



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Dirección de Postgrado
Maestría en Elaboración, Gestión y Evaluación
de Proyectos de Investigación Científica

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE DI(2-ETILHEXIL) ADIPATO
EN AGUAS SUPERFICIALES
DEL LAGO YPACARAÍ**

SERGIO GABRIEL RODRÍGUEZ BONET

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del
Grado de Magíster en Elaboración, Gestión y Evaluación de Proyectos
de Investigación Científica

SAN LORENZO – PARAGUAY
MARZO – 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Dirección de Postgrado

**Maestría en Elaboración, Gestión y Evaluación
de Proyectos de Investigación Científica**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y
CUANTIFICACIÓN DE DI(2-ETILHEXIL) ADIPATO
EN AGUAS SUPERFICIALES
DEL LAGO YPACARAÍ**

SERGIO GABRIEL RODRÍGUEZ BONET

Orientador: Dr. JULIO CÉSAR BENÍTEZ VILLALBA
Co Orientador: Prof. MSc. TOMÁS RODRIGO LÓPEZ ARIAS

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del
Grado de Magíster en Elaboración, Gestión y Evaluación de Proyectos
de Investigación Científica

SAN LORENZO – PARAGUAY

MARZO – 2019

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)

DE LA BIBLIOTECA E INTERNET DE LA FACEN - UNA

Rodríguez Bonet, Sergio Gabriel

Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación y cuantificación de di(2-etilhexil) adipato en aguas superficiales del Lago Ypacaraí / Sergio Gabriel Rodríguez Bonet.-- San Lorenzo: Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Dirección de Postgrado, 2019.

i-xi, 65h.; 30 cm.

Incluye anexos y bibliografías

Tesis (Magíster en Elaboración, Gestión y Evaluación de Proyectos de Investigación Científica). – Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Dirección de Postgrado, 2019.

1. di(2-Etilhexil) adipato 2. Aguas superficiales 3. Lago Ypacaraí 4. Microextracción líquido-líquido dispersiva 5. Diseño experimental multivariante 6. Tesis y disertaciones académicas I. Título

551.49/R618d

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DI(2-ETILHEXIL) ADIPATO EN AGUAS SUPERFICIALES DEL LAGO YPACARAÍ

SERGIO GABRIEL RODRÍGUEZ BONET

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Magíster en Elaboración, Gestión y Evaluación de Proyectos de Investigación Científica.

Fecha de aprobación: 28 de marzo de 2019

MESA EXAMINADORA

MIEMBROS:

Prof. Dr. Julio César Benítez Villalba
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. Dr. Hugo Eduardo Cerecetto Meyer
Universidad de la Republica, Uruguay

Prof. Dr. Fernando José Méndez Gaona
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. Dr. Javier Alcides Galeano Sánchez
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. MSc. Carlos Aníbal Peris Castiglioni
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. MSc Viviana Isabel Díaz Escobar
Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha 22 de julio de 2019.

Prof. MSc. Andrea Weiler de Albertini
Directora de Postgrado, FACEN – UNA

A mis padres
Don Gilberto Rodríguez y Doña Elodia Bonet

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – CONACYT por la financiación de la Maestría.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción FACEN – UNA por desarrollar la Maestría.

Al Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología – INTN por la disposición de los recursos para llevar a cabo la tesis.

A Fernando Cáceres por la motivación, Laura Chaparro por sus acertadas sugerencias, a mi familia, mis compañeros de trabajo, mis colegas y amigos.

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE DI(2-ETILHEXIL) ADIPATO EN AGUAS SUPERFICIALES DEL LAGO YPACARAÍ

Autor: SERGIO GABRIEL RODRÍGUEZ BONET

Orientador: DR. JULIO CÉSAR BENÍTEZ VILLALBA

Co Orientador: Prof. MSc. TOMÁS RODRIGO LÓPEZ ARIAS

RESUMEN

El lago Ypacaraí es un valioso recurso hídrico del Paraguay, es el lago más grande del país y es conocido internacionalmente a través de la música y el turismo. El gran crecimiento demográfico y las actividades antropogénicas desarrolladas en su cuenca han causado su contaminación y degradación ambiental en los últimos años. El objetivo de este trabajo fue desarrollar y validar un método para la determinación de di(2-etilhexil) adipato (DEHA) en sus aguas superficiales. Dentro de la metodología analítica se utilizó la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) optimizada mediante un diseño experimental multivariante. La validación del método analítico se realizó evaluando cada una de las características de desempeño siguiendo los lineamientos de la guía EURACHEM/CITAC 2014. La metodología desarrollada optimizada y validada se aplicó correctamente a la determinación de DEHA en las aguas del lago Ypacaraí. Los límites de detección LOD y cuantificación LOQ fueron $0,004 \text{ mg.L}^{-1}$ y $0,014 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente. La precisión del método evaluada mediante la repetibilidad y precisión intermedia fue de 2,37 % y 3,78 % y una recuperación 87,14 % al LOQ y 97,62 % a $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$. Los resultados comprueban la presencia de este contaminante en concentraciones entre $0,028 \text{ mg.L}^{-1}$ y $0,603 \text{ mg.L}^{-1}$. El método analítico fue desarrollado, optimizado y validado con éxito y permitió la correcta cuantificación del compuesto DEHA en aguas superficiales del lago Ypacaraí.

Palabras clave: di(2-etilhexil) adipato, aguas superficiales, microextracción líquido-líquido dispersiva, diseño experimental multivariante.

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION AND QUANTIFICATION OF DI (2-ETHYLHEXYL) ADIPATE IN SURFACE WATERS OF YPACARAI LAKE

Author: SERGIO GABRIEL RODRÍGUEZ BONET

Advisor: Dr. JULIO CÉSAR BENÍTEZ VILLALBA

Co Advisor: Prof. MSc. TOMÁS RODRIGO LÓPEZ ARIAS

SUMMARY

The Ypacaraí lake is a valuable water resource of Paraguay, it is the largest lake in the country and is known internationally through the music and tourism. The great demographic growth and anthropogenic activities developed in its basin have caused its contamination and environmental degradation in recent years. The objective of this work was to develop and validate a method for the determination of di (2-ethylhexyl) adipate (DEHA) in its surface waters. The liquid-liquid dispersive microextraction technique (DLLME) optimized by means of a multivariate experimental design was used within the analytical methodology. The validation of the analytical method was carried out an evaluation of each of the characteristics of a performance following the guidelines of the EURACHEM / CITAC 2014 guide. The developed, optimized and validated methodology also applies to the determination of DEHA in the waters of Ypacaraí lake. The limit of detection LOD and limit of quantification LOQ were 0.004 mg.L^{-1} and 0.014 mg.L^{-1} respectively. The precision of the method evaluated by repeatability and intermediate precision was 2.37% and 3.78% and 87.14% of recovery at LOQ level and 97.62% at 0.3 mg.L^{-1} . The results include the presence of this contaminant in them between 0.028 mg.L^{-1} and 0.603 mg.L^{-1} . The analytical method was successfully developed, optimized and validated and enabled the correct quantification of the DEHA compound in the surface waters of Ypacaraí lake.

Keywords: di (2-ethylhexyl) adipate, surface water, liquid-liquid dispersive microextraction, multivariate experimental design.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	2
1.2. Justificación.....	3
1.3. Objetivos	4
1.3.1.Objetivo General.....	4
1.3.2.Objetivos Específicos.....	4
1.4. Hipótesis	4
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes	5
2.2. Contaminación de las aguas superficiales	6
2.3. Lago Ypacaraí	6
2.4. Contaminantes emergentes.....	7
2.5. Generalidades del di(2-etilhexil) adipato (DEHA)	8
2.5.1. Efectos de DEHA en el medioambiente y la salud	10
2.6. Microextracción líquido-líquido dispersiva	11
2.6.1. Fundamentos y características de la DLLME	12
2.6.2. Selección de los disolventes extractante y dispersante	14
2.6.3. Aplicaciones de la DLLME	15
2.7. Optimización de métodos analíticos.....	16
2.8. Diseño experimental.....	16
2.9. Validación de métodos analíticos.....	17
2.10. Características de desempeño de los métodos analíticos.....	18
2.10.1. Selectividad.....	18
2.10.2. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)	19
2.10.3. Intervalo de trabajo	19
2.10.4. Sensibilidad analítica	20
2.10.5. Veracidad	20
2.10.6. Precisión.....	21
3. METODOLOGÍA	23
3.1. Materiales y equipamiento	23
3.2. Identificación del analito mediante GC-MS.....	24
3.3. Desarrollo del método DLLME.....	25
3.4. Optimización de la técnica DLLME.....	27
3.5. Validación de métodos analíticos.....	28
3.5.1. Selectividad.....	28
3.5.2. Límite de detección LOD y límite de cuantificación LOQ.....	30
3.5.3. Linealidad, intervalo de trabajo y sensibilidad analítica.....	31
3.5.4. Veracidad y precisión	32
3.6. Toma y análisis de las muestras	33
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Identificación del analito	35
4.2. Desarrollo del método DLLME.....	36
4.3. Optimización del método DLLME.....	37
4.4. Validación del método analítico.....	41

4.4.1. Selectividad.....	41
4.4.2. Límite de detección LOD y límite de cuantificación LOQ.....	42
4.4.3. Linealidad, intervalo de trabajo y sensibilidad analítica.....	42
4.4.4. Veracidad y precisión.....	45
4.4.5. Análisis de las muestras de aguas colectadas en el Lago Ypacaraí ...	47
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	50
5.1. Conclusiones	50
5.2. Recomendaciones	51
ANEXOS.....	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del bis(2-etilhexil) adipato (DEHA).....	8
Figura 2. Representación gráfica de la relación entre la señal instrumental y la concentración.	20
Figura 3. Distribución geográfica de los puntos de muestreo del lago Ypacaraí.....	34
Figura 4. Espectro de masa de DEHA y espectro de masa de la muestra.....	35
Figura 5. Cromatograma obtenido del estándar (superior) y de la muestra del lago (inferior).	36
Figura 6. Diagrama de Pareto de los efectos de la ampliación del diseño Doehlert de 3 variables.	39
Figura 7. Superficie de respuesta de la recuperación del analito como función del % NaCl y la Proporción de extractante – dispersante.	40
Figura 8. Superficie de respuesta de la recuperación del analito como función del volumen y la Proporción de extractante – dispersante.....	40
Figura 9. Curva de calibración DEHA en disolución iso octano.....	43
Figura 10. Curva de calibración DEHA en matriz.....	43
Figura 11. Gráfico de residuos estudentizados vs pares de datos de la curva en disolvente.	44
Figura 12. Gráfico de residuos estudentizados vs pares de datos de la curva en matriz.	44
Figura 13. Comparación de pendientes de las curvas obtenidas en disolvente y en matriz.....	45
Figura 14. Contenido de DEHA en aguas superficiales del Lago Ypacaraí correspondiente a los 6 puntos de las 3 campañas de muestreo.....	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos aplicados para evaluar la mayor afinidad del analito con los componentes extractante y dispersante.	26
Tabla 2. Diseño Doehlert para 3 variables empleado en la optimización de DLLME.	28
Tabla 3. Resultado de los tratamientos aplicados para evaluar el % de recuperación del analito.	37
Tabla 4. Diseño Doehlert de 3 variables utilizada en la optimización de DLLME. .	38
Tabla 5. Condiciones óptimas para maximizar la recuperación del analito aplicando DLLME	40
Tabla 6. Resultados para la prueba de la selectividad.....	41
Tabla 7. LOD y LOQ del método propuesto.....	42
Tabla 8. Parámetros de las curvas de calibración obtenidas por regresión lineal	43
Tabla 9. Prueba estadística de comparación de pendientes de las curvas de calibración.	45
Tabla 10. Resultados de la recuperación del analito	46
Tabla 11. Resultados de la estimación de la repetibilidad y precisión intermedia....	47
Tabla 12. Resultados de los análisis de las muestras de aguas superficiales correspondientes a las 3 campañas de muestreo en el año 2018.....	47

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

CAS	Servicio de Resúmenes Químicos (<i>Chemical Abstracts Service</i>)
DEHA	Di(2-etilhexil) adipato
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
ECD	Detector de captura electrónica
EHA	ácido etilhexanoico
EPA	Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos (<i>United States Environmental Protection Agency</i>)
FE	Factor de enriquecimiento
eV	Electrón Volt
GC-FID	Cromatografía gaseosa con detector de ionización a la llama
GC-MS	Cromatografía gaseosa acoplada a espectrómetro de masas
g.l.	grados de libertad
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LLE	Extracción líquido-líquido.
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
m	metro
mg.g⁻¹	miligramos por gramo
mg.L⁻¹	miligramos por litro
mm	milimetro
MRC	Material de referencia certificado
ng.m⁻³	nanogramos por metro cúbico
NIST	Instituto Nacional de Normas y Tecnología (<i>National Institute of Standards and Technology</i>)
PVC	Polivinil cloruro
S	Desviación estándar
UN-EP	Naciones Unidas – Programa de Medioambiente (<i>United Nations – Environmental Program</i>)
VIM	Vocabulario Internacional de Metrología
μL	microlitro
°C	Grados Celsius

1. INTRODUCCIÓN

La actividad antropogénica sobre todo en regiones altamente pobladas y ubicadas en las cuencas de lagos o ríos causa la contaminación de las aguas, sobre todo por la mala o inadecuada eliminación de líquidos residuales o efluentes industriales, basura doméstica, etc. e incluso el transporte a través aire.

Los cauces hídricos como el lago Ypacaraí sufren de manera más acentuada la contaminación sobre todo por tener afluentes como el arroyo Yukyry o el arroyo Pirayu que provienen de zonas urbanísticas, industriales y rurales de los departamentos Central, Cordillera y Paraguairí, por lo que es importante el monitoreo constante de manera a identificar la presencia sobre todo moléculas que pueden ser considerados contaminantes emergentes.

La presencia de contaminantes emergentes puede no ser significativa en cuanto a la distribución o concentración, por lo cual suelen pasar desapercibidos y la baja concentración dificulta su determinación, por lo que requieren de metodologías analíticas que demuestren el cumplimiento de todos los requisitos para su uso específico. Para demostrar el cumplimiento de los requisitos, los laboratorios que deben validar sus métodos analíticos ya sean propios o que obren en fuentes bibliográficas, a través del diseño de experimento que permitan evaluar las características técnicas del método. Esto permite reportar resultados confiables.

En este trabajo se ha desarrollado y validado una metodología analítica para la determinación y cuantificación del compuesto denominado bis(2-etilhexil) adipato (DEHA) en aguas superficiales, la misma ha sido utilizada para realizar un estudio sobre la situación del lago Ypacaraí en relación con la presencia de estos compuestos en sus aguas. Se aplicó la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva para

la extracción del analito, previamente optimizada mediante un diseño experimental multivariante. La ventaja de las técnicas de microextracción es el uso reducido de disolventes, la practicidad y rapidez del proceso de extracción.

El desarrollo y validación del método analítico, sirve para recabar información con rigor científico sobre la presencia y cantidad de este compuesto, provenientes de las diversas actividades antropogénicas que se encuentran actualmente contaminando el lago, la metodología podrá ser utilizada en otros estudios similares y ser aplicada para el estudio de la situación de otros cursos hídricos.

1.1. Planteamiento del problema

El lago Ypacaraí es un curso hídrico situado entre los departamentos Central, Cordillera y Paraguarí, de donde provienen sus principales tributarios que son los arroyos Yukyry y Pirayú. Es una región densamente poblada por lo que el mismo se encuentra expuesto a la contaminación por vertidos de aguas residuales domésticas, efluentes industriales y lixiviados agrícolas entre otros.

Estudios preliminares realizados en muestras del lago, confirman la presencia del compuesto di(2-etilhexil) adipato en las aguas superficiales y en base a la escasa bibliografía científica disponible al respecto, surge la necesidad de abordar el tema de manera científica.

En el presente trabajo se plantea un método analítico desarrollado y validado mediante la evaluación de sus características de desempeño y la aplicación de una técnica de microextracción optimizada mediante un diseño experimental, con el objetivo de obtener información certera y confiable sobre los niveles presentes del compuesto en sus aguas.

La información obtenida contribuye al crecimiento de la literatura científica existente sobre la presencia de contaminantes específicos derivados de la actividad

antropogénica de población aledaña, así como la aplicación de técnicas de microextracción para el análisis de contaminantes en matrices ambientales.

1.2. Justificación

Son necesarios el desarrollo y validación de métodos analíticos, selectivos, específicos y sensibles, que sobre todo sean sencillos y de bajo coste para la determinación de compuestos plastificantes en agua.

Si bien existen metodologías analíticas normalizadas, es deseable el desarrollo y validación de técnicas cada vez más actualizadas, modernas, amigables con el medio ambiente, que utilicen métodos de extracción que minimicen la cantidad de disolventes, que sean rápidos, sencillos y en lo que se pueda de bajo costo. El método desarrollado y validado en el presente trabajo cumple con las características mencionadas.

Cabe resaltar que no se encontraron artículos científicos en los que se hayan estudiado este compuesto u otros similares como contaminantes en lago, lo cual hace que se desconozca la situación en la que se pueda encontrar el Lago Ypacaraí y si las cantidades presentes pudieran superar los límites permitidos por la legislación vigente para este tipo de sitios hidrográficos.

El trabajo además servirá para sentar un precedente, generar datos e información científica estadísticamente validados, que podría ser útil para la toma de decisiones de los organismos reguladores o controladores, implementar acciones correctivas o paliativas concernientes a la problemática ambiental que se genera y servir como antecedente para futuras investigaciones, que promuevan la preservación de los cauces hídricos naturales del país.

