



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

LA ETAPA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS



MARÍA DEL PILAR PALACIOS ANSÓN

FACULTAD DE FARMACIA- UNIVERSIDAD DE SEVILLA



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



FACULTAD DE FARMACIA

TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

LA ETAPA DE PREPARACIÓN DE LA MUESTRA EN LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

MARÍA DEL PILAR PALACIOS ANSÓN

Lugar de presentación: Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla.

Fecha de presentación: Julio, 2018

Departamento de Química Analítica.

Tutoras: M^a Teresa Montaña González y M^a Teresa Morales Millán.

Trabajo de revisión bibliográfica.

RESUMEN

La calidad es importante en la Química Analítica e influye tanto en los procesos que se realizan en el laboratorio como en los resultados que se obtienen. Una de las etapas que más variabilidad introduce en el proceso analítico es la preparación de la muestra, que puede estar formada por un número variable de operaciones de muy diversa complejidad, por lo que incide en la calidad de los resultados obtenidos.

Esta revisión bibliográfica se centra en la etapa de preparación de la muestra, cuyo objetivo es hacer el analito accesible al análisis, a una concentración adecuada y eliminando las posibles interferencias. En el trabajo se estudia el papel de la etapa de preparación de la muestra dentro del proceso analítico general y se revisan las operaciones que forman parte de ella.

En esta etapa se emplea hasta un 60% del tiempo necesario para el proceso analítico, de aquí su gran importancia. Dependiendo de si el analito a determinar es orgánico o inorgánico se utilizan diferentes procesos. Debido al variable y amplio número de procedimientos existentes dentro de la etapa de preparación de la muestra, este trabajo se ha centrado en los que se utilizan para analitos orgánicos y concretamente en los procesos de extracción. Por último, se ha realizado una revisión de los procedimientos de extracción más utilizados en los últimos años, centrándose en estudiar la frecuencia de utilización de dos de las técnicas más usadas, la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida, observándose que la primera es la técnica más utilizada. Asimismo, se muestran ejemplos de aplicación de los distintos procedimientos de extracción en la determinación de analitos de interés, en diferentes tipos de muestras, en los últimos cinco años.

Palabras Clave: Calidad, Química Analítica, Preparación de muestra, Técnicas de extracción.

ÍNDICE

EPÍGRAFES	PÁG
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Calidad en el análisis químico	5
1.2 El proceso analítico general	7
1.2.1 Etapas del proceso analítico	9
1.2.1.1 Operaciones previas	9
1.2.1.2 Preparación de la muestra	11
2. OBJETIVOS	13
3. METODOLOGÍA	14
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
4.1 Preparación de la muestra	15
4.1.1 Pretratamiento de la muestra	16
4.1.2 Tratamiento de la muestra	17
4.2 Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos	19
4.2.1 Técnicas de extracción	19
4.2.1.1 Extracción liquido-liquido	20
4.2.1.2 Extracción sólido-líquido	21
4.2.1.3 Extracción en fase solida	25
4.2.1.4 Extracción con fluidos supercríticos	26
4.2.1.5 Extracción con agua subcrítica	27
4.2.1.6 Extracción en fase de vapor	28
4.2.1.7 Extracción sólido-sólido	30
4.3 Aplicaciones de las técnicas de extracción	30
5. CONCLUSIONES	33
6.BIBLIOGRAFÍA	34

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Calidad en el análisis químico

La calidad se define como “la totalidad de las características de una entidad que le confieren la aptitud para satisfacer las necesidades establecidas e implícitas” (UNE-EN ISO, 1994) o “el grado en el cual un conjunto de características inherentes de un objeto cumple con los requisitos (UNE-EN ISO, 2015). Estas definiciones de calidad se ajustan al concepto de calidad en un laboratorio, en el que el producto son los resultados y la información obtenida, que en muchas ocasiones deben satisfacer unas necesidades o requisitos preestablecidos. La calidad y la Química Analítica, por tanto, están estrechamente relacionadas. Dentro del concepto de calidad analítica se encuentran tanto la calidad de los resultados como la calidad de los procesos analíticos, la calidad del trabajo, de su organización y, por último, la calidad de las herramientas analíticas, todas ellas van a ayudar a conseguir una excelente calidad en la información final producida por el laboratorio (Valcárcel, 1999).

Para que los laboratorios analíticos trabajen en un entorno de calidad se requiere que lleven a cabo una serie de acciones antes, durante y después del proceso analítico, tal y como se muestra en la Figura 1.



Figura 1. Ciclo de actividades de Garantía de Calidad en un laboratorio analítico durante el tiempo. (Modificado de Valcárcel, 1999).

Como se puede ver en la Figura 1 el control de calidad se realiza antes y durante la realización de los procesos analíticos, mientras que la evaluación se desarrolla durante y después. Las

actividades de corrección tienen lugar posteriormente, reflejándose en un cambio en las actividades de control (Valcárcel, 1999). Todas y cada una de estas actividades necesitan un diseño inicial, un registro final y la generación de documentación para ser realizadas en un entorno de calidad.

La implantación de sistemas de calidad requiere del cumplimiento de normas y directrices (Prichard y Barwick, 2007) entre las cuales, desde un punto de vista analítico las que tienen más interés son las normas ISO de la serie 9000, que recogen la gestión de la calidad en las empresas, la Norma UNE-EN ISO 17025 (Aenor, 2005) y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs), destinadas al campo de los laboratorios.

La norma UNE-EN ISO 17025 (2005) establece los requisitos generales relativos a la competencia técnica de los laboratorios de ensayo y calibración y tiene como objetivos el establecimiento de un sistema de gestión de calidad sin necesidad de un reconocimiento externo y la obtención de un reconocimiento externo de su competencia técnica por parte de clientes, autoridades reglamentarias u organismos de acreditación.

Las BPLs (OECD, 2018) constituyen una alternativa a la norma anterior, y son aplicables, salvo exención normativa específica, a todos los estudios no clínicos de seguridad sanitaria y ambiental requeridos reglamentariamente con el fin de registrar o autorizar productos farmacéuticos, plaguicidas, aditivos destinados a la alimentación humana y animal, cosméticos, medicamentos veterinarios y productos similares, y en la regulación de las sustancias químicas industriales (Ministerio, 2018). Tiene unas particularidades que se deben matizar: los PNTs (Procedimientos normalizados de Trabajo) y la UGC (Unidad de Garantía de Calidad) (Sabater y Vilumara, 1988).

Los PNTs van a describir detalladamente todas y cada una de las actividades que se hacen en el laboratorio (control de reactivos, archivo, aparatos, métodos...) sin hacer ninguna modificación y en el caso de cambiar algún aspecto hay que proponerlo por escrito, y esta misma variación tendría su propio PNT. La UGC es independiente al laboratorio y tiene la finalidad de registrar, valorar y plantear acciones de mejora de la calidad, deberá de ser independiente del laboratorio.

El seguimiento de estas normas tiene como objetivo la realización de procesos analíticos con un adecuado nivel de calidad para asegurar la producción de resultados fiables. Para la obtención de estos resultados se desarrollan y aplican métodos analíticos que deben dar respuesta a los problemas analíticos planteados (Campañó y Ríos, 2002).

Los métodos que se aplican en un laboratorio analítico adquieren diversas categorías que van a depender de la precisión, exactitud y de quien los establece, pero a esto hay que añadir que solo la aplicación correcta y de forma contrastada va a asegurar una excelente calidad de los resultados (Valcárcel, 1999). En la Tabla 1 se recogen las diferentes metodologías analíticas de cuantificación caracterizadas en el ámbito de la calidad.

Tabla 1. Características de las diferentes metodologías analíticas en relación con la calidad. (Modificado de Valcárcel, 1999).

METODOLOGÍAS ANALÍTICAS	CARACTERÍSTICAS
Método primario	Mayor calidad metrológica Perfectamente descrito y comprendido Incertidumbre definida en términos estándares No necesidad de un estándar del analito.
Método de referencia	Se emplea para comparar la exactitud o incertidumbre en el mismo laboratorio de rutina dentro de un sistema de control de calidad.
Método estándar	Desarrollado y validado por organizaciones relacionadas con la normalización. La incertidumbre y la trazabilidad pueden no estar definidas.
Método validado	Sometido a un doble estudio para saber sus propiedades analíticas, exactitud y trazabilidad, incertidumbre, rapidez, costo.
Métodos trazables	Método estándar u oficial relacionado con nitidez a una referencia común.

Los métodos analíticos forman parte de lo que se conoce como el proceso analítico general, que puede definirse como el conjunto de operaciones implícitas en la obtención de un resultado.

1.2 El proceso analítico general.

El proceso analítico es la metodología propia del trabajo analítico consistente en un conjunto de operaciones sucesivas realizadas para solucionar un determinado problema analítico.

