



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE CIENCIAS

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**DETERMINACIÓN DE FUROSEMIDA MEDIANTE EL EMPLEO DE TÉCNICAS DE
EXTRACCIÓN/MICROEXTRACCIÓN DISPERSIVA Y DETECCIÓN
FLUORIMÉTRICA**

Autor: Ana Isabel Robles Manzano

Tutores:

Fernando José Pereira García (Universidad de León)

Laura Toribio Recio (Universidad de Valladolid)

Año: 2022/2023

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	7
2	FUNDAMENTO TEÓRICO	8
2.1	TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN.....	8
2.2	ANÁLISIS FLUORIMÉTRICO	22
2.2.1	<i>Fundamento de la fluorescencia molecular</i>	22
2.2.2	<i>Análisis de espectros de fluorescencia.</i>	26
2.3	FUROSEMIDA	29
3	OBJETIVOS	31
4	EXPERIMENTAL	32
4.1	MATERIALES	32
4.1.1	<i>Instrumentación</i>	32
4.1.2	<i>Reactivos</i>	33
4.2	METODOLOGÍA.....	33
4.2.1	<i>Estudios preliminares</i>	33
4.2.2	<i>Extracción de la furosemida:</i>	34
4.2.3	<i>Factores que afectan al proceso de extracción</i>	36
4.2.4	<i>Aplicación a una muestra comercial</i>	37
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
5.1	ESTUDIOS PRELIMINARES	39
5.1.1	<i>Búsqueda de mezclas de disolventes</i>	39
5.1.2	<i>Extracción de la furosemida</i>	41
5.1.3	<i>Ajuste de las condiciones experimentales óptimas (prescan)</i>	42
5.1.4	<i>Ajuste de los parámetros instrumentales</i>	44
5.2	FACTORES QUE AFECTAN AL PROCESO DE EXTRACCIÓN.....	46
5.2.1	<i>Efecto del tiempo de agitación/sonicación</i>	46
5.2.2	<i>Efecto salino</i>	49
5.2.3	<i>Efecto del pH en la extracción de furosemida.</i>	51
5.3	MUESTRA COMERCIAL.....	53
6	CONCLUSIONES	55
7	BIBLIOGRAFÍA	56

RESUMEN

El proceso de extracción es una etapa clave en la mayoría de los procesos de preparación de muestra ya que reduce la presencia de interferentes y favorece la preconcentración del analito, por lo que se produce una mejora en la selectividad y sensibilidad del método de análisis. En los últimos años, se han desarrollado diversas técnicas de extracción, buscando mejorar la eficacia, rapidez y simplicidad del método de preparación de muestra. Entre estas técnicas, la microextracción y la extracción dispersiva han adquirido gran relevancia debido a su capacidad para extraer analitos en pequeños volúmenes, minimizando así el consumo de disolventes y reduciendo los tiempos de análisis.

En este trabajo se ha estudiado la microextracción líquido-líquido dispersiva con el fin de poder utilizarla en el análisis de furosemida. Para ello se ha evaluado la viabilidad de diferentes agentes extractantes y dispersantes a la vez que se han establecido las condiciones de extracción. Los mejores resultados se obtuvieron empleando como extractantes metilisobutilcetona (MIBK) o acetato de n-butilo, y favoreciendo la dispersión de las fases mediante agitación en un baño de ultrasonidos. El menor tiempo de extracción se obtuvo utilizando acetato de n-butilo y fue de 1 minuto. También se observó que la eficacia de la extracción se favorecía a pH ácidos (menor de 3) y con la adición de NaCl a la fase acuosa.

ABSTRACT

Extraction is a key step in most sample preparation processes as it reduces the presence of interfering species and favours the preconcentration of the analyte, thus improving the selectivity and sensitivity of the analytical method. In recent years, various extraction techniques have been developed, in order to increase the efficiency, speed and simplicity of the sample preparation method. Among these techniques, microextraction and dispersive extraction have acquired great interest due to their ability to extract analytes in small volumes, thus minimizing solvent consumption and reducing analysis times.

In this work, dispersive liquid-liquid microextraction has been studied with the aim of using it in the analysis of furosemide. For this purpose, the suitability of different extractants and dispersing agents has been evaluated and the extraction conditions have been established. The best results were obtained using methylisobutyl ketone (MIBK) or n-butyl acetate as extractants, and the dispersion of the phases was assisted by agitation in an ultrasonic bath. The shortest extraction time was achieved using n-butyl acetate (1 min). Extraction efficiency increased at acidic pH (less than 3) and with the addition of NaCl to the aqueous phase.

Índice de acrónimos

DLLME-SFO: Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop.

DLLME: Dispersive Liquid-liquid Microextraction.

DSPE: Dispersive Solid-Phase Extraction.

EAU: Ultrasound-Assisted Extraction.

EF: Enrichment Factor.

ETAAS: Electrothermal Atomic Absorption Spectroscopy.

FAAS: Flame Atomic Absorption Spectroscopy.

GC-ECD: Gas Chromatography with Electron Capture Detector.

GC: Gas Chromatography.

HPLC-PDA: High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array Detection.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

Ils: Ionic Liquids.

LLE: Liquid-Liquid Extraction.

LLME: Liquid-Liquid Micro Extraction.

LOD: Limit of Detection.

LPME: Liquid Phase Microextraction.

MAE: Microwave-Assisted Extraction.

MIBK: Methyl Isobutyl Ketone.

MIP: Molecularly Imprinted Polymer.

MS: Mass Spectrometry.

MSPD: Matrix Solid-Phase Dispersion.

PDLLME: Partitioned Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

PF: Preconcentration Factor.

RTILs: Room-Temperature Ionic Liquids.

SA-DLLME: Surfactant-assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

SBSE: Stir Bar Sorptive Extraction.

SFE: Supercritical Fluid Extraction.

SM-DLLME: Supramolecular-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

SPE-DLLME: Solid-Phase Extraction Dispersive Liquid-Liquid Microextraction.

SPE: Solid Phase Extraction.

SPME: Solid Phase Microextraction.

USAEME: Ultrasound-Assisted Emulsification-Microextraction.

UV-Vis: Ultraviolet-Visible.

1 Introducción

La preparación de la muestra es el primer paso y uno de los más importantes del análisis. Es importante aislar los analitos de la matriz y preconcentrarlos, ya que la mayoría de los instrumentos de análisis no son capaces de procesar matrices complejas, puesto que algunos de estos componentes pueden interferir con la detección y cuantificación de los solutos de interés. Los analitos se pueden separar de otros componentes de la muestra que pueden tener estructura o propiedades similares, al aislarlos se reduce la presencia de posibles interferencias, disminuye la complejidad de la matriz y se mejora la selectividad del método analítico, pudiendo lograr una identificación más precisa y una cuantificación más fiable de los analitos de interés. Asimismo, en muchos casos, los analitos se encuentran en concentraciones muy bajas en la matriz de la muestra, por lo que, al preconcentrarlos, aumenta su concentración relativa, lo que mejora la sensibilidad del método analítico (Yan & Wang, 2013).

La extracción es un proceso que consiste en transferir selectivamente los analitos de una fase inicial, generalmente líquida o sólida, a una fase extractora, con el objetivo de aislarlos y concentrarlos para su posterior análisis. Esta etapa de pretratamiento de muestras es esencial para mejorar la sensibilidad y selectividad de los métodos analíticos, así como para reducir la interferencia de otros componentes presentes en la muestra.

En los últimos años, se han desarrollado y optimizado diversas técnicas de extracción, buscando mejorar la eficiencia, rapidez y simplicidad del proceso. Entre estas técnicas, la microextracción y la extracción dispersiva han adquirido gran relevancia debido a su capacidad para extraer analitos en muestras de pequeño volumen, minimizando así el consumo de disolventes y reduciendo los tiempos de análisis.

2 Fundamento teórico

En esta sección, se proporcionará el fundamento teórico necesario para comprender los conceptos y principios fundamentales que sustentan la investigación.

2.1 Técnicas de microextracción

Las técnicas de extracción clásicas como son la extracción líquido-líquido (LLE) o la extracción en fase sólida (SPE), han sido y siguen siendo de las más utilizadas. Sin embargo, presentan una serie de inconvenientes como son el tiempo necesario para su ejecución y el consumo de volúmenes grandes de disolventes orgánicos. También, en la mayoría de las ocasiones en las que los analitos se encuentran a nivel de trazas en la muestra, se hace necesaria una etapa de eliminación de disolvente, ya que los analitos se recuperan en un volumen grande del mismo, lo cual supone un mayor consumo de energía (Zhang & Hu, 2013).

Por todo ello y para evitar el uso excesivo de disolventes, las técnicas de microextracción están ganando terreno en los laboratorios modernos.

La primera técnica de microextracción en desarrollarse fue la microextracción en fase sólida (*Solid Phase Microextraction*, SPME), en la que un pequeño volumen de fase de extracción dispersa sobre un soporte sólido se pone en contacto con la muestra durante un periodo de tiempo (Pawliszyn, 2011). Se utiliza una fibra de sílice fundida recubierta con una fase estacionaria adecuada como medio de extracción, que está unida a una microjeringa. Normalmente, la muestra se libera mediante desorción térmica directamente en el portal de inyección del cromatógrafo de gases (*Gas Chromatography*, GC), pero también puede inyectarse en la fase móvil si se utiliza la cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Fue desarrollada originalmente por Arthur y Pawliszyn en 1990. Las principales ventajas de SPME son la combinación de muestreo y extracción en un solo paso y la capacidad de analizar muestras pequeñas. También puede ofrecer alta sensibilidad y puede utilizarse para analitos polares y no polares en una amplia gama de matrices (Ötleş, 2009).

La microextracción en fase líquida (*Liquid Phase Microextraction*, LPME) o microextracción líquido-líquido (*Liquid-Liquid Microextraction*, LLME), se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada en la preparación de muestras debido a sus ventajas en minimizar el uso de disolventes y su simplicidad. A partir de este punto nos referiremos a dicha microextracción únicamente como LLME para simplificar términos. Fue propuesta como alternativa a las técnicas tradicionales de LLE para superar sus limitaciones. LLME utiliza solo

unos pocos microlitros de disolvente en comparación con las grandes cantidades requeridas en LLE, lo que reduce los costos y el impacto ambiental. La técnica fue desarrollada en la década de 1990 por Arthur y Pawliszyn y ha experimentado avances significativos desde entonces. En LLME, se lleva a cabo una extracción entre una fase acuosa (fase donadora) y una fase inmiscible en agua (fase aceptora), donde los analitos se distribuyen preferentemente hacia la fase aceptora. Esto permite una concentración efectiva de los analitos en la fase orgánica, lo que facilita su posterior análisis. Es una técnica simple, rápida y rentable económicamente que puede usarse para una amplia variedad de analitos en muestras complejas (Hashemi et al., 2017).

Para visualizar la evolución de estas técnicas, se ha generado una gráfica (Fig. 1) que muestra el porcentaje del total de artículos científicos publicados entre el año 2006, que coincide con el diseño de la técnica de microextracción dispersiva líquido-líquido (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME*), y el año 2022, que representa el estado actual de la investigación en el campo. En esta gráfica, se ha representado la proporción de artículos que se refieren específicamente a las técnicas de LLME y SPME.

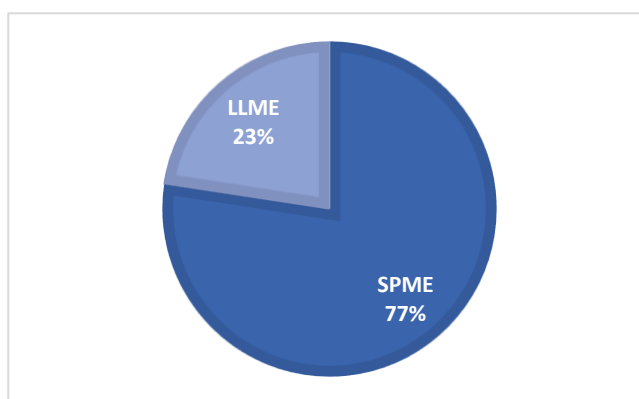


Figura 1. Porcentaje del total de artículos científicos publicados desde el 2006.

La técnica de DLLME es una de las herramientas más utilizadas para el análisis de matrices simples, como muestras de agua. Esta técnica es una modificación de la LLME, desarrollada para aumentar la superficie de contacto entre las fases favoreciendo el proceso de transferencia del analito y por lo tanto aumentando la eficacia y rapidez de la extracción. En DLLME se favorece la formación de pequeñas gotas del disolvente extractante dentro de la fase líquida donde se encuentra la muestra, para lo que se utiliza un disolvente dispersante que es soluble en ambas fases (acuosa y orgánica). Este método fue propuesto en el 2006 por el grupo de investigación de Assadi (Berijani et al., 2006; Rezaee et al., 2006). Esta técnica tuvo un

impacto importante y atrajo inmediatamente la atención de otros investigadores (Farhadi et al., 2009; Fariña et al., 2007; Zhao et al., 2007).

Para visualizar la evolución histórica de las técnicas de DLLME y las microextracciones líquido-líquido no dispersivas, se ha generado una gráfica (Fig. 2) que representa la serie histórica desde el año 2006, año en que se introdujo la técnica DLLME, hasta el año 2022, que refleja el estado actual de la investigación. Al analizar la gráfica, se observa un aumento notable en los primeros años, con un crecimiento muy pronunciado en la utilización de ambas técnicas. Sin embargo, a partir del año 2013, se puede apreciar una estabilización en los niveles de uso, con cambios mínimos en la proporción de artículos publicados sobre DLLME y LLME no dispersivas. Este análisis revela que las técnicas de microextracción líquido-líquido, tanto la DLLME como las LLME no dispersivas, han experimentado una evolución significativa a lo largo de los años, siendo ampliamente reconocidas y utilizadas en el ámbito de la Química Analítica. El crecimiento inicial acelerado indica la aceptación y adopción temprana de estas técnicas, mientras que la estabilización posterior sugiere una consolidación en su uso. Estos resultados son de gran relevancia para comprender la trayectoria histórica de las microextracciones líquido-líquido y su impacto en la investigación analítica. Además, ofrecen una perspectiva valiosa para futuros estudios y desarrollos en este campo, permitiendo identificar áreas potenciales de mejora y explorar nuevas aplicaciones en diversos sectores, como el medio ambiente, la farmacia, la ciencia forense y la industria alimentaria.

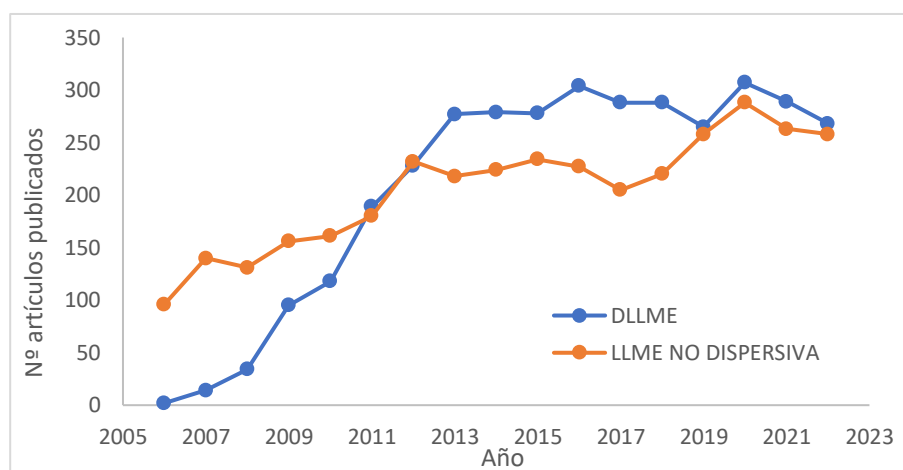


Figura 2. Evolución histórica de las técnicas DLLME.

En la gráfica de la figura 3, se muestra el porcentaje de artículos que corresponde a la técnica DLLME en relación con las LLME en general, en una serie histórica desde 2006. Esta información proporciona una referencia clara sobre la importancia de la DLLME dentro del

conjunto de publicaciones sobre LLME, siendo responsable de aproximadamente el 60% de las investigaciones totales. Esta representación gráfica permite visualizar de manera concisa la relevancia y el impacto de la DLLME en el ámbito de las microextracciones líquido-líquido.

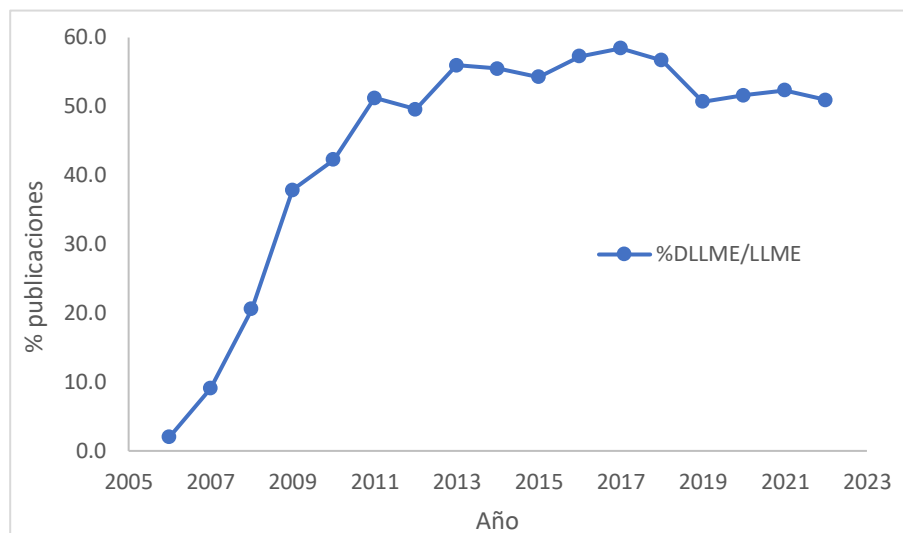


Figura 3. Porcentaje de artículos que corresponde a la DLLME en relación con LLME desde 2006.

