención, el uso de una mezcla de buffer de formiatos 100 mM, pH 4 – ACN 93:7 como fase móvil, permitió tener una separación adecuada en un tiempo razonable. En la tabla 6.6 se presentan las condiciones óptimas establecidas para el análisis de ambos compuestos y en la figura 6.12 un cromatograma obtenido para los dos analitos con este método.

Cuando se realizó el análisis del ácido salicílico proveniente de las extracciones con el líquido iónico, se observó que en el cromatograma junto con el pico del ácido aparecía un pico del líquido iónico del cual no fue posible la separación (figura 6.22 y 6.23) Este problema no fue detectado durante la optimización de los métodos cromatográficos, ya que la concentración a la cual se trabajó el líquido iónico era muy inferior a la utilizada en el método de extracción. Por ello, fue necesario implementar otro método cromatográfico para el análisis del ácido salicílico a partir de las extracciones con el líquido iónico. Se utilizó una columna Luna CN, en modo HILIC y las condiciones evaluadas se presentan en la tabla 6.5. Como puede observarse en el cromatograma de la figura 6.24 se logró la retención del analito y la separación de la señal del líquido iónico. Sin embargo, debido a que el pico se coleaba un poco, se decidió aumentar la fuerza iónica de la fase móvil de acetonitrilo

con un buffer de acetatos 500 mM, pH 5 (95:5), con lo cual se mejoró la separación.

Las condiciones óptimas del método se muestran en la tabla 6.7.

7.4. Validación de los métodos cromatográficos.

En la tabla 6.8, se presentan los resultados obtenidos durante la validación de los métodos cromatográficos desarrollados.

Para los tres analitos, los métodos desarrollados fueron lineales en un intervalo de 5 a 80 $\mu\text{g/mL}$. Se obtuvieron coeficientes de correlación y de determinación mayores a 0.99. El rango lineal está dentro de los rangos reportados por la literatura para la cuantificación de estos analitos analizados por HPLC con detector UV-Vis (Mullangi R. et al. 2012; Oracz J. et al. 2011; Srdjenovic B. et al. 2008; Zhang Y. et al. 2007; Sawyer M. et al. 2003).

La precisión fue evaluada como el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de los factores de respuesta para los tres analitos. Para la acrilamida se obtuvo un 14.25 % de DER, para el ácido salicílico en fase inversa un 4.8 % y en modo HILIC un 8.8 %, mientras que para la cafeína un 3.2% estos porcentajes están dentro de lo reportado en la bibliografía métodos (Mullangi R. et al. 2012; Oracz J. et al. 2011; Srdjenovic B. et al. 2008; Zhang Y. et al. 2007; Sawyer M. et al. 2003). El valor relativamente alto obtenido para la acrilamida, se atribuye al ruido que presentan los cromatogramas, debido a la longitud de onda de la detección del analito, que hace que se dificulte la integración de los picos cromatográficos haciendo que exista más variación y estos resultados son superiores a los reportados en otros.

La exactitud se evaluó mediante la correlación de la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real, obteniendo en todos los casos la ecuación de la recta resultante y haciendo la evaluación con el valor de la pendiente, la cual en todo los casos fue \simeq a 1.

Los límites de cuantificación y de detección de este método para la acrilamida fueron de 1.42 $\mu\text{g/mL}$ y de 0.45 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, estos valores son superiores a los obtenidos en el método desarrollado anteriormente en nuestro laboratorio (Granados G. 2008), pero hay que destacar que en el método aquí desarrollado se evaluó el desempeño de los líquidos iónicos como medios de extracción, a diferencia del método desarrollado por Granados G., que hace uso de la SPE lo cual contribuye a tener los límites de detección y de cuantificación más bajos. Para el ácido salicílico se obtuvo un límite de detección de 0.26 $\mu\text{g/mL}$ y un límite de cuantificación de 0.86 $\mu\text{g/mL}$ y en método HILIC los límites encontrados fueron ligeramente superiores (LD: 0.32 $\mu\text{g/mL}$ y LC: 1.07 $\mu\text{g/mL}$), ambos resultados son superiores a los encontrados en la literatura, en los que hacen uso de procedimientos de preconcentración como la SPE y emplean detectores de espectrometría de masas, lo cual hace que se tengan métodos más sensibles (Gracia-Lor E. et al. 2009, Mullangi R. et al. 2012). Para la cafeína el límite de cuantificación fue de 0.58 $\mu\text{g/mL}$ y el de detección de 0.17 $\mu\text{g/mL}$, dichos valores se encuentran entre el rango de los reportados que van desde 0.07 $\mu\text{g/mL}$ a 14 $\mu\text{g/mL}$ para el límite de detección y de 0.19 $\mu\text{g/mL}$ a 4.2 $\mu\text{g/mL}$ para los límites de cuantificación, los rangos tan amplios se deben a la gran diversidad de matrices evaluadas, lo que hace que se apliquen una gran cantidad de procedimientos para la preparación de muestras a analizar, estos

resultados fueron con detectores UV-Vis y DAD (Srdjenovic B. et al. 2008; Risner C. et al. 2008; Rostagno M. et a. 2011).

