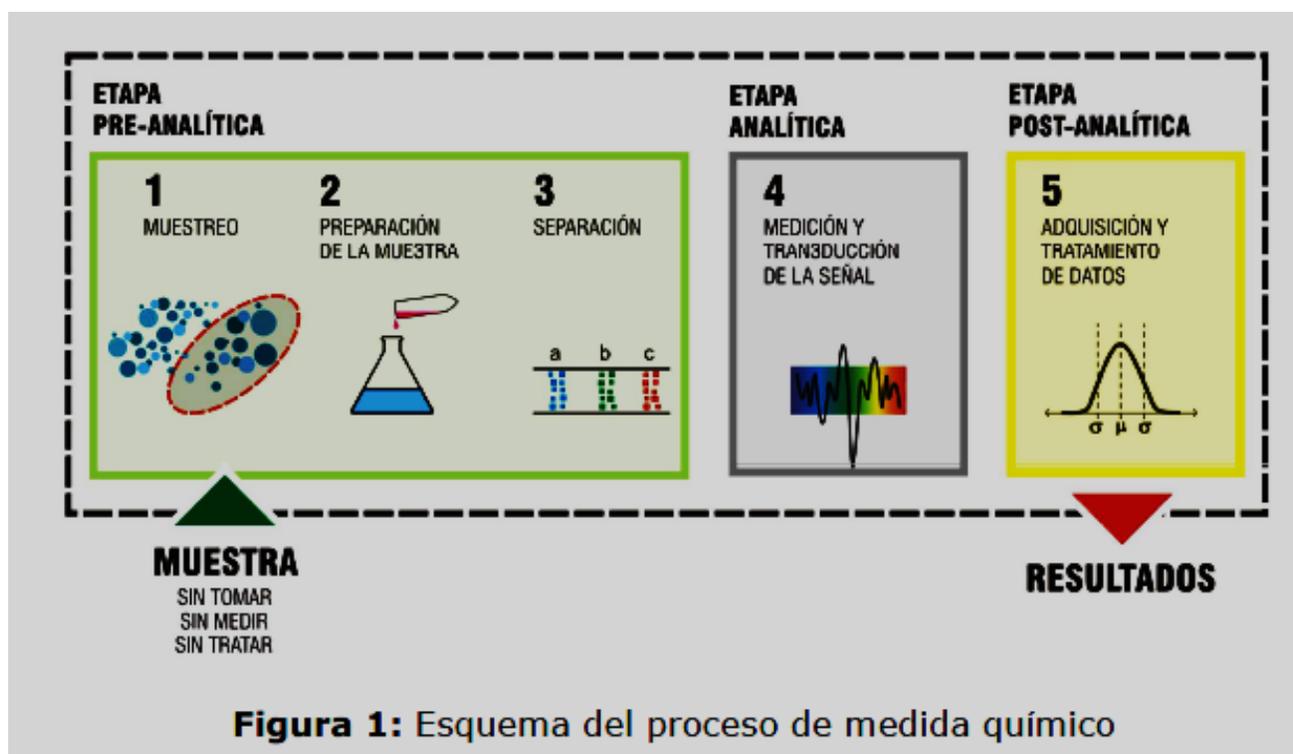


ETAPA PRE-ANALÍTICA: TRATAMIENTO PREVIO DE LA MUESTRA

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El proceso de medida químico (PMQ), como parte del proceso analítico total (PAT) está dividido en tres etapas generales:

1. **Etapa pre-analítica:** (también llamada operaciones previas o etapa preparativa de muestra) que incluye *el acondicionamiento de la muestra* y la *separación* de los analitos de sustancias interferentes.
2. **Etapa analítica:** mediante instrumental analítico específico se intenta detectar, identificar y cuantificar el o los analitos de interés.
3. **Etapa post-analítica** donde se realiza la interpretación de los resultados y *el tratamiento estadístico de los datos*.



Etapa pre-analítica

El objetivo de la etapa pre-analítica es adecuar la muestra para su posterior medición en la etapa analítica, es decir, generar las condiciones que permitan la obtención de una muestra óptima para análisis.

Preparación de la muestra

En la actualidad, la preparación de la muestra es la etapa del análisis que lleva más tiempo, está más expuesto a errores y requiere de mayor trabajo en el laboratorio.