Como sugiere el nombre, DLLME es un tipo miniaturizado de LLE, ya que se reduce el volumen utilizado de disolvente a microlitros. Además, el nombre también hace referencia a la dispersión de la fase orgánica en la fase acuosa, lo que mejora la eficiencia de la extracción al mejorarse notablemente la relación de volúmenes entre las fases. Esta miniaturización ofrece ventajas como un menor consumo de disolventes, un menor tiempo de extracción y una mayor sensibilidad analítica. Se establece generalmente en un sistema ternario de disolventes, estos incluyen el disolvente extractante, el dispersante y la fase acuosa de la muestra.

La selección de los disolventes orgánicos es de gran importancia en el proceso de extracción (Viñas et al., 2014).

El disolvente dispersante tiene que ser soluble tanto en el disolvente extractante como en la disolución acuosa, esto permitirá que el disolvente extractante se disperse en forma de pequeñas micelas en la fase acuosa, formando una solución turbia, conocida como *cloudy solution*. Esta dispersión aumenta significativamente la superficie de contacto entre el extractante y la fase acuosa que contiene la muestra, mejorando así la eficacia de la extracción. Los disolventes dispersantes más utilizados comúnmente son el metanol, etanol, acetonitrilo, acetona y tetrahidrofurano (Zang et al., 2009).

El disolvente extractante debe ser inmisible en agua y tener gran afinidad con el analito. Los disolventes clorados fueron los primeros disolventes utilizados en extracciones de DLLME,

debido a su mayor densidad que el agua, ya que así se podría recuperar fácilmente la fase orgánica por centrifugación. Los más utilizados son el tetracloruro de carbono, el cloroformo, el clorobenceno, el diclorometano y el tetracloroetileno (Primel et al., 2017).

Con el objetivo de disminuir la toxicidad de los residuos generados y reducir la exposición del analista, se han comenzado a utilizar otros disolventes como los líquidos iónicos (*Ionic Liquids*, ILs). Modificaciones en la técnica permitieron el uso de disolventes menos densos que el agua, como algunos alcoholes de cadena larga: 1-undecanol, 1-dodecanol, 1-hexanol, 1-octanol, 1-decanol, y los disolventes hexadecano, m-xileno, ciclohexano y hexano (Primel et al., 2017).

El volumen del disolvente extractante utilizado tiene un gran efecto en el factor de enriquecimiento (*Enrichment Factor*, EF) o factor de preconcentración (*Preconcentration Factor*, PF). Al aumentar el volumen de disolvente extractante se incrementa el volumen de la fase orgánica final recuperada mediante centrifugación, lo que da como resultado una disminución de la concentración del analito a determinar en la fase orgánica. Aunque la recuperación de extracción se mantiene casi constante, el factor de enriquecimiento disminuye, lo que conlleva una disminución en la sensibilidad de la determinación del compuesto. Por lo tanto, el volumen óptimo del disolvente extractante debe permitir obtener altos factores de enriquecimiento y recuperar un volumen suficiente después de la centrifugación para llevar a cabo la determinación.

El volumen del disolvente dispersante tiene un impacto directo en la formación de la *cloudy solution* (compuesta por agua, disolvente dispersante y disolvente extractante), así como en el grado de dispersión del disolvente extractante en la fase acuosa y, en consecuencia, en la eficacia de extracción. Al variar el volumen del disolvente dispersante, se modifica el volumen de la fase sedimentada. Por lo tanto, es necesario ajustar simultáneamente los volúmenes del disolvente dispersante y del disolvente extractante para lograr un volumen constante de la fase sedimentada. El volumen apropiado del disolvente dispersante para obtener una *cloudy solution* adecuada depende tanto del volumen de la fase acuosa como del disolvente extractante. El EF se define como la relación entre la concentración del analito en la fase sedimentada (C_{sed}) y la concentración inicial del analito (C_0) en la muestra:

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0}$$

La concentración de C_{sed} se obtiene a partir de una gráfica de calibración adecuada (Rezaee et al., 2010). En general, se utilizan entre 5 y 100 μ L de disolvente extractante (Zang et al., 2009).

Una mezcla de dos disolventes orgánicos, un dispersante y un extractor, se inyecta rápidamente en una muestra acuosa para formar pequeñas gotas que se dispersan por toda la disolución, que se conoce como *cloudy solution*. Esta turbidez se debe a la cosolvencia del dispersante en los otros dos disolventes. El gran número de microgotas emulsionadas hace que el área intersticial sea muy grande, alcanzando muy rápidamente la situación de equilibrio y haciendo que la extracción sea prácticamente instantánea. Tras la extracción, la muestra se centrifuga con el fin de separar las gotas de la fase extractante, que contienen las moléculas de los analitos, que antes estaban en la fase acuosa. El volumen de extractante sedimenta o flota en función de su densidad comparada con la del agua, de forma que se puede recuperar fácilmente con una jeringuilla para su posterior análisis (Viñas et al., 2014).

Entre las principales ventajas de la DLLME se encuentran:

- Consumo insignificante de solventes de extracción, ya que son volúmenes de microlitros.
- Corto tiempo de extracción debido a que el estado de equilibrio se obtiene rápidamente por la gran área superficial.
- El alto EF debido a la alta relación de volúmenes entre el donante (muestra acuosa) y el aceptor (disolvente de extracción).

En consecuencia, la DLLME es una técnica simple, rápida, eficiente y, al mismo tiempo, cumple con los principios de la química verde. Sin embargo, esta técnica también presenta algunas limitaciones, que resultan principalmente de la elección de los disolventes de extracción y dispersión. Por lo tanto, la selección del disolvente extractante es la parte más restrictiva del proceso, ya que pocos disolventes orgánicos cumplen los requisitos necesarios, y de los que los cumplen, la mayoría son hidrocarburos halogenados (Yan & Wang, 2013). Con el propósito de superar estos inconvenientes, los investigadores han intentado recientemente:

- Usar disolventes con una densidad más baja que la del agua.
- Llevar a cabo la extracción sin usar un disolvente dispersor.
- Hacerlo sin necesidad de centrifugación.

Algunas de las soluciones más interesantes son los métodos que emplean dispositivos especiales de extracción. Todos los dispositivos se publicaron aproximadamente en el mismo tiempo, 2009. Todos ellos funcionan con un principio similar, la centrifugación de un disolvente orgánico más ligero que el agua después del proceso de extracción causando, de este modo, su acumulación en la parte superior de la fase acuosa, seguido de una elevación de la película flotante a la parte estrecha del dispositivo mediante la adición de agua y la posterior retirada de

la fase extractante para su análisis con un método químico apropiado. En la figura 4 se ilustran los dispositivos más destacados.

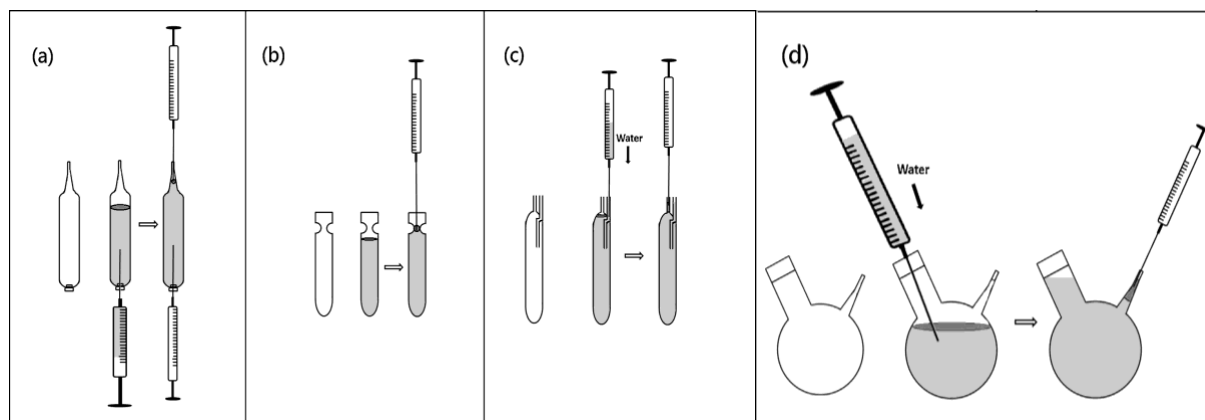


Figura 4. Dispositivos caseros especiales para procedimientos de LLME que utilizan disolventes de extracción menos densos que el agua. (a) el recipiente emplea un septo para inyectar agua destilada; (b) un dispositivo de tubo de vidrio de cuello estrecho; (c) un vial de vidrio con un tubo fijo y un tubo capilar; (d) un dispositivo para la USAEME (Leong et al., 2014).

- Farajzadeh et al. diseñaron un recipiente especial (a) en el que la fase de extracción se eleva a la parte estrecha del recipiente mediante la inyección de 1 mL de agua a través del fondo del recipiente, recuperándola con una microjeringa para su posterior análisis (Farajzadeh et al., 2009).
- Hashemi et al. desarrollaron un dispositivo que consiste en un tubo de vidrio de cuello muy estrecho insertado en el tubo de centrifuga (b). La fase de extracción se acumula en la parte superior de la fase acuosa y, añadiendo agua, se transfiere el disolvente al cuello estrecho para extraerlo posteriormente con una microjeringa (Hashemi et al., 2009).
- Salchc et al. diseñaron un vial de vidrio de centrifuga casero (c) para efectuar la técnica de microextracción de emulsión asistida por ultrasonidos (*Ultrasound-Assisted Emulsification-Microextraction*, USAEME). El disolvente extractante se inyecta lentamente en la muestra acuosa que está en un vial de vidrio de centrifuga en un baño de agua ultrasónico (Semnani et al., 2015).
- Zhang et al. diseñaron un matraz equipado con dos puertos estrechos abiertos, uno de los cuales tiene una punta de irrigación (d). Después de la separación de fases, la fase orgánica se eleva y se acumula en la otra punta estrecha abierta del matraz mediante la adición de agua. De esta forma se reemplaza utilizar un disolvente dispersante por la agitación magnética, y la separación de la fase

orgánica se produce a través de una autoseparación basada en las diferentes densidades, como en la LLE convencional. Al no usar un disolvente dispersante no es necesaria la etapa de centrifugación, que es la etapa limitante en cuanto a tiempo y volumen en cualquier procedimiento analítico basado en DLLME (Zhang et al., 2011).

Las diferencias entre estos diseños aparecen reflejadas en la Figura 4; en (a) se utiliza un tabique para la adición de agua, en (b) el agua se agrega a través de un cuello estrecho y en (c) se utiliza un tubo de vidrio fijado en el lateral del vial para dicho propósito. La fase de extracción siempre es eliminada de la parte superior estrecha de los dispositivos, que difieren únicamente en el tamaño. En conclusión, se puede decir que todos los diseños anteriores poseen tanto ventajas como inconvenientes en función de parámetros como la facilidad con la que se pueden operar, requerimiento de tiempo o habilidades necesarias para utilizar los dispositivos.

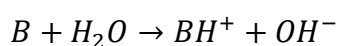
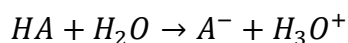
Asimismo, es necesario tener en cuenta los posibles problemas de la LLME asistida por agitación magnética, tales como: la disminución de la eficacia en la mezcla de las dos fases en comparación con el uso de un dispersante o ultrasonidos (con el que a simple vista se aprecia la formación de una dispersión homogénea) la medida en que la extracción mediante agitación magnética es eficaz con el uso de volúmenes mayores de fase acuosa y que después de detener la agitación magnética se requieren cinco minutos adicionales para que todo el disolvente extractante flote en la fase acuosa. Recientemente, Zhang et al. mejoró la LLME asistida por agitación magnética con el uso del dispositivo mencionado al agregar una etapa adicional de re-extracción a modo de preconcentración, lo que provoca una multiplicación de los factores de enriquecimiento.

A pesar de que el uso de diferentes dispositivos especiales es una solución muy inteligente puesto que permite la separación simple y fácil de disolventes extractantes con baja densidad, hay una gran desventaja y es que son recipientes caseros, con la consabida pérdida de reproducibilidad entre laboratorios por diferencias en el diseño. Esta es quizás la razón por la que los investigadores continúan buscando otras soluciones. Como mostraron Bidari et al., al utilizar una película de disolvente orgánico flotando en la superficie de una muestra acuosa, que se puede extraer sin el uso de dispositivos especiales. En este caso, tras la centrifugación, la fase acuosa inferior se extrae primero con una aguja larga, y la fase orgánica sedimentada se elimina posteriormente con una micropipeta (Kocúrová et al., 2012).

Otros parámetros que pueden influir en la extracción y deben ser optimizados, como son el pH de la disolución acuosa y la fuerza iónica, es decir, la presencia de iones en disolución. Si el analito a extraer presenta propiedades ácido-base, que suele ser lo habitual ya que suelen

presentar grupos funcionales ácidos o básicos, el pH de la disolución hace que estos equilibrios ácido-base puedan desplazarse significativamente hacia las formas no disociadas o hacia las formas iónicas (ácido o base conjugada). Por lo tanto, la solubilidad del analito en la fase orgánica, donde pretendemos extraerlo, puede variar significativamente. En el caso de la DLLME, para analitos con carácter básico, el pH de la muestra donde vamos a realizar la extracción debe ser mayor que el valor del pK_a del analito. Si el analito a extraer presenta carácter ácido, el pH deberá ser inferior al pK_a de dicho compuesto. De esta manera, se favorece la presencia mayoritaria de las formas ácidas o básicas sin disociar del analito a extraer. (Maham, M. & Kiarostami, V, s. f.).

La variación del pH suele tener un impacto significativo en la extracción de compuestos orgánicos. Al ajustar el pH de la fase acuosa, se desplaza el equilibrio ácido-base hacia la forma no disociada o hacia la iónica del analito, lo que afecta su solubilidad y capacidad de transferencia entre las fases. Para los compuestos ácidos, un aumento del pH (que corresponde con la disminución de la concentración de iones hidronio en la disolución) favorece su ionización, incrementando su solubilidad en la fase acuosa y reduciendo su extracción en la fase orgánica. Al contrario, una disminución del pH promueve la no ionización de los ácidos, aumentando su solubilidad en la fase orgánica y mejorando su extracción. En el caso de compuestos básicos, un aumento del pH incrementa su capacidad de extracción en la fase orgánica, mientras que una disminución del pH reduce su solubilidad y capacidad de extracción. Es importante considerar que el efecto del pH puede variar según los analitos estudiados y los disolventes utilizados, por lo que se requiere de experimentación y optimización para determinar las condiciones de extracción más adecuadas. Aplicando la teoría ácido-base de Bronsted y Lowry podemos representar los equilibrios acuosos de las especies ácidas y básicas de la siguiente manera:



El aumento o disminución de la concentración de iones H_3O^+ y OH^- , van a desplazar al equilibrio correspondiente hacia la forma no disociada o hacia la especie conjugada cargada.

Para un analito con carácter ácido, a menor pH de la disolución acuosa, se favorece que mayoritariamente el analito se encuentre en la forma no cargada y se extraiga fácilmente en la fase orgánica. Esto es un requisito para una partición/reparto óptima y, por lo tanto, una concentración mayor en la fase orgánica (Maham, M. & Kiarostami, V, s. f.).

El reparto de compuestos químicos de carácter orgánico entre una fase acuosa y otra orgánica, está también condicionada por el contenido de sal en la fase acuosa. Las sales que

actúan como formadoras de estructura, como el cloruro de sodio (NaCl) y otras sales que consisten en iones pequeños, mejoran la estructuración de las fases acuosas y, por lo tanto, la energía cohesiva en el agua debido a sus fuertes interacciones con los dipolos del agua. El aumento de la estructura tiene diversos efectos en las propiedades de la fase acuosa, como un aumento en la viscosidad o el desplazamiento del equilibrio de partición de solutos orgánicos neutros hacia fases no acuosas. Este efecto se conoce como *salting-out* y se utiliza para maximizar la eficiencia de extracción mediante la adición de sal a las muestras de agua. Una descripción cuantitativa de este efecto en solutos orgánicos neutros se proporciona mediante la relación de Setschenow:

$$\log \frac{K_{1,agua\ salina}}{K_{1,agua}} = K^s [sal]$$

donde $K_{1,agua\ salina}$ es el coeficiente de partición de un soluto neutro dado entre la fase 1 y la fase salina, y $K_{1,agua}$ es el coeficiente de partición del soluto entre la fase 1 y el agua pura, $[sal]$ es la concentración de sal en mol L⁻¹ y K^s es el coeficiente de Setschenow en M⁻¹. Este coeficiente es un valor empírico que depende tanto del soluto orgánico como de la sal involucrada (Endo et al., 2012).

Sin embargo, los datos existentes para los coeficientes de Setschenow son muy limitados, incluso para la sal más relevante, el NaCl. Además, en algunos casos existe una desviación sustancial entre los valores reportados por diferentes fuentes para el mismo soluto. El número relativamente pequeño de coeficientes de Setschenow tabulados y las altas incertidumbres en los datos hacen necesario establecer una base de datos fiable que se pueda utilizar para desarrollar un modelo predictivo fiable. Xie et al. revisaron los valores de K^s reportados y encontraron una correlación moderada entre K^s del NaCl y el volumen molar del soluto (Xie et al., 1997). Esta relación se puede explicar razonablemente por un aumento en la energía cohesiva de la solución acuosa debido al NaCl disuelto, lo que conlleva un aumento en el costo de energía de formación de cavidades cuando una molécula del soluto se transfiere a la solución acuosa. Esto provoca, a su vez, una menor partición del soluto en la solución acuosa, lo que produce un efecto de *salting-out*. Este efecto es mayor para solutos con un tamaño molecular grande, ya que son más sensibles al aumento en la energía cohesiva. A pesar de la correlación entre K^s y el volumen molar, Xie et al. sugirieron un factor constante de *salting-out* de 1.36 para utilizar en la modelización de la distribución para tener en cuenta las diferencias en los coeficientes de partición entre agua dulce y agua de mar de cualquier compuesto,

aparentemente porque los datos observados presentaban una dispersión grande y la correlación con el volumen molar no era fuerte. Posteriormente, Schwarzenbach et al. (Schwarzenbach et al., 2017) revisaron los datos de la literatura y mencionaron que tanto el tamaño como la polaridad del soluto pueden contribuir a K^S .