Finalmente, se evaluó las posibles interferencias por la presencia de los medios extractantes en la cuantificación de cada uno de los analitos. Para ello se hicieron análisis por triplicado de estándares acuosos de acrilamida a dos niveles de concentración 25 y 80 $\mu\text{g/mL}$, de cafeína y de ácido salicílico a niveles de 15 y 40 $\mu\text{g/mL}$. Las determinaciones se realizaron en presencia del Tx-114, del SDS y del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio a un nivel de 40 $\mu\text{g/mL}$. Los datos fueron sometidos a una prueba T de Student de dos colas con un nivel de confianza del 95 %. Los resultados de las concentraciones calculadas y de la prueba estadística se encuentran en la tabla 6.9 para cada uno de los analitos, estos resultados nos muestran que no hubo diferencia estadísticamente significativa en la cuantificación de los analitos en la presencia de los surfactantes y del líquido iónico en las concentraciones evaluadas.

7.5. Desarrollo de métodos de extracción micelar.

El análisis de los resultados del diseño de experimentos permitió establecer las condiciones óptimas para la extracción de los tres analitos utilizando Tx-114. En las figuras 6.13, 6.14 y 6.15 se presentan los diagramas de Pareto obtenidos y en la tabla 6.10 las condiciones óptimas de extracción para cada uno de los analitos. Como puede verse en los diagramas, prácticamente todas las variables tuvieron un efecto significativo sobre la respuesta, lo mismo que las interacciones evaluadas. Esto se hace evidente debido a que en los diagramas de Pareto se representan los factores evaluados y sus combinaciones en barras, y aquellos que influyen en la respuesta son los que sobrepasan la línea que atraviesa el gráfico, dicha línea representa el valor crítico de F en el análisis de varianzas (ANOVA) realizado con los datos, es por eso que aquellas barras que sobrepasen esa línea representaran en su valor una diferencia estadísticamente significativa en la respuesta obtenida. El pH óptimo para los tres analitos resultó ser el del nivel bajo, el pH 2. Si bien se esperaría que por lo menos este valor de pH no fuese el indicado para la cafeína, ya que por su pK_a a este pH estaría protonada y por ello tendría mayor afinidad por la solución acuosa. Por otro lado, a este pH el ácido salicílico se encuentra en su forma molecular, lo que favorece su afinidad a la fase rica en surfactante, mientras que para la acrilamida el pH no es importante, debido a que no tiene grupos ionizables. Para los tres analitos el alto contenido de sales (5 % de NaCl) favoreció su extracción, ya que la presencia de sales favorece su desplazamiento hacia la fase rica en surfactante. En cuanto al tipo de agitación, para el ácido salicílico funcionó mejor el ultrasonido, mientras que para la cafeína y la acrilamida resultó mejor la agitación con vórtex. La temperatura óptima de extracción fue de 40 °C para la acrilamida y el ácido salicílico, mientras

que para la cafeína fue de 100 °C. Para la cafeína y el ácido salicílico un tiempo de 10 min fue suficiente para tener una buena extracción, mientras que la acrilamida requirió un periodo mayor (30 min). De acuerdo al valor de $\log K_{o/w}$ el ácido salicílico es el compuesto más hidrofóbico de los tres analitos incluidos en el estudio y probablemente por ello sus condiciones de extracción, resultaron ser las de menor tiempo, más baja temperatura y una agitación más suave. Las figuras 6.16, 6.17 y 6.18, muestran cromatogramas de los analitos extraídos con el Tx-114 en las condiciones óptimas para cada uno de ellos.

Para el SDS no fue posible lograr la separación de fases con ninguno de los experimentos planteados en el diseño. Se realizaron distintas pruebas e incluso se implementaron procedimientos de extracción publicados (Merino F. et al, 2002; Sicilia D. et al, 2002) pero ninguna de las pruebas dio resultado y no se logró la separación de fases. Dado que el método con SDS se desarrolló solo con el fin de comparar su desempeño con el de los líquidos iónicos, se decidió no continuar trabajando con él.

