



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Técnicas extractivas basadas en disolventes sostenibles para la determinación de contaminantes en alimentos

Alumno/a: Desirée Fernández Santiago

Julio, 2023



Trabajo Fin de Grado

Técnicas extractivas basadas en disolventes sostenibles para la determinación de contaminantes en alimentos

~~Desirée~~

Desirée Fernández Santiago

Jaén, Julio, 2023

ÍNDICE

1. RESUMEN / ABSTRACT.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. Química analítica verde.....	3
3.1.1 Disolventes respetuosos con el medio ambiente.....	5
3.1.1.1 <i>Disolventes de punto eutéctico profundo (DESS)</i>	6
3.2 Técnicas extractivas miniaturizadas basadas en DESS.....	12
4. ANÁLISIS BIBLIOGRAFICO	15
5. EMPLEO DE DESS EN ESTRATEGIAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA (LPME) PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES AGROALIMENTARIOS	18
5.1 DESS como solventes en microextracción liquido-liquido dispersiva (DLLME)	19
5.2 DESS como solventes en microextracción en gota suspendida (SDME).....	27
6. CONCLUSIONES.....	34
7. BIBLIOGRAFÍA.....	35

1.- RESUMEN

Este Trabajo de Fin de Grado recoge una revisión sobre el uso de los disolventes de punto eutéctico profundo o *Deep Eutectic Solvents* (DESS) en técnicas de microextracción para analizar contaminantes en alimentos. Se presenta una descripción de los DESS, considerados alternativas más sostenibles a los disolventes convencionales, sus principales características y sus métodos de síntesis. En este trabajo se discuten dos técnicas de extracción miniaturizadas: microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y microextracción en gota suspendida (SDME). La aplicación de DESS en estas técnicas ha sido demostrada con éxito para la determinación de contaminantes, que luego se analizan con técnicas cromatográficas. Este enfoque promueve métodos analíticos más sostenibles en seguridad alimentaria, al reducir el consumo de disolventes y residuos generados durante la preparación de la muestra. En resumen, el uso de DESS en técnicas de microextracción ofrece beneficios ambientales en el análisis de contaminantes agroalimentarios.

ABSTRACT

This Degree project presents a review on the use of Deep Eutectic Solvents (DESS) in microextraction techniques for analyzing contaminants in food. A description of DESS, considered more sustainable alternatives to conventional solvents, is provided, together with their main characteristics, and methods of synthesis. This work discusses two miniaturized extraction techniques, dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) and suspended drop microextraction (SDME). The successful application of DESS in these extraction techniques, usually as a previous step for chromatographic analysis, is demonstrated for the determination of contaminants. This approach promotes more sustainable analytical methods in food safety by reducing solvent consumption and waste generated during sample preparation. In summary, using DESS in microextraction offers environmental benefits in analyzing agri-food contaminants.

2.- OBJETIVOS

Los principales objetivos que se pretenden conseguir en este trabajo de fin de grado son:

- Conocer los DESs, o disolventes de punto eutéctico profundo y las propiedades que los hacen ser considerados una alternativa a los disolventes convencionales para el desarrollo de métodos analíticos más sostenibles, en el contexto de la Química Verde.
- Conocer las técnicas de microextracción que empleen como disolventes los DESs y realizar una discusión crítica de su aplicación a la determinación de contaminantes agroalimentarios.

3.- INTRODUCCION

En los últimos años, se ha producido un aumento de la contaminación ambiental, la cual ha provocado una mayor concienciación en la comunidad científica, impulsando el desarrollo de metodologías más respetuosas con el medio ambiente. Las primeras actividades emprendidas por los científicos para la sostenibilidad se centraron mayoritariamente en procesos y productos a escala industrial, como postula la definición más conocida de química verde propuesta por Anastas (Galuszka, *et al.*, 2013). La Química Verde surge en la década de 1990 como una forma de utilizar las habilidades y el conocimiento de los químicos para evitar amenazas a la salud humana y al medio ambiente en todo tipo de procesos químicos. Paul Anastas y John Warner postularon los 12 principios de la Química Verde, basados en la minimización del uso de disolventes tóxicos en los procesos y análisis químicos, y además evitar la generación de desechos de tales procesos con el objetivo principal de minimizar los riesgos ambientales (Aparecida de Marco, *et al.*, 2019).

Una de las áreas más activas de investigación y desarrollo en la Química Verde es el desarrollo de metodologías analíticas, creando nuevos métodos y técnicas capaces de reducir el uso y la generación de sustancias peligrosas en todas las etapas del análisis químico (Anastas, 1999). Nace así el concepto de Química Analítica Verde, que es la aplicación de una serie de principios que minimizan el impacto de los métodos analíticos (Aparecida de Marco, *et al.*, 2019).

3.1 Química Analítica Verde

La Química Analítica Verde (GAC, por sus siglas en inglés) surgió de la química verde en el año 2000. Esta área de actividad relativamente nueva dentro de la Química Verde se refiere al papel de los químicos analíticos para hacer que las prácticas de laboratorio sean más respetuosas con el medio ambiente (Galuszka, *et al.*, 2013).

La GAC tiene como propósito efectuar procesos de acuerdo con los principios del desarrollo sostenible. Para ello, propone reducir los impactos ambientales utilizando procedimientos analíticos que sean más seguros y menos tóxicos para el medio ambiente, pero manteniendo su eficacia. En el año 2013, Galuszka, Migaszewski y

Namienski adaptaron los 12 principios de la Química Verde para así, ajustarse a la Química Analítica Verde dando lugar a los 12 principios de la Química Analítica Verde que se recogen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1: Los doce principios que recoge la química analítica verde. (Galuszka, et al., 2013).

LOS DOCE PRINCIPIOS DE LA QUIMICA ANALITICA VERDE	
1	Aplicar técnicas analíticas directas para evitar el tratamiento de la muestra
2	El tamaño mínimo de la muestra y el número mínimo de muestras son objetivos.
3	Realizar mediciones <i>in situ</i>
4	La integración de operaciones y procesos analíticos ahorra energía y reduce el uso de reactivos
5	Seleccionar métodos automatizados y miniaturizados
6	Debe evitarse la reprivatización
7	Debe evitarse la generación de un gran volumen de desechos analíticos y debe proporcionarse una gestión adecuada de los desechos analíticos.
8	Emplear preferentemente métodos multianalito o multiparámetro frente a los métodos que utilizan un analito a la vez
9	Minimizar el uso de energía
10	Emplear preferentemente reactivos obtenidos de fuentes renovables
11	Eliminar o reemplazar los reactivos tóxicos
12	Aumentar la seguridad del operador

De acuerdo con estos principios, una de las aproximaciones que se puede utilizar para reducir el consumo de disolventes es el uso de técnicas miniaturizadas. Asimismo, otro de los principios de la GAC propone el uso de nuevos disolventes más respetuosos con el medio ambiente para reemplazar otros disolventes más tóxicos. Actualmente, se pueden combinar ambas estrategias empleando disolventes más verdes en técnicas de preparación de muestra miniaturizadas. En los siguientes apartados se hará una introducción sobre los disolventes más respetuosos con el medio ambiente y sobre las técnicas de extracción miniaturizadas.

3.1.1 Disolventes respetuosos con el medio ambiente.

Uno de los principales objetivos de la GAC es que las etapas de pretratamiento, tratamiento de muestra y determinación de un método de análisis sean respetuosas con el medio ambiente y seguras para el analista, empleando disolventes y reactivos biodegradables y no tóxicos. Además, la química analítica verde también se enfoca en reducir los residuos químicos y materiales usados durante el análisis, y miniaturizar los dispositivos y sensores. (Kaya, *et al.*, 2022). Para lograr estos objetivos, se plantea la reducción y, en la medida de lo posible, la sustitución de los disolventes orgánicos volátiles (VOS) o clorados que se emplean en las etapas de tratamiento de muestra (Bintanel, 2021). Los nuevos disolventes propuestos por la GAC deben cumplir los siguientes requisitos: disponibilidad, ser asequible, calidad de grado suficiente, rutas de síntesis sencillas y de nula toxicidad, biodegradable, de elevado rendimiento, estable térmica y químicamente, no inflamable, renovable, fácil de transportar y de almacenar (Kaya, *et al.*, 2022).

En procesos analíticos, los disolventes son sustancias que se emplean en técnicas de separación, purificación de productos y en medios de reacción. Tienen la desventaja de que son propensos a ocasionar pérdidas por evaporación en caso de los disolventes volátiles, o en caso de los disolventes fluidos a proporcionar pérdidas en forma de vertidos. Estas pérdidas provocan la contaminación del medio ambiente, ya que la mayoría de los disolventes son inflamables y nocivos. Dada la situación, la investigación sobre unos disolventes más respetuosos con el medio ambiente es crucial para evitar que continúe la contaminación por dichos disolventes nocivos. En la actualidad existe una actividad muy intensa que se dedica a la sustitución de disolventes convencionales por otros disolventes no convencionales tales como fluidos supercríticos, líquidos iónicos o disolventes orgánicos renovables y seguros para el medio ambiente. Entre los disolventes no convencionales propuestos por la GAC, se encuentran los disolventes de punto eutéctico profundo (DESS), en los que se centra esta memoria (Kaya, *et al.*, 2022).

3.1.1.1 Disolventes de punto eutéctico profundo (DESS)

Los DESs fueron descubiertos por Abbott *et al.* en 2003 (Abbott, *et al.*, 2003) provocando un gran impacto en la ciencia de tal manera que es considerado como uno de los descubrimientos más significativos del siglo XXI. Los DESs son disolventes formados por mezclas de dos o más compuestos entre los que constituyen enlaces de hidrógeno, un aceptor de enlaces de hidrógeno (HBA) y un donante de enlaces de hidrógeno (HBD) (Santana, *et al.*, 2021). Esta mezcla forma un disolvente líquido a temperatura ambiente con una alta estabilidad térmica, baja volatilidad y alta viscosidad, además, presentan un punto de congelación inferior al del resto de los componentes individuales. La diferencia en el punto de congelación a la composición eutéctica de una mezcla binaria (A + B) comparada con el valor teórico de una mezcla ideal (ΔT_f), está directamente relacionada con la magnitud de la interacción entre los componentes de la mezcla (Smith, *et al.*, 2014). En la Figura 3.1 se muestra un ejemplo de un diagrama de fases con un punto eutéctico. Las interacciones que constituyen los elementos forman nuevos disolventes con una naturaleza dipolar, con estabilidad térmica y no inflamabilidad, entre otros.