A la hora de realizar un análisis es muy importante tener clara la información que se necesita para resolver el problema analítico planteado. La Figura 2 muestra algunos de los factores a tener en cuenta a la hora de seleccionar el proceso analítico más adecuado para la resolución de un problema analítico, para lo que habría que dar respuesta a varias preguntas, tales como ¿qué tenemos que analizar y por qué?, ¿quién va a tomar la muestra?, ¿dónde se va a tomar? ¿cómo van a influir los resultados?, etc. Así pues, las respuestas a estas preguntas serán posibles si el problema se ha definido de manera clara y minuciosa y se evitaría una cantidad de trabajo no necesario con el que se obtendrían datos sin importancia.



Figura 2. Factores a tener en cuenta en la elección de un proceso analítico.

Como se ha explicado anteriormente, hay una alta relación entre el problema que se plantea, los objetivos que quieren alcanzarse y la forma en que se va a desarrollar el proceso analítico (Valcárcel y Lendl, 2004). Los resultados que deban obtenerse van a depender del problema analítico planteado por el cliente, que va a estar interesado en que el análisis se desarrolle dentro de un sistema de calidad.

Para responder a estas preguntas hay que tener también en cuenta los riesgos que pueden aparecer en el proceso de muestreo, así como los problemas en el tratamiento de la muestra, en el transporte y en el análisis para obtener los resultados. Queda claro que antes de iniciar la toma de muestra para posteriormente realizar un análisis hay que conocer el por qué se realiza, cuál va a ser el objetivo de los resultados y las diversas decisiones que se tomaran en base a los resultados obtenidos.

1.2.1 Etapas del proceso analítico

El proceso analítico general requiere de una serie de etapas que se realizan de forma sucesiva y que se encuentran esquematizadas en la Figura 3.

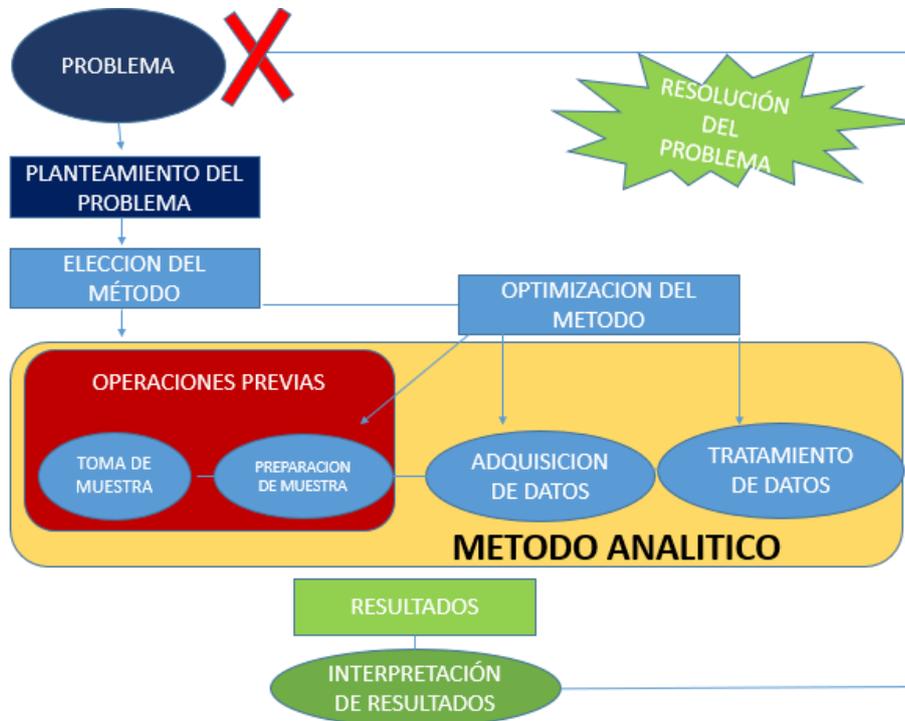


Figura 3. Etapas del proceso analítico general.

Una vez conocido el problema a resolver es necesario elegir el método más adecuado para dar respuesta a ese problema (Valcárcel y Lendl, 2004) y ese método estará siempre compuesto por una serie de operaciones previas, que incluyen la toma y la preparación de la muestra para la siguiente etapa, la adquisición de datos, que se obtienen mediante una medida, y el tratamiento de datos, que permite obtener la información necesaria para resolver el problema (Miller y Miller, 2002).

Cada una de las etapas es diferente dentro de cada método analítico, pudiendo ser más o menos complejas dependiendo de cada caso.

1.2.1.1 Operaciones previas

Las operaciones previas que se realizan en el proceso de análisis tienen como objetivos facilitar el proceso de análisis y mejorar y optimizar las posibilidades analíticas (Figura 4). Pero estas operaciones previas, que pueden ser complejas y numerosas, presentan una serie de

inconvenientes y características comunes, que se muestran en el esquema de la Figura 4 (Anderson, 2008).



Figura 4. Objetivos e inconvenientes de las operaciones previas.

1. Son muy variables, de hecho, cada proceso analítico tiene algunas peculiaridades que requieren diferentes planteamientos en las operaciones preliminares según: los objetivos de la aplicación analítica en cuestión; el tipo de análisis implicado (cualitativo, cuantitativo, estructural, de superficie, especiación, etc.); el estado de agregación, la naturaleza y disponibilidad de la muestra; el tipo, concentración y número de analitos a determinar; y la técnica analítica a utilizar.
2. Existe gran complejidad en la mayoría de estas operaciones puesto que en muchos casos son procesos multietapa en los que se emplea una gran variedad de herramientas analíticas. Ello hace difícil su automatización.
3. Requieren un alto grado de participación humana, en alto contraste con las otras dos etapas. Son procesos complejos y por eso hay un alto grado de dificultad para automatizarlos.
4. Son operaciones lentas, que requieren mucho tiempo y se hacen incluso tediosas, de hecho, pueden llegar a ocupar hasta un 70- 90% del tiempo total del proceso.
5. Son fuente potencial de errores tanto aleatorios como sistemáticos, que afectan a la calidad de los resultados obtenidos.

6. No son tan susceptibles de control sistemático como las otras etapas del proceso analítico. El chequeo de estas operaciones requiere un minucioso trabajo de contraste sistemático de todas las herramientas utilizadas, además de asegurar su empleo correcto.

7. Por último, estas operaciones constituyen una fuente potencial de riesgos personales y medioambientales, debido al uso de reactivos y herramientas peligrosas o de sustancias tóxicas.

Dentro de estas operaciones previas se diferencian dos partes fundamentales, la primera constituida por el muestreo o toma de muestra, y el resto de operaciones que constituyen la preparación de la muestra.

La toma de muestra tiene como objetivo disminuir la masa del material que va a someterse al análisis a una pequeña porción para que pueda ser analizado en el laboratorio. Un problema que aparece en este proceso es la heterogeneidad en la composición de la muestra y en el contenido de los analitos, es importante tomar muestras representativas ya que, si la porción que se va a analizar no es representativa del material original, los resultados que se obtengan no van a poderse relacionar, a pesar de que el método analítico y los análisis hayan sido de una buena calidad. Así pues, la calidad en la toma de muestra va a ser de vital importancia para que los resultados y conclusiones obtenidos sean de confianza.

Para conseguir hacer un muestreo de calidad se diseña un plan de muestreo que asegure que la muestra objeto de análisis va a ser representativa y, además, evite la contaminación de la muestra eligiendo un material y equipo adecuado en función del tipo de analito. Se estudiará en el momento adecuado para llevar a cabo esa toma de muestra debido a las variaciones climatológicas que se puedan presentar. Se seleccionan diversos métodos para proteger la muestra y se redactará un plan de protocolo para evitar problemas y controlar la calidad de este proceso.

1.2.1.2 Preparación de la muestra

La preparación de la muestra se puede definir como la etapa del proceso analítico en la que se realizan todas aquellas operaciones necesarias para convertir la muestra en una forma adecuada para el análisis, comprendiendo todas las transformaciones que se realizan desde que se obtiene la muestra de laboratorio hasta que se llega a la etapa de medida del analito o los analitos de interés.

La preparación de la muestra tiene como objetivos generales los siguientes:

- Hacer el analito accesible al análisis

- Obtener el analito a una concentración adecuada.
- Eliminar interferencias
- Proteger el instrumento final de medida
- Llevar un porcentaje de analitos tan alto como sea posible desde la muestra original al paso de determinación.
- Obtener los analitos en el estado de agregación más adecuado para el procedimiento instrumental a utilizar, asegurando que los analitos permanecen en su estado original o están totalmente convertidos en una especie estable.
- Llevar sólo algunos de los componentes de la matriz de la muestra original al paso de determinación.
- Obtener el analito a una concentración apropiada para la detección y medida.
- No añadir ninguna nueva interferencia

En la Figura 5 se puede apreciar como el proceso de preparación de la muestra ocupa mayor tiempo que el resto de las etapas del proceso analítico.