Al realizar las pruebas planteadas en el diseño de experimentos para la extracción de los analitos con el tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, no fue posible lograr la separación de las fases. Para lograr la separación de fases se realizaron distintas pruebas y se encontró que sin adicionar sales y sin calentamiento era posible formar las dos fases. Los resultados encontrados en la adición del NaCl, se atribuyen a que la presencia de sales pueden dar lugar a un intercambio de iones que aumenta la solubilidad del líquido iónico en el agua, lo cual sucede también al

aumentar la temperatura. En la tabla 6.11 se muestran las condiciones de extracción óptimas utilizando el líquido iónico como fase extractante y en las figuras 6.19, 6.20, 6.21 y 6.22, se muestran cromatogramas obtenidos para la extracción de los 3 analitos de las soluciones acuosas.

7.6. Comparación del desempeño del Tritón Tx-114 y Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio en la extracción micelar.

Para comparar el desempeño de los medios extractantes en los procedimientos desarrollados para los analitos modelo, se realizaron extracciones por triplicado de soluciones acuosas a un nivel de 80 µg/mL de cada uno de ellos, para obtener la eficiencia y la precisión de los métodos desarrollados.

En la tabla 6.12, se muestran los porcentajes de recuperación y los porcentajes de desviación estándar relativa que se obtuvieron para los tres analitos en las extracciones con los extractantes evaluados en las condiciones óptimas.

El Tx-114 permitió extraer a los tres analitos, a la acrilamida con una eficiencia del 2.69 %, a la cafeína con un 11.49 % y al ácido salicílico con una eficiencia del 409.3 %, concentrándolo alrededor de 4 veces. Con el líquido iónico también fue posible extraer a los tres analitos, pero a la acrilamida y a la cafeína con una eficiencia superior con respecto a la obtenida con el Tx-114 las cuales fue del 39.46 % y del 87.10 % respectivamente. En cuanto al ácido salicílico se obtuvo una eficiencia del 120 %, por lo que para este compuesto fue el único para el cual resultó mejor la extracción con Tx-114.

La mayor capacidad del Tx-114 para extraer y concentrar al ácido salicílico se atribuye a que este compuesto es el más hidrofóbico en comparación con los otros

dos analitos, por lo que tiende a desplazarse a la región más hidrofóbica del sistema como lo es la región rica en surfactante, mientras que la cafeína y la acrilamida son sustancias más hidrofílicas y tienen una alta afinidad por la fase acuosa.

Por otra parte, el hecho de que el líquido iónico hubiese presentado mayor eficiencia para la extracción de los analitos para los cuales el Tx-114 mostró menor eficiencia en la extracción, se debe principalmente a las características estructurales del líquido iónico que al formar las micelas hace que se produzcan una serie de interacciones como las electrostáticas o los puentes de hidrógeno que le otorgan una mayor polaridad favoreciendo su interacción con los analitos más polares y por lo tanto favoreciendo su extracción en un mayor nivel.

En cuanto a la precisión de las extracciones, las recuperaciones con el Tx-114 para la acrilamida fueron las que presentaron una mayor desviación estándar relativa (15.12 %) y la menor DER la presentó la cafeína (0.82 %). Por otra parte, en las extracciones con el líquido iónico, las del ácido salicílico fueron las que resultaron con una mayor DER (6.90 %) y las de menor DER fueron las extracciones de la acrilamida (2.86 %). En general el método desarrollado con el líquido iónico resultó ser mejor, ya que se pudo extraer a los tres analitos con buenas recuperaciones sobre todo las de la cafeína y de la acrilamida en las que fue muy superior a la eficiencia que presentó el Tx-114 para las mismas moléculas, aunque al ácido salicílico solo lo concentró una vez.

Actualmente los diferentes métodos por los cuales se lleva a cabo la determinación de la acrilamida, hacen uso de la extracción en fase sólida o la extracción líquido líquido, obteniendo recuperaciones que van desde el 35 al 100 % en diferentes matrices, como alimentos y agua. (Oracz J. et al. 2011, Zhang Y. et al. 2007). En nuestro trabajo el método desarrollado con el Tx-114 para la acrilamida arrojó recuperaciones, muy inferiores a los reportados por la literatura, mientras que el método desarrollado cuando se utilizó el líquido iónico presentó recuperaciones similares a los niveles reportados, pero lo que hay que destacar es que este procedimiento resultó ser más simple y más rápido y además hace uso de una sustancia amigable con el medio ambiente, como lo es el líquido iónico.

