

*Desarrollo de nuevas estrategias analíticas  
basadas en técnicas separativas  
acopladas a metodologías de  
pre-concentración y modelado quimiométrico  
para el análisis de fármacos y sus metabolitos  
en muestras complejas*

Luciana  
**VERA CANDIOTI**

Tesis Doctoral, 2008

Dr. Alejandro **OLIVIERI**  
Director de Tesis

Dr. Héctor **GOICOECHEA**  
Co-director

FACULTAD DE BIOQUÍMICA  
Y CIENCIAS BIOLÓGICAS

**UNL**

UNIVERSIDAD NACIONAL  
DEL LITORAL

CÁTEDRA DE  
QUÍMICA ANALÍTICA I



Laboratorio de Desarrollo  
Analítico y Quimiometría

A mis padres *Graciela y Juan*

A mis hermanos *Ceci y Nico*

A mi abuela *Miryan*

A mis sobrinos *Nico y Lucía*

A *Javier*, al que elegí  
como compañero de mi vida.

**Porque le dan sentido a mi VIDA, porque los AMO.**

## **Quiero agradecer**

A Héctor Goicoechea, quien, al compartir conmigo su alto nivel científico, fue perfeccionando mis escasos conocimientos en el campo de la investigación y generando en mí un notorio crecimiento profesional y personal, junto a la adquisición de conocimientos y experiencia que sin duda me acompañarán en cualquier actividad o tarea futura que emprenda. Por sus sabios consejos y ante todo por su inagotable paciencia.

A Alejandro Olivieri, por permitirme realizar la tesis doctoral bajo su dirección, por su generosa predisposición al ofrecerme todos los elementos necesarios para concluir el trabajo y, fundamentalmente, por brindarme en todo momento su sabiduría.

A Fernando Benavente, por darme la posibilidad de trabajar en el grupo de bioanálisis de la Universidad de Barcelona. Por todo lo que me permitió aprender de él, por enseñarme algunos secretos de la electroforesis capilar, por su calidad profesional y fundamentalmente humana.

A María Martínez Galera y a María Dolores Gil García, quienes fueron una parte fundamental en el desarrollo de este trabajo de tesis, por su orientación, apoyo y estímulo constante. Gracias por recibirme cálidamente en el Departamento de Hidrogeología y Química Analítica en la Universidad de Almería.

A Ricardo Grau y a María Inés Cabrera, por su gran generosidad y buena predisposición al permitirme realizar el trabajo experimental de mi tesis en el laboratorio de Química Fina, facilitando el desarrollo de la misma. Por su trato cordial y ameno.

A mis compañeros, jóvenes científicos, de Química Analítica I y Química Fina, porque fue muy grato compartir con ellos el ámbito de trabajo, porque siempre me brindaron su colaboración y apoyo durante la etapa que aquí concluye.

A Julia, por interesarse constantemente en la evolución de mi trabajo, por su colaboración desinteresada, por brindarme palabras de aliento, siempre.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el apoyo recibido durante el desarrollo de esta tesis.

*“Hay una fuerza motriz más poderosa que  
el vapor, la electricidad y la energía atómica...  
... la voluntad ”*

Albert **EINSTEIN**

La presente tesis dio lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a reuniones científicas:

### **Publicaciones**

1. *Chemometric resolution of fully overlapped CE peaks: Quantitation of carbamazepine in human serum in the presence of several interferences.*

Luciana Vera-Candioti, María J. Culzoni, Alejandro C. Olivieri, Héctor C. Goicoechea. *Electrophoresis* 29 (2008) 4527-4537.

2. *Chemometric assisted solid-phase microextraction for the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river water by liquid chromatography–diode array detection.*

Luciana Vera-Candioti, M.D. Gil García, M. Martínez Galera y Héctor C. Goicoechea. *Journal of Chromatography A*, 1211 (2008) 22–32

3. *Multiresponse simultaneous optimization applied to epinastine determination in human serum by using capillary electrophoresis.*

Luciana Vera Candioti, Alejandro C. Olivieri and Héctor C. Goicoechea. *Analítica Chimica Acta* 595 (2007) 310-318.

4. *Chemometric tools improving the determination of anti-inflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection*

M.D. Gil García, F. Cañada Cañada, M.J. Culzoni, L.Vera-Candioti, G.G. Siano, H.C. Goicoechea and M. Martínez Galera. En preparación para ser enviado a la revista *Journal of Chromatography A*.

## **Reuniones científicas**

1. *Annual Meeting of the Federation for Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies (FACSS 2008)*. Reno, NV, Estados Unidos de América, 28 de septiembre al 2 de octubre de 2008. Exposición oral. "Chemometric resolution of fully overlapped CE peaks: Quantitation of carbamazepine in human serum in the presence of several interferences". H.C. Goicoechea, L. Vera-Candioti, M.J. Culzoni, A.C. Olivieri.

2. *II Congreso Iberoamericano, IV Congreso Argentino de Química Analítica*. Buenos Aires, Argentina del 27 al 30 de agosto de 2007. Presentación de poster: "Determinación de antibióticos en aguas residuales y muestras biológicas"

3. *Décimo Encuentro de Jóvenes Investigadores de la UNL – Primer Encuentro de Jóvenes investigadores de Universidades de Santa Fe*. Santa Fe del 25 al 26 de octubre de 2006. Presentación de poster: "Determinación de Epinastina en suero humano mediante electroforesis capilar. Aplicación de métodos quimiométricos para la optimización de las condiciones experimentales".

4. *10<sup>th</sup> International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry*. Aguas de Lindoia-SP, Brasil del 10 al 15 de septiembre de 2006. Presentación de Poster: "Multiresponse simultaneous optimization applied to epinastine determination in human serum by using capillary electrophoresis".

5. *Congreso de Química Analítica*. Merlo- San Luis, del 1 al 4 de noviembre de 2005. Presentación de poster: "Alternativas para la separación de Carbamazepina de su metabolito principal en suero humano mediante electroforesis capilar asistida por distintos surfactantes"

6. *13<sup>o</sup> Encuentro Nacional del Química Analítica / 1<sup>o</sup> Congreso Ibero-Americano de Química Analítica*. Universidad Federal Fluminense, Niteroi RJ del 12 al 16 de septiembre de 2005. Presentación de Poster: "Diferentes estrategias analíticas aplicadas al control de calidad de fármacos. Uso de quimiometría en espectroscopía UV y Electroforesis capilar".

## DESARROLLO TEÓRICO

<b>1 INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2 PROCESO ANALÍTICO</b>	1
<b>2.1 Preparación de la muestra</b>	2
<b>2.1.1 Elección del método para preparación de la muestra</b>	2
<b>2.1.2 Recuperación del analito</b>	3
2.1.2.1 Propiedades fisicoquímicas de la matriz	4
2.1.2.2 Propiedades fisicoquímicas del analito	4
2.1.2.3 Interacciones químicas entre la matriz y los analitos	4
<b>2.2 Análisis de fármacos en muestras biológicas</b>	5
<b>2.3 Implicancias en el análisis de drogas en matrices biológicas</b>	6
<b>3 ELECTROFORESIS CAPILAR</b>	7
<b>3.1 Definición</b>	7
<b>3.2 Metodología</b>	7
<b>3.3 Problemas asociados a la baja sensibilidad en la detección</b>	9
<b>3.3.1 Volumen inyectado de muestra</b>	9
3.3.1.1 Inyección hidrodinámica	9
3.3.1.2 Inyección electrocinética	10
<b>3.3.2 Sistema de detección y Paso óptico</b>	11
<b>3.4 Estrategias para mejorar la sensibilidad</b>	12
<b>3.4.1 Sistemas de detección</b>	13
3.4.1.1 Detectores	13
3.4.1.2 Derivatizaciones químicas	13
3.4.1.3 Modificación de la instrumentación	13
3.4.1.3.1 Capilares de paso de luz extendida	14
3.4.1.3.2 Celdas de alta sensibilidad	15
<b>3.4.2 Pre-concentración dentro del capilar. Métodos electroforéticos</b>	15

3.4.2.1 Apilamiento de muestra	16
3.4.2.1.1 Metodología experimental para inyección hidrodinámica	17
3.4.2.1.2 Metodología experimental para inyección electrocinética	19
3.4.2.2 <i>Sweeping</i>	21
3.4.2.3 Isotacoforesis	21
3.4.2.4 Limitaciones para la aplicación de los métodos electroforéticos	22
<b>3.4.3 Métodos para el acondicionamiento de muestras</b>	<b>22</b>
3.4.3.1 Precipitación	22
3.4.3.2 Centrifugación y Filtración	23
<b>3.4.4 Pre-concentración fuera del capilar</b>	<b>23</b>
3.4.4.1 Extracción líquido-líquido (ELL)	23
3.4.4.1.1 Fundamento de la extracción	24
3.4.4.1.2 Metodología de la extracción	25
3.4.4.2 Microextracción en fase líquida (MEFL)	25
3.4.4.3 Extracción en fase sólida (EFS)	26
3.4.4.3.1 Extracción en fase sólida en discos (EFSD)	26
3.4.4.3.2 Extracción en fase sólida en cartuchos (EFSC)	27
3.4.4.3.3 Mecanismos de extracción en fase sólida para discos y cartuchos	29
3.4.4.3.4 Metodología de extracción en fase sólida para discos y cartuchos	30
3.4.4.3.5 Ventajas y Desventajas	32
3.4.4.4 Microextracción en fase sólida (MEFS)	33
3.4.4.4.1 Fundamento de la metodología de MEFS	33
3.4.4.4.2 Proceso de extracción	35
3.4.4.4.3 Proceso de desorción	41
3.4.4.4.4 Ventajas y Desventajas	42
3.4.4.5 Extracción en barra magnética (EBM)	42
<b>3.4.5 Pre-concentración mediante metodologías acopladas</b>	<b>43</b>
<b>3.4.6 Pre-concentración mediante metodologías integradas</b>	<b>43</b>
3.4.6.1 Dentro del capilar	43

3.4.6.1.1 Fases pseudos-estacionarias poliméricas	43
3.4.6.1.2 Fases estacionarias sólidas	44
3.4.6.2 Dentro del vial	45
3.4.6.3 En el sistema de renovación de la solución reguladora de corrida	45
<b>4 HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Diseño y análisis de experimentos</b>	<b>46</b>
<b>4.1.1 Introducción</b>	<b>46</b>
<b>4.1.2 Diseño experimental</b>	<b>47</b>
<b>4.1.3 Principios básicos</b>	<b>48</b>
4.1.3.1 Selección de la variable respuesta o función objetivo	49
4.1.3.2 Elección de los factores y niveles	49
4.1.3.3 Elección del diseño experimental	49
4.1.3.4 Realización del experimento	50
4.1.3.5 Análisis de datos	50
4.1.3.6 Extracción de conclusiones	51
<b>4.1.4 Diseño de Plackett-Burman</b>	<b>51</b>
4.1.4.1 Elección de los niveles	52
4.1.4.2 Suposiciones del diseño de Plackett-Burman	52
<b>4.1.5 Metodología de superficie de respuesta</b>	<b>53</b>
4.1.5.1 Diseño Central Compuesto	54
4.1.5.2 Múltiples respuestas	55
4.1.5.2.1 Metodología para el cálculo de la función deseabilidad	56
<b>4.2 Pre-procesamiento de los datos electroforéticos</b>	<b>59</b>
<b>4.2.1 Corrección de la línea de base</b>	<b>59</b>
<b>4.2.2 Corrección del corrimiento de pico</b>	<b>60</b>
<b>4.3 MCR-ALS</b>	<b>61</b>

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

<b>CAPÍTULO 1: OPTIMIZACIÓN SIMULTÁNEA DE RESPUESTAS APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE EPINASTINA EN SUERO HUMANO MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR</b>	67
<b>1.1 INTRODUCCIÓN</b>	67
1.1.1 Importancia de la determinación de epinastina en suero humano	68
<b>1.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	69
1.2.1 Equipamiento	69
1.2.2 Programas de computación	69
1.2.3 Reactivos y materiales	69
1.2.4 Acondicionamiento del capilar	70
<b>1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	70
<b>1.3.1 Extracción de epinastina a partir de comprimidos de Flurinol</b>	70
1.3.1.1 Preparación de la solución madre de epinastina	71
<b>1.3.2 Elección del modo de inyección</b>	71
1.3.2.1 Modo normal de inyección con capilar convencional	71
1.3.2.2 Modo normal de apilamiento	72
1.3.2.3 Apilamiento con acetonitrilo	72
1.3.2.4 Modo normal de apilamiento con capilar burbuja	74
1.3.2.5 Inyección electrocinética	74
1.3.2.6 Inyección electrocinética amplificada	75
<b>1.3.3 Elección del estándar interno</b>	76
<b>1.3.4 Selección de factores</b>	78
1.3.4.1 Análisis de efectos	81
1.3.4.1.1 Efecto de la concentración de la SRC	81
1.3.4.1.2 Efecto del pH	81
1.3.4.1.3 Efecto del voltaje de inyección	82
1.3.4.1.4 Efecto del voltaje de separación	83
<b>1.3.5 Optimización de la separación electroforética</b>	83
1.3.5.1 Construcción del diseño experimental	83

1.3.5.2 Modelado de las respuestas	87
1.3.5.3 Aplicación de la función deseabilidad	89
<b>1.3.6 Preparación de la muestra real</b>	<b>93</b>
<b>1.3.7 Validación del método</b>	<b>95</b>
1.3.7.1 Curvas de calibración	95
1.3.7.1.1 Estimación de los parámetros de calibración	96
1.3.7.2 Ensayos de precisión	97
1.3.7.3 Exactitud	98
1.3.7.4 Selectividad	98
1.3.7.5 Robustez	100
<b>1.4 CONCLUSIONES</b>	<b>102</b>
<b>CAPÍTULO 2: MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ASISTIDA CON MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS ANTI-INFLAMATORIAS Y ANTIEPILÉPTICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN UV.</b>	<b>103</b>
<b>2.1 INTRODUCCIÓN</b>	<b>103</b>
2.1.1 Fármacos como contaminantes emergentes	103
2.1.2 Vías de ingreso de fármacos al medio ambiente	104
2.1.3 Plantas de tratamiento de efluentes	107
2.1.4 Metodologías para la determinación de contaminantes emergentes	108
2.1.5 Preparación de la muestra	108
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>110</b>
2.2.1 Equipamiento	110
2.2.2 Programas de computación	110
2.2.3 Reactivos y materiales	110
2.2.4 Preparación de las soluciones madres y de trabajo	111
2.2.5 Preparación de la muestra	111
2.2.6 Procedimiento de MEFS	111
<b>2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>112</b>

<b>2.3.1 Optimización de la separación cromatográfica</b>	112
<b>2.3.2 Procedimiento de extracción</b>	116
2.3.2.1 Selección del modo de extracción	116
2.3.2.1 Selección del recubrimiento de la fibra	117
<b>2.3.3 Procedimiento de desorción</b>	117
2.3.3.1 Elección del modo de desorción	117
2.3.3.2 Efecto residual de los analitos	118
<b>2.3.4 Optimización del proceso de extracción</b>	118
2.3.4.1 Selección de factores	118
2.3.4.2 Análisis de efectos	122
2.3.4.2.1 Solvente de remojo	122
2.3.4.2.2 Tiempo de remojo	122
2.3.4.2.3 Período de desorción	123
2.3.4.2.4 Velocidad de agitación	123
2.3.4.2.5 Tiempo de agitación	123
2.3.4.2.6 Efecto de la temperatura	123
2.3.4.2.7 Efecto del pH	124
2.3.4.2.8 Efecto del solvente orgánico	124
2.3.4.2.9 Efecto del agregado de sal	124
2.3.4.3 Metodología de superficie de respuesta	125
2.3.4.4 Aplicación de la función deseabilidad	129
<b>2.3.5 Validación del método analítico desarrollado</b>	133
<b>2.3.6 Aplicación del método a muestras de agua de río</b>	136
<b>2.4 CONCLUSIONES</b>	138
<b>CAPÍTULO 3: RESOLUCIÓN QUIMIOMÉTRICA DE PICOS ELECTROFORÉTICOS TOTALMENTE SOLAPADOS: CUANTIFICACIÓN DE CARBAMAZEPINA EN SUERO HUMANO EN PRESENCIA DE DIVERSAS INTERFERENCIAS</b>	139
<b>3.1 INTRODUCCIÓN</b>	139

<b>3.1.1 Importancia de determinar CBZ en suero humano</b>	140
<b>3.1.2 Métodos empleados para su detección</b>	140
<b>3.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	141
<b>3.2.1 Equipamiento</b>	141
<b>3.2.2 Programas de computación</b>	142
<b>3.2.3 Reactivos y materiales</b>	142
<b>3.2.4 Acondicionamiento del capilar</b>	143
<b>3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	144
<b>3.3.1 Desarrollo del método analítico</b>	144
<b>3.3.2 Extracción de CBZ y CBZ-EP del suero</b>	145
3.3.2.1 Precipitación de las proteínas e inyección del sobrenadante	145
3.3.2.2 Precipitación de las proteínas y extracción en fase sólida	147
3.3.2.3 Extracción líquido-líquido	147
3.3.2.3.1 Con precipitación proteica	147
3.3.2.3.2 Sin precipitación proteica	148
3.3.2.4 Procedimiento de extracción final para CBZ y CBZ-EP	148
<b>3.3.3 Calibración univariada y cifras de mérito</b>	149
3.3.3.1 Construcción de las curvas de calibración	149
3.3.3.1.1 Medición de las respuestas de las soluciones de calibración	150
3.3.3.1.2 Estimación de los parámetros de regresión	150
3.3.3.1.3 Análisis de regresión para CBZ y CBZ-EP	152
3.3.3.2 Estimación de la recuperación de CBZ y CBZ-EP del suero	153
3.3.3.4 Estudio de interferencias	154
<b>3.3.4 Aplicación de herramientas quimiométricas</b>	156
3.3.4.1 Diseño de los juegos de calibración y validación	156
3.3.4.2. Corrección de la línea de base y de los tiempos de migración	158
3.3.4.3 Análisis multivariado	161
<b>3.4 CONCLUSIONES</b>	164

<b>CAPÍTULO 4: ALTERNATIVAS PARA LA PRE-CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR</b>	165
<b>4.1 INTRODUCCIÓN</b>	165
<b>4.1.1 Usos y abusos de los antibióticos</b>	165
<b>4.1.2 Contaminación de la leche con antibióticos</b>	166
4.1.2.1 Principios farmacológicos	166
4.1.2.2 Vías de contaminación de la leche	167
4.1.2.3 Importancia en la salud pública	167
4.1.2.4 Problemas tecnológicos	167
4.1.2.5 Regulaciones sanitarias	168
<b>4.1.3 Importancia de la detección de antibióticos en leche</b>	170
<b>4.1.4 Métodos para la detección de residuos de antibióticos en leche</b>	170
<b>4.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	171
<b>4.2.1 Equipamiento</b>	171
<b>4.2.2 Programas de computación</b>	172
<b>4.2.3 Reactivos y materiales</b>	172
<b>4.2.4 Preparación de las soluciones madres y de trabajo</b>	172
<b>4.2.5 Acondicionamiento del capilar</b>	173
<b>4.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	173
<b>4.3.1 Selección de los antibióticos a estudiar</b>	173
<b>4.3.2 Análisis electroforético</b>	175
4.3.2.1 Análisis de interferencias	176
<b>4.3.3 Selección de factores</b>	177
4.3.3.1 Análisis de efectos	179
4.3.3.1.1 Efecto de los factores sobre la resolución	179
4.3.3.1.2 Efecto de los factores sobre el tiempo de análisis	180
4.3.3.1.3 Efecto de los factores sobre la corriente	181
<b>4.3.4 Optimización de la separación electroforética</b>	181
4.3.4.1 Construcción del diseño experimental	181

4.3.4.2 Modelado de las respuestas	183
4.3.4.3 Aplicación de la función deseabilidad	185
<b>4.3.5 Validación del método</b>	191
4.3.5.1 Construcción de las curvas de calibración	191
4.3.5.1.1 Medición de las respuestas de las soluciones de calibración	191
4.3.5.1.2 Estimación de los parámetros de regresión	192
4.3.5.2 Precisión	192
4.3.5.3 Límites de detección y cuantificación	193
<b>4.3.6 Métodos electroforéticos para la pre-concentración de ATB</b>	194
4.3.6.1 Modo normal de apilamiento	194
4.3.6.2 Inyección de un gran volumen de muestra	195
<b>4.3.7 Métodos externos para la extracción y pre-concentración de ATB</b>	197
4.3.7.1 Extracción líquido-líquido	197
4.3.7.2 Extracción en fase sólida	199
4.3.7.2.1 Evaluación del efecto matriz del cartucho	200
<b>4.3.8 Metodologías para la extracción y pre-concentración de ATB en leche</b>	204
4.3.8.1 Metodologías propuestas en la literatura científica	204
4.3.8.2 Metodología desarrollada 1 - Extracción en fase sólida	205
4.3.8.2.1 Evaluación del efecto del TCA	206
4.3.8.3 Metodología desarrollada 2 - Extracción líquido-líquido combinada con extracción en fase sólida	209
4.3.8.3.1 Ensayos de recuperación de ATB	209
4.3.8.3.2 Límites de detección y cuantificación	213
<b>4.4 CONCLUSIONES</b>	214
<b>CONCLUSIONES GLOBALES</b>	215
<b>REFERENCIAS</b>	218

## DESARROLLO TEÓRICO

<b>Figura 3.1:</b> <i>Cassette</i> del equipo de electroforesis capilar Agilent Technologies donde se indica el <i>inlet</i> , <i>outlet</i> y la interfase para la detección (figura extraída de la guía de capilares, reactivos y consumibles para EC de Agilent Technologies).	8
<b>Figura 3.2:</b> Equipo de electroforesis capilar Agilent Technologies (figura extraída de la guía de capilares, reactivos y consumibles para EC de Agilent Technologies).	11
<b>Figura 3.3:</b> Técnicas disponibles en la literatura para el aumento de la sensibilidad de la electroforesis capilar.	12
<b>Figura 3.4:</b> Capilares de paso de luz extendida: Capilar burbuja (figura extraída de la guía de capilares, reactivos y consumibles para EC de Agilent Technologies).	14
<b>Figura 3.5:</b> Secuencia de migración de una banda dentro de un capilar burbuja.	14
<b>Figura 3.6:</b> Capilares de paso de luz extendida: Celda de alta sensibilidad (figura extraída de la guía de capilares, reactivos y consumibles para EC de Agilent Technologies).	15
<b>Figura 3.7:</b> Modo normal de apilamiento. Modelo para aniones.	16
<b>Figura 3.8:</b> Metodología LVSS con cambio de polaridad. Modelo para aniones.	18
<b>Figura 3.9:</b> Inyección de la muestra amplificada por el campo con inyección de una pequeña cantidad de agua.	20
<b>Figura 3.10:</b> Discos de Carbono-18 para la extracción en fase sólida.	27
<b>Figura 3.11:</b> Adaptador, discos y jeringa para la extracción en fases sólida con discos.	27
<b>Figura 3.12:</b> Cartuchos comerciales para la extracción en fase sólida.	28
<b>Figura 3.13:</b> Microjeringa comercial para la extracción en fase sólida (figura extraída de Kumazawa y col., 2003).	34
<b>Figura 4.1:</b> Superficie de respuesta tridimensional y su gráfica de contorno en donde se observa la respuesta (eje z) en función de la variable 1 y la variable 2 (plano x,y) (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).	53
<b>Figura 4.2:</b> Curvas de la función deseabilidad individual cuando se desea ajustar la respuesta a un valor fijo (T) (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).	57
<b>Figura 4.3:</b> Curvas de la función deseabilidad individual cuando se desea maximizar o minimizar una respuesta (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).	58

**Figura 4.4.** Matriz **D** formada aumentando las matrices de calibración con la matriz de la muestra incógnita. 62

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

**Figura 1.1:** Estructura química de epinastina. 67

**Figura 1.2:** Electroferograma correspondiente a un estándar de EPI (1.50 mg L<sup>-1</sup> en agua) en SRC de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 mol L<sup>-1</sup> pH 7.00, a 25 °C y 25 kV. La longitud de onda de detección fue de 200 nm y la inyección hidrodinámica se realizó a 50 mbar durante 5 s. 72

**Figura 1.3:** Electroferograma correspondiente a un estándar de EPI (0.28 mg L<sup>-1</sup> en ACN) bajo las siguientes condiciones electroforéticas: SRC de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 mol L<sup>-1</sup> pH 7.00, a 25 °C y 25 kV. La longitud de onda de detección fue de 200 nm y la inyección hidrodinámica se realizó a 50 mbar durante 30 s (línea azul). Se superpone la gráfica de la variación de corriente a lo largo de la corrida (línea roja). 73

**Figura 1.4:** Absorbancia (eje z) en función del tiempo de migración y longitud de onda (plano xy) del electroferograma correspondiente a la inyección de 0.28 mg L<sup>-1</sup> de EPI disuelta en ACN. 74

**Figura 1.5:** Electroferograma correspondiente a un estándar de EPI (0.12 mg L<sup>-1</sup> en agua acidificada) usando SRC de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 mol L<sup>-1</sup> pH 7.00, a 25 °C y 25 kV. La longitud de onda de detección fue de 200 nm y la inyección electrocinética se realizó a 6 kV durante 30 s. 75

**Figura 1.6:** Electroferograma correspondiente a un estándar de EPI (2.0 µg L<sup>-1</sup> en agua acidificada) usando SRC de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 mol L<sup>-1</sup> pH 7.00, a 25 °C y 25 kV. La longitud de onda de detección fue de 200 nm. La inyección electrocinética amplificada se realizó a 20 kV durante 20 s. 76

**Figura 1.7:** Estructura química de lidocaína. 78

**Figura 1.8:** Electroferograma correspondiente a una mezcla de EPI (7.0 µg L<sup>-1</sup>) y LID (14.0 µg L<sup>-1</sup>) en agua acidificada, bajo las siguientes condiciones electroforéticas: SRC de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.02 mol L<sup>-1</sup> pH 7.00, a 25 °C y 25 kV. La longitud de onda de detección fue de 200 nm y la inyección electrocinética se realizó a 20 kV durante 20 s. 78

**Figura 1.9:** Representación gráfica de los criterios utilizados para optimizar la resolución y el tiempo de análisis con su correspondiente peso e importancia. 90

**Figura 1.10:** Gráficas de superficie de respuesta correspondientes a la función deseabilidad en función de los siguientes pares de factores, manteniendo constantes en sus valores óptimos los factores restantes: A) concentración SRC vs. pH; B) concentración SRC vs. Vi; C) Concentración SRC vs. Vs; D) pH vs. Vi; E) pH vs. Vs y F) Vi vs. Vs. 92

<b>Figura 1.11:</b> Electroferograma correspondiente a un estándar conteniendo EPI ( $7.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y LID ( $12.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) bajo las condiciones experimentales óptimas, donde se indica el tiempo de análisis y en ancho de los picos de EPI y LID.	93
<b>Figura 1.12:</b> Secuencia de pasos para la preparación de la muestra.	94
<b>Figura 1.13:</b> Electroferograma correspondiente al extracto de suero humano conteniendo $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de EPI. Las concentraciones finales de EPI y LID luego de la preparación de la muestra fueron: $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de EPI (2.6 min) y $7.2 \mu\text{g L}^{-1}$ de LID (2.8 min).	95
<b>Figura 1.14:</b> Imágenes proporcionadas por el programa del equipo de EC correspondientes al análisis de pureza para el pico de EPI.	99
<b>Figura 2.1:</b> Rutas de exposición al medio ambiente de los diferentes tipos de fármacos.	105
<b>Figura 2.2:</b> Estructuras químicas de los analitos estudiados: A) carbamazepina, B) piroxicam, C) sulindac, D) ketoprofeno, E) naproxeno, F) diflunisal, G) indometacina y H) diclofenac.	109
<b>Figura 2.3:</b> Cromatograma de una solución estándar conteniendo $25 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito usando una fase móvil de ACN- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ $0.025 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 3.00 (A) y a pH 3.50 (B).	114
<b>Figura 2.4:</b> Esquema del programa de gradiente de flujo utilizado para el análisis cromatográfico de los ocho analitos.	115
<b>Figura 2.5:</b> Cromatograma de una solución estándar conteniendo $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada fármaco analizado a 230 nm (—) y a 254 nm (----) bajo las condiciones cromatográficas óptimas.	116
<b>Figura 2.6:</b> Gráficas de superficie de respuesta correspondientes a la función deseabilidad en función de los siguientes pares de factores, manteniendo constantes en sus valores óptimos los factores restantes: (A) tiempo de remojo–velocidad de agitación; tiempo de agitación= 43.75 min, (B) tiempo de remojo–tiempo de agitación; velocidad de agitación = 1400 rpm y (C) velocidad de agitación–tiempo de agitación; tiempo de remojo = 5 min.	131
<b>Figura 2.7:</b> Cromatograma de un estándar conteniendo $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito en solución acuosa bajo las condiciones experimentales óptimas.	132
<b>Figura 2.8:</b> Cromatograma correspondiente al extracto de una muestra de agua de río sin fortificar con analitos (----) y a un extracto de agua de río fortificada con $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada analito (—).	136
<b>Figura 3.1:</b> Estructura química de A) carbamazepina y B) carbamazepina epóxido.	139

- Figura 3.2:** Electroferograma correspondiente a la extracción de una muestra de suero conteniendo  $5.00 \text{ mg L}^{-1}$  de CBZ (línea roja) superpuesto con el extracto de un estándar de la misma concentración (línea azul) bajo las condiciones experimentales óptimas:  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  de borato de sodio pH 9.20, con un voltaje aplicado de 20 kV y una temperatura de  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ , inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 10 s y una longitud de onda de 214 nm. 149
- Figura 3.3:** Gráficas de calibración obtenida para el análisis de linealidad entre: (A) concentración de CBZ y el área de pico y (B) concentración de CBZ-EP en  $\text{mg L}^{-1}$  y el área de pico. 151
- Figura 3.4:** A) Electroferograma (recogido a 214 nm) de una solución estándar disuelta en SRC conteniendo los siguientes analitos en el siguiente orden de migración: 1) FEN; 2) CBZ, CBZ-EP, CAF y LAMO; 3) PAR; 4) PHT; 5) IBU y TEO; 6) PHB y 7) AAS. B) Electroferograma (recogido a 214 nm) de un extracto (disuelto en SRC) de suero humano fortificado con CBZ, CBZ-EP, LAMO, PHT, PHB, FEN, PAR, TEO, IBU, CAF, AAS, donde sólo se observan los analitos extraídos: CBZ, CBZ-EP y LAMO (pico 1), PHT (pico 2), IBU y TEO (pico 3) y PHB (pico 4). 155
- Figura 3.5:** A) Superficie correspondiente a una muestra de suero (SC1) fortificada con CBZ ( $4.96 \text{ mg L}^{-1}$ ), CBZ-EP ( $4.99 \text{ mg L}^{-1}$ ) y LAMO ( $5.66 \text{ mg L}^{-1}$ ). B) Matriz *background* correspondiente a la superficie de la Figura 3.4 A. 158
- Figura 3.6:** Electroferograma correspondiente a una muestra de suero (SC1–línea azul:); su correspondiente *background* (línea verde) y el electroferograma final corregido (línea roja) todos registrados a 250 nm. 159
- Figura 3.7:** Gráficas de contorno de las matrices **M** y **N**; A y B) antes del ser alineadas, C y D) Luego de ser alineadas; E) Cambio de la variancia residual (RES%) cuando la matriz estudiada se modifica con respecto a la matriz de referencia. 160
- Figura 3.8:** A) Electroferograma registrado a 250 nm para cinco estándares de CBZ, B) Electroferogramas con corrimientos corregidos registrados a 250 nm. 161
- Figura 3.9:** Perfiles temporales obtenidos del procesamiento de una muestra SB mediante MCR-ALS correspondientes a: A) los tres componentes encontrados en la matriz SB; B) estándar de CBZ-EP ( $5.00 \text{ mg L}^{-1}$ ), y C) estándar de CBZ ( $5.00 \text{ mg L}^{-1}$ ). 163
- Figura 3.10:** Perfiles espectrales obtenidos del procesamiento de una muestra SB mediante MCR-ALS correspondientes a: A) estándar de CBZ ( $5.00 \text{ mg L}^{-1}$ ), B) estándar de CBZ-EP ( $5.00 \text{ mg L}^{-1}$ ) y C) componente no esperado del suero. 163
- Figura 4.1:** Especies iónicas de CPF a diferentes pH (figura extraída de Qiang y Adams, 2004). 180

- Figura 4.2:** Gráficas de superficie de respuesta correspondientes a la función deseabilidad en función de los siguientes pares de factores, manteniendo constantes en sus valores óptimos los factores restantes: A) concentración SRC vs. pH; B) concentración SRC vs. Vs; C) concentración SRC vs. temperatura; D) pH vs. Vs; E) pH vs. temperatura y F) Vs vs. temperatura. 187
- Figura 4.3:** Electroferograma correspondiente a un estándar de 2.00 mg L<sup>-1</sup> de CLOR, CPF, AMP, TC y SMX disueltos en una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) bajo las condiciones experimentales óptimas. Respuestas: Resolución 1: 0.78, Resolución 2: 1.13, Resolución 3: 1.3, Resolución 4: 1.06, tiempo de análisis 7.3 min, corriente 95 µA. 188
- Figura 4.4:** Esquema de la disociación de sulfonamidas (figura extraída de Qiang y Adams, 2004). 189
- Figura 4.5:** Grupos funcionales de la molécula de TC que corresponden a sus respectivos pKa's (figura extraída de Qiang y Adams, 2004). 189
- Figura 4.6:** Distribución de especies de TC en función del pH (figura extraída de Qiang y Adams, 2004). 189
- Figura 4.7:** Grupos funcionales de la molécula de CPF que corresponden a sus respectivos pKa's (figura extraída de Qiang y Adams, 2004). 190
- Figura 4.8:** Distribución de especies de CPF en función del pH (figura extraída de Qiang y Adams, 2004). 190
- Figura 4.9:** Superposición entre un electroferograma de una mezcla de ATB de 0.25 mg L<sup>-1</sup> inyectada mediante 50 mbar durante 20 s (línea azul) y un electroferograma de la misma mezcla de ATB inyectada mediante 50 mbar durante 360 s y posterior remoción de la matriz (línea roja). 196
- Figura 4.10:** Electroferogramas correspondientes a la extracción líquido-líquido de 10.0 mL de una solución estándar de 0.20 mg L<sup>-1</sup> de cada ATB (línea roja: extracción con diclorometano, línea azul: extracción con éter, línea verde: estándar de 1.00 mg L<sup>-1</sup> de cada ATB sin el proceso de extracción. Los electroferogramas se registraron a 200 nm (Figura 10 A) y a 275 nm (Figura 10 B). 198
- Figura 4.11:** Electroferogramas recogidos a 200 nm correspondientes a los extractos obtenidos mediante extracción en fase sólida con cartuchos HLB (línea roja) y C-18 (línea azul) inyectados mediante la metodología LVSS. La línea verde corresponde al estándar de 1.00 mg L<sup>-1</sup> de cada ATB. 200
- Figura 4.12:** Comparación de las rectas de regresión obtenidas con las áreas de pico de los estándares extraídos (línea naranja) y de los estándares puros (línea azul) para distintos niveles de concentración de (A) CPF, (B) AMP y (C) SMX. 203

- Figura 4.13:** Electroferogramas recogidos a 200 nm y 275 nm correspondientes al extracto de ATB presentes en leche ( $5.00 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB, línea azul 200 nm; línea roja 275 nm) junto con un estándar de la misma concentración (línea verde a 200 nm) donde se visualizan los picos de los analitos detectados. 206
- Figura 4.14:** Electroferogramas correspondientes a la extracción de un estándar de ATB disuelto en TCA al 10 % eluido con una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) ( $4.00 \text{ mg L}^{-1}$  finales) y a un estándar de la misma concentración que el extracto, inyectados mediante la aplicación de 50 mbar durante 20 s y recogidos a 200 nm. 207
- Figura 4.15:** Electroferogramas recogidos a 200 nm correspondientes a extractos de distintos niveles de ATB presentes en leche junto con una muestra blanco. 208
- Figura 4.16:** Superposición de un electroferograma correspondiente a la extracción combinada ELL + EFS de 100.0 mL de una muestra de leche fortificada con  $0.10 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB (línea azul) y un electroferograma correspondiente a un estándar  $33.30 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB (línea verde) sin el proceso de extracción. 210
- Figura 4.17:** Comparación de las rectas de regresión obtenidas con las áreas de pico de los estándares puros (línea azul) y con las áreas de pico de los extractos de leche (línea naranja) para distintos niveles de concentración de (A) CLOR, (B) CPF, (C) AMP y (D) SMX. 212