Existe una falta de acuerdo general en la literatura con respecto al/los factor/es que determinan la magnitud de los efectos de *salting-out* (Endo et al., 2012). Por lo tanto, al adicionar sal aumenta el efecto *salting-out*, mediante el cual las moléculas de agua de las esferas de hidratación alrededor de las sales iónicas reducen el número de moléculas de agua disponibles para solvatar y disolver al analito y, por lo tanto, disminuyen la solubilidad del analito en la fase acuosa mejorando la transferencia del analito a la fase orgánica. También puede producirse la disminución en la eficacia de extracción debido al aumento de la viscosidad de la solución, lo que reduce la velocidad de difusión del analito en el disolvente extractante (Maham, M. & Kiarostami, V, s. f.). La disolución de NaCl en agua también puede cambiar las propiedades físicas de la película de difusión de Nernst y reducir la velocidad de difusión de los analitos hacia el disolvente de extracción. La velocidad y eficacia de extracción dependen en gran medida de la cinética de transferencia de masa a través de esta capa de difusión. La película de difusión de Nernst puede influir en la separación al actuar como una resistencia a la transferencia de masa. Es importante controlar la cinética de difusión y minimizar el espesor de esta capa para lograr una extracción eficiente y selectiva (Xiong & Hu, 2008).

Ante los méritos propios de la técnica DLLME, como la simplicidad, la rapidez de operación, el bajo coste, el alto factor de enriquecimiento y la reducción de impacto ambiental negativo, la técnica DLLME parece ser accesible para la mayoría de los laboratorios y, además, con los altos factores de enriquecimiento que proporciona se pueden diseñar métodos de análisis muy sensibles con técnicas que lo son poco. La DLLME es compatible con técnicas de HPLC con detección mediante espectrofotometría ultravioleta visible (*Ultraviolet-Visible*, UV-Vis) con diodos alineados (*High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode Array detection*, HPLC-PAD), fluorescencia o espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*, MS), así como con la GC, espectrometría de absorción atómica, tanto con atomización de llama (Flame Atomic Absorption Spectrometry, FAAS) como electrotérmica (Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, ETAAS), y espectrofluorimetría. Por lo tanto, DLLME tiene especial consideración y ha sido ampliamente aceptada, tal y como se refleja en su aparición en un número cada vez mayor de artículos originales y revisiones desde la introducción de la técnica (Kocúrová et al., 2012; Martín et al., 2015; Primel et al., 2017).

En los años siguientes, basándose en la configuración original de DLLME, se llevaron a cabo muchos trabajos científicos que extraían y/o preconcentraban diversos contaminantes (pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorados, etc.) (Hashemi et al., 2017), fármacos (como la furosemida) (Rezazadeh et al., 2018), compuestos orgánicos de interés alimentario (Viñas et al., 2014) e, incluso, iones metálicos de muestras acuosas (El-Shahawi & Al-Saidi, 2013). Estos trabajos fueron los precursores de la expansión de la técnica para el análisis de diferentes analitos con diferentes técnicas. Desde entonces, se han hecho esfuerzos significativos hacia DLLME para obtener más enfoques eficientes y simples para ampliar aún más la gama de aplicaciones de la técnica. A continuación, se comentan algunos de los avances más importantes:

❖ Expansión de disolventes de extracción.

Debido a que los disolventes de extracción comúnmente utilizados son tóxicos y están limitados a la extracción de varios analitos con diferentes polaridades, es necesario buscar otros disolventes disponibles para DLLME. Esta búsqueda se ha centrado en dos aspectos diferentes: el uso de nuevos disolventes y la expansión del campo de uso utilizando disolventes orgánicos polares y de baja densidad.

➤ Utilización de ILs.

Los ILs, conocidos como “disolventes verdes”, son un grupo de sustancias no moleculares que se pueden definir como sales orgánicas que se mantienen en un estado líquido a temperatura ambiente (*Room Temperature Ionic Liquids*, RTILs). Estos disolventes poseen varias propiedades fisicoquímicas únicas, como una presión de vapor despreciable, una viscosidad variable y una alta estabilidad térmica. Teniendo en cuenta las diversas combinaciones de cationes orgánicos y de varios aniones, ILs pueden adaptarse estructuralmente para ser hidrofóbicos o hidrofílicos, así como miscibles o inmiscibles con el disolvente dispersante en DLLME en una técnica llamada microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por líquidos iónicos (*Ionic Liquid-Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, IL-DLLME) (Yan & Wang, 2013).

➤ Utilización de disolventes orgánicos menos densos que el agua.

Desde la primera configuración propuesta para DLLME, se ha requerido que el disolvente de extracción inicialmente definido tenga una densidad mayor que la del agua para facilitar la separación de fases mediante centrifugación y la recogida de los disolventes. Sin embargo, debido al aumento de la preocupación respecto a la toxicidad y la restricción de los disolventes clorados, se han comenzado a considerar los disolventes menos tóxicos, así como aquellos con densidades más bajas, como los alcoholes de cadena

larga o los hidrocarburos. Debido a que las gotas de extractante flotan en la superficie de la muestra acuosa después de la extracción, varios estudios se han centrado en la mejora de la recolección de estas gotas extractantes y han dado lugar al desarrollo de nuevas metodologías.

- Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva con Solidificación de Gota Orgánica Flotante (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Solidification of Floating Organic Droplet*, DLLME-SFO).
- DLLME basado en dispositivos de extracción mejorados o estrategias de recolección.
- DLLME basado en el uso de un disolvente auxiliar.
- DLLME de base supramolecular (*Supramolecular-Based Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, SM-DLLME).

❖ DLLME basado en el empleo de varios disolventes dispersantes.

En la técnica DLLME, la miscibilidad del disolvente dispersante tanto en el disolvente de extracción como en la fase acuosa es esencial. En esta técnica, metanol, acetona, acetonitrilo y etanol son frecuentemente seleccionados como disolventes dispersantes. Debido a la polaridad de estos disolventes, los analitos, especialmente cuando los compuestos son más polares, pueden solubilizarse, en parte, en ellos, lo que hace que el coeficiente de partición de los analitos con el extractante se reduzca, conduciendo a una disminución de la eficacia en la extracción. Por lo tanto, se desarrolló un nuevo método llamado microextracción dispersiva líquido-líquido particionada (*Partitioned Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, PDLLME), para la extracción de compuestos polares orgánicos de muestras de agua. Con esta técnica se mejora la eficacia de extracción al elegir un disolvente dispersante que puede ser particionado en las gotas de extractante. La naturaleza polar del disolvente dispersante permite la partición de los analitos polares en el dispersante, lo que aumenta la cantidad de analitos transferidos a las gotas de extractante. Una pequeña porción de los analitos es extraída en el disolvente dispersante, además de la extracción que ocurría en las gotas de extractante orgánico (Yan & Wang, 2013). Como disolvente dispersante se puede utilizar tetrahidrofurano que puede ser repartido en las gotas de disolvente orgánico (extractante) que contiene el analito, lo que da como resultado un aparente aumento del volumen de la fase orgánica sedimentada. También se han estudiado surfactantes como el bromuro de hexadeciltrimetilamonio para actuar como disolvente dispersor debido a su anfipatía. En la llamada microextracción líquido-líquido dispersiva asistida por surfactante (*Surfactant-assisted Dispersive Liquid-Liquid*

Microextraction, SA-DLLME), los surfactantes contribuyen en gran medida a la dispersión de disolventes orgánicos en la fase acuosa, así como a una reducción significativa de la tensión superficial entre dos fases, mostrando un mejor efecto que los disolventes de uso común. Moradi et al. afirman que el bromuro de hexadeciltrimetilamonio, que es un tensioactivo catiónico, podría formar pares iónicos con clorofenoles, el analito objetivo de su estudio, en un medio alcalino, lo que probablemente mejoraría la eficacia de la extracción. Se concluyó que la SA-DLLME parece ser una herramienta útil para la extracción rápida de compuestos orgánicos (Moradi et al., 2010). Además, los surfactantes siempre han exhibido varias ventajas analíticas, entre las que se cuentan el bajo costo, el fácil manejo y la ausencia de efectos tóxicos. Como consecuencia, los tensioactivos fueron considerados como una nueva opción para la selección de disolventes dispersantes en DLLME por lo que se estudiaron otros surfactantes, como Triton X-114, laurilsulfato sódico y bromuro de tetradeciltrimetilamonio, demostrando, así, su viabilidad como disolventes dispersantes efectivos. En términos generales, varios disolventes tienen el potencial de ser empleados como disolventes dispersantes en diferentes casos, siguiendo los principios básicos. Además, en relación con la reducción del volumen de disolvente y a la inevitable pérdida de analitos en el dispersante, la técnica DLLME en ausencia de disolvente dispersante se lleva a cabo en algunas aplicaciones en las que la extracción emulsionable se logra con la ayuda de ultrasonidos, agitación de vórtex, control de temperatura (sólo para algunos ILs) o incluso métodos asistidos por aire (Yan & Wang, 2013).

❖ Combinación de DLLME con otras técnicas de extracción.

La técnica DLLME se aplicó originalmente al análisis de muestras con las matrices más sencillas, principalmente agua, en función de su configuración. Assadi y sus compañeros exploraron la combinación de las técnicas SPE y DLLME para la extracción y preconcentración de clorofenoles en matrices complejas, como soluciones salinas. Para la detección utilizaron cromatografía de gases con detección por captura de electrones (Gas Chromatography with Electron Capture Detector, GC-ECD), la combinación proporcionó un factor de ultra enriquecimiento para muchos clorofenoles y, consecuentemente, un menor límite de detección (*Limit of Detection*, LOD). Basándose en la tecnología ya desarrollada y la buena adaptabilidad a múltiples matrices de muestras de la SPE, esta técnica podría contribuir a aumentar la aplicabilidad de la DLLME. Además, como el mismo disolvente actúa con dos naturalezas en los dos procedimientos, también demostró la viabilidad de dicha combinación. La técnica Extracción en Fase Sólida Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva. (*Solid-Phase Extraction Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, SPE-DLLME) mejorada fue

posteriormente aceptada ampliamente y aplicada a varias muestras complejas, como muestras de vino o leche, con el fin de analizar varios compuestos orgánicos (Yan & Wang, 2013). Desde entonces, un gran número de estudios se han centrado en la unión de la técnica DLLME con otras técnicas de purificación o extracción, explorando la compatibilidad con diferentes muestras (Farajzadeh et al., 2010; Wang et al., 2012; Wu et al., 2009).

Hasta la fecha, los trabajos publicados han mostrado amplias combinaciones asociadas con: extracción por sorción con barra agitadora (Stir Bar Sorptive Extraction, SBSE), extracción en fase sólida dispersiva (Dispersive Solid-Phase Extraction, DSPE), extracción con polímeros de impresión molecular (Molecularly Imprinted Polymer, MIP), extracción en fase sólida por dispersión de matriz (Matrix Solid-Phase Dispersion, MSPD), extracción con fluidos supercríticos (Supercritical Fluid Extraction, SFE), extracción asistida por ultrasonidos (Ultrasound-Assisted Extraction, EAU) y extracción asistida por microondas (Microwave-Assisted Extraction, MAE).

Al aplicar la técnica DLLME en el eluyente o el extractante obtenido (actuando como un disolvente dispersante o donante acuoso) en un procedimiento previo de extracción, se han podido analizar muestras muy variadas, incluyendo aguas ambientales complejas, suelos o sedimentos, comida o incluso aditivos de tabaco y productos de madera. Además, se consiguieron niveles significativamente mayores de selectividad y sensibilidad debido al enfoque combinado (Yan & Wang, 2013).

2.2 Análisis fluorimétrico

En este trabajo, la técnica seleccionada para determinar el analito es la fluorimetría, por lo que en este apartado se comentarán las características más relevantes de dicha técnica.

2.2.1 Fundamento de la fluorescencia molecular

En la fluorescencia molecular, las moléculas del analito se excitan mediante la irradiación con luz ultravioleta. Los compuestos que presentan fluorescencia, después de absorber esta radiación, para estabilizarse, emiten radiación de mayor longitud de onda que la de excitación (Fig. 5).

Las moléculas tienen niveles electrónicos permitidos, como los niveles σ y π . Los electrones σ están involucrados en enlaces simples y múltiples, mientras que los electrones π son característicos de sistemas aromáticos y enlaces múltiples. Si los espines de los electrones de un nivel de energía determinado tienen direcciones de giro opuestas, se dice que están apareados y la

molécula está en un estado "singlete". Sin embargo, si hay dos electrones desapareados con el mismo sentido de giro, se dice que está en un estado "triplete".

Al excitar una molécula, ocurren diversas transiciones energéticas de los electrones. Por ejemplo, si un electrón π es excitado a un nivel superior π^* , el estado resultante es un singlete π,π^* si no hay cambio de giro, pero es un triplete π,π^* si el giro cambia.

Cuando la molécula en el estado π,π^* regresa a su estado fundamental, parte de su energía se emite como radiación característica, lo cual se conoce como fluorescencia. La fluorescencia es la emisión de luz que puede ocurrir al desactivar un sistema singlete π,π^* . Si el estado excitado es un triplete π,π^* , la baja probabilidad de inversión de giro resulta en una emisión de luz retardada, conocida como fosforescencia.

Las moléculas que contienen átomos de oxígeno o nitrógeno también tienen electrones de tipo n (electrones no enlazantes). Cuando uno de estos electrones n es excitado a un nivel π^* (estado n,π^*), hay otros procesos de disipación de energía que compiten con la emisión de luz, por lo que no se produce fluorescencia. Sin embargo, la probabilidad de excitación de estos electrones n disminuye considerablemente cuando se utilizan para formar un enlace, por ejemplo, al combinarse con un ion metálico para formar un complejo. En estas condiciones, el estado π^* se vuelve más probable al excitar la molécula, lo que puede dar lugar a una fluorescencia intensa.

Las sustancias fluorescentes son principalmente compuestos orgánicos aromáticos (como benceno, naftaleno, antraceno y sus derivados) o complejos metálicos de reactivos fluorógenos. Los reactivos fluorógenos suelen contener dos o más anillos aromáticos unidos por un enlace no saturado que contiene oxígeno o nitrógeno. Además, para facilitar la formación del complejo, la molécula puede contener grupos sulfonato, hidroxilo o amina.

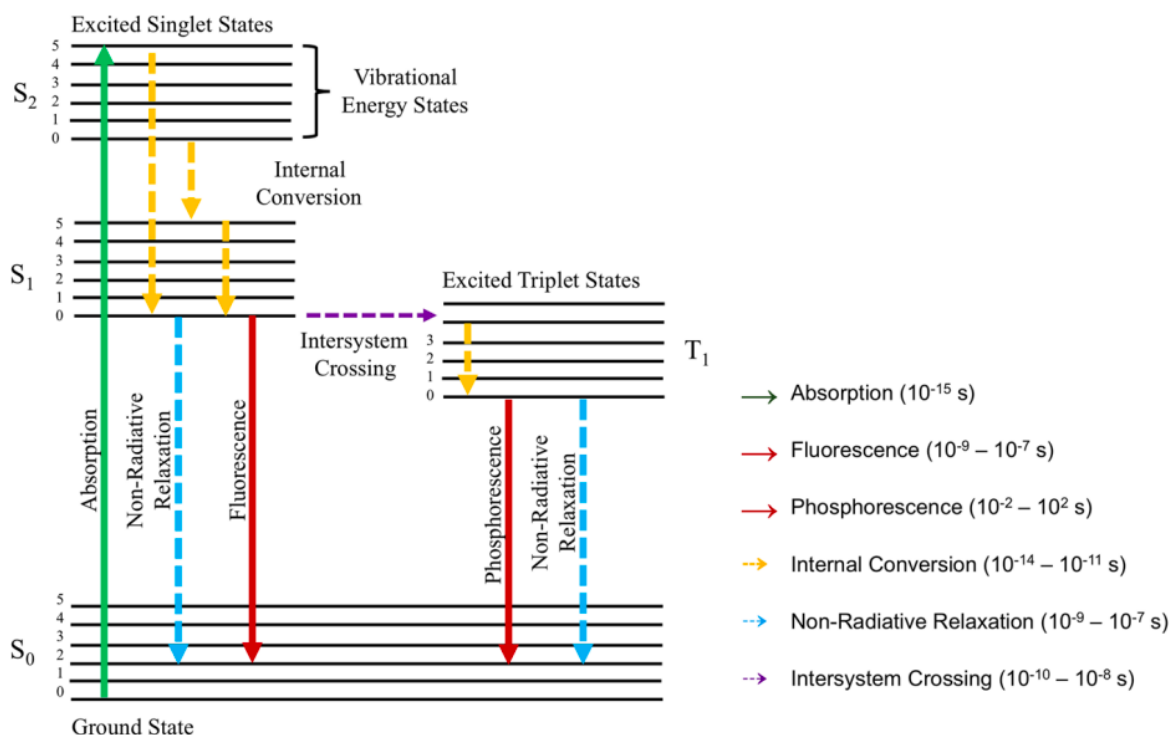


Figura 5. Diagrama de niveles de energía de una molécula (diagrama de Jablonski) y representación de la emisión fluorescente por para la desactivación desde un estado excitado. S: estados singletes (pares de espines), T: estados tripletes (espines desapareados). Las líneas sólidas representan procesos radiantes, las líneas discontinuas no radiantes (Gomes et al., 2019).

En el análisis fluorimétrico, se utilizan fuentes de excitación como tubos fluorescentes especiales, lámparas de vapor de mercurio y lámparas de arco de xenón. Mediante filtros o un monocromador de excitación, se seleccionan bandas específicas de radiación de la fuente, que se dirigen hacia la muestra, generalmente en disolución. La radiación fluorescente emitida por la muestra se separa utilizando filtros o un segundo monocromador (de emisión), y su intensidad se mide mediante un fototubo sensible. El diseño del equipo garantiza que la radiación de excitación no incida en el detector, y se incluyen sistemas de diafragmas para eliminar cualquier excitación no deseada del detector y reducir la fatiga del mismo. En la figura 6 se muestra un esquema de un fluorímetro.