En lo que respecta a la cafeína, la SPE es la técnica más ampliamente utilizada en la separación de este analito de diferentes muestras como bebidas, agua residual o de tabletas de medicamentos y se han obtenido recuperaciones que van del 90 al 100 % (Yamauchi Y. et al. 2007, Evans R. et al. 2008, Rostagno M. et al. 2011). En el método de extracción micelar desarrollado utilizando al Tx-114 la cafeína presentó una recuperación baja en referencia a lo reportado de la bibliografía anteriormente citada, mientras que con el procedimiento utilizando el líquido iónico se obtuvieron recuperaciones del 87 %, superior a los valores que se encontraron con el método cuando se utilizó el Tx-114.

Las técnicas de preparación de muestra que se han aplicado al análisis del ácido salicílico en diferentes matrices, han arrojado buenas recuperaciones que van desde el 90 al 120 % (Gracia-Lor E. et al. 2009, Mullangi R. et al. 2012). En el método desarrollado cuando se utilizó el Tx-114 se encontró que las recuperaciones fueron superiores a las reportadas, teniendo la capacidad de concentrarlo hasta 4 veces. El método con el líquido iónico, también tuvo la capacidad de separar y concentrar al analito pero en un nivel más bajo, ya que solo lo concentró una vez, es decir tres veces menos que el Tx-114.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

8.1. Conclusiones

Se caracterizaron líquidos iónicos de la serie de los 1-alkil-3-metilimidazolio, mediante la determinación de su CMC y el tamaño de micela. El tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio fue seleccionado para el desarrollo de un método de extracción micelar, ya que fue el que presentó mayor tamaño de las micelas.

Se desarrollaron métodos por HPLC, lineales, precisos y exactos, para la determinación de acrilamida, cafeína y ácido salicílico en presencia de surfactantes y del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio.

Se desarrollaron métodos de extracción micelar para la cafeína, el ácido salicílico y la acrilamida, utilizando Tx-114 y tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio. El método propuesto para el líquido iónico resultó ser más simple y demostró tener un buen desempeño para la extracción de analitos hidrofílicos, con eficiencias significativamente superiores para la acrilamida y la cafeína.

Aunque existen reportes del uso del SDS en métodos de extracción micelar, en nuestro caso, no fue posible lograr la separación de la fase rica en micelas de la fase acuosa.

Se demostró que los líquidos iónicos pueden desempeñarse como medios de extracción para compuestos hidrofílicos con altos porcentajes de recuperación, por lo que pueden ser considerados como una alternativa a los solventes convencionales.

8.2 Perspectivas

Evaluar el desempeño de otras familias de líquidos iónicos, como los fosfonios o hexafluorofosfatos, en métodos de extracción micelar.

Aplicar los métodos desarrollados en la cuantificación de los analitos en muestras reales.

BIBLIOGRAFÍA

Andrés A., Téllez A., Rosés M., Bosch E. Chromatographic models to predict the elution of ionizable analytes by organic modifier gradient in reversed phase liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 1247, (2012), 71 – 80.

Arnold T. y Linke D. Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins. Bio. Techniques. 43 (2007) 427 – 440.

Ashjari M., Khoee S., Reza Mahdavian A. y Rahmatolahzadeh R. Self-assembled nanomicelles using PLGA–PEG amphiphilic block copolymer for insulin delivery: a physicochemical investigation and determination of CMC values. J Mater Sci: Mater Med. 23, (2012), 943 – 953.

Ávila R., Burguera J., Salager J. y Bracho C. Las micelas en química analítica. Aplicaciones en la espectroscopía de absorción atómica. Sociedad Venezolana de Química. 26, (2003), 26 – 31.

Ávila R., Burguera J., Salaser J., Bracho C. Las micelas en química analítica. Aplicaciones en la espectroscopía de absorción atómica. Rev. Soc. Venez. Quím., 26 (2003), 23 – 31.

B. Lindman, H. Wennerstrom y Eicke H. Micelles. Topics in Current Chemistry. Springer-Verlag, (1980).

Baghdadi M. y Shemirani F. In situ solvent formation microextraction based on ionic liquids: A novel sample preparation technique for determination of inorganic species in saline solutions. J. Chromatogr. A, 1184, (2008), 6 – 18.

Berthod A., Ruiz-Ángel M.J. y Carda-Broch S. Ionic liquids in separation techniques. J Chromatogr A, 1184, (2008), 6 –18.

Bi W., Tian M. y Ho Row K. Ultrasonication-assisted extraction and preconcentration of medicinal products from herb by ionic liquids. Talanta. 85, (2011), 701 – 706.