## DESARROLLO TEÓRICO

<b>Tabla 3.1:</b> Recubrimientos de fibras para la MEFS disponibles en el mercado.	40
------------------------------------------------------------------------------------	----

## DESARROLLO EXPERIMENTAL

<b>Tabla 1.1:</b> Características eléctricas de las drogas utilizadas en la elección del EI y sus tiempos de migración. Condiciones electroforéticas: 0.02 mol L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.00, inyección 20 kV durante 20 s con un voltaje de separación de 25 kV.	77
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.2:</b> Combinaciones de los factores a evaluar en el diseño experimental de Plackett-Burman para la selección de factores.	79
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.3:</b> Resultados experimentales correspondientes a las experiencias realizadas en el diseño experimental de Plackett-Burman.	80
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.4:</b> Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño de Plackett-Burman.	81
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.5:</b> Comportamiento de la resolución entre EPI y LID con el cambio de pH.	82
----------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.6:</b> Diseño experimental central compuesto: Combinaciones de los factores seleccionados.	85
-------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.7:</b> Respuestas obtenidas para cada combinación de factores en el diseño central compuesto: Resolución, Tiempo de análisis y corriente.	86
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.8:</b> Resultados del ANOVA para las respuestas obtenidas en el diseño central compuesto.	88
------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.9:</b> Parámetros estadísticos correspondientes al ajuste de la resolución, el tiempo de análisis y la corriente.	89
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.10:</b> Criterios utilizados para la optimización de las respuestas, con su correspondiente peso e importancia.	90
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.11:</b> Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables relación de concentración (EPI/LID) y relación de área de pico.	96
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.12:</b> Relación de áreas obtenidas en las 6 inyecciones realizadas para el análisis de repetibilidad, para cada nivel de concentración de EPI.	97
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.13:</b> Resultados obtenidos en el análisis de recuperación de EPI de suero humano.	98
------------------------------------------------------------------------------------------------	----

<b>Tabla 1.14:</b> Combinaciones de los factores a evaluar en el diseño experimental de Plackett-Burman para el análisis de robustez.	100
<b>Tabla 1.15:</b> Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño de Plackett-Burman en el análisis de robustez.	101
<b>Tabla 2.1:</b> Propiedades y usos de los fármacos estudiados.	113
<b>Tabla 2.2:</b> Combinaciones de los factores a evaluar en el diseño experimental de Plackett-Burman para la selección de factores	119
<b>Tabla 2.3:</b> Valores de probabilidad obtenidos del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño experimental de Plackett-Burman construido para la selección de factores.	121
<b>Tabla 2.4:</b> Diseño experimental central compuesto: Combinaciones de los factores seleccionados.	126
<b>Tabla 2.5:</b> Resultados del ANOVA para las respuestas obtenidas en el diseño central compuesto.	127
<b>Tabla 2.6:</b> Valores de probabilidad obtenidos para cada coeficiente en el ajuste de respuestas en el ANOVA realizado.	128
<b>Tabla 2.7:</b> Criterios utilizados para la optimización de las respuestas, con su correspondiente peso e importancia.	129
<b>Tabla 2.8:</b> Cifras de mérito para la determinación de los compuestos farmacéuticos en agua mediante MEFS-CL-UV.	135
<b>Tabla 2.9:</b> Recuperaciones obtenidas para las muestras construidas mediante la adición de diferentes cantidades de analito a muestras reales de agua de río.	137
<b>Tabla 3.1:</b> Secuencia de lavados del capilar para los distintos momentos del análisis.	143
<b>Tabla 3.2:</b> Secuencia para la extracción de CBZ por precipitación proteica.	146
<b>Tabla 3.3:</b> Resultados de la combinación entre precipitación proteica y extracción en fase sólida.	147
<b>Tabla 3.4:</b> Concentraciones de las soluciones de calibración, expresadas en mg L <sup>-1</sup> de CBZ y CBZ-EP, utilizadas para la evaluación de linealidad en calibración univariada.	150
<b>Tabla 3.5:</b> Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico obtenidos con el programa Statgraphics Plus 5.1.	152
<b>Tabla 3.6:</b> Cantidades recuperadas de CBZ adicionada a suero humano.	153

<b>Tabla 3.7:</b> Cantidades recuperadas de CBZ-EP adicionada a suero humano.	153
<b>Tabla 3.8:</b> Composición de las muestras de validación.	157
<b>Tabla 3.9:</b> Concentraciones de las muestras de validación y resultados de la predicción mediante MCR-ALS.	162
<b>Tabla 4.1:</b> Límite máximo superior permitido de residuos de antimicrobianos en leche según el Código Alimentario Argentino, Capítulo VIII- Artículo 556 - (Res Conj. SP y RS y SAGPA N° 33/2006 y N° 563/2006) referente a alimentos lácteos.	169
<b>Tabla 4.2:</b> Secuencia de lavados del capilar para los distintos momentos del análisis.	173
<b>Tabla 4.3:</b> Usos y efectos adversos de los antibióticos seleccionados.	174
<b>Tabla 4.4:</b> Características fisicoquímicas y estructura de los antibióticos seleccionados.	176
<b>Tabla 4.5:</b> Resultados experimentales correspondientes a las experiencias realizadas en el diseño experimental de Plackett-Burman.	177
<b>Tabla 4.6:</b> Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño de Plackett-Burman.	178
<b>Tabla 4.7:</b> Diseño experimental central compuesto: Combinaciones de los factores seleccionados.	179
<b>Tabla 4.8:</b> Respuestas obtenidas para cada combinación de factores en el diseño central compuesto: resoluciones, tiempo de análisis y corriente.	182
<b>Tabla 4.9:</b> Resultados del ANOVA para las respuestas obtenidas en el diseño central compuesto.	184
<b>Tabla 4.10:</b> Criterios utilizados para optimización de las respuestas individuales, con sus correspondientes límites superior e inferior y la importancia.	185
<b>Tabla 4.11:</b> Concentraciones de las 6 soluciones de calibración, expresadas en mg L <sup>-1</sup> , utilizadas para la evaluación de linealidad.	191
<b>Tabla 4.12:</b> Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico.	192
<b>Tabla 4.13:</b> Áreas de cada ATB obtenidas por inyección de la solución de calibración 3, con su correspondiente promedio y CV % (coeficiente de variación porcentual).	193
<b>Tabla 4.14:</b> Límites de detección y cuantificación para cada ATB con su correspondiente límite máximo residual.	194

<b>Tabla 4.15:</b> Áreas obtenidas de CLOR, CPF, AMP, TC y SMX para las diferentes metodologías de inyección.	195
<b>Tabla 4.16:</b> Áreas obtenidas para diferentes concentraciones de CPF, AMP, TC y SMX inyectadas mediante 50 mbar durante 360 s.	196
<b>Tabla 4.17:</b> Recuperaciones de cada analito detectado luego de la aplicación de la metodología de extracción en fase sólida para cada nivel de concentración evaluado.	201
<b>Tabla 4.18:</b> Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico de los estándares puros y extraídos junto con los valores obtenidos en la prueba <i>t</i> de Student para comparación de pendientes.	203
<b>Tabla 4.19:</b> Recuperaciones de cada analito detectado luego de la aplicación de la metodología de extracción combinada (ELL-EFS) para cada nivel de concentración evaluado.	211
<b>Tabla 4.20:</b> Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico de los estándares puros y de los extractos junto con los valores obtenidos en la prueba <i>t</i> de Student para comparación de pendientes.	212
<b>Tabla 4.21:</b> Límites de detección y cuantificación para cada ATB para el método desarrollado con su correspondiente límite máximo residual.	213

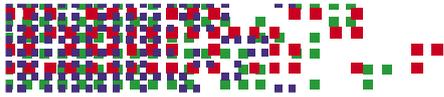
<b>ACN</b>	Acetonitrilo
<b>ADN</b>	Ácido Desoxiribonucleico
<b>ALS</b>	Cuadrados mínimos alternantes
<b>AMP</b>	Ampicilina
<b>AMX</b>	Amoxicilina
<b>ANOVA</b>	Análisis de Variancia
<b>AOAC</b>	Asociación Oficial de Químicos Analíticos
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ASS</b>	Ácido Acetil Salicílico
<b>ATB</b>	Antibiótico
<b>CAF</b>	Cafeína
<b>CAR</b>	Carboxen
<b>CBZ</b>	Carbamazepina
<b>CBZ-EP</b>	Carbamazepina epóxido
<b>CD</b>	Ciclodextrinas
<b>CG</b>	Cromatografía Gaseosa
<b>CL</b>	Cromatografía Líquida
<b>CLAR</b>	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
<b>CLOR</b>	Cloranfenicol
<b>CMEC</b>	Cromatografía Micelar Electrocinética
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>CPF</b>	Cirpofloxacina
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetil trimetilamonio
<b>CTC</b>	Clortetraciclina
<b>CV</b>	Coefficiente de Variación
<b>CW</b>	Carbowax
<b>DAD</b>	Detector de Arreglo de Diodos
<b>DAE</b>	Drogas Antiepilépticas
<b>DICLO</b>	Diclofenac

<b>DIFLU</b>	Diflunisal
<b>DMC</b>	Demeclociclina
<b>DOC</b>	Doxiciclina
<b>DTAB</b>	Bromuro de decil trimetilamonio
<b>DVB</b>	Divinilbenzeno
<b>EBM</b>	Extracción con Barra Magnética
<b>EC</b>	Electroforesis Capilar
<b>ECZ</b>	Electroforesis Capilar Zonal
<b>EDTA</b>	Ácido Etilendiaminoacético
<b>EFS</b>	Extracción en Fase Sólida
<b>EFSC</b>	Extracción en Fase Sólida en Cartuchos
<b>EFSD</b>	Extracción en Fase Sólida en Discos
<b>EI</b>	Estándar Interno
<b>ELISA</b>	Inmunoensayo de entrecruzamiento de enzimas
<b>ELL</b>	Extracción Líquido-Líquido
<b>ENF</b>	Enrofloxacin
<b>EPA</b>	Agencia de Protección Ambiental
<b>EPI</b>	Epinastina
<b>ESI</b>	Ionización por Electro spray
<b>EtOH</b>	Etol
<b>FDA</b>	Administración de Drogas y Alimentos
<b>FEN</b>	Fenilefrina
<b>FEO</b>	Flujo Electro-Osmótico
<b>FM</b>	Fase Móvil
<b>FPE</b>	Fase Pseudo-Estacionaria
<b>FPIA</b>	Inmunoensayo de polarización fluorescente
<b>GEN</b>	Gentamicina
<b>HCl</b>	Ácido Clorhídrico
<b>HLB</b>	Balance Hidrofílico-lipofílico

<b>HS</b>	Espacio Cabeza
<b>HTAB</b>	Bromuro de hexadecil trimetilamonio
<b>IBU</b>	Ibuprofeno
<b>ICH</b>	Conferencia Internacional sobre Armonización
<b>INDO</b>	Indometacina
<b>IUPAC</b>	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada
<b>KETO</b>	Ketoprofeno
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato diácido de potasio
<b>LAMO</b>	Lamotrigine
<b>LID</b>	Lidocaína
<b>LMR</b>	Límite Máximo Residual
<b>LOD</b>	Límite de Detección
<b>LOQ</b>	Límite de Cuantificación
<b>LVSS</b>	Inyección de un gran volumen de muestra
<b>MCC</b>	Meclociclina
<b>MCR-ALS</b>	Resolución Multivariada de Curvas por Cuadrados Mínimos Alternantes
<b>MEFL</b>	Micro-Extracción en Fase Líquida
<b>MEFS</b>	Micro-Extracción en Fase Sólida
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>MNA</b>	Modo Normal de Apilamiento
<b>MNC</b>	Minociclina
<b>MS</b>	Espectrometría de Masas
<b>MTC</b>	Metaciclina
<b>Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub></b>	Borato de sodio
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato de sodio
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sulfato de sodio
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato monobásico de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio

<b>NARPO</b>	Naproxeno
<b>NEO</b>	Neomicina
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OTC</b>	Oxitetraciclina
<b>PA</b>	Poliacrilato
<b>PAR</b>	Paracetamol
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PEN</b>	Penicilina
<b>PHB</b>	Fenobarbital
<b>PHT</b>	Fenitoína
<b>PIR</b>	Piroxicam
<b>PLS</b>	Regresión por cuadrados mínimos parciales
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>PTFE</b>	Politetrafluoroetileno
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de correlación al cuadrado
<b>RES</b>	Variancia Residual
<b>RSM</b>	Método de Superficie de Respuesta
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>SMX</b>	Sulfametoxazol
<b>SNA</b>	Sulfanilamida
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SRC</b>	Solución Reguladora de Corrida
<b>SUL</b>	Sulindac
<b>SVD</b>	Descomposición en Valores Singulares
<b>TC</b>	Tetraciclina
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TEO</b>	Teofilina
<b>Ti</b>	Tiempo de Inyección
<b>UV- VIS</b>	Ultravioleta-Visible

<b>Vi</b>	Voltaje de inyección
<b>Vs</b>	Voltaje de separación
<b>w/v</b>	Peso en volumen
<b>ζ</b>	Potencial zeta



### Objetivo general

Esta tesis doctoral tuvo como objetivo general desarrollar nuevas estrategias analíticas basadas en técnicas separativas, como electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta resolución, acopladas a metodologías de pre-concentración dentro y fuera del sistema de separación, asistidas con modelado quimiométrico, orientadas a la separación y determinación simultánea de una amplia variedad de analitos contenidos en diversas muestras complejas.

### Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de diferentes herramientas quimiométricas para mejorar las características de los métodos analíticos desarrollados. Dichas herramientas fueron las siguientes:

a) Diseños experimentales, para obtener las condiciones experimentales óptimas donde el sistema genera resultados deseables,

b) Algoritmos de modelado, aplicados al mejoramiento de la calidad de los datos instrumentales, para su posterior análisis, y

c) Algoritmos de calibración para modelado de datos de segundo orden a fin de aplicar la ventaja de segundo orden.

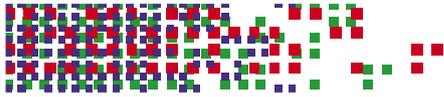
2. Estudiar las técnicas más simples, económicas, rápidas y versátiles para el acondicionamiento de muestras y extracción de analitos, con el objeto de recuperar la mayor parte de sus componentes en una forma compatible con el sistema de análisis y que generen la mínima contaminación para analista y para el medio ambiente.

3. Analizar la potencial implementación de las metodologías desarrolladas en:

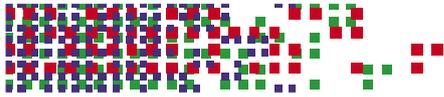
a) En el monitoreo de drogas terapéuticas y en estudios farmacocinéticos sobre pacientes,

b) La detección de contaminantes emergentes en aguas destinadas para el consumo humano y la evaluación del impacto sobre la salud humana y sobre el medio ambiente,

c) La detección de la contaminación temprana de la leche vacuna con residuos de antibióticos, para evitar problemas tecnológicos y sobre la salud humana.



- 1.** En la presente tesis se desarrollaron, optimizaron y validaron métodos basados en técnicas separativas, como electroforesis capilar y cromatografía líquida de alta resolución, para la separación y determinación simultánea de una amplia variedad de analitos contenidos en diversas matrices biológicas: epinastina en suero humano, drogas antiinflamatorias no esteroideas y un antiepiléptico en agua de río, drogas antiepilépticas en suero humano y antibióticos en leche vacuna.
- 2.** Para el acondicionamiento de las muestras y la extracción de los analitos desde sus matrices, se aplicaron métodos basados en la precipitación de proteínas y posterior centrifugación, combinados con extracciones líquido-líquido, extracciones en fase sólida y micro-extracción en fase sólida, obteniendo recuperaciones satisfactorias, acordes a la metodología y a la matriz utilizada. Asimismo, para incrementar la sensibilidad en la detección, se emplearon metodologías de pre-concentración dentro del capilar y se modificó la instrumentación convencional mediante el uso de capilares burbuja.
- 3.** Se construyeron diseños experimentales de Plackett-Burman con el objetivo de realizar las experiencias de una manera eficiente, que permita la extracción de conclusiones correctas de cada experimento, mejorando el valor de la investigación y disminuyendo considerablemente el tiempo y el costo del proceso. Con ellos se estudiaron, en algunos sistemas, el efecto de los parámetros que afectan la eficiencia de las técnicas de extracción utilizadas, y en otros sistemas, los factores que afectan la resolución entre los picos de los analitos estudiados, el tiempo de análisis y parámetros electroforéticos como la corriente generada dentro del capilar, como así también la robustez del método.
- 4.** La metodología de superficie de respuesta, a través de la construcción de diseños experimentales central compuesto, permitió realizar un pequeño número de experiencias, que aportaron los datos suficientes para aplicar la función deseabilidad y de esta manera encontrar las condiciones experimentales óptimas donde los sistemas de múltiples respuestas generan resultados deseables.



**5.** Algunos datos provenientes del análisis electroforético se sometieron a un pre-procesamiento con el objetivo de reducir la señal de fondo y corregir los tiempos de migración de los picos. Se aplicó el algoritmo MCR-ALS (Resolución Multivariada de Curvas por Cuadrados Mínimos Alternantes) para resolver picos totalmente solapados y poder cuantificar al analito de interés.

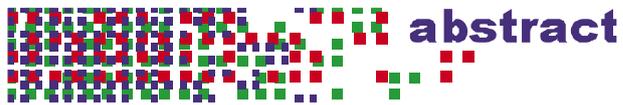
**6.** En todos los métodos desarrollados se alcanzó una sensibilidad suficientemente elevada como para que los mismos puedan ser aplicados en:

**a)** El *monitoreo de drogas terapéuticas*, con el objetivo de controlar la terapia farmacológica en pacientes o para determinar intoxicaciones con drogas ilícitas y de abuso,

**b)** La *detección la contaminación temprana de residuos de antibióticos en leche vacuna*, evitando problemas tecnológicos y sobre la salud humana

**c)** La *detección contaminantes emergentes en aguas destinadas para el consumo humano* y la evaluación del impacto sobre la salud humana y sobre el medio ambiente.

1. In the present Thesis work, several methods based on separative techniques such as capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography were developed, optimized and validated for the separation and simultaneous determination of a wide variety of analytes contained in diverse biological matrices: epinastine in human serum, non-steroidal anti-inflammatory drugs and an antiepileptic in river water, antiepileptic drugs in human serum and antibiotics in cow milk.
2. For the conditioning of samples and analyte extraction from their matrices, methods based on protein precipitation were applied, followed by centrifugation, combined with liquid-liquid extractions, solid phase extractions and solid phase micro-extraction. Obtaining satisfactory recoveries according to the methodology and employed matrix. Likewise, in order to increase the detection sensitivity, pre-concentration methodologies were used inside the capillary, and the conventional instrumentation was modified by means of bubble capillaries.
3. Plackett-Burman experimental designs were built with the aim of performing the experiments in an efficient manner, permitting the extraction of correct conclusions from each experiment, improving the value of the research and considerably decreasing the time and cost of the process. With these designs, the effects of parameters affecting the efficiency of the extraction techniques employed were studied in some of the systems. In other systems, the factors studied were those affecting the peak resolution of the analytes of interest, the analysis time, some electrophoretic parameters such as the current generated inside the capillary, and the robustness of the method.
4. The surface response methodology, through the generation of central composite experimental designs, allowed the concretion of a small number of experiments which provided enough data for the application of the desirability function. In this way, the optimal experimental conditions were found where the systems with multiple responses generated desirable results.
5. Some data arising from the electrophoretic analysis were subjected to pre-processing with the aim of reducing the background signal and correcting the peak migration times. The algorithm MCR-ALS (*multivariate curve resolution-alternating least-squares*) was applied to resolve completely overlapped peaks, and to allow quantitation of the analyte of interest.

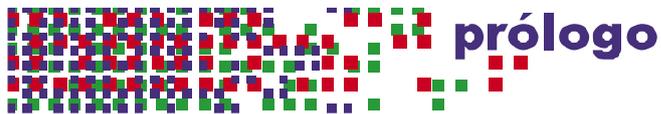


6. In all the developed methods a sufficiently high sensitivity was reached, in order to apply them to:

a. Monitoring of therapeutic drugs, with the objective of controlling the pharmacological therapy in patients, or to determine intoxication with abuse or illicit drugs.

b. The detection of early contamination with antibiotic residues in cow milk, avoiding technological and human health problems.

c. The detection of emergent contaminants in water for human consumption, and the evaluation of the impact over both human health and the environment.



¿Que tienen en común la arqueología, la antropología, la botánica, la química, la ingeniería, las ciencias forenses, la geología, la ciencia de los materiales, la medicina, la biología molecular, la farmacología, la toxicología?

Todas esas disciplinas dependen de los **análisis químicos**. ¿Por qué? Porque las personas que trabajan en esas áreas necesitan resolver problemas con respecto al contenido de los materiales con los cuales trabajan. Por lo tanto, la **QUÍMICA ANALÍTICA** es el estudio del análisis de materiales con el objeto de determinar su composición elemental y molecular.

El químico analista se interesa no solamente en **resolver problemas específicos**, sino también en **descubrir mejores métodos para ello**. Este trabajo de desarrollo en general requiere conocimientos profundos de amplias áreas de la química y además de biología, estadística y física.

*Judith y Kenneth Rubinson*

## 1 INTRODUCCIÓN

---

La **química bioanalítica** juega un rol central en áreas académicas e industriales, abarcando campos como biotecnología, biofarmacia y diagnóstico clínico. Esta disciplina se basa en el desarrollo y aplicación de mediciones químicas e instrumentación para resolver problemas biológicos, biotecnológicos y relacionados con la ciencia médica (Musteata y Pawliszyn, 2007).

Durante los últimos años, se observó un significativo avance en el desarrollo de instrumentos y métodos analíticos cada vez más eficientes, capaces de resolver mezclas altamente complejas en diversas matrices, desde gases hasta matrices biológicas, obteniendo límites de detección por debajo de los femtogramos ( $1 \times 10^{-15}$  g) (Smith, 2003).

A pesar de ello, si el proceso analítico es inadecuado, la medición analítica quedará invalidada, y hasta la más poderosa técnica analítica no proporcionará resultados confiables.

## 2 PROCESO ANALÍTICO

---

En general, el **proceso analítico** está dividido en cinco etapas: el *muestreo*, que debe ser representativo para el objetivo del estudio, la *preparación de la muestra*, la *separación, detección* (cuantificación) y el *análisis estadístico* de los datos. Cada uno de estos pasos es importante para obtener un resultado correcto y confiable, aunque el 80 % del tiempo total del análisis corresponde a los dos primeros pasos, que influyen enormemente en la calidad de los resultados finales.

Es muy importante tener en cuenta que esos cinco pasos son consecutivos y que no puede llevarse a cabo un paso posterior si el paso previo no se concluyó correctamente. Si uno de los pasos no se lleva a cabo fielmente, el proceso en general sería erróneo y los resultados serían inconsistentes (Kataoka, 2003; Pavlovic y col., 2007; Wardencki y col., 2007).

Sería lógico pensar que el proceso de preparación de la muestra es un prerrequisito para la mayoría de los procesos analíticos (Pavlovic y col., 2007).

## 2.1 Preparación de la muestra

El objetivo de la preparación de la muestra es **recuperar** todos los analitos existentes en una forma compatible con la técnica de análisis, y **separarlos** de los componentes de la matriz que interfieren, usando un mínimo número de pasos mediante una metodología reproducible (Musteata y Pawliszyn, 2007; Smith, 2003; Rubinson y Rubinson, 2000).

El término **preparación de la muestra** significa que la muestra que vaya a emplearse, para el método de ensayo elegido, debe ser de tamaño y forma correctos.

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

### 2.1.1 Elección del método para la preparación de la muestra

En la elección del proceso para la preparación de la muestra se aplican cinco principios generales (Kataoka, 2003; Pavlovic y col., 2007, Smith, 2003, Rubinson y Rubinson, 2000).

En este contexto, la preparación de la muestra:

1. Debe realizarse sin perder ninguno de los analitos. La medida cuantitativa de la cantidad de analito que queda para el ensayo de la muestra original se llama **recuperación** del procedimiento.

2. Debe incluir la transformación del analito a la mejor forma química para el método de ensayo que va a emplearse. Esto permite evitar problemas en los sistemas de análisis posteriores.

3. Puede incluir, en ciertos casos, la eliminación eficiente de la mayor cantidad de compuestos interferentes presentes en la matriz. Cuando el método de ensayo está menos expuesto a interferencias, se dice que tiene mayor **especificidad**. Si se mejora la especificidad del ensayo, con frecuencia los pasos en preparación de la muestra se simplifican considerablemente.

4. Debe realizarse sin agregar nuevas interferencias que pueden proceder del agregado de reactivos o recipientes de reacción.

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 el análisis no funcionará.

Estos cinco requisitos, a menudo, suelen implicar contradicciones, por ejemplo, un tratamiento que permita una buena recuperación probablemente también agregue interferencias. Asimismo, hay otros temas que también influyen en la preparación de la muestra. Los instrumentos contemporáneos, al estar provistos con inyectores automáticos, efectúan los análisis con mayor rapidez. Por lo tanto, si el proceso de preparación de la muestra consume mucho tiempo, se limita la cantidad de muestras para analizar. Por consiguiente, se debe incrementar su potencial de **automatización** para minimizar los procesos manuales y la variabilidad entre los ensayos, y para utilizar el instrumento en su mayor capacidad (Meyer, 2002).

Además, 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.

En los últimos años, adquirió importancia un concepto relacionado con la preservación del medio ambiente: la **química verde**, que propone algunos lineamientos que pueden utilizarse en la elección del mejor proceso para el tratamiento de la muestra (Wardencki y col., 2007; Smith, 2003):

- 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 la utilización de material reutilizable, minimizando el uso de material desechable.

### **2.1.2 Recuperación del analito**

El analito está presente en una matriz de donde debe recuperarse, por lo tanto, es necesario estudiar las propiedades fisicoquímicas de la matriz, de los analitos y las interacciones químicas entre ellos.

### 2.1.2.1 Propiedades fisicoquímicas de la matriz

Las propiedades fisicoquímicas de las matrices varían considerablemente en tiempo y espacio, dependiendo del sistema medioambiental. En muchos casos varios parámetros fisicoquímicos influyen en la recuperación del analito desde su matriz. Por lo tanto, si no se consideran estas propiedades, la información acerca de la concentración, estabilidad, biodisponibilidad, etc., de sus elementos y componentes, no será correcta.

A menudo, la cantidad de muestra restringe la posibilidad de medición de estas propiedades. En estos casos, basándose en el conocimiento previo, se deben seleccionar las variables más importantes. Sin embargo, muchas de estas variables deben ser medidas durante el muestreo, debido a que pueden cambiar rápidamente en el curso de su traslado y conservación (Paschke, 2003).

Los efectos de la matriz son los mayores problemas en el proceso de preparación de la muestra. El **efecto matriz** se define como la influencia de una propiedad de la muestra sobre la eficiencia en la recuperación, es decir sobre la cantidad de analito extraído, independientemente de su presencia (Pavlovic y col., 2007).

### 2.1.2.2 Propiedades fisicoquímicas del analito

La selectividad de un método se produce por las diferencias en las propiedades fisicoquímicas entre analitos. Por tal motivo, es muy importante disponer de información acerca de estas propiedades, lo que ayudará a determinar si el compuesto puede ser extraído bajo determinadas condiciones específicas (Díaz-Cruz y col., 2003).

En este contexto, las propiedades **físicas** relevantes son la *solubilidad* (entre fases inmiscibles), el *coeficiente de partición* (entre una fase líquida y una fase sólida) y la *volatilidad* (para determinar el modo de extracción). Las principales propiedades **químicas** son las *constantes de disociación* (el grado de ionización de una molécula depende tanto del valor de dicha constante como del pH de la solución), *la constante de solubilidad* (es un indicador de la lipofilicidad o hidrofiliicidad del analito) y de su *polaridad*.

### 2.1.2.3 Interacciones químicas entre la matriz y los analitos

Durante el proceso de preparación de la muestra, es muy probable que las interacciones de los analitos con su medio ambiente químico cambien.

Estas interacciones están determinadas por las propiedades fisicoquímicas, tanto de los analitos como de las matrices, y pueden afectar la aplicabilidad de diferentes métodos para la preparación de la muestra, como la eficiencia y reproducibilidad del método analítico.

Por ello, la caracterización del estado fisicoquímico inicial de la matriz y de los analitos es una precondición para todos los pasos en la preparación de la muestra (Paschke, 2003).

## 2.2 Análisis de fármacos muestras biológicas

A menudo, en las **muestras biológicas** la cantidad de analito es muy baja y la matriz en la que se encuentran es muy compleja. A medida que la cantidad de analito disminuye, y llega al nivel de partes por millón ( $\text{mg L}^{-1}$ ) o partes por billón ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), es más difícil eliminar las interferencias de la matriz. Al mismo tiempo las muestras son más susceptibles a la contaminación.

Los **fluidos biológicos** contienen gran cantidad de moléculas como proteínas, lípidos, lipoproteínas, ácidos, bases y sales, y otras sustancias orgánicas endógenas y exógenas, que pueden poseer una estructura similar a los analitos de interés. Además, la matriz de los fluidos biológicos puede variar considerablemente dependiendo del estado de salud del paciente o de su dieta (por ejemplo, puede contener mayor cantidad de componentes que los esperados o puede presentar propiedades físicas y químicas diferentes) (Musteata y Pawliszyn, 2007; Kataoka, 2003).

El análisis de fármacos en fluidos biológicos está creciendo en importancia debido al desarrollo de drogas cada vez más selectivas y efectivas (Pawliszyn, 2002; Kataoka, 2003). Para permitir el uso de una nueva droga, existen variables y/o parámetros que deben estudiarse exhaustivamente, como por ejemplo el tiempo en que se llega a la máxima concentración plasmática, la biodisponibilidad en el organismo, las interacciones farmacocinéticas en la co-medicación y el proceso de eliminación (Kataoka, 2003).

El conocimiento de los niveles de las drogas y sus metabolitos en los fluidos biológicos tales como saliva, suero u orina permite realizar estudios farmacocinéticos para saber la evolución del medicamento en el organismo, en función del tiempo y de la dosis administrada. Además, la **monitorización de drogas terapéuticas** se utiliza como una herramienta muy útil para controlar la terapia farmacológica o para determinar intoxicaciones con drogas ilícitas y de abuso (Kataoka, 2003).

Como parte de la **química medioambiental**, una amplia variedad de compuestos químicos como pesticidas, herbicidas, compuestos orgánicos volátiles, dioxinas e hidrocarburos aromáticos polinucleares, se analizan en fluidos biológicos con el fin de investigar su toxicidad en seres humanos expuestos a este tipo de drogas (Ulrich, 2000).

La **metabolómica** comprende el análisis de metabolitos de bajo peso molecular en sistemas biológicos compuestos por sustancias que contienen información genómica (ADN), para la transcripción (ARN) y proteómica (proteínas).

El estudio de esos metabolitos es importante para entender la comunicación interna entre células, para el diagnóstico de enfermedades, para estudiar el efecto de los nutrientes en la salud o enfermedad de una persona y para estudiar el efecto de una nueva droga en el organismo.

El objetivo de la metabolómica es separar y detectar tantos metabolitos como sea posible en un análisis simple, y para ello se debe utilizar una técnica de análisis que permita separar compuestos con diferentes propiedades físicas y químicas (Ramautar y col., 2006).

### 2.3 Implicancias en el análisis de drogas en matrices biológicas

El análisis de drogas en matrices biológicas presenta el gran desafío de **detectar cada vez menores cantidades de analito**, los que además pueden exhibir características fisicoquímicas muy similares. Sumado a esto, la matriz es altamente compleja, conteniendo gran cantidad de interferencias que pueden estar presentes o no en alícuotas de una misma muestra. Esta gran variabilidad dificulta significativamente el proceso de preparación de la muestra.

De ello se deduce que no existe un método universal para la preparación de la muestra (Hernández-Borges y col., 2007). Las exigencias para el analista son, entonces, las de detectar cada vez menores cantidades de analito, afrontando el desafío de seleccionar el mejor y más conveniente método para la preparación de la muestra, lo que depende en gran medida del desarrollo de nuevas técnicas e instrumentos analíticos (Musteata y Pawliszyn, 2007; Kumazawa y col., 2003).

La técnica analítica utilizada para la detección y cuantificación del analito, así como los objetivos del análisis, determinarán cuánto esfuerzo se deberá invertir en el proceso de preparación de la muestra (Kataoka, 2003).

Las técnicas analíticas más citadas en la literatura para la separación y cuantificación de analitos son: Cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), Cromatografía gaseosa (CG) y Electroforesis capilar (EC); debido a su alta sensibilidad y selectividad en comparación con los métodos de ELISA (del inglés *enzyme-linked immunoassays*) y FPIA (del inglés *fluorescent polarization immunoassays*) (Ulrich, 2000). Para la determinación de analitos por los métodos de ELISA y FPIA se necesitan reactivos inmunológicos costosos y la imposibilidad de determinar simultáneamente varios analitos resulta un serio inconveniente.

Durante la última parte del siglo XX, científicos de distintos campos demostraron que muchos de sus inconvenientes se solucionaron mediante Electroforesis capilar (EC). Debido a ello, y a que no es una técnica que se aplica comúnmente en análisis de rutina, es

conveniente realizar una breve descripción de dicha técnica, profundizando en las alternativas actuales para realizar el tratamiento y la pre-concentración de la muestra.

## 3 ELECTROFORESIS CAPILAR

---

### 3.1 Definición

La electroforesis capilar es una microtécnica analítica separativa, de muy alta resolución, que se basa en la electromigración diferencial de especies cargadas o neutras por atracción o repulsión de un campo eléctrico dentro de un capilar. La electroforesis, como técnica separativa, se desarrolló por Tiselius, en 1937 (Heiger, 2000).

Esta técnica se diferencia de las cromatográficas en que las separaciones dependen de las diferencias entre las propiedades eléctricas de los analitos, más que de las diferencias en la forma en que se distribuyen entre una fase móvil y una estacionaria.

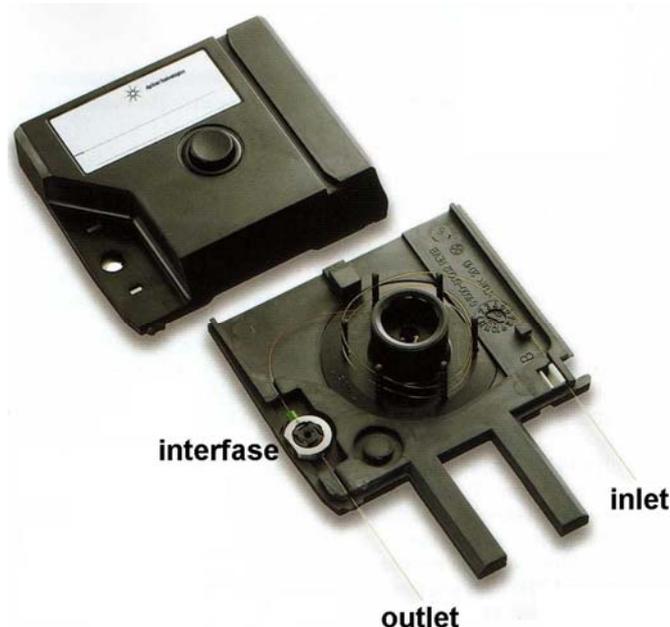
### 3.2 Metodología

La electroforesis capilar zonal (ECZ) es un modo de electroforesis que se basa sólo en las diferencias entre las movilidades de los analitos cargados. Para su implementación, se utiliza un tubo capilar con un cierto diámetro y longitud, que conecta a dos recipientes que contienen la solución reguladora de corrida (SRC) con la que se llena el capilar. Los capilares poseen un diámetro interno que va desde los 20 a los 100  $\mu\text{m}$ , siendo los que más se utilizan los de 50 y 75  $\mu\text{m}$ .