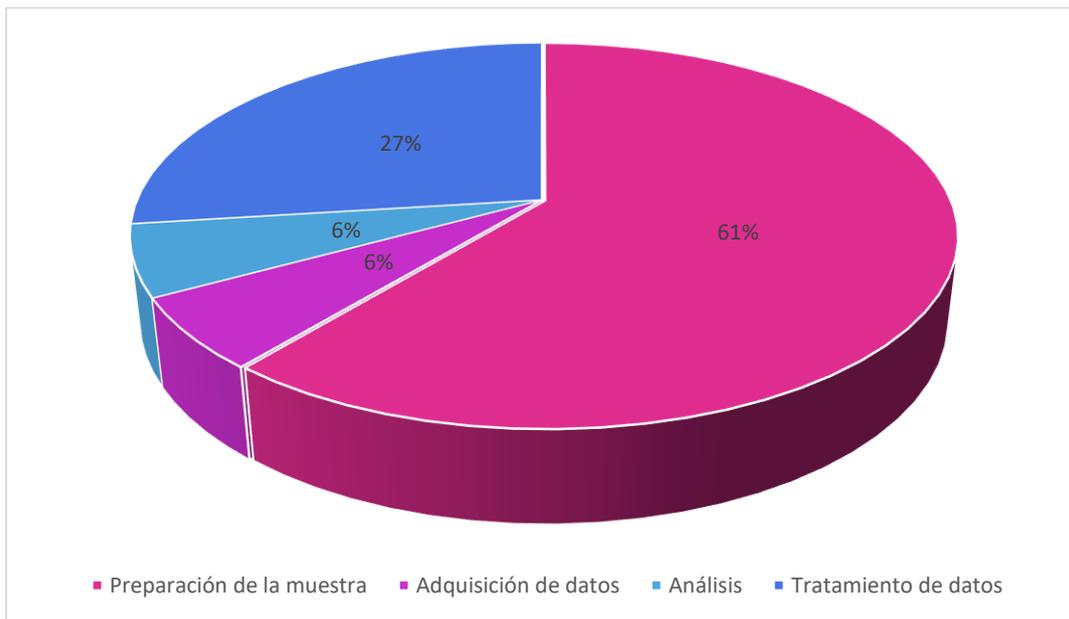


Figura 5. Porcentaje de tiempo gastado en el proceso analítico.

2. OBJETIVOS

- El principal objetivo de este trabajo es evaluar las diferentes técnicas y metodologías empleadas para la preparación de una muestra en los métodos analíticos.

Para conseguir este objetivo fue necesario alcanzar varios objetivos parciales:

- Evaluar la problemática que presenta la etapa de la preparación de la muestra desde el punto de vista de la calidad.
- Identificar las diferentes operaciones previas que hay que realizar a la muestra como parte del proceso analítico general.
- Conocer las diferentes técnicas que se aplican para la preparación de la muestra antes de ser llevada al instrumento de medida.
- Profundizar en las técnicas de extracción que se utilizan en la preparación de la muestra para el análisis de analitos orgánicos.
- Evaluar la frecuencia de aplicación de estos procedimientos en los últimos años en el análisis farmacéutico, clínico, medioambiental, bromatológico, etc. y su evolución en el tiempo.

3. METODOLOGÍA

Se ha llevado a cabo una búsqueda de bibliografía en catálogos nacionales y bases de datos internacionales, principalmente, con el fin de encontrar libros, documentos técnicos, tesis doctorales o artículos, que fueran de utilidad para llevar a cabo la resolución de los objetivos propuestos en el trabajo.

En primer lugar, se realizaron búsquedas en español, siendo la primera la realizada en el catálogo de la biblioteca de la universidad de Sevilla FAMA; con la obtención de textos que tuvieron peso en el desarrollo del trabajo, tales como los libros “Principios de Química Analítica” de Miguel Valcárcel y “Toma y Tratamiento de Muestras” de Carmen Cámara.

También se ha utilizado información y material extraído de los temas de clase de las asignaturas Química Analítica Aplicada y Control de Calidad en el Laboratorio Analítico.

Por otro lado, se realizaron búsquedas bibliográficas en bases de datos internacionales de lengua inglesa como Scopus y Pubmed. Estas resultaron de gran utilidad para la búsqueda de trabajos científicos, en su mayoría de índole experimental.

La búsqueda giró en torno a una serie de palabras clave, las cuales fueron: calidad, química analítica, preparación de muestra, técnicas de extracción.

Tras la lectura del título de los artículos encontrados en cada una de las búsquedas se hizo una primera selección, descartándose los que no estaban relacionados con el trabajo. Para la siguiente selección se procedió a la lectura del resumen de los mismos, hasta recopilar artículos con información interesante para el desarrollo de los objetivos. En esta última selección se profundizó en la lectura, incluyendo artículos de relevancia.

Cabe destacar que algunos de los trabajos mencionados en la bibliografía se emplearon con el objetivo de enriquecer el texto y aportar una visión de la gran diversidad de trabajos experimentales que existen sobre el tema en cuestión.

Los criterios de exclusión principales a la hora de seleccionar la información fueron la restricción de cualquier documento del que no se dispusiera, el criterio personal para determinar qué textos no tenían relación con los objetivos perseguidos por el trabajo y los textos encontrados en Internet cuya procedencia era poco fiable o sin referencias bibliográficas.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Preparación de la muestra

Una de las etapas del proceso analítico general es la de las Operaciones Previas, que a su vez está constituida por dos etapas bien definidas: Muestreo y Preparación de la Muestra. En la Figura 6 se encuentran representadas algunas de las operaciones previas a realizar para preparar la muestra desde que se ha realizado el muestreo hasta obtener la muestra de laboratorio que se lleva al instrumento de medida.

Hay que tener en cuenta que en este esquema no están representadas todas las operaciones que se utilizan para llevar a cabo la preparación de la muestra y que no todas las muestras tienen que sufrir todos estos procesos secuencialmente hasta llegar al instrumento.

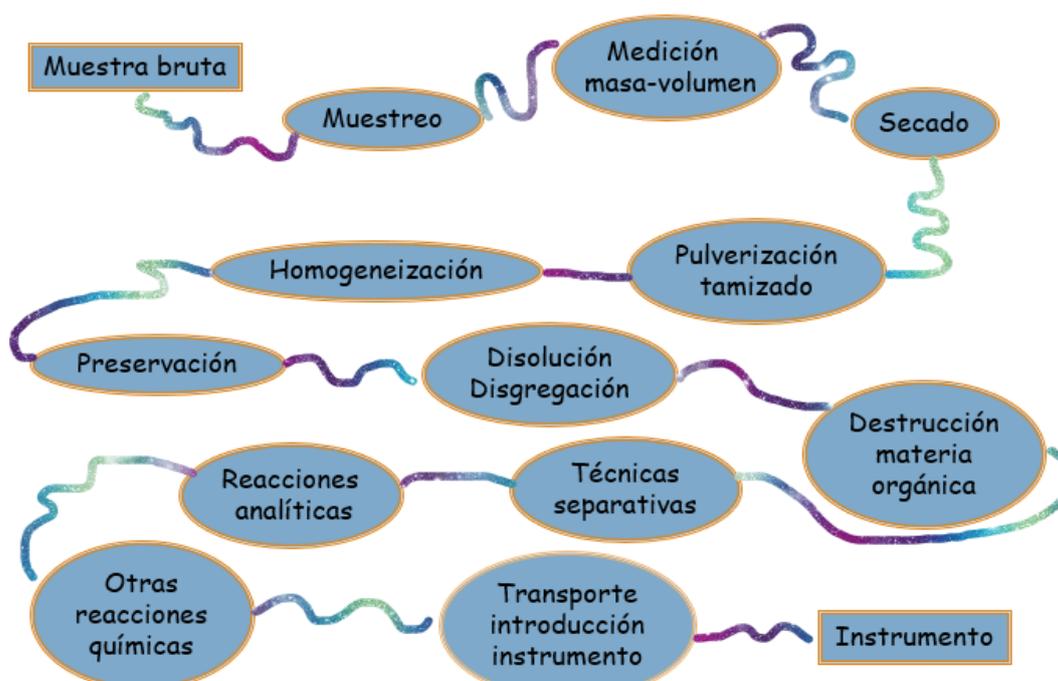


Figura 6. Esquema en el que se muestran algunas de las operaciones previas.

Las operaciones a realizar para preparar la muestra van a depender del tipo de análisis implicado, del estado de agregación, naturaleza y disponibilidad de la muestra, y de la concentración y número de analitos a determinar, por lo que pueden ser muy numerosas y diversas.

Dentro de las posibles operaciones de preparación de muestras algunos autores (Cámara et al., 2004) diferencian dos fases, la primera de ellas correspondiente a una serie de tratamientos

previos de la muestra, y la segunda correspondiente a la propia preparación de la muestra para la medida según el tipo de analito orgánico o inorgánico.