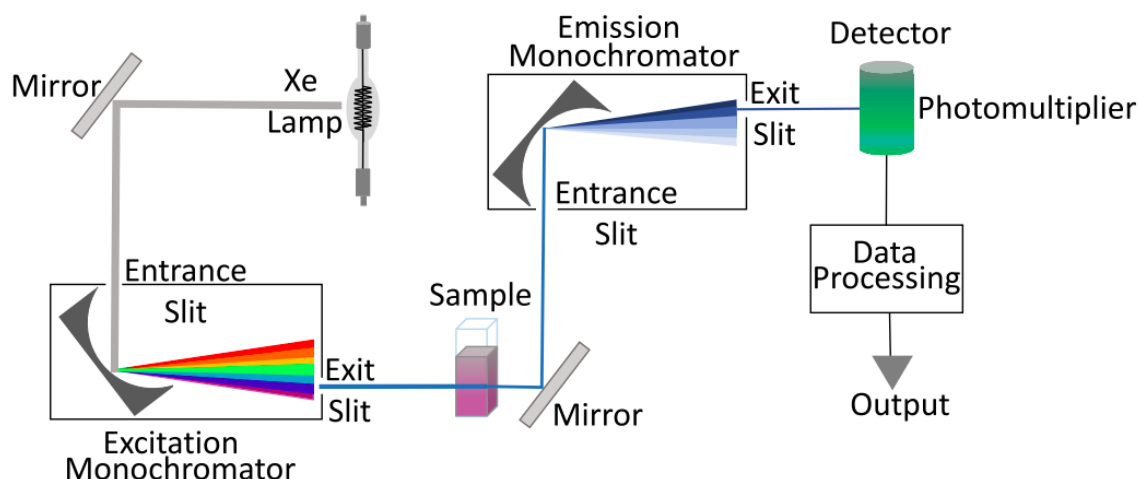


Figura 6. Representación esquemática de los componentes principales de un espectrofluorímetro (Gomes et al., 2019).

La selección de la longitud de onda más adecuada para la excitación se basa en las siguientes consideraciones: debe ser emitida intensamente por la fuente de excitación y también debe ser absorbida de manera significativa por la muestra. Además, es importante que se pueda separar fácilmente de la radiación de fluorescencia, por ejemplo, mediante el uso de filtros. Muchas soluciones fluorescentes contienen coloides que dispersan la luz incidente, por lo tanto, se recomienda que la longitud de onda de la radiación de excitación y la de la emisión de fluorescencia difieran al menos en 50 nm.

Una vez que se ha seleccionado la fuente de excitación, la elección de la longitud de onda adecuada para medir la intensidad de fluorescencia se realiza observando la emisión de fluorescencia en función de la longitud de onda.

El análisis por fluorescencia se utiliza principalmente para la determinación de trazas de sustancias, por lo que es importante tomar precauciones para evitar la contaminación de las muestras. Es necesario tener en cuenta que los disolventes comunes a menudo contienen sustancias fluorescentes, que los tapones pueden contener sustancias fluorescentes extraíbles, y que la grasa y las fibras de papel también pueden introducir especies interferentes. Si bien la mayoría de los trabajos se han realizado con sustancias disueltas, también existen equipos que permiten trabajar con muestras sólidas.

En cada serie de determinaciones fluorimétricas, es recomendable realizar un ensayo en blanco y trabajar con al menos dos soluciones patrón de concentración conocida que abarquen el rango de concentraciones que se pretende medir. Para soluciones muy diluidas con un bajo grado de absorción de luz, se ha demostrado que la relación entre la intensidad de fluorescencia (F) y la concentración (c) es aproximadamente lineal, es decir:

$$F = \varphi I_0 abc = Kc$$

donde φ es el rendimiento cuántico de fluorescencia (relación entre la luz emitida y la luz absorbida), I_0 es la intensidad de la luz incidente, a es la absorptividad multiplicada por 2,303, b es la longitud del camino óptico. K es la constante empírica de proporcionalidad determinada en las condiciones experimentales utilizadas.

Es recomendable verificar la validez de esta ecuación mediante la construcción de una curva de calibración cada vez que se trabaja con un nuevo sistema.

La principal ventaja de los métodos de fluorescencia radica en su alta selectividad y sensibilidad, que permite detectar la presencia de hasta 0,01 ppm en muchos casos. Con equipos de buena calidad, se puede lograr una precisión de +/- 1%, pero para obtener una precisión similar, es necesario prestar una atención cuidadosa a todos los detalles operativos y eliminar todas las posibles fuentes de error, que son numerosas. Por ejemplo, si la intensidad de fluorescencia depende fuertemente del pH, es necesario trabajar en un medio cuidadosamente tamponado. En otros sistemas, se ha encontrado que la intensidad de fluorescencia es función del tiempo debido a la destrucción fotoquímica de la molécula fluorescente.

La aplicación analítica de esta técnica es relativamente limitada, ya que solo un número reducido de elementos y compuestos presenta fluorescencia definida. Entre los procedimientos publicados, se incluyen la determinación de trazas de elementos en aleaciones metálicas y silicatos. Sin embargo, sus aplicaciones en medicina clínica y análisis de alimentos son especialmente interesantes (Pickering, 2021; *Principios de análisis instrumental*, 2019).

2.2.2 Análisis de espectros de fluorescencia.

En el campo de la fotoluminiscencia, a diferencia de la fotometría que trabaja con un único espectro de absorción, se utilizan dos espectros distintos: el espectro de excitación y el espectro de emisión. El espectro de excitación muestra la absorbancia del analito en diferentes longitudes de onda, que induce la fluorescencia o fosforescencia en el fluoróforo. Por otro lado, el espectro de emisión muestra la intensidad relativa de la radiación emitida en diferentes longitudes de onda.

Es importante destacar que el espectro de excitación debería ser similar al espectro de absorción, con la longitud de onda de máxima excitación coincidiendo con la de máxima absorción, que provoca la máxima fluorescencia. Sin embargo, las diferencias instrumentales entre un espectrofotómetro y un espectrofluorímetro, como la respuesta del fotomultiplicador y

la existencia de selectores de longitudes de onda, hacen que ambos espectros no coincidan plenamente.

Tanto en el espectro de excitación como en el de emisión se puede observar una banda denominada "*scatter*" cuando las longitudes de onda de excitación y emisión coinciden. Esta banda se debe al "efecto Rayleigh", que ocurre cuando un electrón es excitado por un fotón y pasa a un nivel vibracional de energía superior sin producir una transición electrónica. La energía se conserva totalmente y el fotón se emite cuando el electrón vuelve al estado fundamental, en un proceso de corta duración. En consecuencia, la radiación emitida tiene la misma longitud de onda que la absorbida.

Otra banda que aparece en el espectro de emisión, cerca del *scatter*, es la banda Raman, que se origina por la interacción de los fotones de la radiación con los enlaces de las moléculas del disolvente. Este efecto Raman genera una banda de menor energía (mayor longitud de onda) que la del efecto Rayleigh.

Además de las bandas mencionadas, como la emisión luminiscente, *scatter* y Raman, pueden aparecer bandas adicionales en el espectro de emisión debido a posibles impurezas en el disolvente o los reactivos utilizados. Por esta razón, es necesario realizar siempre un ensayo en blanco para poder identificar y restar cualquier contribución de las impurezas presentes en la muestra.

Para estudiar cuantitativamente la luminiscencia de una sustancia, el primer paso consiste en determinar las longitudes de onda características de excitación y emisión. La forma de realizar esta determinación varía según se disponga de un fluorímetro o de un espectrofluorímetro.

En el caso de utilizar un fluorímetro, se emplea un espectrofotómetro para obtener la longitud de onda de absorción máxima, que corresponde a la de excitación máxima. Luego, se elige el filtro primario que mejor se ajuste a esta longitud de onda y, si se utiliza una lámpara de mercurio como fuente de excitación, se selecciona una línea espectral de dicha fuente. A continuación, se elige el filtro secundario, probando valores crecientes en intervalos de 50 nm, comenzando desde $\lambda_{\text{ex}} + 50 \text{ nm}$, hasta obtener la máxima fluorescencia.

En el caso de contar con un espectrofluorímetro, hay dos situaciones a considerar. En los instrumentos actuales, se dispone de un sistema de "*prescan*" que, mediante escaneos repetitivos de excitación y emisión, localiza automáticamente los máximos característicos del fluoróforo. No obstante, es recomendable verificar esta selección registrando los respectivos espectros de excitación y emisión.

En el caso de que el instrumento no disponga de esta opción, la búsqueda de los máximos se realiza manualmente. Para ello, se posiciona el monocromador de emisión de manera que permita el paso de toda la radiación emitida hacia el detector, y se registra el espectro de excitación. Este espectro debe presentar un máximo correspondiente a la máxima excitación del fluoróforo. Luego, se fija esta longitud de onda en el monocromador de excitación y se realiza un barrido del monocromador de emisión para obtener la máxima longitud de onda de emisión. Por último, se vuelve a registrar el espectro de excitación, fijando la longitud de onda de emisión seleccionada en el monocromador de emisión, con el fin de comprobar que la longitud de onda de excitación inicialmente seleccionada es la correcta (Ríos Castro, 2012).

Hoy día, prácticamente todos los espectrofluorímetros realizan la función que se conoce como *prescan* que permite para ajustar las condiciones experimentales óptimas. Para ello, se rellena la cubeta con una disolución del analito a determinar en una concentración suficiente para obtener una señal apreciable. Automáticamente el equipo hace un barrido de λ de excitación, desde 200 a 800 nm, para comprobar cuál de ellas es la que produce una mayor señal. Una vez seleccionada, fija la λ de excitación y a ese valor, hace un barrido de las λ emitidas por la molécula, obteniendo así la que se conoce como λ de emisión, que es aquella a la que se obtiene la mayor emisión fluorescente. El proceso se representa en la figura 7.

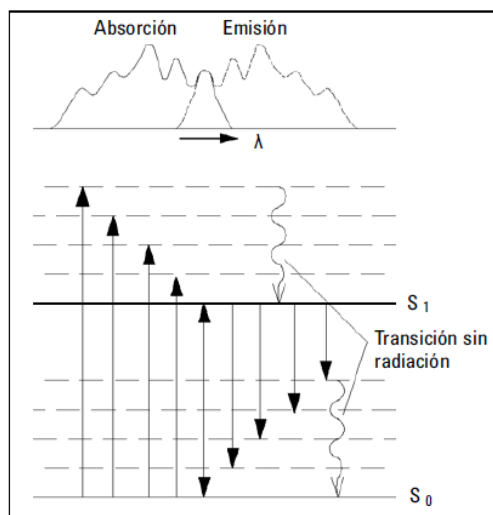


Figura 7. Obtención de las longitudes de onda óptimas de trabajo (Agilent Technologies, 2013).

2.3 Furosemida

La furosemida, es un diurético de asa que se ha utilizado en el tratamiento de una variedad de afecciones, como la insuficiencia cardíaca congestiva, edema e hipertensión arterial. El grupo de los diuréticos de asa, incluye compuestos con amplias diferencias en estructuras moleculares y propiedades físico-químicas (Granero et al., 2010).

La furosemida actúa bloqueando la absorción de sal y líquido en los túbulos renales, lo que provoca un aumento de la producción de orina (diuresis). Su mecanismo exacto de acción se cree que ocurre en la superficie luminal del asa ascendente del asa de Henle, donde inhibe la reabsorción activa de cloruro. Esto ayuda a reducir la carga de líquidos en el organismo y disminuir la presión arterial en el caso de la hipertensión (Espinosa Bosch et al., 2008).

Además de su uso en el tratamiento de afecciones cardiovasculares y renales, la furosemida también se utiliza para tratar la hipertensión arterial. Sin embargo, su uso requiere una supervisión médica cuidadosa debido a su potencial para causar una disminución de agua y electrolitos en el cuerpo. Esto se debe al efecto diurético de la furosemida, que puede llevar a desequilibrios electrolíticos, como la hipopotasemia (Mariano et al., 2019).

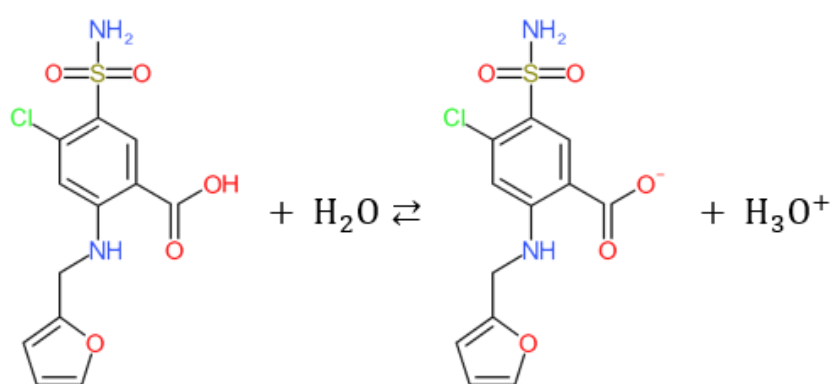
La furosemida muestra un comportamiento farmacocinético altamente variable debido a diferencias entre individuos y protocolos de estudio, así como a diferencias en la función de los órganos. Estos factores son relevantes considerando los pacientes que reciben terapia con furosemida. Además, las técnicas utilizadas para estimar los parámetros farmacocinéticos pueden presentar problemas, especialmente en la estimación de la semivida terminal. Sin embargo, se ha encontrado que los trabajos en los que se han utilizado técnicas más específicas sensibles, como la cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia, proporcionan resultados más consistentes (Espinosa Bosch et al., 2008).

La biodisponibilidad de la furosemida a partir de formas farmacéuticas orales es altamente variable. Se supone que esto se debe a la baja solubilidad del compuesto, absorción específica en ciertos sitios, metabolismo presistémico y/o otros mecanismos desconocidos. Además, la furosemida se une en gran medida a las proteínas plasmáticas, principalmente a la albúmina. Aunque el fármaco es insoluble en agua y tiende a acumularse en tejido graso, la alta unión a proteínas plasmáticas restringe el volumen aparente de distribución en estado de equilibrio a valores dentro de un múltiplo de 2 a 5 veces el volumen plasmático. En términos de eliminación, la furosemida se excreta principalmente a través de los riñones (Mariano et al., 2019). Las concentraciones plasmáticas de furosemida no muestran correlaciones significativas con la respuesta diurética. En cambio, la concentración del fármaco en la orina se ha relacionado

directamente con su actividad diurética. Esto sugiere que la respuesta clínica a la furosemida está más relacionada con su concentración en la orina que en el plasma.

En la lista de los cien medicamentos más vendidos en España, aparece la furosemida bajo la marca comercial Seguril, en el puesto 23 y el genérico del laboratorio *Cinfa* en el puesto 94, lo que da una idea de su elevado consumo y por lo tanto importancia («Los 100 más vendidos», 2008).

La furosemida es un compuesto que presenta propiedades ácido-base, siendo el valor del pK_a igual a 3,8 (Devi et al., 2020). Por lo tanto las disoluciones acuosas de furosemida participan del siguiente equilibrio:



Es importante desarrollar métodos analíticos sensibles y fiables para determinar la concentración de furosemida tanto en plasma y orina, especialmente en pacientes con enfermedades y en estudios terapéuticos. También sería importante su análisis en las aguas residuales por los posibles efectos nocivos que puede tener sobre la fauna acuática. Estos métodos permitirán evaluar la actividad diurética de la furosemida y comprender su cinética en diferentes condiciones.

3 Objetivos

El objetivo general de este trabajo de fin de grado es:

1. Desarrollar y aplicar a una muestra real un método de análisis para la determinación de furosemida utilizando la técnica espectrofluorimétrica, llevando a cabo una etapa de preconcentración mediante microextracción/extracción dispersiva.

Se buscó a obtención de resultados precisos y exactos para cuantificar la presencia de furosemida en muestras. Realizando etapas de optimización experimental y de preparación de muestras, para ofrecer una herramienta que sea precisa y eficaz para poder evaluar la presencia de furosemida en diferentes contextos, tanto en investigación científica como en el ámbito clínico.

Para alcanzar este objetivo principal se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar y comprender los principios teóricos y fundamentos de la técnica de extracción dispersiva líquido-líquido, incluyendo la microextracción.
2. Evaluar la viabilidad de la técnica de extracción dispersiva en combinación con un espectrofluorímetro para determinar analitos. Utilizar eficientemente el espectrofluorímetro para cuantificar los analitos extraídos.
3. Optimizar las condiciones de microextracción para maximizar la eficacia y selectividad del método.
4. Aplicar a muestras reales, en este caso, a formulaciones farmacéuticas de furosemida.

4 Experimental

En este apartado se describen los equipos utilizados y materiales de referencia, con los cuales se realiza el trabajo.

4.1 Materiales

4.1.1 Instrumentación

4.1.1.1 Instrumentación habitual de laboratorio

- Eppendorfs y tubos de microcentrífuga.
- Pipetas y micropipetas.
- Jeringas Hamilton de 25 μ L, 50 μ L y 1000 μ L.
- Agitador magnético

4.1.1.2 Equipos

- Balanza analítica, Metler Toledo AE 240
- Equipo de obtención de agua miliQ, Autwomatic Plus 1+2, Wasserlab
- pHmetro, CRISON, pH METER GLP22
- Ultrasonidos
- Centrífuga Beckman Coulter, modelo Allegra 21R Centrifuge
- Centrífuga eppendorf, modelo Centrifuge 5430
- Espectrofotómetro UV-Vis, Cary 60 UV-Vis
- Espectrofluorímetro, Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer

4.1.2 Reactivos

Los reactivos utilizados y su grado de calidad y aparecen reflejados en la tabla 1.

Tabla 1. Reactivos utilizados, grado de calidad y solubilidad en agua de los poco solubles.