A su vez, esos recipientes se conectan por dos electrodos, unidos a una fuente de alto voltaje, para generar la diferencia de potencial dentro del capilar.

Luego de acondicionar correctamente el capilar, se introduce la muestra, reemplazando uno de los reservorios (usualmente el ánodo, denominado *inlet*) por el que contiene la muestra (denominado *outlet*) (Figura 3.1).

**Figura 3.1:** *Cassette* del equipo de electroforesis capilar Agilent Technologies donde se indican el *inlet*, el *outlet* y la interfase para la detección (figura extraída de la guía de capilares, reactivos y consumibles para EC de Agilent Technologies).



Al aplicar la diferencia de potencial, los componentes de la muestra comienzan su migración a través del capilar, y en su camino pasan por el detector, que registra la señal que estos producen. La gráfica de señal vs. tiempo se llama *electroferograma*. Esa señal depende de las características de los analitos y del detector que posea el equipo.

Actualmente, la EC es una técnica irremplazable para muchas aplicaciones, ampliamente aceptada en química analítica para la separación simultánea de una extensa variedad de compuestos, como por ejemplo en el análisis de biomoléculas (proteínas, ácidos nucleicos y péptidos), en la secuenciación del DNA y en la separación de isómeros. Las principales ventajas son su elevada eficiencia de separación, el requerimiento de pequeños volúmenes de muestra y su bajo costo, debido al consumo de escasas cantidades de solventes orgánicos.

A pesar de esto, todavía existe resistencia para implementar los análisis por EC en forma rutinaria, debido a que se la considera menos robusta que otras técnicas cromatográficas como CLAR y CG. Por otro lado, la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) no tiene métodos validados basados en EC.

En parte, esa falta de robustez se debe a la **baja sensibilidad**. Contribuyen a la falta de sensibilidad el *sistema de detección*, el *reducido paso óptico* y el *pequeño volumen de muestra inyectado* (Puig y col., 2007-a). Este inconveniente se ve aún más agravado en el

análisis de muestras con matrices biológicas complejas, que poseen un gran número de compuestos interferentes.

### 3.3 Problemas asociados a la baja sensibilidad de detección

#### 3.3.1 Volumen inyectado de muestra

En EC la muestra se introduce durante un corto período de tiempo. Por consiguiente, el volumen inyectado es muy reducido, pero está en relación con el pequeño volumen del capilar.

Como regla se establece que la porción de muestra inyectada no debe superar el 2 % del volumen total del capilar. Dependiendo de varios parámetros de inyección, el volumen inyectado se encuentra entre 1 y 50 nL.

Cuando el volumen de muestra disponible es muy reducido, este inconveniente se convierte en una ventaja, ya que sólo 5 µL de muestra son suficientes para realizar varias inyecciones. Aunque, si la escasa muestra disponible presenta una matriz no compatible con la técnica de elección, no es aconsejable realizar una dilución, debido a la posibilidad de reducir notablemente la sensibilidad de la técnica.

Existen dos métodos para realizar la inyección de la muestra dentro del capilar, que se describen a continuación:

##### 3.3.1.1 Inyección hidrodinámica

Actualmente, es el método que más se utiliza. Se puede producir de tres maneras diferentes: mediante la aplicación de presión en el *inlet* del capilar, vacío en el *oulet* del capilar o por efecto sifón, que se logra elevando el recipiente que contiene la muestra por encima del recipiente que contiene la SRC. Con esta metodología de inyección, la cantidad de muestra introducida es independiente de su matriz. El volumen inyectado es una función de las dimensiones del capilar, de la viscosidad de la SRC y de la presión que se aplica durante un determinado tiempo. Para calcular este volumen puede utilizarse la ecuación de Hagen-Poiseuille (*Ecuación 3.1*).

$$vol.inyectado = \frac{\Delta P \times d^4 \times \pi \times t}{128 \times \eta \times L} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

Si consideramos que la muestra es una solución de 0.01 g (cm s)<sup>-1</sup> de viscosidad ( $\eta$ ) y aplicamos 50 mbar de presión ( $5100 \text{ kg (m s}^2\text{)}^{-1} = \Delta P$ ), en un capilar de 75 µm de diámetro

interno ( $d$ ) y 60 cm de longitud total ( $L$ ) por un período de 10 segundos ( $t$ ), obtendremos un volumen inyectado de 66 nL. Este valor corresponde al 0.33 % del volumen usual de inyección de CLAR (20  $\mu$ L). Por lo tanto, la pequeña cantidad de analito inyectado dentro del capilar influye notablemente la sensibilidad de la técnica.

Si se dispone de una muestra que contiene analitos en una concentración significativamente elevada, la sensibilidad no es un limitante. En este caso, deberá usarse el menor volumen de inyección posible. La inyección de grandes volúmenes de muestra ocasiona pérdida de resolución, por superposición de las bandas de separación, o conduce a serios problemas instrumentales. Sin embargo, la reproducibilidad usualmente disminuye con los bajos tiempos de inyección, debido a limitaciones instrumentales.

Para mantener constante el volumen de inyección es necesario un control minucioso de la temperatura, ya que esta tiene gran influencia sobre la viscosidad de la muestra.

### 3.3.1.2 Inyección electrocinética

Se obtiene mediante la aplicación de voltaje en el recipiente que contiene la muestra. Se utiliza un campo eléctrico de 3 a 5 veces menor del que se aplica en la separación.

Una propiedad fundamental de este tipo de inyección es que la cantidad que se inyecta depende de la movilidad electroforética de los analitos. Por lo tanto, sólo podrán inyectarse especies cargadas y no especies neutras, que no poseen movilidad propia. Las especies neutras sólo podrían introducirse dentro del capilar si la movilidad del flujo electroosmótico (FEO) es suficientemente grande como para que arrastre a los analitos dentro del capilar o por métodos específicos que utilizan surfactantes iónicos.

La cantidad inyectada puede calcularse mediante la *Ecuación 3.2*:

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{FEO})V \pi r C t}{L} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

donde  $\mu_e$  es la movilidad electroforética del analito,  $\mu_{FEO}$  es la movilidad del FEO,  $V$  el voltaje aplicado,  $r$  el radio del capilar,  $C$  la concentración de analito en la muestra,  $t$  el tiempo y  $L$  la longitud total del capilar.

Este método de inyección no es tan reproducible como la inyección hidrodinámica, ya que pequeñas variaciones en la conductividad de la muestra pueden producir cambios significativos en la cantidad inyectada.

### 3.3.2 Sistema de detección y Paso óptico.

La elección del sistema de detección en EC es un punto crítico, debido a las pequeñas dimensiones del capilar. Los equipos de EC actuales (Figura 3.2) tienen la posibilidad de acoplarse a varios sistemas de detección como: detectores de luz ultravioleta-visible (UV-VIS), fluorescencia, fluorescencia inducida por láser, detectores electroquímicos, detectores de masa y otros, que varían básicamente en los límites de detección.

**Figura 3.2:** Equipo de electroforesis capilar Agilent Technologies (figura extraída de la guía de capilares, reactivos y consumibles para EC de Agilent Technologies).



La absorción UV-VIS es el método de detección que se utiliza con mayor frecuencia. Como todos los detectores ópticos, para mantener alta resolución, el ancho en la zona de detección debe ser tan pequeño como el ancho de la zona del soluto. Debido a que los picos en EC poseen un ancho de 2 a 5 nm, el ancho de longitud de onda deberá ser como máximo un tercio de esa cantidad (0.67 y 1.67 nm aproximadamente).

Para detectores de absorción de energía, la absorbancia de un soluto es dependiente del paso óptico ( $b$ ), de la concentración del analito ( $C$ ) y de la absorptividad molar ( $\epsilon$ ), según define la Ley de Beer (*Ecuación 3.3*).

$$A = b \times C \times \epsilon$$

***Ecuación 3.3***

El principal factor que limita la sensibilidad en EC es el pequeño paso óptico. Debido a la curvatura del capilar, el paso óptico efectivo es menor a su diámetro interno (corresponde al 80 % del diámetro del capilar), porque sólo una fracción de luz pasa directamente por el centro. Idealmente, toda la luz debería pasar por el centro del capilar y no por la pared.

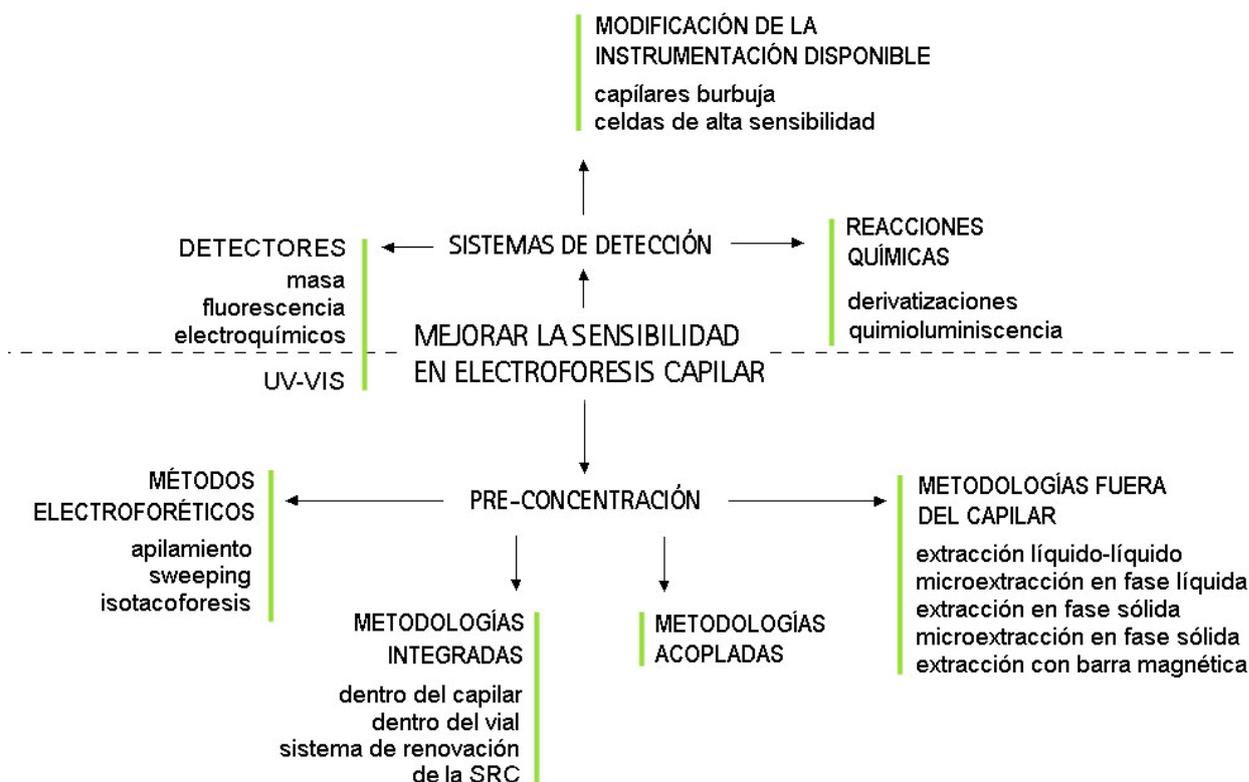
### 3.4 Estrategias para mejorar la sensibilidad

Una de las principales prioridades en el campo de la investigación relacionada con la EC es desarrollar estrategias para mejorar la sensibilidad. Estas estrategias pueden clasificarse en dos grandes grupos:

1. Mejorar los sistemas de detección, a través de la elección de los detectores más sensibles, de la realización de reacciones químicas de los analitos y de la modificación de la instrumentación.
2. Aplicar metodologías de pre-concentración: dentro del capilar (metodologías electroforéticas), fuera del capilar (metodologías externas), metodologías acopladas e integradas a determinadas partes del equipo de EC.

A continuación se resumen algunas de las técnicas disponibles en la literatura para el aumento de la sensibilidad en EC.

**Figura 3.3:** Técnicas disponibles en la literatura para el aumento de la sensibilidad en EC.



### **3.4.1 Sistemas de detección**

El esfuerzo de muchos investigadores se centró en perfeccionar el funcionamiento de los detectores para mejorar la sensibilidad. Sin un sistema de detección sensible, la EC será difícilmente aceptada como técnica de rutina.

#### **3.4.1.1 Detectores**

Los detectores electroquímicos (detectores de conductividad, amperométricos y potenciométricos) y de fluorescencia son más sensibles, pero no tan flexibles (fáciles de cambiar) y difundidos como los detectores UV- VIS. Por otro lado, los detectores de masa son universales y permiten una alta resolución y sensibilidad en la detección, pero son muy costosos y requieren de instrumentación compleja (Simonet y col., 2003). Finalmente, los detectores basados en espectroscopia Raman y espectrometría de resonancia magnética nuclear se utilizan menos frecuentemente que los anteriores, presentando límites de detección inferiores a los alcanzados con detección UV-VIS (Simonet y col., 2003).

#### **3.4.1.2 Derivatizaciones químicas**

Cuando los analitos se encuentran en niveles de trazas en matrices complejas, los componentes de la muestra pueden interferir enmascarando su señal. Por este motivo, es necesario realizar un proceso de derivatización para aumentar la sensibilidad de la técnica respecto de los analitos, tanto en la detección de fluorescencia como en la UV-VIS (Smith, 2003).

La derivatización es un proceso en el que se hacen reaccionar grupos de la molécula con un reactivo, para formar otro grupo que produce una respuesta fuerte frente al detector del instrumento. El analito adopta propiedades físicas o químicas que le permiten diferenciarse de los interferentes de la matriz.

El inconveniente que presenta la derivatización es que adiciona un paso más en el tratamiento de la muestra, incrementa el costo y el tiempo del análisis, y posiblemente introduzca nuevas interferencias.

#### **3.4.1.3 Modificación de la instrumentación**

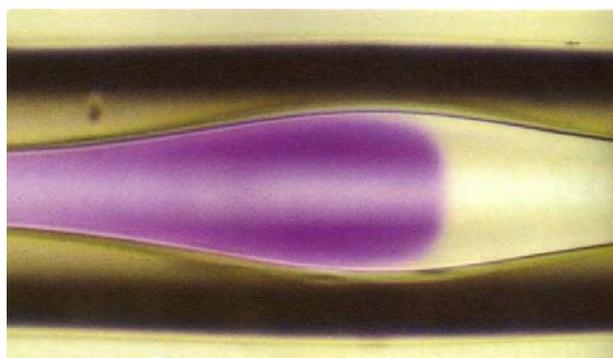
Cuando se utilizan detectores de absorción de energía, según la Ley de Beer la absorbancia de un soluto es dependiente del paso óptico (parámetro establecido por las dimensiones del capilar), de la absorptividad molar (factor fijo que depende del analito) y de la concentración del analito. Algunas empresas proveedoras de equipos de EC ofrecen equipamiento especial para aumentar la sensibilidad.

### 3.4.1.3.1 Capilares de paso de luz extendida

La sensibilidad puede mejorarse mediante el aumento del diámetro interno del capilar. Sin embargo, esta alternativa es limitada, debido a que se incrementa la corriente del sistema con el subsiguiente calentamiento dentro del capilar. Por ejemplo, si el diámetro del capilar se aumenta al doble, se duplica la absorbancia, pero la corriente se aumenta 4 veces.

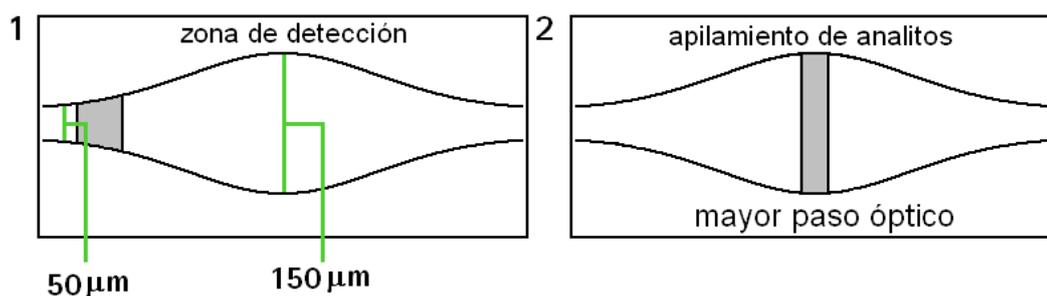
Existen capilares especialmente diseñados llamados **capilares burbuja**, que presentan un ensanchamiento en la ventana de detección (Figura 3.4).

**Figura 3.4:** Capilares de paso de luz extendida: capilar burbuja (figura extraída de la guía de capilares, reactivos y consumibles para EC de Agilent Technologies).



Debido a que el ensanchamiento se produce sólo en la zona de detección, no conduce a un aumento de la corriente. En la región de la burbuja, la resistencia eléctrica disminuye, y por lo tanto, también lo hace el campo eléctrico. El fenómeno siguiente es una disminución en la velocidad del FEO, debido a la mayor sección de la burbuja, lo que produce el apilamiento de los analitos que se encuentran formando una banda (se contraen longitudinalmente a lo largo del capilar), sin perder la eficiencia de separación y resolución (Figura 3.5). Así, la cantidad de analito se mantiene constante, pero el paso óptico aumenta.

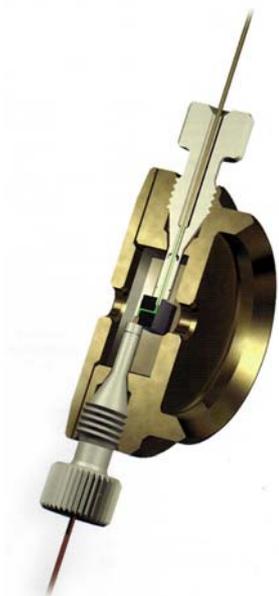
**Figura 3.5:** Secuencia de migración de una banda dentro de un capilar burbuja.



#### 3.4.1.3.2 Celdas de alta sensibilidad

La celda de alta sensibilidad (Figura 3.6) posee  $100 \mu\text{m}^2$  con un paso de luz de 1.2 mm y un volumen de 12 nL. Este sistema mejora hasta 20 veces la sensibilidad de la señal.

**Figura 3.6:** Capilares de paso de luz extendida: celda de alta sensibilidad (figura extraída de la guía de capilares, reactivos y consumibles para EC de Agilent Technologies).



Existen algunas alternativas instrumentales para solucionar el inconveniente de la baja sensibilidad (cambio del detector o equipamiento especial), pero implican un costo mayor. Por lo tanto, sin modificar la instrumentación disponible (detector UV-VIS y celdas convencionales), la única alternativa favorable es aumentar la concentración del analito dentro del capilar.

### 3.4.2 Pre-concentración dentro del capilar. Métodos electroforéticos

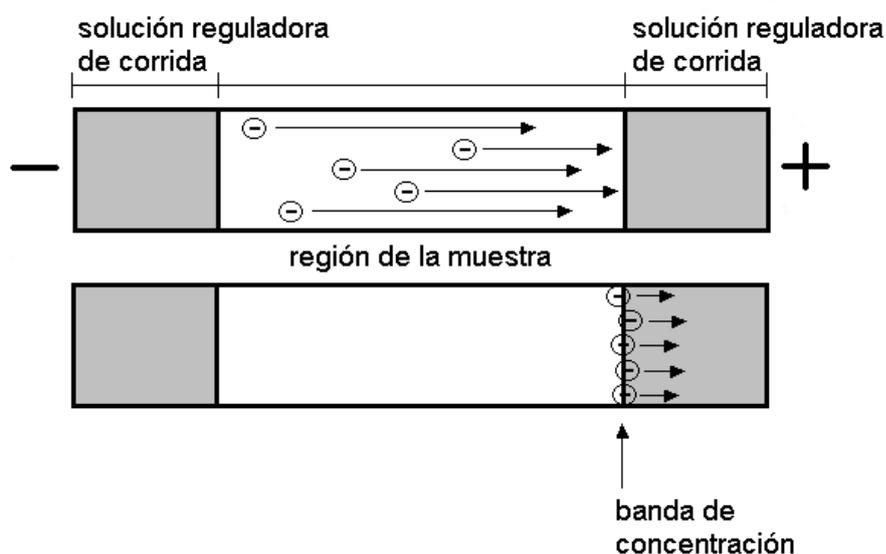
Los **métodos electroforéticos** de pre-concentración se utilizan para aumentar la concentración de analito en la muestra antes de su separación, y se realizan dentro del capilar.

Los métodos electroforéticos se basan en la diferencia de la movilidad electroforética de los analitos en diferentes zonas. Sin la alteración de la instrumentación disponible, y con un procedimiento simple de inyección, se puede modificar la movilidad electroforética de los analitos mediante la variación de la composición de la muestra y de la SRC. Los métodos electroforéticos incluyen: apilamiento de analitos, *sweeping* e isotacoforesis.

### 3.4.2.1 Apilamiento de la muestra

El método de **apilamiento**, sugerido por Tiselius y colaboradores en 1965, consiste en el movimiento de las especies cargadas de la muestra hacia un límite que separa dos regiones: una que contiene la muestra y la otra que contiene la SRC (Burgi y Chien, 1991). Los iones se apilan formando una banda angosta. En la Figura 3.7 se esquematiza el principio de apilamiento para aniones.

**Figura 3.7:** Modo normal de apilamiento. Modelo para aniones.



Para que se produzca el apilamiento de iones es fundamental que la matriz de la muestra sea de baja conductividad como las soluciones acuosas. A veces se agrega una pequeña cantidad de solvente orgánico para disminuir la conductividad, También se requiere que la región que contiene la SRC sea de alta conductividad.

Si dentro de un capilar se tienen regiones de alta y baja conductividad, y se aplica una diferencia de potencial, la zona de baja conductividad experimentará un mayor campo eléctrico que la zona que contiene a la SRC. Esto hará que los iones de la zona de baja conductividad se muevan más rápido que los de alta conductividad, apilándose en el límite entre las dos zonas y generando una reducción en el ancho de banda, con el consecuente aumento de la concentración de los analitos (Burgi y Chien, 1991; Quirino y Terabe, 2000). Esta técnica de pre-concentración puede aplicarse con inyección hidrodinámica o electrocinética.

Con esta metodología se obtiene un factor de concentración de 10, mejorando el límite de detección (LOD). El factor de concentración se obtiene dividiendo el área de los picos obtenidos con el método de apilamiento por el área de los picos obtenidos mediante una inyección convencional (Quirino y Terabe, 2000).

El mecanismo de apilamiento de iones sólo se puede aplicar para especies que presenten carga neta. Aplicando polaridad positiva, los cationes se apilarán en el frente de la porción de muestra, los aniones al final y las especies neutras quedarán distribuidas en la porción de muestra inyectada, eluyendo con la matriz (Burgi y Chien, 1991).

#### 3.4.2.1.1 Metodología experimental para inyección hidrodinámica

- *Modo normal de apilamiento* (MNA) (Quirino y Terabe, 1997, Quirino y Terabe, 2000)

Antes de la inyección de la muestra el capilar está lleno con SRC, un electrolito que por la aplicación de un campo eléctrico, genera corriente. En la inyección de la muestra, parte de esa solución electrolítica se reemplaza: en el *inlet* del capilar ingresa muestra y en el *outlet* se expulsa la misma cantidad de SRC.

Teniendo en cuenta la baja conductividad de la matriz de la muestra, cuando se aplica una diferencia de potencial, la corriente que se genera será menor a la del sistema en equilibrio. Además, dependiendo de la cantidad de muestra inyectada, la conductividad podrá ser nula en el caso extremo de que todo el capilar esté lleno de muestra. Por lo tanto, por encima de un volumen crítico, comenzarán a detectarse problemas con la estabilidad de la corriente.

La cantidad de muestra que puede introducirse dentro del capilar constituye una de las principales limitaciones que presenta esta metodología. Cabe destacar que sólo puede llenarse un 10 % del volumen total del capilar sin perderse la eficiencia en la separación. Cuando se inyecta un volumen mayor de muestra, se pueden mezclar las zonas de baja y alta conductividad ocasionando el ensanchamiento de banda y la pérdida de la resolución.

Si la matriz de la muestra es de alta conductividad, puede inyectarse una pequeña cantidad de agua antes del ingreso de la muestra. La porción de agua introducida es la que generará el área de baja conductividad para favorecer el apilamiento de los analitos.

- *Inyección de una gran cantidad de muestra* (**LVSS** del inglés *Large volume sample stacking*)

Cuando se dispone de una muestra con analitos en muy baja concentración, y la pre-concentración mediante el modo normal de apilamiento no es suficiente para su detección, se deberá aumentar aún más el volumen de muestra inyectada.

La metodología de pre-concentración LVSS permite inyectar un volumen de muestra mucho mayor, debido a que su matriz se elimina fuera del capilar, preservando la eficiencia

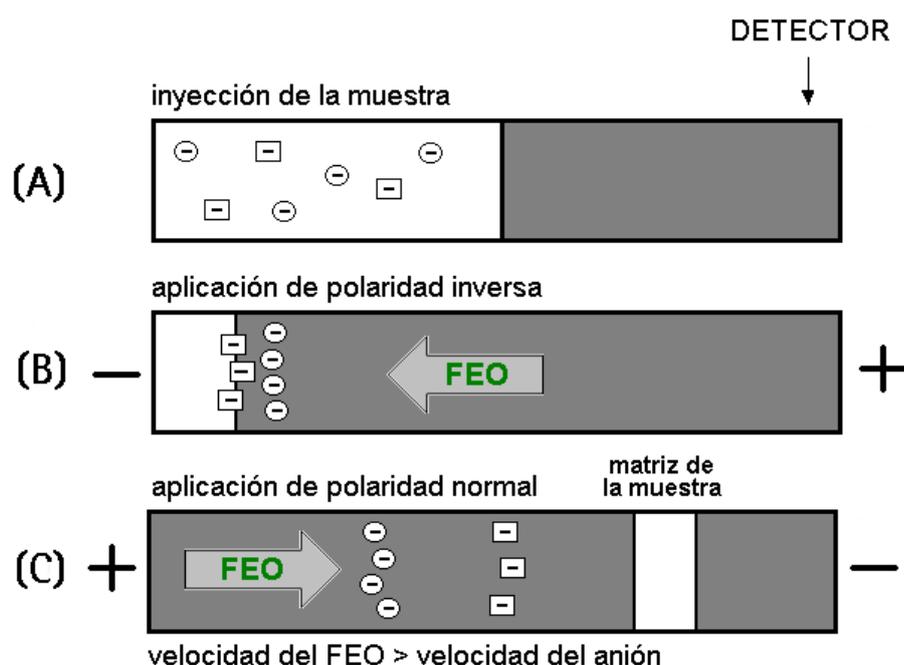
en la separación. Una condición fundamental para la aplicación de esta metodología es que la matriz debe ser de baja conductividad.

La eliminación de la matriz puede realizarse con una presión externa o mediante el FEO. La dirección de la eliminación es siempre en dirección opuesta a la del movimiento de las especies a separar, y su velocidad deberá ser siempre menor a la velocidad electroforética de las especies cargadas (para no eliminarlas del capilar). Una limitación de esta metodología es que en una misma corrida sólo pueden concentrarse efectivamente aniones o cationes (no es útil para especies neutras debido a que se eliminan con el FEO).

El factor de concentración es de 100, mejorando dos órdenes de magnitud el LOD (Quirino y Terabe, 2000).

La *metodología LVSS con cambio de polaridad* (Figura 3.8) consiste en llenar el capilar con SRC, cargar la muestra durante un tiempo determinado (Figura 3.8 A) (el volumen máximo es el volumen total del capilar), luego se cierra el circuito con SRC y se aplica un voltaje de signo contrario al de separación hasta que la corriente alcance entre el 90 y el 99 % de la corriente máxima (corriente obtenida cuando el capilar esta lleno sólo con SRC) (Figura 3.8 B). Ese momento corresponde a la eliminación de la totalidad de la matriz de la muestra. Posteriormente se detiene la aplicación de voltaje y se procede a la separación convencional (Figura 3.8 C).

**Figura 3.8:** Metodología LVSS con cambio de polaridad. Modelo para aniones.



En algunos equipos comerciales de EC no es posible cambiar la polaridad en una corrida convencional. Para eliminar la matriz de la muestra se puede manipular la magnitud y dirección del FEO. Para aniones, el FEO debe ser reducido usando una SRC con bajo pH o simplemente la velocidad del FEO debe ser menor a la velocidad electroforética de los analitos (Quirino y Terabe, 2000).

- *Apilamiento con acetonitrilo*

Las muestras biológicas, en general, contienen alta concentración de proteínas, además de una elevada concentración salina. La utilización de acetonitrilo (ACN) permite, no sólo eliminar el contenido proteico de las muestras, sino también pre-concentrar analitos. El apilamiento de los iones ocurre cuando una mezcla de ACN y sales inorgánicas están presentes sólo en la muestra. El apilamiento es consecuencia del cambio en la velocidad electroforética de los analitos, producido por la variación en la viscosidad de la muestra (Shihabi, 1996).

#### 3.4.2.1.2 Metodología experimental para inyección electrocinética

La pre-concentración de analitos utilizando *inyección electrocinética* proporciona mayor sensibilidad que la inyección hidrodinámica, ya que en esta metodología no existe el limitante de la cantidad de muestra que puede inyectarse. Además, es una inyección selectiva donde sólo ingresan dentro del capilar cationes o aniones, excluyendo la entrada de la matriz.

Este modo de inyección es poco reproducible, debido a que es muy susceptible a los pequeños cambios en la matriz de la muestra, aunque se obtienen factores de concentración de 1000, mejorando el LOD en tres órdenes de magnitud. Por otro lado, sólo puede utilizarse para matrices de baja conductividad; de lo contrario, durante la inyección se generará una elevada corriente, lo que ocasionará serios problemas instrumentales.

- *Inyección de la muestra amplificada por el campo eléctrico*

Es una variante de la inyección electrocinética. La muestra se prepara en una matriz de baja conductividad y se inyecta electrocinéticamente dentro del capilar. Debido a la baja conductividad de la muestra, los analitos cargados pueden inyectarse mediante un voltaje elevado (similar al voltaje de separación). De esta manera, se produce la amplificación de la inyección.

Si el FEO es significativo (pH por encima de 4.00), sólo pueden pre-concentrarse analitos que migran en su misma dirección. Bajo polaridad normal, donde el FEO migra

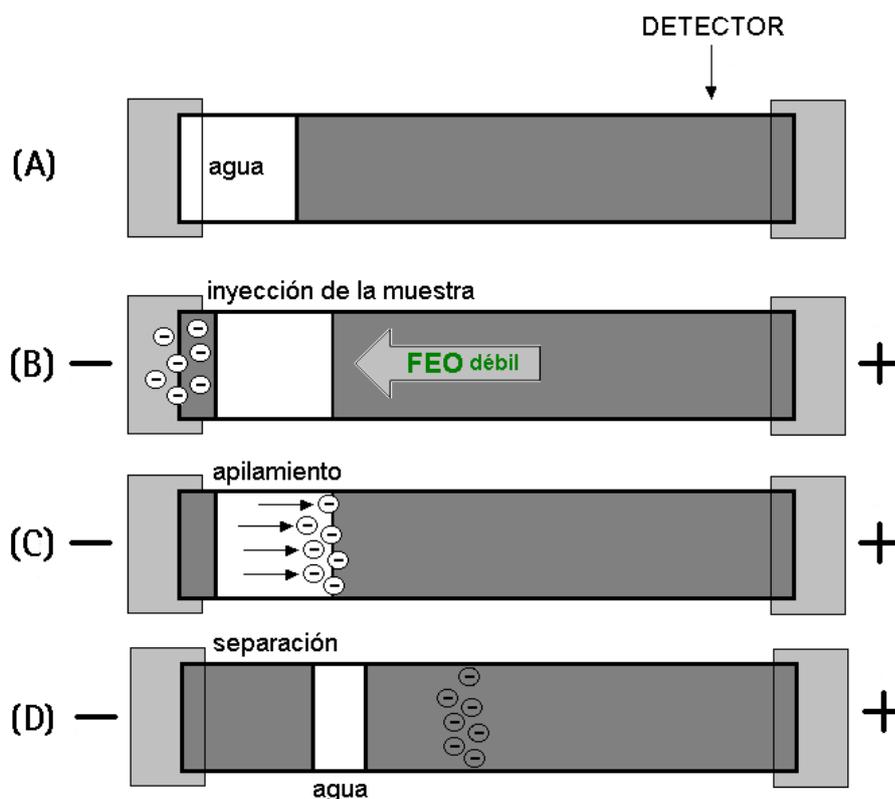
desde el polo positivo hacia el negativo, la aplicación de voltaje permite que los iones que posean carga positiva ingresen dentro del capilar, apartando aquellos que posean movilidad contraria al FEO, es decir los aniones. Con polaridad inversa (polaridad negativa), en cambio, ingresan dentro del capilar los aniones, pero se expulsan inmediatamente hacia el *inlet*, debido al movimiento del FEO durante la inyección.

En conclusión, sólo los cationes pueden concentrarse mediante inyección electrocinética en presencia de un FEO significativo.

Sin embargo, es posible pre-concentrar aniones si antes de su inyección se introduce una pequeña cantidad de agua (Figura 3.9 A). Esta estrategia permite que la velocidad del FEO sea menor a la de los aniones que ingresan al capilar y se evite su remoción.

En el momento de la aplicación del voltaje de inyección, los analitos cargados presentes en la muestra experimentan un aumento de movilidad e ingresan dentro del capilar (Figura 3.9 B). Cuando se encuentran con la SRC de alta conductividad su movilidad disminuye y se produce su acumulación (Figura 3.9 C) y posterior separación (Figura 3.9 D) (Palmer y col., 1999).

**Figura 3.9:** Inyección de la muestra amplificada por el campo con inyección de una pequeña cantidad de agua.



El agua inyectada tiene como función proporcionar un área de baja conductividad para que puedan apilarse los analitos, y según algunos autores, mejora la reproducibilidad (Chien, 1991; Wey y Thormann, 1999).

Por lo tanto, seleccionando una correcta polaridad durante la inyección, tanto cationes como aniones pueden inyectarse y pre-concentrarse dentro del capilar (Chien, 1991).

Desafortunadamente, el apilamiento con inyección electrocinética no se puede aplicar a todos los modos de EC. Tal es el caso de la cromatografía micelar electrocinética, que se utiliza para la separación de analitos neutros (no cargados).

#### **3.4.2.2 Sweeping**

La cromatografía micelar electrocinética (CMEC) es un modo de operación de EC introducido por Terabe en 1984, que puede usarse para la separación tanto de analitos neutros (que no pueden separarse mediante ECZ) como cargados.

El mecanismo de separación involucra la partición de los analitos entre una fase pseudo-estacionaria (FPE) que se adiciona a la SRC y la fase acuosa (muestra). La FPE incluye micelas, polímeros, dendrímeros, etc. y puede ser iónica o neutra. La FPE cargada le proporciona a las especies neutras, mediante complejamiento, la movilidad efectiva necesaria tanto para su acumulación como para su separación.

En la metodología de *sweeping*, cuando se aplica el voltaje de separación, la fase pseudo-estacionaria ingresa en la zona de la muestra y en su camino interacciona con los analitos permitiendo su acumulación (Quirino y Terabe, 1999). Este fenómeno ocurre por la partición o interacción de carácter hidrofóbico de los analitos con la FPE.

Las especies neutras se separan debido sólo a la partición entre ambas fases, mientras que la separación de especies cargadas se basa en mecanismos de partición y electroforesis.

#### **3.4.2.3 Isotacoforesis**

Es un modo de electroforesis capilar que utiliza un sistema de solución reguladora discontinuo, aplicable sólo para especies iónicas (Chen y Lee, 2000).

Primero se introduce en el capilar un electrolito delantero o líder, cuya movilidad es mayor a cualquier componente de la muestra, luego se introduce la muestra, hasta un 50 % del volumen total del capilar, y por último el electrolito terminal, cuya movilidad es menor a cualquier componente de la muestra.

Cuando se aplica una diferencia de potencial a lo largo del capilar, el campo generado no es uniforme. La separación ocurre en zonas que dependen de la movilidad de los iones individuales. Los iones que posean la misma velocidad (“isotaco” = “misma velocidad”) se separarán para formar zonas discretas (Wu, 2003). Estas zonas permanecen limitadas entre los electrolitos delantero y terminal (Moore y Jorgenson, 1995; Simonet y col., 2003).