4.1.1 Pretratamiento de la muestra

Se conoce por pretratamiento a la etapa que hay entre la toma y el tratamiento de la muestra, donde se van a realizar operaciones físicas sobre la muestra antes de su análisis, por otro lado, se entiende como tratamiento a la etapa en la cual la muestra es sometida a procesos químicos y físicos para prepararla para el posterior análisis (Cámara et al., 2004).

Cuando la muestra llega al laboratorio el analista realiza una serie de tratamientos previos como son el submuestreo para seleccionar una porción (submuestra) adecuada, que represente a la muestra; o el almacenamiento, que debe realizarse de forma adecuada según el tipo de muestra, aquellas muestras que se degraden rápidamente tienen que analizarse lo más pronto posible, esto a veces no puede ser y hay que recurrir al almacenamiento en condiciones determinadas o a la adición de conservantes, etc.

Para conservar la muestra completa e íntegra hay que usar diversas sustancias preservantes, el cómo deben conservarse va a depender de las características de las muestras. Se pueden utilizar ácidos y bases para el control del pH, el almacenamiento de la muestra a baja temperatura (4°C), además de la utilización de envases en color topacio y guardados en la oscuridad.

La conservación de la muestra siempre tiene un aspecto cuantitativo asociado a la obtención de resultados reproducibles. Parámetros como el pH, la ausencia de cloro residual, o la temperatura de la muestra, tienen que evaluarse en el lugar de muestreo y finalmente en el laboratorio.

Hay que tener cuidado ante la posible contaminación de la muestra al introducir alguna sonda de medida, generalmente basadas en la toma de dos muestras idénticas para realizar en una de ellas la medida de los parámetros de conservación.

Además, otro aspecto fundamental es el tiempo que pasa entre la toma de muestra y el análisis ya que las sustancias a analizar pueden sufrir pérdidas o alteraciones, aunque se apliquen las técnicas de conservación y almacenamiento adecuadas.

Esta es una etapa importante ya que en ella pueden variar la concentración de los analitos de interés debido a la temperatura, manipulación, exposición a la luz, agitación, etc. Cada muestra hay que tratarla de manera diferente debido a la múltiple variedad de muestras y matrices existentes, que hacen que sea imposible la descripción absoluta de los diversos pretratamientos.

Los procesos de secado de la muestra, pulverización, homogeneización, y también posteriores submuestreos, son muy generales para las muestras sólidas.

- **Secado:** la presencia de agua en una muestra sólida puede producir alteraciones para el análisis de compuestos inorgánicos y orgánicos, por ello es importante el buen secado de la muestra y así evitar también reacciones de hidrólisis que producirían pérdidas del analito. El secado se realiza antes de la trituración y homogeneización y dos importantes caminos a la hora del secado son el secado en estufa y la liofilización.

Secado en estufa: se pone la muestra bien extendida en un vidrio de reloj, y se mete en el horno a 100°C durante un tiempo determinado, hay que conocer bien la temperatura ya que temperaturas muy altas pueden producir descomposición de la muestra y si la temperatura es baja puede producir un aumento del tiempo de la muestra en la estufa.

Liofilización: es un proceso de secado en frío y caro, pero recomendable cuando hay riesgo de pérdida de analito con el calentamiento. En la etapa primera se congela la muestra con nitrógeno líquido para después hacerle el vacío, logrando que el hielo pase a vapor de agua y es eliminado.

- **Trituración y homogeneización:** se recomienda disminuir el tamaño de la muestra ya que cuanto menor sea el tamaño de partícula menor será el error que se cometa en el análisis, ya que las muestras finamente divididas son más homogéneas, pueden mezclarse y submuestrearse con mayor precisión y exactitud, pueden disolverse y extraerse más fácilmente porque presentan mayor superficie expuesta al disolvente. En el mercado existen numerosos equipos que son utilizados para una adecuada trituración, se puede encontrar, por tanto: trituradores para muestras duras (de mandíbula, de rodillo, de cono, molinos de bolas, de anillos...) y trituradores para muestras blandas.

4.1.2 Tratamiento de la muestra

Los procesos de tratamiento de la muestra se pueden clasificar en dos grupos según la naturaleza química del analito, inorgánica u orgánica (Tablas 2 y 3) (Cámara et al., 2002).

Tabla 2. Procesos de preparación de la muestra para la determinación de analitos inorgánicos.

PROCESOS PARA LA DETERMINACION DE ANALITOS INORGÁNICOS

Filtración y centrifugación

Disolución por vía húmeda

Descomposición por fusión

Preparación de la muestra para el análisis por fluorescencia de rayos X

Mineralización por vía seca

- **En horno a elevadas temperaturas**
- **Método de combustión Schoniger**
- **Mineralización en plasma de oxígeno a baja T^a**

Extracción secuencial: Lixiviación

Preparación de suspensiones

Técnicas de separación extractivas

- **Extracción líquido-líquido**
- **Extracción con fluidos supercríticos**

Procedimientos de preconcentración

- **Transferencia de la matriz a otra fase**
- **Transferencia de los analitos a otra fase**

Tratamiento de la muestra para la determinación de especies (especiación)

Tabla 3. Procesos de preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos.

PROCESOS PARA LA DETERMINACION DE ANALITOS ORGÁNICOS

Extracción

- **Sólido-líquido**
- **Con fluidos supercríticos**
- **Con agua subcrítica**
- **Líquido-líquido**
- **En fase de vapor**
- **En fase sólida**
- **Sólido-sólido: dispersión de la muestra en fase sólida**

Otras técnicas de aislamiento y preconcentración

- **Derivatización**
- **Destilación y evaporación de disolventes**
- **Procesos de membrana**

Cromatografía preparativa

Debido al gran número de procesos que hay, este trabajo bibliográfico se va a centrar en la preparación de muestra para determinación de analitos orgánicos y concretamente en los diferentes tipos de extracción.

4.2 Preparación de la muestra para la determinación de analitos orgánicos

Los compuestos orgánicos están formados por C, H, O, N, S y halógenos, sabiendo que existen más de diez millones de compuestos orgánicos hay que entender la dificultad que envuelve la determinación individual de estos. Para su análisis se deberán utilizar métodos analíticos que no alteren al analito o transformarlos en derivados más estables mediante una reacción de derivatización, por este motivo el analista debe conocer perfectamente tanto el tipo de analito como de matriz para seleccionar adecuadamente el método de análisis.

Como se ha indicado anteriormente, los objetivos de la preparación de la muestra son hacer el analito accesible al análisis, obtenerlo a una concentración adecuada, eliminar interferencias y proteger el instrumento final de medida.

4.2.1 Técnicas de extracción

Las extracciones son procesos de separación mediante los cuales el analito se reparte o distribuye entre dos fases (Cela et al., 2002). Los principales objetivos de estos procesos son separar el analito de la matriz de la muestra, eliminar interferencias, preconcentrar el analito y producir especies medibles del mismo.

La muestra tiene que ponerse en contacto con un sólido, líquido o fluido supercrítico, los cuales actuarán como extractantes. Esto tiene que ocurrir en unas condiciones determinadas para conseguir debilitar la unión analito-matriz y aumentar la interacción analito-extractante.

Si el analito es un compuesto apolar se utilizará un extractante suficientemente apolar para que interaccione con mayor intensidad que la que presenta con la matriz, además hay que tener en cuenta a otras condiciones como pH, temperatura, fuerza iónica, etc. que pueden afectar a esas interacciones. De esta forma se puede decir que se utiliza la máxima *similia similibus solvuntur* (lo similar disuelve a lo similar).

Uno de los inconvenientes del análisis de compuestos orgánicos frente a los inorgánicos es que es difícil averiguar si todo el analito orgánico ha sido extraído de la matriz, lo que podría redundar en un error en la determinación final. Dentro de las técnicas de extracción existen algunas que permiten la separación y recuperación completa del analito de la muestra y otras

que no lo recuperan completamente y que requieren de estrategias para calcular la porción de analito recuperada (Anderson, 2008).

Concluida la extracción se puede pensar que el analito está en óptimas condiciones para su determinación, pero algunas de las técnicas de extracción no son específicas y el analito ha podido ser extraído junto con otras sustancias, por lo que posteriormente hay que someter a los extractos obtenidos a otros procesos para eliminar las interferencias o algunas de las técnicas de extracción se acoplan a otros procesos separativos como la cromatografía.

4.2.1.1 Extracción líquido-líquido

En esta técnica las fases están formadas por dos por líquidos inmiscibles entre los que se reparte el soluto en función de su coeficiente de distribución o reparto. Se utiliza un embudo de decantación como herramienta para conseguir la separación (Figura 7).