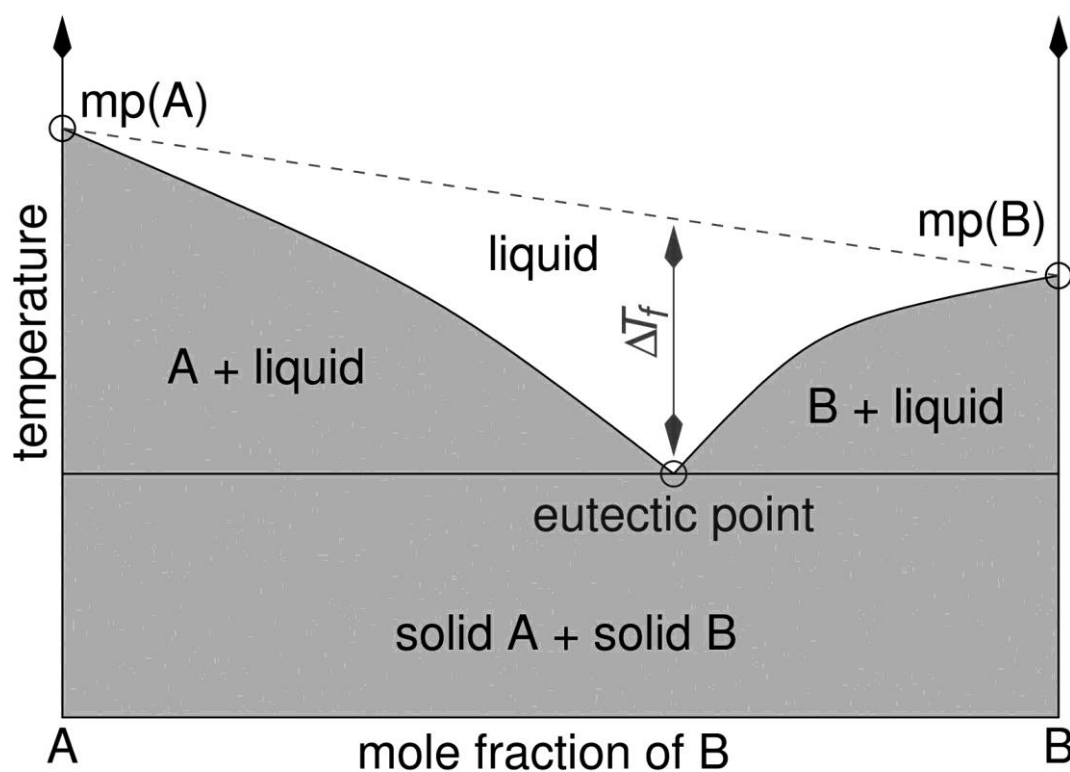


Figura 3.1: Representación esquemática de un punto eutéctico en un diagrama de fases de dos componentes. (Smith, *et al.*, 2014)

Los DESs son considerados disolventes verdes ya que son sustancias con alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, además tienen menos toxicidad que otros disolventes de propiedades fisicoquímicas similares, como los líquidos iónicos, y su síntesis tiene un pequeño coste de producción, una alta disponibilidad de materias primas y es fácil de sintetizar, formándose más de un millón de combinaciones posibles.

Una de las características más destacadas de estos nuevos disolventes es la variedad que existe de DESs, ya que se forman simplemente con la combinación de distintos componentes, obteniéndose diversas mezclas eutécticas con diferentes propiedades físicas y químicas. (Bastos, *et al.*, 2022). En la actualidad los DESs utilizados se clasifican en varios tipos, recogidos en la Tabla 3.2, en función de los compuestos utilizados como HBA y HBD (Benworth, *et al.*, 2021).

Tabla 3.2: Clasificación de los distintos tipos de DESs estudiados en la actualidad.

Tipo DES	Mezcla
Tipo I	Sal de amonio cuaternario y un cloruro metálico
Tipo II	Sal de amonio cuaternario y un cloruro metálico hidratado
Tipo III	Sal de amonio cuaternario y HBD
Tipo IV	Cloruro metálico hidratado y HBD
Tipo V	Moléculas no iónicas HBA y HBD

La cantidad de haluros metálicos no hidratados disponibles es limitada por lo que se restringe el número de disolventes de tipo I. Sin embargo, existen muchos donantes de enlaces de hidrogeno disponibles, por lo que la cantidad obtenida de disolventes DESs de tipo III es muy amplia. Además, se encuentra variedad como donantes de enlaces de hidrogeno, lo cual permite elegir las propiedades del disolvente según la aplicación (Bastos, *et al.*, 2022). En la Figura 3.2 quedan recogidas las estructuras más comunes de HBA y HBD.

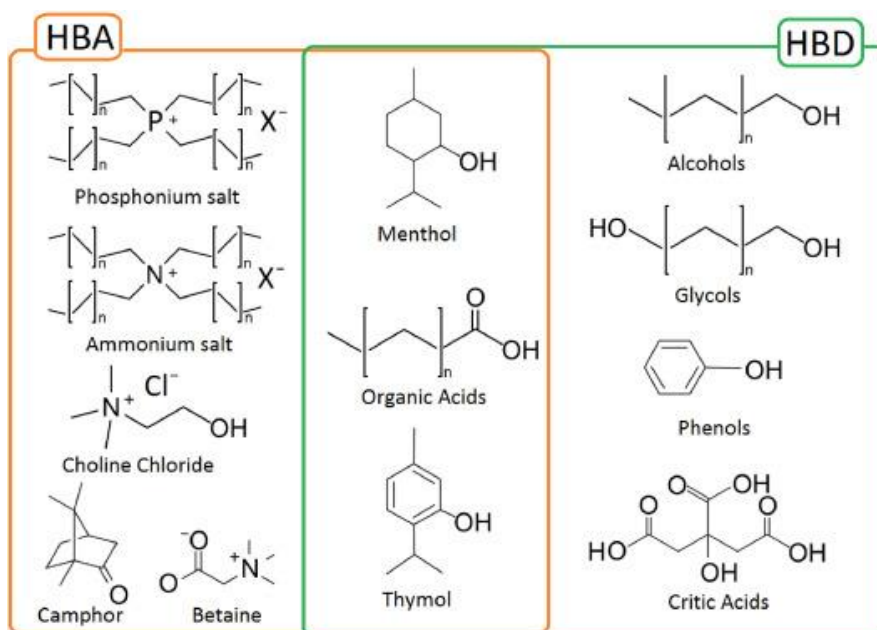


Figura 3.2: Estructuras más comunes de HBA y HBD (Makos, *et al.*, 2020)

La síntesis de DESs es relativamente sencilla y existen distintas opciones para llevarla a cabo. Sin embargo, la ruta más empleada implica calentar y agitar los componentes conjuntamente bajo una atmósfera inerte hasta que se consigue un líquido homogéneo. Dicha síntesis no presenta un impacto ambiental con respecto a los líquidos iónicos y disolventes orgánicos, debido a que no se utilizan disolventes ni se realiza ninguna reacción y, además, no es necesario purificar. Así se sintetizó un DESs por primera vez en 2003 mezclando cloruro de colina (ChCl) y urea que son dos sustancias sólidas que tienen altos puntos de congelación (Abbott, *et al.*, 2003). Jiang *et al.* 2003 sintetizó una clase de DESs ternarios mezclando ChCl, ácido bórico y polietilenglicol. Estos DESs ternarios tienen la ventaja con respecto a los binarios de tener baja volatilidad, baja toxicidad y una alta actividad, por lo que estos DESs pueden ser aplicados más fácilmente en tareas específicas.

Existen otros métodos de síntesis menos aplicados como la preparación de DESs con evaporación a vacío, la molienda y la liofilización. En la evaporación a vacío, los componentes se disuelven en agua y a continuación se evapora el agua a 49,85 °C a vacío, y la mezcla que se obtiene finalmente se introduce en un desecador con gel de sílice hasta que se elimina el agua y se obtiene un peso constante. El método de molienda consiste en introducir en un mortero los componentes sólidos y se muelen hasta obtener un líquido claro y homogéneo, y se introduce en una atmósfera inerte

de nitrógeno. En el método de liofilización se disuelve el HBD y el HBA un 5% en peso de agua y se mezclan, se congelan y a continuación se liofilizan hasta formar un líquido claro y homogéneo. En la Figura 3.3 se encuentran las especies de HBA y HBD comúnmente utilizadas en la síntesis de DESs. Podemos observar que (A) son las especies de HBA y (B) son las especies de HBD.

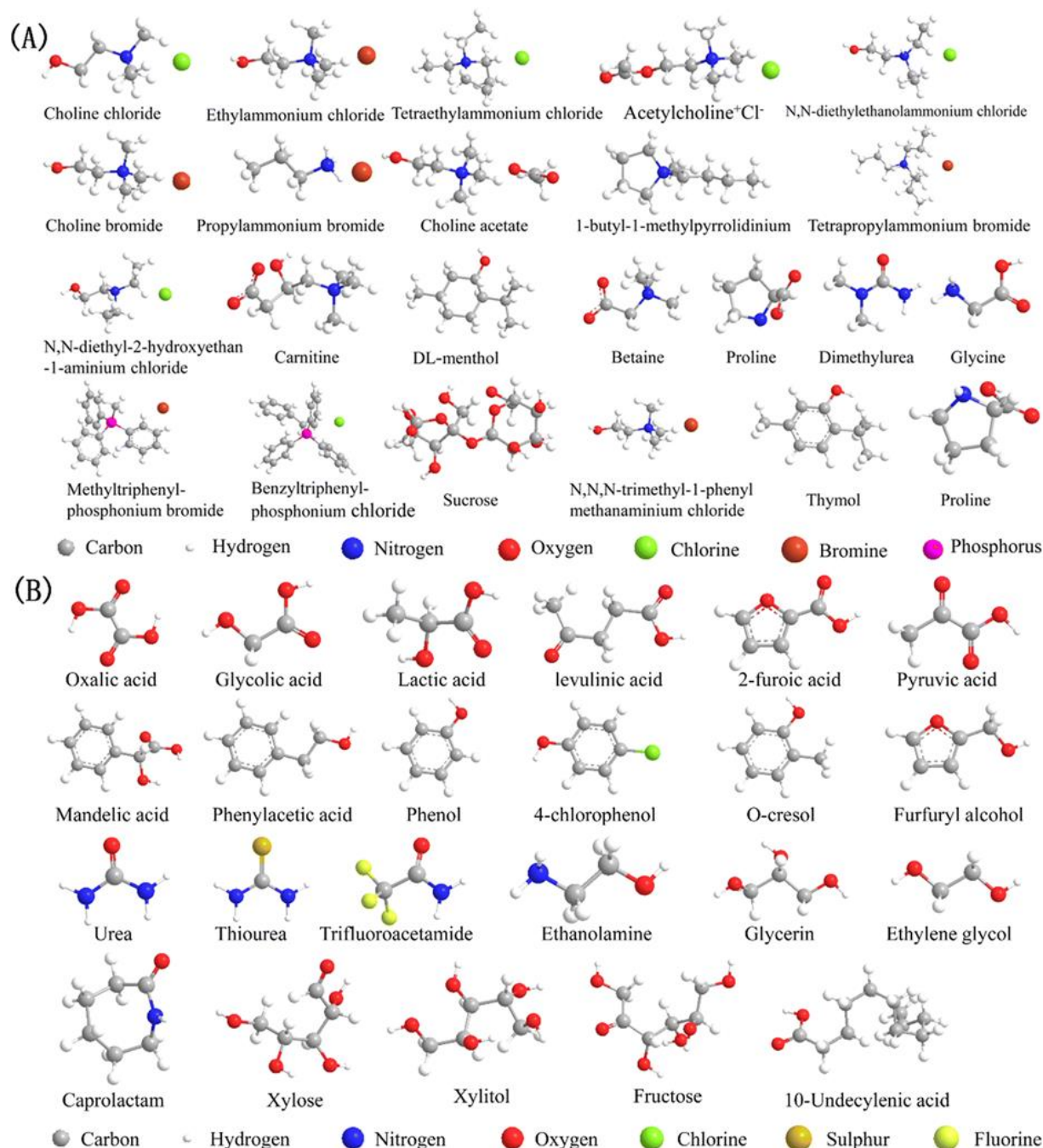


Figura 3.3: Especies de HBA llamados (A) y HBD llamados (B) comúnmente utilizadas en la síntesis de DESs. (Zhang, *et al.*, 2021)

Los DESs siguen siendo solventes punteros debido a su versatilidad. Actualmente, se continúa investigando con el objetivo de aumentar su potencial y aplicabilidad. Estos disolventes verdes se han aplicado ya en muchos ámbitos, entre los que se encuentran la metalurgia, separación y captura de gas, sistemas de energía y tecnología de baterías, biocatálisis, genómica y fundamentos de ácidos nucleicos, farmacéutica y médica y síntesis de nanomateriales. Además, los DESs pueden participar en reacciones que superan los 100° C en recipientes no presurizados debido a su alta estabilidad térmica y una baja presión de vapor (Benworth, *et al.*, 2021).