Una dificultad para aplicar este modo de operación es la de encontrar un sistema de soluciones reguladoras que contengan tanto el electrolito delantero como el terminal (Heiger, 2000). Además, esta técnica no es útil para el análisis de trazas de analitos presentes en muestras complejas, debido a que puede perderse la resolución por superposición de bandas (Chen y Lee, 2000).

#### **3.4.2.4 Limitaciones para la aplicación de los métodos electroforéticos**

El principal problema para la aplicación de los métodos electroforéticos de pre-concentración se presenta cuando se trabaja con muestras que contienen matrices complejas. Estas poseen una gran cantidad de compuestos (potenciales interferentes) que pueden pre-concentrarse simultáneamente con el analito de interés, ocasionando separaciones altamente complicadas (Saavedra y col., 2007).

Asimismo, determinados componentes de la matriz, como por ejemplo proteínas en muestras de suero o leche, o surfactantes en muestras medioambientales, pueden unirse a las paredes del capilar, ocasionando cambios en los tiempos de migración de los analitos en estudio, pueden eliminar o reducir el FEO, o en el peor de los casos obturar el capilar (Santos y col., 2006). Por otro lado, estos compuestos interferentes pueden poseer un tiempo de migración igual o similar al de los analitos de interés, ocasionando la superposición de los picos y pérdida de la resolución.

Por ese motivo, se considera necesario realizar un acondicionamiento de la muestra, permitiendo no sólo eliminar las interferencias, sino también concentrar el o los analitos en estudio con el fin de mejorar los límites de detección (Wu, 2003).

### **3.4.3 Métodos para el acondicionamiento de muestras**

#### **3.4.3.1 Precipitación**

Las proteínas son componentes principales de fluidos y muestras biológicas, que causan modificaciones en las paredes del capilar y, por lo tanto, su remoción es un paso sumamente importante en el proceso de preparación de la muestra.

Como agentes precipitantes de proteínas se utilizan *ácidos, sales y solventes orgánicos*. Para decidir cuál de ellos utilizar, un parámetro importante es la **eficiencia**,

expresada en volúmenes de aditivo necesario para una determinada cantidad de proteínas, en un volumen específico de muestra. Generalmente, se necesitan de 4 a 5 volúmenes de soluciones salinas concentradas (por ejemplo sulfato de amonio) para desproteínizar un volumen de suero. En este caso se genera una considerable **dilución**. La desproteínización con ácido tricloroacético resulta en una dilución mínima, mientras que con solventes orgánicos la dilución es intermedia (Lloyd, 1996).

Otro parámetro a tener en cuenta es la **propiedad residual** del agente precipitante en el sobrenadante. Los aditivos salinos o ácidos otorgan a la matriz una elevada conductividad, limitando la aplicación de inyección electrocinética. Contrariamente, el sobrenadante obtenido de una precipitación con solventes orgánicos posee una baja conductividad, y el efecto de dilución que se produce durante el proceso de precipitación puede compensarse con largas inyecciones (modo normal de apilamiento o la metodología de inyección de un gran volumen de muestra).

### **3.4.3.2 Centrifugación y Filtración**

Luego de la precipitación la muestra puede **centrifugarse** y/o **filtrarse** para eliminar el material insoluble (Smith, 2003).

La eliminación del material sólido (suspendido o precipitado) es necesaria, sobre todo en matrices complejas. Pero se debe tener cuidado de que no exista pérdida de los analitos a causa de su adsorción en el material que se quiere eliminar.

Finalmente, el sobrenadante (obtenido de la centrifugación o filtración) puede inyectarse directamente en el equipo de EC, puede evaporarse y el residuo resuspenderse en un menor volumen de algún solvente compatible con el sistema de EC o puede someterse a otro proceso de preparación de la muestra.

### **3.4.4 Pre-concentración fuera del capilar**

#### **3.4.4.1 Extracción líquido-líquido (ELL)**

Para extraer analitos de matrices acuosas, el método más común es la extracción con solventes no-polares (Smith, 2003).

El principio de separación en la extracción líquido-líquido se basa en la partición de un analito entre dos fases inmiscibles, con el objetivo de favorecer la solubilización del analito en una fase y de los contaminantes en la otra. El proceso de extracción se repite la cantidad de veces necesaria como para permitir la máxima extracción de los compuestos o contaminantes en una u otra fase.

#### 3.4.4.1.1 Fundamento de la extracción

La desorción de un analito desde una matriz compleja es dependiente de las interacciones moleculares entre la droga y la matriz (uniones puente hidrógeno, interacciones dipolo-dipolo, interacciones iónicas o covalentes). La desorción y la extracción desde matrices biológicas pueden modelarse mediante la isoterma de adsorción de Freundlich, descrita por la *Ecuación 3.4*:

$$\log C_b = \log k + m C_f \quad \textbf{Ecuación 3.4}$$

donde  $C_b$  es la concentración total de analito,  $C_f$  es la concentración de analito en el solvente extractante,  $k$  es la constante de disociación y  $m$  es una medida de la disponibilidad de analito para ser desorbido. Estos parámetros (especialmente  $m$ ) proporcionan una idea de la facilidad con que el analito puede extraerse desde la matriz y de los requerimientos para la extracción.

El valor de  $m$  depende tanto del solvente de extracción que se utiliza, como de las propiedades ácido-base del analito y el contenido lipídico de la matriz de la muestra. Otra consideración es el valor del pH, ya que su alteración puede causar un cambio notable de solubilidad en drogas ionizables. Por lo tanto, el valor del pKa de analitos es un parámetro a tener en cuenta cuando se analiza la solubilidad en distintos solventes.

Para realizar la extracción de un analito desde una matriz mediante extracción líquido-líquido, la selección del solvente de extracción puede realizarse por dos métodos:

- a) *Técnicas empíricas*, que se basan en observaciones experimentales.
- b) *Técnicas termodinámicas*, que se basan tanto en las propiedades termodinámicas del solvente como del analito.

Las principales propiedades termodinámicas de los solventes con respecto a sus habilidades de solvatación son: su polaridad, su capacidad de realizar interacciones dipolo-dipolo, o su carácter como donador o aceptor de protones. En un soluto, la propiedad termodinámica de interés es su energía de cohesión, que es función de su composición y de su estructura. El cálculo de la solubilidad de una sustancia química resulta casi imposible sobre bases puramente termodinámicas, especialmente cuando está presente como residuo en una matriz biológica. Esto es debido a la complejidad de las matrices. Consecuentemente, las técnicas empíricas resultan las de mayor uso.

#### 3.4.4.1.2 Metodología de la extracción

Cuando se adiciona un solvente inmiscible a una muestra líquida, se forman dos fases. El analito tendrá más afinidad por una u otra fase, de acuerdo con su coeficiente de partición. Las fases pueden separarse fácilmente mediante una ampolla de decantación. Luego, la fase orgánica puede evaporarse y el residuo resuspenderse en la solución de trabajo.

La selectividad se obtiene mediante la variación de la naturaleza de los solventes, del pH de la muestra, del uso de aditivos como agentes complejantes o sales (efecto *salting-out*) o reactivos pares-iónicos y mediante la alteración de la temperatura (Smith, 2003).

La metodología de extracción líquido-líquido presenta las desventajas de que consume gran cantidad de solventes orgánicos (en discordancia con los conceptos de la química verde), que perjudican la salud del analista y tienen un impacto directo sobre el medio ambiente. Las repetidas operaciones manuales pueden incorporar muchos errores al resultado final, además de tornarse un proceso tedioso y aburrido que requiere mucho tiempo.

Lograr una buena selectividad para los analitos de interés es una tarea compleja. Cuando se desea extraer varios analitos al mismo tiempo es difícil encontrar un solvente o condiciones experimentales apropiadas para todos los analitos, demandando más de un paso de extracción por muestra (Smith, 2003).

Además, sólo puede utilizarse para determinadas muestras, ya que algunas causan emulsiones y, a veces, la adición de solvente es una fuente de contaminación y un factor de dilución. Si el extracto final se evapora, esta metodología no puede utilizarse para la extracción de analitos volátiles, debido a su potencial pérdida.

#### **3.4.4.2 Micro-extracción en fase líquida (MEFL)**

La MEFL consiste en la miniaturización de las extracciones líquido-líquido. Las principales ideas son las de automatizar el proceso permitiendo realizar extracciones rápidas, reducir el consumo de grandes cantidades de solventes y facilitar la efectiva concentración del analito sin la evaporación de solvente (Pedersen-Bjergaard y Rasmussen, 2005).

La MEFL, introducida por primera vez en 1996 por Jeannot y Cantwell, se basa en un proceso de difusión pasiva de los analitos contenidos en una matriz acuosa, hacia una microgota de solvente de extracción, inmiscible en agua, contenido en la aguja de una micro-jeringa. Luego de un período de remojo se succiona la gota con la jeringa, se

transfiere al instrumento y se analiza (Wardencki y col., 2007; Pedersen-Bjergaard y Rasmussen, 2005, Rasmussen y Pedersen-Bjergaard, 2004).

En lugar de la aguja, también se puede utilizar una fibra hueca de polipropileno poroso o teflón como objeto de extracción. La principal ventaja de esta alternativa es que el solvente de extracción está protegido dentro de la fibra y previene la pérdida del analito durante la extracción. Esto es importante ya que la muestra debe agitarse vigorosamente (Si Ho y col., 2007).

Este método es útil para el acondicionamiento de muestras biológicas y medioambientales. Es rápido, de bajo costo y minimiza el tiempo de exposición a solventes orgánicos tóxicos. Es compatible con CG, CLAR y EC (Kataoka, 2003).

### **3.4.4.3 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 eluido con un pequeño volumen de solvente de elución proporcionando extractos altamente concentrados (Kataoka, 2003). Las EFS es útil para realizar extracción, concentración de analitos y acondicionamiento de la muestra.

La fase sólida consiste en partículas cromatográficas (*sorbente*), que pueden estar en diferentes configuraciones:

- **Compactadas en discos**
- **Empacadas en cartuchos**
- **Recubriendo una fibra**
- **En una barra magnética**

#### **3.4.4.3.1 Extracción en fase sólida en discos (EFSD)**

Los discos están compuestos por partículas poliméricas o de sílice modificada (sorbente), unidas fuertemente a una matriz de politetrafluoroetileno (PTFE) impregnados en un disco de fibra de vidrio (90 % sorbente y 10 % PTFE) (Figura 3.10).

**Figura 3.10:** Discos de C-18 para la extracción en fase sólida.



Las micropartículas de PTFE no interfieren con la actividad del sorbente, dejando libre su superficie para la interacción con la muestra durante la separación. La matriz de PTFE es compatible con todos los solventes orgánicos e inorgánicos y, por ser inerte, confiere una alta pureza a la extracción (Varian Analytical Instruments, 2001-2002).

Las pequeñas partículas de PTFE se compactan densamente permitiendo, no sólo la aplicación de una alta velocidad de flujo, sino también el uso de un volumen de solvente de extracción pequeño. Además, se distribuyen uniformemente a través de la membrana permitiendo una transferencia de masa más eficiente que los cartuchos.

Algunos discos contienen una doble capa de fibra de vidrio que funciona como prefiltro. De esta manera, se puede analizar agua residual, plasma, saliva, suero, etc., sin previa centrifugación o filtración.

El disco se coloca dentro de un adaptador, que se enrosca a una jeringa destinada para tal fin (Figura 3.11) o puede colocarse en un sistema de filtración por vacío.

**Figura 3.11:** Adaptador, disco y jeringa para la extracción en fase sólida con discos.



El uso de discos evita algunos inconvenientes asociados al proceso de extracción líquido-líquido, como la formación de emulsiones, el trabajo laborioso, el costoso material de vidrio y el uso de excesiva cantidad de solvente.

#### 3.4.4.3.2 Extracción en fase sólida en cartuchos (EFSC)

Las partículas cromatográficas están unidas a sílica o a un polímero y se empacan dentro de cartuchos (Figura 3.12). En el mercado están disponibles una amplia variedad de

sorbentes. Su correcta elección depende de la naturaleza del analito (polaridad y la presencia de grupos funcionales) que se desea extraer y de las características de los componentes de la muestra. Entendiendo la interacción entre la matriz de la muestra, el analito de interés y el sorbente, se puede mejorar la recuperación.

**Figura 3.12:** Cartuchos comerciales para la extracción en fase sólida.



Las matrices de las muestras biológicas influyen en la retención del analito o de las interferencias en el sorbente. Para un mismo analito, pueden utilizarse diferentes sorbentes, dependiendo de la matriz en la que se encuentre. Por ejemplo, para extraer un analito de una matriz acuosa, con moderada concentración salina, se deberá utilizar un sorbente no polar. Si el mismo analito estuviese inmerso en una matriz no polar como un aceite, se deberá usar un sorbente polar. Si en cambio, el analito estuviese disuelto en una matriz acuosa, con baja concentración salina sin interferencias, se tendrá que utilizar un sorbente que permita realizar intercambio iónico.

La EFS puede utilizarse:

**a)** Para retener al analito de interés, permitiendo que las interferencias y los componentes de la matriz pasen a través de la columna (alta constante de afinidad del analito con el sorbente).

**b)** Para retener las interferencias, permitiendo que los compuestos de interés pasen a través de la columna con la matriz de la muestra (alta constante de afinidad de las interferencias con el sorbente).

La elección del sorbente es una clave fundamental en el proceso de EFS, ya que controla parámetros como selectividad, afinidad y capacidad. Una vez que se analizó la matriz de la muestra y las propiedades del analito se puede seleccionar el sorbente.

#### 3.4.4.3.3 Mecanismos de extracción en fase sólida para discos y cartuchos

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

La retención de analitos orgánicos de soluciones polares se debe principalmente a uniones carbono-hidrógeno entre el analito y los grupos funcionales de la superficie de la sílice. Esas fuerzas atractivas no polares se denominan fuerzas de Van der Waals o fuerzas de dispersión.

Los sorbentes que más se utilizan son los de Carbono-8 (C-8) y Carbono-18 (C-18), pero también se emplean sorbentes poliméricos que son más resistentes a pH extremos y son útiles en el análisis medioambiental, para retener compuestos orgánicos.

Para romper la fuerza que une al analito con el empacado (proceso de elución) se utiliza un solvente no polar. Aunque si un solvente no polar no es eficiente para eluir al analito retenido, será necesario adicionar un solvente polar (como por ejemplo metanol). El metanol se une al hidrógeno de los grupos silanoles sobre la superficie de sílice y, de esta manera, rompe cualquier unión hidrógeno del analito.

Los grupos silanoles (Si-OH) por encima de pH 4.00 existen en la forma ionizada (Si-O<sup>-</sup>). Esta disociación puede provocar la atracción de cationes o compuestos básicos, ocasionando interacciones secundarias. En este caso, es necesario ajustar el pH del solvente de elución para romper estas interacciones (Bulletin 910 – Supelco, 1998).

En este tipo de mecanismo, lo deseable es retener al analito de interés, por lo tanto el pH de la muestra debe ajustarse para que la retención sea óptima. Si el compuesto de interés es ácido o básico, debe usarse un pH al que el compuesto no esté cargado. Contrariamente, puede utilizarse un pH al que los compuestos no deseados de la muestra se retengan en el sorbente y el analito de interés pase a través del relleno del cartucho.

- *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 sílice (-CN, -NH<sub>2</sub>, -Diol). La retención del analito se produce por las interacciones entre los grupos funcionales polares del analito y los grupos polares de la superficie del sorbente. Las interacciones son hidrofílicas e incluyen uniones hidrógeno, interacciones  $\pi - \pi$ , dipolo-dipolo, dipolo-dipolo inducido, entre otras. Un compuesto adsorbido por este mecanismo se eluye mediante un

solvente más polar que la matriz original (donde estaba contenido el analito) (Bulletin 910–Supelco, 1998).

- *Intercambio iónico:* Las retenciones por intercambio iónico se utilizan para compuestos iónicos contenidos en matrices usualmente acuosas, a veces orgánica. El mecanismo de retención se basa principalmente en la atracción electrostática de los grupos funcionales cargados de los analitos con los grupos funcionales cargados unidos a la sílice.

Para retener un compuesto mediante intercambio iónico, es fundamental que el pH del medio permita que los grupos funcionales del analito y de la superficie de la sílice presenten carga neta, y que la carga sea opuesta entre ellos. Además, el pH no debe permitir que otros compuestos se carguen, para que no interfieran en el proceso de retención.

Como solvente de elución, se utiliza una solución con un pH que neutralice los grupos funcionales del compuesto de interés o los grupos funcionales unidos a la sílice, permitiendo que se rompan las fuerzas electrostáticas que los unen. También puede utilizarse una solución con elevada fuerza iónica o una solución que contenga especies iónicas que reemplacen al analito de interés retenido (Bulletin 910–Supelco, 1998).

#### 3.4.4.3.4 Metodología de extracción en fase sólida para discos y cartuchos

La extracción en fase sólida es un proceso que implica cinco pasos fundamentales, tanto para los cartuchos como para los discos:

**Paso 1:** Seleccionar una fase sólida apropiada, en cartucho o disco.

Se recomienda el uso de los discos cuando se dispone de un gran volumen de muestra conteniendo grandes cantidades de partículas, o cuando se necesita grandes velocidades de flujo (Bulletin 910–Supelco, 1998). 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 sorbente polar o no polar, unido a sílice, es menor al 1 % de la masa del sorbente y ocasionalmente excede el 5 %, dependiendo de la naturaleza del sorbente, analito y matriz. Para polímeros, la capacidad puede ser mucho mayor (Varian Analytical Instruments, 2001-2002). Es importante destacar que, si se utiliza gran cantidad de sorbente, se puede extraer gran cantidad de analito, pero demandará una mayor cantidad de solvente para su elución. Por lo tanto, la concentración del analito en el eluído será menor que si se usa una cantidad de sorbente inferior.

En un sorbente de intercambio iónico, la capacidad está definida como el número de sitios iónicos que pueden interactuar con especies iónicas de la muestra.

**Paso 2:** Acondicionar el cartucho o disco.

Mediante solvatación se prepara al cartucho o disco 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, usualmente, se acondiciona pasando un volumen apropiado de agua, seguido por un volumen de un solvente orgánico miscible en agua (por ejemplo, metanol) y por último agua o una solución reguladora acuosa. En algunos casos, se utiliza un solvente de pre-acondicionamiento antes del lavado con metanol. Este solvente es, generalmente, el mismo que el solvente de elución, y se usa para eliminar alguna impureza del sorbente que pueda interferir en el análisis y que sea soluble sólo en solventes de elución fuertes.

Para extracciones en fase normal se utiliza el mismo solvente orgánico en el que está disuelta la muestra (Bulletin 910–Supelco, 1998). En extracciones por intercambio iónico con matrices no polares se utiliza el mismo solvente orgánico de la muestra. Para matrices polares se utiliza agua, luego un solvente orgánico miscible en agua, y por último una solución acuosa con pH y fuerza iónica adecuados. En el caso de discos se necesita un volumen entre 5 y 10 mL (Bulletin 910–Supelco, 1998).

**Paso 3:** Transferir la muestra al cartucho o disco 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 sorbente y para evitar el taponamiento del 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 determinadas matrices es necesario realizar un paso previo de acondicionamiento, que puede consistir en un proceso de precipitación, centrifugación y/o filtración o en ajustar el contenido de solvente orgánico, pH y/o fuerza iónica.

La muestra debe pasarse, a través del cartucho, con una velocidad de flujo apropiada, ya que puede afectar la retención de ciertos compuestos (Bulletin 910–Supelco, 1998).

**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. En el caso de discos se necesitan entre 5 y 10 mL (Bulletin 910–Supelco, 1998).

**Paso 5:** Eluir el compuesto de interés.

La mínima cantidad de solvente de elución, necesaria para eluir al analito, esta definida como 2 veces el volumen de elución del sorbente que corresponde a 120  $\mu$ L por 100 mg de sorbente (Varian Analytical Instruments, 2001-2002).

Para la elución del analito se utiliza una solución que rompa las interacciones entre el analito y el sorbente, pero que deje retenidas las impurezas que no pudieron eliminarse en el paso de lavado. El eluido se recolecta para su posterior análisis.

Para que la elución sea más eficiente es conveniente utilizar dos alícuotas del volumen total de elución, en vez de una sola. Además, la eficiencia aumenta cuando el tiempo de contacto del solvente con el sorbente es de 20 a 60 seg. Tiempos de contacto muy breves o muy elevados no son beneficiosos (Bulletin 910–Supelco, 1998).

Por último, puede evaporarse el eluido y resuspenderse en otro solvente compatible con la técnica de análisis (para analitos volátiles este paso no sería recomendable).

#### 3.4.4.3.5 Ventajas y Desventajas

El amplio rango de fases sólidas disponibles en el mercado posibilita una correcta elección de acuerdo con la *selectividad* que se desee, permitiendo la extracción de todos los compuestos de matrices acuosas u orgánicas. También se dispone de varios *sistemas manuales y automáticos*, en discos, cartuchos y microfibras, con la posibilidad de automatización y acople al sistema de separación (Kataoka, 2003).

Se pueden utilizar *pequeñas y grandes cantidades de muestra*, sobre todo muestras medioambientales, como agua de río o provenientes de una planta de tratamiento de efluentes que poseen analitos en muy baja concentración (Puig y col., 2007-b)

Pueden analizarse muestras con *diferentes matrices*, sin la aparición de problemas de formación de emulsiones y burbujas, como sucede en ELL. La EFS usualmente se utiliza para acondicionar *muestras líquidas*, pero también puede utilizarse con *sólidos* previamente extraídos con solventes (Bulletin 910, Supelco, 1998).

El uso de cartuchos o discos *descartables* evita el contacto físico del analista con la muestra, sobre todo cuando se trabaja con fluidos corporales como sangre u orina, minimizando los riesgos sobre la salud humana (Smith, 2003).

La principal desventaja del método de EFS es que, en determinadas ocasiones, el extracto final no es compatible con el sistema analítico, por lo tanto, el solvente debe evaporarse y el residuo resuspenderse en un solvente o solución adecuada. Esto limita su uso sólo para analitos no volátiles.

Además, debido a que en EC se inyectan volúmenes en el orden de los nanolitros, sólo se ingresa dentro del capilar una pequeña porción del eluido (o del residuo resuspendido) (Puig y col., 2007-a)

La EFS no es un proceso económico, ya que los cartuchos y los discos están diseñados para utilizarse una sola vez y luego descartarse (Smith, 2003).

#### **3.4.4.4 Microextracción en fase sólida (MEFS)**

La técnica de MEFS se desarrolló en 1990 por Arthur y Pawliszyn (Arthur y Pawliszyn, 1990). Se aplicó, inicialmente, sólo al análisis de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles, preferentemente en muestras limpias (como aire y agua). En la actualidad, se utiliza para analizar una amplia variedad de compuestos en matrices sólidas, líquidas y gaseosas. Es útil en el análisis de proteínas, compuestos polares y no polares, fármacos, surfactantes, pesticidas y para la extracción de compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles de muestras medioambientales, biológicas y de alimentos.

La MEFS es una miniaturización de la EFS. Sus mecanismos de extracción son similares y la única diferencia está en el volumen del extractante.

La MEFS proporciona extractos más limpios que los métodos basados ELL y EFS. Es una innovadora tecnología libre del uso de solventes que permite no sólo la extracción de los analitos sino también su concentración, mejorando el límite de detección de la técnica.

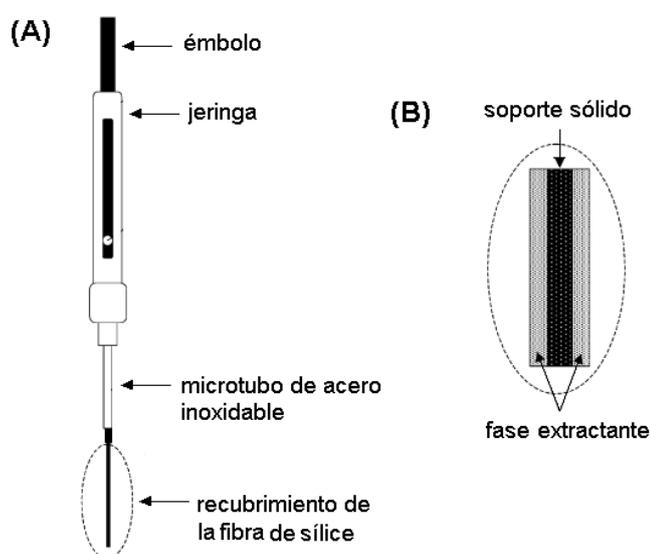
La geometría del extractante permite la combinación de todas las etapas involucradas en la preparación de la muestra en un sólo paso, facilitando la introducción de la muestra dentro del equipo de detección. La MEFS puede acoplarse a equipos de CLAR, CL-MS o CG mediante interfases diseñadas con cámaras para la desorción de los analitos. (Kataoka, 2003)

##### **3.4.4.4.1 Fundamento de la metodología de MEFS**

La extracción se basa en la partición del analito entre la fase inmovilizada en una fibra de sílice fundida y la matriz (aire, agua, sangre, orina, etc.). La fibra se ubica en el

extremo de una jeringa y está protegida dentro de un microtubo de acero inoxidable. La fibra puede estar en dos posiciones, dentro y fuera del microtubo (Figura 3.13 A). Durante la extracción, la fibra se pone en contacto con la matriz, los analitos se adsorben en el recubrimiento de la fibra (Figura 3.13 B) y luego de un tiempo determinado son desorbidos por exposición de la fibra a un solvente de extracción (Ulrich, 2000; Junting y col., 1998; Wardencki y col., 2007, Kumazawa y col., 2003, Bulletin 923–Supelco, 1998).

**Figura 3.13:** Microjeringa comercial para la extracción en fase sólida (figura extraída de Kumazawa y col., 2003).



La MEFS tiene dos variantes: *MEFS directa por inmersión* de la fibra dentro de la muestra acuosa y por exposición de la fibra en el *espacio cabeza* (HS del inglés *Headspace*). El HS es la parte superior del líquido o del sólido.

Cuando los analitos poseen una presión de vapor baja (peso molecular entre 150 y 450 g mol<sup>-1</sup>) y cuando tienen grupos hidrofílicos en la molécula, la concentración de analito en el HS es baja, siendo lenta la transferencia a la fibra a temperatura ambiente. El aumento de temperatura, en algunos casos, ocasiona la desnaturalización de proteínas o la descomposición del analito. Por este motivo, se prefiere la utilización de MEFS directa.

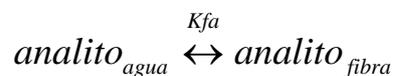
La baja presión de vapor de los analitos permite almacenar la fibra después de la extracción, durante un tiempo determinado. El *tiempo de almacenamiento* es el tiempo máximo que pueden estar retenidos los analitos en la fibra, antes de la extracción. Esto es útil cuando la extracción se realiza en un lugar alejado del equipo de análisis. En MEFS-HS la transferencia del analito al equipo debe ser inmediatamente después de la extracción, debido a que la elevada presión de vapor de los analitos puede ocasionar su pérdida durante el tiempo de almacenamiento.

Cuando se dispone de muestras biológicas, es conveniente realizar la extracción en el HS, ya que se previene la contaminación de la superficie de la fibra con polímeros orgánicos. De esta manera, se incrementa el tiempo de vida útil de la fibra (Ulrich, 2000).

#### 3.4.4.4.2 Proceso de extracción

La cantidad de analito extraído depende de su coeficiente de partición entre la matriz y el recubrimiento de la fibra. Para entender los factores que influyen en la MEFS es necesario comprender la termodinámica de los analitos en el paso de extracción.

Existe un equilibrio entre el analito en la matriz acuosa y en la fibra, gobernado por una constante de equilibrio ( $K^{fa}$ , *Ecuación 3.5*):



$$\text{siendo } K^{fa} = \frac{C_f}{C_a} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

donde  $K^{fa}$  es la constante de equilibrio entre  $C_f$  (concentración de equilibrio de analito en la fibra) y  $C_a$  (concentración de equilibrio del analito en la muestra). La  $K^{fa}$  también puede expresarse de acuerdo con la *Ecuación 3.6*:

$$K^{fa} = \frac{n_f \times V_a}{n_a \times V_f} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

donde  $n_f$  es el número de moléculas de analito en la fibra en el equilibrio,  $V_a$  es el volumen de la muestra,  $n_a$  el número de moléculas de analito en la muestra en el equilibrio y  $V_f$  el volumen del recubrimiento de la fibra. A partir de la *Ecuación 3.6* y teniendo en cuenta que  $n_0 = n_a + n_f$ , siendo  $n_0$  el número de moléculas total de analito, se puede obtener la *Ecuación 3.7*:

$$n_f = \frac{K^{fa} \times n_0 \times V_f}{(V_a + K^{fa} \times V_f)} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

De acuerdo con la *Ecuación 3.7*, existe una relación lineal entre  $n_f$  y  $n_0$ . La MEFS es una extracción de equilibrio y no una extracción exhaustiva. Por lo tanto, es evidente que se obtengan bajas recuperaciones. La máxima recuperación se calcula mediante la *Ecuación 3.8*:

$$\text{m}{\acute{a}}x\text{ima recuperaci}{\acute{o}}n = \frac{n_f}{n_0} = \frac{K^{fa} \times V_f}{(V_a + K^{fa} \times V_f)} \quad \text{Ecuaci}{\acute{o}}n \text{ 3.8}$$

El valor de  $K^{fa}$  esta influenciado por la temperatura, la concentraci3n de sal, el pH y la presencia de solventes orgánicos (Ulrich, 2000). La influencia de estos factores, se describe a continuaci3n:

- *Temperatura*

La influencia de la temperatura se explica con las siguientes ecuaciones:

$$K^{fa} = K_0^{fa} \times e^{\left\{ \frac{-\Delta G^{fa}}{R} \times \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_0} \right) \right\}} \quad \text{Ecuaci}{\acute{o}}n \text{ 3.9}$$

$$\Delta G^{fa} = G^f - G^a \quad \text{Ecuaci}{\acute{o}}n \text{ 3.10}$$

$$\ln \frac{K^{fa}}{K_0^{fa}} = \frac{-\Delta G^{fa}}{R} \times \left( \frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_0} \right) \quad \text{Ecuaci}{\acute{o}}n \text{ 3.11}$$

En las *Ecuaciones 3.9 y 3.11*  $K_0^{ka}$  es la constante en el equilibrio a la temperatura inicial ( $T_0$ ) y  $\Delta G^{fa}$  es la entalpía libre de transferencia del analito entre las dos fases. Debido a que las moléculas orgánicas interfieren con las interacciones intermoleculares del agua, su entalpía libre ( $G^a$ ) es mayor que la entalpía de la fibra ( $G^f$ ). Por lo tanto, la  $\Delta G^{fa}$  es negativa.

Un cambio de temperatura se traduce en una disminuci3n de la  $K^{fa}$  y por lo tanto, en una disminuci3n de la cantidad de analito extraído por la fibra. En general, para extracciones por inmersi3n directa se trabaja a temperatura ambiente.

Por otra parte, el aumento de temperatura disminuye la viscosidad del medio, aumentando el coeficiente de difusi3n de los analitos. Esto permite disminuir el tiempo de agitaci3n, aunque a costa de perder sensibilidad. No obstante, si la temperatura es muy alta, se puede expulsar a los analitos de la fibra, reduciendo la sensibilidad. Este comportamiento sucede generalmente cuando se usan muestras líquidas y fibras absorbentes como polidimetilsiloxano (PDMS).

El uso de calentamiento durante las extracciones en el HS ayuda al movimiento de los analitos desde la muestra hacia el HS (debido al aumento de su volatilidad), mejorando la sensibilidad y acortando el tiempo de agitaci3n. Las temperaturas que se utilizan varían de 45 a 100 C (Ulrich, 2000).

- *Adición de sal*

La relación entre  $K^{fa}$  y la concentración de sal ( $c_s$ ) se expresa por la *Ecuación 3.12*:

$$\ln \frac{K^{fa}}{K_0^{fa}} = k_s \times c_s \quad \text{Ecuación 3.12}$$

donde  $K^{fa} = K_0^{fa}$  cuando  $c_s=0$ . Si se incrementa la concentración de sal, aumenta la  $K^{fa}$  ( $K_0^{fa}$  es constante), y por lo tanto, la cantidad de analito extraída. Este comportamiento no siempre se verifica en muestras reales.

La adición de sal (un 25-30 % (w/v) de NaCl) incrementa la fuerza iónica del medio y reduce la solubilidad de algunos analitos (efecto *salting-out*). Dependiendo de la naturaleza del compuesto, puede incrementar su afinidad por el recubrimiento de la fibra.

El uso de altas concentraciones de sal disminuye el tiempo de vida útil de la fibra. Su estabilidad disminuye a causa de la cristalización de sales en el recubrimiento.

Muchos autores usan un 20 % (w/v) de sal, aunque, es conveniente utilizar sólo un 10 % para obtener buena eficiencia en la extracción sin perder estabilidad en la fibra (Ulrich, 2000).

- *Adición de solventes orgánicos*

Para el agregado de solventes orgánicos se verifica que disminuye la  $K^{fa}$  y, por lo tanto, el número de moléculas de analito extraídas.

El uso de aditivos orgánicos es útil para matrices con compuestos poliméricos (como plasma), debido a que disminuye la unión de los analitos de interés con las proteínas presentes en la muestra.

- *Influencia del pH*

La relación entre el pH y  $K^{fa}$  está descrita por las *Ecuaciones 3.13* y *3.14*:

$$\log \left( \frac{K_0^{fa}}{K^{fa}} - 1 \right) = pH - pKa \quad \text{Ecuación 3.13 para ácidos}$$

$$\log \left( \frac{K_0^{fa}}{K^{fa}} - 1 \right) = pH + pKa - 14 \quad \text{Ecuación 3.14 para bases}$$

Cuando el pH se aleja cada vez más del pKa del analito, el término  $(pH - pKa)$  de la *Ecuación 3.13* aumenta y por lo tanto, también lo hace el cociente  $(K_0^{fa} / K^{fa})$ . Como  $K_0^{fa}$  es constante, para que se mantenga la igualdad, la  $K^{fa}$  aumenta y de acuerdo con la *Ecuación 3.6*, el número de moléculas extraídas por la fibra es mayor.

Si los analitos a extraer presentan comportamientos ácido-base, el fenómeno de partición entre la fibra y la muestra será fuertemente influenciado por el pH. Para favorecer la afinidad del analito por la fibra, se debe disminuir la solubilidad en el medio. En este contexto, se debe ajustar el pH de la muestra a un valor donde la molécula de analito se encuentre en su forma neutra.

No obstante, se debe tener especial cuidado de no trabajar a pHs extremos, ya que a valores de pH menores a 2 y mayores a 10 se puede dañar el recubrimiento de la fibra cuando se utiliza MEFS por inmersión (Ulrich, 2000).

- *Agitación*

Si todas las moléculas de analito tuviesen el mismo acceso al recubrimiento de la fibra, es decir, si existiese un modelo de perfecta agitación, el tiempo en que se llegaría al equilibrio ( $t_e$ ) estaría dado por la *Ecuación 3.15*:

$$t_e = t_{95\%} = \frac{(r_0 - r_i)^2}{2D_f} \quad \text{Ecuación 3.15}$$

donde  $r_0$  es el radio externo de la fibra,  $r_i$  es el radio interno de la fibra y  $D_f$  es el coeficiente de difusión de analito en la fibra.

Pero no todos los analitos tienen un acceso simultáneo al recubrimiento. Existe un límite alrededor de la fibra, llamado  $\delta$ , donde la agitación no llega. La agitación perfecta ocurre sólo afuera de ese límite. Cuanto mayor sea la velocidad de agitación menor será el radio  $\delta$  y más rápido se llegará al equilibrio. Por consiguiente, el tiempo máximo en el que se llega al equilibrio se explica a través de la *Ecuación 3.16*:

$$t_e = t_{95\%} = 3 \times \delta \times K^{fa} \frac{(r_0 - r_i)}{D_a} \quad \text{Ecuación 3.16}$$

Reordenando los términos de la *Ecuación 3.16* se obtiene la *Ecuación 3.17*:

$$K^{fa} = \frac{t_e \times D_a}{3 \times \delta \times (r_0 - r_i)} \quad \text{Ecuación 3.17}$$

El tiempo de equilibrio es mayor para valores altos de  $K^{fa}$ , para grandes espesores de la fibra ( $r_0 - r_i$ ) y para bajos coeficientes de difusión del analito en la muestra ( $D_a$ ).