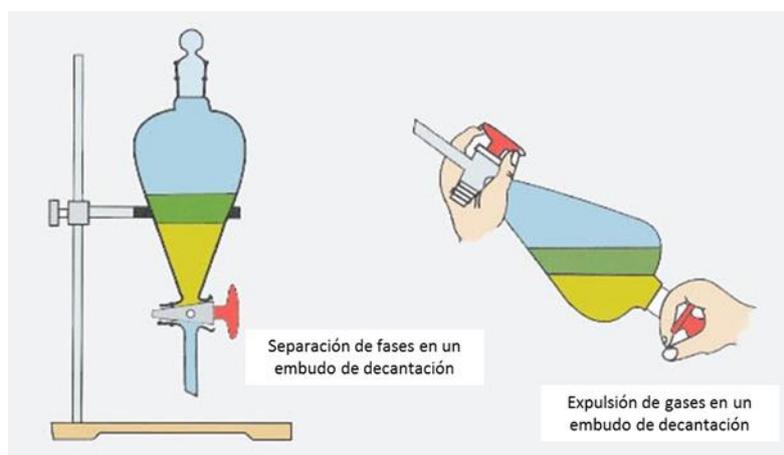


Figura 7. Embudo de decantación en la extracción líquido-líquido.

La extracción con disolventes o extracción líquido-líquido es un proceso de reparto en el que el analito se va a transferir desde una fase líquida a otra, inmiscibles entre sí, en función de su solubilidad. Generalmente una fase es acuosa y la otra un disolvente inmiscible con el agua (fase orgánica).

El proceso se realiza en una única etapa si el coeficiente de reparto es adecuado. Si la separación no es cuantitativa se repite este proceso n veces, añadiendo disolvente orgánico fresco, este proceso se denomina extracción líquido-líquido en múltiples etapas. Si los coeficientes de

reparto de los compuestos a separar son muy próximos, es necesario recurrir a la extracción a contracorriente (Valcárcel y Silva, 1984).

El principal inconveniente de esta técnica, aplicada en su forma tradicional, es el elevado consumo de disolventes orgánicos. Algunos de ellos pueden ser tóxicos para el medioambiente y/o para la salud, por lo que, en los últimos años, y teniendo en cuenta los principios de la química verde, se han puesto a punto procedimientos de extracción líquido-líquido a microescala que utilizan volúmenes mucho más pequeños de disolventes orgánicos.

4.2.1.2 Extracción sólido-líquido

Consiste en poner en contacto una cantidad de muestra sólida con un disolvente, sometiéndose a continuación a distintos procesos en función de la unión existente entre el analito y la matriz de la muestra.

El proceso de extracción debe ser optimizado en cada aplicación real tratando de emplear unas condiciones de compromiso, de forma que se obtenga la mayor cantidad posible en la extracción de los analitos y la mínima de otros compuestos no deseados de la matriz (Cámara et al., 2004).

Se pueden utilizar distintos procedimientos:

a) Agitación:

Proceso de extracción muy suave, en el que la muestra se somete a la acción de un disolvente mediante un proceso de agitación, manual o automática. Este proceso es solo aplicable a analitos débilmente unidos a la matriz. La eficacia de la extracción va a depender del disolvente principalmente, del tipo de matriz y del tiempo de agitación.

Cuando se extrae el analito, la matriz y el disolvente se separan por filtración, normalmente el volumen de disolvente que se utiliza es muy alto y se necesita su evaporación antes de la determinación final para preconcentrar los analitos.

En general, aunque las interacciones analito-matriz no sean especialmente intensas, las recuperaciones mediante el proceso de agitación son bajas, haciendo que la agitación no sea eficaz, así pues, se utiliza radiación de ultrasonidos que va a aumentar los choques entre moléculas y el disolvente difunde más rápido. Gracias a esta última mejora, el tiempo de extracción, la cantidad de disolvente y de muestra son reducidos notoriamente.

En conclusión, estos procesos de extracción por agitación, aunque sean fáciles de utilizar resultan muy complicados por la evaporación del disolvente, filtración del extracto, aumento de

la probabilidad de contaminación y la exposición del operador a vapores de los disolventes, que pueden ser tóxicos.

b) Soxhlet:

Se utiliza cuando los compuestos orgánicos están retenidos en la matriz fuertemente y no pueden ser extraídos con una sencilla agitación, sino que además es necesario calentar la mezcla continuamente, pero sin riesgos de evaporación del analito o disolvente que se ha utilizado.

Para ello se va a utilizar la técnica de Soxhlet, utilizándose un extractor que lleva el mismo nombre que la técnica (Figura 8). Proceso donde el disolvente recircula continuamente a través de la muestra mediante destilación y condensación. El disolvente se va enriqueciendo en analito y la muestra se va agotando.

La ventaja de esta extracción es que la muestra repetidamente entra en contacto con el disolvente (extracción continua) y favorece el equilibrio de transferencia entre las dos fases. Además, la temperatura de este sistema es alta porque el calor que se aplica al matraz se transmite a la cámara de extracción.

Sin embargo, también tiene sus inconvenientes y es que, como se ha mencionado anteriormente, se necesita un tiempo largo para tener una extracción completa, y se utiliza un gran volumen de disolventes, esto implica que haya un gasto económico alto y un problema ambiental. Otro elemento que hay que tener en cuenta es que a medida que se extraen los analitos, estos pasan al matraz que está a altas temperaturas y permanecen ahí un largo periodo de tiempo, esto hace que los analitos que sean termolábiles puedan degradarse.



Figura 8. Extracción Soxhlet.

c) Microondas:

La extracción con microondas apareció como alternativa a Soxhlet. Se coloca la muestra en un recipiente con el disolvente y se le somete a una radiación de microondas. Al acabar la extracción, el extracto se filtra y se guarda para posibles tratamientos. El calentamiento de la muestra va a ser posible ya que las moléculas con momento dipolar absorben la energía de microondas y se produce la rotación, siendo esta la responsable del calentamiento de la muestra.

Para que la extracción sea eficiente y eficaz la elección del disolvente va a ser muy importante, a mayor momento dipolar de éste, mayor será la capacidad de extracción. Frecuentemente en los métodos de extracción se suele utilizar como producto extractante una mezcla de hexano y acetona. Esta mezcla va a extraer los analitos, pero a la vez también se extraen compuestos que interfieren y es necesario hacer posteriormente una limpieza de lo que se ha conseguido.

Los equipos disponibles en el mercado permiten el control de la temperatura, potencia y presión, lo que va a permitir mejorar la separación en cada caso.

Se han hecho estudios de recuperación de compuestos fenólicos en suelos, comparando la técnica de Soxhlet y utilizando microondas. La conclusión fue que las recuperaciones obtenidas fueron similares pero el tiempo de extracción, el volumen de disolvente orgánico que se utilizó y la posibilidad de procesar diversas muestras a la vez la convierten en una técnica con mucho futuro. En la Tabla 4 se muestra una comparación de la eficacia de extracción de las dos técnicas mencionadas anteriormente.

Tabla 4. Recuperación (%) de compuestos fenólicos en suelos. Condiciones: 10 g de suelo con analitos en concentración 10 microgramos/ gramo. En Soxhlet: 100ml de metanol:agua (4:1)+2% trietilamina, 12 horas. Microondas: 50 ml de metanol:agua (4:1) +2% trietilamina, 75W, 40 min. (Cámara et al., 2004).

COMPUESTO	SOXHLET	MICROONDAS
Fenol	74 ± 11	84 ± 8
2-Nitrofenol	88 ± 9	45 ± 14
2-Metilfenol	74 ± 10	83 ± 6

d) Extracción acelerada:

Esta técnica se introdujo en el año 1994 por una compañía llamada Dionex Corporation. Se utilizan disolventes orgánicos a presión y temperatura alta para conseguir una buena extracción.

La muestra se coloca en una celda, con 15-40 ml de disolvente, se aplica una temperatura de hasta 200°C y una presión de 20MPa. Tras un tiempo de 15 minutos, el extracto que se ha conseguido se transfiere a un vial para realizar el análisis. No es necesario filtrar el extracto obtenido.

Es un proceso automático y se pueden programar las diversas etapas, además, es importante remarcar que se pueden procesar unas 24 muestras de forma secuencial. En la Figura 9 aparece un equipo de extracción acelerada, Dionex ASE 350 y en la Figura 10 se muestra un esquema del proceso de extracción acelerada.



Figura 9. Equipo de extracción acelerada. Referenciado de VERTEX technics.