Bi W., Tian M., Ho Row K. Ultrasonication-assisted extraction and preconcentration of medicinal products from herb by ionic liquids. Talanta, 85, (2011), 701–706.

Blankschtein D, Nikas Y. y Liu L. Novel bioseparations using two-phase aqueous micellar systems. Biotechnol. Bioeng. 52, (1996), 185 – 192.

Blesic M., Marques M., Plechkova N, Seddon K., Rebelo L y Lopes A. Self-aggregation of ionic liquids: micelle formation in aqueous solution. Green Chem., 9 (2007), 481 – 490.

Buszewski B, Studzinska S. A Review of Ionic Liquids in Chromatographic and Electromigration Techniques. *Chromatographia*, 68, (2008), 1- 10.

Buszewski B. y Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, (2012), 231 – 247.

Cabaleiro N., Peña-Pereira F., De la Calle I., Bendicho C. y Lavilla I. Determination of triclosan by cuvetteless UV–vis micro-spectrophotometry following simultaneous ultrasound assisted emulsification–microextraction with derivatization: Use of a micellar-ionic liquid as extractant. *Microchem. J.* 99, (2011) 246 – 251.

Casero I., Sicilia D., Rubio S. y D. Pèrez Bendito D. An Acid-Induced Phase Cloud Point Separation Approach Using Anionic Surfactants for the Extraction and Preconcentration of Organic Compounds. *Anal. Chem.* 71, (1999), 4519 – 4526.

Chen L., Qi Zhao, Xu Y., Sun L., Zeng Q., Xu H., Wang H., Zhang X., Yu A., Zhang H. y Ding L. A green method using micellar system for determination of sulfonamides in soil. *Talanta.* 82, (2010), 1186 – 1192.

Citak D., Tuzen M. A novel preconcentration procedure using cloud point extraction for determination of lead, cobalt and copper in water and food samples using flame atomic absorption spectrometry. *Food Chem. Toxicol.*, 48, (2010), 1399 –1404.

Domínguez A., Fernández A., González N., Iglesias E. y Montenegro L. Determination of Critical Micelle Concentration of Some Surfactants by Three Techniques. *J. Chem. Educ.* 74, (1997), 1227 – 1231

Donati G., Nascentes C., Nogueira A., Arruda M., Nóbrega J. Acid extraction and cloud point preconcentration as sample preparation strategies for cobalt determination in biological materials by thermospray flame furnace atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.* 82, (2006). 189 –195.

Dong B., Li N., Zheng L., Yu L. y Inoue T. Surface Adsorption and Micelle Formation of Surface Active Ionic Liquids in Aqueous Solution. *Langmuir* 23, (2007), 4178 – 4182.

Evans R. y Siitonen P. Determination of Caffeine and Sympathomimetic Alkaloids in Weight Loss Supplements by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* 46, (2008) 61 – 67.

Fan Y. y Zhang S. Ionic liquid-based microextraction: A sample pretreatment technique for chromatographic analysis. *Eur. J. Chem.* 2, (2011), 282-288.

Farré M., Pérez S., Goncalves C., M.F. Alpendurada M. y Barcelo D. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *Trend. Anal. Chem.* 29, (2010), 1347 – 1362.

Freire M., Carvalho P., Fernandes A., Marrucho I., Queimada A., Coutinho J. Surface tensions of imidazolium based ionic liquids: Anion, cation, temperature and water effect. J Colloid Interf. Sci., 314, (2007), 621–630.

Furton K. y Norelus A. Determining the Critical Micelle Concentration of Aqueous Surfactant Solutions. J. Chem. Educ. 70, (1993), 254 – 257.

Garza M., Chávez A., Waksman N. y Castro R. Desarrollo de métodos por cromatografía de alta resolución para fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos. Memorias del XXV Congreso Nacional de la AMQA 2012.

Geng F., Liu J., Zheng L., Yu L., Li Z, Li G. y Tung, C. Micelle Formation of Long-Chain Imidazolium Ionic Liquids in Aqueous Solution Measured by Isothermal Titration Microcalorimetry. J. Chem. Eng. Data 2010, 55, 147 – 151.

Gracia-Lor E., Sancho J. y Hernández F. Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 1217, (2010), 622–632.

Guo Y. y Gaiki S. Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction Chromatography. J. Chromatogr. A, 1218, (2011), 5920 – 5938.

Guzmán N., Fernández J., Parada M., Orbegozo C., Alejandra Rodríguez M., Padrón A. y Jorg Thöming. Efecto del catión, del anión y del co-ión sobre la agregación de líquidos iónicos en solución acuosa. Quim. Nova. 33, (2010), 1703 - 1708.