Dispersante	Extractante	Solubilidad en agua (g/L) 25°C
1,4-butanodiol ^a	1,2-dicloroetano ^c	7,9
Metanol ^d	1,1,1-tricloroetano ^b	1,3
Acetona ^b	Clorobenceno ^b	0,5
Acetonitrilo ^e	Diclorometano ^a	20
Alcohol isobutílico ^c	Tetracloroetileno ^b	0,15
Alcohol isopropílico ^b	Tetracloruro de carbono ^a	Insoluble
Butan-1-ol ^b	Triclorometano ^a	4,6
Ciclohexanona ^e	Acetato de n-butilo ^a	5,3
Etil metil cetona ^b	MIBK ^a	14,1
Etanol ^b		
Éter etílico ^b		

a: PANREAC (PRS); b: MERCK (PA); c: CARLO ERBA (HPLC); d: LAB-SCAN (HPLC) e: PROBUS (QP)

Todas las disoluciones acuosas fueron preparadas con agua Tipo I (Milli-Q).

Una vez procesadas todas las muestras, se vertían en los bidones/contenedores facilitados por el Servicio de Gestión de Residuos Tóxicos y Peligrosos, para su posterior tratamiento.

4.2 Metodología

4.2.1 Estudios preliminares

En primer lugar, se planteó la posibilidad de encontrar los disolventes (dispersantes y extractantes) más adecuados para añadir a la fase acuosa y que se forme la dispersión que permita la microextracción, con independencia del analito que se vaya a estudiar. La formación de la fase dispersa es el primer paso necesario para que se pueda producir la microextracción. Se prepararon distintas relaciones de volúmenes de las fases dispersantes y del extractante, 1:10, 1:5 y 1:1. Hay que tener en cuenta, que el extractante ha de ser soluble en el dispersante y el extractante prácticamente insoluble en la fase acuosa, para poder recuperarlo. De estas mezclas se añadían 400 µL sobre 1 mL de agua que previamente habíamos añadido en un tubo eppendorf de 2 mL. La adición de los 400 µL debía hacerse con una jeringa Hamilton, ya que cuando se añadía el volumen con una micropipeta, y debido al grosor de la salida de la punta empleada,

nunca se formaba la dispersión. En el instante de la introducción de la mezcla dispersante en la fase acuosa, se formaba la dispersión, pero duraba muy poco tiempo, lo que dificultaría el proceso de extracción cuando ya estuviera presente el analito. Posteriormente centrifugábamos para separar ambas fases y recuperar el extractante, de nuevo con una jeringa Hamilton, que al ser más denso que el agua, permanecía en el fondo del tubo eppendorf.

En primer lugar, se prepararon patrones de los analitos, tanto en agua como en los diferentes disolventes orgánicos para estudiar la emisión fluorescente de los mismos. Se realizó el *prescan* de las disoluciones preparadas para seleccionar las condiciones óptimas de trabajo.

4.2.2 Extracción de la furosemida:

Procedimos a realizar la extracción de distintas disoluciones acuosas de furosemida. Para ello se prepararon disoluciones acuosas de furosemida con distintas concentraciones, desde 0,1 ppm hasta 5 ppm. En tubos de microcentrífuga de 10 mL, se añadieron 7 mL de cada una de las disoluciones acuosas de furosemida y a cada una de ellas se les añadió 1 mL del disolvente extractante; MIBK, acetato de n-butilo y éter etílico.

Se agitaron manualmente y se colocaron en el ultrasonidos durante un tiempo de 5 minutos. Durante el tiempo de sonicación, se mantuvo la dispersión de las fases. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 4000 rpm durante 4 minutos a temperatura ambiente, separándose las fases: en los tres casos, al ser el disolvente orgánico menos denso que el agua, la fase orgánica quedó en la parte superior, lo que facilitó la recuperación de la fase orgánica para poder añadirla a la cubeta fluorimétrica.

Cuando se empleó el éter como disolvente, la interfase no era nítida, apareciendo una cierta turbidez de color blanco, esto nos iba a dificultar considerablemente la toma de la fase orgánica y su posterior medida, por lo que, en adelante, se desechó la posibilidad de llevar a cabo la extracción con éter etílico.

Empleando los otros dos disolventes, MIBK y acetato de n-butilo, se pudo recuperar, con la ayuda de una micropipeta o de una jeringuilla Hamilton, gran parte del volumen de la fase orgánica, cuidando de no tomar fase acuosa que podría afectar a la medida espectrofluorimétrica del analito.

Una vez tomada la cantidad necesaria de la fase orgánica y depositada en la cubeta se procede a la determinación fluorimétrica de la furosemida. Para ello se procedió de la siguiente manera.

Se tomó la fase orgánica de la muestra más concentrada y se realizó el *prescan* en el espectrofluorímetro, para obtener las condiciones óptimas de trabajo. Una vez obtenidas, se

hizo un espectro del disolvente orgánico en las condiciones en las que se iba a medir el analito y aunque no observó señal significativa del disolvente, hicimos el cero a la longitud de onda de emisión de la furosemida y procedimos a medir las distintas muestras orgánicas que provenían de los patrones acuosos iniciales de furosemida. Una vez realizadas las medidas de estas muestras y de igual manera, procedimos a medir la emisión luminiscente de patrones de furosemida en los disolventes empleados; MIBK y acetato de n-butilo, para así poder determinar la cantidad del analito que se había extraído.

Posteriormente se midieron las fases acuosas resultantes del proceso de extracción. Para ello y como ahora el disolvente es el agua, se llevó a cabo un *prescan* del patrón más concentrado de los empleados para determinar las condiciones experimentales óptimas de trabajo, en esas condiciones se realizó un espectro del disolvente, en este caso el agua para comprobar que no había emisión fluorescente e hicimos el cero de emisión luminiscente a la longitud de onda de emisión de la furosemida. Posteriormente se midieron las distintas fases acuosas ya extraídas de las muestras preparadas. Una vez realizadas las medidas de estas muestras y de igual manera, se procedió a medir la emisión luminiscente de patrones de furosemida en agua para así poder determinar la cantidad del analito que hubiera quedado en la fase acuosa sin ser extraído.

Con el fin de mejorar la eficacia de la extracción, se repitió el proceso de extracción con furosemida empleando las mismas concentraciones de furosemida en disolución acuosa, pero ahora extrayendo 8 mL de la disolución con 0,5 mL del disolvente orgánico MIBK. Una vez terminado el proceso con la centrifugación, el volumen de la fase orgánica era ligeramente inferior a los 500 μ L iniciales debido a la solubilidad de la MIBK en agua, con lo cual, la toma de la fase orgánica debía hacerse con una jeringa Hamilton con cuidado de no extraer nada de la fase acuosa.

Se planteó la posibilidad de emplear un volumen menor, de orden de 100 μ L de MIBK y una vez realizado todo el proceso, se extrajo la fase orgánica y se midió la emisión fluorescente en una microcubeta, de 60 μ L. Sin embargo, como en estas microcubetas la pérdida de sensibilidad debido al propio diseño de la microcubeta varía entre 5 y 8 veces en función del tamaño de la ventana de salida de la radiación hacia el detector, con lo que se vería compensado el incremento de sensibilidad debido a la mejora de la relación de volúmenes de las fases con la pérdida de señal debida a la propia microcubeta.

Para poder medir pequeños volúmenes de muestra (por encima de 80 μ L) en la cubeta convencional, prisma de 10 x10 mm con las cuatro caras transparentes, previamente diseñamos un soporte a la medida adecuada, que elevaba la cubeta a una altura en la que empleando

volúmenes superiores a 80 μL , la intensidad emitida para una disolución de furosemida era constante y reproducible. Sin embargo, es conveniente emplear volúmenes mayores, siempre que sea posible, ya que, con estos volúmenes tan pequeños en la cubeta convencional, la curvatura del menisco que forma la disolución, que depende de la tensión superficial de la misma y por lo tanto del propio disolvente, puede dar lugar a medidas erróneas.

4.2.3 Factores que afectan al proceso de extracción

Los factores que afectan al proceso de extracción fueron cuidadosamente estudiados y se identificaron como variables clave en el rendimiento y eficacia del mismo.

4.2.3.1 Efecto del tiempo de agitación/sonicación

Se prepararon 8 muestras con 8 mL de disolución acuosa de furosemida en concentraciones 0,1 a las que se añadió 1 mL de acetato de n-butilo y otras 8 muestras con 8 mL de disolución acuosa de furosemida en concentraciones 1 ppm a las que se añadió 1 mL de MIBK y se mantuvieron en el ultrasonidos durante distintos tiempos, desde 0,5 hasta 10 minutos, para cada disolvente extractante empleado. Transcurridos los tiempos estudiados se centrifugaron las muestras para separar nítidamente ambas fases y medir la intensidad fluorescente emitida tanto por la fase orgánica como por la acuosa.

4.2.3.2 Efecto salino

La concentración de iones en la fase acuosa puede tener un impacto significativo en la eficacia de la extracción de un analito.

Para estudiar la influencia de la fuerza iónica en el proceso de extracción de furosemida utilizando MIBK y acetato de n-butilo, se realizó un experimento en el cual se estudió la extracción en presencia de diferentes concentraciones de NaCl en la fase acuosa. En primer lugar, se prepararon disoluciones acuosas de furosemida con concentraciones de 0.1 y 1 ppm. Se tomaron 8 mL de cada disolución y se transfirieron a tubos de microcentrífuga. Después se agregó el volumen necesario de una disolución de NaCl para obtener concentraciones que abarcaban desde 0 hasta 0.2 M de NaCl en las muestras. Se utilizó una disolución patrón de NaCl 4 M y se realizaron las diluciones necesarias para que los volúmenes añadidos de NaCl fueran despreciables en comparación con los 8 mL de muestra acuosa de furosemida. Para las muestras con concentración de furosemida de 1 ppm, se añadió 1 mL de MIBK a cada tubo de microcentrífuga. En cambio, para las muestras con concentración de furosemida de 0.1 ppm, se añadió 1 mL de acetato de n-butilo a cada tubo. Los tubos con las muestras se introdujeron en un ultrasonidos durante 4 minutos para permitir la formación de la dispersión y la extracción

de furosemida hacia la fase orgánica. Transcurrido el tiempo de exposición en el ultrasonidos, se procedió a la centrifugación de las muestras para separar las fases orgánicas y acuosas. Finalmente, se midió la emisión fluorescente de las fases orgánicas y acuosas.

4.2.3.3 Efecto del pH en la extracción de furosemida

Para ello se procedió a estudiar la influencia del pH de la disolución acuosa de furosemida en la extracción de la misma tanto en MIBK como en acetato de n-butilo. Se prepararon patrones acuosos de furosemida en concentraciones 0,1 y 1 ppm. Se fue ajustando el pH de disoluciones de esos patrones con la adición de disoluciones de ácido clorhídrico (HCl) e hidróxido sódico (NaOH) con la ayuda del pHmetro. Se añadieron 8 mL de las disoluciones patrón con el pH ya ajustado al valor deseado y 1 mL de MIBK a las disoluciones de concentración 1ppm y 1 mL de acetato de n-butilo a las disoluciones de concentración 0,1 ppm. Se introdujeron en el ultrasonidos durante 4 minutos y se centrifugaron y se procedió a medir la emisión fluorescente, en las condiciones óptimas con cada disolvente (*prescan*), tanto de los patrones como de las muestras problema. Las medidas fluorimétricas se hicieron sobre la fase orgánica y en el caso de las disoluciones de 1 ppm también se midió la fase acuosa.

4.2.4 Aplicación a una muestra comercial

Se aplicó el método descrito para la determinación de furosemida a un preparado comercial de furosemida (Fig. 8) con una cantidad total de 40 mg de furosemida por comprimido.



Figura 8. Preparado farmacéutico analizado (UXA pharma, s. f.).

Según se detalla en el prospecto del medicamento, en cada comprimido, además del principio activo, furosemida, hay otros componentes que son: lactosa monohidrato, almidón de maíz, almidón de maíz pregelatinizado, carboximetil almidón sódico (tipo A) y estearato de magnesio. Ante la presencia de dichos compuestos y la dificultad de preparar un blanco adecuado, se decidió aplicar el método de las adiciones patrón.

Se pesó un comprimido (164,80 mg) y se disolvió en 50 mL de etanol y se enrasó en un matraz aforado de 250 mL (disolución A). De ahí se tomaron 187,5 y 250 μ L y se llevaron a sendos matraces aforados de 100 mL (disoluciones B y C). Se enrasaron con agua desionizada.

Se prepararon dos series de ocho muestras cada una a las que les aplicaríamos el método de las adiciones patrón, a la más diluida se la realizaría la extracción con acetato de n-butilo y a la más concentrada se la extraería la furosemida con MIBK.

Las series de muestras se prepararon de la siguiente manera. Para la serie que se extrae con acetato de n-butilo, a cada tubo de microcentrífuga se le añadieron 8 mL de la disolución B y además a cada uno de ellos, se les añadió el volumen necesario de una disolución acuosa patrón de furosemida, para que la concentración final añadida fuera de 0, 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5 y 0,75 ppm. Se ajustó el valor del pH a 1 con HCl y se añadió 1 mL de acetato de n-butilo. Para la serie que se extrae con MIBK, a cada tubo de microcentrífuga se le añadieron 8 mL de la disolución C y además a cada uno de ellos, se les añadió el volumen necesario de una disolución acuosa patrón de furosemida, para que la concentración final añadida fuera de; 0, 0,05; 0,075; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 y 1 ppm. El pH se ajustó a un valor de 3 y se añadió 1 mL de MIBK a cada muestra.

Cerramos los tubos y se colocaron en el ultrasonidos durante 4 minutos. Se centrifugaron a 4000 rpm durante 5 minutos para completar la separación de las fases y se procedió a medir la emisión fluorescente, en las condiciones óptimas con cada disolvente (*prescan*), tanto de los patrones como de las muestras problemas.

5 Resultados y discusión

En esta sección, se presentarán los resultados obtenidos a partir del análisis de los datos recopilados durante la investigación.

5.1 Estudios preliminares

En esta sección, se expondrán los resultados obtenidos a través de los estudios preliminares llevados a cabo.

5.1.1 Búsqueda de mezclas de disolventes

Se procedió a medir la fluorescencia de distintas mezclas de disolventes y se encontraron grandes dificultades:

- Eran pocos los disolventes dispersantes que producían dispersiones permanentes; metanol, etanol, alcohol isopropílico y acetona.
- La relación de volúmenes dispersante/extractante debía ser favorable hacia el extractante para así poder recuperar mayor volumen del extractante.
- Eso hacía que el volumen del dispersante fuera menor, con la consiguiente pérdida de la capacidad para formar dispersiones.

Pero el mayor de los problemas era que el volumen del extractante recuperado era tan pequeño, que nos obligaría a realizar las medidas fluorimétricas en microcubetas. Estas microcubetas fluorimétricas están diseñadas para medir volúmenes del orden de μL , entre 10 y 100 μL habitualmente, pero debido a su diseño, llevan una pérdida estructural de sensibilidad con un factor entre 5 y 8, por lo que parte del beneficio que se puede obtener con la relación favorable de los volúmenes del extractante, se pierde en la etapa de la medida de la emisión fluorescente.

Ante la dificultad de llevar a cabo DLLME, se procedió a efectuar distintas extracciones dispersivas de los diferentes analitos con diferentes disolventes orgánicos.

En primer lugar, se prepararon patrones de 10 ppm de los analitos a estudiar, tanto en disolución acuosa, como en diferentes disolventes orgánicos, para estudiar la emisión fluorescente de los analitos en los diferentes disolventes.

Se realizó un prescan de cada analito cada disolvente para determinar las condiciones óptimas de trabajo, los resultados aparecen en las tablas 2 a 6.

Tabla 2. Furosemida.

Disolvente	λ_{Raman} , (nm)	$\lambda_{\text{excitación}}$, (nm)	$\lambda_{\text{emisión}}$, (nm)	V _{detector} , (V)
Agua	3340	225,93	382,92	600
MIBK	2900	348,00	400,92	600
Acetato de n-butilo	2940	272,03	399,07	600
Triclorometano	3020	274,06	401,07	600
Tetracloruro de carbono	714	274,03	406,25	800
Éter etílico	2960	235,93	396,92	600

Se puede observar que, con todos ellos, la furosemida presenta emisión fluorescente en torno a una longitud de onda de 400 nm y con variaciones en las longitudes de onda de excitación desde 225,93 a 348,00 nm.

Cuando se empleó tetracloruro de carbono fue necesario elevar el potencial del tubo fotomultiplicador a 800 V, con el fin de incrementar la sensibilidad. De todos modos, no es conveniente trabajar a potenciales tan altos, ya que también se incrementará notablemente el ruido con el consiguiente deterioro de la señal.

Por otro lado, como el empleo de disolventes orgánicos clorados es conflictivo, ambientalmente hablando, se decidió seguir el estudio con los otros tres disolventes orgánicos; MIBK, acetato de n-butilo y éter etílico.

Se probaron también otros analitos.

- Dos hormonas femeninas:

Tabla 3. Dietibestrol.

Disolvente	λ_{Raman} , (nm)	$\lambda_{\text{excitación}}$, (nm)	$\lambda_{\text{emisión}}$, (nm)	V _{detector} , (V)
Agua	3340	----	----	----
MIBK	2900	528,05	550,00	780
Acetato de n-butilo	2940	----	----	----
Éter etílico	2960	----	----	----

Tabla 4. Etinilestradiol.

Disolvente	λ_{Raman} , (nm)	$\lambda_{\text{excitación}}$, (nm)	$\lambda_{\text{emisión}}$, (nm)	V _{detector} , (V)
Agua	3340	204,60	311,09	620
MIBK	2900	528,05	551,02	760
Acetato de n-butilo	2940	282,23	606,50	540
Éter etílico	2960	----	----	----

- Dos betabloquantes

Tabla 5. Nadolol.

Disolvente	λ_{Raman} , (nm)	$\lambda_{\text{excitación}}$, (nm)	$\lambda_{\text{emisión}}$, (nm)	V_{detector} , (V)
Agua	3340	202,03	295,07 y 580,00	620
MIBK	2900	----	----	----
Acetato de n-butilo	2940	----	----	----
Éter etílico	2960	227,90	285,00 y 583,00	600

Tabla 6. Propranolol.