En la elección del proceso para la preparación de la muestra se aplican cinco principios generales:

1. Debe realizarse sin perder ninguno de los analitos. La cantidad de analito que queda disponible para el ensayo (luego del acondicionamiento de muestra) en relación a la cantidad presente en la muestra original (sin procesar) se designa como **recuperación o rendimiento** del procedimiento.
2. Debe incluir la transformación del analito a la mejor forma química para el método de ensayo que va a emplearse.
3. Puede incluir, en ciertos casos, la eliminación eficiente de la mayor cantidad de compuestos interferentes presentes en la matriz (muestra original).

Cuando el método de ensayo está menos expuesto a interferencias, se dice que tiene mayor **especificidad**. Es por esto que en la etapa analítica se optará por los ensayos que presenten mejor especificidad porque ello simplificará considerablemente las etapas preparativas de la etapa pre-analítica.

4. Debe realizarse sin agregar nuevas interferencias que pueden proceder de los reactivos o del material de vidrio o dispositivos utilizados.
5. Puede incluir, en caso necesario, la dilución o concentración de los analitos para que sus concentraciones queden dentro del mejor intervalo para el método que se aplica.

Cada método de ensayo tiene un intervalo de concentración óptimo; fuera de ese intervalo los resultados del análisis pueden ser erráticos.

Ya en el contexto de la **etapa analítica**, se debe incrementar el **potencial de automatización del instrumental** para minimizar los procesos manuales y la variabilidad (baja reproducibilidad) entre los ensayos y para utilizar el instrumento en su máxima capacidad (reducción del tiempo de operación entre ensayo y ensayo).

Es indispensable que el método sea **robusto y reproducible**, es decir, que sea independiente de las variaciones de la matriz de la muestra. También debe ser **económico**, ya que, si se requiere de material, instrumentación, reactivos o solventes específicos, se incrementarán significativamente los costos globales del proceso.

Sumado a esto, el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos produce contaminación medioambiental y el uso de reactivos químicos nocivos implica riesgos para la salud del analista.

Entre otros lineamientos generales que se utilizan en la elección del mejor proceso para el tratamiento de la muestra, destacan los siguientes:

- Eliminar o al menos reducir el consumo de reactivos, particularmente de solventes orgánicos en los procesos analíticos.
- Reducir la emisión tanto de vapores y gases, como la generación de residuos líquidos y de sólidos en los laboratorios analíticos.
- Eliminar reactivos de alta toxicidad y/o ecotóxicos de los procesos analíticos.
- Favorecer el uso de material reutilizable, minimizando el uso de material desechable.

Preconcentración de analitos

Cada método de análisis tiene un intervalo de concentración óptima y para la optimización de la concentración en la etapa pre-analítica se deberá tener en cuenta el límite de detección del ensayo y el intervalo de concentración de trabajo.

Con estas consideraciones se logra la mayor precisión y la mayor exactitud en el ensayo.

El proceso de preconcentración (inserto en la etapa pre-analítica) incrementa la concentración de analitos antes del ensayo (etapa analítica), este proceso puede llevarse a cabo mediante técnicas de extracción líquido-líquido, microextracción en fase líquida, extracción en fase sólida, microextracción en fase sólida, entre otras.

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)

La EFS se basa en la partición de los compuestos entre una fase líquida (muestra) y una fase sólida (extractante) gobernada por fuerzas intermoleculares entre ambas fases.

Los compuestos a ser extraídos deben tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra (fase líquida). La retención puede involucrar fuerzas polares, no-polares y de intercambio iónico.

El analito retenido es posteriormente eluído con un pequeño volumen de solvente de elución proporcionando extractos altamente concentrados.

La EFS es la técnica más usual en el pretratamiento muestras antes de su análisis por técnicas instrumentales como por ejemplo HPLC (Cromatografía Líquida de alto Rendimiento), GC (Cromatografía en fase Gaseosa), entre otras.

Es útil para realizar la extracción de los solutos de interés, es decir el aislamiento desde la muestra original y la preconcentración de esos solutos ya separados.

La fase sólida, fase estacionaria o material adsorbente puede presentarse en diferentes configuraciones: *Compactadas en discos*, *Empacadas en cartuchos* o *Recubriendo una fibra (micro-extracción en fase sólida)*.

1. Extracción en fase sólida en cartuchos (EFSC)

El relleno es de silicagel con modificación química de la superficie expuesta o de distintos polímeros y se empaca dentro de cartuchos.

La correcta elección del adsorbente se hará en función de la estructura y propiedades fisicoquímicas del analito que se desea extraer (en particular la polaridad y la presencia de determinados grupos funcionales) y de las características de los componentes de la muestra.

Entendiendo la interacción intermolecular entre los interferentes presentes en la muestra, el analito de interés y el material adsorbente, se puede optimizar la separación.