Por otro lado, la metodología podrá ser utilizada en otros estudios similares y ser aplicada para el monitoreo de la situación de otros cursos hídricos.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Desarrollar y validar un método analítico para la determinación y cuantificación de di(2-etilhexil) adipato en aguas superficiales del Lago Ypacaraí.

1.3.2. Objetivos Específicos

- a) Aplicar un diseño experimental para optimizar la técnica de extracción del compuesto di(2-etilhexil) adipato de aguas superficiales.
- b) Proponer un método analítico aplicable a la determinación del compuesto di(2-etilhexil) adipato en aguas superficiales mediante cromatografía gaseosa con detector de ionización a la llama (GC-FID).
- c) Evaluar las características de desempeño del método analítico propuesto para la matriz de aguas superficiales.
- d) Determinar el contenido de di(2-etilhexil) adipato en aguas superficiales del lago Ypacaraí mediante la técnica analítica optimizada.

1.4. Hipótesis

La técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva seguida del método de cuantificación por cromatografía gaseosa permite identificar de forma válida la presencia del compuesto di(2-etilhexil) adipato en aguas superficiales del Lago Ypacaraí.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

El consumo de combustibles fósiles para la circulación vehicular, actividades industriales, prácticas agrícolas y actividades domésticas sobre todo en regiones altamente pobladas causan impactos al medioambiente. La contaminación de aguas superficiales como las del Lago Ypacaraí, puede deberse sobre todo a la mala o inadecuada eliminación de aguas residuales o efluentes industriales, basura doméstica, etc. (López Moreira *et al.*, 2018).

La liberación de compuestos orgánicos y sus metabolitos de degradación en las aguas residuales pueden tener propiedades tóxicas, cancerígenas, mutagénicas y/o de disruptores endócrinos (Barnabé *et al.*, 2008). Las mismas generalmente van a parar a los cauces hídricos esparciendo así los contaminantes a lugares donde no deberían estar.

Un estudio preliminar fue realizado con el objetivo de explorar la presencia de compuestos organoclorados en el lago Ypacaraí, mediante extracción líquido-líquido y elucidación de los compuestos extraídos mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas, en modo barrido (“*scan*”).

En base a los resultados obtenidos, los cuales no fueron concluyentes para moléculas organocloradas, que sin embargo es completamente satisfactorio considerando que si estuvieran presentes sería un problema medioambiental grave. Los espectros de masa obtenidos en dicho estudio evidenciaron la presencia de compuestos hidrocarburos de alto peso molecular y específicamente la presencia del compuesto

conocido como di(2-etilhexil) adipato, que fue identificado con la base de datos de la biblioteca de espectros de masa NIST 08.

La identidad de la molécula pudo ser confirmada mediante la comparación del tiempo de retención utilizando un estándar de di(2-etilhexil) adipato como referencia y cromatografía gaseosa con detector de ionización a la llama (FID).

2.2. Contaminación de las aguas superficiales

La Ley N° 3239/2007 de los recursos hídricos del Paraguay, define agua superficial como: “Agua o recurso hídrico que permanece o escurre sobre la superficie de la tierra, en estado líquido o sólido”

El estado de los cursos de agua en las regiones densamente pobladas sufre los efectos de las actividades humanas en la cuenca hidrográfica, (Fatecha *et al.*, 2016). Los productos agroquímicos y los contaminantes industriales a menudo pueden llegar a los cuerpos de cursos hídricos a través del aire o afluentes superficiales, produciendo efectos complejos en los ecosistemas y alterando las interacciones tróficas (Santolaria *et al.*, 2015; Silva Barni *et al.*, 2016).

La evaluación de la calidad los recursos hídricos, puede ser abordada por diferentes disciplinas relacionadas al medioambiente. La química específicamente estudia la concentración de compuestos y algunos parámetros fisicoquímicos que se relacionan directamente con la calidad del agua y su aptitud para el uso correspondiente (Rimoldi *et al.*, 2018).

2.3. Lago Ypacaraí

El lago Ypacaraí se encuentra situado al Este de Asunción, entre los departamentos Central y Cordillera, cuenta con una superficie de 60 km² aproximadamente y su profundidad media es de 1,72 m. Es un lugar importante desde

el punto de vista cultural porque ofrece bellos paisajes y es conocido a través de la música. Posee un alto valor ecológico, una rica biodiversidad, sobre todo de peces (López Moreira *et al.*, 2018).

En su cuenca se encuentran importantes afluentes como los arroyos como el Yukyry y el Pirayu y su principal efluente es el río Salado que desemboca en el río Paraguay.

La calidad de sus aguas se encuentra en situación de contaminación según el Informe Técnico de la Cuarta Campaña de Muestreo del Proyecto “Monitoreo de Calidad de Agua por Campañas de Muestreo en el Lago Ypacaraí”, realizado por Itaipu Binacional (2017) y llevado a cabo por el Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT), dependiente Dirección General de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Nacional de Asunción (UNA).

Algunos parámetros fisicoquímicos como nitrógeno total, fósforo total, color y turbidez se encontraron por encima de lo establecido como límite máximo para aguas de clase II en el decreto 222/02 del Ministerio del Ambiente y Desarrollo Sostenible. En base a los resultados fisicoquímicos, bacteriológicos e hidrobiológicos, el informe concluye en que el lago se encuentra en un estado de degradación importante.

Las aguas del Lago Ypacaraí son un recurso significativo de agua potable y de riego para localidades vecinas. Su proximidad a Asunción y su importancia como lugar turístico y cultural hacen que la situación de degradación ambiental en la que se encuentra sea un tema delicado, que llama la atención de las autoridades locales y motiva constantemente la investigación científica que apuntan a su saneamiento y recuperación (López Moreira *et al.*, 2018).

2.4. Contaminantes emergentes

Son considerados contaminantes emergentes a aquellos compuestos de origen y naturaleza química distinta que no han sido incluidos en las regulaciones de calidad del agua existentes, no se han estudiado anteriormente y se consideran amenazas

potenciales para los ecosistemas ambientales, la salud y la seguridad humanas. (Gil *et al.*, 2012)

Se pueden clasificar en diferentes grupos de compuestos químicos como: pesticidas, surfactantes, plastificantes y aditivos industriales, aditivos para combustibles, drogas farmacéuticas, productos de cuidado personal, hormonas y esteroides entre otros, incluyendo sus productos de degradación (Farré *et al.*, 2008). Las cantidades o concentraciones no siempre son significativas, por lo que en muchos casos pasan inadvertidos (Gil *et al.*, 2012).

La forma en que los contaminantes emergentes ingresan al medioambiente está relacionada con el uso del compuesto y en general provienen de desechos municipales, industriales, lixiviados agrícolas, derrames accidentales entre otros (Farré *et al.*, 2008). En su gran mayoría son moléculas contaminantes directos y en otros casos lo son sus productos de degradación o ambos (Gil *et al.*, 2012)

2.5. Generalidades del di(2-etilhexil) adipato (DEHA)

Según la nomenclatura sistemática de la IUPAC (“International Union of Pure and Applied Chemistry”) el compuesto cuya fórmula estructural se observa en la Figura 1, se denomina: hexanodioato de bis(2-etilhexilo) (PubChem Compound Database), aunque su nomenclatura tradicional di(2-etilhexil) adipato (DEHA) es la más utilizada.

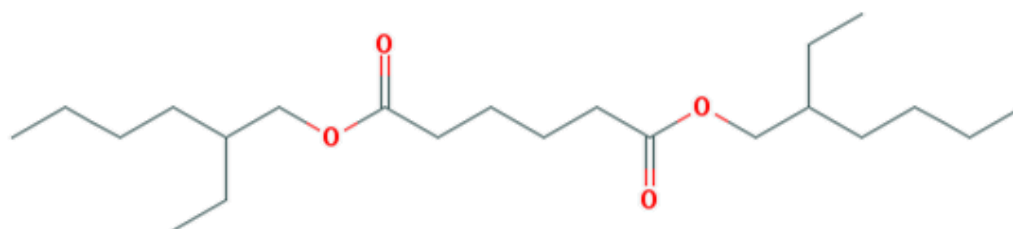


Figura 1. Estructura del bis(2-etilhexil) adipato (DEHA)

Su fórmula molecular es $C_{22}H_{42}O_4$; con número de registro CAS 103-23-1. Es un líquido oleoso de color amarillo muy claro, hidrofóbico y su densidad es 0,922

g.mL^{-1} , su punto de ebullición es $417\text{ }^{\circ}\text{C}$ y peso molecular: $370,57\text{ g.mol}^{-1}$ (Linstrom & Mallard, 2017).

Los ésteres de ácido ftálico comúnmente denominados ésteres de ftalato (PE), junto con di(2-etilhexil) adipato (DEHA) son compuestos químicos que se utilizan ampliamente en la industria de los plásticos, ya que mejoran la suavidad y la flexibilidad de estos (Farajzadeh & Khoshmaram, 2015).

DEHA al igual que otros plastificantes son utilizados en muchos productos de plástico como los ésteres de celulosa y los copolímeros de cloruro de vinilo (PVC) para hacerlos más flexibles y poder utilizarlos por ejemplo como embalaje de alimentos entre otros (Zhou *et al.*, 2013). Razón por la que DEHA es comúnmente detectado en alimentos con alto contenido de lípidos y con envolturas de plástico aditivadas con el mismo.

Estudios realizados determinaron la presencia de este y otros plastificantes como di(2-etilhexil) ftalato (DEHP), así como dos de los productos de degradación 2-etilhexanol y ácido 2-etilhexanoico, en aguas superficiales, sedimentos de ríos, nieve recién caída, agua del grifo, (Horn *et al.*, 2004). Se determinaron cantidades significativas de DEHA, DEHP y di(2-etilhexil) tereftalato DEHTP, 2-etilhexanol, 2-etilhexanal y ácido 2-etilhexanoico en las aguas residuales de una planta de tratamiento fisicoquímico de efluentes en Montreal Canadá (Barnabé *et al.*, 2008). Inclusive en el aire, se han determinado niveles de DEHA entre $0,3$ y $1,1\text{ ng/m}^3$ de aire en el puerto de Tarragona (Aragón *et al.*, 2012).

La solubilidad de DEHA en agua entre $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ es de $0,78\text{ mg.L}^{-1}$ a $< 100\text{ mg.L}^{-1}$, lo cual clasifica a esta sustancia como moderadamente soluble (Stuer-Laurdisen *et al.*, 2001). Sin embargo, Robillard *et al.* (2008), midieron la solubilidad de este compuesto en agua moderadamente dura a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y utilizando un método de agitación lenta, con el fin de aplicar un test de toxicidad, obteniendo un valor de solubilidad de $5,5\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$.

2.5.1. Efectos de DEHA en el medioambiente y la salud

Este compuesto químico es uno de varios productos de alto volumen de producción que se encuentran en evaluación por posibles riesgos ambientales (Robillard *et al.*, 2008). Debido al uso generalizado de los compuestos mencionados, se los considera contaminantes ambientales omnipresentes (Farajzadeh & Khoshmaram, 2015).

Su ingreso a la cadena trófica puede darse a través de la bioacumulación. Se han determinado altos niveles de DEHA en *Euphasia superba* Dana (krill antártico), 2,16 mg/g (Han & Liu, 2018)

Robillard *et al.* (2008), realizaron un test de toxicidad utilizando *Daphnia magna*, en la concentración de la solubilidad determinada ($5,5 \mu\text{g.L}^{-1}$). No observaron efectos perjudiciales sobre la supervivencia, el crecimiento o la reproducción en *D. magna* para la concentración testada. Sin embargo, (Boran & Terzi, 2017) hallaron que DEHA puede producir causar bajo nivel de genotoxicidad y daño en el ADN en pruebas realizadas con *Danio rerio* a concentraciones más altas.

Nabae, *et al.* (2006) realizaron pruebas de toxicidad de DEHA en órganos reproductivos de ratas macho, no observaron daños testiculares ni observaron cambios biológicamente significativos en la espermatogénesis en ratas tratadas con DEHA. Por otro lado Dalgaard *et al.* (2003) investigaron la toxicidad del compuesto pre y post natalidad de ratas Wistar, no encontraron evidencias de efectos antiandrogénicos pero sí evidenciaron toxicidad para el desarrollo y que el compuesto puede producir cáncer de hígado.

Según Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer - IARC por sus siglas en inglés (International Agency for Research on Cancer), DEHA no puede ser clasificado como un carcinógeno humano. Se clasifica como carcinógeno de categoría 3: debido a que la evidencia de carcinogenicidad en animales es limitada. DEHA causa la proliferación de peroxisomas en el hígado en ratones y ratas, pero la evidencia de

que este compuesto es carcinogénico en animales experimentales no es suficiente (IARC, 2000).

DEHA se hidroliza a ácido adípico y 2-etilhexanol, este último se oxida a 2-etilhexanol y ácido etilhexanoico (EHA). EHA se debe considerar al abordar la toxicidad del desarrollo de DEHA, ya que EHA es conocido como potente tóxico para el desarrollo físico (UN-EP, 2000).

Si bien no se ha comprobado que DEHA es un compuesto tóxico, sus productos de degradación (2-etilhexanol, 2-etilhexanal y 2-tilhexanoico) son muy estables y mayormente tóxicos. El químico es un candidato para más trabajos de investigación adicionales, debido al potencial riesgo crónico para el medio ambiente acuático (OECD SIDS).

2.6. Microextracción líquido-líquido dispersiva

La microextracción líquido-líquido dispersiva (*Dispersive Liquid-Liquid Microextraction, DLLME*) es una técnica de preparación de muestras muy amigable con el medioambiente porque es rápida, sencilla, económica, con un buen porcentaje de recuperación, que consume muy pequeñas cantidades de disolvente orgánico que fue desarrollado por (Rezaee *et al.*, 2006). La técnica de DLLME, se aplica con gran éxito en la extracción de analitos en matrices líquidas o acuosas, utilizando un disolvente líquido como medio extractante y por otro lado un líquido dispersante cuya finalidad es permitir una mayor superficie de contacto entre el extractante y la muestra.

La técnica de DLLME consiste en inyectar una mezcla apropiada de extractante y dispersantes en una muestra acuosa que contenga los analitos. De esta manera, el disolvente de extracción se dispersa en la muestra acuosa en forma de gotas muy finas permitiendo que los analitos sean transferidos de la fase acuosa a la fase orgánica. La interacción del dispersante entre el medio acuoso y el disolvente de extracción garantiza una gran superficie de contacto entre extractante y muestra, favoreciendo el paso de los analitos a la fase orgánica y aumentando la eficacia de la extracción. La gran superficie de contacto formada entre el disolvente de extracción y la muestra

acuosa, el estado de equilibrio se alcanza rápidamente y la extracción es independiente del tiempo (Rezaee *et al.*, 2010).

La última etapa de la técnica DLLME consiste en la centrifugación de mezcla ternaria. En esta etapa, las microgotas formadas por el extractante se agregan formando una gota más grande y que debido a su mayor densidad que el agua, se deposita en el fondo del tubo de centrifugación, de donde es fácilmente recuperable mediante la utilización de una microjeringa, para su posterior determinación por alguna técnica de análisis instrumental (Saraji & Boroujeni, 2014; Andruch *et al.*, 2012).

2.6.1. Fundamentos y características de la DLLME

La técnica de extracción líquido-líquido dispersiva se basa en un sistema ternario de fases líquidas, en la que la muestra está constituida por una fase acuosa, de la que se pretende extraer los analitos y, por otro lado, se tiene una mezcla binaria de disolventes orgánicos constituidos por un agente dispersante y un agente extractante. El disolvente dispersante debe ser polar y miscible tanto con el agua como el disolvente extractante. El disolvente extractante debe ser apolar, poco o nada miscible con el agua y con densidad mayor a $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Bosch Ojeda & Sánchez Rojas, 2009; Rezaee *et al.*, 2006).

La adición de la mezcla extractante-dispersante, se realiza mediante una inyección rápida dentro de la muestra, esto permite la formación de una gran cantidad de gotas pequeñas del agente extractante, aumentando enormemente la superficie de contacto con la fase acuosa. Este proceso favorece la transferencia del analito a la fase extractante y el equilibrio es alcanzado rápidamente (Zang *et al.*, 2009).

La centrifugación permite la correcta separación de la fase extractante en la parte inferior de la mezcla, debido a su mayor densidad. Esta fase contiene el analito, que preferentemente es más soluble en un medio apolar. La fase inferior es recuperada mediante la utilización de microjeringas para luego ser analizada (Bosch Ojeda & Sánchez Rojas, 2009).

La DLLME solo es aplicable a analitos neutros y que tengan un elevado carácter hidrofóbico, pues necesariamente el analito deberá tener una mayor distribución de su concentración en la fase orgánica. Esto se determina mediante el coeficiente de distribución K, que se mide por el cociente entre la concentración del analito en la fase orgánica y en la fase acuosa. Por lo tanto, para algunas especies químicas hidrofílicas con $K < 500$, será poco probable que pueda aplicarse esta técnica para su correspondiente extracción desde una matriz acuosa (Zang *et al.*, 2009; Rezaee *et al.*, 2010).

Rezaee *et al.* (2006) han utilizado un parámetro para medir la eficacia de la extracción denominado factor de enriquecimiento (FE), el cual se define como el cociente entre la concentración del analito en la fase extractante y su concentración en la muestra.

$$\text{Ecuación 1} \quad FE = C_{ext}/C_0$$

en donde: C_{ext} es la concentración del analito en la fase extractante y C_0 es la concentración del analito en la muestra.