Inicialmente, los DESs nacen como alternativa aún más sostenible a los ya conocidos líquidos iónicos (ILs). Los ILs tienen el inconveniente de no ser tan verdes como los DESs debido a que el proceso de síntesis de los mismos es más complejo, además de presentar una alta toxicidad y carecer de biodegradabilidad. De esta manera, la investigación de los disolventes verdes se ha centrado en los DESs por ser la alternativa sostenible. En la Tabla 3.3 se recogen las diferencias que presentan los ILs con respecto a los DESs (Liu, *et al.*, 2018).

Tabla 3.3: Características que diferencian a los DESs de los ILs.

CARACTERIZACIONES DISTINGUIDAS	LIQUIDOS IONICOS	DISOLVENTES EUTECTICOS PROFUNDOS
Constitución	Sal	Sal, azúcar, ácido orgánico, aminoácido etc
Composición	Sal simple	Mezcla
Fuerza intermolecular	Enlace iónico	Enlaces de hidrogeno
Contenido de energía libre	--	1-5 kcal/mol
Distancia intermolecular	<1,2 Å	2-5 Å
Conductividad	Baja	Alta
Citotoxicidad	Positivo para mayoría	Difícil de detectar

Los puntos de congelación de los DESs oscilan entre -85 y 95°C, son menores que los de sus HBD y HBA, esto se debe al gran volumen de iones, la distribución de carga asimétrica y la reducción de la fuerza de culombio de los DESs (Tang *et al.*, 2012).

Para obtener el estado líquido de los DESs se debe reducir el punto de congelación, el cual se mide mediante una calorimetría diferencial de barrido.

Como alternativa aún más sostenible dentro de los denominados DESs, se encuentran los disolventes eutécticos profundos naturales (NADESs). Éstos son obtenidos de metabolitos primarios de origen vegetal, los cuales permiten progresar en la baja toxicidad y en las desventajas ambientales provocados por los disolventes orgánicos convencionales como la acetona o el metanol (Rivas Blas, 2021). Los NADESs son el nuevo tipo de concepto de solventes propuesto por Choi *et al.* en 2011 que representan plenamente el principio de la química verde y se consideran disolventes más seguros. Se pueden sintetizar sencillamente mezclando HBA como sales de amonio cuaternario no tóxicas, como por ejemplo el cloruro de colina (ChCl), con HBD con una toxicidad baja como los azúcares, ácidos orgánicos, urea y polioles (Espino, *et al.*, 2016). Un estudio realizado por Dai, *et al.* (2015) ha descubierto que se pueden realizar la combinación de más de cien tipos diferentes de NADESs, como por ejemplo mezclas de glucosa-cloruro de colina-agua o ácido láctico-glucosa-agua.

Son de gran interés para usos en distintas prácticas ya que son biodegradables, biocompatibles y tienen una baja o nula toxicidad. Numerosos estudios han evaluado su potencial como extractantes en diversas metodologías analíticas, logrando excelentes resultados, incluso en matrices complejas (Dai, *et al.*, 2015). Diversos estudios han demostrado que los NADESs manifiestan una elevada estabilidad química. Son aptos para disolver productos naturales con baja solubilidad en agua y para proteger los compuestos naturales de las altas temperaturas durante su almacenamiento (Dai, *et al.*, 2015). Es por ello que, aun el desarrollo de estos nuevos tipos de solventes se encuentra en auge, no sólo por sus propiedades, sino también porque son económicos, de una síntesis sencilla y estables a temperatura ambiente.

En Química Analítica, una de las principales aplicaciones de los DESs es su uso en el campo de tratamiento de muestra, sobre todo en extracciones y microextracciones en fase líquida (LPME). De entre dichos procedimientos, destacan: la extracción sólido-líquido (SLE), microextracción en gota suspendida (SDME), fibra hueca (HF)-LPME, extracción por membrana líquida soportada (SLME) y, en general, cualquier otra variante dispersiva de LPME y LLE (Santana, *et al.*, 2021). El primer paso para empleo de DESs con objetivos extractivos, es identificar cual es el adecuado para cada

situación. De este modo garantizar la mayor eficacia extractiva, manteniendo las ventajas de ser ecológico, barato y de baja toxicidad. Es por ello que los DESs han demostrado ser solventes competentes en la disminución del impacto ambiental.

3.2 Técnicas de extracción miniaturizadas basadas en DESs

Los DESs han sido utilizados como solventes en técnicas de microextracción con excelentes resultados, como se ha indicado anteriormente. Uno de los objetivos principales de su uso es el de emplear solventes con propiedades ecológicas que permitan el desarrollo de diferentes métodos de microextracción, mejorando así las características verdes del proceso analítico (Bastos, *et al.*, 2022).

La preparación de la muestra es un paso común en muchos métodos de análisis, que implica la extracción de una clase de analitos de su matriz original en un solvente. Con ello se eliminan posibles efectos matriz y se puede realizar la preconcentración de los analitos, lo cual permite su posterior análisis de una manera sensible y selectiva. Las técnicas de extracción convencionales suelen requerir mucho tiempo, mano de obra y grandes volúmenes de disolventes orgánicos, los cuales generan una cantidad considerable de residuos nocivos para el medio ambiente. A causa de ello, en las últimas décadas, para reducir el uso y la generación de sustancias peligrosas de acuerdo con los principios de la Química Verde, han aparecido nuevas técnicas que miniaturizan la extracción, sea en fase sólida (SPME), o en fase líquida (LPME) (Cunha & Fernandes, 2018).

Centrándonos en las técnicas basadas en LPME, en las cuales se emplean líquidos como material extractante, implica una extracción química apropiada ya que este método se ha desarrollado para superar algunas debilidades de los métodos tradicionales de extracción líquido-líquido (Pimparu, *et al.*, 2016). La estrategia más simple y de extenso uso para la ecologización de los métodos analíticos se basa en la miniaturización de cualquiera de las variantes de la LPME, reduciendo la cantidad de muestra requerida, el consumo de reactivos y la generación de residuos. Todas las variantes implican el empleo de microvolúmenes de solventes para la extracción cuantitativa de los analitos. La LPME se ha convertido en una de las herramientas de investigación y desarrollo más importante disponible en los laboratorios de análisis

analítico, forense, farmacéutico, alimentario, clínico e industrial para la extracción, purificación y concentración de trazas de sustancias químicas presentes en medios acuosos, sólidos, gaseosos, y muestras a base de aceite. (Kokosa, 2019). En la Figura 3.4 se representa un diagrama de flujo de las distintas técnicas basadas en LPME y sus diversas variantes, algunas de ellas mencionadas anteriormente.

Existen técnicas que ofrecen alternativas verdes para resolver problemas de sensibilidad y selectividad de métodos de aplicación directa para analizar muestras complejas, entre las que se encuentran la SDME, la HF-LPME y técnicas de microextracción basadas en membranas (Armenta, *et al.*, 2019).

La técnica HF-LPME tiene la ventaja de que el disolvente orgánico se encuentra protegido dentro del poro de la membrana de la fibra hueca. Además, tiene un bajo costo, el volumen empleado de disolvente orgánico es mínimo, tiene altos factores de enriquecimiento y posibilidad de automatización (Pimparu, *et al.*, 2016).

La técnica SDME ha sido reconocida como una de las herramientas simples de preparación de la muestra miniaturizadas para el aislamiento y la preconcentración de analitos de una matriz de muestra compleja. Además, es una técnica con notables ventajas, de entre ellas, es una técnica simple, con una extracción rápida, se emplean volúmenes mínimos de disolvente y de muestra, tiene una gran capacidad para la adaptación a diversas técnicas analíticas como espectroscopia, cromatografía y espectrometría de masas y los analitos objetivo pueden aislarse de forma eficaz teniendo en cuenta condiciones como la temperatura, el tiempo y la velocidad de agitación entre otras (Kumar Kailasa, *et al.*, 2021).

En cuanto a la técnica DLLME, las principales ventajas que presenta son, proceso miniaturizado de extracción de analitos, bajo volumen de muestra, es una técnica simple y rápida, con un costo bajo, y con un alto factor de enriquecimiento. Tiene gran capacidad para la adaptación de distintas técnicas analíticas. (Seetha, *et al.*, 2023)

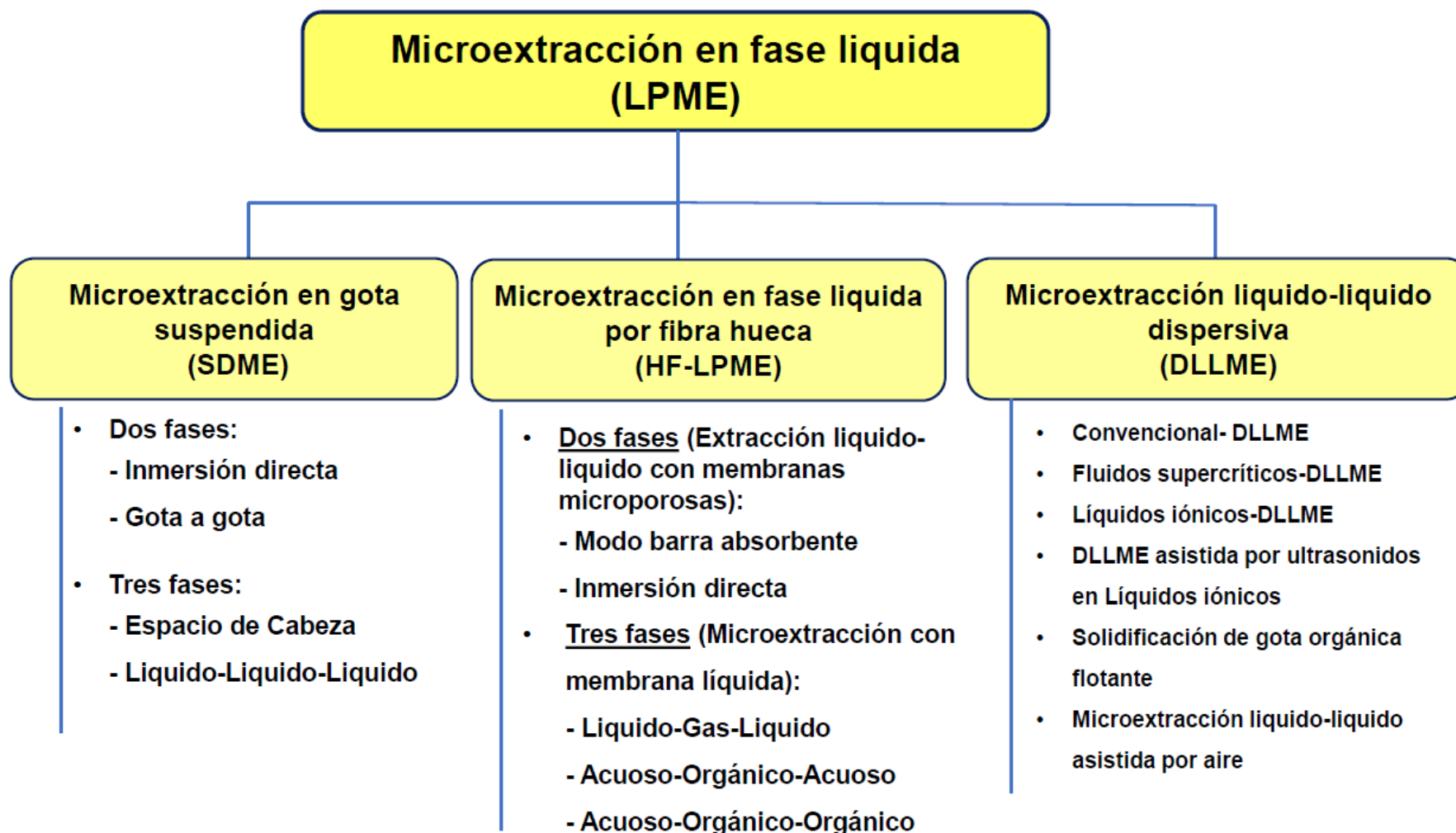


Figura 3.4: Técnicas y subtécnicas de LPME. Adaptada de (Farajzadeh, et al., 2014) (Yamini, et al., 2019)