Huddleston J. G., Willauer H. D., Griffin S. T. y Rogers R.D. Aqueous polymeric solutions as environmentally benign liquid/liquid extraction media. Ind. Eng. Chem. Res. 38, (1999), 2523 –2530.

Hung K., Chen B. y Yu L. Cloud-point extraction of selected polycyclic aromatic hydrocarbons by nonionic surfactants. Sep. Purif. Tech. 57, (2007), 1–10.

Inoue T. y Yamakawa H. Micelle formation of nonionic surfactants in a room temperature ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate: Surfactant chain length dependence of the critical micelle concentration. J. Colloid Interface Sci. 356, (2011), 798 –802.

IUPAC. Validation of Qualitative and Semi-Quantitative (Screening) Methods by Collaborative Trial. Chem. Int. (2006), 29.

Jouyban A., Soltani S., Shayanfar A., Pappa-Louisi A. Modeling the effects of type and concentration of organic modifiers, column type and chemical structure of analytes on the retention in reversed phase liquid chromatography using a single model. J. Chromatogr. A, 1218, (2011), 6454 – 6463.

Jungnickel C., Łuczak J., Ranke J, Fernández J., Muller A. y Thoming J. Micelle formation of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. Colloid Surface A. 316, (2008), 278 – 284.

Kalyanasundaram K. y Thomas J. Environmental on vibronic band intensities in pyrene monomer fluorescence and their application in studies of micelar systems. J. Am. Chem. Soc. 99, (1977), 2039 - 2043.

Kiril Streletzky K. y Phillies G. Temperature Dependence of Triton X-100 Micelle Size and Hydration. Langmuir. 11, (1996), 42 – 47.

Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, Wishart DS. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. Nucleic Acids Res. 2011 Jan; 39 (Database issue):D1035-41. PMID: 21059682.

L.N. van Nuijs A., Tarcomnicu I. y Covaci A. Application of hydrophilic interaction chromatography for the analysis of polar contaminants in food and environmental samples. J. Chromatogr. A. 1218, (2011), 5964 – 5974.

Li Z., Pei Y., Wang H., Fan J. y Wang J. Ionic liquid-based aqueous two-phase systems and their applications in green separation processes. Trends Anal. Chem. 29, (2010), 1336 – 1346.

Ling W., Gui-bin J., Ya-qi C., Bin H., Ya-we W. y Da-zhong S. Cloud point extraction coupled with HPLC-UV for the determination of phthalate esters in environmental water samples. J. Environ. Sci. 19, (2007), 874 – 878.

Liu J., Chi Y., Jiang G., Tai C., Peng J. y Hu J. Ionic liquid-based liquid-phase microextraction, a new sample enrichment procedure for liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 1026 (2004) 143–147.

Liu J., Jonsson A. y Jiang G. Application of ionic liquids in analytical chemistry. Trend Anal. Chem., 24, (2005), 20 – 27.

Liu R., Liu J., Yin Y., Hu X. y Jiang G. Ionic liquids in sample preparation. Anal. Bioanal. Chem., 393, (2009), 871–883.

Machatha S. y Yalkowsky S. Comparison of the octanol/water partition coefficients calculated by ClogP®, ACDlogP and KowWin® to experimentally determined values. Int. J. of Pharm. 294, (2005), 185 – 192

Madej K. Microwave-assisted and cloud-point extraction in determination of drugs and other bioactive compounds. Trend. Anal. Chem., 28, (2009), 436 – 446.

Maniasso N. Ambientes micelares en química analítica. Quim. Nova, 24, (2001), 87 - 93.