El valor de la recuperación del analito se determina mediante la Ecuación 2. El volumen de extracción varía en cada ensayo, por lo que se hace necesaria la determinación del factor de enriquecimiento para calcular la recuperación.

$$\text{Ecuación 2} \quad R(\%) = FE \cdot V_{sed}/V_{aq} \cdot 100\%$$

donde: FE es el factor de enriquecimiento, V_{sed} es el volumen sedimentado de la fase extractante y V_{aq} es el volumen de la muestra utilizada en la extracción.

Algunos parámetros que afectan a la DLLME son: la fuerza iónica, que, al aumentarse, favorece el paso del analito a la fase extractante, favoreciendo la eficacia de la extracción (Zang *et al.*, 2009). La variación del potencial de Hidrogeno (pH), especialmente cuando el analito adopta una forma neutra en ciertas condiciones de pH,

se puede modificar este parámetro de manera a desplazar el equilibrio hacia la formación del analito en su forma extraíble, es decir, sin disociación (Cortada, 2012).

Por otro lado, existen otros factores que no afectan de manera significativa el proceso de extracción. En este caso, el tiempo de extracción y agitación son parámetros no muy importantes en esta técnica, ya que el equilibrio es alcanzado en un período de tiempo muy corto, lo que hace casi innecesarios tiempos largos de extracción y agitación (Cortada, 2012).

2.6.2. Selección de los disolventes extractante y dispersante

Los factores que más afectan la eficiencia de la DLLME son el disolvente de extracción adecuado, el disolvente de dispersión adecuado, el volumen de disolvente de extracción y el volumen de disolvente de dispersión. La selección de un disolvente de extracción apropiado es el parámetro principal para el proceso de DLLME (Rezaee *et al.*, 2010).

Los disolventes orgánicos se seleccionan como extractante en función de su mayor densidad que el agua, baja solubilidad en agua, la capacidad de extracción de los compuestos de interés, su capacidad de formar una dispersión mediante la combinación con el agente dispersante al ser añadido a la muestra y un buen comportamiento cromatográfico.

Los más utilizados generalmente son los hidrocarburos halogenados que en su mayoría son pesados, como el clorobenceno, el cloroformo, el tetracloruro de carbono, tricloroetano y el tetracloroetileno (Andruch *et al.*, 2012), aunque Kozani *et al.* (2007), han utilizado con éxito el disulfuro de carbono en la determinación de clorobencenos en agua, mediante cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica (ECD). La fuerte respuesta de los disolventes halogenados en el ECD establece restricciones para la selección del disolvente de extracción.

El disolvente dispersante a diferencia del disolvente extractante, debe ser miscible tanto con el disolvente de extracción como con el agua (la muestra), esto se logra con moléculas polares como los alcoholes de cadena corta, cetonas, nitrilos, etc. (Andruch *et al.*, 2012; Rezaee *et al.*, 2006). Los más utilizados son: metanol, etanol, acetona, acetonitrilo.

El agente dispersante produce una disminución de la tensión superficial del extractante y de esa manera permite que la mezcla forme una emulsión al ser inyectada dentro de la muestra, esto favorece la formación de una superficie de contacto grande entre el agente extractante y la matriz de análisis, permitiendo la transferencia de los analitos a la fase orgánica (Farajzadeh *et al.*, 2007).

El volumen y la proporción óptima de la mezcla extractante y dispersante será aquella que produzca un valor alto de FE y volumen suficiente de la fase extractante como para ser manipulable y analizable después de la centrifugación (Rezaee *et al.*, 2010).

2.6.3. Aplicaciones de la DLLME

Debido a su gran simplicidad, bajo costo, buena recuperación, pequeños volúmenes de disolventes, la DLLME es una técnica que se aplica directamente en la determinación de compuestos orgánicos en matrices acuosas. El agua es la matriz más eficaz para la aplicación de esta técnica, sin embargo, se han desarrollado estudios tanto para analitos orgánicos como inorgánicos en matrices con gran contenido de agua como aguas residuales, aguas superficiales, muestras biológicas (sangre, orina, leche), alimentos (jugos, vinos, bebidas en gral.), preparaciones farmacéuticas y otros, (Viñas *et al.*, 2014; Saraji & Boroujeni, 2014).

La búsqueda de disolventes más amigables con el medioambiente, que podrían ser empleados en sustitución de los hidrocarburos halogenados, constituye uno de los enfoques en el desarrollo de la DLLME. El uso de líquidos iónicos, líquidos de menor densidad que el agua, líquidos de bajo punto de fusión (inferiores a la temperatura

ambiente), el uso de surfactantes como agente dispersante, así como la combinación de la técnica DLLME con otras técnicas son algunas de las variantes que se pueden encontrar en la bibliografía relacionada al tema (Rykowska *et al.*, 2018; Lawal *et al.*, 2018).

2.7. Optimización de métodos analíticos

Las metodologías analíticas son optimizadas mediante técnicas multivariadas y puede considerarse como una excelente alternativa al modo tradicional de optimización basado en el enfoque univariado, ya que se logra con un bajo número de experimentos que son necesarios para alcanzar las condiciones optimizadas y la posibilidad de observar las interacciones entre las variables (Caldas *et al.*, 2013).

La optimización multivariante de una metodología analítica requiere de dos etapas. Primeramente, se debe realizar la identificación de las variables más significativas, las que realmente afectan de manera importante a todo el proceso, mientras que la segunda etapa implica la optimización de la respuesta del sistema controlando dichas variables. La identificación de las variables significativas se puede lograr mediante el uso de métodos de detección como la aplicación de un diseño factorial completo (o fraccional) de dos o más niveles (Caldas *et al.*, 2013; Gonzalez-Siso *et al.*, 2015).

Uno de los enfoques más utilizados en los estudios multivariados es el método de la superficie de respuesta, en el cual se aplica el diseño Doehlert con gran éxito en la optimización de técnicas analíticas en los laboratorios (Ferreira *et al.*, 2004).

2.8. Diseño experimental

Un diseño experimental con un enfoque estadístico es fundamental para optimizar un método analítico, considerando la variedad y complejidad de la química analítica actual; por lo que el uso de técnicas de diseño experimental multivariante se

está extendiendo cada vez más en la química analítica y otras ciencias (Ferreira *et al.*, 2004).

Los diseños multivariados permiten el estudio simultáneo de varias variables de control, ofrecen ventajas como por ejemplo que son más rápidos de implementar y más rentables que los enfoques univariados tradicionales. Mediante el diseño experimental y la evaluación estadística de los resultados, se puede demostrar la especificidad de un método, además de su selectividad, precisión y exactitud. Sobre todo, cuando se trata de un intervalo delimitado de concentraciones del analito (Velandia-Castellanos *et al.*, 2011).

2.9. Validación de métodos analíticos

Un método analítico es un conjunto de procedimientos que conduce a la determinación de la composición química de una muestra, tanto cualitativa como cuantitativamente. Es importante la validación de los métodos analíticos, ya que esto permite emitir resultados fiables y adecuados para su finalidad.

Se deben validar todos los métodos analíticos a ser utilizados, ya sean desarrollados por los mismos laboratorios como los establecidos por sus pares o que obren en fuentes bibliográficas (NP-ISO/IEC 17025, 2018).

La validación de un método está definida por la NP-ISO/IEC 17025, (2018) como la confirmación a través del examen y aportación de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto. Esta confirmación se realiza evaluando las características de desempeño del método.

El uso de la estadística es fundamental para soportar el proceso de validación sobre todo para el manejo y análisis de los datos, lo que posibilita emitir juicios con criterios que lleven a una correcta evaluación del método (Bazilio *et al.*, 2014).

La validación de un método analítico abarca etapas como la verificación de la exactitud de los resultados para luego establecer otros parámetros como linealidad, sensibilidad y selectividad, límites de detección y cuantificación (Benítez, 2013).

2.10. Características de desempeño de los métodos analíticos

Las características de desempeño de un método analítico son un conjunto de parámetros del método analítico. Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad.

Según la NP-ISO/IEC 17025 (2018), las características de desempeño incluyen: el rango de medición, la exactitud, la incertidumbre de medición de los resultados, el límite de detección, el límite de cuantificación, la selectividad del método, la linealidad, la repetibilidad o la reproducibilidad y el sesgo.

2.10.1. Selectividad

La selectividad es el grado en que un método puede determinar al analito de manera precisa y específica en presencia de interferentes en una matriz bajo las condiciones establecidas para el método (Eurachem, 2014).

Para evaluar esta característica de desempeño en casos en donde no está claro si la presencia de interferentes ya se encuentra con anterioridad en la muestra, la guía EURACHEM establece que se pueden comparar los resultados obtenidos entre dos métodos diferentes independientes.

Es usual que la selectividad de un método se evalúe a través del estudio de su capacidad para medir el analito de interés en presencia de interferencias específicas que son agregadas deliberadamente a las muestras. Sin embargo, cuando es difícil establecer o conocer cuáles podrían ser los interferentes en la técnica utilizada, la selectividad del método puede ser evaluada estudiando su capacidad de medir el analito mediante comparación con otros métodos o técnicas independientes (González & Herrador, 2007).

2.10.2. Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)

Se puede definir el límite de detección (LOD) como la cantidad o concentración más baja de un analito, que puede ser detectada por un método analítico con un nivel de confianza determinado (Eurachem, 2014).

Existe un límite de detección del instrumento y un límite de detección del método. El límite de detección del instrumento consiste en el análisis de una muestra blanco, es decir que no que contenga al analito o una muestra con cantidades muy pequeñas del analito capaz de generar señal en el equipo y que estén por debajo del límite de cuantificación (LOQ) esperado. Mientras que el LOD del método es el valor obtenido para muestras que hayan sido sometidas a todo el proceso del método de ensayo y cuyo resultado se obtiene mediante la misma ecuación utilizada para calcular el valor del mensurando empleado en el método (Eurachem, 2014).

El LOQ, es la cantidad o concentración mínima del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión y veracidad. Ambas son características de desempeño de un método (NP-ISO/IEC 17025, 2018) y son determinadas a partir del valor de desviación estándar en unidades de concentración de una muestra blanco o fortificada con el analito a un nivel de concentración mínima que genere una señal instrumental. La guía EURACHEM (2014), establece que el LOD es 3 veces la desviación estándar en unidades de concentración del analito en la matriz, mientras que el LOQ es 10 veces ese mismo valor.

2.10.3. Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo lineal se puede definir como el intervalo dentro del cual, la sensibilidad analítica se mantiene constante. Esto se traduce en que la respuesta analítica del instrumento es proporcional a la concentración de analito en la muestra (González & Herrador, 2007).

Si representamos gráficamente la señal instrumental obtenida para diferentes concentraciones de analito presentes en los patrones de calibración, se podrá visualizar

una curva como se ejemplifica en la Figura 2. En la misma se pueden identificar las características de desempeño como el LOD, el LOQ, la sensibilidad y el intervalo de trabajo lineal del instrumento, que es una sección de esta curva que queda determinada en su límite inferior por el LOQ y en el extremo superior se puede extender hasta observar anomalías en la sensibilidad analítica (EURACHEM 2014).

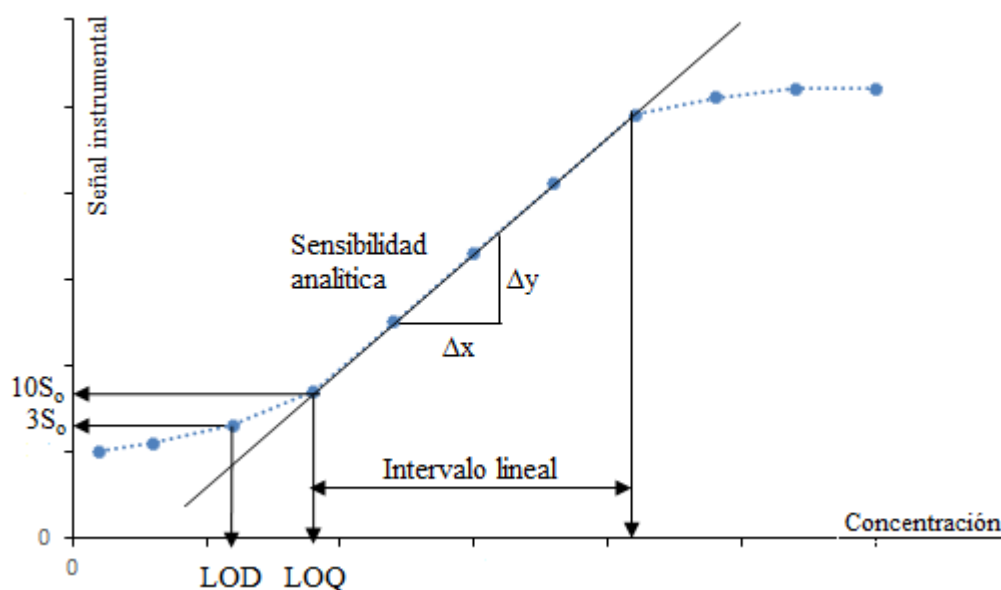


Figura 2. Representación gráfica de la relación entre la señal instrumental y la concentración. Elaboración propia, fuente: Eurachem, 2014.

2.10.4. Sensibilidad analítica

La sensibilidad de un método analítico que requiere de una curva patrón queda definida por la pendiente de dicha curva. La definición de la EURACHEM (2014), establece que la sensibilidad analítica de un método es la variación de la respuesta instrumental con respecto a la magnitud de medida, en este caso la concentración del analito.

2.10.5. Veracidad

La veracidad de un método analítico se define como la proximidad o concordancia entre los resultados obtenidos experimentalmente a través de un número infinito de pruebas repetidas y un valor de referencia (VIM, 2012).

Como no es posible realizar un número infinito de mediciones, se puede evaluar la veracidad del método en términos cuantitativos mediante determinación del sesgo. Para determinar el sesgo es recomendable el uso de materiales de referencia certificados (MRC), que aseguren la trazabilidad metrológica del valor verdadero, estos no siempre se encuentran disponibles para todas las matrices o analitos de interés. La guía EURACHEM (2014), establece otros enfoques como la medición de la recuperación (Rec%) de muestras fortificadas con el analito o la comparación de los resultados obtenidos con el método propuesto y un método de referencia.

El sesgo puede expresarse en términos de porcentaje de recuperación del analito en la muestra fortificada mediante la Ecuación 3. Para muestras que han sido diluidas, la recuperación del analito puede calcularse mediante la Ecuación 4.

Ecuación 3
$$Rec\% = \frac{(C_F - C_O)}{C_A}$$

donde Rec% es el porcentaje de recuperación del analito desde la matriz, C_F es concentración determinada en la muestra fortificada, C_O es la concentración inicial del analito en la matriz y C_A es la concentración del analito añadida.

Ecuación 4
$$Rec\% = \frac{C_O}{C_E} \cdot 100\%$$

donde C_O es concentración observada y C_E es la concentración esperada para muestras de concentración conocida, que fueron diluidas.

2.10.6. Precisión

La precisión de medida se define como la proximidad o la concordancia entre los valores medidos, que química analítica serían las concentraciones, que hayan sido obtenidos, mediante mediciones repetidas de un mismo objeto o muestra, bajo condiciones especificadas (VIM, 2012).

La precisión puede expresarse en términos cuantitativos mediante la desviación estándar de los resultados analíticos. Una desviación estándar amplia, equivale a una baja precisión.

La repetibilidad y la reproducibilidad de las mediciones son las formas en que se representan las medidas de precisión. La repetibilidad se determina a partir de una serie de mediciones realizadas generalmente por un mismo analista, en un periodo corto de tiempo, con los mismos instrumentos, en la misma muestra y los mismos reactivos; mientras que la reproducibilidad se determina realizando mediciones en diferentes laboratorios (Eurachem, 2014).

La precisión intermedia, es una forma de estimar la variación de los resultados en un mismo laboratorio, pero en condiciones más variables que las establecidas para estimar la repetibilidad. Por ejemplo, se pueden realizar mediciones de una misma muestra por diferentes técnicos, en diferentes días, en diferentes equipos, etc. Con el objetivo de que la estimación de la precisión incluya más fuentes de variación de los resultados.

El valor de la repetibilidad (S_r) se puede obtener mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor, calculando la raíz cuadrada del término del cuadrado medio dentro del grupo, que representa la varianza intra-grupo, mientras que la precisión intermedia (S_I) se obtiene como la raíz cuadrada de la suma de los cuadrados de la precisión dentro del grupo y entre grupos (Eurachem, 2014; González & Herrador, 2007).

3. METODOLOGÍA

3.1. Materiales y equipamiento

Los reactivos utilizados, materiales de laboratorio, equipos e instrumentales fueron proveídos por el Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología – INTN y el equipo de cromatografía gaseosa acoplado a espectrómetro de masas fue proveído por la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – FACEN.

Se utilizaron reactivos y disolventes como etanol (CAS N° 64-17-5) *Merck* de 99,9 % de pureza, acetona *Cicarelli* (CAS N° 67-64-1) de 99,5 % de pureza, acetonitrilo *J.T. Baker* (CAS N° 75-05-8), diclorometano *Cicarelli* (CAS N° 75-09-2) de 99,5 % de pureza, cloroformo *Cicarelli* (CAS N° 67-66-3) de 99,0 % de pureza, tetracloruro de carbono *Sigma Aldrich*[®] (CAS N° 56-23-5) de $\geq 99,5$ % de pureza, isooctano (CAS N° 540-84-1) de 99,8 % de pureza, cloruro de sodio (CAS N° 7647-14-5) de 99,0 % de pureza. El estándar de di(2-etilhexil) adipato (CAS N° 103-23-1) de la marca *Sigma Aldrich*[®] de 99 % de pureza.