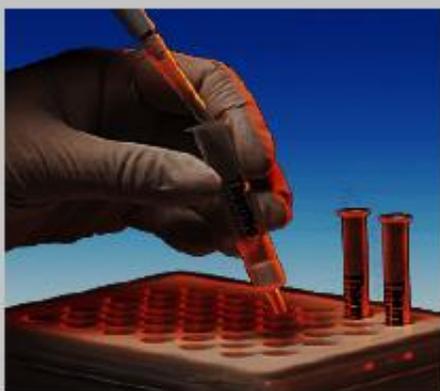


Figura 2: Cartuchos comerciales para la extracción en fase sólida.

La EFS puede utilizarse:

a) Para retener al analito de interés, permitiendo que las interferencias (los componentes de la matriz distintos de los solutos de interés) pasen a través de la columna (elevada constante de afinidad del analito con el adsorbente).

b) Para retener las interferencias, permitiendo que los compuestos de interés pasen a través de la columna disueltos en la fase acuosa de la muestra (elevada constante de afinidad de las interferencias con el adsorbente).

Existen tres tipos de mecanismos para la extracción en fase sólida: fase reversa, fase normal e intercambio iónico. La diferencia entre estos mecanismos radica en las distintas interacciones posibles entre los grupos funcionales de los analitos o solutos y los de la fase sólida.

Mecanismos de extracción en fase sólida

Fase reversa: Las retenciones en fase reversa implican matrices polares o moderadamente polares (usualmente fases líquidas como el agua) y una fase estacionaria no polar.

Las Fases Estacionarias que más se utilizan son las de Carbono 8 (octilo) y Carbono 18 (octadecilo), pero también se emplean adsorbentes poliméricos.

Para romper las interacciones intermoleculares entre el soluto retenido en la superficie de la fase fija (proceso que se denomina ELUCION) se utiliza un solvente no polar o poco polar.

En este tipo de mecanismo, el objeto es retener al analito de interés, por lo cual el pH de la muestra debe ajustarse para que los solutos no tengan carga neta, es decir estén en su forma neutra.

Fase normal: Las retenciones en fase normal implican analitos polares en matrices no polares o medianamente polares (acetona, solventes clorados y hexano) y fase estacionaria polar.

Se utilizan grupos funcionales polares unidos a la sílicagel (–CN, –NH₂, –Dioles).

Un compuesto adsorbido por este mecanismo se eluye mediante un solvente más polar que la matriz original (donde estaban contenidos los solutos de interés).

Metodología experimental para la extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida es un proceso que implica **cinco pasos** fundamentales:

Paso 1: Seleccionar una fase estacionaria apropiada.

Comercialmente se dispone de tamaños variables de cartuchos, que difieren en la cantidad de relleno, influyendo en su **capacidad** para retener al analito.

La *capacidad* está definida como la cantidad de analito que puede retenerse en el cartucho.

La capacidad típica de retención de un adsorbente polar o no polar, (por ejemplo, silicagel químicamente modificada) es menor al 1 % de la masa del adsorbente y ocasionalmente puede alcanzar el 5 %.

Paso 2: Acondicionar la Fase Estacionaria

Mediante solvatación se prepara al adsorbente para que la interacción con los analitos sea reproducible. La solvatación es el proceso de atracción y asociación de moléculas de un solvente con moléculas o iones de un soluto.

Para extracción en fase reversa se acondiciona pasando un volumen apropiado de agua, seguido por un volumen de un solvente orgánico miscible en agua (por ejemplo, metanol). Por último, se adiciona una solución reguladora acuosa para ajuste del pH.

Paso 3: Transferir la muestra al cartucho de extracción.

La cantidad de muestra disponible puede estar comprendida en un rango muy extenso, desde pocos microlitros a varios litros, pero es una condición esencial que esté en una forma compatible con el sistema de EFS.

Para favorecer la retención del analito en el adsorbente y para facilitar el flujo y distribución de la muestra en todo el relleno, es necesario que la muestra esté limpia, es decir, sin partículas ni materiales en suspensión y libre de todo tipo de material interferente.

Por este motivo, para muestras complejas es necesario realizar un paso previo de acondicionamiento, que puede consistir en un proceso de desnaturalización previa de macromoléculas biológicas (proteínas, hidratos de carbono, lípidos, etc.)

La muestra debe pasarse, a través del cartucho, con una velocidad de flujo apropiada, de lo contrario se puede ver afectada la retención de ciertos compuestos.