Muchos estudios que emplean la LPME usan DESs como fase receptora, aprovechando su elevada versatilidad de síntesis, combinando HBAs con HBDs, para obtener las interacciones solvente-analito que interesen. Algunos ejemplos de estas interacciones incluyen: electrostática, hidrofóbica, dispersión de van der Waals, dipolo-dipolo, enlace de hidrogeno, π -catión, π - π e ion-dipolo. Algunas interacciones pueden controlar la viscosidad de la mezcla, esto es un factor crucial en LPME, por lo que la eficiencia del empleo de DESs está relacionada con su capacidad para formar interacciones eficientes con los componentes extraídos (Bastos, *et al.*, 2022). Dentro de las metodologías de LPME basadas en DESs, se encuentran SDME y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME), cada uno de las cuales tiene requisitos únicos de disolventes de extracción (Kokosa, 2019). Serán, por tanto, estas dos técnicas las que se describan más en profundidad en la memoria, centrando la discusión en la aplicación de las mismas al análisis de contaminantes en alimentos.

4.-ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO

Para la obtención de la información requerida para la realización de este Trabajo de Fin de Grado, se efectuó una búsqueda bibliográfica empleando las bases de datos Scopus (<https://www.elsevier.com/es-es/solutions/scopus>) y PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>). En la búsqueda bibliográfica se establecen unos criterios de búsqueda para así acotar en función de la información necesaria. Los criterios de búsqueda están basados en el empleo de palabras clave que estén relacionadas con el tema del trabajo, tipo de publicación como artículos, libros etc. Los resultados obtenidos se pueden filtrar usando opciones como autor, revista o año de publicación.

En primer lugar, en las bases de datos empleadas se realizó una primera búsqueda con las palabras clave sobre el tema de estudio, se emplearon palabras clave como *Green Analytical Chemistry*, *DES* y *extraction*. En la tabla 4.1 se encuentran los diferentes buscadores con algunas de las palabras clave empleadas en la búsqueda de información.

Tabla 4.1: Información de la búsqueda en las bases de datos.

Busqueda	Base de datos	Resultados
Green Analytical Chemistry	Scopus	3463
Green Analytical Chemistry	Pubmed	5306 307 con filtros
DES and Extraction	Scopus	1299
DES and Extraction	Pubmed	15316 1125 con filtros
DMLLE and DES	Scopus	289 98 con filtros
DMLLE and DES	Pubmed	19
SDME and DES	Scopus	25
Single Drop Microextraction	Scopus	781 289 con filtros
Dispersive Liquid Liquid Microextraction	Scopus	4099 144 con filtros
Single Drop Microextraction	Pubmed	386 28
Dispersive Liquid Liquid Microextraction	Pubmed	1759 86 con filtros

Una vez realizada la búsqueda en las bases de datos con las palabras clave del tema de trabajo, aplicamos los filtros de búsqueda para así acotar la información y emplear la necesaria en el tema de interés. En este caso se han empleado los filtros *food* y *chemistry* en el caso de las palabras clave. Para obtener la información necesaria se ha buscado en artículos y *reviews*. En la figura 4.1 se recoge un organigrama que representa un ejemplo de cómo se ha realizado la búsqueda en la base de datos Scopus con la sintaxis *DES AND extraction* y los resultados que se han obtenido con los filtros aplicados para la obtención de información.

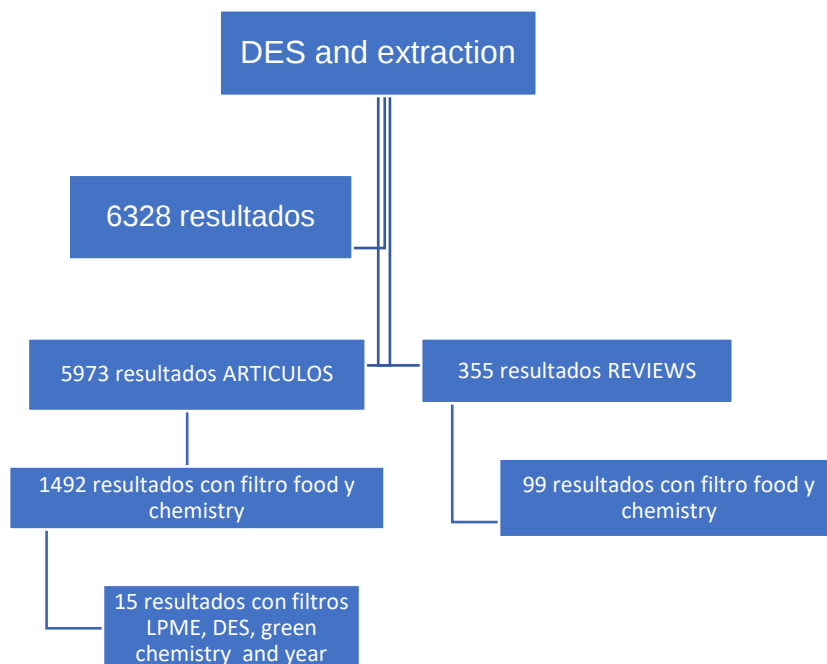


Figura 4.1: Organigrama resultados de la búsqueda en Scopus.

Posteriormente, se llevó a cabo una selección de las referencias más representativas para la realización de este trabajo. Se seleccionaron las referencias de los artículos experimentales que presentaban una variedad de analitos y tratamientos de muestra. En la Figura 4.2 se recogen, el número de artículos que se incluyen en las distintas técnicas empleadas en este trabajo, diferenciando en cada barra los artículos cuyos analitos a estudiar son contaminantes orgánicos, pesticidas o metales.

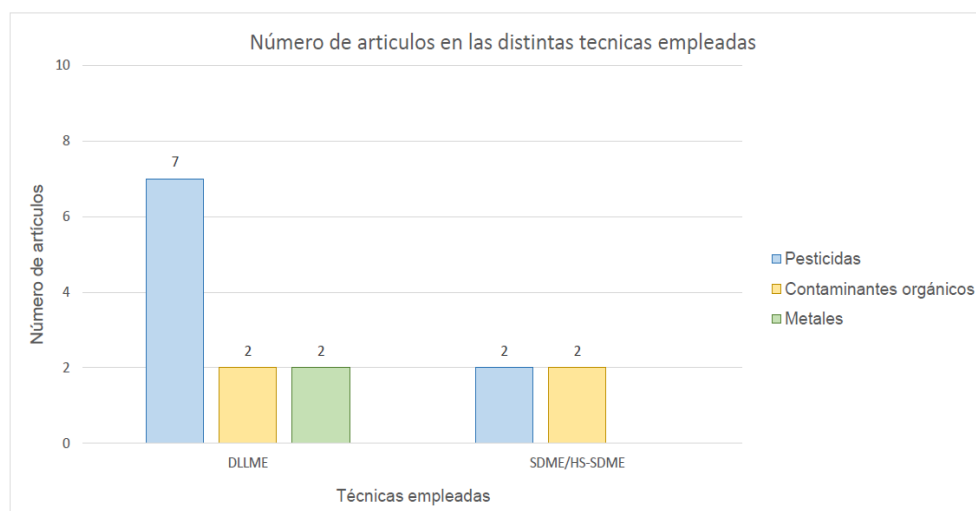


Figura 4.2: Número de artículos en las distintas técnicas empleadas

5.- EMPLEO DE DESs EN ESTRATEGIAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA (LPME) PARA LA DETERMINACIÓN DE CONTAMINANTES AGROALIMENTARIOS

Las muestras agroalimentarias son muestras complejas en las cuales se encuentran los analitos objetivo en concentraciones bajas. Por esta razón, se requieren métodos de preparación de las muestras antes de su análisis, los cuales suelen basarse en la extracción con disolventes (Delinska, *et al.*, 2021). La etapa de preparación de muestra, detección e identificación son importantes en los métodos analíticos, ya que, el tratamiento de muestra a menudo ocupa la mayor parte del tiempo total del análisis de manera que contribuye en gran medida al coste total y a tener un análisis fiable y con precisión. La preparación de la muestra tiene un impacto directo en la exactitud, la precisión y los límites de cuantificación. A su vez, es un proceso importante en el análisis químico, especialmente para analizar y determinar los compuestos a nivel de trazas, y a la reducción de los efectos matriz en muestras complejas (Farajzadeh, *et al.*, 2014).

El campo de la Química Analítica continúa buscando procedimientos para la preparación de muestras que sean más rápidos, sencillos, menos costosos y, sobre todo, más respetuosos con el medio ambiente. Para superar estos inconvenientes, se han desarrollado distintas técnicas que involucran la miniaturización, siendo la idea principal una gran reducción en relación de volumen de la fase extractante con la muestra (Dadfarnia & Haji Shabani, 2010).

En esta memoria, tal y como se indica en la introducción y, en los términos que se describen en la sección de búsqueda bibliográfica, se enfoca en el uso de DESs como disolventes sostenibles en las técnicas de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y en microextracción en gota suspendida (SDME), que son las principales técnicas microextractivas que aprovechan las características fisicoquímicas de estos solventes. La discusión se distribuirá de forma que se realiza una discusión de las referencias más representativas en las cuales se emplean DESs como disolventes en ambas técnicas y cuyos analitos son contaminantes agroalimentarios.

5.1.- DESs como solventes en microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)

La DLLME es un procedimiento de extracción muy recurrido, desarrollado por Rezaee *et al.* en 2006 (Rezae, *et al.*, 2006). La técnica se basa fundamentalmente en la extracción de una muestra acuosa que contiene los analitos de interés, con una pequeña cantidad de disolvente extractante (< 0.5 mL), cuyo requisito es que no sea miscible con la muestra. Para que se produzca la extracción, dicho disolvente debe ser “dispersado” y puede realizarse de dos modos: (i) con una agitación externa (vortex, ultrasonidos o agitación manual, entre otros), o (ii) con la adición simultánea de un disolvente dispersivo (normalmente con un volumen entre 0.5 y 1 mL) el cual es miscible tanto en agua como en el solvente extractante. La mezcla de solvente de extracción y solvente dispersor se inyecta rápidamente en la muestra acuosa con una jeringa. (Rezae, *et al.*, 2006). La mezcla resultante de los tres componentes forma múltiples microgotas en solución en las que se produce el reparto de los analitos, que experimentan un enriquecimiento en el bajo volumen de solvente de extracción que se dispersó en la solución acuosa inicial. Luego las fases se separan comúnmente por centrifugación (Trujillo-Rodriguez, *et al.*, 2013). En la figura 5.1 se observa un esquema común del procedimiento de DLLME asistida por vórtex. Una vez que se realiza la extracción, dependiendo de la naturaleza del disolvente orgánico, éste suele ser combinado con cromatografía líquida (LC) y cromatografía de gases (CG) para su determinación.