Se utilizaron materiales de laboratorio como matraces, pipetas clase A de diferentes volúmenes, viales de vidrio color caramelo de 1,5 mL de capacidad, insertos de 100 μ L y 250 μ L de capacidad, tubos de centrifuga de polipropileno de 15 mL y de 50 mL de capacidad, punteras de 1000 μ L, 500 μ L y 100 μ L, propipeta automática de la marca *Dragon Lab*. Botellas de vidrio color ámbar de 1 L de capacidad para los muestreos. Papel de filtro para las muestras marca *Macherey-Nagel* faja negra sin cenizas.

Los equipos e instrumentales de laboratorio fueron un Cromatógrafo gaseoso con detector FID (GC-FID) de la marca *Agilent* modelo 7890 A, con inyector automático, cromatógrafo gaseoso acoplado a espectrometría de masas “single”

cuadrupolo (GC-MS) de la marca *Shimadzu* modelo QP2010 plus, con inyector automático. Centrífuga automática de la marca *Thermo Electron Corporation*, modelo CL30. Agitador automático de la marca *New Brunswick Scientific*, modelo Excella E1. Balanza analítica de la marca *Kern* modelo ACJ 120-4M. Evaporador rotatorio de la marca *Büchi* modelo R210.

Programas informáticos: Software de tratamiento estadístico *Statgraphic Centurion XVI*, versión 16.0.07; Paquete *Microsoft® Office: Word®, Excel® y PowerPoint®* 2016; Software *ChemStation* versión B.03.01-SR1 de gestión y tratamiento de los datos obtenidos del cromatógrafo GC FID *Agilent* y *GC-MS Solution Workstation* versión 2.5, software de gestión y tratamiento de los datos obtenidos del GC-MS con base de datos de espectros de masa *NIST 08* utilizado para la identificación del analito.

3.2. Identificación del analito mediante GC-MS

Para la identificación del analito se realizaron pruebas cualitativas utilizando la técnica de extracción líquido-líquido con diclorometano. Se utilizaron muestras extraídas muestra del Lago Ypacaraí; 1 litro de cada muestra correspondiente a los 6 puntos de muestreo respectivamente fueron extraídas con dos porciones sucesivas de 60 mL de diclorometano, las mismas se juntaron en un balón y se evaporó el disolvente en el evaporador rotatorio, retomando el residuo con acetona a un volumen de 500 µL. El método de extracción se basó en la norma EPA 606.

El extracto obtenido se inyectó en el cromatógrafo gaseoso acoplado al espectrómetro de masa. El análisis fue realizado en modo “scan”. El volumen de inyección fue de 1 µL con inyector automático y en modo “splitless”. La fuente a 260 °C, interfaz a 230 °C, el corte del disolvente a los 3 minutos, el voltaje a 70 eV y la ventana de pesos moleculares entre 40 Dalton y 500 Dalton.

La columna utilizada fue SLB[®]-5ms de 30 m de longitud por 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 micras de película, la temperatura de la misma a 150 °C con

rampa de 5 °C/minuto hasta 260 °C. El tiempo de corrida total fue de 33 minutos.

La identificación del analito fue confirmada mediante el análisis del extracto en un cromatógrafo gaseoso con detector FID y comparación del tiempo de retención con un estándar de di(2-etilhexil) adipato de 99 % de pureza.

Las condiciones de análisis fueron: columna HP-INNOWax de polietilenglicol como fase estacionaria, de 30 m de longitud x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 micras de filme. Gas carrier nitrógeno de 99,9 % de pureza. La temperatura del puerto inyector a 250 °C, detector a 300 °C, la temperatura inicial del horno a 200°C y una rampa de 5 °C/min hasta 260 °C, en donde se mantuvo por 2 minutos. 14 minutos de tiempo total de corrida y 2 µL de volumen de inyección en modo *Splitless*.

3.3. Desarrollo del método DLLME

Para este trabajo se utilizó la técnica de microextracción en fase líquido-líquido dispersiva DLLME por sus siglas en inglés (Rezaee *et al.* 2006). La técnica de extracción fue sometida a un proceso de optimización con el objetivo de obtener las condiciones óptimas que garanticen la mejor recuperación del analito. Para tal fin, primeramente, se evaluó la influencia de los disolventes de extracción y de dispersión, aplicando un diseño univariante en cual se ha estudiado la recuperación del analito como variable dependiente.

Los disolventes extractantes seleccionados (diclorometano - CH₂Cl₂, cloroformo - CHCl₃ y tetracloruro de carbono - CCl₄), poseen densidades mayores a la del agua (requisito para ser utilizado como medio extractante en esta técnica). Mientras que la característica requerida para los disolventes dispersantes (etanol - CH₃CH₂OH, acetona - (CH₃)₂CO y acetonitrilo - CH₃CN), es su capacidad de mezclarse completamente con el disolvente extractante y con el medio acuso de la matriz de estudio.

En el diseño experimental completamente al azar de un factor que se propone,

se evaluó la recuperación del analito desde una muestra preparada en laboratorio con el estándar del analito DEHA y agua destilada como variable dependiente, utilizando las mezclas de los disolventes (extractante-dispersante) en diferentes combinaciones, según Tabla 1.

Para el efecto se proponen las siguientes hipótesis:

Ho: La combinación del tipo de disolvente extractante y disolvente dispersante no tiene influencia en la recuperación del analito.

Ha: La combinación del tipo de disolvente extractante y disolvente dispersante mejora la recuperación del analito.

Tabla 1. Tratamientos aplicados para evaluar la mayor afinidad del analito con los componentes extractante y dispersante.

Identificación de los tratamientos	Extractante	Dispersante	Proporción	Volumen inyectado (mL)
T11	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ CH ₂ OH	1:9	1
T21	CHCl ₃	CH ₃ CH ₂ OH	1:9	1
T31	CCl ₄	CH ₃ CH ₂ OH	1:9	1
T12	CH ₂ Cl ₂	(CH ₃) ₂ CO	1:9	1
T22	CHCl ₃	(CH ₃) ₂ CO	1:9	1
T32	CCl ₄	(CH ₃) ₂ CO	1:9	1
T13	CH ₂ Cl ₂	CH ₃ CN	1:9	1
T23	CHCl ₃	CH ₃ CN	1:9	1
T33	CCl ₄	CH ₃ CN	1:9	1

Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias significativas entre los tratamientos evaluados, la variable respuesta estudiada fue el porcentaje de recuperación del analito. Con los resultados obtenidos, se procedió a aplicar el diseño experimental Doehlert de tres variables para optimizar el proceso de extracción y cuantificación del analito.

La muestra utilizada para la evaluación de la efectividad de los tratamientos se preparó a una concentración de 0,1 mg.L⁻¹, utilizando el estándar de di(2-etilhexil) adipato (DEHA), proveído por el Departamento de Envases y Embalajes del INTN.

El compuesto DEHA se disolvió previamente en 1 mL de acetona, una vez disuelto completamente, se llevó a un volumen de 1L con agua destilada.

Posteriormente la mezcla fue sonicada por 10 minutos a 30 °C para homogeneizar completamente la misma. La muestra preparada fue extraída aplicando cada tratamiento por triplicado.

3.4. Optimización de la técnica DLLME

Para optimizar la técnica DLLME, una vez conocida la mejor combinación de disolventes extractante y dispersante, se evaluaron otras variables que pudieran tener influencia en la recuperación del analito como ser el volumen de mezcla extractante aplicada en la extracción, la proporción extractante dispersante y la fuerza iónica del medio de extracción.

Para llevar a cabo la optimización de la técnica de extracción, se utilizó un diseño experimental multivariante y fue aplicado mediante una matriz Doehlert para 3 variables.

Los niveles de cada uno de los factores fueron establecidos según la Tabla 2. La fuerza iónica se evaluó mediante la adición de cloruro de sodio a la muestra en cantidades que varían de 0 % a 20 % (m/v), agregado antes de la extracción. La proporción de disolventes extractante-dispersante fue estudiada mediante la variación del contenido de disolvente extractante con relación al dispersante. La proporción se expresa en porcentaje volumen / volumen (extractante / dispersante) y varía de 10 % a 25 % de tetracloruro de carbono en acetona. Finalmente, la variable volumen de mezcla extractante añadida a la muestra para la aplicación del método DLLME en un intervalo de 1 mL a 1,5 mL.

La distribución de las variables se realizó según la matriz Doehlert de códigos para un diseño de 3 variables (ver Anexo A.1).

El experimento 1, se repitió tres veces por ser el punto central en la matriz Doehlert.

Tabla 2. Diseño Doehlert para 3 variables empleado en la optimización de DLLME.

Experimentos	NaCl (%)	Proporción (%)	Volumen (mL)
1	10	17,5	1,25
2	20	17,5	1,25
3	15	25,0	1,25
4	15	20,0	1,50
5	0	17,5	1,25
6	5	10,0	1,25
7	5	15,0	1,00
8	15	10,0	1,25
9	15	15,0	1,00
10	5	25,0	1,25
11	10	22,5	1,00
12	5	20,0	1,50
13	10	12,5	1,50

La asignación de códigos a los niveles de los factores estudiados en la optimización de DLLME se detalla en el Anexo A.2.

3.5. Validación de métodos analíticos

El método DLLME fue optimizado mediante la aplicación del diseño experimental multivariante tipo Doehlert. Posteriormente se procedió a la validación del método de análisis siguiendo las directrices de la guía CITAC - EURACHEM, (2014) estableciendo las características de desempeño del método que se describen a continuación.

3.5.1. Selectividad

Para la verificación de la selectividad, el método propuesto (método A) fue comparado con otro método basado en la norma EPA 606 – “Método para determinación de ésteres de ftalatos y de adipatos en agua potable” (método B).

Método A: es el método propuesto en este trabajo. Los analitos se extraen de la muestra utilizando la técnica de microextracción DLLME, optimizada mediante el diseño experimental detallado anteriormente. Para el efecto, se coloca una alícuota de 50 mL de muestra en un tubo de centrifugación de suficiente capacidad para dicho volumen, a la cual, se le inyecta de manera rápida un volumen de 1,0 mL de la mezcla

extractante-dispersante (tetracloruro de carbono - acetona) en proporción 25 % (v/v). El tubo es colocado en un agitador mecánico y se procede a su agitación automática por 10 min a 150 rpm.

Luego de ese período, el tubo, conteniendo la muestra es sometido a centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos. Posterior a esta etapa, el líquido extractante sedimenta en el cono del tubo de donde es retomado utilizando una micro jeringa de vidrio de 100 µL. Se mide el volumen total sedimentado y luego una alícuota de 100 µL es colocada en un vial de 1,5 mL de capacidad que a su vez contiene un inserto de vidrio de 250 µL de capacidad para su análisis en el cromatógrafo *Agilent* (GC-FID).

Condiciones de análisis: columna *HP-INNOWax* de polietilenglicol como fase estacionaria, de 30 m de longitud por 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 micras de filme. Gas carrier nitrógeno de 99,9 % de pureza. La temperatura del puerto inyector a 250 °C, detector a 300 °C, la temperatura inicial del horno a 200 °C y una rampa de 5 °C/min hasta 260 °C, en donde se mantuvo por 2 minutos. 14 minutos de tiempo total de corrida y 2 µL de volumen de inyección en modo “Splitless”.

Método B: Los analitos se extraen de la muestra utilizando extracción líquido-líquido (LLE). Para LLE, una muestra de 500 mL se extrajo con 60 mL de diclorometano y 50 g de NaCl en un embudo de decantación. Se agitó vigorosamente y luego se dejó reposar por 10 minutos para la separación completa de las fases, el líquido orgánico fue decantado dentro de un matraz Erlenmeyer y se procedió a una segunda extracción utilizando nuevamente una porción de 60 mL de diclorometano.

Ambas porciones se juntaron y se evaporó el disolvente en el evaporador rotatorio hasta sequedad y fue retomado con 2,0 mL de n-hexano para su posterior análisis en el cromatógrafo gaseoso.

Condiciones de análisis: cromatógrafo gaseoso *Agilent* (GC-FID), columna DB-5 (5%-fenyl)-methylpolisiloxano como fase estacionaria de 30 m de longitud por 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 micras de filme. Gas carrier nitrógeno de 99,9 %

de pureza. La temperatura del puerto inyector a 300 °C, detector a 300 °C, la temperatura inicial del horno a 150 °C por 1 min y una rampa de 5 °C/min hasta 260 °C. 23 minutos de tiempo total de corrida y 2 µL de volumen de inyección en modo “Splitless”.

Las muestras analizadas fueron preparadas como una curva en matriz en concentraciones que se detallan en Anexo A.3.

La selectividad del método fue determinada mediante la prueba estadística t de comparación de medias, para lo cual se plantearon las siguientes hipótesis.

Ho: La diferencia de medias entre los métodos A y B es igual a 0 ($\mu_D = 0$)

Ha: La diferencia de medias entre los métodos A y B es distinto de 0 ($\mu_D \neq 0$)

3.5.2. Límite de detección LOD y límite de cuantificación LOQ

El límite de detección (LOD) queda definido por la desviación estándar de n resultados individuales en concentración cero o muy cercana a cero. La desviación estándar obtenida corresponde a 6 muestras preparadas en la matriz de análisis a la concentración más baja en la cual se obtenía señal instrumental (0,020 m.L⁻¹). Las mismas fueron tratadas según las condiciones definidas en el método optimizado.

El LOD instrumental se determinó mediante la Ecuación 6, para lo cual se estima la desviación estándar S'_o de los resultados de las 6 réplicas aplicando la Ecuación 5.

Ecuación 5
$$S'_o = \frac{S_o}{\sqrt{n}}$$

Ecuación 6
$$LOD_{inst} = 3.S'_o$$

donde S_o : es la desviación estándar de m réplicas de medidas realizadas con el método en la validación expresadas en unidades de concentración del analito en la curva; n : es

la cantidad de réplicas de medición promediadas que se realizan para informar un resultado de un ensayo obtenido siguiendo el procedimiento de medición y S'_o : es la desviación estándar utilizada para calcular el LOD.

El LOQ instrumental, queda definido por la Ecuación 7. Se determina de manera análoga a LOD instrumental.

Ecuación 7
$$LOQ_{inst} = 10 \cdot S'_o$$

Para obtener el LOD y LOQ del método se calcularon mediante la Ecuaciones 8 y 9 respectivamente, con las cuales, los valores del LOD y LOQ quedan expresados en unidades de concentración en la muestra.

Ecuación 8
$$LOD_{met} = LOD_{inst} \cdot V_{sed} / V_m$$

Ecuación 9
$$LOQ_{met} = LOQ_{inst} \cdot V_{sed} / V_{aq}$$

dónde: V_{sed} es el volumen sedimentado de la fase extractante y V_{aq} es el volumen de la muestra utilizada en la extracción.

3.5.3. Linealidad, intervalo de trabajo y sensibilidad analítica

El estudio de linealidad se realizó utilizando siete niveles de concentración con tres replicas diferentes (ver Anexo A.4), partiendo de una solución concentrada, preparada utilizando iso-octano como disolvente a una concentración de 1000 mg.L⁻¹ del compuesto.

Para evaluar el efecto matriz, se realizó una curva en matriz mediante la fortificación de las muestras con el estándar de DEHA, en concentraciones que se observan en Anexo A.4. Para verificar si el efecto matriz es significativo se realizó una prueba estadística de comparación de pendientes para lo cual se establecieron las siguientes hipótesis.

Ho: las pendientes de las curvas en disolvente y en matriz son iguales ($b_1 = b_2$).

Ha: las pendientes de las curvas en disolvente y en matriz difieren estadísticamente ($b_1 \neq b_2$).

El intervalo de trabajo lineal propuesto en este método, va de 10 a 100 mg.L⁻¹, para la curva en disolvente (iso-octano) y de 10 a 240 mg.L⁻¹ para la curva preparada en matriz.

Para establecer el rango lineal se realizó un análisis de correlación lineal entre el área de los picos y las concentraciones (factor respuesta) en cada punto de calibración. Además, se realizó un análisis de los residuales para verificar que no existan tendencias no aleatorias.

Se calcularon la pendiente, el intercepto y el coeficiente de correlación (r) para verificar la linealidad del intervalo, así como cuantificar la sensibilidad del método.

3.5.4. Veracidad y precisión

Se determinó la veracidad del método mediante el empleo de los ensayos de recuperación, para cada nivel de concentración del analito en muestras preparadas de concentración conocida. La recuperación se determinó aplicando la Ecuación 3 para las muestras fortificadas y la Ecuación 4 para la muestra diluida al LOQ.

Se utilizó la muestra de más baja concentración y se prepararon muestras en 5 niveles de concentración incluyendo la concentración al LOQ, para lo cual la muestra tuvo que ser diluida (ver Anexo A.5). Las demás muestras fueron fortificadas mediante la adición de cantidad necesaria de una solución del analito en acetona a una concentración de 1000 mg.L⁻¹. Se calculó el porcentaje de error relativo, %Er en cada punto mediante la Ecuación 10.

Ecuación 10
$$\%Er = \frac{|C_O - C_E|}{C_E} \cdot 100\%$$

donde: C_O es concentración observada, C_E es concentración esperada.

La precisión del método fue determinada mediante la estimación de la repetibilidad (S_r) y precisión intermedia (S_I) mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor para 6 réplicas en dos niveles de concentración distintos. Al nivel del LOQ y a 0,200 mg.L⁻¹.

La repetibilidad (S_r) es la precisión dentro del grupo obtenida de la tabla ANOVA y calculada mediante la Ecuación 11 y la precisión intermedia S_I se obtiene mediante la Ecuación 13.