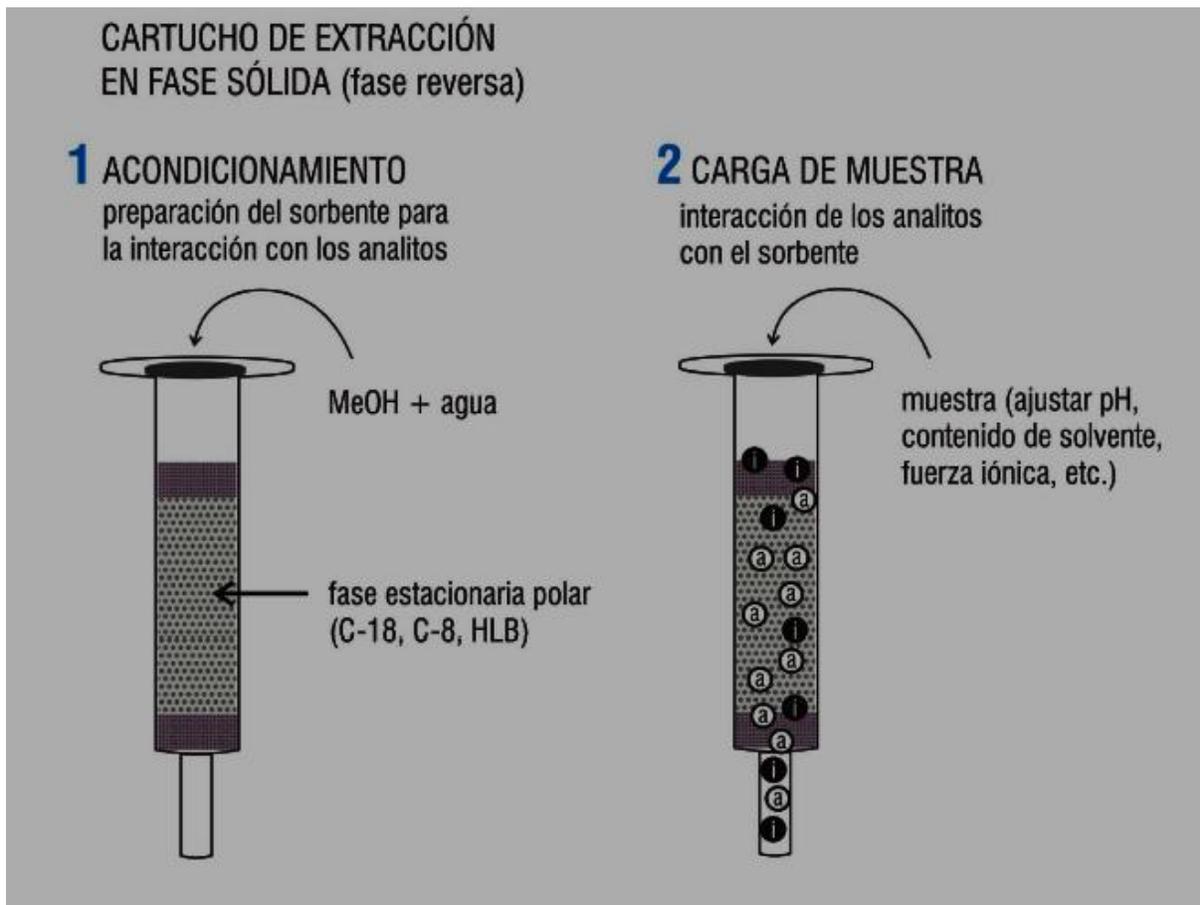
Paso 4: Lavar el empacado.

Si el mecanismo de EFS implica la retención del compuesto de interés, el lavado deberá eliminar los compuestos no deseados o retenidos débilmente. Para ello, se debe utilizar el mismo solvente en el que está disuelta la muestra o alguna otra solución que no elimine el analito de interés. En general, se necesita no más del volumen total del cartucho.

Paso 5: Eluir el compuesto de interés.

Para la elución del analito retenido se utiliza una solución que rompa las interacciones entre el analito y el adsorbente. El eluido se colecta para su posterior análisis.

Para que la elución sea más eficiente es conveniente utilizar dos alícuotas de volumen de solvente, en vez de una sola. La eficiencia es óptima con tiempos de contacto entre el solvente de elución y la fase estacionaria de 20 a 60 segundos.



3 LAVADO

eliminación compuestos no
deseados o retenidos débilmente



4 ELUCIÓN

se rompen las interacciones
analito-sorbente



Figura 3: Secuencia para la extracción en fase sólida. Ejemplo para fase reversa.