Disolvente	λ_{Raman} , (nm)	$\lambda_{\text{excitación}}$, (nm)	$\lambda_{\text{emisión}}$, (nm)	V_{detector} , (V)
Agua	3340	227,96	338,92	540
MIBK	2900	528,05	550,80	840
Acetato de n-butilo	2940	292,00	336,90	600
Éter etílico	2960	----	----	----

Con los datos obtenidos, se decidió seguir el estudio con la furosemida ya que se podía tratar de extraer y medir en los tres disolventes orgánicos.

Sin embargo, los resultados para los beta-bloqueantes y para las hormonas son alentadores, ya que en el caso de las hormonas se pueden medir en el mismo disolvente, pero presentan diferentes longitudes de emisión, por lo que en el caso de que fueran susceptibles de ser extraídas con la MIBK, podrían ser determinadas de manera conjunta en la misma muestra.

En el caso de los beta-bloqueantes, se medirían en dos disolventes orgánicos distintos y con la posibilidad de poder determinarlos a diferentes longitudes de onda. Las condiciones de trabajo serían preferentemente a potenciales del detector bajos, en torno a 600 V. Ya que cuando se emplean potenciales muy elevados, es debido a que la sensibilidad es pequeña y la fluorescencia puede ser debida en parte a la presencia de impurezas del disolvente.

5.1.2 Extracción de la furosemida

Los resultados de la emisión luminiscente de patrones de furosemida en agua aparecen en las figuras 9 y 10:

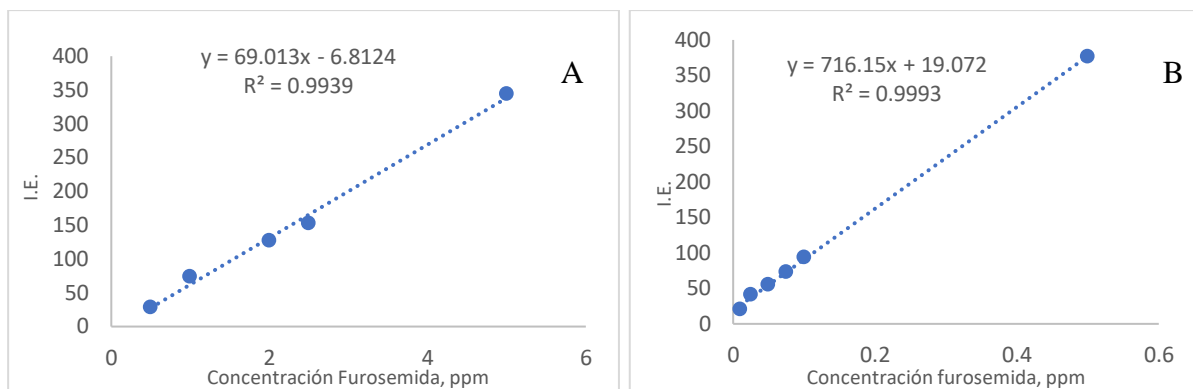


Figura 9. Líneas de calibrado de furosemida extraída en acetato de n-butilo a distintas concentraciones. A) Intervalo de 1 a 5ppm; B) Intervalo de 0,05 a 0,5ppm.

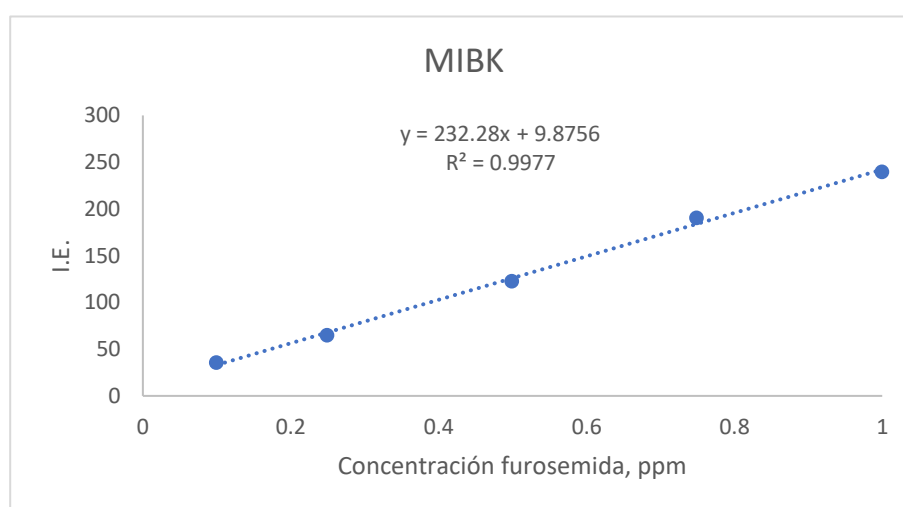


Figura 10. Líneas de calibrado de furosemida extraída en MIBK a distintas concentraciones.

5.1.3 Ajuste de las condiciones experimentales óptimas (*prescan*)

Los espectros y resultados obtenidos a partir de las muestras patrón de furosemida en MIBK, acetato de n-butilo y agua aparecen reflejados en las figuras 11, 12 y 13.

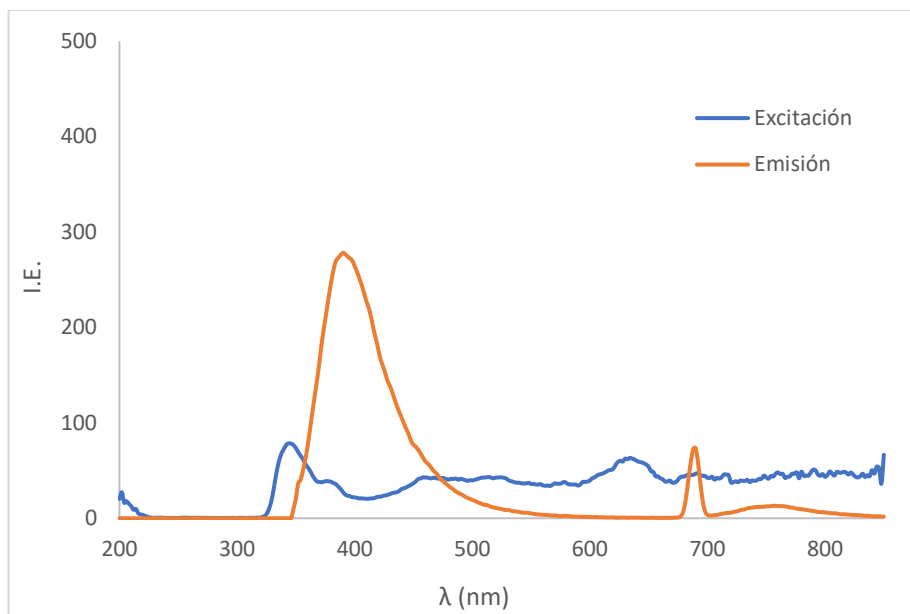


Figura 11. Espectros de excitación y emisión de la furosemida en MIBK.

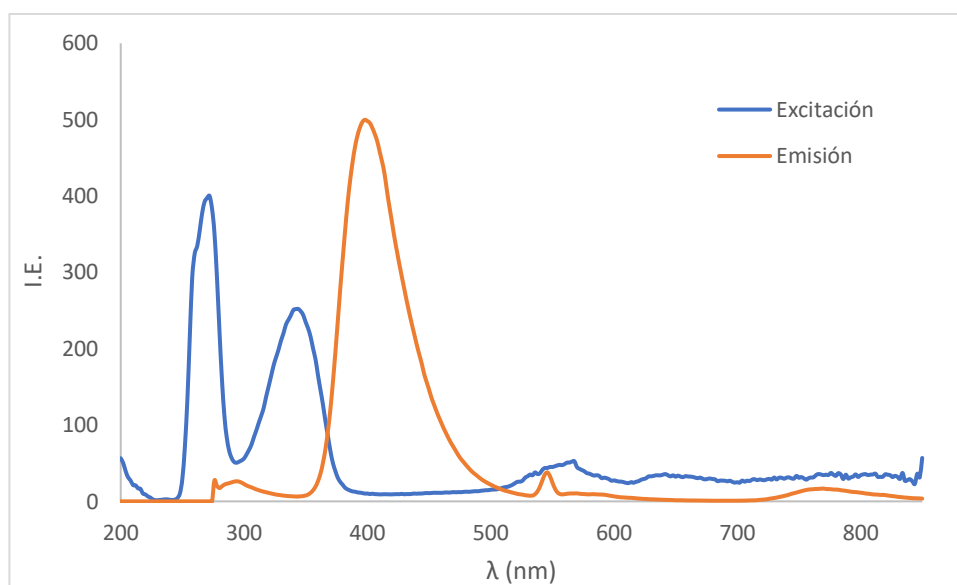


Figura 12. Espectros de excitación y emisión de la furosemida en acetato de n-butilo.

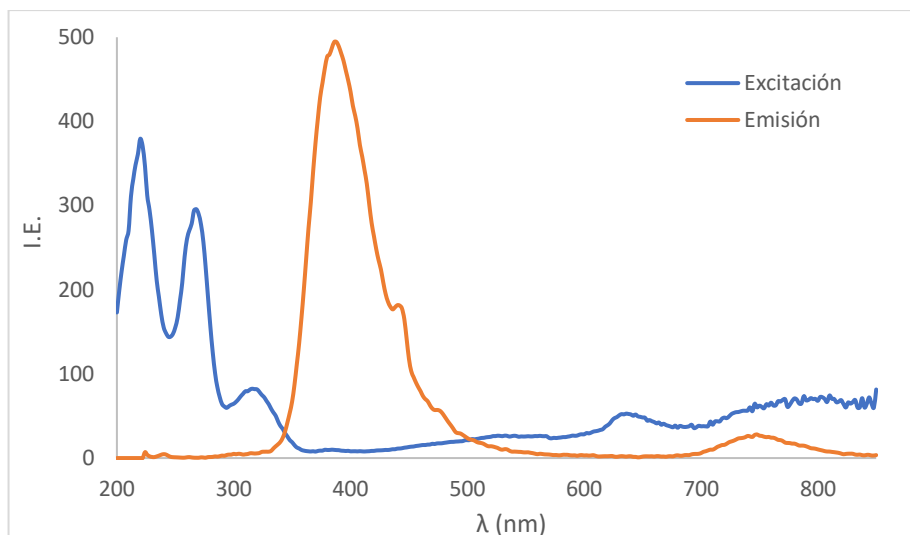


Figura 13. Espectros de excitación y emisión de la furosemida en agua.

De aquí se obtienen las longitudes de onda óptimas de trabajo, que aparecen reflejados en la tabla 7.

Tabla 7. Datos óptimos de las λ de trabajo y potencial del detector.

DISOLVENTE	$\lambda_{excitación}$ (nm)	$\lambda_{emisión}$ (nm)	$V_{detector}$ (V)
MIBK	344,00	388,92	600
Acetato de n-butilo	272,03	398,10	600
Agua	222,03	393,07	600

5.1.4 Ajuste de los parámetros instrumentales

Empleando un patrón de 10 ppm de furosemida en MIBK modificamos los parámetros instrumentales que nos permitía el equipo, las aperturas de las rendijas tanto de excitación como de emisión y el potencial aplicado al detector.

Tabla 8. Intensidad emitida para 1 ppm de furosemida en MIBK a 600V.

Rendija de excitación (nm)	Rendija de emisión (nm)	Intensidad Emitida
1,5	5	0
2,5	5	27,82
5	5	125,32
10	5	273,25
20	5	1000 (Sat.)
5	1,5	0
5	2,5	24,31

Rendija de excitación (nm)	Rendija de emisión (nm)	Intensidad Emitida
5	5	126,88
5	10	395,66
5	20	927,61

Tabla 9. Intensidad emitida para 1 ppm de furosemida en MIBK y el disolvente MIBK puro

Rendija de excitación	Rendija de emisión	Potencial (V)	Intensidad Emitida Furosemida	Intensidad Emitida MIBK
2,5	2,5	600	0	0
2,5	2,5	700	23,10	0
2,5	2,5	750	44,26	0
2,5	2,5	800	80,49	15,35
2,5	2,5	850	130,09	25,05
2,5	2,5	900	217,50	42,95
5	5	600	126,54	26,23
5	5	700	254,48	54,33
5	5	750	507,09	107,53
5	5	800	953,28	201,66
5	5	850	1000 (Sat.)	363,15

Los resultados corroboran la teoría de la emisión fluorescente (Tablas 8 y 9). Las aperturas de las rendijas tanto de excitación como de emisión incrementan la señal fluorescente. Sin embargo, también se ve incrementado el ruido de fondo, con lo que para el trabajo rutinario es conveniente trabajar con las aperturas predeterminadas para las rendijas tanto de excitación

como de emisión de 5 y 5 nm respectivamente. Si cerramos las rendijas perdemos sensibilidad en la medida y si las abrimos, aumenta notablemente el ruido de fondo.

El efecto del potencial aplicado al tubo fotomultiplicador resultó ser más importante. A potenciales elevados se satura la señal emitida, pero también aumenta muy considerablemente el ruido de fondo y la absorción del disolvente. Por ello es conveniente trabajar a potenciales tan bajos como sea posible. Otro inconveniente notable del uso de potenciales altos es que contribuyen a un rápido deterioro del detector con lo que acortan la vida útil del espectrofluorímetro.

Sin embargo, para determinados tipos de análisis, en los que puntualmente se necesitara obtener la señal fluorescente de muestras muy diluidas, del orden de ppb y hasta ppt, la modificación adecuada de estos parámetros nos permitiría obtener resultados interesantes.

5.2 Factores que afectan al proceso de extracción

Se presentarán y discutirán los resultados obtenidos en relación con los factores que han demostrado tener un impacto significativo en el proceso de extracción estudiado.

5.2.1 Efecto del tiempo de agitación/sonicación

El tiempo de agitación es un parámetro fundamental que debe ser estudiado en detalle, ya que es necesario para que se produzca la extracción eficiente de los componentes deseados. Durante la extracción líquido-líquido, es crucial que las dos fases estén en contacto cercano para permitir la transferencia de los analitos entre ellas. Para lograr esto, se forma una emulsión mediante la agitación, y esta emulsión debe mantenerse durante un período de tiempo suficiente para que se establezca el equilibrio de extracción. En nuestro proceso, se llevó a cabo la extracción en un dispositivo de ultrasonidos, donde se introdujo el recipiente de muestra que contenía las dos fases. El ultrasonidos proporcionó una agitación intensa y rápida mediante ondas de alta frecuencia, lo que promovió la formación y ruptura de microburbujas en la emulsión. Esto ayudó a aumentar la eficiencia de la extracción. En este estudio, interesó investigar la influencia del tiempo que las muestras se mantienen en el ultrasonidos. Se estudió cómo este parámetro afecta la extracción y si hay un tiempo óptimo que maximice la eficacia de la extracción. Para ello, se realizaron experimentos en los que se varió el tiempo de agitación en el ultrasonidos y se analizaron los resultados obtenidos. Es importante tener en cuenta que el tiempo de agitación no debe ser demasiado corto, ya que no permitiría que se establezca un equilibrio adecuado entre las fases y se obtenga una extracción completa. Por otro lado, si el

tiempo de agitación es demasiado largo, puede haber un mayor riesgo de degradación de los analitos o interferencia de otros componentes no deseados.

En primer lugar, se hizo un *prescan* a una disolución de furosemida de 10 ppm tanto en MIBK como en acetato de n-butilo para ajustar las condiciones experimentales óptimas para cada fase orgánica. Las condiciones óptimas fueron para la MIBK: $\lambda_{excitación} = 344 \text{ nm}$; $\lambda_{emisión} = 390 \text{ nm}$ y para el acetato de n-butilo: $\lambda_{excitación} = 272,03 \text{ nm}$; $\lambda_{emisión} = 399,07 \text{ nm}$

Para la fase acuosa se hizo lo mismo, pero con una disolución acuosa de furosemida de 10 ppm.

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la figura 14.

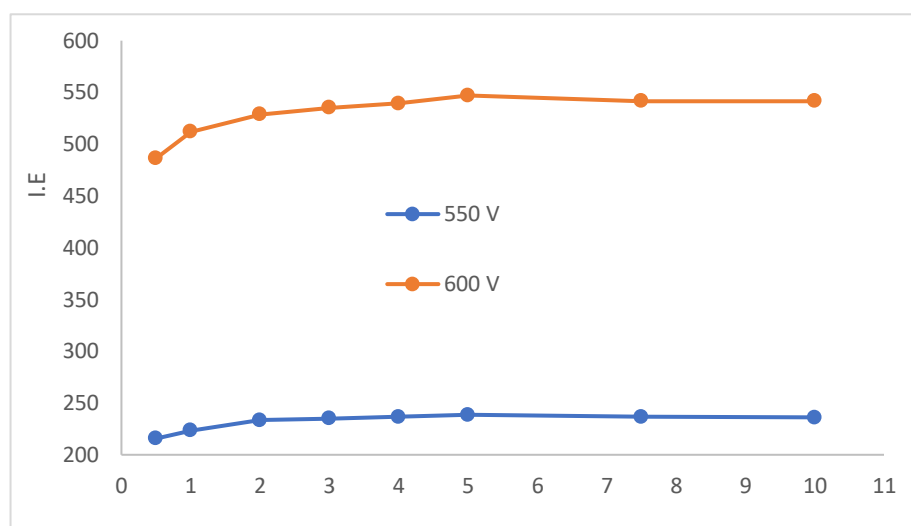


Figura 14. Influencia del tiempo de agitación en la extracción de 1ppm de furosemida con MIBK a distintos potenciales del detector.