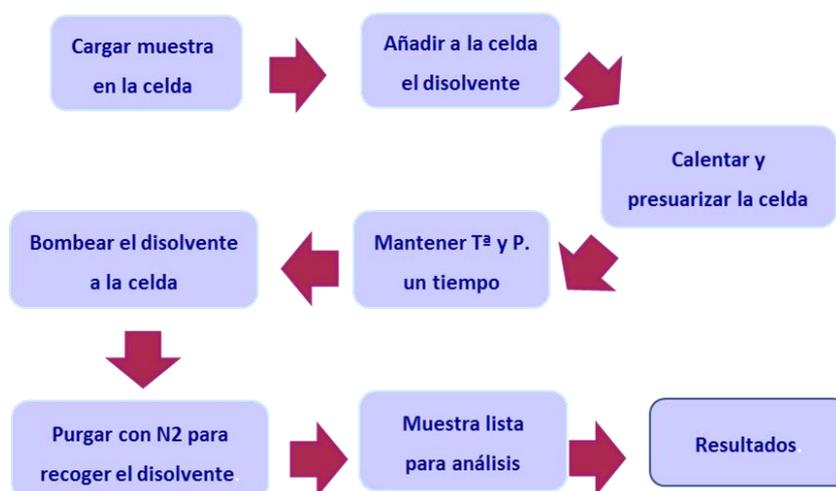


Figura 10. Proceso de extracción acelerada.

En la Tabla 5 aparecen las ventajas e inconvenientes de las técnicas de extracción de compuestos orgánicos en muestras solidas que se han explicado anteriormente.

Tabla 5. Técnicas de extracción de compuestos orgánicos.
(Modificada de Cámara et. al., 2004).

TÉCNICA	VENTAJAS	INCONVENIENTES
EXTRACCIÓN SOXHLET	<ul style="list-style-type: none"> -Método estándar -No es necesaria la filtración del extracto obtenido -Independiente del tipo de matriz -Coste bajo 	<ul style="list-style-type: none"> -Elevado tiempo de extracción. Hasta 48h -Gran cantidad de disolvente Necesaria la evaporación del disolvente
EXTRACCIÓN CON MICROONDAS	<ul style="list-style-type: none"> -Rápido -Bajo consumo de disolventes Se necesita filtrar el extracto Automático. Y de hasta 24 muestras Manejo sencillo 	<ul style="list-style-type: none"> -El extracto obtenido debe ser filtrado - Adición de un disolvente polar -La limpieza del extracto es necesaria Coste moderado
EXTRACCIÓN ACELERADA	<ul style="list-style-type: none"> -Rápido -Utilización de baja cantidad de disolventes orgánicos -Control de temperatura, presión y potencia -Se consiguen altas temperaturas -En una hora se pueden procesar hasta 12 muestras 	<ul style="list-style-type: none"> -Coste inicial elevado -Depende del tipo de matriz

4.2.1.3 Extracción en fase sólida

Proceso físico en el que interviene una fase sólida y una fase líquida. Esta separación está basada en la diferente afinidad que presenta el analito por la fase sólida o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido). El analito o algunos componentes de la matriz quedarán retenidos en la fase sólida. Posteriormente serán eluidos con un pequeño volumen de un disolvente adecuado (Figura 11).

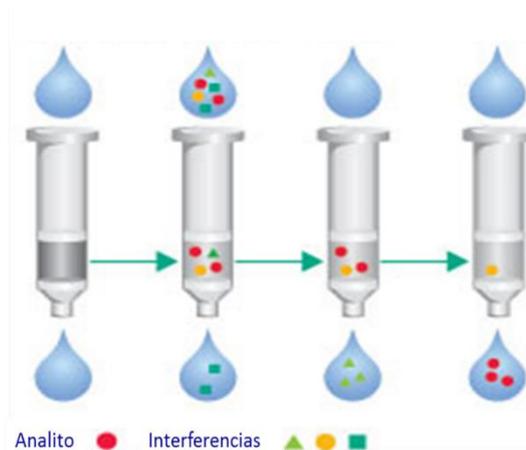


Figura 11. *Proceso de extracción en fase sólida.*

Tiene la ventaja de que es de fácil aplicación y permite realizar la preconcentración de los analitos, asimismo utiliza relativamente poco disolvente y puede automatizarse. Por otro lado, presenta el inconveniente de las posibles bajas recuperaciones debido a las interacciones entre la matriz de la muestra y los analitos, la posible obturación del cartucho o bloqueo de los poros del adsorbente por sólidos y componentes grasos, y la limitación de su aplicación a compuestos semivolátiles con temperatura de ebullición sustancialmente por encima de la de los disolventes.

4.2.1.4 Extracción con fluidos supercríticos

Un fluido supercrítico es aquel que se encuentra a una temperatura y presión por encima de sus valores críticos (Figura 12). Tiene unas características intermedias entre gas y líquido, es decir, capacidad de solvatación como los líquidos y capacidad de penetración como los gases.

Se conoce como punto crítico a la T^a y la P a las que el líquido y el gas se hacen indiferenciables, ya que las densidades se igualan. Es específico para cada compuesto. En la Figura 12 aparece el diagrama de fases para un compuesto puro.

Es importante la solubilización del analito en el fluido supercrítico. La cantidad de soluto en equilibrio aumenta cuando aumenta la densidad (a P y T^a constante) y aumenta la T^a a densidad constante. Por tanto, se concluye que la selectividad en la extracción mejora al modificar la temperatura y la presión o adicionando un modificador (Luque de Castro et al., 1993).

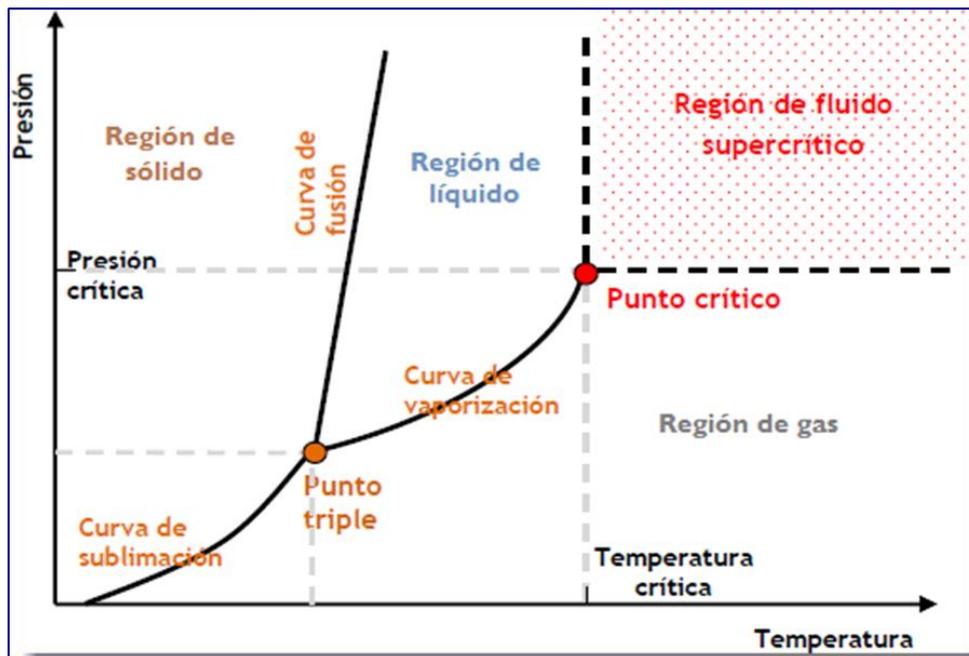


Figura 12. Diagrama de fases para una sustancia pura.

El CO₂ es la sustancia más utilizada para extracción supercrítica debido a que es químicamente inerte, inocuo, no inflamable, la P y T^ª críticas se alcanzan fácilmente, está disponible con pureza elevada y a presión atmosférica es un gas.

El uso de un fluido supercrítico en extracción tiene las ventajas de mejorar la solubilización de los analitos, ya que pequeños cambios en la presión cambian enormemente el poder solubilizante y poseen alta penetración en el interior de las matrices difíciles. El consumo de disolventes es bastante menor y se pueden automatizar. Tiene el inconveniente de que la optimización de los distintos parámetros es más compleja y un coste económico superior.

4.2.1.5 Extracción con agua subcrítica

El disolvente ideal para utilizar en procesos de extracción sería el agua, ya que el empleo de disolventes orgánicos no es beneficioso desde el punto de vista medioambiental, pero hay un inconveniente y es que la poca solubilidad de los compuestos orgánicos en el agua. Por tanto, se necesitaría modificar sus propiedades para que fuese un buen extractante.

Cuando se alcanzan combinaciones de temperatura y presión elevadas, por debajo de su punto crítico, el agua alcanza un estado denominado “subcrítico”. La estructura química del agua se modifica, lo que le confiere una mayor reactividad que se aproxima a la de los disolventes de polaridad reducida. Así, La polaridad de un disolvente está determinada por su constante

dieléctrica, donde un valor bajo va a indicar poca polaridad. El agua tiene una constante dieléctrica de 78 a 25°C y 1 bar, mientras que ese valor pasa a ser 27 a 250°C y 50 bar (presión necesaria para mantener el estado líquido).