Ecuación 11
$$S_r = \sqrt{CM_e}$$

Ecuación 12
$$S_d = \sqrt{\frac{CM_e - CM_i}{n}}$$

Ecuación 13
$$S_I = \sqrt{S_r^2 + S_d^2}$$

dónde: CM_e es el cuadrado medio entre días, CM_i es el cuadrado medio intradía, y S_d es la contribución a la variación total del factor de agrupamiento y n es la cantidad de réplicas realizadas por día.

3.6. Toma y análisis de las muestras

Las muestras fueron colectadas según el procedimiento descrito en la NP-186 (1980), en botellas de vidrio color ámbar de 1 litro de capacidad con tapa rosca de plástico, en 6 puntos distribuidos en el lago Ypacaraí según se ilustra en el mapa de la Figura 3. Los puntos de muestreo fueron elegidos por conveniencia de manera a cubrir zonas importantes como la desembocadura de los afluentes o zonas aledañas a poblaciones costeras y la zona central de manera a abarcar de forma más representativa la extensión del lago.

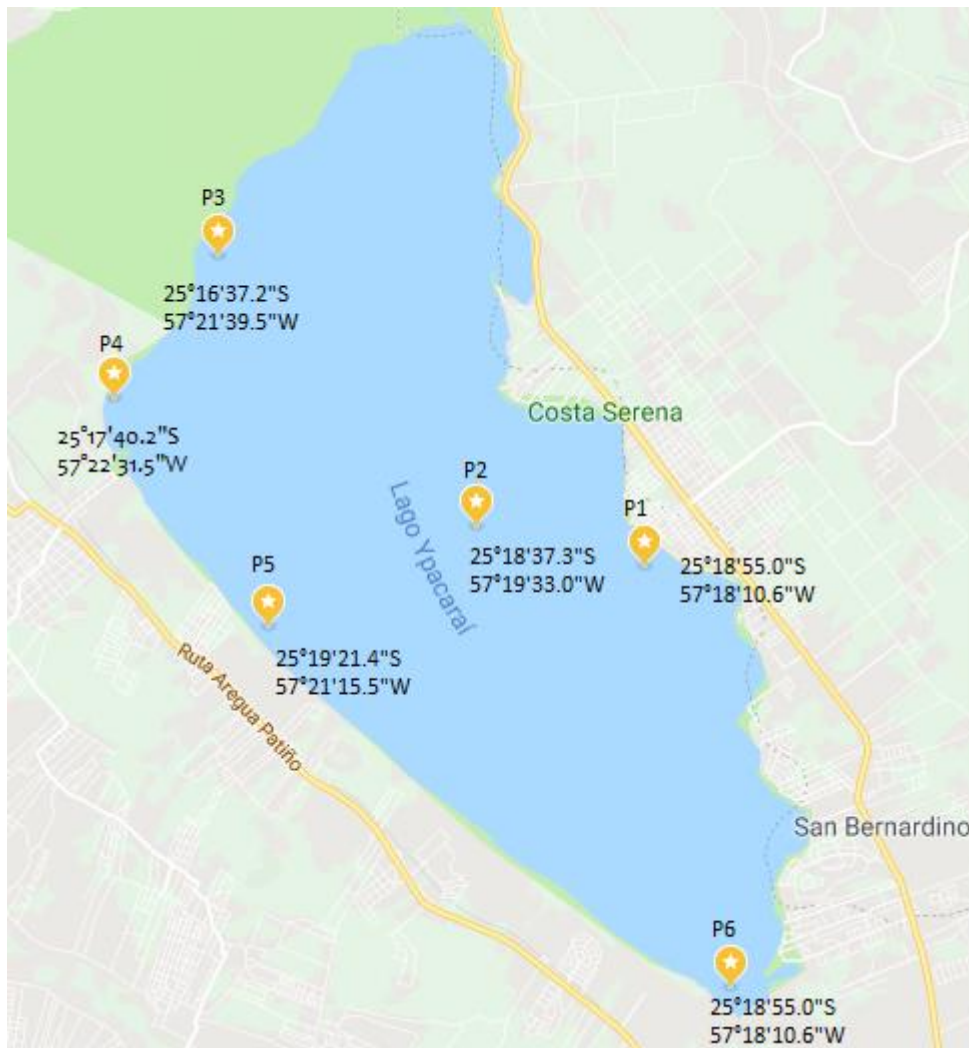


Figura 3. Distribución geográfica de los puntos de muestreo del lago Ypacaraí.
Elaboración propia. Fuente Google maps.

Con el objetivo de obtener datos para evaluar la situación del contaminante en el lago, durante el año 2018 se realizaron 3 campañas de muestreo puntuales en periodos de tiempo seleccionados arbitrariamente. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio del INTN y refrigeradas a 4°C hasta su análisis. Las coordenadas de los puntos de muestreo se detallan en Anexo A.6.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este apartado se discuten los resultados obtenidos en la identificación del analito, la optimización del método DLLME, desarrollo y validación del método analítico y la aplicación del mismo en la cuantificación de DEHA en muestras de aguas superficiales.

4.1. Identificación del analito

La identificación del analito se realizó mediante el análisis por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas del extracto de las muestras. El espectro de masa de las muestras analizadas (Figura 4) muestra una similitud del 97% con el espectro de masa del di(2-etilhexil) adipato obtenido de la base de datos de la biblioteca de espectros de masa NIST 08. La presencia del ion “target” o cuantificador $m/z = 129$ y los iones cualificadores $m/z = 112$ y $m/z = 147$ coinciden con el espectro obtenido por Lo Turco *et al.* (2015), y Aragón *et al.* (2012).

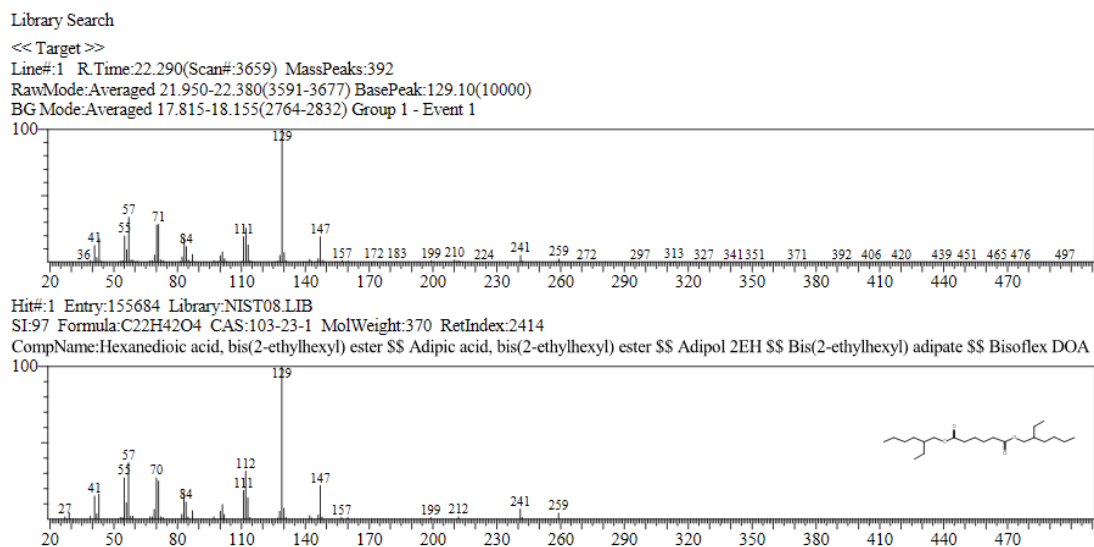


Figura 4. Espectro de masa de DEHA y espectro de masa de la muestra.
Fuente Base de datos de la biblioteca de espectros de masa NIST 08.

Posteriormente se realizó un análisis de confirmación de la identificación del analito mediante un análisis de cromatografía gaseosa y comparación de tiempos de retención con un estándar del compuesto di(2-etilhexil) adipato. En la Figura 5, se pueden observar los cromatogramas obtenidos del estándar y de la muestra del lago.

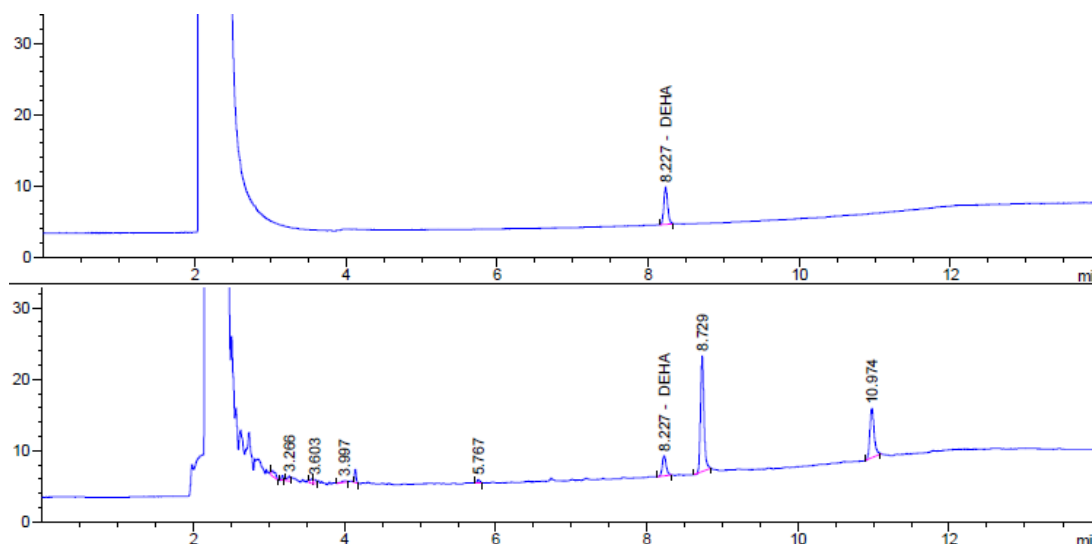


Figura 5. Cromatograma obtenido del estándar (superior) y de la muestra del lago (inferior).
Fuente: ChemStation versión B.03.01-SR1 de gestión y tratamiento de los datos obtenidos del cromatógrafo GC FID Agilent.

El tiempo de retención (RT) del pico del analito objetivo coincide totalmente con el RT del pico del estándar de di(2-etilhexil) adipato utilizado como material de referencia. Considerando las dos pruebas, se comprueba cualitativamente la presencia de dicho compuesto en las aguas del lago Ypacaraí.

4.2. Desarrollo del método DLLME

La combinación de disolventes extractante y dispersante pudo ser evaluada mediante la aplicación de un diseño experimental univariante, cuyos resultados fueron sometidos a un tratamiento estadístico de análisis de la varianza y la prueba de significancia de Tukey. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 3.

La Tabla 3 muestra que el tratamiento T32, difiere significativamente según la prueba de Tukey con un 95% de probabilidad de acierto, de todos los demás tratamientos en los que se obtuvieron resultados (Anexo A.7). Por lo que se rechaza la

hipótesis nula H_0 .

Tabla 3. Resultado de los tratamientos aplicados para evaluar el % de recuperación del analito.

# de Réplicas	Tratamientos								
	T11	T21	T31 ^a	T12	T22 ^a	T32 ^b	T13 ^a	T23 ^a	T33 ^a
1	0	0	39,5	0	26,3	93,1	0	44,6	48,6
2	0	0	37,8	0	29,5	87,4	0	44,8	51,0
3	0	0	41,3	0	31,4	90,2	0	46,2	49,3

Según la prueba de Tukey, tratamientos con la letra *a*, no difieren estadísticamente, tratamientos con la letra *b*, difieren estadísticamente al 95% de confianza.

Los tratamientos que contenían diclorometano con los distintos disolventes dispersantes (T11, T12 y T13), así como el tratamiento T21 (cloroformo-etanol) no formaron gotas en la proporción establecida para el estudio, por lo que se aumentó la proporción de extractante – dispersante a 3:7, sin éxito en la formación de gotas.

La varianza determinada mediante las diferencias en la recuperación del analito (ver anexo A.8), evidencia que el tipo de disolventes, extractante y dispersante, influyen en la recuperación del analito. Por lo que el tetracloruro de carbono y la acetona fueron seleccionados para la optimización del DLLME. (Farajzadeh & Khoshmaram, 2015) obtuvieron resultados satisfactorios empleando una mezcla ternaria de disolventes extractantes de CH_2Cl_2 , CHCl_3 y CCl_4 . En cuanto al dispersante evaluado obtuvieron mejores resultados con dimetil formamida.

4.3. Optimización del método DLLME

Determinada la mejor combinación de disolvente extractante – dispersante, se realizó la optimización del DLLME considerando las otras variables que pueden influenciar en el valor de la recuperación de analito establecidas en la Tabla 2.

La optimización se realizó mediante la aplicación de un diseño multivariante del tipo Doehlert de 3 variables. La Tabla 4 muestra los 13 experimentos realizados más el punto central (experimento 1) por triplicado, y los resultados obtenidos para la variable respuesta (el % de la recuperación del analito) en cada caso.

Tabla 4. Diseño Doehlert de 3 variables utilizada en la optimización de DLLME.

Número de experimento	% de NaCl	Proporción (%)	Volumen (mL)	Recuperación %
1	10	17,5	1,25	53,43
1	10	17,5	1,25	57,13
1	10	17,5	1,25	61,21
2	20	17,5	1,25	87,38
3	15	25,0	1,25	77,51
4	15	20,0	1,50	68,77
5	0	17,5	1,25	40,98
6	5	10,0	1,25	35,93
7	5	15,0	1,00	43,64
8	15	10,0	1,25	39,22
9	15	15,0	1,00	55,89
10	5	25,0	1,25	107,5
11	10	22,5	1,00	79,67
12	5	20,0	1,50	69,58
13	10	12,5	1,50	69,43

Los datos obtenidos fueron procesados por Statgraphic Centurion XVI y evaluados mediante un estudio de gráfico de Pareto, análisis de la varianza y se ha aplicado un gráfico de la superficie de respuesta para representar los efectos de los factores en la variable respuesta.

En el análisis de la varianza ANOVA (Anexo A.9) realizado para la evaluación de la recuperación del analito, se observa que el efecto del factor B (proporción de disolvente extractante – dispersante) difiere significativamente de cero ($p < 0,05$). El estadístico R^2 , indica que el modelo explica en un 83,96% la variabilidad en la recuperación. Los modelos con $R^2 > 75\%$ son considerados aptos (Chauhan & Gupta, 2004).

El porcentaje de recuperación puede ser explicado por el modelo de ecuación polinomial de segundo orden obtenido del programa Statgraphic Centurion XVI (Ecuación 14) que establece que es dependiente de la proporción de disolvente extractante dispersante y no de las otras variables.

Ecuación 14

$$Y = 246,502 + 0,706917[X_1] + 3,96756[X_2] - 462,187[X_3] + 0,231833[X_1]^2 - 0,221867[X_1][X_2] - 0,393333[X_1][X_3] + 0,3244[X_2]^2 - 7,88978[X_2][X_3] + 249,298[X_3]^2$$

donde: Y es el porcentaje de recuperación, X₁ es el porcentaje de NaCl agregado a la muestra, X₂ es la proporción extractante dispersante en % (v/v) y X₃ es el volumen de la mezcla extractante aplicada para la extracción.

Con el gráfico de Pareto obtenido mediante los datos (Figura 6), se puede observar que la variable “proporción” de extractante dispersante tiene un efecto significativo y positivo en la recuperación del analito.

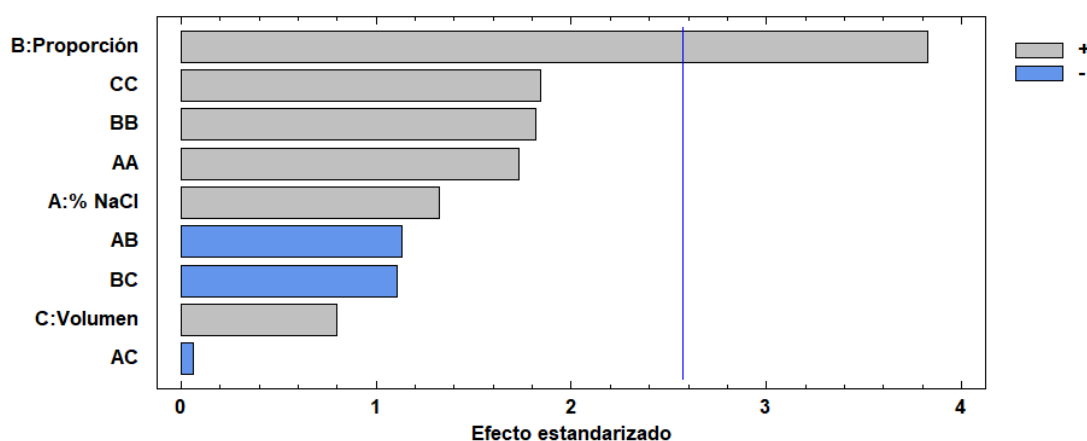


Figura 6. Diagrama de Pareto de los efectos de la ampliación del diseño Doehlert de 3 variables. Obtenida mediante Statgraphic Centurion XVI.

El gráfico 3D de superficie de respuesta utilizado para determinar las condiciones óptimas del nivel de cada factor para obtener la máxima recuperación se muestra en la Figura 7.

En el mismo se observan de manera gráfica, las condiciones óptimas de los factores % de NaCl y proporción de extractante – dispersante manteniendo constante el volumen a 1 mL.