Cuando se empleó MIBK como agente extractante y se analizaron los resultados para los dos potenciales del detector utilizados, se pudo observar que, a partir de los 4 minutos de exposición al ultrasonidos y, por ende, de formación de la dispersión, la emisión fluorescente se mantuvo prácticamente constante en las muestras con la misma concentración inicial de furosemida. Esto sugiere que se alcanzó un equilibrio en la extracción de furosemida hacia la fase orgánica (MIBK) después de este tiempo de exposición. Una vez establecido este equilibrio, la concentración de furosemida en la fase orgánica se mantuvo estable y la emisión fluorescente, como medida de la concentración de furosemida, permaneció constante. Estos resultados indican que un tiempo de exposición de al menos 4 minutos en el ultrasonidos es suficiente para lograr una extracción eficiente de furosemida utilizando MIBK como agente extractante. No obstante, es importante tener en cuenta que la estabilidad de la emisión

fluorescente y el equilibrio de extracción pueden variar según las condiciones experimentales y las características de la muestra.

Al utilizar acetato de n-butilo como agente extractante y aprovechar la mayor sensibilidad de la técnica para la extracción de furosemida, se pudo emplear un mayor número de valores de potencial del detector. Al analizar los resultados obtenidos, se observó que, en todas las configuraciones, a partir de 1 minuto de extracción, la emisión fluorescente de furosemida se mantuvo prácticamente constante. Esto indica que se alcanza rápidamente un equilibrio en la extracción de furosemida hacia la fase orgánica (acetato de n-butilo) después de solo 1 minuto de exposición. Una vez establecido este equilibrio, la concentración de furosemida en la fase orgánica se mantiene constante, y la emisión fluorescente, como medida de la concentración de furosemida, permanece prácticamente sin cambios. Estos resultados (Fig. 15) demuestran la eficiencia de la extracción de furosemida utilizando acetato de n-butilo como agente extractante y sugieren que un tiempo de extracción de 1 minuto es suficiente para obtener resultados consistentes y reproducibles.

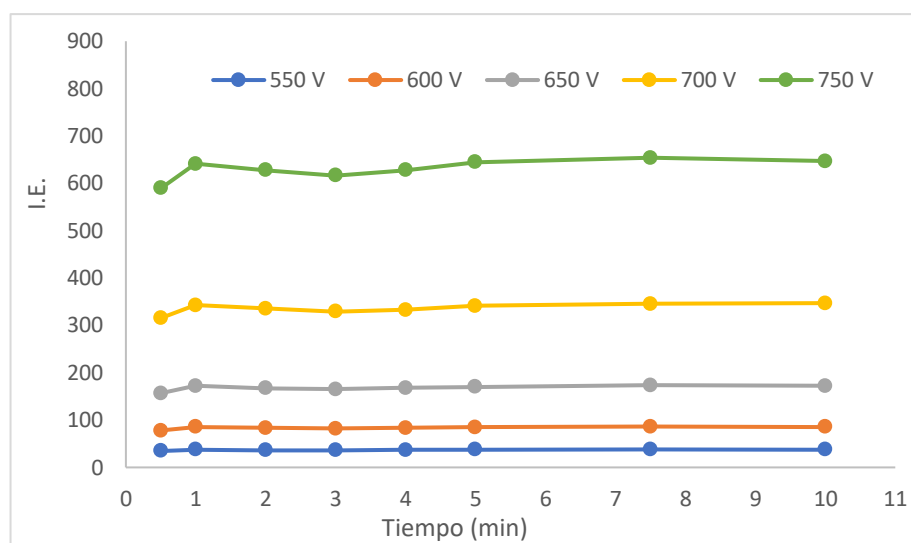


Figura 15. Influencia del tiempo de agitación en la extracción de 0,1ppm de furosemida con acetato de n-butilo a distintos potenciales del detector.

Por lo tanto, se determinó que el tiempo mínimo necesario para la formación de la dispersión y la extracción eficiente es de 4 minutos en el ultrasonidos cuando se emplea MIBK como disolvente extractante. Sin embargo, al utilizar acetato de n-butilo como agente extractante, este tiempo puede reducirse a 2 minutos. Estos hallazgos indican que el tiempo de extracción óptimo puede variar según el disolvente utilizado, y es importante tener en cuenta esta diferencia al diseñar y realizar los procedimientos de extracción.

Adicionalmente, se llevó a cabo la medición de la emisión fluorescente de furosemida en la fase acuosa tras la extracción, tanto con MIBK como con acetato de n-butilo. Para ello, se realizó el *prescan* de una disolución acuosa de furosemida de 10 ppm, utilizando como condiciones óptimas: $\lambda_{excitación} = 220 \text{ nm}$; $\lambda_{emisión} = 387 \text{ nm}$.

Los resultados de la emisión de furosemida en los sobrenadantes acuosos después de las extracciones, con concentraciones de 0,1 y 1 ppm, se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la emisión de furosemida en disolución acuosa, con concentraciones de 0,1 y 1 ppm.

Concentración (ppm)	550V	600V	650V	700
0,1 (acetato n-butilo)	29,40	60,12	132,92	226,50
1 (MIBK)	255,34	490,68	979,90	1000 (sat.)

Al analizar los datos de emisión de furosemida que permanece en fase acuosa sin extraer, se observó que los valores obtenidos fueron prácticamente constantes tanto para las muestras con una concentración inicial de 0,1 ppm como para aquellas con una concentración de 1 ppm, aunque lógicamente, se ven incrementados al aumentar el potencial aplicado al tubo fotomultiplicador. Estos resultados indican que la cantidad de furosemida no extraída en la fase acuosa se mantiene constante en ambos casos, lo cual sugiere que la capacidad de extracción del disolvente utilizado es suficiente para extraer la mayoría de la furosemida presente en la muestra, independientemente de su concentración inicial. Esto demuestra la eficacia del método de extracción empleado y respalda la fiabilidad de los resultados obtenidos en cuanto a la cuantificación de furosemida en las muestras analizadas.

5.2.2 Efecto salino

Previamente a la medida, se llevó a cabo un *prescan* en el espectrofluorímetro para determinar los parámetros experimentales óptimos para la medida de la emisión fluorescente de la furosemida, tanto en fase orgánica (MIBK y acetato de n-butilo) como en la fase acuosa.

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en las figuras 16 y 17.

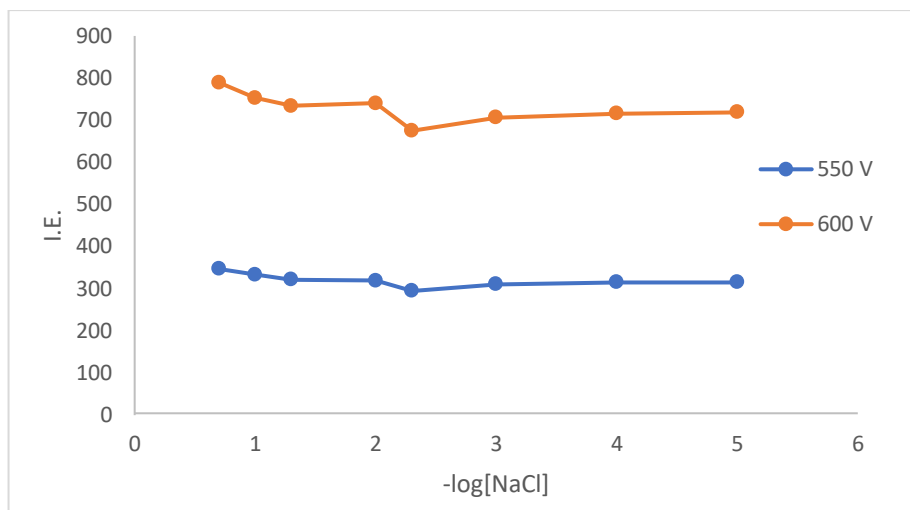


Figura 16. Influencia de la concentración de NaCl en la extracción de 1ppm de furosemida con MIBK.

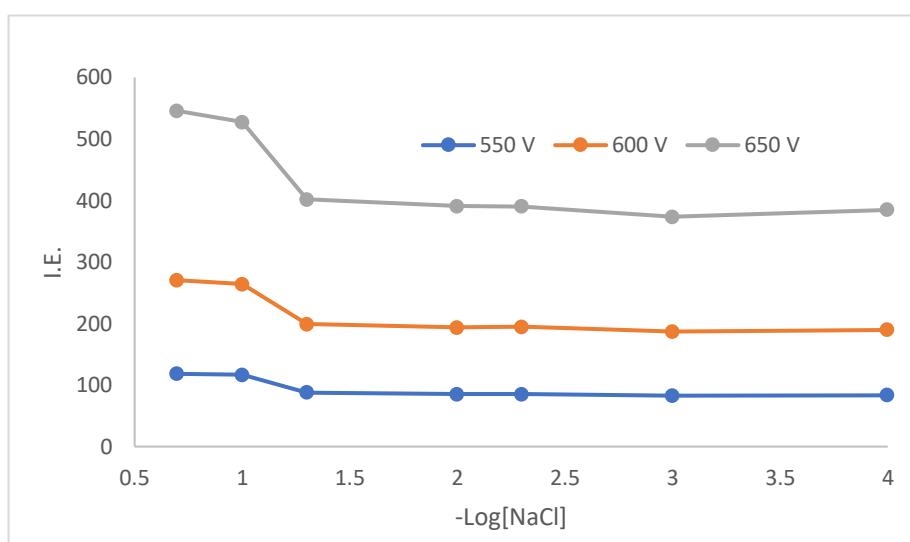


Figura 17. Influencia de la concentración de NaCl en la extracción de 0,1ppm de furosemida con acetato de n-butilo.

Los resultados obtenidos mostraron que, para concentraciones iónicas bajas, inferiores a $5 \cdot 10^{-2} \text{M}$ de NaCl, no se observó ningún efecto significativo en el rendimiento de la extracción de furosemida. Sin embargo, a medida que la concentración de NaCl aumentó por encima de este umbral, se observó un ligero incremento en la señal de emisión fluorescente de la furosemida. Este incremento se volvió significativo cuando la concentración de NaCl alcanzó los 0,1 M, superando el 5% de aumento en la señal de emisión fluorescente. Estos resultados indicaron que, a concentraciones más altas de NaCl, la presencia de iones en la fase acuosa pudo tener un efecto positivo en la extracción de furosemida.

Estos hallazgos resaltaron la importancia de la concentración iónica como un factor a considerar al optimizar las condiciones de extracción. Dependiendo de los objetivos del análisis

y las concentraciones de NaCl presentes en la muestra, se pudo ajustar la concentración iónica para mejorar la eficacia de la extracción de furosemida utilizando MIBK o acetato de n-butilo como agentes extractantes.

5.2.3 Efecto del pH en la extracción de furosemida.

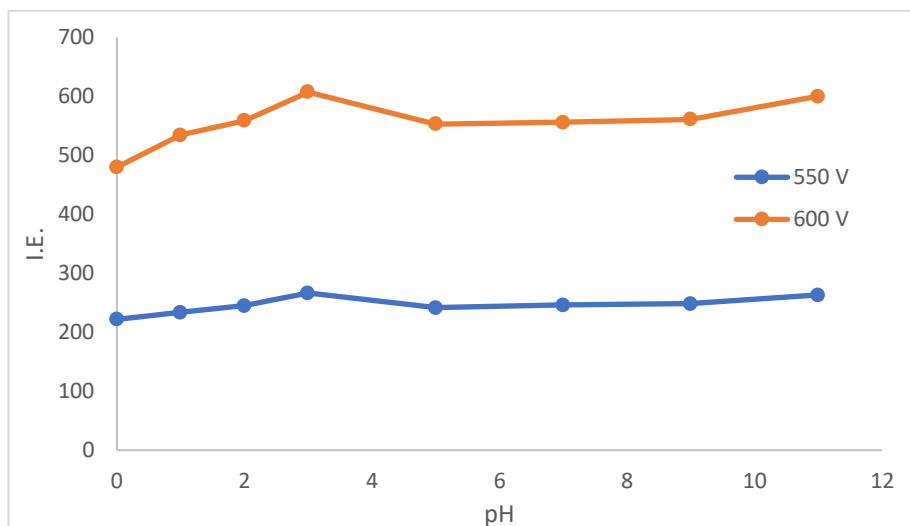


Figura 18. Influencia del pH en la extracción de 1ppm de furosemida en fase acuosa con MIBK a distintos potenciales.

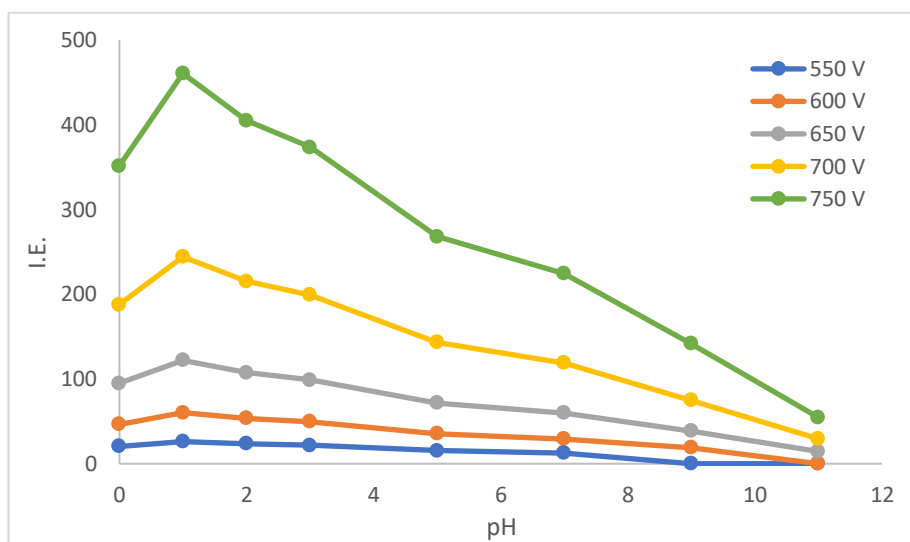


Figura 19. Influencia del pH en la extracción de 0,1ppm de furosemida en fase acuosa con acetato de n-butilo a distintos potenciales.

Como se puede apreciar (Tablas 18 y 19), la furosemida se extrae más eficientemente a valores de pH bajos, probablemente debido a que, a valores de pH superiores a su pKa, la especie predominante es la desprotonada (FUR^-), su base conjugada que es un anión y no se

extrae tan eficientemente como su forma ácida sin disociar (H-FUR) empleando un disolvente orgánico.

En el caso de MIBK, el valor de pH=3 es al que se obtiene la máxima emisión de fluorescencia (es decir, la mayor extracción). A pH superiores, la fluorescencia permanece más o menos estabilizada. Esto se puede comprobar con la disolución acuosa (Fig. 20) de la que se ha extraído, observándose que, para valores superiores a pH=3, la cantidad que permanece en disolución acuosa se mantiene constante.

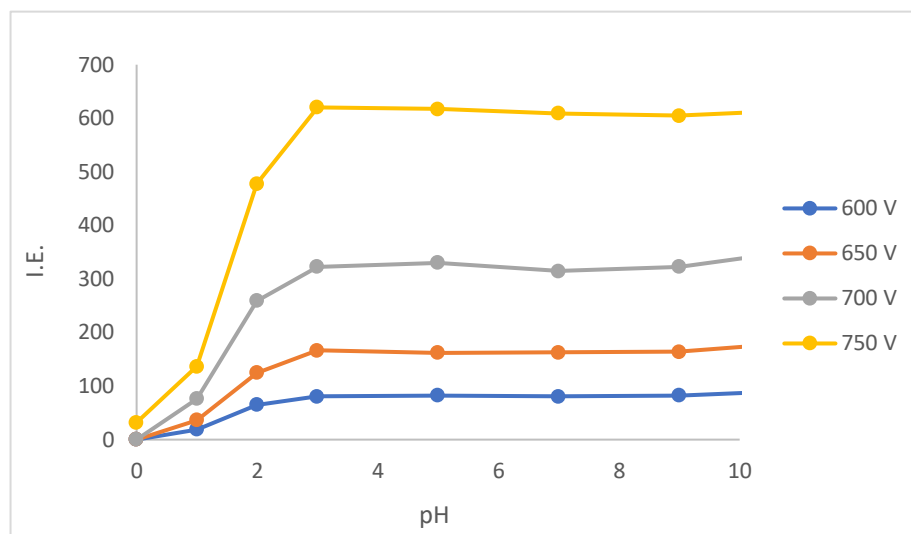


Figura 20. Emisión fluorescente de la fase acuosa de 1ppm de furosemida en la disolución inicial acuosa tras la extracción con MIBK a distintos potenciales.

En cuanto al acetato de n-butilo, el valor máximo de fluorescencia se obtiene a pH=1, disminuyendo tanto para valores inferiores como superiores. Observando las gráficas de los sobrenadantes acuosos, se pone de manifiesto que, para valores de pH>3, la intensidad de fluorescencia decrece a medida que aumenta el pH.

Como resumen final, las condiciones experimentales óptimas para la extracción de furosemida con MIBK y acetato de n-butilo aparecen en la tabla 11.

Tabla 11. Condiciones instrumentales y experimentales óptimas para la extracción y posterior determinación fluorimétrica de furosemida.

	MIBK	Acetato de n-butilo
$\lambda_{excitación}$, (nm)	344,00	272,03
$\lambda_{emisión}$, (nm)	390	399,07
$V_{detector}$, (V)	600	600
Rendija de excitación, (nm)	5	5

	MIBK	Acetato de n-butilo
Rendija de emisión, (nm)	5	5
Tiempo de extracción, (min)	4	2
pH	3	1
[NaCl], (M)	0,1	0,1

5.3 Muestra comercial

Como se indicó en el *Apartado 4.2.4. Aplicación a la muestra comercial*, para determinar el contenido de furosemida en el preparado farmacéutico comercial empleamos el método de las adiciones patrón.

Los resultados obtenidos tras realizar la extracción con MIBK aparecen reflejados en la figura 21.