El agua en estado subcrítico, además de tener una difusividad mayor, puede sustituir potencialmente a los disolventes orgánicos, como el metanol o la acetona, para determinadas aplicaciones.

La extracción con agua subcrítica ha permitido extraer una gran cantidad de contaminantes presentes en suelos, como los fenoles que pueden ser extraídos a 100°C, o los hidrocarburos aromáticos policíclicos de bajo peso molecular a 150-200°C.

4.2.1.6 Extracción en fase de vapor

Como se ha ido mencionando anteriormente el objetivo principal es separar el analito de la matriz aprovechando las propiedades de ésta y del compuesto que se va a determinar.

Una de las propiedades es la presión de vapor de los analitos, si es alta significa que los analitos pueden ser volatilizados de manera fácil y, como consecuencia, pueden separarse de la matriz. Basándose en esta propiedad se han desarrollado diversas técnicas que se basan en el reparto de analitos entre la muestra, que puede ser sólida o líquida y una fase gaseosa.

Se utilizan para aislar y preconcentrar determinar compuestos orgánicos volátiles en muestras de diversa naturaleza (aroma en alimentos, perfumes, muestras biológicas, etc.).

Dentro de los procedimientos de extracción en fase de vapor tienen gran interés las llamadas técnicas de espacio de cabeza, que se utilizan para el análisis de compuestos volátiles y tienen la ventaja de que pueden automatizarse y acoplarse a técnicas cromatográficas para separar, identificar y cuantificar los analitos volátiles obtenidos de una fase gaseosa (Morales et al., 2013).

En este tipo de técnicas la muestra se coloca en un vial, tal como puede observarse en la Figura 13, dejándose un espacio (espacio de cabeza) entre la superficie de la muestra y el septum que cierra herméticamente el vial. A continuación, se aplica la temperatura adecuada para que los analitos volátiles pasen a la fase gaseosa hasta alcanzar el equilibrio, pudiendo estar la muestra sometida o no a agitación. Por último, se toma una alícuota de la fase gaseosa y se inyecta en el cromatógrafo para que los analitos sean separados. Así pues, sólo los analitos volátiles pasan a la fase de vapor y pueden ser analizados, ya que no existen interferencias por otras sustancias de la matriz.

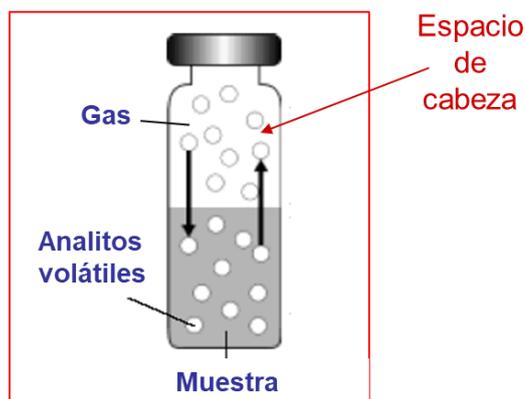


Figura 13. Espacio de cabeza, mezcla de gases en equilibrio con la muestra sólida o líquida contenida en un recipiente cerrado.

La transferencia de analitos a la fase gaseosa estará favorecida cuanto mayor sea la temperatura, aunque también estará favorecida la transferencia de compuestos parcialmente volátiles, así pues, esto obliga a controlar la temperatura de trabajo, que en muchos casos se establece a unos 25-30°C. En la Figura 14 se puede apreciar este proceso.



Figura 14. Extracción en espacio de cabeza.

Existen diversos procedimientos de extracción en espacio de cabeza, algunos de los cuales permiten solo el aislamiento de los compuestos volátiles, como la técnica de espacio de cabeza estático, y otros que consiguen al mismo tiempo la preconcentración de los analitos, tales como el espacio de cabeza dinámico, la purga y atrape en circuito cerrado o abierto, la microextracción en fase sólida en espacio de cabeza y la extracción adsorbtiva en espacio de cabeza.

4.2.1.7 Extracción sólido-sólido

La técnica de dispersión de la muestra en fase sólida consiste en mezclar una pequeña cantidad de muestra con un sorbente, también en cantidad muy pequeña y formando una mezcla homogénea. Esta mezcla se coloca en un cartucho de extracción y los analitos son eluidos con un disolvente. El tipo de sorbente y de disolvente utilizados dependerán del tipo de analito y muestra a analizar. En la Figura 15 se puede ver un esquema de esta técnica (Cámara, 2004).

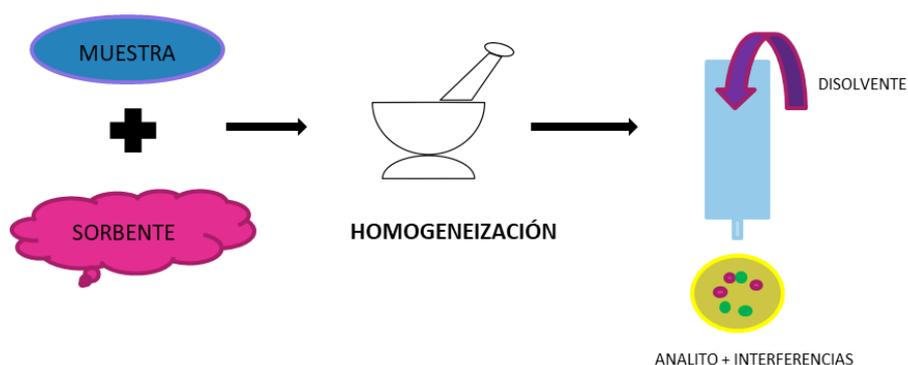


Figura 15. Técnica de dispersión de la muestra en fase sólida.

Esta técnica se ha aplicado a la determinación de pesticidas organoclorados y organofosforados en naranjas, y especialmente a muestras biológicas de tejidos para la obtención de fracciones ricas en algún tipo de compuesto.

4.3 Aplicaciones de las técnicas de extracción

Con el fin de evaluar la frecuencia de utilización de las técnicas de extracción y sus aplicaciones en análisis farmacéutico, clínico, medioambiental, bromatológico, etc., se ha llevado a cabo una exhaustiva búsqueda bibliográfica en los últimos cinco años. Las Figuras 16 y 17 representan la evolución en el tiempo, mostrando el número de publicaciones por año en las que se aplican las técnicas de extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida, las cuales han sido buscadas en la base de datos Scopus.

N.º de Publicaciones					
6118	6490	6600	6747	6648	3288
2013	2014	2015	2016	2017	2018
AÑO					

Figura 16. Evolución del número de publicaciones de extracción líquido-líquido en los últimos cinco años.

N.º de Publicaciones					
3164	3344	3334	3318	3177	1656
2013	2014	2015	2016	2017	2018
AÑO					

Figura 17. Evolución del número de publicaciones de extracción en fase sólida en los últimos cinco años.

Como se puede apreciar en la primera línea del tiempo, el número de publicaciones de extracción líquido-líquido en los últimos cinco años ha aumentado, estando aproximadamente en torno a unos 6.600 al año. Sin embargo en la segunda línea del tiempo, donde queda reflejado el número de publicaciones de la extracción en fase sólida de los últimos cinco años, queda plasmado que no ha habido un gran crecimiento de un año para otro, estando la cifra en torno a 3.200 artículos al año, y que además el número de artículos que aparecen de esta última es la mitad que los que emplean la técnica de extracción líquido-líquido.

A pesar de que la extracción en fase sólida presenta ventajas frente a la extracción líquido-líquido, el número de publicaciones de esta última es mayor, observándose en los artículos encontrados que en los últimos años hay una tendencia a la utilización de la extracción líquido-líquido operando a microescala, lo que reduce la cantidad de disolventes empleados.

La Tabla 6 muestra en orden cronológico algunas publicaciones encontradas en los últimos 5 años donde se incluyen aplicaciones de las distintas técnicas de extracción al análisis de alimentos, muestras biológicas y plantas. La tabla recoge la muestra analizada, el analito determinado o fracción estudiada, la técnica usada para la preparación de la muestra, la aplicación y la referencia bibliográfica. Se observa que los analitos son variados e incluyen tanto compuestos individuales como fracciones de compuestos.

Tabla 6. Agrupación de diferentes trabajos experimentales de los últimos cinco años que emplean diferentes técnicas de extracción.