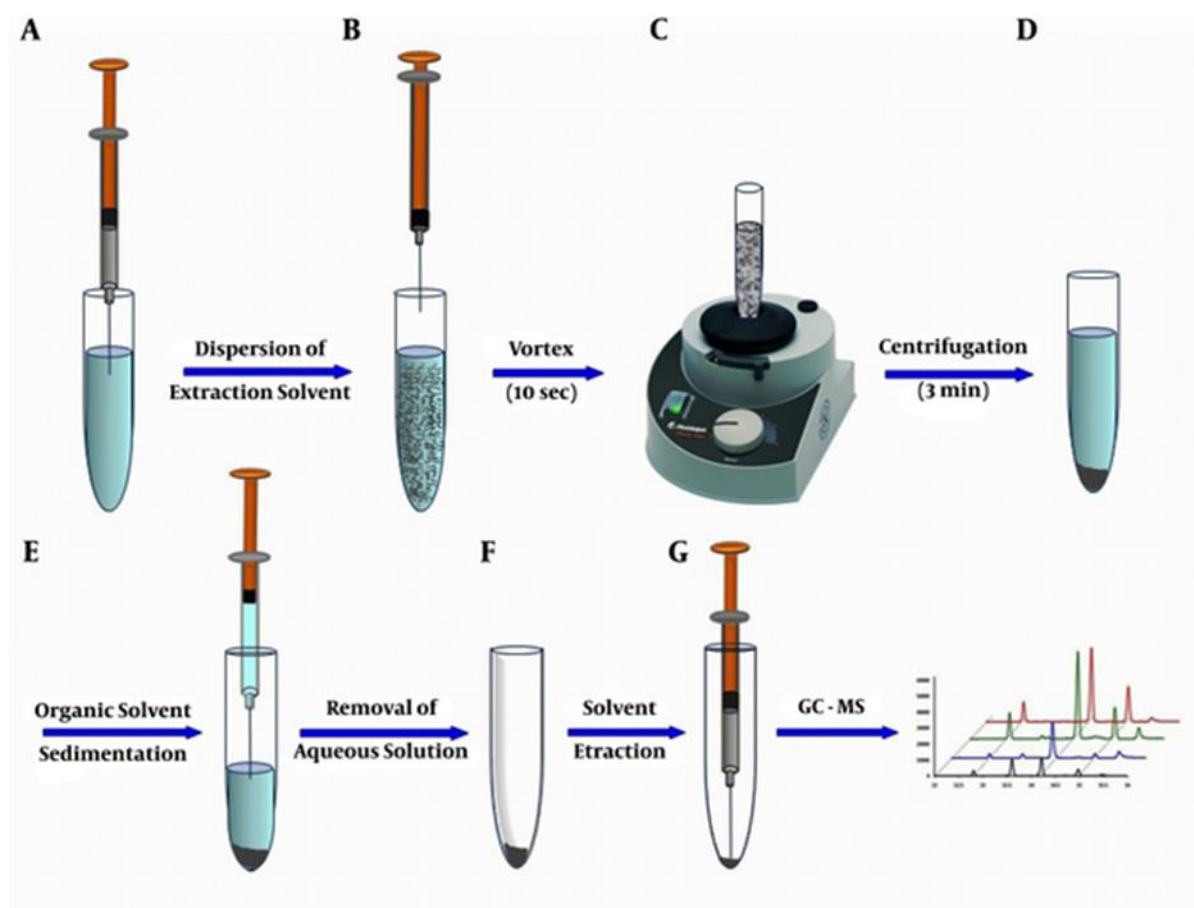


Figura 5.1. Ilustración esquemática del procedimiento DLLME. A y B, inyección y formación de finas gotas del solvente de extracción en la muestra acuosa; C, agitar en vórtex la mezcla de disolvente de extracción y muestra acuosa; D, centrifugación de la muestra; E y F eliminación de la fase acuosa con jeringa y obtención de la fase orgánica sedimentada; G, retracción de la fase sedimentada e inyección en el GC-MS (Rahbar, *et al.*, 2020).

Las ventajas principales de la DLLME son su alto factor de preconcentración, alta eficiencia de extracción, la simplicidad de operación, rapidez, bajo costo, bajo consumo disolvente extractante, y alta recuperación. (Rezae, *et al.*, 2006). En la Tabla 5.1 se encuentran reflejados una recopilación de los distintos artículos que emplean la técnica DLLME con DESs como disolventes para la extracción de analitos de interés agroalimentario.

Tabla 5.1. Aplicaciones de la DLLME usando DESs como solventes al análisis de contaminantes en alimentos. Espectrometría de absorción atómica electrotrémica (ETAAS); Detector de arreglo de diodos (DAD); Detección de ionización de llama (FID); Detector de Fluorescencia (FLD)

Analito	Matriz	DESs	Tratamiento DLLME	Técnica analítica	LOD	Referencia
Insecticidas (3)	Maíz, trigo, cebada y avena	1 mmol Timol (HBA) y 4 mmol Ácido octanoico (HBD)	DLLME asistida por vórtex: Vórtex 1 min Baño de agua a 70°C, 10 min formación fase DES incolora y homogénea. Centrifugación 3 min Baño hielo 15 min	HPLC-DAD	2.0-2.7 µg / kg	(Wu, <i>et al.</i> , 2021)
Contaminantes (Cd)	Vegetales, agua potable y agua de grifo	ChCl:fenol, ChCl:urea, ChCl:Ox, ChCl:LA y ChCl:EG (0.2-0.8 mL)	DLLME asistida por microondas y ultrasonidos: Microondas de vaso cerrado Centrifugación Ultrasonidos (2-5 min)	ETAAS	0.161 ng/L	(Ali Zounr, <i>et al.</i> , 2018)

Pesticidas (6)	Frutas (3) Verduras (6)	ChCl (HBA) y 4-clorofenol (HBD)	DLLME asistida por vórtex: Centrifugación 10 min Vórtex 5 min Baño de agua 75°C, 10 min	CG-FID	1.5-11 ng / mL	(Farajzadeh, <i>et al.</i> , 2016)
Pesticidas (7)	Leche (8)	ChCl (HBA) y Ácido decanoico (HBD) (1.39 y 1.24 mg respectivamente)	DLLME asistida por ultrasonido: Vórtex 1 min Centrifugación 5 min, 4000 rpm Baño ultrasónico termostatzado 50° C, 7 min	CG-FID	0.9 – 3.9 ng/mL	(Jouyban, <i>et al.</i> , 2020)
Pesticidas (7)	Miel (7)	Ácido dicloroacético (HBD) y mentol (HBA) 30 µL	DLLME asistida por ultrasonido: Baño ultrasónico termostatzado 90°C, 60 min Acetona (disolvente de extracción) Agitación Vórtex 1 min Centrifugación 4000 rpm, 5 min	CG-FID	1.1 – 4.0 ng/g	(Farajzadeh, <i>et al.</i> , 2019)
Metales tóxicos (Th (IV))	Agua (2)	[HMIM]Br, [BMIM]Br (HBA), ácido salicílico y ácido benzoico (HBD) (170 µL)	DLLME simple Filtración (membrana 0.45 µm) Almacenamiento a 4°C Torina (60µM) agente quelante Centrifugación 5 min, 3500 rpm Fase sedimentada diluida con etanol ácido	UV-vis	2.1 ng/mL	(Sadeghi & Davami, 2019)
Pesticidas (5)	Té (3) Zumo de frutas (3)	Betaina, L- carnitina (HBA) , HFIP (HBD) 0.15 g	DLLME asistida por vórtex: Vórtex (5-25 s) Centrifugación (5 min, 3000 rpm) Acetonitrilo (1mL) como agente de dispersión	HPLC- DAD	0.06- 0.17 ng/mL	(Deng, <i>et al.</i> , 2019)

Contaminante (Bisfenol)	Agua (2) Agua gas (2) Zumo naranja (2)	TBABr(HBA)- Acido fórmico (HBD)(1g)	DLLME simple Disolvente de extracción: Octanol (150µL) Centrifugación 2 min, 4000 rpm	HPLC-FLD	0.0003 mg/L	(Shishov, <i>et al.</i> , 2018)
Bisfenoles(13)	Muestras de leche envasada, agua mineral embotellada, bebidas carbonatadas, huevos y carne	Timol (HBA) y alcanfor(HBD) 150-400 µL	DLLME asistida por vórtex y ultrasonidos: Sonicación 5-20 min Vórtex 2-10 min Centrifugación 5-20min	CG-MS	0.03-0.05 ng/mL	(Seetha, <i>et al.</i> , 2023)
Pesticidas (3)	Aceite comestible	1-metilurea (HBA) y sorbitol (HBD)	DLLME asistida por vórtex: Vórtex 2 min	HPLC-UV	1.4 y 1.1 µg/L	(Ju, <i>et al.</i> , 2023)
Pesticidas (8)	Miel	Cloruro de fosfocolina (HBA) ácido dicloroacético (HBA) ácido decanoico (HBD)	DLLME asistida por vórtex: Vórtex 5 min Centrifugación 7 min	CG-MS	0.05-0.10 ng/mL	(Mokhtari, <i>et al.</i> , 2020)

En lo que respecta a la elección del DESs como solvente de extracción adecuado para cada ocasión, se debe de tener en cuenta algunas propiedades, como una elevada afinidad de extracción por el analito, y una baja solubilidad en solución acuosa. Esto queda directamente relacionado con el conocimiento de su naturaleza hidrofóbica, selectividad e interacciones electrostáticas con el analito (Ali Zounr, *et al.*, 2018). Son varios artículos publicados en los que se emplea cloruro de colina (ChCl) como parte aceptora (HBA) del DESs (Ali Zounr, *et al.*, 2018) (Farajzadeh, *et al.*, 2016) (Jouyban, *et al.*, 2020). Aquellos DESs basados en ChCl, se caracterizan por una gran inmiscibilidad con el agua y una baja viscosidad. En el artículo de Jouyban, *et al.*, 2020, se requiere que el solvente de extracción debía de formar un sistema de dos fases en presencia de una sal junto con la precipitación de las proteínas de la leche, por lo que teniendo en cuenta este hecho, se probaron dos DESs inmiscibles en agua, con baja viscosidad. En la Figura 5.3 se muestra un ejemplo de estudio para la selección del disolvente, que de acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que ChCl:Etilenglicol (EG) tiene unas recuperaciones de extracción de pesticidas más altas en comparación con ChCl:Fenol. Esto se debe a su baja viscosidad, que conduce a unos altos coeficientes de difusión de los analitos en la solución de la muestra.