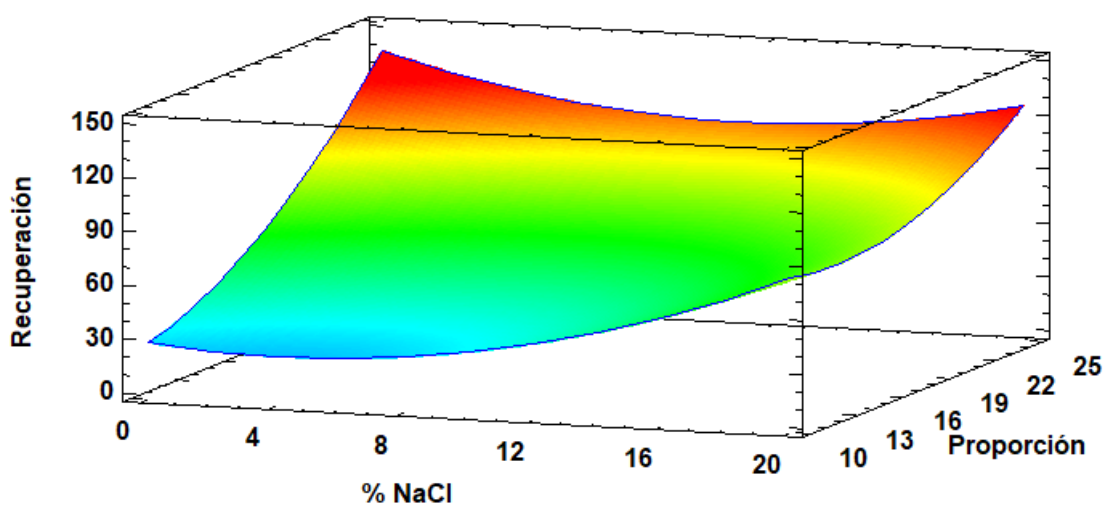


Figura 7. Superficie de respuesta de la recuperación del analito como función del % NaCl y la proporción de extractante – dispersante. Obtenida mediante Statgraphic Centurion XVI.

En la Figura 8, se muestran las condiciones óptimas para la variable respuesta en función a la proporción y al volumen, manteniendo constante el % de NaCl en 0%.

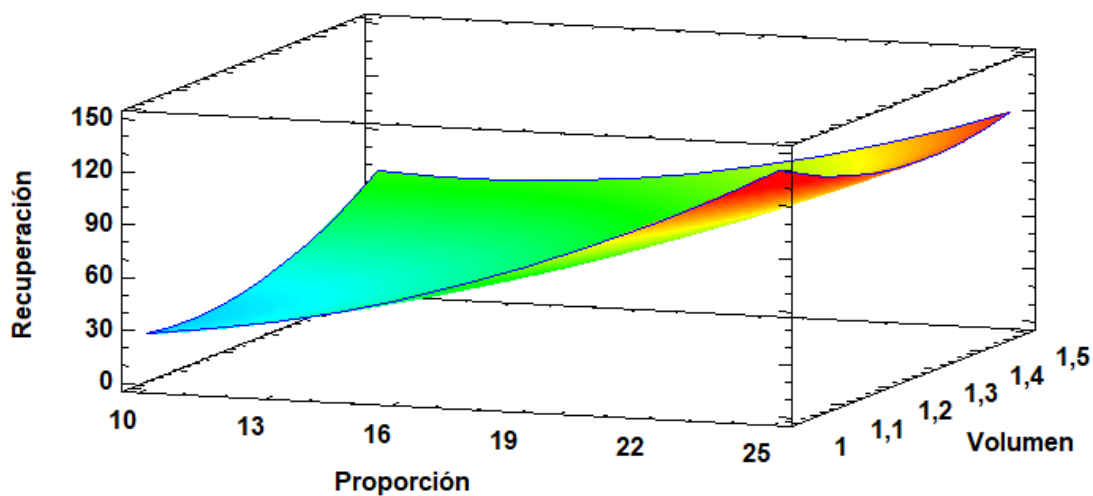


Figura 8. Superficie de respuesta de la recuperación del analito como función del volumen y la proporción de extractante – dispersante. Obtenida mediante Statgraphic Centurion XVI.

Por lo tanto, las condiciones óptimas para lograr una recuperación máxima se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Condiciones óptimas para maximizar la recuperación del analito aplicando DLLME

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
% NaCl	0,0	20,0	0,0
Proporción	10,0	25,0	25,0
Volumen	1,0	1,5	1,0

Estos resultados son satisfactorios y concuerdan con Rezaee *et al.* (2010) y Farajzadeh & Khoshmaram (2015). El volumen y la proporción óptima de la mezcla extractante y dispersante será aquella que produzca un valor alto de factor de enriquecimiento (FE) y volumen suficiente de la fase extractante como para ser manipulable y analizable.

4.4. Validación del método analítico

4.4.1. Selectividad

La comprobación de la selectividad se realizó por comparación del método propuesto (método A) con un método de referencia (método B) basado en la norma EPA 606 “Método para determinación de ésteres de ftalatos y de adipatos en agua potable”. Se efectuó la comparación entre las concentraciones obtenidas por ambos métodos. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados para la prueba de la selectividad.

Muestra	Método A (mg.L ⁻¹)	Recuperación %	Método B (mg.L ⁻¹)	Recuperación %
M1	0,039	81,3	0,046	95,8
M1'	0,041	85,4	0,044	91,7
M2	0,240	96,8	0,247	99,6
M2'	0,237	95,6	0,244	98,4
M3	0,352	101,1	0,344	98,9
M3'	0,358	102,9	0,340	97,7
M4	0,561	102,4	0,540	98,5
M4'	0,553	100,9	0,548	100,0
M5	0,998	95,2	1,014	96,8
M5'	1,023	97,6	1,036	98,9

Estadístico t = -0,0250444. Valor-P = 0,980566. $\alpha = 0,05$.

La prueba estadística t efectuada para comparar las variables emparejadas demuestra que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos, por lo que la hipótesis nula no puede ser rechazada a 95% de probabilidad de acierto, y se concluye que el método propuesto es selectivo para el analito estudiado.

4.4.2. Límite de detección LOD y límite de cuantificación LOQ

El LOD y el LOQ del método propuesto fueron determinados mediante las Ecuaciones 8 y 9, los resultados se observan en la Tabla 7.

Tabla 7. LOD y LOQ del método propuesto.

Parámetro de desempeño	Valor obtenido (mg.L⁻¹)
LOD _{inst}	0,9369
LOQ _{inst}	3,1230
LOD _{met}	0,004
LOQ _{met}	0,014

Para el efecto se analizaron 6 muestras bajo condiciones de repetibilidad a una concentración de 0,020 m.L⁻¹ (concentración más baja en la cual se obtuvo señal instrumental) cuyos resultados se observan en el Anexo A.10.

4.4.3. Linealidad, intervalo de trabajo y sensibilidad analítica

La linealidad del método fue evaluada mediante una curva de calibración utilizando siete niveles de concentración en tres réplicas (Figura 9), el gráfico contiene los límites de confianza y de predicción. Se preparó además una curva en matriz con 5 niveles de concentración (Figura 10), preparadas mediante la fortificación de la muestra, para estudiar el efecto matriz.

Las áreas obtenidas utilizando los patrones para determinar el intervalo de trabajo lineal propuesto en este método, que van de 10 mg.L⁻¹ a 100 mg.L⁻¹ en la curva en iso octano y de 10 mg.L⁻¹ a 239 mg.L⁻¹ en la curva en matriz se observan en los Anexos A.11 y A.12 respectivamente. Con los cuales se construyeron las curvas de calibración en disolvente y matriz.

De las curvas obtenidas se estimaron mediante regresión lineal, los valores de las pendientes, los interceptos y coeficientes de correlación R (Tabla 8).

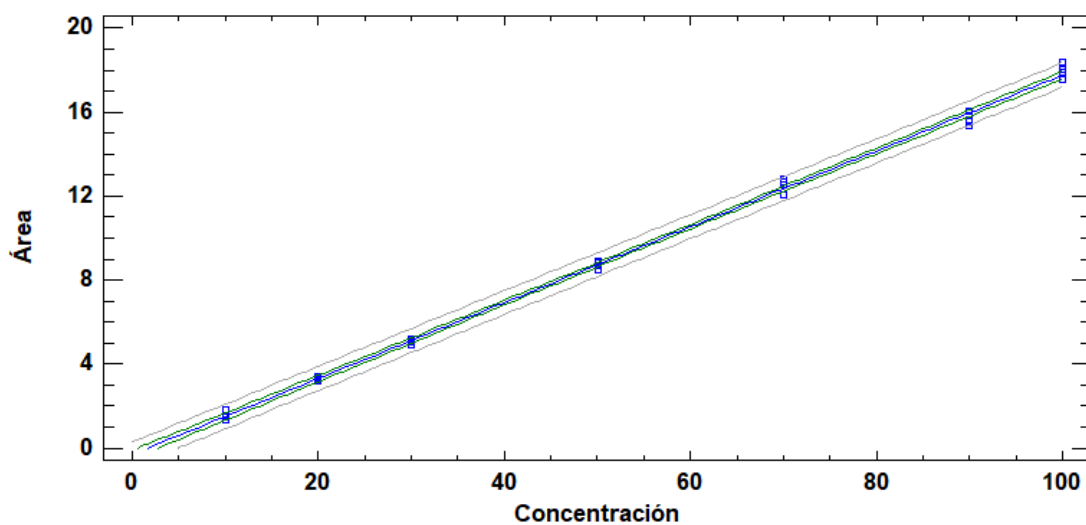


Figura 9. Curva de calibración DEHA en disolución iso octano.
Obtenida mediante Statgraphic Centurion XVI.

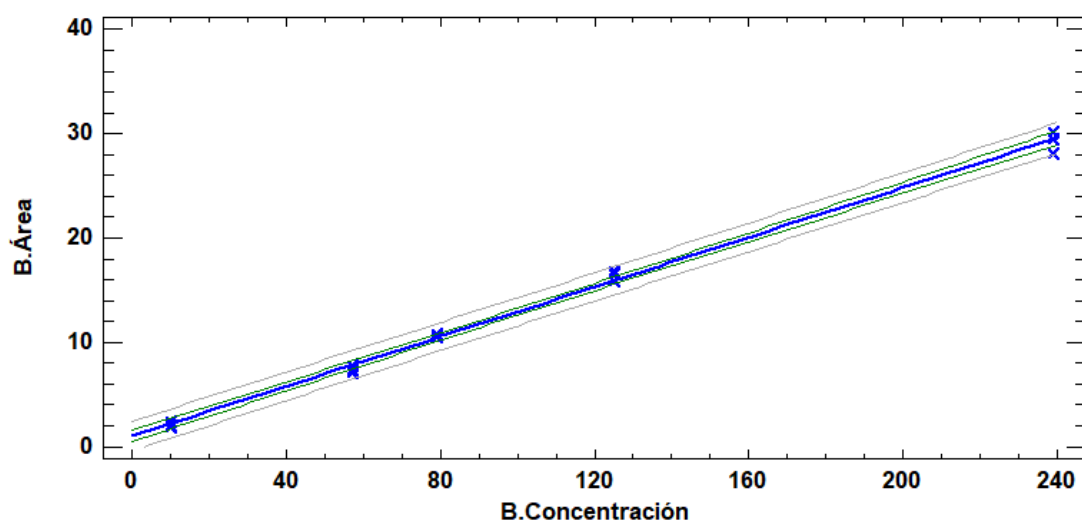


Figura 10 Curva de calibración DEHA en matriz.
Obtenida mediante Statgraphic Centurion XVI.

Tabla 8. Parámetros de las curvas de calibración obtenidas por regresión lineal

Parámetros	Curva en disolvente	Curva en matriz
Pendiente	0,180773	0,119122
Intercepto	-0,306287	1,01997
R	0,999	0,998

Además del gráfico de los residuales (Figuras 11 y 12), en donde se observa la completa aleatoriedad de los valores obtenidos y una distribución normal.

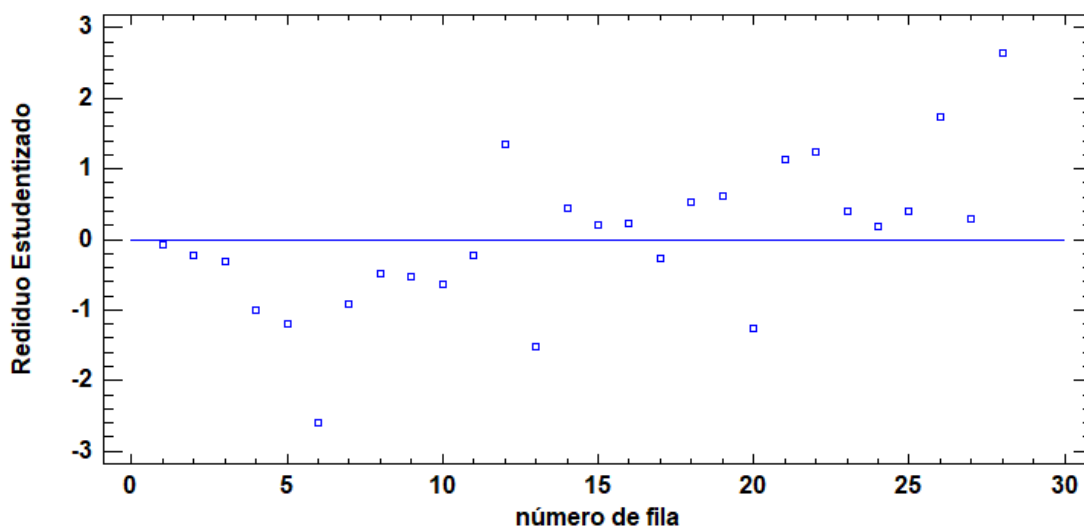


Figura 11. Gráfico de residuos estudentizados vs pares de datos de la curva en disolvente. Obtenida mediante Statgraphic Centurion XVI.

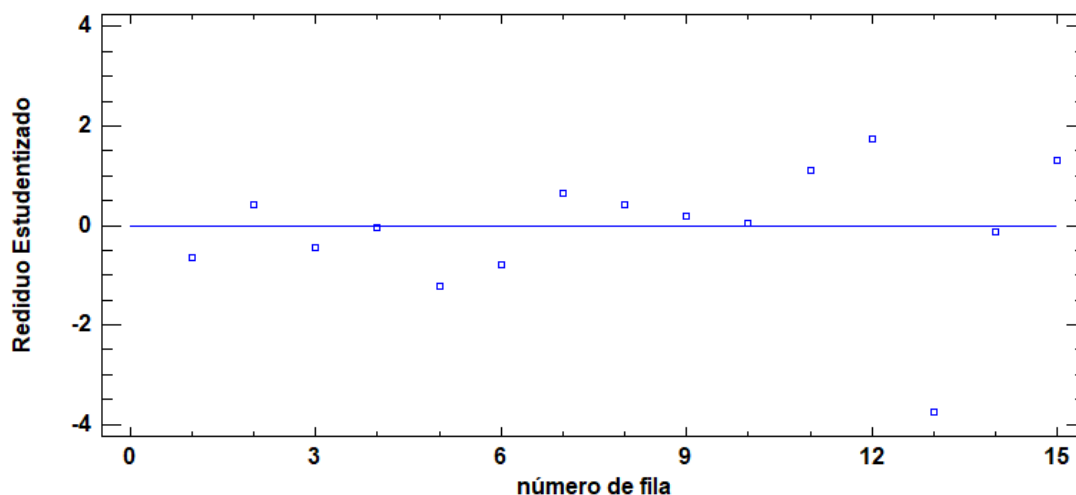


Figura 12. Gráfico de residuos estudentizados vs pares de datos de la curva en matriz. Obtenida mediante Statgraphic Centurion XVI.

El efecto matriz fue evaluado mediante la comparación de las pendientes de las curvas obtenidas en disolvente y en matriz. Observando la Figura 13, se puede apreciar una diferencia entre las pendientes de ambas curvas, sin embargo, la prueba estadística F, muestra que las varianzas de las pendientes son no homogéneas al 95% de probabilidad de acierto y la prueba estadística t (Tabla 9), muestra que las pendientes de las curvas son estadísticamente similares en un 95 % de probabilidad de acierto.

No se rechaza la hipótesis nula ($H_0: b_1 = b_2$), por lo tanto, el efecto matriz no es significativo.

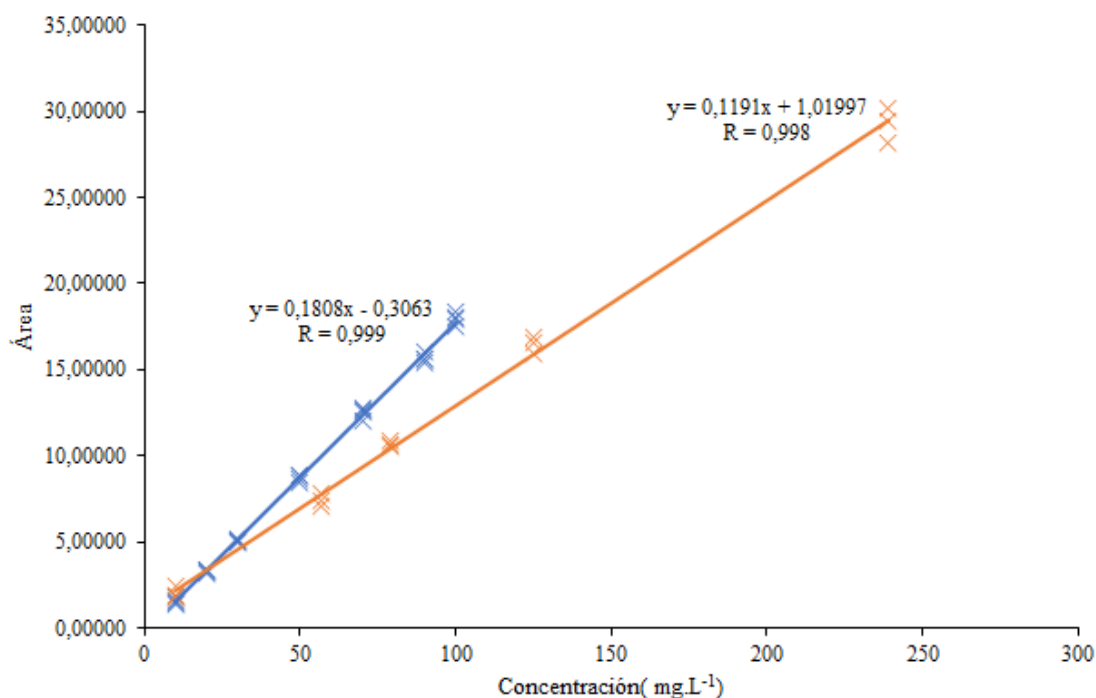


Figura 13. Comparación de pendientes de las curvas obtenidas en disolvente y en matriz. La línea azul corresponde a la curva en disolvente — y la línea naranja corresponde a la curva en matriz —. Obtenida mediante Excel®

Tabla 9. Prueba estadística de comparación de pendientes de las curvas de calibración.