La agitación de la muestra puede realizarse con un agitador magnético, con vortex (movimiento del vial), por vibración de la fibra, por agitación a través de flujo o mediante sonicado. El problema de la agitación magnética es mantener constante la velocidad. La agitación por movimiento del vial o por vibración de la fibra tiene la ventaja de que no se colocan objetos externos a la muestra, aunque no se puede usar en extracciones en el espacio cabeza debido a que este modo de agitación es menos efectivo.

La agitación para matrices biológicas debe ser importante, debido a la viscosidad de la muestra y a los bajos coeficientes de difusión de los analitos. Sin embargo, se debe destacar que llegar al equilibrio no es un pre-requisito para un método cuantitativo (Ulrich, 2000).

- *Tiempo de agitación*

Es un parámetro crítico que permite llegar al equilibrio. Si se varía el tiempo de contacto de la fibra con la muestra, antes del equilibrio, se modifica la cantidad de analito que se adhiere a la fibra. En el equilibrio esa concentración es constante.

Las extracciones comunes se realizan entre 15 y 20 minutos, pero pueden extenderse hasta 30 minutos o más. El tiempo de agitación puede reducirse si se trabaja con compuestos pequeños (peso molecular  $< 150 \text{ g mol}^{-1}$ ) o usando recubrimientos de fibra delgados. En la extracción en el HS se emplea un tiempo de agitación menor que las extracciones por inmersión.

El tiempo máximo de agitación puede obtenerse experimentalmente cuando, con el aumento en el tiempo de agitación, no se observa un incremento en la señal del analito. En el análisis de muestras biológicas estos tiempos suelen ser muy altos. Por este motivo, es que a veces se trabaja con tiempos menores al tiempo de equilibrio.

- *Recubrimiento de la fibra*

La elección del recubrimiento de la fibra en MEFS es el primer paso en el desarrollo del método de extracción. La sensibilidad de la técnica depende principalmente del coeficiente de partición del analito entre la muestra y la fase estacionaria.

La fibra es de sílice de 1 cm de longitud y puede estar recubierta por un polímero líquido, un sólido o por una combinación de ambos.

En el mercado se encuentran disponibles varios tipos de recubrimientos (Tabla 3.1) y pueden consistir en uno o dos polímeros: PDMS (Polidimetilsiloxano), PA (Poliacrilato) (polímeros simples), Carboxen-PDMS (polímero doble) o un polímero combinado con una fase sólida como PDMS-divinilbenzeno (PDMS-DVB) o Carbowax-DVB. También existen fases compuestas por tres componentes: dos polímeros combinados con un sólido (DVB-Carboxen-PDMS).

**Tabla 3.1:** Recubrimientos de fibras para la MEFS disponibles en el mercado.

Tipos de fibra	Tipo de recubrimiento	Polaridad del recubrimiento
Polidimetilsiloxano (PDMS)	Polimérico simple	Fase no polar
Poliacrilato (PA)	Polimérico simple	Fase polar (ideal para fenoles)
Carbowax/Divinilbenzeno (CW/DVB)	Polímero + sólido	Fase polar (ideal para alcoholes)
Carboxen/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)	Polímero doble	Bi-polar (ideal para analitos gaseosos/ volátiles)
Polidimetilsiloxano/ Divinilbenzeno (PDMS/DVB)	Polímero + sólido	Bi-polar (ideal para aminas)
DVB/Carboxen/PDMS (DVB/CAR/PDMS)	Polímero doble + sólido	Bi-polar (amplio rango de polaridades)

El recubrimiento de la fibra es el que va a recoger los compuestos de la muestra por **absorción** en el caso de revestimientos líquidos o **adsorción** en el caso de revestimientos sólidos.

Para la selección del recubrimiento se deben aplicar dos reglas:

**a)** La polaridad del recubrimiento debe ser la misma que la polaridad del analito, de acuerdo con la regla “lo similar atrae a lo similar”. El número de grupos formadores de uniones hidrógeno es una propiedad especial de los analitos (por ejemplo, el número de grupos NRH, NH<sub>2</sub> y OH). Estos grupos determinan la hidrofiliidad de los analitos, y por lo tanto la afinidad por la fibra.

**b)** Como segunda regla, el recubrimiento debe ser química y físicamente resistente (a pH extremos, al agregado de sales o de solventes orgánicos y a las variaciones de temperatura). El polímero PDMS es el recubrimiento más resistente en MEFS y su eficiencia es alta, aún después de varias extracciones y desorciones. El polímero PA puede ser más eficiente, en el caso de analitos más polares, aunque este recubrimiento se daña más fácilmente que el de PDMS. Los recubrimientos PDMS-DVB y Carbowax-DVB se utilizan, comúnmente, para la extracción de compuestos volátiles.

El espesor del recubrimiento se selecciona teniendo en cuenta la eficiencia requerida en el análisis (% de recuperación), el tiempo de agitación y la naturaleza del analito. Cuanto más delgado es el recubrimiento, más rápido se llega al equilibrio, aunque la recuperación es menor. Los espesores de fibras comerciales tienen valores de 7, 30, 65,75, 85 y 100 µm.

Las fibras con mayor espesor de recubrimiento (100  $\mu\text{m}$ ) son óptimas para analitos volátiles, ya que permiten el transporte hacia el sistema de análisis minimizando la pérdida de analito. Las fibras con recubrimientos más delgados (PDMS de 7 y 30  $\mu\text{m}$ ) son óptimas para moléculas más grandes.

- *Volumen de la muestra*

La cantidad de analito extraído en el equilibrio se incrementa con el aumento del volumen de la muestra  $V_M$ , de acuerdo con la *Ecuación 3.18*:

$$n_f = \frac{K^{fa} \times n_0 \times V_M}{(V_a + K^{fa} \times V_M)} \quad \text{Ecuación 3.18}$$

Cuando se llega al equilibrio, el recubrimiento se satura y la cantidad de analito extraído no se incrementa. En la práctica, el volumen a utilizar está determinado por la cantidad de muestra disponible y por el tamaño de los viales.

Para extracciones por inmersión, la sensibilidad se mejora cuando el vial se llena hasta un 80 % como mínimo de su capacidad total. Lo recomendable es trabajar con volúmenes entre 1 y 5 mL y usar el mismo volumen para todas las extracciones, para obtener resultados reproducibles. Aunque cuanto menor el volumen de muestra más rápido se llega al equilibrio.

Cuando se utilizan muestras que contienen azúcares, proteínas y partículas de materia, es recomendable lavar la fibra con agua antes de la desorción. Este procedimiento extiende su tiempo de vida útil y evita contaminaciones.

Para extracciones en el espacio cabeza, la sensibilidad es mayor cuando ese espacio es menor. Se recomienda que el HS sea entre el 30 y el 50 % del volumen del vial.

Otra consideración importante es mantener la fibra en el mismo lugar durante todas las extracciones.

#### 3.4.4.4.3 Proceso de desorción

La elección de los parámetros de desorción es tan importante como la de los parámetros de la extracción. En CG, generalmente, se utiliza desorción termal, pero en CLAR o EC la desorción se realiza con un solvente apropiado.

Una vez que se realizó la extracción de los analitos, la fibra se coloca dentro de una interfase, que contiene un *solvente de remojo*. Dicho solvente tiene la función de desorber al analito durante un tiempo determinado, llamado *tiempo de remojo*. Luego se gira una válvula a la posición de inyección para permitir que la fase móvil (FM) ingrese dentro de la cámara de desorción. La FM es la que va a arrastrar el volumen de solvente de remojo con los

analitos desorbidos, y los va a ingresar dentro de la columna. Este proceso se realiza en un tiempo determinado llamado *tiempo de extracción*. Luego se gira la válvula a la posición inicial. Este modo de desorción se llama **estático**.

Por el contrario, el modo **dinámico** consiste en colocar la fibra (luego de extraer los analitos) dentro de la cámara e inmediatamente girar la válvula en la posición de inyección. De esta manera, la FM pasa a través de la cámara y extrae a los analitos de la fibra durante un tiempo determinado. Luego se vuelve a girar la válvula a su posición inicial.

#### 3.4.4.4 Ventajas y Desventajas

Las principales **ventajas** de la MEFS son su simplicidad, rapidez y sensibilidad. Además, requiere poca cantidad de muestra (de 0.1 a 1.0 mL como mínimo), se requiere poco equipamiento, de bajo costo y que puede automatizarse. Es una técnica de extracción libre de solventes, lo que evita la contaminación del medio ambiente con reactivos orgánicos. También es muy útil para el muestreo en campo. A menos que la matriz de la muestra sea muy compleja, la fibra puede reutilizarse varias veces si se realiza un correcto proceso de limpieza (Smith, 2003, Junting y col., 1998).

La volatilidad de los compuestos no es un factor limitante, debido a que se puede utilizar la extracción en el espacio cabeza.

En relación a las **desventajas**, el análisis de fluidos biológicos no suele resultar muy simple, debido a la presencia de biopolímeros disueltos o de otros compuestos interferentes. La concentración de analito unido a la fibra puede modificarse a causa de una competencia entre la molécula interferente y el analito de interés por la fibra.

Como la fibra entra en contacto con la matriz de la muestra, existe la posibilidad de co-extraer otros componentes además de los de interés. Asimismo, pueden existir efectos residuales indeseables a causa de una ineficiente limpieza de la fibra, limitando su tiempo de vida útil. En algunos casos, el proceso de extracción puede ser bastante lento, ya que el analito tiene que difundir hacia el interior del recubrimiento (Smith, 2003).

#### 3.4.4.5 Extracción en barra magnética (EBM)

Debido a que el recubrimiento de la fibra en MEFS es bastante pequeño, la extracción es incompleta, aún llegando al estado de equilibrio. Existe una alternativa para solucionar este inconveniente, conocida como **extracción en barra magnética**, donde se utiliza una barra magnética recubierta con material extractante como PDMS. El espesor del recubrimiento de la barra (de 0.3 a 1.0 mm) es mucho mayor que el de la fibra, permitiendo aumentar el área de adsorción.

Esta técnica es compatible con los procesos de desorción de CG y CLAR. Teóricamente es más sensible que la MEFS con fibras, pero sólo para ciertas aplicaciones debido a que se requiere de un sistema especial para la desorción, difícil de automatizar (Kataoka, 2003, Smith, 2003).

### 3.4.5 Pre-concentración mediante metodologías acopladas

Para acoplar un método para la preparación de la muestra y pre-concentración del analito a equipos de EC comerciales, se necesita de la inserción de una **interfase** entre el capilar y el eluido proveniente del método de tratamiento de la muestra. En algunos casos, se requiere de un programa de computación específico (Santos y col., 2006).

### 3.4.6 Pre-concentración mediante metodologías integradas

La integración de los métodos para la preparación de la muestra a equipos comerciales de EC ofrece importantes ventajas en comparación con los métodos acoplados, sobre todo porque no se necesita equipamiento especial ni programas de computación adicionales. La integración puede realizarse dentro del capilar, en el vial o en una parte auxiliar del equipo, como por ejemplo en el sistema de renovación de la SRC (Santos y col., 2006).

#### 3.4.6.1 Dentro del capilar

##### 3.4.6.1.1 Fases pseudo-estacionarias poliméricas

Se utilizan moléculas que forman *dímeros*, *trímeros* o *una red polimérica* como polivinilos, poliacrilatos, siloxanos, entre otros. Dependiendo del tipo de molécula puede existir una asociación mayor y formar *micelas*, *bicapas* o *vesículas*. Son ejemplos los surfactantes aniónicos como dodecilsulfato de sodio (SDS), catiónicos como sales de tetraalkilamonio, bromuro de cetil-hexadecil-decil trimetilamonio (CTAB, HTAB, DTAB respectivamente), no iónicos como Tween, Tritón y zwitteriónicos como octilglucósidos (Bilek y col., 2006; Palmer y Mc. Carney, 2004, Liu y col., 2006; Nishi y Kuwahara, 2002).

Determinadas moléculas, como surfactantes catiónicos, modificadores como metilcelulosa o hidroxipropil celulosa, polímeros lineales hidrofílicos, liposomas entre otras, pueden adsorberse en la pared interna del capilar (por unión con los grupos silanoles) y disminuir el potencial  $\zeta$ . De esta manera revierten, minimizan o eliminan el FEO. También evitan o reducen adsorciones indeseables de moléculas interferentes y posibilitan la interacción de los analitos con la fase inmobilizada.

Por otro lado, cuando estas moléculas se adicionan a la SRC, actúan como fase pseudo-estacionaria (FPE). Cuando se aplica voltaje de separación, la FPE se mueve a lo largo del capilar e interacciona con los analitos de interés favoreciendo su pre-concentración.

3.4.6.1.2 Fases estacionarias sólidas (Tempels, 2008; Puig y col., 2007-b; Santos y col., 2006).

Es posible integrar sistemas de extracción en fase sólida mediante:

- *Columnas empacadas con partículas cromatográficas*

La estrategia de realizar el proceso de preparación de la muestra y su concentración dentro del capilar se publicó por primera vez en 1991 por Guzmán y colaboradores. Desde entonces se publicaron muchos avances con respecto al tema demostrando la utilidad de esta técnica (Benavente y col., 2007; Saavedra y col., 2007; Vizioli y col., 2004; Visser y col., 2003; Petersson y col., 1999).

En la actualidad, se conoce como metodología cromatográfica *on-line* (Santos y col., 2006) y es la metodología más utilizada hasta el momento, debido a que emplea una fase estacionaria similar a CLAR.

La estrategia consiste en adicionar un microcartucho concentrador, conteniendo partículas cromatográficas (sorbente de extracción), en una porción del capilar.

- *Discos/membrana*

Entre dos capilares angostos, se coloca una porción de membrana impregnada con fase estacionaria o modificada con material adsorbente. Con esta metodología se pueden utilizar altas velocidades de flujo y pequeños volúmenes de elución (Puig y col., 2007-a).

- *Columnas monolíticas*

El uso de las columnas monolíticas se publicó por primera vez por Hjertén y colaboradores en 1989. Para construir la columna, el capilar se llena con una mezcla de monómeros, luego se inicia la polimerización mediante calor o luz UV y se forma un relleno poroso. Existen columnas monolíticas de sílice (inorgánica) como micro esferas de sílice octadeciladas y de polímeros (orgánica) como acrilato, metacrilato, poliestireno, poliacrilamida, polietileno, polipropileno, polivinilos, entre otros (Puig y col., 2007-a; Armenta y col., 2007; Svec, 2006; Santos y col., 2004; Quirino y col., 2001; Yu y col., 2001; Zhang y col., 2006-a; Zhang y col., 2003).

La elevada porosidad de las columnas monolíticas permite obtener una baja resistencia al flujo y una buena transferencia de masa. Otra ventaja es que el tamaño del poro se controla modificando las condiciones de reacción (tiempo de reacción y temperatura, naturaleza del radical iniciador, naturaleza del monómero).

- *Columnas tubulares abiertas*

Se utiliza una pieza de capilar cuyas paredes están recubiertas con una fase estacionaria. Esta sección integrada al sistema de EC, funciona como una columna donde se retienen los analitos.

Una variante a esta metodología implica la combinación de dos capilares con diferentes diámetros internos, uno está destinado a la separación y el otro a la pre-concentración (Puig y col., 2007-a).

#### **3.4.6.2 Dentro del vial**

Las metodologías de pre-concentración dentro del vial dependen de las dimensiones del vial y de la configuración del capilar con el electrodo.

Nozal y colaboradores (Nozal y col., 2006) desarrollaron un dispositivo para realizar micro-extracción. La metodología consiste en ensamblar una micro-membrana dentro del vial que contiene a la muestra. La extracción de los analitos se realiza por un proceso de difusión a través de la membrana o por migración electrocinética por aplicación de voltaje.

Este sistema permite analizar compuestos presentes en matrices complejas evitando el tratamiento previo de la muestra.

#### **3.4.6.3 En el sistema de renovación de la solución reguladora de corrida**

El sistema de renovación de la SRC es un reservorio del equipo de electroforesis que contiene SRC y permite que dicha solución se renueve entre las corridas con el objetivo de evitar la contaminación en corridas posteriores.

El sistema de pre-concentración incluye una micro-columna que contiene un sorbente donde se retiene el analito. La micro-columna se conecta, a través de una aguja, al vial que contiene la muestra y mediante una válvula a las dos botellas del sistema renovación de la SRC.

## 4 HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS

---

### 4.1 Diseño y Análisis de experimentos

#### 4.1.1 Introducción

La quimiometría utiliza métodos matemáticos, estadísticos y otros basados en la lógica, para resolver problemas en el campo de la química y en particular de la química analítica. La quimiometría se puede dividir en tres áreas generales (Massart, 1997):

- Optimización de los procedimientos experimentales y mediciones químicas
- Calibración, validación y significancia de las mediciones analíticas
- Extracción de la máxima información química de los datos analíticos

El análisis clásico, donde la respuesta se investiga para cada variable, manteniendo el resto de las variables en un nivel constante, implica el consumo de mucho tiempo y esfuerzo. En muchos casos la existencia de interacciones entre las distintas variables hace que la estrategia sea inaplicable.

La manera más eficiente de mejorar el valor de la investigación y disminuir el tiempo en desarrollo de un método, es realizar un proceso de *optimización* a través de la utilización de un *diseño experimental*.

Los motivos para optimizar y aplicar diseños en química analítica son numerosos. A menudo, se optimiza el rendimiento de un proceso analítico con respecto a un criterio de calidad analítico, como precisión, sensibilidad, límite de detección, robustez, etc. Además, con frecuencia, el experimentador busca disminuir el tiempo total del análisis y disminuir los costos totales de un proceso.

Se puede optimizar un problema analítico o un instrumento analítico, y esa optimización se realiza mediante el estudio de un número limitado de factores. Un *factor* es cualquier aspecto de las condiciones experimentales que influye en el resultado obtenido en un experimento. Se entiende por *niveles de un factor* a los diferentes valores que dicho factor toma. El *efecto de un factor* se define como el cambio en la respuesta producida por un cambio en el nivel del factor y se conoce como *efecto principal* porque se refiere a los factores de interés fundamentales del experimento.

Los factores se pueden clasificar en:

- *Controlados*, cuando el experimentador lo puede alterar a voluntad.
- *Incontrolados*, cuando el experimentador no lo puede alterar a voluntad (condiciones externas medioambientales, como presión, temperatura, humedad).
- *Cualitativos*, cuando sus posibles valores no se pueden ordenar numéricamente. Se conocen comúnmente como factores *categoricos*.
- *Cuantitativos*, cuando sus posibles valores se pueden ordenar numéricamente.
- *Conocidos*, cuando conociendo exhaustivamente el problema analítico se pueden seleccionar los factores más importantes. En electroforesis capilar, por lo general, se investigan factores tales como la naturaleza y concentración de la SRC, su pH, la concentración de aditivos (solventes orgánicos, selectores quirales, surfactantes, etc.), la temperatura, el voltaje aplicado, entre otros (Heyden y col., 2001). En CLAR los factores importantes son los constituyentes de la fase móvil y su concentración.
- *Desconocidos*, cuando debido a la complejidad de muchos problemas analíticos, aparecen factores que el experimentador desconoce y pueden afectar a la respuesta. A veces, se puede suponer los efectos de un factor, pero esto debe confirmarse mediante la realización de una pre-visualización o selección apropiada.

El estudio de todos los factores potenciales es imposible, sólo se pueden investigar los efectos de los factores seleccionados y los restantes factores (desconocidos o incontrolados) deberían mantenerse tan constantes como sea posible. Si se quiere que las conclusiones extraídas de un experimento sean correctas, hay que identificar los diferentes factores que influyen en el resultado y, si es posible, controlarlos.

#### **4.1.2 Diseño experimental**

En la comunidad científica se realizan experimentos en todos los campos del saber, por lo general, para descubrir algo acerca de un proceso o sistema en particular. Un experimento es una prueba o ensayo. Un *experimento diseñado* es una prueba o serie de pruebas donde se inducen cambios deliberados en las variables de entrada del proceso o sistema, de manera que sea posible observar e identificar las causas de los cambios en la respuesta de salida (Montgomery, 1991).

Entre los objetivos del experimento pueden incluirse:

**a)** Determinar cuáles variables tienen mayor influencia sobre una respuesta.

**b)** Determinar el mejor valor de las variables que influyen en la respuesta, de modo que:

- La respuesta tenga un valor cercano al valor deseado,
- La variabilidad de la respuesta sea pequeña,
- Se minimicen los efectos de las variables.

### 4.1.3 Principios básicos

Para que un experimento se realice en forma más eficiente, es necesario emplear métodos científicos en su planificación. El *diseño estadístico de experimentos* es el proceso de planear un experimento para obtener datos apropiados, que pueden analizarse mediante métodos estadísticos, con el fin de producir conclusiones válidas y objetivas.

La metodología estadística es el único enfoque objetivo para analizar un problema que involucra datos sujetos a errores experimentales. Por lo tanto, hay dos aspectos en cualquier problema experimental: *el diseño del experimento y el análisis estadístico de los datos*.

Los tres principios básicos en el diseño de experimentos son el de *obtención de réplicas, aleatorización y análisis por bloques*.

- La *réplica* se refiere a una repetición del experimento básico. Este concepto permite al experimentador, por un lado, obtener una estimación del error experimental, útil para determinar si las diferencias observadas en los datos son *estadísticamente* significativas. Por otro lado, permite calcular una estimación más precisa del efecto de un factor en el experimento, si se usa la media de la respuesta como una estimación de dicho efecto.
- Se entiende por *aleatorización* al hecho de que, tanto la asignación del material experimental como el orden en que se realicen las pruebas individuales o ensayos, se determinan aleatoriamente. Los métodos estadísticos requieren que las observaciones (o los errores) sean variables aleatorias independientes. La aleatorización confirma esta suposición. Además, al aleatorizar adecuadamente el experimento, se ayuda a “cancelar” los efectos de factores extraños que pudieran estar presentes.
- El *análisis por bloques* es una técnica que se usa para incrementar la precisión del experimento. Un bloque es una porción del material experimental más homogéneo que el total del material. Al realizarse un análisis por bloques se hacen las comparaciones entre las condiciones de interés del experimento dentro de cada bloque.

Diseñar y analizar un experimento con un enfoque estadístico, requiere conocer claramente que se va a estudiar y cómo se van a recopilar y analizar los datos.

#### **4.1.3.1 Selección de la variable respuesta o función objetivo**

La respuesta seleccionada debe proveer información acerca del proceso en estudio. A veces, sólo se necesita una respuesta individual para caracterizar un proceso o análisis. Pero hay casos más complicados, donde la función objetivo puede estar compuesta por múltiples respuestas. En estos casos, cada respuesta podrá presentar un criterio de optimización particular, por lo que se deberá encontrar una función matemática que sea la combinación de todos los criterios de optimización.

El error de medición es un factor importante, ya que si esa capacidad de medición es deficiente pueden detectarse grandes efectos de los factores; en ese caso deben realizarse repeticiones.

#### **4.1.3.2 Elección de factores y niveles**

El experimentador deberá elegir los factores que variará en el experimento, con sus correspondientes niveles. También, debe considerar la forma en que controlará esos factores para mantenerlos en los valores deseados, y como los medirá. Para ello, es necesario conocer el proceso completo. Tal conocimiento suele ser una combinación de experiencia práctica y comprensión teórica.

Es importante investigar todos los factores que puedan ser de interés y no depender demasiado de la experiencia pasada; en particular durante las primeras etapas de la experimentación o cuando el proceso no está muy avanzado.

#### **4.1.3.3 Elección del diseño experimental**

Para definir los factores potenciales que afectan a la función objetivo existen distintos tipos de experimentos. Estos pueden ser:

- Factorial completo a 2 niveles ( $2^k$ ), donde  $k$  es el número de factores.
- Factorial fraccionado ( $2^{k-p}$ ), donde el número de experimentos se reduce con respecto al anterior de acuerdo con el número  $p$ .
- Plackett-Burman. Son diseños factoriales fraccionados a dos niveles, utilizados para estudiar muchos factores al mismo tiempo.

Una vez que se determinaron los factores responsables del experimento, así como sus interacciones, la siguiente etapa a realizar es el proceso de optimización. Para encontrar

las combinaciones más apropiadas de factores y llevar a cabo el proceso de optimización se pueden distinguir entre optimizaciones *simultáneas* y *secuenciales*.

En la *optimización simultánea* se construye un diseño experimental y, con un modelo matemático, se estudia la relación entre la respuesta y los factores, a través del método de superficie de respuesta (RSM, del inglés *Response Surface Method*). Los diseños experimentales utilizados en estos casos son: factorial completo para 3 o más variables, central compuesto, Box-Behnken y diseños de mezclas.

La *optimización secuencial* se basa en un diseño inicial de experimentos con sus respectivas mediciones y obtención de resultado, a partir de los cuales se diseña otra serie de experiencias hasta encontrar el punto óptimo. El diseño experimental que se utiliza para este análisis es el método Simplex.

Para elegir el diseño experimental adecuado, es necesario considerar el tamaño de la muestra (número de repeticiones), seleccionar un orden adecuado para los ensayos experimentales y determinar si hay algún tipo de restricción. Es importante tener presentes los objetivos experimentales al seleccionar el diseño.

#### **4.1.3.4 Realización del experimento**

En este paso es de vital importancia no cometer errores de procedimiento, ya que suelen anular la validez experimental.

#### **4.1.3.5 Análisis de datos**

Para analizar los datos experimentales se deben emplear métodos estadísticos, de modo que los resultados y conclusiones sean objetivos, más que apreciativos. Existen programas de computación para el análisis de datos y métodos gráficos para su interpretación.

Los métodos estadísticos no permiten probar algo experimentalmente, sólo hacen posible obtener el probable error de una conclusión, o asignar un nivel de confiabilidad a los resultados. La principal ventaja de los métodos estadísticos es que agregan objetividad al proceso de toma de decisiones. Las técnicas estadísticas, acopladas a un buen conocimiento técnico o del proceso y al sentido común, suelen llevar a conclusiones razonables.

También es muy importante poseer un conocimiento no estadístico del problema, ya sea para elegir los factores y los niveles, para decidir el número de réplicas a realizar, al analizar los resultados, etc.. La estadística no puede sustituir el hecho de reflexionar sobre el problema.

#### 4.1.3.6 Extracción de conclusiones

Una vez que se analizaron los datos, el experimentador debe extraer conclusiones *prácticas* de los resultados y recomendar un curso de acción. En esta etapa son útiles los métodos gráficos, en especial al presentar los datos a otras personas.

Se concluye que la experimentación es *iterativa*: se formula tentativamente una hipótesis acerca de un sistema, se realizan los experimentos para investigar dicha hipótesis y en base a esos resultados se formulan nuevas hipótesis.

Suele ser un grave error diseñar un único experimento grande y amplio al principio del estudio. Para que un experimento sea exitoso, es necesario conocer los factores importantes, los intervalos en que deben hacerse variar esos factores, la cantidad adecuada de niveles a usar y las unidades de medida apropiadas para esas variables. Conforme progresa un diseño experimental, con frecuencia se eliminan algunas variables, se agregan otras, se modifican los niveles de algún factor o se añaden nuevas variables de respuesta.

A continuación se detallan los diseños experimentales que se emplearon en este trabajo de tesis:

#### 4.1.4 Diseño de Plackett-Burman

Son diseños factoriales fraccionados a dos niveles, que se utilizan para estudiar  $K=N-1$  variables, en  $N$  ensayos, donde  $N$  es múltiplo de 4.

Un diseño factorial es aquel en el que se investigan todas las posibles combinaciones de los niveles de los factores de cada experimento. Los diseños factoriales se utilizan para estudiar el efecto conjunto de varios factores sobre una respuesta. Estos diseños se basan en la variación simultánea de un número limitado de niveles de un factor.

Este tipo de experimentación es esencialmente importante en el comienzo de un estudio experimental, donde todavía no se conocen los factores que más influyen, su rango de influencia y las interacciones entre factores.

Un problema que aparece en un experimento factorial completo es que el número de experimentos crece rápidamente con el número de factores. Como generalmente los recursos son limitados, el número de réplicas que un experimentador puede realizar, también son limitadas. Frecuentemente, los recursos disponibles permiten ejecutar una sola vez el experimento, a menos que el investigador esté dispuesto a desechar algunos factores originales.

Cuando hay más de 3 factores, es posible una simplificación del diseño, suponiendo que las interacciones de orden 3 y superiores sean despreciables. La lógica de esta aproximación es que los efectos de orden más grande son normalmente más pequeños que

los factores principales y los efectos de interacción entre dos factores. Si las interacciones de orden superior se pueden suponer insignificantes, una fracción adecuada de todas las posibles combinaciones de los niveles del factor es suficiente para proporcionar una estimación de los efectos principales y de la interacción entre los factores. Dicho diseño experimental se llama *diseño factorial fraccionado o incompleto*. Estos diseños se utilizan en experimentos donde se consideran muchos factores.

Generalmente, se realizan en las primeras etapas del proyecto, cuando es probable que muchos de los factores inicialmente considerados tengan poco o ningún efecto sobre la respuesta. Los factores que se identifican como importantes se investigan con mayor detalle en experimentos posteriores.

#### **4.1.4.1 Elección de los niveles**

La elección correcta de los niveles se determina principalmente por la experiencia y el conocimiento del experimentador y por las restricciones físicas del sistema. Para una variable cualitativa, nivel “alto” y “bajo” se refiere a un par de condiciones diferentes, por ejemplo ausencia o presencia de un catalizador, el uso de agitación mecánica o magnética, etc..

Al utilizar un diseño factorial para determinar que factores tienen un efecto significativo sobre la respuesta, se observa que, para factores que son variables continuas, el efecto depende de los niveles alto y bajo utilizados. Si estos están excesivamente cerca uno del otro, se puede concluir que el efecto del factor correspondiente no sea significativo, a pesar de que sobre el intervalo completo de los niveles del factor, el efecto no sea despreciable. Por otra parte, si los niveles se alejan bastante, pueden caer a ambos lados de un máximo, y aún así dar lugar a una diferencia en la respuesta que no sea significativa.

#### **4.1.4.2 Suposiciones del diseño de Plackett-Burman**

Una de las hipótesis para aplicar el diseño Plackett-Burman es que no debe haber interacciones entre los factores. En algunos experimentos se puede encontrar que la diferencia en la respuesta entre los niveles de un factor no es la misma en todos los niveles de los otros factores. Cuando esto ocurre, existe una interacción entre los factores. Por este motivo, el efecto de un factor va a depender del nivel elegido para el otro factor. Hay que tener en cuenta que cuando una interacción es grande, los correspondientes efectos principales tienen poco significado práctico, ya que dicha interacción oculta el significado de los efectos principales.

Los diseños de Plackett-Burman tienen estructuras de **alias** muy complejas. Dos o más efectos tienen la propiedad de *alias* cuando es imposible distinguir entre los efectos, es decir que hay confusión en la estimación de los efectos principales. Por ejemplo, sólo en la situación de un diseño de 12 experiencias cada efecto principal tiene como alias parcial toda interacción de dos factores en la que no participe el mismo.

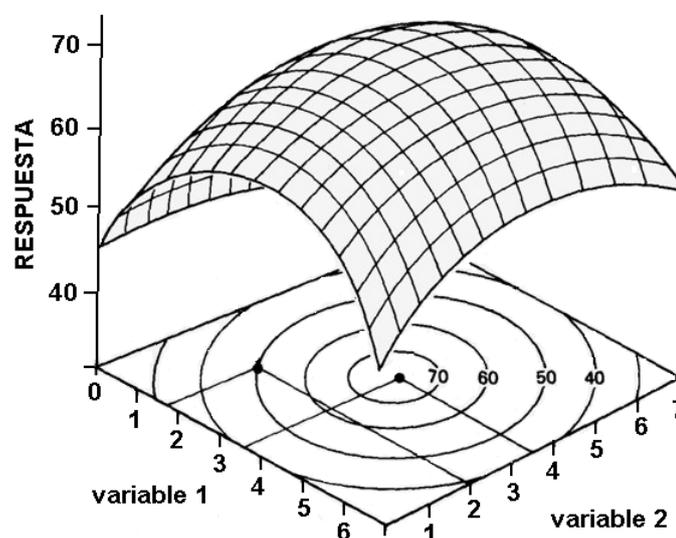
#### 4.1.5 Metodología de superficie de respuesta

La metodología de superficie de respuesta es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas que se emplean para modelar y analizar problemas, donde una respuesta de interés depende de varios factores, siendo el objetivo optimizar dicha respuesta.

En química analítica, la relación entre la respuesta y los efectos de los factores cuantitativos se basa en modelos *físicos* o *fisicoquímicos*. Otra alternativa es el modelado *empírico*, donde se utilizan polinomios de diferentes grados, de acuerdo con la complejidad de los datos. Estos modelos matemáticos pueden describir una superficie de respuesta lineal o curvilínea.

La superficie de respuesta se representa como una superficie en un espacio tridimensional (Figura 4.1). Para visualizar mejor la forma de una superficie de respuesta se grafican los contornos de dicha superficie. En esta gráfica de contornos se trazan líneas de respuesta constante en el plano  $x_1, x_2$ . Cada contorno corresponde a una altura específica de la superficie de respuesta.

**Figura 4.1:** Superficie de respuesta tridimensional y su gráfica de contorno en donde se observa la respuesta (eje z) en función de la variable 1 y la variable 2 (plano x, y) (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).



Generalmente, la forma de la relación entre la respuesta y las variables independientes se desconoce. Por tal motivo, el primer paso en la metodología de superficie de respuesta es determinar una aproximación a la relación real entre la respuesta y el conjunto de variables. Por lo general, se emplea un polinomio de orden bajo sobre alguna región de las variables independientes, siguiendo el principio de parsimonia, aunque en algunas oportunidades debe usarse un polinomio de mayor grado.

El método de cuadrados mínimos sirve para estimar los parámetros del polinomio de aproximación. El análisis de la superficie de respuesta se hace luego en términos de superficie ajustada.

La metodología de superficie de respuesta es una técnica secuencial y su objetivo es determinar las condiciones de operación óptima para un sistema, o determinar la región del espacio de los factores en la que se satisfacen las condiciones de operación.

#### 4.1.5.1 Diseño Central Compuesto

El diseño central compuesto es, probablemente, el diseño experimental que más se usa para ajustar superficies de respuesta de segundo orden. Los hay de diferentes tipos que coinciden en general en 3 partes:

- un *diseño cúbico*, que responde al diseño factorial completo a 2 niveles. El número de puntos o experimentos se expresa como:  $n_{\text{cúbico}} = 2^k$ , donde  $k$  es el número de factores.
- un *diseño estrella*, cuyo objetivo es agregar más niveles y describir curvatura. Se agregan más puntos llamados  $\alpha$ , que se sitúan a una distancia del centro, describiendo una estrella. El número de puntos responde a los puntos axiales ( $n_{\text{estrella}}$ ). El valor que toma  $\alpha$  se expresa por:  $\alpha = (n_{\text{estrella}})^{1/4}$ .
- un *punto central* ( $n_{\text{central}}$ ) con todos los niveles iguales a cero, generalmente es el punto que se replica.

El número de experiencias a realizar está dado por:  $n = n_{\text{cúbico}} + n_{\text{estrella}} + n_{\text{central}}$ .

Se dice que un diseño experimental es *rotable* o *girable*, si la variancia de la respuesta  $y$  predicha en algún punto  $x$  es función sólo de la distancia al punto desde el centro del diseño y no es una función de la dirección. La rotabilidad es una propiedad muy importante en la elección de un diseño de superficie de respuesta. Dado que la finalidad de la metodología de superficie de respuesta es la optimización y se desconoce la localización del óptimo antes de comenzar el experimento, tiene sentido usar un diseño que proporcione estimaciones igualmente precisas en todas las direcciones.

Un diseño central compuesto se convierte en *rotable* mediante la elección de  $\alpha$ . El valor de  $\alpha$  para lograr la conversión a diseño rotatable depende del número de puntos de la porción factorial del diseño. De hecho,  $\alpha = (n_i)^{1/4}$  proporciona un diseño central compuesto rotatable.