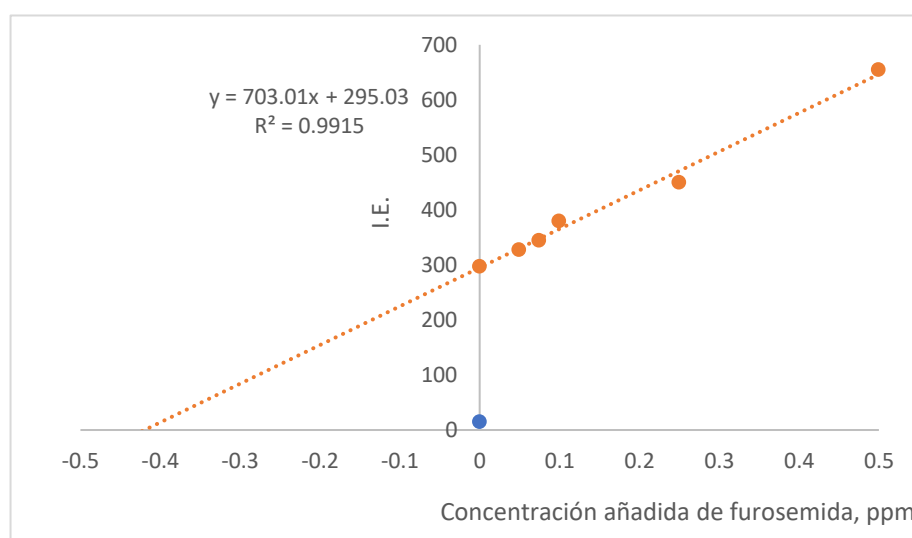


Figura 21. Intensidad emitida frente a la concentración añadida de furosemida extraída con MIBK.

Si se representan la intensidad de fluorescencia frente a la concentración añadida de furosemida, se puede apreciar que la prolongación de la recta corta al eje x en el valor -0,4197 ppm. Si corregimos con la intensidad de fluorescencia medida del blanco, obtenemos una concentración de furosemida en la muestra de 0,398 ppm.

La cantidad de furosemida en el comprimido será:

$$0,398 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mg de furosemida}}{\text{mL disolución C}} \cdot \frac{100 \text{ mL disolución C}}{0,250 \text{ mL disolución A}} \cdot 250 \text{ mL disolución A} \\ = 39,8 \text{ mg de furosemida}$$

Al igual que en el caso de la extracción con MIBK, efectuamos la extracción con acetato de n-butilo. Los resultados obtenidos cuando realizamos la extracción con acetato de n-butilo aparecen reflejados en la figura 22.

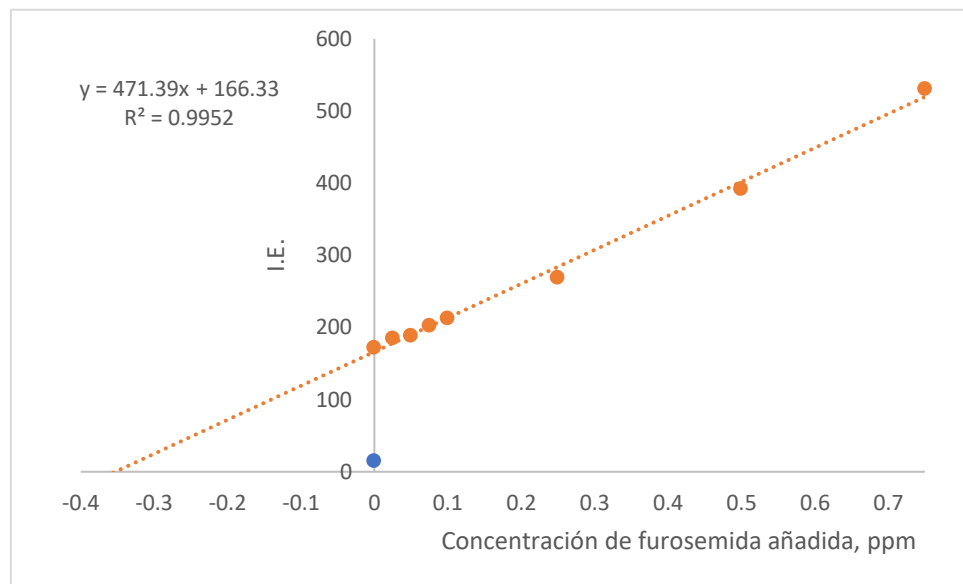


Figura 22. Intensidad emitida frente a la concentración añadida de furosemida extraída con acetato de n-butilo.

La prolongación de la recta corta al eje x en el valor -0,353 ppm. Si corregimos con el blanco, obtenemos una concentración de furosemida en la muestra de 0,321 ppm.

La cantidad de furosemida en el comprimido será:

$$0,321 \cdot 10^{-3} \frac{\text{mg de furosemida}}{\text{mL disolución B}} \cdot \frac{100 \text{ mL disolución B}}{0,1875 \text{ mL disolución A}} \cdot 250 \text{ mL disolución A} = 42,8 \text{ mg de furosemida.}$$

6 Conclusiones

- Se ha puesto a punto un procedimiento para la extracción de furosemida de muestras acuosas empleando la extracción líquido-líquido dispersiva.
- De todos los disolventes orgánicos ensayados como extractantes, los mejores resultados se obtuvieron con MIBK y con acetato de n-butilo.
- La dispersión de las fases se consiguió empleando un baño de ultrasonidos, y los tiempos óptimos de extracción fueron de 4 minutos empleando MIBK y de 2 minutos empleando acetato de n-butilo.
- Como era de esperar, la eficacia de la extracción mejoró cuando el pH de la fase acuosa se encuentra en valores ácidos, por debajo del pK_a de la furosemida. El pH más favorable para la extracción con MIBK fue de 3 y de 1 cuando se utilizó acetato de n-butilo.
- La eficacia de la extracción se favoreció por efecto salino, obteniéndose mayores recuperaciones cuando la concentración de NaCl en la fase acuosa fue de 0.1M.
- El método descrito fue probado a una muestra real de furosemida (preparado comercial), obteniéndose resultados exactos.

7 Bibliografía

Berijani, S., Assadi, Y., Anbia, M., Milani Hosseini, M.-R., & Aghaee, E. (2006). Dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, *1123*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.05.010>

Chou, T.-Y., Lin, S.-L., & Fuh, M.-R. (2009). Determination of phenylurea herbicides in aqueous samples using partitioned dispersive liquid–liquid microextraction. *Talanta*, *80*(2), 493-498. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.07.005>

Devi, Y., Ang, I., Soetaredjo, F. E., Santoso, S. P., Irawaty, W., Yuliana, M., Angkawijaya, A. E., Hartono, S. B., Tran-Nguyen, P. L., Ismadji, S., & Ju, Y.-H. (2020). An iron–carboxylate-based metal–organic framework for Furosemide loading and release. *Journal of Materials Science*, *55*(28), 13785-13798. <https://doi.org/10.1007/s10853-020-05009-3>

El-Shahawi, M. S., & Al-Saidi, H. M. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction for chemical speciation and determination of ultra-trace concentrations of metal ions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, *44*, 12-24. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.10.011>

Endo, S., Pfennigsdorff, A., & Goss, K.-U. (2012). Salting-Out Effect in Aqueous NaCl Solutions: Trends with Size and Polarity of Solute Molecules. *Environmental Science & Technology*, *46*(3), 1496-1503. <https://doi.org/10.1021/es203183z>

Espinosa Bosch, M., Ruiz Sánchez, A. J., Sánchez Rojas, F., & Bosch Ojeda, C. (2008). Recent developments in analytical determination of furosemide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *48*(3), 519-532. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.07.003>

Farajzadeh, M. A., Djozan, D., Nouri, N., Bamorowat, M., & Shalamzari, M. S. (2010). Coupling stir bar sorptive extraction-dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration of triazole pesticides from aqueous samples followed by GC-FID and GC-MS determinations: Sample Preparation. *Journal of Separation Science*, *33*(12), 1816-1828. <https://doi.org/10.1002/jssc.201000088>

Farajzadeh, M. A., Seyedi, S. E., Shalamzari, M. S., & Bamorowat, M. (2009). Dispersive liquid-liquid microextraction using extraction solvent lighter than water. *Journal of Separation Science*, *32*(18), 3191-3200. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900109>

Farhadi, K., Farajzadeh, M. A., & Matin, A. A. (2009). Liquid chromatographic determination of benomyl in water samples after dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Separation Science*, *32*(14), 2442-2447. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900050>

Fariña, L., Boido, E., Carrau, F., & Dellacassa, E. (2007). Determination of volatile

phenols in red wines by dispersive liquid–liquid microextraction and gas chromatography–mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1157(1-2), 46-50. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.05.006>

Gomes, A. J., Lunardi, C. N., Rocha, F. S., & Patience, G. S. (2019). Experimental methods in chemical engineering: Fluorescence emission spectroscopy. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 97(8), 2168-2175. <https://doi.org/10.1002/cjce.23506>

Granero, G. E., Longhi, M. R., Mora, M. J., Junginger, H. E., Midha, K. K., Shah, V. P., Stavchansky, S., Dressman, J. B., & Barends, D. M. (2010). Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Furosemide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(6), 2544-2556. <https://doi.org/10.1002/jps.22030>

Hashemi, B., Zohrabi, P., Kim, K.-H., Shamsipur, M., Deep, A., & Hong, J. (2017). Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 97, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.08.014>

Hashemi, P., Beyranvand, S., Mansur, R. S., & Ghiasvand, A. R. (2009). Development of a simple device for dispersive liquid–liquid microextraction with lighter than water organic solvents: Isolation and enrichment of glycyrrhizic acid from licorice. *Analytica Chimica Acta*, 655(1-2), 60-65. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.09.034>

Kocúrová, L., Balogh, I. S., Šandrejová, J., & Andruch, V. (2012). Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. *Microchemical Journal*, 102, 11-17. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2011.12.002>

Leong, M.-I., Fuh, M.-R., & Huang, S.-D. (2014). Beyond dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1335, 2-14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.021>

Los 100 más vendidos. (2008, enero 28). *El Mundo*. <https://www.elmundo.es/suplementos/magazine/2008/435/1201531430.html>

Maham, M., & Kiarostami, V. (s. f.). Extraction and Determination of Cyproheptadine in Human Urine by DLLME-HPLC Method. *ranian journal of pharmaceutical research*, 12(2), 311-318.

Mariano, F., Mella, A., Vincenti, M., & Biancone, L. (2019). Furosemide as a functional marker of acute kidney injury in ICU patients: A new role for an old drug. *Journal of Nephrology*, 32(6), 883-893. <https://doi.org/10.1007/s40620-019-00614-1>

Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2015). Determination of hormones, a plasticizer, preservatives, perfluoroalkylated compounds, and a flame retardant in water

samples by ultrasound-assisted dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of a floating organic drop. *Talanta*, *143*, 335-343. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.04.089>

Moradi, M., Yamini, Y., Esrafil, A., & Seidi, S. (2010). Application of surfactant assisted dispersive liquid–liquid microextraction for sample preparation of chlorophenols in water samples. *Talanta*, *82*(5), 1864-1869. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.08.002>

Ötles, S. (Ed.). (2009). *Handbook of food analysis instruments*. CRC Press.

Pawliszyn, J. (2011). *Handbook of solid phase microextraction*. Elsevier e-book.

Pickering, W. F. (2021). *Química analítica moderna* (E. Casassas, J. Artigas Vidal, & M. Aguilar Sanjuan, Trads.). Editorial Reverté.

Primel, E. G., Caldas, S. S., Marube, L. C., & Escarrone, A. L. V. (2017). An overview of advances in dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides and emerging contaminants from environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, *14*, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2017.03.001>

Principios de análisis instrumental (Séptima edición). (2019). Cengage Learning.

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

Rezaee, M., Yamini, Y., & Faraji, M. (2010). Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, *1217*(16), 2342-2357. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.11.088>

Rezazadeh, A., Amjadi, M., L Manzoori, J., Ghaffari, A., & Jouyban, A. (2018). Microextraction of Furosemide from Human Serum and Its Fluorimetric Determination. *Pharmaceutical Sciences*, *24*(1), 71-78. <https://doi.org/10.15171/PS.2018.11>

Ríos Castro, Á. (coord). (2012). *Técnicas espectroscópicas en Química Analítica. 1: Aspectos básicos y espectrometría molecular*. Síntesis.

Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M., & Imboden, D. M. (2017). *Environmental organic chemistry* (Third edition). Wiley.

Semnani, A., Haddadi, H., Rezaee, M., & Khalilian, F. (2015). Application of ultrasound-assisted emulsification microextraction followed by gas chromatography for determination of oxadiazon in water and soil samples. *South African Journal of Chemistry*, *68*. <https://doi.org/10.17159/0379-4350/2015/v68a18>

Viñas, P., Campillo, N., López-García, I., & Hernández-Córdoba, M. (2014). Dispersive

liquid–liquid microextraction in food analysis. A critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(8), 2067-2099. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7344-9>

Wang, P., Yang, X., Wang, J., Cui, J., Dong, A. J., Zhao, H. T., Zhang, L. W., Wang, Z. Y., Xu, R. B., Li, W. J., Zhang, Y. C., Zhang, H., & Jing, J. (2012). Multi-residue method for determination of seven neonicotinoid insecticides in grains using dispersive solid-phase extraction and dispersive liquid–liquid micro-extraction by high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 134(3), 1691-1698. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.03.103>

Wu, Q., Wang, C., Liu, Z., Wu, C., Zeng, X., Wen, J., & Wang, Z. (2009). Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(29), 5504-5510. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.05.062>

Xie, W.-H., Shiu, W.-Y., & Mackay, D. (1997). A review of the effect of salts on the solubility of organic compounds in seawater. *Marine Environmental Research*, 44(4), 429-444. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(97\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(97)00017-2)

Xiong, J., & Hu, B. (2008). Comparison of hollow fiber liquid phase microextraction and dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of organosulfur pesticides in environmental and beverage samples by gas chromatography with flame photometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1193(1-2), 7-18. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.03.072>

Yan, H., & Wang, H. (2013). Recent development and applications of dispersive liquid–liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1295, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.04.053>

Zang, X.-H., Wu, Q.-H., Zhang, M.-Y., Xi, G.-H., & Wang, Z. (2009). Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37(2), 161-168. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(08\)60082-1](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(08)60082-1)

Zhang, J., & Hu, B. (2013). Liquid-Liquid Extraction (LLE). En S. Ramaswamy, H.-J. Huang, & B. V. Ramarao (Eds.), *Separation and Purification Technologies in Biorefineries* (pp. 61-78). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118493441.ch3>

Zhang, Shi, Z.-G., & Feng, Y.-Q. (2011). Determination of phenols in environmental water samples by two-step liquid-phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta*, 85(5), 2581-2586. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.021>

Zhao, E., Zhao, W., Han, L., Jiang, S., & Zhou, Z. (2007). Application of dispersive liquid–liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon

and cucumber. *Journal of Chromatography A*, 1175(1), 137-140.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.10.069>

Índice de tablas

Tabla 1. Reactivos utilizados, grado de calidad y solubilidad en agua de los poco solubles...	33
Tabla 2. Furosemida.....	40
Tabla 3. Dietibestrol.....	40
Tabla 4. Etinilestradiol.....	40
Tabla 5. Nadolol.....	41
Tabla 6. Propranolol.....	41
Tabla 7. Datos óptimos de las λ de trabajo y potencial del detector.....	44
Tabla 8. Intensidad emitida para 1 ppm de furosemida en MIBK a 600V.....	44
Tabla 9. Intensidad emitida para 1 ppm de furosemida en MIBK y el disolvente MIBK puro	45
Tabla 10. Resultados de la emisión de furosemida en disolución acuosa, con concentraciones de 0,1 y 1 ppm.....	49
Tabla 11. Condiciones instrumentales y experimentales óptimas para la extracción y posterior determinación fluorimétrica de furosemida.....	52

Índice de figuras

Figura 1. Porcentaje del total de artículos científicos publicados desde el 2006.	9
Figura 2. Evolución histórica de las técnicas DLLME.	10
Figura 3. Porcentaje de artículos que corresponde a la DLLME en relación con LLME desde 2006.	11
Figura 4. Dispositivos caseros especiales para procedimientos de LLME que utilizan disolventes de extracción menos densos que el agua.	14
Figura 5. Diagrama de niveles de energía de una molécula y representación de la emisión fluorescente por para la desactivación desde un estado excitado.	24
Figura 6. Representación esquemática de los componentes principales de un espectrofluorímetro.	25
Figura 7. Obtención de las longitudes de onda óptimas de trabajo.	28
Figura 8. Preparado farmacéutico analizado.	37
Figura 9. Líneas de calibrado de furosemida extraída en acetato de n-butilo a distintas concentraciones. A) Intervalo de 1 a 5ppm; B) Intervalo de 0,05 a 0,5ppm.	42
Figura 10. Líneas de calibrado de furosemida extraída en MIBK a distintas concentraciones.	42
Figura 11. Espectros de excitación y emisión de la furosemida en MIBK.	43
Figura 12. Espectros de excitación y emisión de la furosemida en acetato de n-butilo.	43
Figura 13. Espectros de excitación y emisión de la furosemida en agua.	44
Figura 14. Influencia del tiempo de agitación en la extracción de 1ppm de furosemida con MIBK a distintos potenciales del detector.	47
Figura 15. Influencia del tiempo de agitación en la extracción de 0,1ppm de furosemida con acetato de n-butilo a distintos potenciales del detector.	48
Figura 16. Influencia de la concentración de NaCl en la extracción de 1ppm de furosemida con MIBK.	50
Figura 17. Influencia de la concentración de NaCl en la extracción de 0,1ppm de furosemida con acetato de n-butilo.	50
Figura 18. Influencia del pH en la extracción de 1ppm de furosemida en fase acuosa con MIBK a distintos potenciales.	51
Figura 19. Influencia del pH en la extracción de 0,1ppm de furosemida en fase acuosa con acetato de n-butilo a distintos potenciales.	51

Figura 20. Emisión fluorescente de la fase acuosa de 1ppm de furosemida en la disolución inicial acuosa tras la extracción con MIBK a distintos potenciales.	52
Figura 21. Intensidad emitida frente a la concentración añadida de furosemida extraída con MIBK.	53
Figura 22. Intensidad emitida frente a la concentración añadida de furosemida extraída con acetato de n-butilo.	54