Pendiente b1	Pendiente b2	n1	n2	S _{b1} ²	S _{b2} ²	F _{cal}	F _{tab}	t _{cal}	t' _{cal}
0,180773	0,119122	21	15	1087,8	6496,3	5,97	2,31	0,007	2,15

4.4.4. Veracidad y precisión

Utilizando la curva en matriz se evaluó la veracidad del método mediante ensayos de recuperación, en concentraciones del LOQ y 4 muestras de concentración intermedia en el rango lineal de trabajo. La recuperación se determinó aplicando la Ecuación 3 para las muestras fortificadas y la Ecuación 4 para la muestra diluida al LOQ.

La veracidad del método se expresa mediante el sesgo que se estima en términos del error relativo % Er, el mismo se calculó utilizando la Ecuación 10. Se puede observar en la Tabla 10, que el error relativo aumenta a medida que disminuye la concentración, este comportamiento es aceptable ya que la teoría de Horwitz (1982) explica que a concentraciones muy bajas la precisión disminuye y el sesgo aumenta y que cuando se trata de ensayos para determinaciones de trazas es aceptable una recuperación del 80%.

Tabla 10. Resultados de la recuperación del analito

	Muestras preparadas en la matriz				
	LOQ	R2	R3	R4	R5
Concentración original (mg.L⁻¹)	0,028	0,028	0,028	0,028	0,028
Concentración añadida (mg.L⁻¹)	-0,014*	0,022	0,172	0,272	0,472
Concentración observada (mg.L⁻¹)	0,012 (±0,001)	0,048 (±0,001)	0,193 (±0,006)	0,294 (±0,003)	0,487 (±0,012)
Concentración esperada (mg.L⁻¹)	0,014	0,050	0,200	0,300	0,500
Recuperación %	83,14	90,72	95,91	97,62	97,19
Error relativo %	16,86	4,08	3,52	2,16	2,66

*la muestra se diluyó para llegar a la concentración del LOQ. Los valores con (±) indican la desviación estándar de los resultados para n=3.

La precisión del método fue determinada mediante la estimación de la repetibilidad S_r y precisión intermedia S_I mediante el análisis de la varianza (ANOVA) de un factor. Se analizaron durante 6 días dos replicas por cada día de una muestra preparada a una concentración conocidas de 0,200 mg.L⁻¹, los resultados de los análisis se observan en la Anexo A.13.

La repetibilidad (S_r) y la precisión intermedia (S_I) fueron determinados por el método del análisis de la varianza (Anexo A.14), donde S_r es la precisión dentro del

grupo, obtenida de la tabla ANOVA mediante la Ecuación 11 y la precisión intermedia S_I se obtiene mediante la Ecuación 13.

En la Tabla 11 se observan los valores obtenidos en la estimación de la repetibilidad y precisión intermedia, en ambos casos es menor al 5% lo cual es favorable, mientras menor dispersión de los datos, mejor precisión.

Tabla 11. Resultados de la estimación de la repetibilidad y precisión intermedia

S_r (mg.L ⁻¹)	S_d (mg.L ⁻¹)	S_I (mg.L ⁻¹)	% S_r	% S_I
0,00473	0,00956	0,00754	2,37	3,78

Tanto la repetibilidad como la precisión intermedia pueden ser expresados en forma desviación estándar relativa con respecto a la media de los resultados obtenidos en los ensayos realizados.

4.4.5. Análisis de las muestras de aguas colectadas en el Lago Ypacaraí

La técnica de extracción optimizada y el método de análisis validado fue aplicado para la determinación del compuesto DEHA en las muestras de aguas superficiales colectadas de los diferentes puntos de muestreo. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 12.

Tabla 12. Resultados de los análisis de las muestras de aguas superficiales correspondientes a las 3 campañas de muestreo en el año 2018.

Puntos de muestreo	Resultados obtenidos (mg.L ⁻¹)		
	Abril	Agosto	Noviembre
P1	0,048 (±0,005)	0,041 (±0,004)	< LOD
P2	0,028 (±0,001)	NR	NR
P3	0,030 (±0,004)	NR	0,080 (±0,006)
P4	0,263 (±0,009)	0,120 (±0,007)	0,150 (±0,009)
P5	0,603 (±0,007)	0,094 (±0,005)	0,112 (±0,007)
P6	0,036 (±0,004)	< LOD	< LOD

Los valores entre paréntesis indican la desviación estándar para n=3. NR: no realizado. < LOD: inferior al límite de detección.

Los valores más altos se registraron en los puntos 4 y 5 que corresponden a la zona de desembocadura del arroyo Yukyry, y la costa de la ciudad de Areguá

respectivamente, lo cual supone que la contaminación del lago Ypacaraí con di(2-etilhexil) adipato, puede deberse a la entrada de este contaminante a través de este afluente.

El valor máximo tolerable para agua potable según la Norma de agua potable y consejo de salud de la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, 2018) es de $0,4 \text{ mg. L}^{-1}$, como se puede observar en la Figura 14, el punto 5 del primer muestreo supera este límite, los demás puntos de esta y las siguientes campañas se encuentran dentro de lo tolerable según esta norma, lo que hace suponer que el lago pudo haber purgado o diluido el contaminante en el transcurso del tiempo.

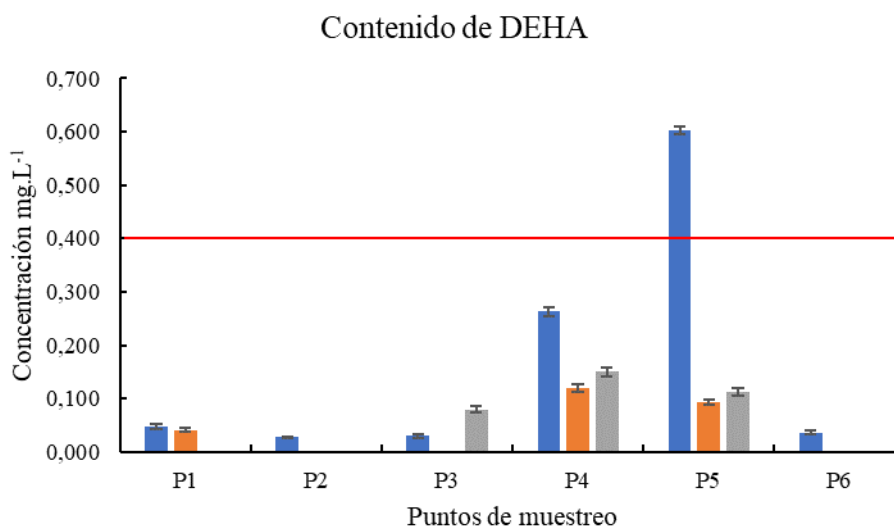


Figura 14. Contenido de DEHA en aguas superficiales del Lago Ypacaraí correspondiente a los 6 puntos de las 3 campañas de muestreo. La línea roja marca el límite máximo tolerable según EPA. Las barras azules ■ corresponden a la primera campaña de muestreo, las barras de color naranja ■ corresponden a la segunda campaña y las barras de color gris ■ corresponden a las muestras de la tercera campaña de muestreo. Obtenida mediante Excel®

No se han encontrado estudios similares sobre la presencia de DEHA en aguas superficiales en países de la región, sin embargo (Barnabé *et al.*, 2008) han detectado $0,147 \text{ mg.L}^{-1}$ de DEHA en aguas efluentes de una planta de tratamiento en Montreal, Canadá y $0,014 \text{ mg.L}^{-1}$ de DEHA en las aguas del río Saint Lawrence.

Paralelamente dentro del mismo estudio, han determinado además $0,0023 \text{ mg.L}^{-1}$; $0,0240 \text{ mg.L}^{-1}$ y $0,0148 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2-etilhexanol, 2-etilhexanal y ácido 2-

etilhexanoico respectivamente en el efluente, mientras que en las aguas del río Saint Lawrence, han determinado $0,0085 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2-etilhexanol y $0,0032$ de ácido 2-etilhexanoico, que son los productos de degradación de DEHA.

Por su parte (Aragón *et al.*, 2012) estudiaron la presencia de DEHA en el material particulado del aire del puerto de Tarragona y determinaron valores de $0,36 \text{ ng.m}^{-3}$ y $1,08 \text{ ng.m}^{-3}$ de DEHA.

Cabe resaltar que Han & Liu (2018) han determinado $0,63 \text{ mg.g}^{-1}$ de DEHA en *krill* antártico liofilizado y $2,16 \text{ mg.g}^{-1}$ de DEHA en aceite de *krill* antártico. Concluyen que DEHA puede presentar una amenaza para la supervivencia y reproducción del *krill* antártico, que a su vez es un importante eslabón en la cadena alimentaria en el océano.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

El desarrollo del método analítico para la determinación de di(2-etilhexil) adipato fue llevado a cabo utilizando la técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) optimizada mediante un diseño experimental multivariante tipo Doehlert en el que se evaluaron las variables fuerza iónica, volumen y proporción de mezcla extractante dispersante. El tetracloruro de carbono y la acetona fueron seleccionados como disolventes extractante y dispersante respectivamente mediante un estudio previo tipo univariante en el cual se evaluó la recuperación obtenida del analito como factor respuesta.

Los resultados obtenidos de la optimización de la técnica DLLME son interesantes porque en comparación con otros métodos de extracción, utiliza pequeñas cantidades de disolventes, es una técnica rápida, sencilla, amigable con el medioambiente, eficaz y sobre todo de bajo costo. La misma técnica puede ser aplicada en la determinación de otros compuestos en matrices acuosas como los compuestos organoclorados u organofosforados.

El método analítico propuesto fue validado mediante el análisis estadístico de los resultados de los ensayos realizados en muestras controladas que han posibilitado el estudio de cada una de las características de desempeño del método, como: la selectividad, la linealidad, la sensibilidad, los límites de detección y cuantificación, la precisión y la veracidad.

El método desarrollado y validado posibilitó la correcta cuantificación del compuesto di(2-etilhexil) adipato en aguas superficiales del lago Ypacaraí

Hasta ahora, DEHA no ha sido estudiado en aguas superficiales del país, este hecho hace que este trabajo sea de interés sobre todo por su aplicación a un cuerpo hídrico muy importante para el país. Se considera al compuesto DEHA como contaminante del lago por ser un aditivo en la industria del plástico y no es un componente natural de los cauces hídricos.

En respuesta a la hipótesis planteada en el presente trabajo: La técnica de microextracción líquido-líquido dispersiva seguida del método de cuantificación por cromatografía gaseosa permite identificar de forma válida la presencia del compuesto di(2-etilhexil) adipato en aguas superficiales del Lago Ypacaraí.

Con la información obtenida de los resultados de los análisis aplicados a las muestras de aguas superficiales del Lago Ypacaraí se concluye que existe una contaminación actual de sus aguas con el compuesto di(2-etilhexil) adipato, dicha información podrá ser utilizada para futuras investigaciones.

5.2. Recomendaciones

- Continuar la investigación en la búsqueda de disolventes extractantes, que sean más amigables con el medio ambiente.
- Estudiar la presencia y los efectos de los productos de degradación del di(2-etilhexil) adipato.
- Investigar las posibles fuentes de contaminación del Lago y proponer soluciones o métodos de remediación para ser aplicados a las aguas del lago.

ANEXOS

Anexo A. Tabla de datos y cálculos auxiliares

1. Matriz Doehlert de códigos para un diseño de 3 variables.

Experimentos	Factor 1	Factor 2	Factor 3
1	0	0	0
2	1	0	0
3	0,5	0,866	0
4	0,5	0,289	0,817
5	-1	0	0
6	-0,5	-0,866	0
7	-0,5	-0,289	-0,817
8	0,5	-0,866	0
9	0,5	-0,289	-0,817
10	-0,5	0,866	0
11	0	0,577	-0,817
12	-0,5	0,289	0,817
13	0	-0,577	0,817

2. Codificación de los de los factores estudiados en la optimización del método DLLME.

Factor 1	-	(-1)	(-0,5)	(0)	(0,5)	(1)	-
% de NaCl	-	0	5	10	15	20	-
Factor 2	(-0,866)	(-0,577)	(-0,289)	(0)	(0,289)	(0,577)	(0,866)
Proporción (%)	10,0	12,5	15,0	17,5	20,0	22,5	25,0
Factor 3	-	-	(-0,817)	(0)	(0,817)	-	-
Volumen (mL)	-	-	1,00	1,25	1,50	-	-

3. Curva preparada en matriz para evaluación de la selectividad del método propuesto.

Muestras	Concentración esperada mg.L⁻¹
M1	0,048
M2	0,248
M3	0,348
M4	0,548
M5	1,048

4. Patrones ensayados para el estudio de la linealidad del método.

Curvas	Patrones (mg.L ⁻¹)						
	St1	St2	St3	St4	St5	St6	St7
C1	10	20	30	50	70	90	100
C2	10	20	30	50	70	90	100
C3	10	20	30	50	70	90	100
M1	10	57	79	125	239	-	-
M2	10	57	79	125	239	-	-
M3	10	57	79	125	239	-	-

5. Muestras fortificadas para la determinación del % de recuperación en diferentes niveles de concentración.

Muestra	C original (mg.L ⁻¹)	C añadida (mg.L ⁻¹)
R1	0,028	-0,06*
R2	0,028	0,022
R3	0,028	0,172
R4	0,028	0,272
R5	0,028	0,472

*la muestra se diluyó para llegar a la concentración del LOQ.

6. Localización de los puntos de toma de muestras.

Identificación del punto	Coordenadas
P1	25°18'55.0"S - 57°18'10.6"W
P2	25°18'37.3"S - 57°19'33.0"W
P3	25°16'37.2"S - 57°21'39.5"W
P4	25°18'37.3"S - 57°19'33.0"W
P5	25°19'21.4"S - 57°21'15.5"W
P6	25°22'00.6"S - 57°17'29.2"W

7. Prueba de Tukey, comparación de medias de los tratamientos aplicados para evaluar el % de recuperación del analito.

Tratamientos	T11	T21	T31	T12	T22	T32	T13	T23	T33
T11	-	18,60	38,65	13,15	42,40	90,25	20,35	43,20	27,30
T21	-	-	20,05	5,45	23,80	71,65	1,75	24,60	8,70
T31	-	-	-	25,50	3,75	51,60	18,30	4,55	11,35
T12	-	-	-	-	29,25	77,10	7,20	30,05	14,15
T22	-	-	-	-	-	47,85	22,05	0,80	15,10
T32	-	-	-	-	-	-	69,90	47,05	62,95
T13	-	-	-	-	-	-	-	22,85	6,95
T23	-	-	-	-	-	-	-	-	15,90
T33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diferencia honestamente significativa (HSD)								66,04	
Q _{α (9,9)}								5,595	
Cuadrado del error medio (Mse)								278,7	
N								2	

En negrita las medias con diferencia honestamente significativa

8. Análisis de la varianza ANOVA de los tratamientos aplicados para evaluar el % de recuperación del analito.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probab.	Valor crítico para F
Entre grupos	10767,424	8	1345,9281	4,8298	0,0150	3,2296
Dentro de los grupos	2508,06	9	278,67333	-	-	-
Total	13275,484	17				Valor P: 0,015 < 0,05

9. Análisis de Varianza para Recuperación

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
A: % NaCl	375,778	1	375,778	1,75	0,2434
B: Proporción	3150,58	1	3150,58	14,65	0,0123*
C: Volumen	136,136	1	136,136	0,63	0,4623
AA	644,96	1	644,96	3,00	0,1438
AB	276,89	1	276,89	1,29	0,3079
AC	0,87025	1	0,87025	0,00	0,9517
BB	710,339	1	710,339	3,30	0,1288
BC	262,611	1	262,611	1,22	0,3194
CC	728,313	1	728,313	3,39	0,1251
Error total	1075,17	5	215,035		
Total (corr.)	6701,5	14			

$R^2 = 83,9562$

* Diferencia significativa ($p < 0,05$)

10. Resultados obtenidos para DEHA, utilizados para determinar el LOD y LOQ del método propuesto.

Muestra	Área	Vol de ext (µL)	C en solución (mg.L ⁻¹)	Vol de muestra (mL)	C en muestra (mg.L ⁻¹)	Recuperación (%)
1	1,41478	220	3,31	50	0,019	72,9
2	1,37334	225	2,97	50	0,018	66,7
3	1,48548	206	3,91	50	0,016	80,5
4	1,491934	205	3,96	50	0,018	81,2
5	1,389453	224	3,10	50	0,019	69,5
6	1,478015	232	3,85	50	0,015	89,2
	S _o		0,4416			
	S _o '		0,3123			

11. Patrones utilizados para la curva en disolvente.

Patrones	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	C (mg.L ⁻¹)	Área	C (mg.L ⁻¹)	Área	C (mg.L ⁻¹)	Área
St1	10	1,4800	10	1,3720	10	1,819
St2	20	3,2470	20	3,1670	20	3,415
St3	30	5,0312	30	4,9440	30	5,167
St4	50	8,4640	50	8,6700	50	8,838
St5	70	12,034	70	12,698	70	12,794
St6	90	15,352	90	15,578	90	16,039
St7	100	17,534	100	17,888	100	18,383

12. Patrones recuperados de muestras fortificadas utilizados para la curva en matriz.

Muestras Fortificadas	Curva 1		Curva 2		Curva 3	
	C (mg.L ⁻¹)	Área	C (mg.L ⁻¹)	Área	C (mg.L ⁻¹)	Área
FSt1	10	1,8460	10	2,446	10	1,959
FSt2	57	7,7900	57	7,121	57	7,343
FSt3	79	10,821	79	10,673	79	10,544
FSt4	125	15,940	125	16,543	125	16,847
FSt5	239	28,126	239	29,414	239	30,144

13. Resultados de los análisis de 2 réplicas durante 6 días diferentes

DEHA	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
R1 (mg.L ⁻¹)	0,199	0,188	0,196	0,208	0,199	0,205
R2 (mg.L ⁻¹)	0,192	0,187	0,206	0,200	0,207	0,205
Promedio (mg.L ⁻¹)	0,199					

14. Análisis de la varianza de los resultados obtenidos para la estimación de la precisión.

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SM)	Grados de Libertad (GL)	Cuadrado medio (CM)	F	Valor P	Valor crítico de F
Entre grupos	0,000457	6	0,000091	4,09	0,058	4,39
Dentro de los grupos	0,000134	5	0,000022	-	-	-
Total	0,000591	11	-	-	-	-

Anexo B. Imágenes de los equipos y parte experimental.