Otra propiedad de este diseño es que puede “crecer” a partir de un diseño de primer orden (el  $2^k$ ) agregando los puntos axiales y quizás algunos puntos centrales, y además puede controlarse mediante la elección del número de puntos centrales.

Una variante del diseño central compuesto es el *diseño central compuesto centrado en las caras*, en el que  $\alpha = 1$ . En este diseño los puntos centrales o estrella se localizan en los centros de las caras del cubo. Esta variante del diseño central compuesto se emplea cuando se requiere sólo tres niveles de cada factor. Sin embargo, estos diseños no son rotatables y esto sería una desventaja.

Para estimar el error experimental es necesario realizar repeticiones de la combinación de factores. Usualmente, el punto central es el que se replica tres veces.

Este diseño posee buenas propiedades estadísticas, pero posee una desventaja experimental ya que el punto central sale del hipercubo y el número de niveles que serán ajustados para cada factor es cinco en lugar de tres, como en un diseño a tres niveles.

#### 4.1.5.2 Múltiples respuestas

Cuando se presentan situaciones de respuestas múltiples, a menudo es imposible optimizar simultáneamente cada una de ellas. Superponer las gráficas de contorno de la optimización de cada respuesta individual, permite estimar las soluciones, siempre y cuando el número de respuestas y de variables no sea muy grande. Cuando el número de respuestas es igual o mayor a cuatro o existen muchas variables (tres o más), la metodología de la gráfica de contorno no se puede aplicar. Por lo tanto, es fundamental encontrar una función que provea las condiciones experimentales satisfactorias para obtener la mejor respuesta.

Derringer y Suich, en 1980, desarrollaron la función **deseabilidad** (Derringer y Suich, 1980) que se utiliza ampliamente en la industria para la optimización de procesos con respuestas múltiples. La función deseabilidad se basa en la idea de que la calidad de un producto o proceso, que tiene múltiples características, con una de ellas fuera de algún límite “deseable”, es completamente inaceptable. Este método busca condiciones operativas que provean el mejor “valor de respuesta deseable” (Myers y Montgomery, 1995).

#### 4.1.5.2.1 Metodología para el cálculo de la función deseabilidad

Para cada respuesta  $Y_i(x)$  se puede calcular una función deseable  $d_i(Y_i)$  que toma valores entre 0 y 1, donde  $d_i(Y_i) = 0$  representa un valor no deseable y  $d_i(Y_i) = 1$  representa un valor deseable o una respuesta ideal.

Las deseabilidades individuales luego se combinan generando la función *Deseabilidad (D)* global de acuerdo con la *Ecuación 4.1*:

$$D = (d_1 \times d_2 \times \dots \times d_n)^{\frac{1}{n}} = \left( \prod_{i=1}^n d_i \right)^{\frac{1}{n}} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

donde  $n$  es el número de respuestas. Un valor de deseabilidad global entre 0 y 1 implica que todas las respuestas poseen simultáneamente un valor deseable.

Es interesante observar que, si alguna de las respuestas  $Y_i$  es completamente indeseable, la deseabilidad de esa respuesta  $d_i(Y_i)$  será igual a cero y, por lo tanto, la función deseabilidad será nula. En la práctica se usan los valores de las respuestas estimadas con la ecuación de ajuste en lugar de la respuesta experimental.

En la función deseabilidad, a cada respuesta se le asigna una **importancia** relativa con respecto a las demás. La importancia ( $r_i$ ) varía desde las respuestas menos importantes, con un valor de 1, hasta las más importantes, con un valor de 5. Si a cada respuesta se le asigna un grado de importancia, entonces la función deseabilidad toma la forma descrita por la *Ecuación 4.2*:

$$D = (d_1^{r_1} \times d_1^{r_2} \times \dots \times d_1^{r_m})^{\frac{1}{\sum r_i}} = \left( \prod_{i=1}^n d_i^{r_i} \right)^{\frac{1}{\sum r_i}} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

Si todas las respuestas poseen la misma importancia, la función deseabilidad se reduce a la *Ecuación 4.1*.

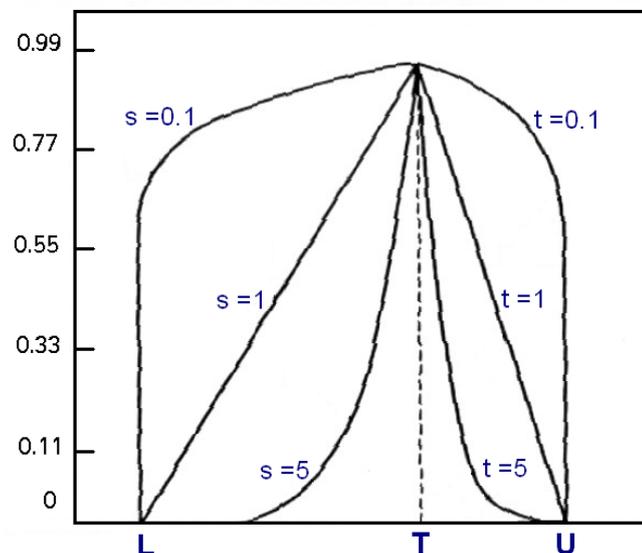
Dependiendo del criterio de optimización de cada respuesta, pueden usarse diferentes funciones deseabilidad  $d_i(Y_i)$ . Derringer y Suich denominaron  $L_i$ ,  $U_i$  y  $T_i$  a los valores bajo, alto y un valor fijo, respectivamente, de respuestas deseadas para la respuesta  $Y_i$ , con  $L_i \leq T_i \leq U_i$ . En muchas aplicaciones, los valores de  $L_i$ ,  $T_i$  y  $U_i$  se eligen de acuerdo con las prioridades de los investigadores.

- Si se desea ajustar la respuesta a un valor  $T_i$ , la función deseabilidad es:

$$d_i(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < L_i \\ \left( \frac{\hat{Y}_i(x) - L_i}{T_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq T_i \\ \left( \frac{\hat{Y}_i(x) - U_i}{T_i - U_i} \right)^t & \text{si } T_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > U_i \end{cases}$$

Donde los exponentes  $s$  y  $t$  se denominan **peso** y permiten cambiarle la forma a cada función deseabilidad individual. Los pesos se utilizan para darle énfasis a los criterios. Cuando el peso es 1, la función deseabilidad individual ( $d_i$ ) varía entre 0 y 1 linealmente. Pesos mayores a 1 (el máximo peso es 10) le otorgan más énfasis al criterio; pesos menores a 1 (el mínimo es 0.1) le dan menos peso al criterio (Figura 4.2).

**Figura 4.2:** Curvas de la función deseabilidad individual cuando se desea ajustar la respuesta a un valor fijo ( $T$ ) (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).



En otras palabras, si el criterio adoptado es muy estricto, se utiliza un valor de  $s$  o  $t$  grande. Se puede observar que, para esos valores, la pendiente de la curva de la función deseabilidad en las proximidades del valor fijo ( $T$ ) es muy pronunciada, por lo que con pequeños cambios o alejamientos del valor óptimo, la función  $d_i$  disminuye de manera considerable. En caso contrario, cuando la condición no es tan estricta, se puede utilizar un valor de  $s$  o  $t$  pequeño. Conforme se aleja la respuesta del valor fijo, la función  $d_i$  no varía de manera considerable.

- Si se desea maximizar la respuesta, la función deseabilidad individual está definida como:

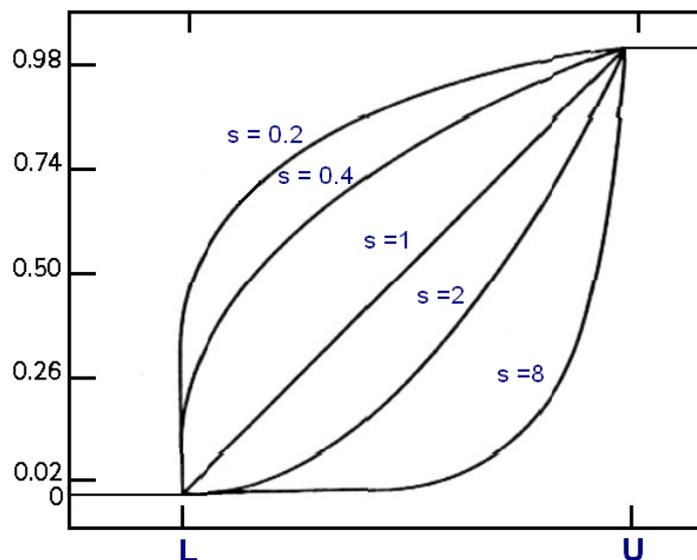
$$di(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < L_i \\ \left( \frac{\hat{Y}_i(x) - L_i}{U_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > U_i \end{cases}$$

- Finalmente, si queremos minimizar la respuesta, debemos usar:

$$di(\hat{Y}_i(x)) = \begin{cases} 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) < L_i \\ \left( \frac{U_i - \hat{Y}_i(x)}{U_i - L_i} \right)^s & \text{si } L_i \leq \hat{Y}_i(x) \leq U_i \\ 0 & \text{si } \hat{Y}_i(x) > U_i \end{cases}$$

La figura 4.3 muestra las curvas de la función deseabilidad, cuando se maximiza o minimiza una función, utilizando diferentes pesos ( $s$  y  $t$ ).

**Figura 4.3:** Curvas de la función deseabilidad individual cuando se desea maximizar o minimizar una respuesta (figura extraída de Myers y Montgomery, 1995).



Cuando la respuesta se maximiza o se minimiza, el razonamiento para la elección de los coeficientes  $s$  y  $t$  es el mismo.

Una vez que se especificaron todos los criterios de optimización, se generarán las coordenadas de las variables independientes donde la función  $D$  toma su mayor valor. Es importante aclarar que en todos los puntos donde la deseabilidad global ( $D$ ) es distinta de 0 se cumplen **todos** los criterios especificados, en mayor o en menor medida. Por lo tanto, se puede trabajar experimentalmente en una *zona de condiciones óptimas*, a pesar de que las mejores condiciones son aquellas donde  $D$  toma su mayor valor.

## 4.2 Pre-procesamiento de los datos electroforéticos

La técnica de EC presenta problemas que se relacionan con la tendencia de la línea de base y con los corrimientos en el tiempo de migración de los analitos entre corridas, y requieren del pre-procesamiento de los datos (Daszykowski y Walczak, 2006). Este tipo de pre-procesamiento cobra mayor significancia cuando los datos electroforéticos se deben utilizar para la construcción de modelos de calibración multivariada.

### 4.2.1 Corrección de la línea de base

La implementación de un paso apropiado de pre-procesamiento es de extrema importancia para garantizar la calidad de las señales instrumentales, que a su vez determina la calidad de los resultados finales del análisis electroforético. Del mismo modo que cualquier otra señal instrumental, los electroferogramas están compuestos de tres componentes principales: *señal*, *ruido* y *línea de base*. En consecuencia, la eliminación del ruido o la línea de base de los componentes puede resultar en un aumento de la señal (Daszykowski y Walczak, 2006).

Además, la eliminación de la línea de base del electroferograma es un paso crítico para reducir el número y la complejidad de los componentes no esperados (De Zan y col., 2008). En la literatura existen diferentes estrategias para la corrección de la línea de base (Daszykowski y Walczak, 2006). En el capítulo 3 del presente trabajo, se aplicó el método de cuadrados mínimos asimétricos propuesto por Eilers (Eilers, 2004), adaptado para datos multidimensionales (Eilers y col., 2006). Este método consiste en la estimación de la matriz *background*  $\mathbf{F}$  ( $J \times K$ ) a partir de la matriz de datos  $\mathbf{M}$  ( $J \times K$ ), donde  $J$  es el número de longitudes de onda digitalizadas y  $K$  es el número de tiempos de migración. Para lograr este objetivo, se usó una matriz de base *spline*  $\mathbf{B}_1$  ( $L \times J$ ) a lo largo de las filas de la matriz  $\mathbf{M}$  y una matriz de base *spline*  $\mathbf{B}_2$  ( $M \times K$ ) a lo largo de las columnas de la matriz  $\mathbf{M}$ . En base a la literatura, (Kaczmarek y col., 2005) se utilizó un compromiso de 10 funciones bases, es decir  $L = M = 10$ .  $\mathbf{F}$  se puede representar como:

$$f_{j,k} = \sum_{L,M} b1_{Lj} b2_{Mk} a_{LM} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

donde  $a_{LM}$  es el elemento  $(L,M)$  de una matriz  $\mathbf{A}$  que contiene los coeficientes de regresión, que se pueden calcular a través de la minimización de la siguiente función costo:

$$Q = \sum_{JK} v_{JK} (y_{JK} - f_{JK})^2 + P \quad \text{Ecuación 4.4}$$

donde  $y$  es la señal experimental,  $f$  una tendencia del ruido (la aproximación de la línea de base), y  $v$  son los pesos anteriores. Los elementos de  $v$  deberán tener valores grandes en las partes de la señal en donde está permitido afectar la estimación de la línea de base. Considerar la siguiente elección de pesos asimétricos:  $v_{JK} = p$  si  $v_{JK} > f_{JK}$  y  $v_{JK} = 1 - p$  si  $v_{JK} \leq f_{JK}$  con  $0 < p < 1$ . Desviaciones positivas de la tendencia resultarán en pesos diferentes de los residuos negativos. La experiencia muestra que comenzar a partir de  $v \cong 1$ , e iterar entre dos cálculos, conduce de manera rápida y confiable a una solución en aproximadamente 10 iteraciones. Finalmente, en la *Ecuación 4.5* hay un término de penalización definido por:

$$P = \lambda \left[ \sum_L (\Delta_1^d \mathbf{a}_{\cdot L})^2 + \sum_i (\Delta_2^d \mathbf{a}_{i \cdot}) \right] \quad \text{Ecuación 4.5}$$

donde  $\Delta_1$  y  $\Delta_2$  son diferencias de orden  $d$  calculadas para cada columna de  $\mathbf{A}$  ( $\mathbf{a}_{\cdot L}$ ) y cada fila de  $\mathbf{A}$  ( $\mathbf{a}_{i \cdot}$ ), respectivamente. Como se puede observar en la *Ecuación 4.5*, si se usan valores diferentes para el parámetro de regularización  $\lambda$ , la penalización podría tener diferente influencia en las direcciones verticales y horizontales.

### 4.2.2 Corrección del corrimiento de pico

Con el propósito de alinear los picos se empleó la metodología propuesta por Fraga y colaboradores (Fraga y col., 2001) que tiene en cuenta la estructura de segundo orden de los datos. Este algoritmo se basa en la descomposición en valores singulares (SVD) de una matriz de  $\mathbf{N}/\mathbf{M}$  que contiene las matrices de datos  $\mathbf{N}$  y  $\mathbf{M}$ , en donde  $\mathbf{N}$  se toma como referencia y  $\mathbf{M}$  será corregido en relación a  $\mathbf{N}$ :

$$(\mathbf{U}, \mathbf{S}, \mathbf{V}) = \text{SVD}(\mathbf{N}/\mathbf{M}) \quad \text{Ecuación 4.6}$$

En la *Ecuación 4.6*, **S** es una matriz diagonal que contiene los valores singulares mientras que **U** y **V** son matrices que contienen los autovectores izquierdos y derechos de **N/M**, respectivamente. La corrección se realiza calculando la variancia residual (RES) a medida que la matriz **M** se mueve en relación a **N**, usando un número preestablecido de puntos que puede estimarse mediante inspección de los electroferogramas de **N** y **M**.

$$RES = 100 \frac{\sum_{a=A+1}^{\min(J,K)} s_a^2}{\sum_{a=1}^{\min(J,K)} s_a^2} \frac{JK}{(J - A)(K - A)} \quad \text{Ecuación 4.7}$$

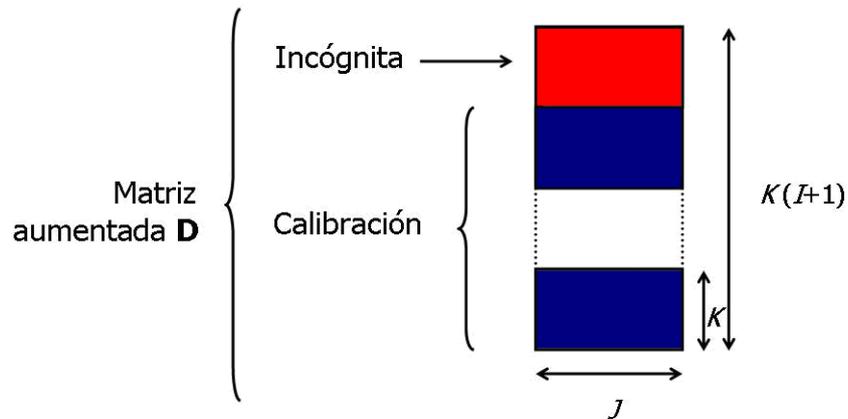
donde A es el número de valores singulares significativos, idealmente igual al número de especies presentes en **N/M**, y J y K tienen el significado descrito anteriormente. Cuando las matrices **N** y **M** se alinean, los valores de RES deberían alcanzar un mínimo.

### 4.3 MCR-ALS

El algoritmo MCR-ALS (Resolución Multivariada de Curvas por Cuadrados Mínimos Alternantes) se utiliza ampliamente para la resolución de componentes múltiples en muestras desconocidas que den como resultado tablas o matrices de datos que puedan describirse por un modelo bilineal (Jaumot y col., 2005). Los datos en forma de tabla o matriz, en donde una dirección se relaciona con la variación de la composición del sistema y la otra con la variación en la respuesta, ayudan a la diferenciación entre los componentes.

MCR-ALS posee la capacidad de procesar múltiples matrices de datos simultáneamente, reduciendo ambigüedades intrínsecas del análisis de factores y/o deficiencias de rango presentes en los datos. Por otra parte, permite la aplicación flexible y diversa de restricciones que ayudan a la resolución, mejorando los resultados (Jaumot y col., 2005). En la Figura 4.4 se observa una matriz de datos aumentada a partir de las matrices de calibración.

**Figura 4.4.** Matriz **D** formada aumentando las matrices de calibración con la matriz de la muestra incógnita.



Si las matrices son de tamaño  $J \times K$  ( $J$  es el número de longitudes de onda y  $K$  los tiempos de migración), las columnas representan el modo espectral y las filas el modo temporal. La forma usual de trabajo consiste en aumentar las matrices en la dirección temporal, con el objetivo de hacer frente a posibles variaciones de los perfiles temporales entre muestra y muestra. En otras palabras, MCR-ALS es capaz de procesar juegos de datos que se desvían de la trilinealidad. Esto se logra aumentando las matrices en el modo sospechado de romper la estructura trilineal. Es decir, si ocurre una variación de los perfiles temporales de matriz a matriz, se crea una matriz aumentada en este sentido. En el modo de aumento temporal, las matrices de calibración y la matriz incógnita se acomodan una al lado de la otra (De Juan y col 2000). Luego, la descomposición bilineal de la matriz aumentada se realiza de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\mathbf{D}_{ta} = \mathbf{S}_{ta} \mathbf{G}_{ta}^T + \mathbf{E}_{ta} \quad \text{Ecuación 4.8}$$

donde las columnas de  $\mathbf{D}_{ta}$  contienen los espectros de absorción medidos para diferentes muestras a diferentes tiempos de reacción, las columnas de  $\mathbf{G}_{ta}$  contienen los perfiles temporales de las especies que intervienen, las columnas de  $\mathbf{S}_{ta}$  sus espectros relacionados y  $\mathbf{E}_{ta}$  es una matriz de residuos no ajustados por el modelo (el subíndice 'ta' indica aumento en el modo temporal). Las dimensiones apropiadas de  $\mathbf{D}_{ta}$ ,  $\mathbf{G}_{ta}$ ,  $\mathbf{S}_{ta}$  y  $\mathbf{E}_{ta}$  son  $J \times [(I+1)K]$ ,  $[(I+1)K] \times N$ ,  $J \times N$  y  $J \times [(I+1)K]$ , respectivamente ( $I$  es el número de muestras de calibración,  $N$  es el número de componentes que dan respuesta y se asume una sola muestra de validación). La descomposición de  $\mathbf{D}_{ta}$  se logra a través de la minimización por cuadrados mínimos alternantes (ALS) de la norma de  $\mathbf{E}_{ta}$ . La minimización comienza con la

provisión de los espectros estimados de los componentes, que se emplean para estimar  $\hat{G}_{ta}$  (el 'sombrero' indica una matriz estimada') a partir de la *Ecuación 4.9*:

$$\hat{G}_{ta} = D_{ta}^T (S_{ta}^+)^T \quad \text{Ecuación 4.9}$$

en donde '+' indica la inversa generalizada. Con la matriz  $\hat{G}_{ta}$  de la *Ecuación 4.9* y la matriz de datos original  $D_{ta}$  se vuelve a estimar la matriz  $S_{ta}$  mediante cuadrados mínimos:

$$\hat{S}_{ta} = D_{ta} (\hat{G}_{ta}^T)^+ \quad \text{Ecuación 4.10}$$

y finalmente se calcula  $E_{ta}$  a partir de la *Ecuación 4.8* usando  $D_{ta}$  y las matrices estimadas  $\hat{G}_{ta}$  y  $\hat{S}_{ta}$ . Estos pasos se repiten hasta alcanzar la convergencia imponiendo ciertas restricciones adecuadas al sistema en estudio durante el proceso de ALS. Entre las restricciones que se aplican con mayor frecuencia se encuentran (Muñoz y De Juan 2007, De Juan y Tauler 2003, Jaumot y col 2005):

- *No negatividad*: previene la presencia de valores negativos en los perfiles. Se aplica a los perfiles de concentración y a espectros UV-VIS y de fluorescencia, debido a que sus valores son siempre positivos.
- *Unimodalidad*: fuerza la presencia de un único máximo en el perfil de una especie. Se aplica a procesos en donde los perfiles de concentración muestran una forma de aparición-decaimiento (perfiles de reacción, picos cromatográficos y electroforéticos, voltamogramas).
- *Clausura* (cierre o balance de masa): se relaciona con ecuaciones de balance de masa en sistemas cerrados. Se aplica cuando la concentración total de las especies detectables en cada etapa del proceso es constante, pudiéndose fijar a un valor único o variable. Cuando hay especies que no absorben en el sistema no se puede aplicar, debido a que las especies que contribuyen a la señal medida no forman un sistema cerrado.
- *Rango local/selectividad*: impone la ausencia de algunas especies en un rango específico de perfiles de concentración, por ejemplo, en una cierta ventana de tiempo o pH. Este conocimiento puede tener una base química o ser adquirido mediante la aplicación de métodos de análisis de rango local.
- *Igualdad*: se puede introducir en la optimización información química asociada al conocimiento de los perfiles puros de concentración o espectros. Los perfiles conocidos

pueden ser establecidos como invariantes durante el proceso iterativo. No es necesario conocer completamente un perfil; si hay algunos elementos conocidos se pueden fijar.

- *Modelado rígido*: se aplica cuando se conoce la ley química (cinética o termodinámica) asociada a un proceso particular. Los perfiles de concentración asociados a componentes en el proceso se fuerzan a presentar la forma descrita por la ley química.

- *Trilinealidad*: es la restricción de tres vías más esencial ya que, cuando es aplicable, asegura que los resultados son únicos; en otras palabras, que los perfiles resueltos no tienen ambigüedad.

En este contexto, es importante mencionar que se requiere inicializar MCR-ALS con parámetros del sistema, lo más cercanos posibles al resultado final. Se pueden proveer, por ejemplo, espectros de las especies obtenidos a partir de sus estándares puros o del análisis de los llamados espectros ‘más puros’ a través de la metodología SIMPLISMA (del inglés, *simple interactive self-modelling mixture analysis*), un algoritmo de resolución multivariada de curvas que extrae los espectros puros de los componentes a partir de una mezcla de espectros de composición variada (Windig y Guilment 1991).

Para el análisis de muestras realmente desconocidas en presencia de posibles interferencias del sistema electroforético (Sección experimental-capítulo 3), la aplicación de MCR-ALS necesitó de la combinación de ambos procedimientos, es decir, espectros puros de los analitos conocidos y análisis de los espectros más puros para la interferencia.

Finalmente, la resolución satisfactoria de MCR se logra incluyendo información de la correspondencia entre especies en cada matriz, a través de una matriz binaria que indica si un dado componente existe o no en una dada muestra (Ruckebush y col 2006).

La condición para realizar lo descrito es que los espectros de las especies que intervienen sean lo suficientemente diferentes. En el caso de solapamiento espectral extremo, la inversa generalizada requerida en la *Ecuación 4.9* se vuelve inestable. Una alternativa para resolver este problema es realizar el aumento en el modo espectral. En este caso, las matrices se ubican una arriba de la otra y el proceso de cuadrados mínimos se representa por el siguiente juego de ecuaciones:

$$\mathbf{D}_{sa} = \mathbf{S}_{sa} \mathbf{G}_{sa}^T + \mathbf{E}_{sa} \quad \text{Ecuación 4.11}$$

$$\hat{\mathbf{S}}_{sa} = \mathbf{D}_{sa} (\mathbf{G}_{sa}^T)^+ \quad \text{Ecuación 4.12}$$

$$\hat{\mathbf{G}}_{sa} = (\hat{\mathbf{S}}_{sa}^+ \mathbf{D}_{sa})^T$$

**Ecuación 4.13**

en donde ahora los tamaños de las matrices involucradas son:  $\mathbf{D}_{sa}$ ,  $[(I + 1)J] \times K$ ,  $\mathbf{S}_{sa}$ ,  $[(I + 1)J] \times N$ ,  $\mathbf{G}_{sa}$ ,  $K \times N$  ('sa' indica aumento en el modo espectral). En este modo particular de aumento, la inversa generalizada de  $\mathbf{G}_{sa}$  en la *Ecuación 4.12* se obtiene siempre que los perfiles temporales de los componentes de la muestra sean diferentes (siendo esta una de las principales asunciones del presente modelo). Más importante aún, la inversa generalizada de  $\mathbf{S}_{sa}$  puede obtenerse de manera confiable debido a que el aumento de la matriz rompe la dependencia lineal de los perfiles espectrales individuales. Esto se debe al hecho de que la matriz espectral  $\mathbf{S}_{sa}$  ahora tiene  $[(I + 1)J] \times N$  elementos, en vez de los  $J \times N$  correspondientes al aumento en el modo temporal. Cada columna de  $\mathbf{S}_{sa}$  consiste en vectores sucesivos de tamaño  $J \times 1$ , cada uno de ellos teniendo la forma de un espectro de un componente particular, con una intensidad proporcional a su concentración en una dada muestra. Por lo tanto, las columnas de  $\mathbf{S}_{sa}$  no son más linealmente dependientes.

Luego de la descomposición de  $\mathbf{D}_{sa}$  mediante MCR-ALS, la información de concentración contenida en  $\mathbf{S}_{sa}$  puede utilizarse para realizar predicciones cuantitativas. Esto se realiza construyendo una curva de calibración pseudounivariada con las concentraciones relativas de las muestras de calibración contenidas en la matriz optimizada  $\mathbf{S}_{sa}$ . Dado un componente de interés particular, se seleccionan los elementos de  $\mathbf{S}_{sa}$  correspondientes a las  $I$  muestras de calibración, que van de  $S_{sa}(1, n)$  a  $S_{sa}(IK, n)$ . Cada serie de  $K$  valores corresponde al perfil en la dimensión temporal para una muestra en particular. Si el área bajo el perfil se considera proporcional a la concentración del componente, entonces se construye la curva pseudounivariada de la siguiente forma:

$$\left[ \sum_{k=1}^K S_{sa}(k, n) \mid \sum_{k=1}^K S_{sa}[(k + K), n] \mid \dots \mid \sum_{k=1}^K S_{sa} \{ [k + KI], n \} \right] = k \mathbf{y} \quad \text{Ecuación 4.14}$$

donde cada sumatoria agrupa los  $K$  elementos de  $\mathbf{S}_{sa}$  correspondientes a un componente particular y la muestra estándar e  $\mathbf{y}$  es el vector de las concentraciones de calibración. Una vez que se obtiene  $k$  de la *Ecuación 4.14*, la interpolación de los valores de las muestras incógnitas provee la concentración del componente en la incógnita  $y_u$ , es decir:

$$y_u = \frac{1}{k} \sum_{k=1}^K S_{sa} \{[k + (I+1)K], n\} \quad \text{Ecuación 4.15}$$

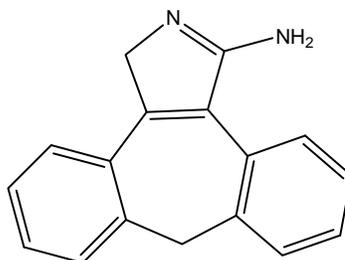
Cuando el aumento se realiza en el modo temporal también se emplean las Ecuaciones 4.14 y 4.15, con los elementos de  $S_{sa}(k,n)$  reemplazados por las series análogas de  $J$  elementos de  $G_{ta}(j,n)$  tomadas a partir de la matriz  $\mathbf{G}_{ta}$ .

## OPTIMIZACIÓN SIMULTÁNEA DE RESPUESTAS APLICADA A LA DETERMINACIÓN DE EPINASTINA EN SUERO HUMANO MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

### 1.1 INTRODUCCIÓN

La epinastina (**EPI** – 9,13b-dihydro-1H-dibenz [c, f] imidazo [1,5-a] azepon-3-amine hydrochloride) (Figura 1.1) es un moderno y potente agente antihistamínico H<sub>1</sub> de segunda generación, que se utiliza para aliviar los síntomas causados por reacciones alérgicas.

**Figura 1.1:** Estructura química de epinastina.



Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo farmacológico competitivo a nivel de los receptores histaminérgicos periféricos H<sub>1</sub> de la histamina. Una única dosis diaria provoca un antagonismo farmacológico prolongado, sin afectar los receptores H<sub>1</sub> cerebrales, evitando la somnolencia y la depresión del Sistema Nervioso Central (SNC), síntomas que provocan los antihistamínicos H<sub>1</sub> antiguos (difenhidramina, clorfeniramina, bromfeniramina e hidroxicina).

### 1.1.1 Importancia de la determinación de EPI en suero humano

En el presente trabajo de tesis surge la inquietud de determinar EPI en suero humano debido a que es una droga relativamente nueva y existen escasas publicaciones en relación al tema. Algunos autores formulan modelos farmacocinéticos para cuantificar EPI en plasma y describir su estabilidad en el organismo (Sarashina y col., 2004), mientras que otros plantean estudios para determinar su eficacia y seguridad en pacientes (Novales y col., 1998; Cortés-Borrego y col., 1998).

Un estudio farmacocinético reciente, que se realizó sobre pacientes pediátricos y adultos, mostró que la concentración plasmática máxima de epinastina ( $C_{max}$ ) en niños es de  $25.6 \pm 6.9 \mu\text{g L}^{-1}$ . Este valor es similar al obtenido en pacientes adultos luego de la administración de 20 mg de droga ( $C_{max}=26.9 \pm 9.1 \mu\text{g L}^{-1}$ ). La concentración de EPI se determinó sobre el peso corporal del paciente (Sarashina y col., 2004).

Debido a los muy bajos niveles plasmáticos en los que se encuentra la EPI en suero, así como a la baja sensibilidad en la detección que presenta la EC, consideramos un gran desafío poder cuantificar EPI en suero humano mediante esta técnica separativa.

Una revisión bibliográfica muestra un limitado número de métodos publicados para determinar EPI en suero humano. Estos se basan exclusivamente en CLAR (Ohtani y col., 1996; Ogiso y col. 2001; He y col., 2005), obteniendo límites de detección (LOD) entre  $1.0$  y  $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$  con detección UV,  $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$  con detección de masas y  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  con detectores de fluorescencia (Sarashina y col., 2004).

CLAR presenta una sensibilidad que permite medir concentraciones nanomolares de la droga. Sin embargo, la EC, en combinación con las novedosas metodologías de pre-concentración, se presenta como una técnica apropiada para el análisis de muestras biológicas, debido a su elevada eficiencia en la separación de analitos. Este hecho se evidencia en las numerosas publicaciones presentadas en la temática de monitorización de drogas (Santos y col., 2007; Barrón y col., 2001; Lara y col., 2006; Pucci y Raggi, 2005; Lancas y col., 2003; Pucci y col., 2003; Ivanova y col., 2003; Ivanova y col., 2002; Raggi y col., 2002).

En cuanto a la preparación de la muestra, algunos métodos se basan en la extracción líquido-líquido con éter etílico, seguida de otra extracción con 0.5 % de ácido fórmico (Sarashina y col., 2004). Además, estos autores proponen la extracción en fase sólida y derivatización de la EPI para analizar muestras de pacientes adultos. Otros autores realizan una extracción líquido-líquido con diclorometano en condiciones alcalinas (Ohtani y col., 1996; Ogiso y col., 2001; He y col., 2005).

## 1.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1 Equipamiento

Todas las experiencias se realizaron usando un equipo de electroforesis capilar Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) con detector de arreglo de diodos (DAD). Para la recolección de datos se utilizó una PC Pentium 4 HP.

Para las separaciones electroforéticas se utilizaron dos capilares: primeramente un capilar convencional desnudo de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y una longitud total de 64.5 cm (56 cm hasta el detector) y, a continuación, un capilar burbuja desnudo de sílice fundida de 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 150  $\mu\text{m}$  de paso óptico y una longitud total de 64.5 cm (56 cm hasta el detector), ambos provistos por Agilent Technologies. El pH de la solución reguladora de corrida (SRC) se ajustó mediante un pHmetro (HANNA Instruments).

Para la degasificación de todas las soluciones de trabajo se utilizó un baño ultrasónico Cole Palmer 8891 (Cole Palmer, Illinois, USA). Para la evaporación del solvente de extracción, dependiendo de su volumen, se utilizó una manta calefactora y un evaporador rotatorio conectado a una bomba de vacío y a un baño termostatzado (BÜCHI, Suiza). Para el secado de la droga sólida y para la cristalización de EPI se utilizó una estufa con una temperatura establecida en 100 °C.

### 1.2.2 Programas de computación

Para el control y la adquisición de datos se utilizó el programa *Chemstation* provisto por Agilent Technologies. Los diseños experimentales, el análisis de datos y el cálculo de la función deseabilidad se realizaron utilizando el programa Design Expert versión 6.0.10 (Stat-Ease Inc., Minneapolis). La linealidad del método se estudió con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

### 1.2.3 Reactivos y Materiales

Todos los reactivos utilizados para realizar las experiencias fueron de calidad grado analítico marca Cicarelli: fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ), carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) y diclorometano. El agua que se utilizó para las disoluciones y las diluciones fue de calidad ultrapura. El solvente acetonitrilo (ACN) fue de calidad cromatografía líquida.

Las drogas lidocaína clorhidrato (LID), fenilefrina, paracetamol, ibuprofeno, cafeína y ácido acetil salicílico fueron de la marca Sigma Aldrich.

Las soluciones reguladoras de corrida (SRC) y las soluciones de lavado se prepararon en el día. Previo a la inyección en el sistema electroforético, se filtraron a través de filtro jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro con membrana de nylon (Sartorius, Alemania) y se degasificaron en baño ultrasónico durante 5 minutos.

El estándar de epinastina se obtuvo mediante la extracción de la droga de tabletas comerciales (Flurinol, Boehringer Ingelheim) y su subsiguiente purificación.

### **1.2.4 Acondicionamiento del capilar**

El acondicionamiento del capilar es uno de los factores más importantes, y está relacionado con la repetitividad de los análisis. Mantener reproducible la pared del capilar es una tarea fundamental en EC y se lleva a cabo mediante lavados sucesivos con diferentes soluciones. El objetivo es eliminar los compuestos adheridos a la pared del capilar y regenerar los grupos silanoles mediante deprotonización.

El capilar nuevo se acondicionó mediante lavados sucesivos de 10 minutos con soluciones de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>, agua ultrapura y SRC.

Al comienzo del día de trabajo, el capilar se lavó sucesivamente con 0.1 mol L<sup>-1</sup> de NaOH, agua ultrapura y SRC, teniendo una duración de 10 minutos cada uno. Entre cada corrida electroforética el capilar se lavó repetidamente con NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>, agua ultrapura y SRC durante 2 minutos. Al final del día de trabajo el capilar se lavó con NaOH 0.1 mol L<sup>-1</sup>, agua ultrapura y aire durante 5 minutos.