- Maniasso N. Micellar media in analytical chemistry. Quim. Nova, (2001), 24, 87-93.
- McLntire G. y Dorsey J. Micelles in Analytical Chemistry. Anal. Chem. 21, (1990), 257 - 278.
- Melwanki M.B., Ming-Ren Fuh. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with semi-automated *in-syringe* back extraction as a new approach for the sample preparation of ionizable organic compounds prior to liquid chromatography. J Chromatogr A, 1198 -1199, (2008), 1-6.
- Melwanki M.B., Ming-Ren Fuh. Partitioned dispersive liquid-liquid microextraction. An approach for polar organic compounds extraction from aqueous samples. J of Chromatogr A, 1207, (2008), 24-28.
- Merino F., Rubio S. y Pérez D. Acid-induced cloud point extraction and preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solid samples. J. Chromatogr. A. 962, (2002), 1 - 8.
- Miller N. and Miller J. Estadística y quimiometría para química analítica. Ed. Pearson Education. 4ª. Edición, (2002), 296 pp
- Miskolczy Z., Sebok-Nagy K., Biczók L y Göktürk S. Aggregation and micelle formation of ionic liquids in aqueous solution. Chem. Phys. Lett. 400 (2004) 296-300.
- Mullangi R., Sharma K. y Srinivas N. Review of HPLC methods and HPLC methods with mass spectrometric detection for direct determination of aspirin with its metabolite(s) in various biological matrices. Biomed. Chromatogr. 26, (2012). 906 - 941.
- Mun J. and Sim H. Handbook of Ionic Liquids. Nova. 2011. USA.
- Opti Frankewlch R. P. y Hinze W. L. Evaluation and optimization of the factors affecting nonionic surfactant-mediated phase separations. Anal. Chem. 66, (1994), 944 - 954.
- Oracz J. Nebesny E. y Zyzelewicz D. New trends in quantification of acrylamide in food products. Talanta. 86, (2011), 23 - 34.
- Oracz J., Nebesny E. y Zyzelewicz D. New trends in quantification of acrylamide in food products. Talanta. 86, (2011), 23 - 34.
- Padrón C. Tesis de Doctorado: Extracción micelar de compuestos organoclorados y organofosforados. Aplicación a su determinación por cromatografía líquida en muestras medioambientales. Universidad de La Palmas de la Gran Canaria. 2005.
- Paleologos E., Giokas D., y Karayannis M. Micelle-mediated separation and cloud-point extraction. Trend. Anal. Chem. 24, (2005), 426 - 436.

Pavagadhi S., Basheer C. y Balasubramanian R. Application of ionic-liquid supported cloud point extraction for the determination of microcystin –leucine – arginine in natural waters. Anal. Chim. Acta. 686 (2011) 87 – 92.

Pierola I. y Pacios I. Fluorescence Study on the Structure of Ionic Liquid Aggregates in Aqueous Solutions. J Fluoresc. 22, (2012), 145–150.

Ping Sun, Daniel W. Armstrong. Ionic liquids in analytical chemistry. Anal. Chim. Acta., 661, (2010), 1–16.

Pino V. Tesis de Doctorado: Extracción y preconcentración micelar. Aplicación a la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos en muestras de interés medioambiental. Universidad de la Laguna. 2002.

Pino V., Anderson J., Ayala J., González V., y Afonso A. The ionic liquid 1-hexadecyl-3-methylimidazolium bromide as novel extracting system for polycyclic aromatic hydrocarbons contained in sediments using focused microwave-assisted extraction. J. Chromatogr. A. 1182, (2008), 145 – 152.

Pino V., Ayala J., Afonso A. y González V. Ultrasonic micellar extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediments. Talanta, 54, (2001), 15 – 23.

Poole C. Chromatographic and spectroscopic methods for the determination of solvent properties of room temperature ionic liquids. J. Chromatogr. A. 1037, (2004), 49 – 82.

Poole C. y Poole S. Extraction of organic compounds with room temperature ionic liquids. J Chromatogr A, 1217, (2010), 2268–2286.

Qiu Z. y Texter J. Ionic liquids in microemulsions. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 13, (2008), 252 – 262.

Qiu Z. y Texter J. Ionic liquids in microemulsions. Curr. Opin. Colloid Interface Sci. 13, (2008), 252 – 262.

Quina F., Hinze W. L. Surfactant-mediated cloud point extractions: an environmentally benign alternative separation approach. Ind. Eng. Chem. Res. 38, (1999), 4150 - 4168.

Ramos L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. J Chromatogr A, 1221, (2012), 84 – 98.

Revelli A., Mutelet F. y Jaubert J. Prediction of Partition Coefficients of Organic Compounds in Ionic Liquids: Use of a Linear Solvation Energy Relationship with Parameters Calculated through a Group Contribution Method. Ind. Eng. Chem. Res. 49, (2010), 3883–3892.

Risner C. Simultaneous Determination of Theobromine, (+)-Catechin, Caffeine, and (-)-Epicatechin in Standard Reference Material Baking Chocolate 2384, Cocoa, Cocoa Beans, and Cocoa Butter. J. Chromatogr. Sci., 46, (2008), 892 – 899.

Romani A., Da Hora Machado A., Hioka N., Severino D., Baptista M., Codognoto L., Rodriguez M. y De Oliveira H. Spectrofluorimetric Determination of Second Critical Micellar Concentration of SDS and SDS/Brij 30 Systems. J. Fluoresc. 19, (2009), 327–332.

Rosen M. Surfactants and Interfacial Phenomena. John Wiley and Sons. Inc. 3a. Edición, (2004), 2.