1. Toma de muestra en el lago



2. Proceso de filtración de las muestras tomadas del lago



3. Extracción líquido-líquido (LLE)



4. Microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME)



5. Líquido extractante en el inserto para ser analizado en el GC-FID.



6. Cromatógrafo Agilent 7890 A (GC-FID)



7. Agitador mecánico

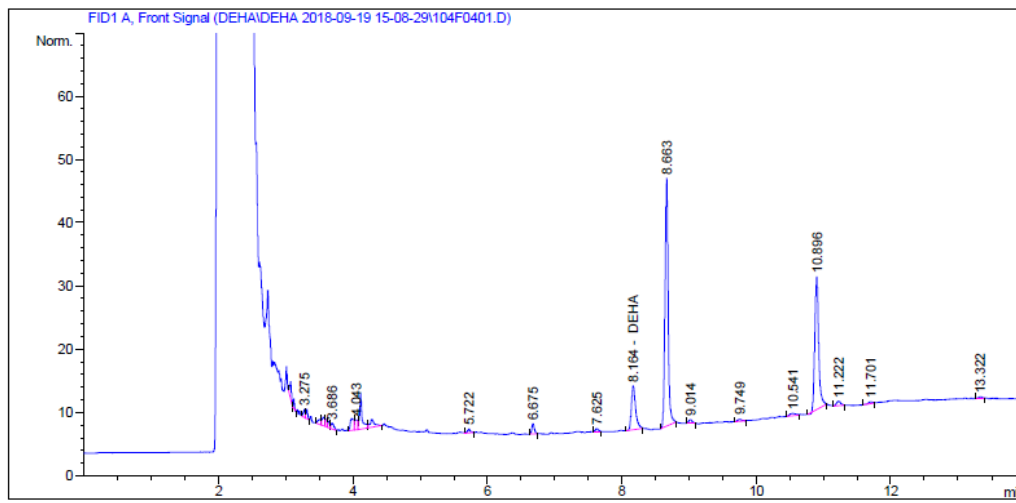


8. Centrifuga


```

=====
Acq. Operator   : Sergio Rodriguez           Seq. Line :    4
Acq. Instrument : Instrument 1               Location  : Vial 104
Injection Date  : 9/19/2018 4:03:14 PM      Inj       :    1
                                           Inj Volume: External
Acq. Method    : C:\Chem32\1\DATA\DEHA\DEHA 2018-09-19 15-08-29\DEHA.M
Last changed   : 9/17/2018 10:48:57 AM by Sergio Rodriguez
Analysis Method: C:\CHEM32\1\DATA\DEHA\DEHA 2018-09-19 15-08-29\104F0401.D\DA.M (DEHA.M)
Last changed   : 9/17/2018 10:48:57 AM by Sergio Rodriguez
Method Info    : BIODIESEL

```



9. Cromatograma de la muestra del lago extraída mediante DLLME

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRUCH, V., L. KOCÚROVÁ, I. S. BALOGH & J. ŠKRLÍKOVÁ. 2012. Review article: Recent advances in coupling single-drop and dispersive liquid–liquid microextraction with UV–vis spectrophotometry and related detection techniques. *Microchemical Journal*, 102, 1-10.
- ARAGÓN, M., R. M. MARCÉ & F. BORRULL. 2012. Determination of phthalates and organophosphate esters in particulated material from harbour air samples by pressurised liquid extraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, 101, 473-478.
- BARNABÉ, S., I. BEAUCHESNE, D. G. COOPER & J. A. NICELL. 2008. Plasticizers and their degradation products in the process streams of a large urban physicochemical sewage treatment plant. *Water Research*, 42, 153-162.
- BAZILIO, F. S., M. V. J. BOMFIM, R. J. ALMEIDA & S. M. P. ABRANTES. 2014. Intralaboratory validation of an analytical method for determining the migration of bis(2-ethylhexyl) adipate from packaging to fat foods. *Accreditation and Quality Assurance*, 19, 195-204.
- BENÍTEZ VILLALBA, J. 2013. Comportamiento de contaminantes orgánicos en suelos agrícolas. Estudio de los procesos de compostaje y enmendado de suelos. Tesis doctoral. Universidad de Granada, España. 432p.
- BORAN, H. & S. TERZI. 2017. Stress-Induced Transcriptional Changes and DNA Damage Associated with Bis(2-ethylhexyl) Adipate Exposure in Zebrafish (*Danio rerio*) Larvae. *Bull Environ Contam Toxicol*, 99, 308-314.
- BOSCH OJEDA, C. & F. SÁNCHEZ ROJAS. 2009. Separation and Preconcentration by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Procedure: A Review. *Chromatographia*, 651–679.
- CALDAS, L. F. S., C. E. R. DE PAULA, D. M. BRUM & R. J. CASSELLA. 2013. Application of a four-variables Doehlert design for the multivariate optimization of copper determination in petroleum-derived insulating oils by GFAAS employing the dilute-and-shot approach. *Fuel*, 105, 503-511.
- VELANDIA-CASTELLANOS, C., PEÑA-PÁEZ, V. & ARIAS-PALACIOS, J. 2011. Validación del método analítico para la cuantificación de bacitracina / Validation of the analytical method to quantify the bacitracine. *Revista Cubana de Farmacia*, 216.
- CHAUHAN, B. & R. GUPTA. 2004. Application of statistical experimental design for optimization of alkaline protease production from *Bacillus* sp. RGR-14. *Process Biochemistry*, 39, 2115-2122.

- CORTADA CORTEZ, C. 2012. Nuevas metodologías y aplicaciones de las técnicas de microextracción líquido-líquido para determinación de contaminantes orgánicos. Tesis doctoral. Universidad de Alicante, España. 243p.
- DALGAARD, M., U. HASS, A. M. VINGGAARD, K. JARFELT, H. R. LAM, I. K. SORENSEN, H. M. SOMMER & O. LADEFOGED. 2003. Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) induced developmental toxicity but not antiandrogenic effects in pre- and postnatally exposed Wistar rats. *Reprod Toxicol*, 17, 163-70.
- EURACHEM GUIDE: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics, (2nd ed. 2014). B. Magnusson and U. Örnemark (eds.) ISBN 978-91-87461-59-0. Available from www.eurachem.org.
- FARAJZADEH, M. A., M. BAHRAM & J. Å. JÖNSSON. 2007. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography-diode array detection as an efficient and sensitive technique for determination of antioxidants. *Analytica Chimica Acta*, 591, 69-79.
- FARAJZADEH, M. A. & L. KHOSHMARAM. 2015. Development of dispersive liquid-liquid microextraction technique using ternary solvents mixture followed by heating for the rapid and sensitive analysis of phthalate esters and di(2-ethylhexyl) adipate. *J Chromatogr A*, 1379, 24-33.
- FARRÉ, M. L., S. PÉREZ, L. KANTIANI & D. BARCELÓ. 2008. Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27, 991-1007.
- FATECHA, D. A. F., J. W. R. ALVAREZ, N. CABRAL, J. G. O. ROJAS, J. C. COPPO, A. J. ALVES NETO, E. LOREZETTI, C. K. H. WATANAKE, B. B. RISSATO & C. BELMONTE. 2016. Phosphorus fractionation in sediments of the Ypacarai lake basin. *African Journal of Agricultural Research*, 11, 3360-3365.
- FERREIRA, S. L. C., W. N. L. DOS SANTOS, C. M. QUINTELLA, B. C. B. NETO & J. M. BOSQUE-SENDRA. 2004. Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. *Talanta*, 63, 1061-1067.
- GIL, M. J., A. M. SOTO, J. I. USMA & O. D. GUTIÉRREZ. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Emerging contaminants in waters: effects and possible treatments.*, 7, 52-73.
- GONZALEZ-SISO, P., R. A. LORENZO, M. REGENJO, P. FERNÁNDEZ & A. M. CARRO. 2015. Response surface methodology for the optimization of dispersive liquid-liquid microextraction of chloropropanols in human plasma. *Journal of Separation Science*, 38, 3428-3434.

- GUSTAVO GONZÁLEZ, A. & M. ÁNGELES HERRADOR. 2007. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26, 227-238.
- HAN, X. & D. LIU. 2018. Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) detection in Antarctic krill (*Euphasia superba* Dana). *Polar research*, 37:1, 1457395, DOI:10.1080/17518369.2018.1457395
- HORN, O., NALLI, S., COOPER, D.G., NICELL, J.A. 2004. Plasticizer metabolites in the environment. *Water Res.* 38, 3693–3698.
- HORWITZ, W. 1982. Evaluation of Regulations Analytical Methods Used for Regulation of Foods and Drugs. *Analytical chemistry*, Vol. 54. No. 1.
- INTERNATIONAL VOCABULARY OF METROLOGY. 2008. 3rd Edition, JCGM 200 (BIPM, IEC, IFCC, ILAC, ISO, IUPAC, IUPAP and OIML).
- ITAIPIU BINACIONAL. 2017. Informe Técnico de la Cuarta Campaña de Muestreo del Proyecto “Monitoreo de Calidad de Agua por Campañas de Muestreo en el Lago Ypacarai”. Consultado el 25-08-2018. Disponible en: <https://hidroinformatica.itaipu.gov.py/gestiondecuenca/py/ypacarai/index.php/2017/10/26/decimo-sexta-campana-muestreo-092017/>
- KOZANI, R. R., Y. ASSADI, F. SHEMIRANI, M.-R. M. HOSSEINI & M. R. JAMALI. 2007. Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid-liquid microextraction combined gas chromatography-electron capture detection. *Talanta*, 72, 387-393.
- LAWAL, A., R. C. S. WONG, G. H. TAN, L. B. ABDULRA'UF & A. M. A. ALSHARIF. 2018. Multi-pesticide Residues Determination in Samples of Fruits and Vegetables Using Chemometrics Approach to QuEChERS-dSPE Coupled with Ionic Liquid-Based DLLME and LC--MS/MS. *Chromatographia*, 759.
- LO TURCO, V., G. DI BELLA, A. POTORTÌ, M. FEDE & G. DUGO. 2015. Determination of plasticizer residues in tea by solid phase extraction-gas chromatography-mass spectrometry. *European Food Research & Technology*, 240, 451-458.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database; CID=7641, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7641> (accessed Ago.25, 2018)
- NP ISO/IEC 17025. 2018. Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología. Asunción, Paraguay.

- NP-186. (1980). Toma de muestra para el análisis físico, químico y bacteriológico de las aguas. Instituto Nacional de Tecnología, Normalización y Metrología. Asunción, Paraguay.
- LINSTROM, P.J. AND MALLARD, W.G. 2017. Eds., NIST Chemistry WebBook, NIST Standard Reference Database Number 69, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 20899, [doi:10.18434/T4D303](https://doi.org/10.18434/T4D303), (obtenido 2 octubre 2018).
- LÓPEZ MOREIRA M, G. A., L. HINEGK, A. SALVADORE, G. ZOLEZZI, F. HÖLKER, R. A. MONTE DOMECQ S, M. BOCCI, S. CARRER, L. DE NAT, J. ESCRIBÁ, C. ESCRIBÁ, G. A. BENÍTEZ, C. R. ÁVALOS, I. PERALTA, M. INSAURRALDE, F. MERELES, J. M. SEKATCHEFF, A. WEHRLE, J. F. FACETTI-MASULLI & J. F. FACETTI. 2018. Eutrophication, Research and Management History of the Shallow Ypacaraí Lake (Paraguay). *Sustainability*, 10, 2426; doi:10.3390/su10072426.
- PARAGUAY - Congreso de la Nación Paraguaya. (2007). Ley N° 3239/2007 de los recursos hídricos del Paraguay. Asunción, Paraguay. 16p.
- REZAEI, M., Y. ASSADI, M.-R. MILANI HOSSEINI, E. AGHAEI, F. AHMADI & S. BERIJANI. 2006. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1116, 1-9.
- REZAEI, M., Y. YAMINI & M. FARAJI. 2010. Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, 1217, 2342-2357.
- RIMOLDI, F., L. PELUSO, G. B. ROSSINI, A. E. RONCO & P. M. DEMETRIO. 2018. Multidisciplinary approach to a study of water and bottom sediment quality of streams associated with mixed land uses: case study Del Gato Stream, La Plata (Argentina). *Ecological Indicators*, 89, 188-198.
- ROBILLARD, K. A., D. L. DUFRESNE, J. W. GORSUCH, W. A. STUBBLEFIELD, C. A. STAPLES & T. F. PARKERTON. 2008. Aqueous solubility and *Daphnia magna* chronic toxicity of di(2-ethylhexyl) adipate. *Bulletin Of Environmental Contamination And Toxicology*, 80, 539-543.
- RYKOWSKA, I., J. ZIEMBLIŃSKA & I. NOWAK. 2018. Review: Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 259, 319-339.
- SANTOLARIA, Z., T. ARRUEBO, A. PARDO, J. MATE SANZ, A. BARTOLOMÉ, J. CAIXACH, F. LANAJA & J. URIETA. 2015. Evaluation of Airborne Organic Pollutants in a Pyrenean Glacial Lake (The Sabocos Tarn). *Water, Air & Soil Pollution*, 226, 1-15.

- SARAJI, M. & M. K. BOROUJENI. 2014. Recent developments in dispersive liquid–liquid microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406, 2027–2066.
- SILVA BARNI, M. F., P. M. ONDARZA, M. GONZALEZ, R. D. CUÑA, F. MEIJIDE, F. GROSMAN, P. SANZANO, F. L. L. NOSTRO & K. S. B. MIGLIORANZA. 2016. Persistent organic pollutants (POPs) in fish with different feeding habits inhabiting a shallow lake ecosystem. *Science of the Total Environment*, 550, 900-909.
- STUER-LAURIDSEN F, MIKKELSEN S, HAVELUND S, BIRKVED M, HANSEN LP. 2001. COWI Consulting engineers and planners AS, environmental project No. 590: environmental and health assessment of alternatives to phthalates and to flexible PVC. Dan Environ Prot Agency. <http://www2.mst.dk/udgiv/Publications/2001/87-7944-407-5/pdf/87-7944-408-3.pdf> Accessed 10, Oct 2018
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL AGENCY – EPA. EPA 606 Methods for the Determination of Organic Compounds in Drinking Water - Supplement III (EPA/600/R-95-131)
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL AGENCY – EPA. (2018) Drinking Water Standards and Health Advisories. Available in <https://www.epa.gov/dwstandardsregulations/2018-drinking-water-standards-and-advisory-tables> Accessed 24, Sep 2018.
- UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME – UNEP. (2000). Bis(2-ethylhexyl)adipate - SIDS Initial Assessment Report For SIAM 10- Available in <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/103231.pdf> Accessed 24, Sep 2018.
- VIÑAS, P., N. CAMPILLO, I. LÓPEZ-GARCÍA & M. HERNÁNDEZ-CÓRDOBA. 2014. Dispersive liquid-liquid microextraction in food analysis. A critical review. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, 406, 2067-2099.
- ZANG, X.-H., Q.-H. WU, M.-Y. ZHANG, G.-H. XI & Z. WANG. 2009. Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 37, 161-168.
- ZHOU, S. N., R. P. MOODY, B. AIKAWA, A. YIP, B. WANG & J. ZHU. 2013. In Vitro Dermal Absorption of Di(2-ethylhexyl) adipate (DEHA) in a Roll-On Deodorant Using Human Skin. *Journal of Toxicology & Environmental Health: Part A*, 76, 157-166.