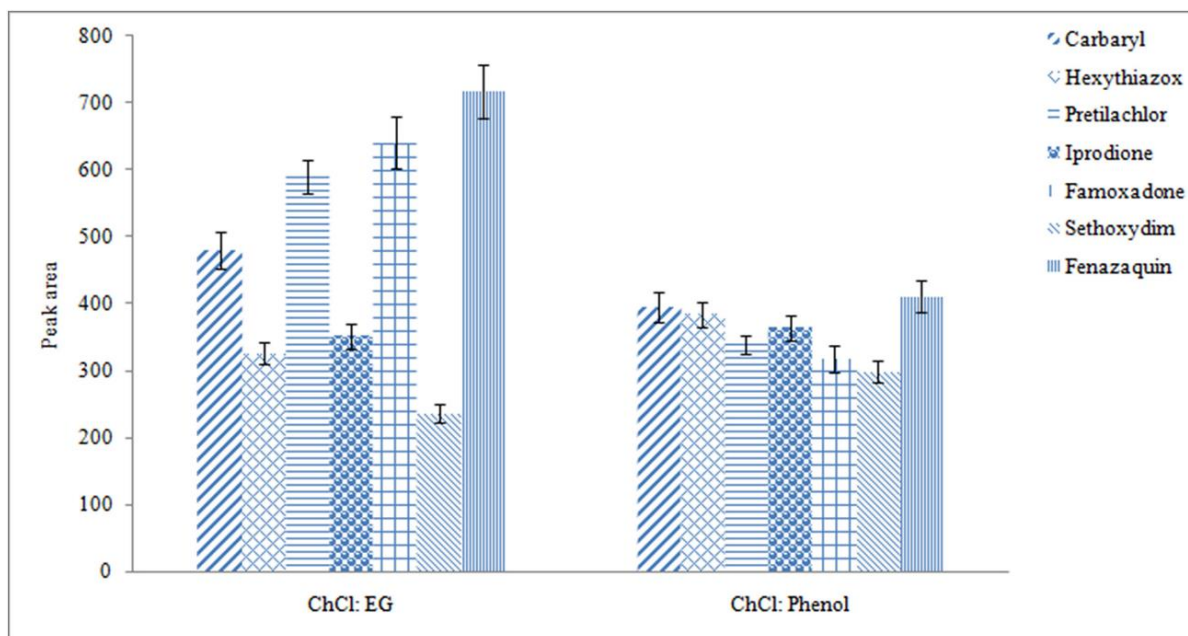


Figura 5.3: Selección del solvente de extracción/dispersor en el desempeño del método desarrollado. (Jouyban, *et al.*, 2020)

Otro estudio llevado a cabo por Ali Zounr, *et al.*, 2018, tiene como objetivo encontrar un DESs con carácter hidrofóbico, selectividad y conexiones electrostáticas con el

analito, siendo la selectividad la capacidad del solvente para extraer el constituyente objetivo en el medio asociado a otros componentes, por lo que se prepararon cinco DESs diferentes: ChCl:Urea (U), ChCl:Ácido Oxílico (Ox), ChCl:Fenol (Ph), ChCl:Ácido Láctico (LA) y ChCl:EG. De los cinco DESs, finalmente, el Ch:Ph mostró una máxima eficiencia de extracción (>95%) por lo que fue el seleccionado.

Los analitos más estudiados son los pesticidas, entre ellos destacan Fenazaquin. (Farajzadeh, *et al.*, 2019) (Jouyban, *et al.*, 2020). El fenazaquin es un sólido cristalino que se emplea como pesticida para el control de ácaros fitófagos que se encuentran en una serie de cultivos como frutas y verduras (Yaqoob, *et al.*, 2021). El fenazaquin está regulado exclusivamente para el uso como acaricida en invernadero (Ministerio de Agricultura, 2023) También se estudian algunos piretroides (Deng, *et al.*, 2019) que son contaminantes perjudiciales para la salud. Los piretroides son un grupo de insecticidas sintéticos que se emplea en áreas agrícolas ya que reemplazan a pesticidas restringidos y prohibidos como los organoclorados y organofosforados. Debido a un uso generalizado y mal empleado, sus residuos son detectados en productos alimentarios y en el medio ambiente (Wongmaneepratip, *et al.*, 2023). La contaminación indirecta de alimentos, agua y aire, puede deberse a la aplicación de pesticidas en la agricultura a través del suelo, el aire, el agua y las plantas, ya que estos, son tóxicos y pueden causar efectos graves sobre la salud si no se usan correctamente (Farajzadeh, *et al.*, 2019). La presencia de residuos de plaguicidas en alimentos puede ser un riesgo clave para la salud humana. Muchos países han establecido directivas legales y programas de monitoreo para controlar el uso de pesticidas en cultivos agrícolas y así, descubrir si realmente, se cumplen los niveles máximos legales de residuos. Por lo que existe una creciente demanda para desarrollar métodos analíticos sensibles y selectivos para la determinación de residuos de plaguicidas (Farajzadeh, *et al.*, 2019). En el artículo de Jouyban, *et al.*, 2020 se determinan contaminantes como medicamentos veterinarios, micotoxinas y pesticidas que se pueden acumular en la leche. El DESs empleado como disolvente en DLLME, es ChCl como HBA y ácido decanoico como HBD, utilizando CG-FID.

Uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta de los métodos desarrollados es el límite de detección (LOD), ya que aporta información sobre la cantidad de concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad. De esta manera uno de los artículos con menor LOD es el de Ali Zounr *et al* (Ali Zounr, *et al.*,

2018). Esto es debido a que se emplean ultrasonidos para acelerar la formación de agregados nanométricos y esto hace que aumente la eficiencia de extracción. Se obtuvo una excelente exactitud, una elevada precisión y recuperación del método. El analito que se determina en este artículo es el cadmio, ya que tiene una elevada toxicidad debido a que se encuentra en pequeñas concentraciones en fertilizantes fosfatados que se emplean en cultivos agrícolas. El DESs empleado en este artículo es ChCl:Ph. El DLLME es asistido por ultrasonido que teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se ha demostrado que el método de microextracción empleado tiene grandes ventajas para el análisis de muestras complejas de entre ellas utilización de solventes de extracción no tóxicos, facilidad al realizar los pasos experimentales y un bajo costo. Asimismo, al ser una técnica sencilla y rápida tiene un tiempo de extracción y determinación en cada muestra de unos diez minutos aproximadamente.

Otro de los artículos con un bajo valor de LOD es el de Seetha *et al* (Seetha, *et al.*, 2023). Los resultados obtenidos en este artículo muestran un rendimiento aceptable. Se ha observado que al incluir la centrifugación en la preparación de la muestra se ha disminuido el tiempo debido a que se acelera la separación de las fases. Además, la cantidad de DESs y de acetonitrilo fue fundamental para tener un volumen adecuado de la fase DESs después de DLLME. El tiempo de agitación por vórtex es determinante para la eficiencia de extracción de DLLME. Se determinó que el modelo, su precisión y confiabilidad resultaron ideales. Otro factor importante es el empleo de HPLC con el método DLLME, ya que tiene una precisión y una exactitud excelentes y es adecuado para la determinación de trazas. Por tanto, se ha demostrado que al emplear método DLLME basado en DESs se obtiene un buen rendimiento de enriquecimiento y extracción.

En cuanto a los volúmenes de DESs que comúnmente se han empleado en esta técnica en los artículos estudiados son de aproximadamente 1 mg en relación a peso y entre 30-200 μ L si este es expresado en volumen. A pesar de que se trata de un solvente respetuoso con el medio ambiente, es importante que la cantidad de disolvente utilizado sea la mínima ya que es el objetivo principal tal y como se ha mencionado anteriormente, la GAC tiene como propósito contribuir en el desarrollo sostenible reduciendo los impactos ambientales.

Respecto a la instrumentación analítica en combinación con estas estrategias de DLLME, cabe destacar que se encuentra siempre ligada a una separación previa a la determinación. La bibliografía incluida en este TFG, comprende tanto la cromatografía de gases como de líquidos. Para separar el disolvente DESs del analito, antes de introducir la muestra en el cromatógrafo, se debe realizar una centrifugación para separarlos, ya que el DESs queda disperso en la fase acuosa. Una vez realizado este proceso se forman unas finas gotitas de DESs que quedan sedimentadas en el fondo del tubo, que se extraen posteriormente. En otros casos es necesario introducir la disolución turbia en un baño de hielo a 0 °C durante 3 minutos, para que así, se formen las gotitas solidificadas de DESs y se recogen en la parte superior de la disolución. De esta manera se separa el DESs del analito para así poder introducirlo en el cromatógrafo.

5.2 DESs como solventes en microextracción en gota suspendida (SDME)

Las técnicas basadas en SDME son muy efectivas para el pretratamiento de muestras acuosas. La principal ventaja de SDME radica en la miniaturización del proceso de extracción empleando una cantidad de solvente inmiscible con la fase acuosa de menos de 20 µL. Por lo tanto, las técnicas SDME son rentables y representan menos daño para el medio ambiente, suscribiéndose a los principios de la química analítica verde (Delove Teglada, *et al.*, 2020).

En los últimos años, SDME ha ganado una popularidad significativa en la química analítica debido a sus notables ventajas como la simplicidad, la extracción rápida, los volúmenes mínimos de disolvente y de muestra, y la facilidad de integración con diversas técnicas analíticas como la espectroscopía, cromatografía y espectrometría de masas (Kumar Kailasa, *et al.*, 2021). Además de bajo coste, bajo impacto medioambiental, la aplicabilidad a diferentes matrices debido a que existe variabilidad en el número de disolventes que se pueden emplear. (Farajzadeh, *et al.*, 2014).

Se basa en la distribución de analitos entre una microgota de un solvente de extracción colocado en la punta de una aguja de microjeringa y una muestra líquida que contiene los analitos. En esta técnica, una gota de un solvente de extracción inmiscible

(alrededor de 1-10 μ L) se suspende de una jeringa en el líquido (microextracción en gota suspendida de inmersión directa, DI-SDME) o medio de muestra gaseoso (microextracción en gota suspendida de espacio de cabeza, HS-SDME) (Farajzadeh, *et al.*, 2014). Después de extraer varias veces, la gota orgánica se retrae a la microjeringa y se transfiere a un instrumento analítico para la cuantificación de los analitos.

Por el contrario, en cuanto a desventajas, se incluyen la variación del volumen de gota durante el proceso de extracción, especialmente cuando están presentes condiciones extremas de extracción (alta velocidad de agitación, largo tiempo de extracción y alta temperatura), lo que afecta a la estabilidad de la gota y la precisión analítica. En la Tabla 5.2 quedan recogidas las principales diferencias que existen entre DI-SDME y HS-SDME.

Tabla 5.2: Principales diferencias entre las técnicas DI-SDME y HS-SDME (Farajzadeh, *et al.*, 2014)

DI-SDME	HS-SDME
Microdrop está en contacto directo con la muestra acuosa	Microdrop permanece en el vacío sobre la muestra acuosa
Disolvente miscible con agua	Enriquecimiento de matrices acuosas, gaseosas y solidas
Disolventes no polares o muy ligeramente polares	Disolventes polares y no polares
Disolventes de extracción volátil	Disolventes de extracción
Sistema bifásico, menor tiempo de equilibrio	Sistema trifásico, mayor tiempo de equilibrio

Desde su desarrollo, SDME se ha combinado con diversas técnicas analíticas, incluidas la espectroscopía, la cromatografía y la espectrometría de masas para el análisis de varios analitos de muestras alimentarias, ambientales, vegetales, de

biofluidos y farmacéuticas. En la figura 5.4 se muestra los diferentes modos de extracción en SDME.