## **1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1.3.1 Extracción de epinastina a partir de comprimidos de Flurinol**

Para extraer EPI, que se encuentra como clorhidrato, se pulverizaron 10 comprimidos de Flurinol en mortero. El polvo resultante se disolvió con 20 mL de agua acidificada a pH 1.00 para favorecer su solubilización. La solución acuosa sobrenadante se neutralizó mediante el agregado de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.1 mol L<sup>-1</sup>, se mezcló con 20 mL de diclorometano y se agitó vigorosamente. A continuación, a la fase orgánica que se extrajo se le adicionó una pizca de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para eliminar los restos de agua. La fase orgánica se filtró y se evaporó en el evaporador rotatorio a 45 °C hasta visualizar la formación de un precipitado blanco correspondiente a la cristalización de EPI. Finalmente se continuó con el secado de la droga en estufa a 100 °C hasta obtener un peso constante.

### 1.3.1.1 Preparación de la solución madre de EPI

La solución madre de EPI se preparó por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de agua para alcanzar una concentración final de  $0.20 \text{ g L}^{-1}$ . Esta solución se conservó en oscuridad a  $4^{\circ}\text{C}$ . Las soluciones de trabajo se prepararon cada día mediante dilución en agua de un volumen determinado de solución madre, se filtraron a través de filtro jeringa de  $0.45 \mu\text{m}$  de poro con membrana de nylon y se degasificaron en baño ultrasónico durante 5 min.

### 1.3.2 Elección del modo de inyección

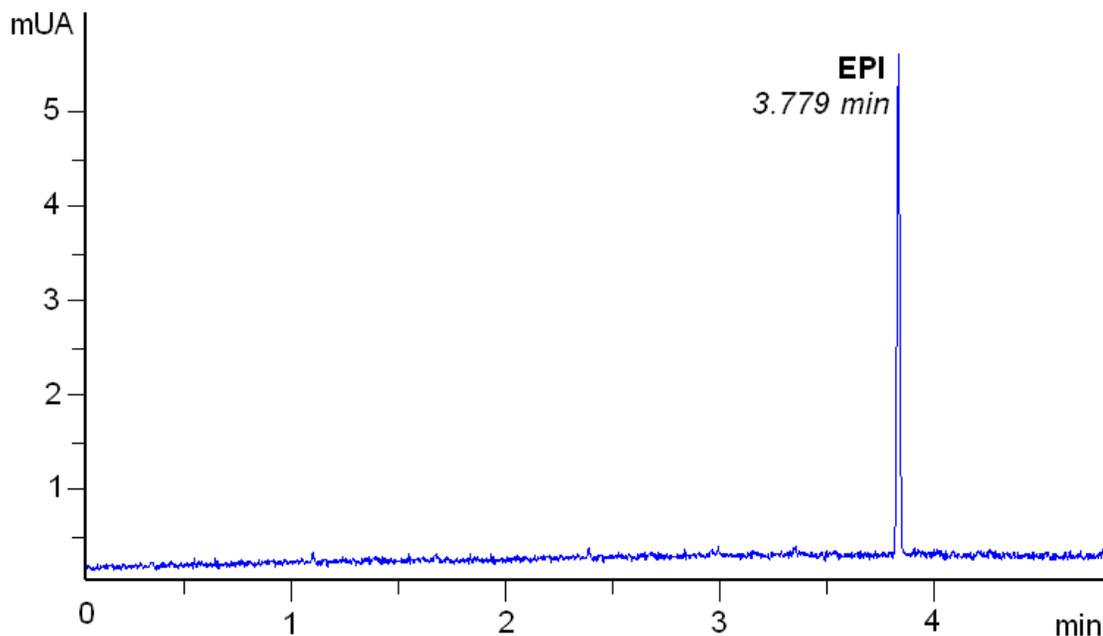
Dada la baja concentración de EPI en suero ( $25 \mu\text{g L}^{-1}$ ), en combinación con la baja sensibilidad en la detección de la técnica de electroforesis capilar, se consideró indispensable realizar un paso de pre-concentración del analito. Para tal fin, se propuso evaluar los distintos métodos electroforéticos de pre-concentración dentro del capilar sugeridos en la literatura, en combinación con la modificación de la instrumentación.

#### 1.3.2.1 Modo normal de inyección con capilar convencional

Se comenzó trabajando con un capilar desnudo de sílice fundida de  $50 \mu\text{m}$  de diámetro interno y una longitud total de 64.5 cm (56 cm hasta el detector), termostaticado a  $25^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó una solución de fosfato diácido de sodio  $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  de pH 7.00 como SRC, y se aplicó un voltaje de 25 kV. Los electroferogramas se obtuvieron a 200 nm de longitud de onda.

Como primera experiencia se inyectó hidrodinámicamente una solución acuosa de EPI ( $1.50 \text{ mg L}^{-1}$ ), aplicando 50 mbar de presión durante 5 s. El electroferograma registrado (Figura 1.2) nos muestra que se obtuvo un pico correspondiente a EPI a un tiempo de migración de 3.8 minutos y un área pequeña, si se considera que se pretende detectar una concentración menor de EPI en suero.

**Figura 1.2:** Electroferograma correspondiente a un estándar acuoso de EPI  $1.50 \text{ mg L}^{-1}$ , usando SRC de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.00, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $25 \text{ kV}$ . La longitud de onda de detección fue de  $200 \text{ nm}$  y la inyección hidrodinámica se realizó a  $50 \text{ mbar}$  durante  $5 \text{ s}$ .



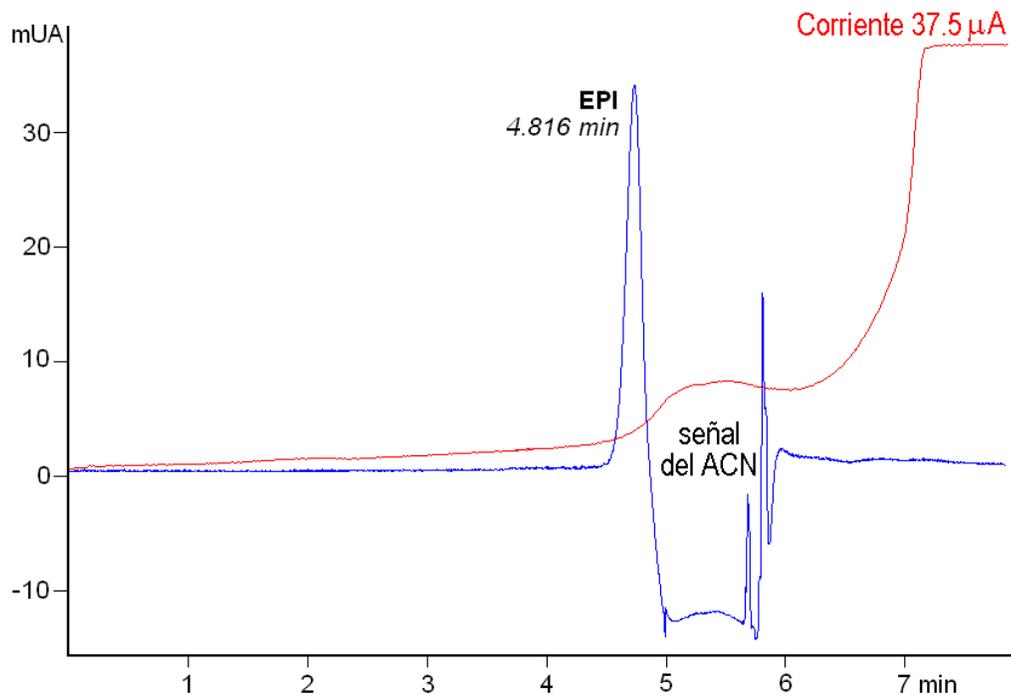
### 1.3.2.2 Modo normal de apilamiento

Posteriormente se aumentó el tiempo de inyección, manteniendo constante la presión de inyección en su valor máximo de  $50 \text{ mbar}$ . El máximo tiempo factible de inyección fue de  $30 \text{ s}$ , ya que a partir de ese momento comienzan a detectarse inconvenientes con la corriente, lo que repercute en el ancho y la forma del pico en su posterior cuantificación. Con este modo de inyección, *modo normal de apilamiento*, pueden detectarse  $0.28 \text{ mg L}^{-1}$  de EPI.

### 1.3.2.3 Apilamiento con acetonitrilo

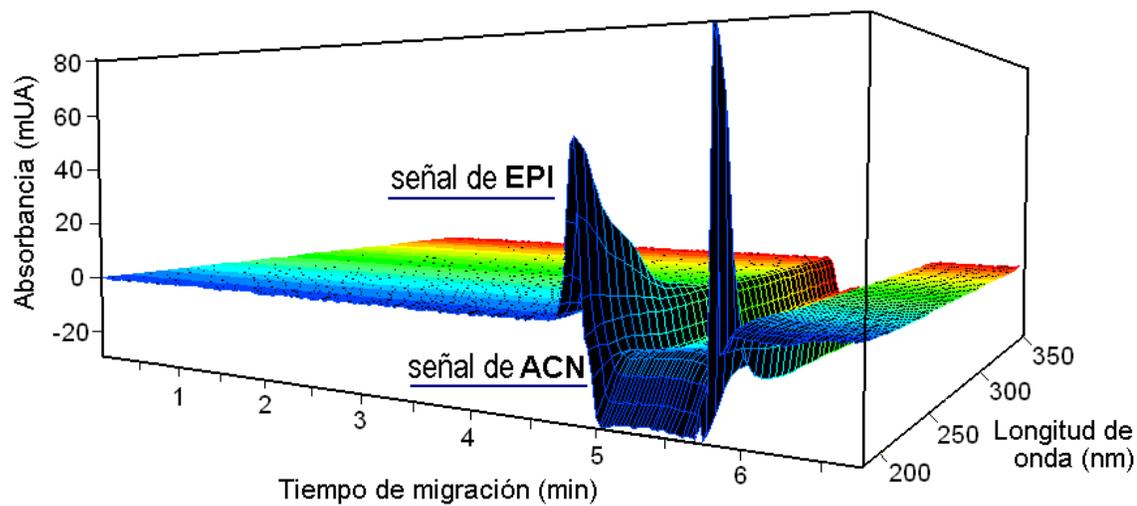
Para su implementación, se inyectó una solución de EPI ( $0.28 \text{ mg L}^{-1}$ ) disuelta en ACN mediante la aplicación de  $50 \text{ mbar}$  durante  $30 \text{ s}$ . Aquí aparecieron dos inconvenientes: el primero, relacionado con problemas instrumentales. Cuando se inyecta gran cantidad de muestra que presenta baja conductividad (otorgada por el ACN) y se aplica voltaje, la corriente generada es casi nula y fluctúa a lo largo de la corrida. Esto se ve claramente en la Figura 1.3, donde se grafica la variación de la corriente (línea roja) en función del tiempo de análisis. Se puede observar que cuando la muestra salió en su totalidad del capilar, la corriente comienza a incrementarse y se vuelve estable en su valor máximo de  $37.5 \text{ } \mu\text{A}$  (a partir de los  $7 \text{ min}$ ).

**Figura 1.3:** Electroferograma correspondiente a un estándar de EPI ( $0.28 \text{ mg L}^{-1}$  en ACN) bajo las siguientes condiciones electroforéticas: SRC de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.00, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $25 \text{ kV}$ . La longitud de onda de detección fue de  $200 \text{ nm}$  y la inyección hidrodinámica se realizó a  $50 \text{ mbar}$  durante  $30 \text{ s}$  (línea azul). Se superpone la gráfica de la variación de corriente a lo largo de la corrida (línea roja).



Por otro lado, el pico de EPI sale inmediatamente antes de la señal del ACN y, en algunas ocasiones, con algún grado de superposición. Estos inconvenientes dificultan su integración y subsiguiente cuantificación, a pesar de que se amplifica en forma considerable la señal. Esto se ve claramente en la Figura 1.4 que corresponde al registro de datos espectrales en función del tiempo de la corrida electroforética. Finalmente, la metodología de apilamiento con ACN se descartó para inyección hidrodinámica.

**Figura 1.4:** Absorbancia (eje z) en función del tiempo de migración y longitud de onda (plano xy) del electroferograma correspondiente a la inyección de  $0.28 \text{ mg L}^{-1}$  de EPI disuelta en ACN.



### 1.3.2.4 Modo normal de apilamiento con capilar burbuja

Como se mencionó en el primer capítulo correspondiente al desarrollo teórico, una de las alternativas instrumentales para realizar pre-concentración dentro del capilar es la utilización de capilares burbuja, donde el aumento de la sensibilidad se consigue como consecuencia del aumento del diámetro interno del capilar. Por lo tanto, en las experiencias posteriores se utilizó un capilar burbuja desnudo de sílice fundida de  $50 \mu\text{m}$  de diámetro interno,  $150 \mu\text{m}$  de paso óptico y una longitud total de  $64.5 \text{ cm}$  ( $56 \text{ cm}$  hasta el detector). Con esta metodología se pudo detectar una concentración de EPI de  $0.12 \text{ mg L}^{-1}$ , aplicando  $50 \text{ mbar}$  de presión durante  $30 \text{ s}$ .

### 1.3.2.5 Inyección electrocinética

La pre-concentración de analitos utilizando inyección electrocinética proporciona mayor sensibilidad que la inyección hidrodinámica, debido a que el volumen de muestra inyectado no es un limitante.

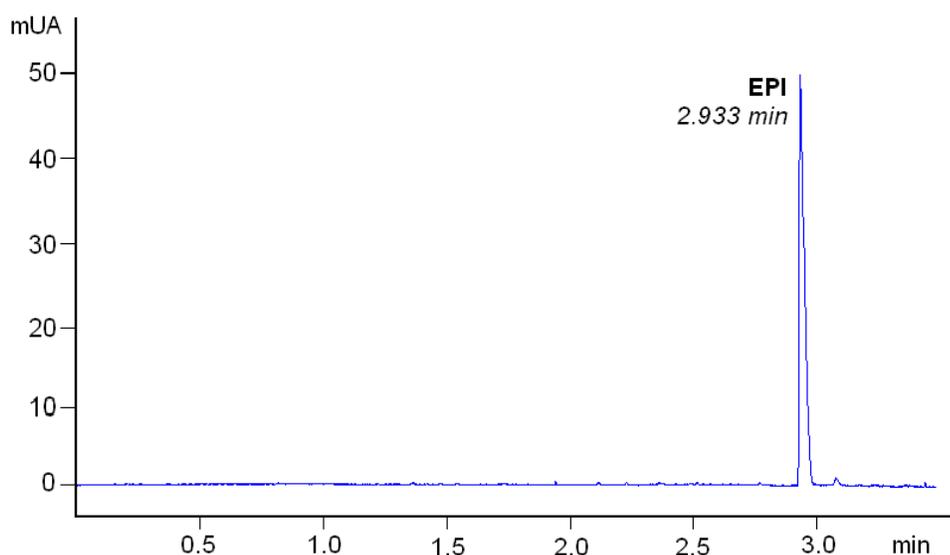
El campo eléctrico elegido durante la inyección debe ser de 3 a 5 veces menor que el campo aplicado en la separación. Teniendo en cuenta esta especificación, se inyectó una solución acuosa de EPI  $0.12 \text{ mg L}^{-1}$  mediante la aplicación de  $6 \text{ kV}$  durante  $3 \text{ s}$ . El campo generado en la inyección fue de  $93 \text{ V cm}^{-1}$ , aproximadamente tres veces menor que el de separación ( $310 \text{ V cm}^{-1}$ ).

Cuando se aplica inyección electrocinética, sólo ingresan dentro del capilar cationes o aniones, impidiéndose el ingreso de matriz de la muestra. Por este motivo, el estándar de EPI

se disolvió en agua ultrapura a pH 2.00 para favorecer la protonación de la molécula y permitir su ingreso al capilar.

Con esta metodología se aumenta considerablemente tanto la sensibilidad en la detección, como la variabilidad en la cantidad de muestra inyectada, ya que no sólo juega un rol fundamental la matriz de la muestra, sino que además el tiempo de inyección es muy reducido. Para mejorar la repetitividad de los análisis, se aumentó progresivamente el tiempo de inyección, logrando una amplificación de la señal cuando se aplica 6 kV durante 30 s (Figura 1.5). Con esta metodología se pudieron detectar concentraciones de EPI de hasta  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$ .

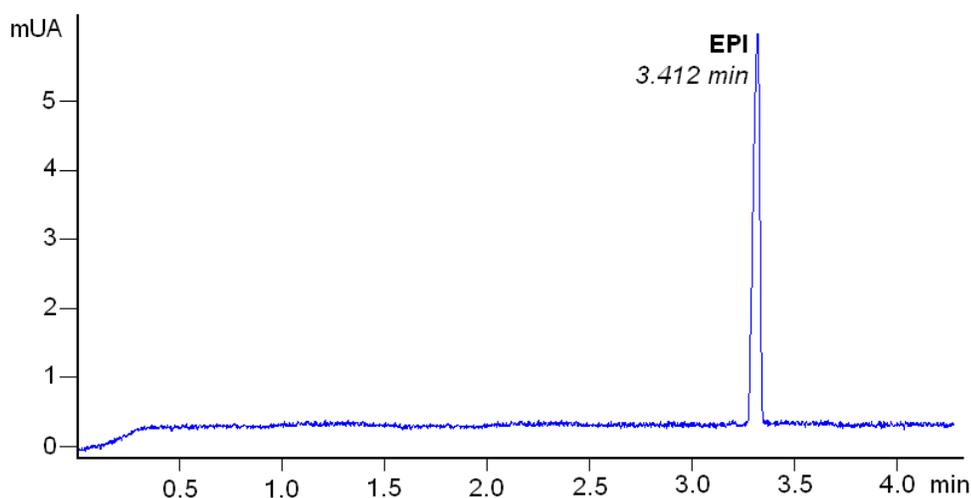
**Figura 1.5:** Electroferograma correspondiente a un estándar de EPI ( $0.12 \text{ mg L}^{-1}$  en agua acidificada) usando SRC de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.00, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y 25 kV. La longitud de onda de detección fue de 200 nm y la inyección electrocinética se realizó a 6 kV durante 30 s.



### 1.3.2.6 Inyección electrocinética amplificada

La EPI disuelta en agua acidificada se inyectó electrocinéticamente dentro del capilar aplicando 20 kV durante 20 s. De esta manera se obtuvo una **amplificación en la inyección** que permitió detectar  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de EPI (Figura 1.6). En consecuencia este fue el modo de inyección seleccionado para las experiencias posteriores.

**Figura 1.6:** Electroferograma correspondiente a un estándar de EPI ( $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  en agua acidificada) usando SRC de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.00, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $25 \text{ kV}$ . La longitud de onda de detección fue de  $200 \text{ nm}$ . La inyección electrocinética amplificada se realizó a  $20 \text{ kV}$  durante  $20 \text{ s}$ .



### 1.3.3 Elección del estándar interno

Uno de los inconvenientes más comunes en los análisis electroforéticos es la variación en el tiempo de migración de los analitos y en la movilidad del FEO cuando se realizan corridas consecutivas. Este comportamiento se origina por las variaciones en las condiciones de la pared del capilar, la composición, el pH y la viscosidad de la SRC, la naturaleza de la muestra y parámetros instrumentales tales como la temperatura y el voltaje aplicado. Además, debido a la difusión longitudinal, cuanto mayor es el tiempo de migración, más ancho es el pico, por lo que cualquier variabilidad causará una disminución en la precisión del área.

Sumado a lo comentado, el modo de inyección seleccionado no es tan reproducible como la inyección hidrodinámica, ya que pequeñas variaciones en la conductividad de la muestra pueden producir cambios significativos en la cantidad inyectada.

El uso de un estándar interno (EI) puede mejorar significativamente la reproducibilidad en el tiempo de migración, ya que cualquier variabilidad en la inyección de la muestra o en las condiciones instrumentales o electroforéticas afectará de la misma manera a ambos analitos, manteniendo constante la relación entre sus áreas.

En la elección de un estándar interno se deben tener en cuenta varios criterios: debe tener propiedades fisicoquímicas similares a las del analito que se va a analizar (estructura, pKa, solubilidad, etc.), debe presentar un área similar a la del analito en estudio, debe ser estable y químicamente inerte y debe responder en forma semejante al analito con el detector seleccionado.

Ohtani y colaboradores (Othani y col., 1996) utilizaron difenidol como estándar interno en la determinación de EPI en suero humano mediante CLAR. Este estándar presenta un tiempo de retención de aproximadamente 14.8 minutos, mucho mayor al de la EPI de 8.1 minutos, aumentando considerablemente el tiempo de análisis. Aquí surge un nuevo criterio a tener en cuenta: el tiempo de migración del estándar interno debe ser similar al del analito en estudio, con el objetivo de minimizar el tiempo el análisis. Pero, a su vez, ambos analitos deben separarse completamente.

En este trabajo se evaluaron las siguientes drogas como estándar interno: lidocaína clorhidrato, fenilefrina, paracetamol, ibuprofeno, cafeína y ácido acetil salicílico (AAS). En la Tabla 1.1 se resumen algunas características útiles para su elección.

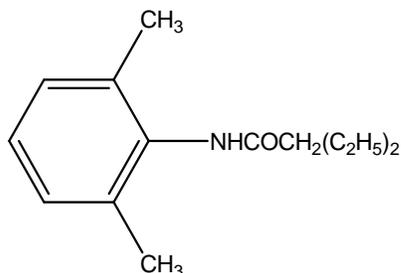
**Tabla 1.1:** Características eléctricas de las drogas utilizadas en la elección del EI y sus tiempos de migración. Condiciones electroforéticas: 0.02 mol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.00, inyección 20 kV durante 20 s con un voltaje de separación de 25 kV.

Analito	pKa	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Carga a pH 7.00	Tiempo de migración (min)
Epinastina HCl	11.2	249.31	+	3.25
Cafeína	10.4	194.19	+	3.05
Fenilefrina	9.6	203.67	+	3.18
Paracetamol	9.5	151.16	+	2.96
Lidocaína HCl	7.9	270.66	+	3.48
Ibuprofeno	4.4	206.28	-	7.20
AAS	3.49	180.16	-	7.67

Las drogas ibuprofeno y AAS se descartaron como estándar interno, debido a que sus tiempos de migración (7.20 y 7.67 min, respectivamente) resultaron bastante mayores que el tiempo de migración de EPI (3.25 min). De las drogas restantes se optó por lidocaína, por ser la droga más accesible (Figura 1.7), aunque pudo haberse seleccionado cualquiera de las otras.

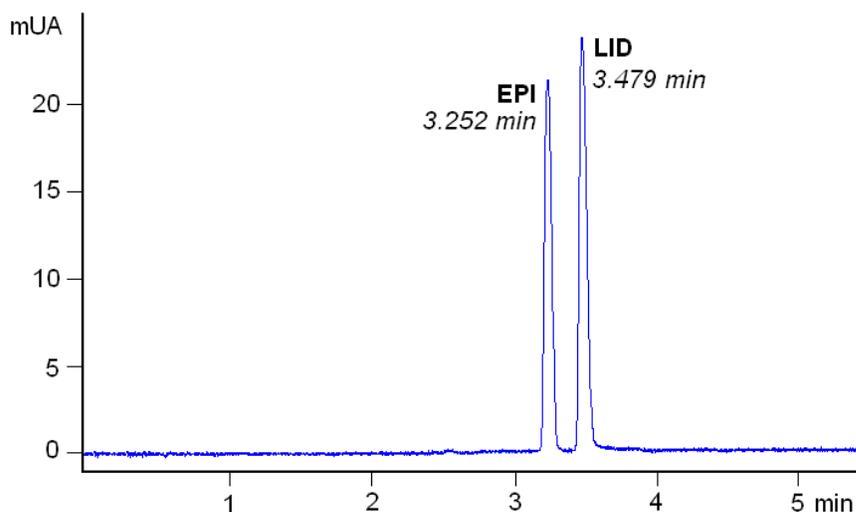
La solución madre de LID se preparó por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de agua para alcanzar una concentración final del 0.20 g L<sup>-1</sup>. Esta solución se conservó en oscuridad a 4°C. Las soluciones de trabajo se prepararon cada día mediante dilución de un volumen determinado de solución madre en agua, se filtraron a través de filtro jeringa de 0.45 µm de poro de membrana de nylon y se degasificaron en baño ultrasónico durante 5 min.

**Figura 1.7:** Estructura química de lidocaína.



En la Figura 1.8 se muestra un electroferograma de una mezcla de EPI y LID, en la que se observa que los picos de ambos analitos están débilmente resueltos. Los tiempos de migración de EPI y LID a pH 7.00 son similares debido a que ambas moléculas poseen carga neta positiva.

**Figura 1.8:** Electroferograma correspondiente a una mezcla de EPI ( $7.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y LID ( $14.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) en agua acidificada, bajo las siguientes condiciones electroforéticas: SRC de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$   $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  pH 7.00, a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $25 \text{ kV}$ . La longitud de onda de detección fue de  $200 \text{ nm}$  y la inyección electrocinética se realizó a  $20 \text{ kV}$  durante  $20 \text{ s}$ .



### 1.3.4 Selección de factores

Para determinar los factores que afectan la resolución entre los picos correspondientes a EPI y LID y el tiempo de análisis, se realizó un diseño experimental de Plackett-Burman que consistió en la realización de 12 experiencias. Los factores que se analizaron fueron: concentración y pH de la SRC, voltaje de separación ( $V_s$ ) y voltaje y tiempo de inyección ( $V_i$  y  $T_i$  respectivamente). Cada uno de estos factores se evaluó a dos niveles (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2:** Combinaciones de los factores a evaluar en el diseño experimental de Plackett-Burman para la selección de factores.

Experiencia	Concentración de la SRC (mol L <sup>-1</sup> )	pH	Voltaje de inyección (kV)	Tiempo de inyección (min)	Voltaje de separación (kV)
1	0.04	6.95	15	25	20
2	0.04	6.95	25	35	20
3	0.04	6.95	25	25	30
4	0.02	6.95	25	35	20
5	0.02	6.95	15	35	30
6	0.02	6.95	15	25	20
7	0.04	9.16	25	25	30
8	0.04	9.16	15	35	20
9	0.04	9.16	15	35	30
10	0.02	9.16	15	25	30
11	0.02	9.16	25	25	20
12	0.02	9.16	25	35	20

La evaluación consistió en analizar una solución estándar conteniendo 7.0 µg L<sup>-1</sup> de EPI y 15.0 µg L<sup>-1</sup> de LID en todas las condiciones citadas. En cada caso se evaluó la resolución entre los picos de EPI y LID y el tiempo de análisis. El tiempo de análisis se asignó al tiempo de migración correspondiente al analito más lento, en este caso LID (Tabla 1.3).

La corriente generada dentro del capilar fue menor a 66 µA en todas las experiencias. En las separaciones electroforéticas este valor se considera aceptable, ya que no ocasiona calentamiento del capilar por efecto Joule. Por este motivo, se descartó esta respuesta en la evaluación.

**Tabla 1.3:** Resultados experimentales correspondientes a las experiencias realizadas en el diseño experimental de Plackett-Burman.

Experiencia	Resolución EPI/LID	Tiempo de análisis (min)
1	1.02	4.64
2	0.37	4.41
3	0.86	3.14
4	0.00	3.89
5	0.85	2.80
6	1.54	4.84
7	7.40	3.48
8	8.21	6.32
9	9.09	3.58
10	11.71	3.31
11	4.81	4.31
12	4.85	4.00

La resolución se define como:

$$R = 2 \times \frac{(tm_2 - tm_1)}{(w_1 + w_2)} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

en donde  $tm_1$  y  $tm_2$  son los tiempos de migración de dos picos consecutivos y  $w_1$  y  $w_2$  son los anchos de dichos picos.

El numerador de la ecuación hace referencia a los procesos de separación en términos de migración diferencial, y el denominador a los procesos de dispersión longitudinal. Debido a que los analitos están enfocados en zonas muy pequeñas (como consecuencia del perfil plano del FEO), pequeñas diferencias en sus movilidades (menores al 0.05 %) son suficientes para que su resolución sea completa. Cuando la resolución es mayor a 1.50, se considera que dos analitos están totalmente resueltos (Guzmán, 1993).

Posteriormente, se aplicó un test ANOVA a los datos experimentales. En la Tabla 1.4 se muestran los valores de probabilidad obtenidos para cada factor en función de la respuesta evaluada, indicando entre paréntesis el tipo de influencia sobre la respuesta (positiva o negativa). Un factor se considera significativo cuando su probabilidad es menor a 0.05.

**Tabla 1.4:** Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño de Plackett-Burman.

Factor analizado	Valor de probabilidad <sup>a</sup>	
	Resolución (EPI/LID)	Tiempo de análisis (min)
Modelo	0.0021	0.0108
Concentración de la SRC (mg L <sup>-1</sup> )	0.7339	0.0411 (+)
pH	0.0002 (+)	0.1100
Voltaje de inyección (kV)	0.0463 (-)	0.0470 (-)
Tiempo de inyección (min)	0.6287	0.8023
Voltaje de separación (kV)	0.1774	0.0009 (-)

<sup>a</sup> se considera significativo cuando es menor a 0.05

### 1.3.4.1 Análisis de los efectos

#### 1.3.4.1.1 Efecto de la concentración de la SRC

El incremento de la concentración de la SRC de 0.02 a 0.04 mol L<sup>-1</sup> aumenta el tiempo de migración de los analitos.

El potencial  $\zeta$  depende de la fuerza iónica de la SRC, como lo describe la teoría de la doble capa (Heiger, 2000). El incremento de la fuerza iónica resulta en una compresión de la doble capa, disminuyendo el potencial  $\zeta$  y, por lo tanto, el FEO. La disminución del FEO se traduce en un aumento en el tiempo de análisis.

#### 1.3.4.1.2 Efecto del pH

El incremento en el pH de la SRC de 6.95 a 9.16 se traduce en un aumento en la resolución. El pH de la SRC determina la carga neta del analito para compuestos con propiedades ácido-base. La molécula de analito poseerá carga neta positiva si se trabaja a un pH por debajo de su pKa, y migrará hacia el cátodo delante del FEO. Por encima de su pKa ocurrirá lo opuesto.

El pKa de la EPI es 11.2 y el pKa de la LID es 7.9 (Index Merck, 2001). Por lo tanto, a pH 6.95 ambos analitos poseen carga neta positiva. En cambio a pH 9.16 la EPI posee carga neta positiva y la LID carga neta negativa.

Este comportamiento condice con lo observado en los datos experimentales de la resolución. A pH 6.95 la mayoría de los valores de resolución obtenidos son menores a 1.50, y sólo en la experiencia 6 ambos analitos pueden separarse completamente, debido a la

combinación favorable de los factores restantes. En cambio, a pH 9.16 todos los valores de resolución son mayores a 1.50 y algunos considerablemente elevados (Tabla 1.5).

**Tabla 1.5:** Comportamiento de la resolución entre EPI y LID con el cambio de pH.

Experiencia	pH	Resolución EPI/LID
1	6.95	<b>1.02</b>
2	6.95	<b>0.37</b>
3	6.95	<b>0.86</b>
4	6.95	<b>0</b>
5	6.95	<b>0.85</b>
6	6.95	<b>1.54</b>
7	9.16	<b>7.4</b>
8	9.16	<b>8.21</b>
9	9.16	<b>9.09</b>
10	9.16	<b>11.71</b>
11	9.16	<b>4.81</b>
12	9.16	<b>4.85</b>

#### 1.3.4.1.3 Efecto del voltaje de inyección

El incremento en el voltaje de inyección de 15 a 25 kV ocasiona una disminución en la resolución y en el tiempo de análisis.

La cantidad de muestra inyectada ( $Q$  en gramos o moles) es directamente proporcional al voltaje aplicado, de acuerdo con la ecuación de inyección electrocinética (*Ecuación 1.2*).

$$Q = \frac{(\mu_e + \mu_{FEO}) V \pi r C t}{L} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

en donde  $\mu_e$  es la movilidad electroforética del analito,  $\mu_{FEO}$  es la movilidad del flujo electrosmótico,  $V$  el voltaje aplicado,  $r$  el radio del capilar,  $C$  la concentración de analito en la muestra,  $t$  el tiempo y  $L$  la longitud total del capilar.

Un voltaje elevado conducirá al ingreso de mayor cantidad de especies iónicas dentro del capilar. La resolución entre dos especies es inversamente proporcional a la suma de los anchos de los picos, de acuerdo con la *Ecuación 1.1*. Por lo tanto, si se introduce mayor

cantidad de muestra, el ancho de los picos de los analitos será considerablemente mayor y la resolución entre ellos disminuirá.

#### 1.3.4.1.4 Efecto del voltaje de separación

En incremento del voltaje de separación de 20 a 30 kV ocasiona una disminución en el tiempo de análisis.

La velocidad de los analitos depende de su movilidad electroforética y del campo eléctrico aplicado. El campo eléctrico es función del voltaje y de la longitud del capilar. Si se mantiene constante la longitud del capilar y se incrementa el voltaje, se producirá un aumento en la velocidad de los analitos, disminuyendo de esta manera el tiempo de análisis.

El diseño de Plackett-Burman proporciona resultados coherentes cuando no hay interacción entre los distintos factores. Los coeficientes de correlación del ajuste  $R^2$  fueron de 0.9299 para la resolución y de 0.8759 para el tiempo de análisis. Además los residuos del ajuste presentaron una distribución aleatoria indicando que el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos.

Debido al muy buen ajuste de las respuestas al modelo seleccionado y a que todos los factores fueron significativos, no se corroboró si había o no interacciones entre ellos.

Finalmente, se puede concluir que todos los factores evaluados, excepto el tiempo de inyección, resultaron significativos y deben ser considerados en el análisis posterior.

### **1.3.5 Optimización de la separación electroforética**

Se determinaron las condiciones experimentales que permitieron obtener un valor favorable de resolución entre EPI y LID, un mínimo tiempo de análisis y un valor aceptable de corriente.

#### **1.3.5.1 Construcción del diseño experimental**

Se construyó un diseño experimental central compuesto, que consistió en 30 experiencias provenientes de la combinación entre las variables independientes seleccionadas, en los siguientes rangos: concentración de la SRC 0.01 – 0.05 mol L<sup>-1</sup>, pH 6.72 – 9.72, voltaje de inyección 10 – 30 kV y voltaje de separación 17.5 – 27.5 kV (Tabla 1.6). El límite superior e inferior de cada factor quedó delimitado por las restricciones instrumentales. Por otro lado, la inyección de la muestra se realizó al voltaje especificado en cada experiencia durante 30 s. Este tiempo corresponde al valor medio del rango analizado en el diseño de Plackett-Burman. La

temperatura del capilar se fijó en 25 °C y los datos se recogieron a una longitud de onda de 200 nm.

Todas las experiencias se realizaron en orden aleatorio para minimizar los efectos de los factores incontrolados que pueden introducir errores en las mediciones. Todas las corridas del diseño experimental se realizaron con soluciones de trabajo de 7  $\mu\text{g L}^{-1}$  de EPI y 12  $\mu\text{g L}^{-1}$  de LID.

Las respuestas obtenidas para cada combinación de factores se muestran en la Tabla 1.7. En este análisis se tuvo en cuenta la corriente generada dentro del capilar, debido a la posible aparición de una combinación insatisfactoria de factores que generase una elevada corriente, ocasionando calentamiento del capilar.

**Tabla 1.6:** Diseño experimental central compuesto: Combinaciones de los factores seleccionados.

Experiencia	Concentración de la SRC (mol L <sup>-1</sup> )	pH	Voltaje de inyección (Vi-kV)	Voltaje de separación (Vs-kV)
1	0.03	6.72	20	22.5
2	0.02	7.50	15	25.0
3	0.02	7.50	15	20.0
4	0.02	7.50	25	25.0
5	0.02	7.50	25	20.0
6	0.04	7.50	15	20.0
7	0.04	7.50	15	25.0
8	0.04	7.50	25	25.0
9	0.04	7.50	25	20.0
10	0.01	8.25	20	22.5
11	0.03	8.25	20	22.5
12	0.03	8.25	20	22.5
13	0.03	8.25	20	22.5
14	0.03	8.25	20	22.5
15	0.03	8.25	20	22.5
16	0.03	8.25	20	22.5
17	0.03	8.25	10	22.5
18	0.03	8.25	20	27.5
19	0.03	8.25	20	17.5
20	0.03	8.25	30	22.5
21	0.05	8.25	20	22.5
22	0.02	9.02	15	20.0
23	0.02	9.02	15	25.0
24	0.02	9.02	25	25.0
25	0.02	9.02	25	20.0
26	0.04	9.02	15	20.0
27	0.04	9.02	15	25.0
28	0.04	9.02	25	25.0
29	0.04	9.02	25	20.0
30	0.03	9.72	20	22.5

**Tabla 1.7:** Respuestas obtenidas para cada combinación de factores en el diseño central compuesto: Resolución, Tiempo de análisis y corriente.