Rostagno M., Manchon N., D'Arrigo M., Guillamon E., Villares A., Garcia-Lafuente A., Ramos A. y Martinez J. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. Anal. Chim. Acta. 685, (2011), 204–211.

Rostagno M., Manchon N., D'Arrigo M., Guillamon E., Villares A., Garcia-Lafuente A., Ramos A. y Martinez J. Fast and simultaneous determination of phenolic compounds and caffeine in teas, mate, instant coffee, soft drink and energetic drink by high-performance liquid chromatography using a fused-core column. Anal. Chim. Acta 685 (2011) 204–211.

Shi Z., Zhu X. y Zhang H. Micelle-mediated extraction and cloud point preconcentration for the analysis of aesculin and aesculetin in Cortex fraxini by HPLC. J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 44, (2007), 867 – 873.

Sicilia D., Rubio S. y Pérez-Bendito D. Evaluation of the factors affecting extraction of organic compounds based on the acid-induced phase cloud point approach. Anal. Chim. Acta. 460, (2002), 13–22.

Skoog D.A., Holler F. J. y Nieman T. A. Principios de Análisis Instrumental. Ed. McGraw Hill, España, 2001.

Smirnova N. y Safonova E. Ionic Liquids as Surfactants. Russ. J. Phys. Chem. A. 84, (2010), 1695 – 1704.

Soukup-Hein R., Warnke M y Armstrong D. Ionic Liquids in Analytical Chemistry. Anal Chem., 2, (2009), 145-168.

Sousa J, Alves G. y Fortuna A. Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. Anal Bioanal Chem, 403, (2012), 93–129

Srdjenovic B., Djordjevic-Milic V., Grujic N., Injac R. y Lepojevic Z. Simultaneous HPLC Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Food, Drinks, and Herbal Products. J. Chromatogr. Sci, 46, (2008), 144 – 149.

Srdjenovic B., Djordjevic-Milic V., Grujic N., Injac R. y Lepojevic Z. Simultaneous HPLC Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline in Food, Drinks, and Herbal Products. J. Chromatogr. Sci., 46 (2008), 144 – 149.

Standard Test Method for Water Miscibility of Water-Soluble Solvents. Designation: D1722 – 09. ASTM International, (2009), 1 – 2.

Stocka J., Tankiewicz M., Biziuk M. y Namiesnik J. Green Aspects of Techniques for the Determination of Currently Used Pesticides in Environmental Samples. Int. J. Mol. Sci., 12, (2011), 7785 – 7805

Tani H., Kamidate T. y Watanabe H. Micelle-mediated extraction. J. Chromatogra. A, 780, (1997), 229 – 241.

Tankiewicz M., Fenik J. y Biziuk M. Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. Talanta, 86, (2011), 8 – 22.

Thompson M., S Ellison T. y Wood R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl. Chem., 74, (2002), 835 – 855.

Vanyúr R., Biczók L. y Miskolczy Z. Micelle formation of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids in aqueous solution. Colloid. Surface A. 299, (2007), 256–261.

Wang X., Li Y., Du X., Lin Z. y Huang Ch. Effects of Room Temperature Ionic Liquids on Fluorescence Characteristics of 17 β -estradiol and its Derivative. Fluoresc 21, (2011), 1643 – 1648.

Wang Y., Tian M., Bi W y Ho Row K. Application of Ionic Liquids in High Performance Reversed-Phase Chromatography. Int. J. Mol. Sci, 10, (2009), 2591-2610.

Wang Z. The potential of cloud point system as a novel two-phase partitioning system for biotransformation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, (2007), 1 –10.

Xie S. Chin Paau M, Fai Li C. Xiao D. y Choi M. Separation and preconcentration of persistent organic pollutants by cloud point extraction. J. Chromatogr. A, 1217, (2010), 2306 – 2317.

Yamauchi Y., Nakamura A., Kitai M., Hatanaka K., Kohono I. y Tanimoto T. Improved Sample Pre-treatment for Determination of Caffeine in Tea Using a Cartridge Filled with Polyvinylpyrrolidone (PVPP). Chem. Pharm. Bull. 55, (2007), 1393—1396

Zhang Y., Ren Y., Zhao H. y Zhang Y. Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with

electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal. Chim. Acta. 584, (2007), 322 – 332.

Zhao Q. y Anderson J.L. Task-specific microextractions using ionic liquids. Anal Bioanal Chem. 6, (2011), 1613 -1618.

Zhou J., Li Sun X. y Wang S. Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* with analysis by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A, 1200, (2008), 93–99.