MUESTRA	ANALITO/ FRACCIÓN	TÉCNICA DE EXTRACCION	APLICACIÓN	REFERENCIA
Sangre	Cocaína	Extracción líquido-líquido	Determinación de cocaína, metabolitos y un biomarcador de crack de cocaína	(Takitane et al., 2018)
Orina	Tirostáticos	Extracción líquido-líquido y en fase solida	Determinación de tirostáticos	(Tölgyesi et al., 2018)
Raíz de cúrcuma	Aceite de cúrcuma	Extracción fluidos supercríticos	Optimización del proceso de extracción	(Priyanka y Khanam, 2018)
Achillea lycaonica	Compuestos fenólicos y flavonoides	Extracción solido-líquido (Soxhlet)	Efectos antioxidantes y antimicrobianos de Achillea lycaonica	(Taşkın et al.,2018)
Dipteryx odorata	Fracciones volátiles	Extracción con fluido supercrítico y microextracción en fase sólida	Analizar el perfil volátil de Dipteryx odorata	(Bajer et al.,2018)
Agua	Materia orgánica	Extracción en fase sólida	Determinación de materia orgánica	(Yang et al.,2017)
Palma de drazno	Fracciones lipídicas	Extracción CO ₂ supercríticos y Soxhlet	Comparación de ambas técnicas	(Restrepo et al., 2016)
Té	Volátiles aromáticos	Microextracción en fase sólida en espacio de cabeza	Cuantificar volátiles aromáticos del te	(Xu et al., 2016)
Aceite de oliva	Compuestos fenólicos y pigmentos clorofílicos	Extracción líquido-líquido	Parámetros químicos del aceite de oliva	Uncu y Ozen, 2015)
Semilla de Sacha inchi	Aceite	Extracción sólido líquido (Soxhlet)	Comparación de métodos menos invasivos	(Niu et al., 2014)

5. CONCLUSIONES

- La calidad analítica afecta tanto a los resultados como a los procesos que se realizan en el laboratorio. Dentro de ellos la etapa de preparación de la muestra tiene una gran importancia ya que, por sus características, introduce variabilidad en el proceso, motivo por el que debe someterse a actividades de control en el laboratorio para asegurar la calidad de los resultados.
- Para la resolución de un problema analítico se aplica el proceso analítico general, que comienza con la selección de un método de análisis adecuado para dar respuesta al problema planteado. La primera etapa del método la forman las operaciones previas que están formadas por la toma de muestra y la preparación de la muestra, que tienen como objetivos facilitar el proceso de análisis y mejorar y optimizar las posibilidades analíticas.
- Las operaciones a realizar para preparar la muestra pueden ser muy numerosas y diversas y van a depender del tipo de análisis implicado, del estado de agregación, naturaleza y disponibilidad de la muestra, y de la concentración y número de analitos a determinar. Dentro de ellas se encuentran tanto las relacionadas con el pretratamiento de la muestra como las que corresponden a la preparación para la medida.
- Uno de los procesos más utilizados para la determinación de analitos orgánicos son los procesos de extracción, que permiten aislar el analito de interés de la matriz de la muestra y, en algunos casos, preconcentrarlo. Los procedimientos de extracción líquido-líquido, sólido-líquido, con fluidos supercríticos, con agua subcrítica, en fase de vapor, en fase sólida y sólido-sólido se han revisado en el trabajo.
- Se ha evaluado la frecuencia de aplicación de las técnicas de extracción en los últimos cinco años y su evolución en el tiempo, realizándose una amplia revisión bibliográfica. La técnica más utilizada es la extracción líquido-líquido que tiende a utilizarse a nivel de microescala para minimizar los riesgos de la utilización de disolventes orgánicos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- AENOR. Manual práctico de calidad en los laboratorios. Enfoque ISO 17025 [en línea]. 1ª ed. Madrid: 2005. [Consultado en Marzo 2018]. Disponible en: www.aenor.es/aenor/descargafichero.asp?tipo=pub®istro=12294&archivo=1
- Anderson R. Sample Pretreatment and Separation. New York : John Wiley & Sons Ltd; 2008.
- Bajer T, Surmová, S, Eisner, A, Ventura, K, Bajerová P. Use of simultaneous distillation-extraction, supercritical fluid extraction and solid-phase microextraction for characterisation of the volatile profile of *Dipteryx odorata*. *Industrial Crops and Products*.2018; 119: 313-321
- Cámara C, Fernández P, Martín-Esteban A, Pérez-Conde C, Vidal M. Toma y tratamiento de muestras. 1ªed. Madrid: Síntesis SA; 2004.
- Campañó Beltrán R, Ríos Castro A. Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos. 1ª ed. Madrid: Síntesis SA; 2002.
- Cela R, Lorenzo RA, Casais MC. Técnicas de separación en Química Analítica. Madrid: Síntesis SA; 2002.
- Luque de Castro M.D, Valcárcel M, Tena M.T. Extracción con fluidos supercríticos en el proceso analítico. 1ª ed. Barcelona: Reverté; 1993.
- Miller JN y Miller JC. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª ed. Madrid: Ed. Prentice-Hall; 2002.
- Ministerio de la presidencia y para las administraciones territoriales. Gobierno de España. Real Decreto 1369/2000, de 19 de julio, por el que se modifica el Real Decreto 822/1993, de 28 de mayo, por el que se establecen los principios de buenas prácticas de laboratorio y su aplicación en la realización de estudios no clínicos sobre sustancias y productos químicos. 2000 [en línea]. [Consultado en Marzo 2018]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2000-13702>
- Morales MT, Aparicio-Ruiz R, Aparicio R. Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. En: Harwood J, Aparicio R. (Eds.). *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* 2nd ed. New York: Springer. 261-310; 2013.
- Niu, L, Li, J., Chen, M.-S., Xu, Z.-F. Determination of oil contents in *Sacha inchi* (*Plukenetia volubilis*) seeds at different developmental stages by two methods: Soxhlet extraction and time-domain nuclear magnetic resonance. *Industrial Crops and Products*.2014; 56: 187-190.
- OECD. Better Policies for better lives. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice (GLP) and Compliance Monitoring. 1998 [en línea]. [Consultado en Marzo 2018]. Disponible en:

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliancemonitoring.htm>

- Prichard E, Barwick V. Quality Assurance in Analytical Chemistry. New York: John Wiley & Sons. ; 2007.
- Priyanka M, Khanam S. Influence of operating parameters on supercritical fluid extraction of essential oil from turmeric root. Journal of Cleaner Production .2018; 188: 816-824.
- Restrepo J., Estupiñán J.A., Colmenares A.J. Comparative study of lipid fractions from *Bactris gasipaes* Kunth (Peach palm) obtained by soxhlet and supercritic CO₂ extraction. Revista Colombiana de Química. 2016; 45(1): 5-9
- Sabater J, Vilumara A. Las buenas prácticas de laboratorio. 1ª ed. Madrid: Díaz de Santos; 1988.
- Takitane J, Leyton V, Andreuccetti G, Gjerde H, Vindenes V, Berg T. Determination of cocaine, metabolites and a crack cocaine biomarker in whole blood by liquid-liquid extraction and UHPLC-MS/MS. forsciint. 2018; 289:165-174.
- Taşkın T, Taşkın D, Rayaman, E, (...), Süzgeç-Selçuk S., Arabacı, A.T. Characterization of the biological activity and phenolics in *Achillea lycanica*. Analytical Letters 2018; 51(1-2): 33-48
- Tölgyesi Á, Giri A, Barta E, McDonald TJ, Sharma VK. Determination of Thyreostats in Urine Using Supported Liquid Extraction and Mixed-Mode Cation-Exchange Solid-Phase Extraction: Screening and Confirmatory Methods. J Chromatogr Sci. 2018; 637: 828-837.
- Uncu O, Ozen B. Prediction of various chemicals parameters of olive oils with Fourier transform infrared spectroscopy. LWT-Food Sci. Technol. 2015; 63: 978-984.
- UNE-EN ISO 8402:1994. Gestion de la calidad y aseguramiento de la calidad. Vocabulario. Madrid: AENOR; 1994.
- UNE-EN ISO 17025:2005. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Madrid: AENOR; 2005.
- UNE-EN ISO 9000:2015. Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario. Madrid: AENOR; 2015.
- Valcárcel Cases M, Silva Rodríguez M. Teoría y práctica de la extracción líquido-líquido. 1ª ed. Madrid: Alhambra;1984.
- Valcárcel M, Lendl B. Analytical chemistry at the interface between metrology and problem solving. TrAC - Trends in Analytical Chemistry. 2004; 23: 527-534.
- Valcárcel M. Principios de química analítica. 1ª ed. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica, S.A; 1999.

- VERTEX technics. Análisis y preparación de muestras. [en línea]. [Consultado en Febrero 2018]. Disponible en: <http://www.vertex.es/analitica/dionex-ase-350/>
- Xu Y.-Q., Wang, C, Li C.-W., (...), Li, L.-W., Jiang D.-H. Characterization of Aroma-Active Compounds of Pu-erh Tea by Headspace Solid-Phase Microextraction (HS-SPME) and Simultaneous Distillation-Extraction (SDE) Coupled with GC-Olfactometry and GC-MS. Food Analytical Methods. 2016; 9(5): 1188-1198.
- Yang K, Zhang Y, Dong Y, Li W. Selectivity of solid phase extraction for dissolved organic matter in the hypersaline da Qaidam Lake, China. Science of the Total Environment ;2017 636: 632-640