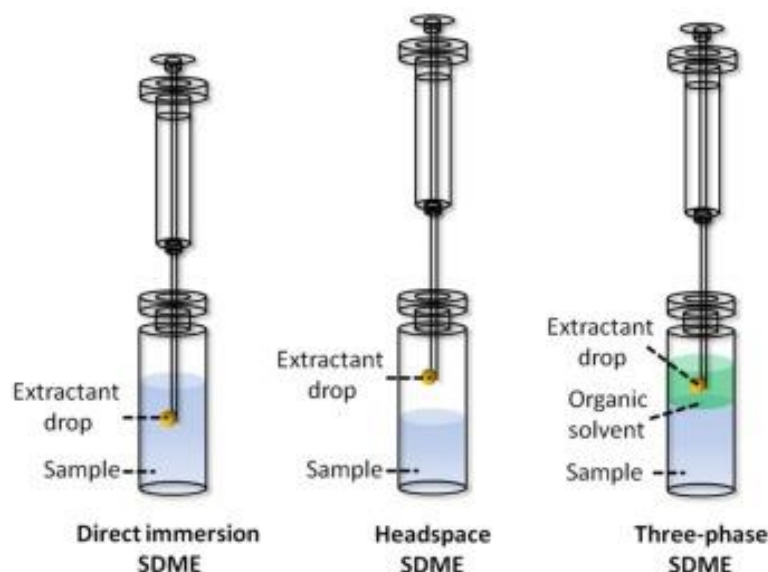


Figura 5.4 Tipos principales de SDME. (Tang, *et al.*, 2018)

Un solvente ideal en SDME debe de tener un alto punto de ebullición, una baja presión de vapor y alta viscosidad. Dichas características permiten la estabilidad de la gota y evitan su pérdida, lo cual es muy probable debido a los volúmenes tan reducidos empleados durante el procedimiento. Además, para ser óptimo para la extracción debe ser capaz de extraer/solubilizar los analitos subejos a estudio y además una baja toxicidad. La mayoría de los solventes orgánicos comúnmente utilizados para HS-SDME, como tolueno, hexano, decano y alcohol n-octílico, no son ecológicos y su presión de vapor no es tan baja como podría exigirse en esta metodología, lo cual conlleva a la pérdida de la microgota por evaporación durante la extracción. Sin embargo, los DESs poseen una serie de propiedades atractivas como solventes que pueden ser utilizadas en SDME. Actualmente existen pocos estudios que han empleado DESs en SDME para la extracción de contaminantes (Qamar Farooq, *et al.*, 2021).

La mayoría de los DESs sintetizados y reportados en la bibliografía hasta ahora, son en su mayoría de carácter hidrofílico. Por tanto, su aplicación para procesos de separación en matrices acuosas ha sido limitada, y aunque los DESs como medio de extracción pueden ser uno de los candidatos más apropiados para desarrollar las técnicas de HS-SDME para el análisis de compuestos traza volátiles y semivolátiles

en muestras acuosas, la volatilidad es relativamente baja y la alta viscosidad de la mayoría de los DESs pueden ser un arma de doble filo cuando se aplican como fase de extracción en las técnicas de microextracción combinadas con sistemas de cromatografía, especialmente sistemas de cromatografía de gases. Estas propiedades evitan la evaporación total de los DESs en el puerto de inyección del GC, lo que provoca la contaminación del liner y la columna, así como la inestabilidad en la tasa de flujo del gas portador y de referencia (Godwin, *et al.*, 2019).

En la Tabla 5.3 quedan recogidos una recopilación de los distintos artículos que emplean la técnica SDME con DESs como solventes de extracción y cuyos analitos son contaminantes agroalimentarios.

En los diferentes artículos descritos en la Tabla 5.3, observamos que el solvente más utilizado para la formación de los DESs en la técnica SDME es el cloruro de colina como HBA, ya que es más efectivo para la extracción de los analitos objetivo de las muestras. En el artículo elaborado por Mahdi Abolghasemi, *et al.*, 2020 se describe que la mezcla de solventes ChCl y OX tienen una mayor capacidad para extraer el analito del espacio libre de matrices acuosas en comparación con los solventes ChCl-urea y ChCl-Glicerol. Los analitos que se determinan en este artículo son los fungicidas triazólicos que pertenecen a los compuestos heterocíclicos nitrogenados, que son de una gran toxicidad, mutagenicidad y carcinogenicidad en bajas concentraciones. Se utilizan comúnmente para tratar enfermedades fúngicas de cultivos de frutas y hortalizas. Estos fungicidas tienen una gran estabilidad fotoquímica, además de una baja biodegradabilidad que les permite permanecer en el suelo, lo que provoca que se filtre en las aguas superficiales y se extienda por todo el ecosistema y se produzca una gran contaminación ambiental (Wang, *et al.*, 2023). La técnica más utilizada en los artículos destacados es la cromatografía de gases-masas. La cantidad de DESs que más se ha empleado en los diferentes artículos es entre 0.3 y 0.12 µg/L.

Tabla 5.3: Aplicaciones de la SDME usando DESs como solventes al análisis de contaminantes en alimentos

Analito	Matriz	DESs	Tratamiento SDME	Técnica analítica	LOD	Referencia
Contaminantes orgánicos (18)	Agua	ChCl (HBA) urea (HBD) y N ₄₄₄₄ Cl y LcA	SDME-HS Agitación (10 min, 400-1000rpm) Agitación magnética	HPLC-UV vis	35 µg/L	(Qamar Farooq, <i>et al.</i> , 2021)
Contaminantes orgánicos (16)	Agua	ChCl (HBA) y Acido oxálico (HBD) (15 µL)	SDME-HS Agitación magnética Agitación (3 min)	CG-MS	0,003-0,012 µg/L	(Mehravari, <i>et al.</i> , 2020)
Pesticidas (7)	Zumos de frutas Y vegetales	ChCl (HBA) 4-clorofenol (HBD) 2µL	SDME-HS NaCl 10% en el vial de vidrio Tiempo de extracción 30 min	CG-FID	0,9 µg/L	(Mahdi Abolghasemi, <i>et al.</i> , 2020)
Pesticidas (29)	Canela Comino Hinojo Clavo Tomillo Y nuez moscada	N ₄₄₄₄ (HBA) Dodecanol (HBD)	SDME-HS Incubadora 80°C durante 90 min	CG-MS	0.2 µg/g	(Triaux, <i>et al.</i> , 2020)

Uno de los artículos con los mejores resultados es el de Mehravar *et al* (Mehravar, *et al.*, 2020), ya que tiene un menor valor de LOD, esto es debido a que la eficiencia del método mejoró debido a diversos factores, entre los que se encuentra una transferencia de masa a la muestra acuosa y la difusión de analitos al extractante, esto logró mejorar la eficiencia de extracción y disminuir el tiempo de extracción. Otro factor importante fue la temperatura de la muestra, ya que se obtuvo un mayor rendimiento de extracción a 50°C. Si se emplea una temperatura mayor disminuye el rendimiento debido a que las moléculas de agua compiten con los analitos para la transferencia de la muestra acuosa y conlleva a una disminución de la recuperación de extracción. Asimismo, el tubo de extracción con forma de campana conllevó a una alta estabilidad de la microgota. El tiempo de extracción se redujo de manera considerable. El método fue simple, con disolventes ecológicos y con una disminución en el tiempo con respecto a otros métodos empleados anteriormente. En este artículo se emplearon como DESs ChCl como HBA y Acido oxoalico como HBD ya que se obtuvo una mayor extracción del analito. Los analitos a estudiar son contaminantes orgánicos llamados hidrocarburos aromáticos policíclicos que se forman principalmente durante la combustión incompleta de materia orgánica como el carbón, petróleo, gasolina entre otros, que se encuentran presentes en los alimentos por la contaminación ambiental, provocando efectos nocivos en los consumidores. Este contaminante está regulado actualmente en el marco legislativo sobre los límites máximos en contaminantes lo establece el Reglamento (UE) 2023/915 de la Comisión de 25 de abril de 2023 (Consumo, 2023)

Otro de los artículos con resultados positivos en LOD es el de Triaux *et al* (Triaux, *et al.*, 2020) Un parámetro importante para SDME es una elección del disolvente adecuado. Para ello debe de tener una volatilidad baja al igual que la presión de vapor, y una viscosidad suficiente. Los DESs tienen cientos de combinaciones y es necesario encontrar el que se adapte fácilmente a las propiedades fisicoquímicas requeridas en SDME, en términos de tensión superficial e hidrofobicidad en el caso de que sea un proceso de inmersión directa. Por lo que, en este caso, un aumento de la cadena de carbonos en el HBA y en el HBD aumenta la eficiencia de extracción. Los resultados muestran que DESs-HS-SDME es adecuado para la extracción del analito en materiales naturales, ya que, al compararla con otras técnicas, tiene numerosas ventajas entre ellas se distinguen rapidez en la extracción, además es un método con

bajo costo, ecológico y con una gama amplia de compuestos con diferentes propiedades fisicoquímicas debido a sus amplias fases de absorción. En este artículo se han empleado los DESs N₄₄₄₄ como HBA y Dodecanol como HBD ya que han obtenido resultados positivos en la extracción.

Los analitos más estudiados en esta técnica son los contaminantes orgánicos y los pesticidas mencionados anteriormente. Además el HS-SDME es más empleado debido a que se considera un modo de SDME adecuado para la extracción de compuestos de bajo peso molecular polares o no polares, volátiles o semivolátiles y de matrices de muestras complejas. Además es técnicamente sencillo, rentable y respetuoso con el medio ambiente. (Mehravar, *et al.*, 2020). Se ha comprobado que HS-SDME basado en DESs se utiliza con éxito en distintos artículos ya que se ha obtenido una eficiencia y sensibilidad de extracción muy satisfactorias además de que el método fue rápido, económico, simple y con una consumición química ecológica.

En el caso de la técnica SDME no se han encontrado el mismo número de artículos de investigación como en el caso de DLLME, con la aplicación de los DESs como disolventes. Esto es debido a que es una técnica que carece de volatilidad, además de tener una falta de estabilidad en la gota y una limitación del área superficial y de el volumen de la gota de extracción (Havlikova, *et al.*, 2018). A pesar de ello, se están realizando diversos estudios para mejorar las deficiencias de HS-SDME convencional y dar un paso efectivo para acercar la técnica a la química verde (Mehravar, *et al.*, 2020).

6.- CONCLUSIONES

En este Trabajo de Fin de Grado se ha realizado una revisión bibliográfica acerca de los disolventes sostenibles empleados en técnicas de microextracción para la extracción de contaminantes agroalimentarios. De entre dichos contaminantes, los DESs ganan importancia a ser uno de los disolventes más recientes y más amables dentro de las condiciones GAC establecidas. Las principales conclusiones obtenidas son las siguientes:

- Se ha demostrado que los analitos más estudiados como contaminantes en alimentos son los pesticidas. Asimismo, la técnica de microextracción más relevante para la extracción de los analitos es DLLME ya que se han obtenido resultados positivos en distintos analitos. Esta técnica se ha empleado en una gama amplia de muestras y con diversos DESs por lo que es una técnica que cumple los requisitos de la GAC.
- En el caso de la técnica de microextracción de SDME no se han encontrado un gran número de artículos. Esto se debe a que, debido a sus propiedades fisicoquímicas, no es una tarea sencilla encontrar un DESs que pueda quedar suspendido como gota a la vez que sus propiedades extractivas destacan con respecto a otro tipo de disolventes ya descritos en la literatura. Sin embargo, los artículos mencionados anteriormente, han demostrado unos resultados positivos en relación con otras técnicas.
- Los DESs más destacados son el ácido dicloroacético como HBA y el ácido decanoico como HBD debido a que son los que mayores resultados se obtienen en el proceso de extracción. Los DESs son una gran alternativa para una química verde debido a que tienen una baja toxicidad y baja volatilidad, con una alta actividad y un bajo costo económico. Cumple los requisitos de la GAC y se obtienen resultados muy prometedores.

7.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbott, A., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K., & Tambyrajah, V. (2003). Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Royal Society of Chemistry*, 70-71.
- Agnieszka Galuszka, Z. M. (Octubre de 2013). The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 78-84.
- Ali Zounr, R., Tuzen, M., Deligonul, N., & Yar Khuhawar, M. (2018). A highly selective and sensitive ultrasonic assisted dispersive liquid phase microextraction based on deep eutectic solvent for determination of cadmium in food and water samples prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry*, 253, 277-283.
- Anastas, P. T., 1999. Green Chemistry and the Role of Analytical Methodology Development. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 29(3), pp. 167-175.
- Aparecida de Marco, B., Saú Rechelo, B., Gandolpho, E., Kogawa, A. C., & Nunes, H. R. (enero de 2019). Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 1-8.
- Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F. & de la Guardia, M., 2019. Green extraction techniques in green analytical chemistry. *TrAC Tendencias en Química Analítica*, julio, Volumen 116, pp. 248-253.
- Bastos, L., Santos, R., Alves, J., Almeida, M., Galvao, C., & Azevedo, V. (January de 2022). Deep eutectic solvents in liquid-phase microextraction: Contribution to green chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 146.
- Benworth, H., Spittle, S., Chen, B., Poe, D., Zhang, Y., Klein, J., . . . Tuckerman, M. (2021). Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chemical Reviews*, 121(3), 1232–1285.
- Bintanel, C. J., 2021. Química Analítica Verde (I). Nuevas técnicas de extracción de contaminantes basadas en disolventes eutécticos profundos. *SECyTA*, 42(1), pp. 21-23.

- Choi, Y., Spronsen, V. & al, D. Y. e., 2011. Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology?. *Planta Physiol*, 156(4), pp. 1701-1705.
- Consumo, M. d. (2023). *Seguridad alimentaria* . Obtenido de https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/haps.htm
- Cunha, S. C., & Fernandes, J. O. (agosto de 2018). Extraction techniques with deep eutectic solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 105, 225-239.
- Dadfarnia, S. & Haji Shabani, A. M., 2010. Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals—A review. *Analytica Chimica Acta*, 658(2), pp. 107-119.
- Dai, Y., J Witkamp, G., Verpoorte, R. & Choi, Y., 2015. Tailoring properties of natural deep eutectic solvents with water to facilitate their applications. *Food Chem*, Issue 187, pp. 14-19.
- Delinska, K., Yavir, K. & Kloskowski, A., 2021. Ionic liquids in extraction techniques: Determination of pesticides in food and environmental samples. *TrAC Tendencias en Química Analítica*, Volumen 143.
- Delove Tegladza, I., Qi, T., Chen, T., Alorku, K., Tang, S., Shen, W., . . . Kee Lee, H. (5 de July de 2020). Direct immersion single-drop microextraction of semi-volatile organic compounds in environmental samples: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 393
- Deng, W., Yu, L., Li, X., Chen, J., Wang, X., Deng, Z., . . . Yuxiu. (2019). Hexafluoroisopropanol-based hydrophobic deep eutectic solvents for dispersive liquid-liquid microextraction of pyrethroids in tea beverages and fruit juices. *Food Chemistry*, 274, 891-899.
- Espino, M., Fernandez, M. d. I. A., Gomez, F. J. & Silva, M. F., 2016. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volumen 76, pp. 126-136.
- Farajzadeh, M. A., Abbaspour, M. & Kazemian, R., 2019. Synthesis of a green high density deep eutectic solvent and its application in microextraction of seven

widely used pesticides from honey. *Journal of Chromatography A*, Volumen 1603, pp. 51-60.

- Farajzadeh, M. A., Reza Afshar Mogaddam, M. & Aghanassab, M., 2016. Deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytical Methods*, Issue 12.
- Farajzadeh, M. A., Sorouraddin, S. M. & Afshar Mogaddam, M. R., 2014. Liquid phase microextraction of pesticides: a review on current methods. *Microchimica Acta*, Volumen 181, pp. 829-851.
- Galuszka, A., Migaszewski, Z. & Namiesnik, J., 2013. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Octubre, Volumen 50, pp. 78-84.
- Godwin, P., Pan, Y., Xiao, H. & T.Afzal, M., 2019. Progress in Preparation and Application of Modified Biochar for Improving Heavy Metal Ion Removal From Wastewater. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 4(1), pp. 31-42.
- Havlikova, M., Cabala, R., Pacakova, V., Bursova, M., & Bosakova, Z. (2018). Critical evaluation of microextraction pretreatment techniques – Part 1: Single drop and sorbent-based techniques. *Journal of Separation Science*, 42(1), 273-284.
- Jouyban, A., Farajzadeh, M. A. & Asfhar mogaddam, M. R., 2020. In matrix formation of deep eutectic solvent used in liquid phase extraction coupled with solidification of organic droplets dispersive liquid-liquid microextraction; application in determination of some pesticides in milk samples. *Talanta*, Volumen 206, p. 2020.
- Ju, Z., Fan, J., Meng, Z., Lu, R., Gao, H., & Zhou, W. (2023). A high-throughput semi-automated dispersive liquid–liquid microextraction based on deep eutectic solvent for the determination of neonicotinoid pesticides in edible oils. *Microchemical Journal*, 185.

- Kaya, S. I., Cetinkaya, A. & Ozkan, S. A., 2022. Green analytical chemistry approaches on environmental analysis. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, marzo. Volumen 33.
- Kokosa, J. M., 2019. Selecting an extraction solvent for a greener liquid phase microextraction (LPME) mode-based analytical method. *TrAC Tendencias en Química Analítica*, septiembre, Volumen 118, pp. 238-247.
- Kumar Kailasa, S., Reddy Koduru, J., Jung Park, T., Kumar Singhad, R., & Wu, H.-F. (2021). Applications of single-drop microextraction in analytical chemistry: A review. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 29.
- Liu, Y., Friesen, J. B., McAlpine, J., Lankin, D. C., Chen, S.-N., & Pauli, G. F. (2018). Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *Journal of natural product*, 3(81), 679-690.
- Mahdi Abolghasemi, M., Piryaee, M. & Moghtader Imani, R., 2020. Deep eutectic solvents as extraction phase in head-space single-drop microextraction for determination of pesticides in fruit juice and vegetable samples. *Microchemical Journal*, Volumen 158.
- Makos, P., Slupek, E. & Gebicki, J., 2020. Hydrophobic deep eutectic solvents in microextraction techniques—A review. *Microchemical Journal*, Volumen 152.
- Mehravar, A., Feizbakhsh, A., Mohsen Sarafi, A. H., Konozy, E., & Faraji, H. (2020). Deep eutectic solvent-based headspace single-drop microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, 1632.
- Ministerio de Agricultura, p. y. (2023). *Registro de productos fitosanitarios*. Obtenido de <https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/sanidad-vegetal/productos-fitosanitarios/registro-productos/>
- Mokhtari, N., Torbati, M., Farajzadeh, M. A., Mogaddam, A., & Reza, M. (2020). Synthesis and characterization of phosphocholine chloride-based three-component deep eutectic solvent: application in dispersive liquid–liquid microextraction for determination of organothiophosphate pesticides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2364-2371.

- Namieśnik, J., Trends in environmental analysis and monitoring. *Reseñas Críticas en Química Analítica*, 30(2-3), pp. 221-269.
- Pimparu, R., Nitiyanontakit, S., Miró, M. & Varanusupakul, P., 2016. Dynamic single-interface hollow fiber liquid phase microextraction of Cr(VI) using ionic liquid containing supported liquid membrane. *Talanta*, Volumen 161, pp. 730-734.
- Piryaeei, M. & Behroozi, M., 2022. Deep Eutectic Solvent as a Green Solvent for Fast Analysis of the Volatile. *Physical Chemistry Research*, 10(3), pp. 421-428.
- Qamar Farooq, M., Zeger, V. R. & Anderson, J. L., 2021. Comparing the extraction performance of cyclodextrin-containing supramolecular deep eutectic solvents versus conventional deep eutectic solvents by headspace single drop microextraction. *Journal of Chromatography A*, Volumen 1658.
- Rahbar, N., Mehdi Hesami, M., Ramezani, Z. & Savarizadeh, A., 2020. Ultra Rapid and Highly Sensitive Disperser-less Liquid-liquid Microextraction of Organophosphate Pesticides Prior to Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection. *Jundishapur Journal of Health Sciences*, 12(4).
- Rezae, M., Assadi, Y., Reza, M., Hosseini, M., Aghaee, E., Ahmadi, F., & Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116(1-2), 1-9.
- Rivas Blas, S., 2021. Química Analítica Verde (II). Nuevas técnicas avanzadas de extracción. *Revista SECyTa*, 42(2), pp. 91-93.
- Sadeghi, S. & Davami, A., 2019. A rapid dispersive liquid-liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvent for selective and sensitive preconcentration of thorium in water and rock samples: A multivariate study. *Journal of Molecular Liquids*, Volumen 291.
- Santana, Á., Rodríguez, R., Herrera, A., Socas, B., & Rodríguez, M. A. (enero de 2021). Deep eutectic solvents. The new generation of green solvents in analytical chemistry. *TrAC Tendencias en Química Analítica*, 134.

- Seetha, B. S., Ganneru, S., Thati, R. & Reddy mudiam, M. K., 2023. Experimental design of non-ionic hydrophobic DES-DLLME coupled with injector port silylation-GC–MS/MS for the quantitative determination of 13 bisphenols in food samples. *Food Chemistry*, 30 marzo.Volumen 405 parte A.
- Shishov, A., Volodina, N., Nechaeva, D., Gagarinova, S., & Bulatov, A. (2018). Deep eutectic solvents as a new kind of dispersive solvent for dispersive liquid–liquid microextraction. *RSC Advances*, 67.
- Smith, E. L., Abbott, A. P. & Ryder, K. S., 2014. Deep Eutectic Solvents (DESS) and Their Applications. *Chemical Reviews*, Volumen 21, p. 114.
- Tang, S., Qi, T., Ansah, P. D., Nalouzebi Fouemina, J. C., Shen, W., Basheer, C., & Kee Lee, H. (2018). Single-drop microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 108, 306-313.
- Triaux, Z., Petitjean, H., Marchioni, E., Boltoeva, M., & Marcic, C. (2020). Deep eutectic solvent–based headspace single-drop microextraction for the quantification of terpenes in spices. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(412), 933-948
- Trujillo-Rodriguez, M. J., Rocío Bautista, P., Pino, V. & Alfonso, A. M., 2013. Ionic liquids in dispersive liquid-liquid microextraction. *TrAC Tendencias en Química Analítica*, Volumen 51, pp. 87-106.
- Wang, Y.-X., Shen, X.-F., Zhang, J.-Q. & Pang, Y.-H., 2023. Fabrication of β -cyclodextrin-polyacrylamide/covalent organic framework hydrogel at room temperature for the efficient removal of triazole fungicides from environmental water. *Environmental Pollution*, Volumen 333.
- Wongmaneepratip, W., Tongkhao, K. & Vangnai, K., 2023. Effect of clarifying agent type and dose on the reduction of pyrethroid residues in apple juice. *Food Control*, Volumen 153.
- Wu, B., Guo, Z., Li, X., Huang, X., Teng, C., CHe, Z., . . . Wenting, Z. (2021). Analysis of pyrethroids in cereals by HPLC with a deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of floating organic droplets. *Analytical Methods*, 13(5), 636-641.

- Yamini, Y., Rezazadehb, M. & Seidic, S., 2019. Liquid-phase microextraction – The different principles and configurations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volumen 112, pp. 264-272.
- Yaqoob, M., F.A., Z., Mukhtar, M., Bilal Ahmed, S., Azhar Khan, M., Ayoub, L., . . . Ondrisik, P. (2021). Residual fate of fenazaquin (10EC) in apple fruit and soil. *Journal of King Saud University – Science*.
- Zhang, M., Zhang, X., Liu, Y., Wu, K., Zhu, Y., Lu, H., & Liang, B. (2021). Insights into the relationships between physicochemical properties, solvent performance, and applications of deep eutectic solvents. *Environmental Science and Pollution Research*(28), 35537–35563.