Experiencia	Resolución EPI/LID	Tiempo de análisis (min)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
1	0.76	3.85	31.4
2	0.99	<b>3.13</b>	<b>23.2</b>
3	0.96	<b>3.96</b>	15.6
4	0.73	3.12	19.2
5	0.78	3.72	18.8
6	1.13	4.30	31.0
7	0.83	3.23	42.0
8	0.00	2.62	31.5
9	0.00	3.41	28.2
10	1.58	3.07	10.8
11	2.22	3.41	27.4
12	2.07	3.63	28.1
13	2.09	3.56	27.9
14	2.12	3.56	28.0
15	2.16	3.64	28.0
16	2.18	3.68	28.3
17	5.15	4.08	35.5
18	3.17	3.19	39.4
19	2.60	4.99	22.6
20	0.97	2.94	35.5
21	3.79	4.56	56.0
22	6.36	4.43	20.6
23	4.95	3.49	26.2
24	1.86	2.84	30.3
25	1.93	3.53	15.3
26	6.00	5.11	40.0
27	6.04	3.96	<b>52.5</b>
28	5.39	4.14	52.0
29	3.69	4.75	34.4
30	5.59	4.39	36.0

### 1.3.5.2 Modelado de las respuestas

Los datos experimentales de la resolución EPI/LID, el tiempo de análisis y la corriente se ajustaron mediante modelos polinomiales. Se eliminó el valor del tiempo de análisis correspondiente a las experiencias 2 y 3, y el valor de la corriente correspondiente a las experiencias 2 y 27. Esta eliminación se basó en el estudio de determinados parámetros que permiten estudiar la influencia de cada experiencia individual sobre el modelo seleccionado. Los valores experimentales que se eliminaron presentan una influencia desproporcionada sobre el modelo seleccionado (Myers y Montgomery, 1995).

Los coeficientes del modelo se calcularon mediante regresión múltiple con eliminación por retroceso (eliminación *backward*) (Derringer y Suich, 1980). Este procedimiento consiste en realizar la regresión con todos los términos del modelo, luego quitar el término con el valor de probabilidad parcial más alto. Finalmente, el proceso se detiene cuando el valor de probabilidad del siguiente término satisface el valor de  $\alpha$  especificado. El modelo seleccionado se validó mediante el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 1.8).

**Tabla 1.8:** Resultados del ANOVA para las respuestas obtenidas en el diseño central compuesto.

Parámetro	Resolución EPI/LID	Tiempo de análisis (min)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
Valor de probabilidad <sup>a</sup>			
<b>Modelo</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
A- Concentración de la SRC ( $\text{mg L}^{-1}$ )	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
B- pH	< 0.0001	0.0077	< 0.0001
C- Voltaje de inyección (kV)	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
D- Voltaje de separación (kV)	0.0075	< 0.0001	< 0.0001
A <sup>2</sup>	< 0.0001	0.0007	< 0.0001
B <sup>2</sup>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
C <sup>2</sup>	< 0.0001	0.2474	< 0.0001
D <sup>2</sup>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
AB	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
AC	0.0090	< 0.0001	< 0.0001
AD	0.0001	0.2732	< 0.0001
BC	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
BD	0.0338	0.5082	< 0.0001
CD	< 0.0001	0.0003	< 0.0001
ABC	< 0.0001	0.9130	0.0002
ABD	< 0.0001	0.5104	0.7395
ACD	0.0187	0.5152	< 0.0001
BCD	< 0.0001	0.4133	< 0.0001
A <sup>2</sup> B	< 0.0001	0.6956	< 0.0001
A <sup>2</sup> C	< 0.0001	0.0155	< 0.0001
A <sup>2</sup> D	0.0007	0.5124	< 0.0001
AB <sup>2</sup>	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
B <sup>3</sup>	< 0.0001		
<b>Falta de ajuste</b>	<b>0.7893</b>	<b>0.8948</b>	<b>0.7395</b>

<sup>a</sup> se considera significativo cuando es menor a 0.05.

La resolución, el tiempo de análisis y la corriente se ajustaron mediante modelos cúbicos modificados, por ser los que mejor explican el comportamiento de dichas respuestas en relación a los factores estudiados. Estos modelos sólo contienen los términos que resultaron significativos en el ajuste y los restantes, no significativos, fueron excluidos en la eliminación por retroceso.

La probabilidad obtenida para el modelo es menor 0.05 para las tres respuestas, indicando que sus términos son significativos. Los valores de probabilidad para cada factor, mostrados en la Tabla 1.8, indican que la concentración de la SRC, el pH, el voltaje de inyección y de separación son factores significativos para las tres respuestas con un 95 % de confianza.

Por otro lado, la prueba de falta de ajuste resultó no significativa para todas las respuestas ( $p > 0.05$ ), es decir, se puede considerar que el modelo elegido ajusta de manera satisfactoria a los datos experimentales.

Además, dichos modelos exhiben baja desviación estándar (entre 0.053 y 0.279) y los cuadrados de los coeficientes de correlación ajustados obtenidos (mayores a 0.9866) indican una buena relación entre los datos experimentales y los estimados por el modelo (Tabla 1.9).

**Tabla 1.9:** Parámetros estadísticos correspondientes al ajuste de la resolución, el tiempo de análisis y la corriente.

Parámetro estadístico	Resolución	Tiempo de análisis (min)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
Desviación estándar	0.053	0.075	0.279
Coefficiente de variación (%)	2.02	1.99	0.93
$R^2$	0.9998	0.9930	0.9998
$R^2$ ajustado	0.9993	0.9866	0.9993

### 1.3.5.3 Aplicación de la función deseabilidad

Mediante el uso de la función deseabilidad se optimizaron simultáneamente las tres respuestas: resolución EPI/LID, tiempo de análisis y corriente. La Tabla 1.10 muestra los criterios que se utilizaron para optimizar cada respuesta en forma individual, los límites superior e inferior y la importancia que se le adjudica a cada respuesta con respecto a las demás.

**Tabla 1.10:** Criterios utilizados para la optimización de las respuestas, con su correspondiente peso e importancia.

Respuestas	Criterio	Límite superior	Límite inferior	Peso superior	Peso inferior	Importancia
Resolución	valor fijo de 2.00	1.50	6.36	0.1	0.8	3
Tiempo de análisis (min)	minimizar	2.62	5.11	–	0.8	3
Corriente ( $\mu\text{A}$ )	mantener en el rango	10.80	56.00	–	–	3

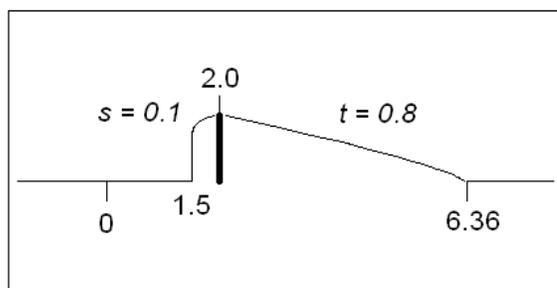
La resolución EPI/LID se ajustó al valor fijo de 2.00, en el rango comprendido entre 1.50 (valor obtenido en una resolución completa) y el valor máximo registrado de 6.36. Se utilizó un coeficiente de 0.1 (peso superior) para darle mayor importancia a los valores de resolución entre 1.50 y 2.00, y un coeficiente de 0.8 (peso inferior) para valores de resolución entre 2.00 y 6.36 (Figura 1.9 A).

A pesar de que el tiempo de análisis fue considerablemente bajo, se minimizó entre su valor mínimo de 2.62 min y su valor máximo de 5.11 min. Se utilizó un coeficiente de 0.8 para darle mayor énfasis a valores cercanos al mínimo (Figura 1.9 B).

**Figura 1.9:** Representación gráfica de los criterios utilizados para optimizar: A) la resolución y B) el tiempo de análisis, con su correspondiente peso e importancia.

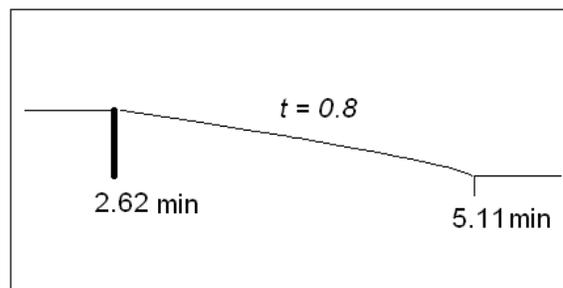
### (A) Resolución

criterio ajustar a un valor fijo



### (B) Tiempo de análisis

criterio minimizar

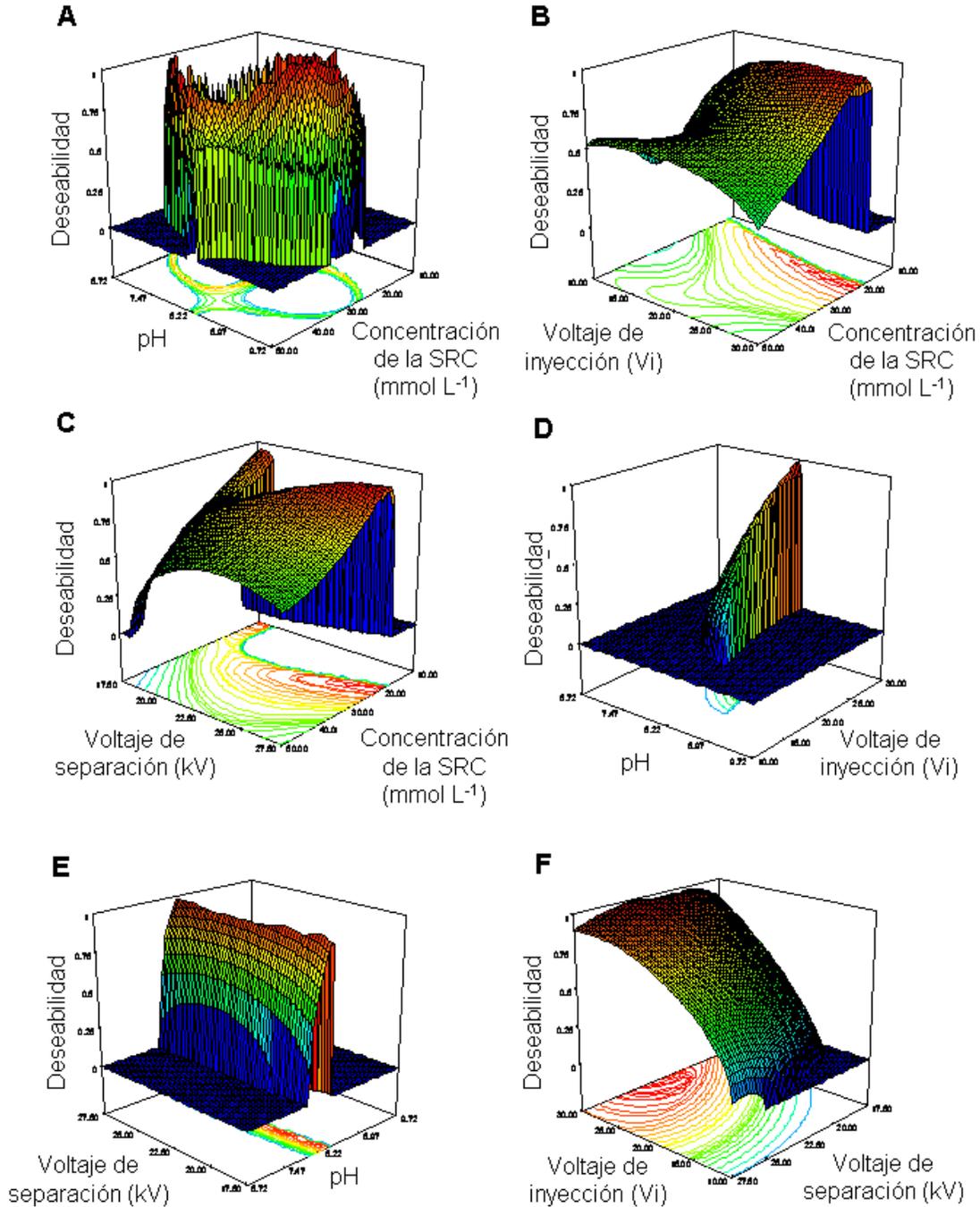


El rango de corriente obtenido (entre 10.8 y 56.0  $\mu\text{A}$ ) se considera aceptable en las separaciones electroforéticas, ya que no ocasiona calentamiento del capilar por efecto Joule. Por este motivo, esta respuesta se mantuvo en el rango experimental obtenido.

Luego se realizó la optimización obteniendo como resultado que las condiciones experimentales que generan el máximo de la función deseabilidad, es decir, que satisfacen todos los criterios especificados son:  $0.016 \text{ mol L}^{-1}$  de SRC pH 8.50, con un voltaje de inyección de 20 kV y un voltaje de separación de 25 kV. La función deseabilidad tomó un valor de 1.00. Las respuestas individuales correspondientes a las condiciones óptimas son: resolución EPI/LID: 2.00 y tiempo de análisis: 2.6 minutos.

Las superficies de respuestas obtenidas para la función deseabilidad global se muestran en la Figura 1.10 A-F. Estas gráficas se obtuvieron para dos factores manteniendo los demás constantes en sus valores óptimos.

**Figura 1.10:** Gráficas de superficie de respuesta correspondientes a la función deseabilidad en función de los siguientes pares de factores, manteniendo constantes en sus valores óptimos los factores restantes: A) concentración SRC vs. pH; B) concentración SRC vs. Vi; C) concentración SRC vs. Vs; D) pH vs. Vi; E) pH vs. Vs y F) Vi vs. Vs.

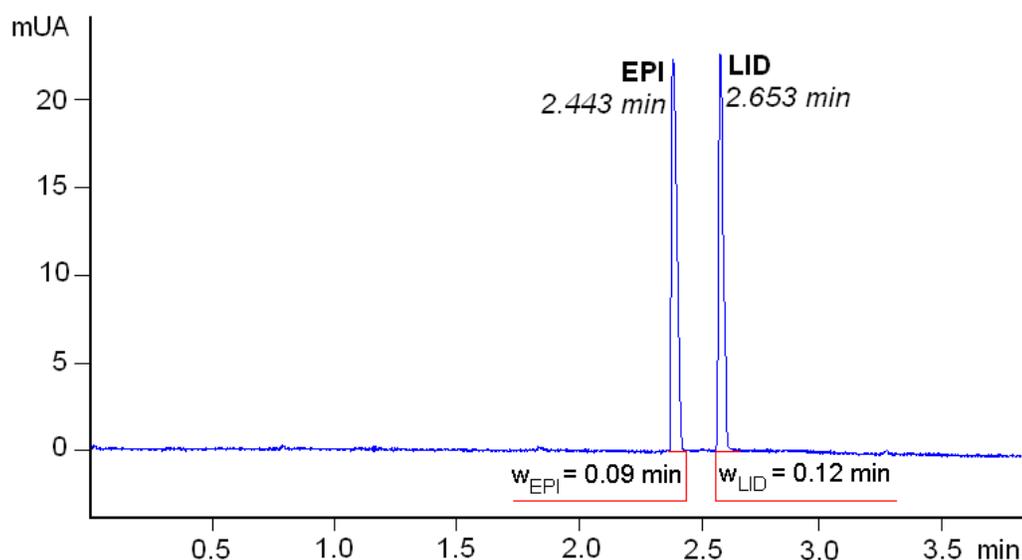


Realizando un análisis global de la Figura 1.10, se puede concluir que la función deseabilidad adquiere valores mayores a 0 sólo en zonas muy estrechas correspondientes a valores bajos de concentración de SRC, valores medios de pH y en casi todo el rango de voltaje de inyección y voltaje de separación.

De acuerdo con los resultados que se obtuvieron en el diseño de Plakett-Burman, el aumento de concentración de la SRC proporciona un incremento de resolución entre EPI y LID, pero también incrementa el tiempo de análisis. Consecuentemente, las condiciones experimentales óptimas son las que muestran un buen compromiso entre una separación adecuada y un mínimo tiempo de análisis.

Los valores obtenidos en la optimización se corroboraron experimentalmente. El electroferograma correspondiente se muestra en la Figura 1.11.

**Figura 1.11:** Electroferograma correspondiente a un estándar de EPI ( $7.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y LID ( $12.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ) bajo las condiciones experimentales óptimas, donde se indica el tiempo de análisis y en ancho de los picos de EPI y LID.



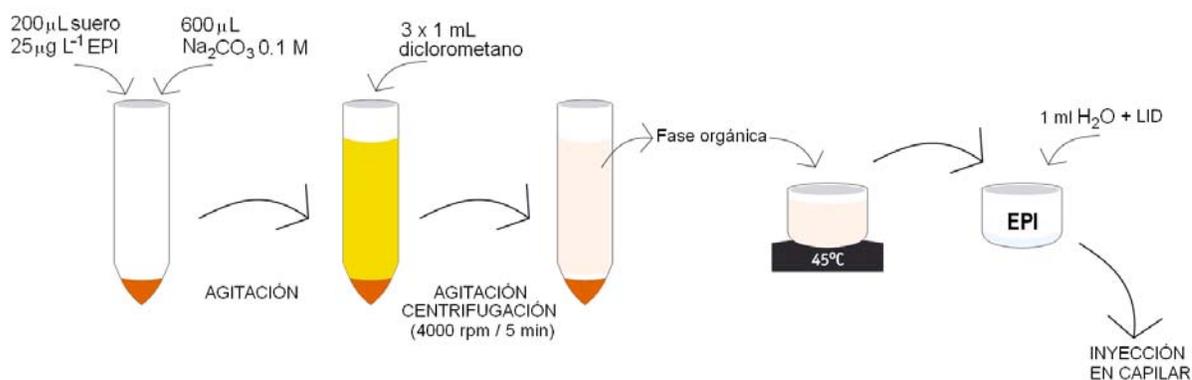
### 1.3.6 Preparación de la muestra real

La inyección electrocinética directa del suero sin procesar resulta prácticamente imposible. Una de las razones es que la muestra de suero presenta una conductividad significativa, imposibilitando la inyección por voltaje, y se debe recordar que una de las condiciones para realizar la inyección electrocinética es que la matriz de la muestra sea de baja conductividad. Por otro lado, su viscosidad y la variación de la composición entre alícuotas de un mismo suero, convierten a la inyección de la muestra en un proceso irreproducible. Por lo

tanto, es necesario que el analito se encuentre en una forma compatible con el método de inyección.

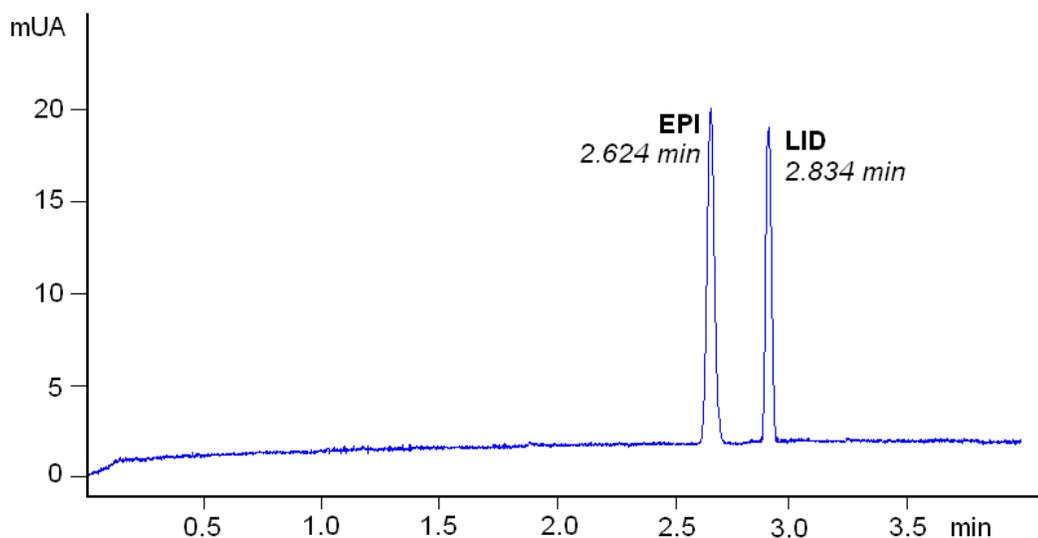
Para realizar el acondicionamiento de la muestra, se mezclaron 200  $\mu\text{L}$  de suero humano con 600  $\mu\text{L}$  de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  0.1  $\text{mol L}^{-1}$  en un tubo de centrifuga de polipropileno y dicha mezcla se agitó mediante un vortex. Para extraer la EPI se adicionaron 3 porciones de diclorometano de 2.0 mL cada una, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos para favorecer la separación de fases. Posteriormente, la fase orgánica se transfirió a un tubo limpio y se evaporó a sequedad en un baño de agua a 45  $^\circ\text{C}$  (Othani y col., 1996). Finalmente, se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de solución de LID de 0.24  $\text{mg L}^{-1}$ , completando la reconstitución del residuo con 1.0 mL de agua ultrapura acidificada a pH 2.00. Antes de su inyección en el capilar, la muestra se filtró a través de un filtro jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro. La secuencia de preparación de la muestra se resume en la Figura 1.12.

**Figura 1.12:** Secuencia de pasos para la preparación de la muestra.



La muestra se introdujo dentro del capilar electrocinéticamente mediante la aplicación de 20 kV durante 30 s. La corrida electroforética se llevó a cabo con una SRC de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0.016  $\text{mol L}^{-1}$  a pH 8.50 y se aplicó un voltaje de separación de 25 kV. Los electroferogramas se registraron a 200 nm y la temperatura del capilar fue de 25  $^\circ\text{C}$  (Figura 1.13).

**Figura 1.13:** Electroferograma correspondiente al extracto de suero humano conteniendo  $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de EPI. Las concentraciones finales de EPI y LID luego de la preparación de la muestra fueron:  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de EPI (2.6 min) y  $7.2 \mu\text{g L}^{-1}$  de LID (2.8 min).



Como se puede observar en la Figura 1.13, existe un pequeño aumento en los tiempos de migración de ambos analitos en relación con los tiempos obtenidos cuando se analizó un estándar de EPI y LID disuelto en agua ultrapura (Figura 1.11), bajo las condiciones experimentales óptimas. Esta variación puede ser causada por la modificación en la movilidad electroforética de EPI y LID, producida por algunos componentes del suero que se co-extraen con EPI, pero que no se visualizan en el electroferograma.

### 1.3.7 Validación del método

#### 1.3.7.1 Curvas de calibración

Para verificar la linealidad del método en el rango de concentración de  $2.0$  a  $12.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , se prepararon tres replicados de soluciones de calibrado a 6 niveles de concentración:  $2.0$ ,  $4.0$ ,  $6.0$ ,  $8.0$ ,  $10.0$  y  $12.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de EPI, cada uno con  $7.2 \mu\text{g L}^{-1}$  de LID como estándar interno. Las soluciones de calibrado se prepararon por dilución de cantidades conocidas de soluciones madres en agua ultrapura acidificada a pH 2.00. Cada solución se analizó en el sistema electroforético bajo las condiciones experimentales óptimas.

La gráfica de calibración se construyó colocando en el eje de las ordenadas los cocientes entre las áreas de los picos de EPI y LID ( $R_a$ ) y en el eje de las abscisas el cociente entre las concentraciones de EPI y LID ( $R_c$ ).

### 1.3.7.1.1 Estimación de los parámetros de regresión

Los datos experimentales se ajustaron con un modelo lineal mediante el método de cuadrados mínimos ordinarios, donde  $R_c = a + b \cdot R_a$  ( $a$  = ordenada al origen y  $b$  = pendiente). Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 1.11.

**Tabla 1.11:** Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables relación de concentración (EPI/LID) y relación de área de los picos.

Parámetros de ajuste	Valor
ordenada al origen	-0.84 (0.04)
pendiente	3.41 (0.04)
$R^2$	0.9989
$R^2$ ajustado	0.9977
Desviación estándar	0.0791
Probabilidad del modelo	0.0000
Falta de ajuste	0.0921
LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	1.2
LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.4

Los parámetros ordenada al origen y pendiente se presentan con su correspondiente incertidumbre entre paréntesis, que afecta a la última cifra incierta de la respuesta.

El coeficiente de correlación, igual a 0.9989, indica una relación relativamente fuerte entre las variables. Dado que el valor de probabilidad del análisis de varianza (ANOVA) es inferior a 0.05, se puede concluir que existe una concordancia estadísticamente significativa entre la relación del área de pico y la relación de la concentración EPI/LID para un nivel de confianza del 95 %.

Para determinar si el modelo seleccionado es adecuado para describir los datos observados, se realizó un test de falta de ajuste. El test se realiza comparando la variabilidad de los residuos del modelo actual con la variabilidad entre las observaciones. Dado que el valor de probabilidad para la falta de ajuste es superior a 0.05, se puede decir que el modelo lineal seleccionado es apropiado para describir el comportamiento de los datos observados con un 95 % de confianza.

Los valores del límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) se calcularon de acuerdo con las recomendaciones de IUPAC (Danzer y Curie, 1998). Los valores obtenidos

de LOQ ( $1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ ) y LOD ( $0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ ) indican que el método analítico desarrollado es apto para ser aplicado en la determinación de EPI en suero humano, ya que luego del procesamiento de  $200 \mu\text{L}$  de suero conteniendo el nivel plasmático máximo de EPI ( $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), se obtiene una solución de  $5.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de EPI. Los límites de detección y cuantificación alcanzados son comparables con los publicados para la determinación de EPI en suero humano por CLAR con detección UV: LOD entre  $1.0$  y  $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$  (Ohtani y col., 1996; Ogiso y col. 2001; He y col., 2005), con detecciones de masas: LOQ  $0.6 \mu\text{g L}^{-1}$ , y de fluorescencia: LOQ  $2.0 \mu\text{g L}^{-1}$  (Sarashina y col., 2004).

### 1.3.7.2 Ensayos de precisión

Para obtener el valor de repetitividad del método se analizaron por sextuplicado tres soluciones a tres niveles de concentración de EPI (nivel 1 =  $4.0 \mu\text{g L}^{-1}$ , nivel 2 =  $6.0 \mu\text{g L}^{-1}$  y nivel 3 =  $8.0 \mu\text{g L}^{-1}$ ), cada una de ellas conteniendo  $7.2 \mu\text{g L}^{-1}$  de LID. Se registraron las áreas para cada uno de los analitos y se calculó la desviación estándar para cada nivel de concentración (Tabla 1.12).

**Tabla 1.12:** Relación de áreas obtenidas en las 6 inyecciones realizadas para el análisis de repetitividad, para cada nivel de concentración de EPI.

Inyecciones	Relación de áreas (EPI/LID)		
	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
1	1.072	1.853	3.022
2	1.051	1.881	3.051
3	1.058	1.912	3.067
4	1.037	1.863	3.097
5	1.059	1.859	3.072
6	1.019	1.782	2.917
Promedio	1.049	1.858	3.038
Desviación	0.019	0.043	0.064
CV (%)	<b>1.79</b>	<b>2.32</b>	<b>2.11</b>

De acuerdo con los coeficientes de variación obtenidos (CV%) en los tres niveles de concentración, se puede afirmar que el método analítico desarrollado cumple con los requerimientos de repetitividad para métodos bioanalíticos especificados por la FDA (Guidance for industry-Bioanalytical method validation, 2001).

### 1.3.7.3 Exactitud

La exactitud se evaluó mediante ensayos de recuperación. Se adicionaron cantidades conocidas de solución de EPI a 200  $\mu\text{L}$  de suero humano de pacientes sanos para alcanzar las concentraciones de 20.0, 25.0 y 30.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Estos valores corresponden al 80, 100 y 120 % de la concentración máxima plasmática de EPI reportada en la literatura (Sarashina y col., 2004). A cada solución se le adicionó una determinada cantidad de LID. Las muestras se analizaron por triplicado y las cantidades obtenidas se utilizaron para calcular la recuperación del método.

La Tabla 1.13 muestra los valores de EPI recuperada, que son indicativos de una elevada exactitud obtenida en los tres niveles de concentración estudiados, siendo valores aceptables según los requerimientos para ensayos bioanalíticos (Guidance for industry-Bioanalytical method validation, 2001).

**Tabla 1.13:** Resultados obtenidos en el análisis de recuperación de EPI de suero humano.

Nivel de concentración	Cantidad de EPI adicionada al suero ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cantidad de EPI recuperada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) <sup>a</sup>	Recuperación (%)
80 (%)	20.0	19.24 (0.03)	96.21
100 (%)	25.0	22.73 (0.03)	90.94
120 (%)	30.0	27.0 (0.3)	89.92

<sup>a</sup> Los valores entre paréntesis corresponden a la desviación estándar.

### 1.3.7.4 Selectividad

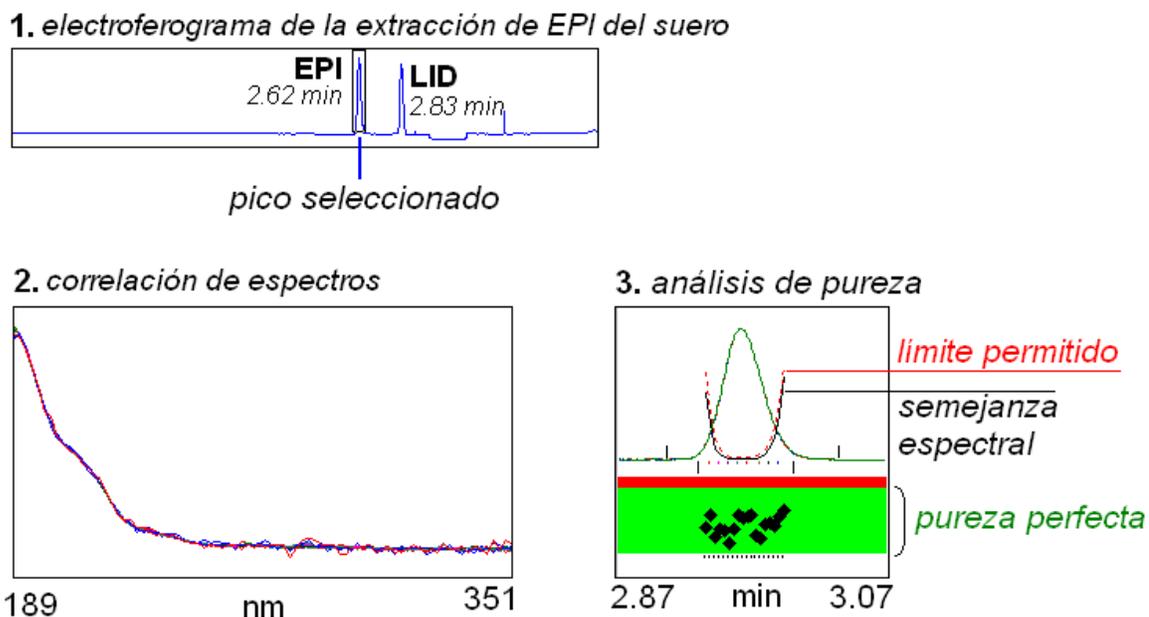
Este parámetro se refiere a la propiedad del método de producir una señal medible debida sólo a la presencia del analito, libre de interferencias en la matriz de la muestra. Las potenciales sustancias interferentes en una matriz biológica, como suero humano, incluyen componentes endógenos de la matriz, productos de descomposición y medicamentos co-administrados con el fármaco en estudio.

Se estudió la pureza u homogeneidad de los picos obtenidos luego de la extracción de EPI del suero humano. Se determinó no sólo la identidad del pico de EPI y de LID (por comparación del registro de datos espectrales en función del tiempo de migración de una muestra con el de un estándar), sino también si existe alguna interferencia que produzca un pico superpuesto al del analito y que no alcance a evidenciarse.

El programa computacional del equipo de EC (*Chemstation*) está provisto de una herramienta para realizar análisis de pureza de pico. Este test se basa en la comparación entre todos los espectros de absorbancia recolectados en el ancho del tiempo del pico. Para concluir

que el pico obtenido es debido sólo a la presencia de un analito, la correlación debe ser superior a 0.99 (**factor de pureza**). Dado que, tanto para EPI como para LID los valores obtenidos del factor de pureza son mayores al 99 % (límite establecido), se concluye que no existe interferencia detectable en los picos de EPI y LID (Figura 1.14).

**Figura 1.14:** Imágenes proporcionadas por el programa del equipo de EC correspondientes al análisis de pureza para el pico de EPI.



La imagen 1 de la Figura 1.14 corresponde al electroferograma de la extracción de EPI del suero humano donde se muestran los picos de EPI y LID, a los que se les calculó su pureza. Por otra parte, la imagen 2 corresponde a los espectros normalizados de EPI. Si el pico es puro cada uno de los espectros graficados debería superponerse sin diferencias obvias. Si hay diferencias en la forma de los espectros, y no hay superposición, esto indica que el pico es probablemente impuro. Finalmente, la imagen 3 es una representación gráfica de los resultados del análisis de pureza. La parte superior del gráfico muestra las curvas de pureza, donde la línea negra corresponde a la *semejanza espectral* y la línea roja superpuesta al *límite permitido*. Un perfil ideal para un pico puro es una línea de semejanza espectral plana en la línea de base del pico. Cuando la curva de semejanza está encima de la curva del límite permitido, muestra que parte del pico está fuera de su pureza aceptable.

Debajo de las curvas hay una representación gráfica de la pureza de cada espectro en el pico. La banda roja es para valores de pureza entre 0 y el límite permitido; la banda verde es para valores de pureza entre el límite y 1000 (**pureza perfecta**). La pureza de cada espectro a

través del pico se muestra como un punto negro donde su posición en el área verde indica el valor de pureza.

### 1.3.7.5 Robustez

Para evaluar la robustez del método desarrollado se construyó un diseño experimental de Plackett-Burman, donde se introdujeron pequeños cambios en los factores estudiados (Tabla 1.14) y se evaluó el efecto que producía ese cambio sobre la recuperación de EPI.

**Tabla 1.14:** Combinaciones de los factores a evaluar en el diseño experimental de Plackett-Burman para el análisis de robustez.

Experiencia	Concentración SRC (mol L <sup>-1</sup> )	pH	Voltaje de inyección (kV)	Voltaje de separación (kV)	Recuperación (%)
1	0.014	8.40	19	26	89.24
2	0.014	8.40	21	24	90.25
3	0.014	8.40	21	26	89.60
4	0.014	8.60	21	26	88.54
5	0.014	8.60	19	24	86.13
6	0.014	8.60	19	26	87.79
7	0.018	8.40	19	26	87.99
8	0.018	8.40	19	24	87.64
9	0.018	8.40	21	24	85.46
10	0.018	8.60	21	24	86.00
11	0.018	8.60	19	24	85.75
12	0.018	8.60	21	26	83.26

La evaluación consistió en analizar una solución estándar de EPI y una muestra de suero adicionado con 25.0 µg L<sup>-1</sup> de EPI en todas las condiciones citadas. En cada caso se evaluó la recuperación porcentual de EPI.

Se aplicó un test ANOVA a los datos experimentales, cuyos resultados se muestran en la Tabla 1.15.

**Tabla 1.15:** Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño de Plackett-Burman en el análisis de robustez.

Parámetro	Probabilidad <sup>a</sup>
Modelo	0.0058
Concentración de la SRC (mol L <sup>-1</sup> )	<b>0.0368 (-)</b>
pH	0.1000
Voltaje de inyección (kV)	0.3953
Voltaje de separación (kV)	0.4224

<sup>a</sup> se considera significativa cuando es menor a 0.05

El cambio de concentración de la SRC de 0.014 a 0.018 mol L<sup>-1</sup> tiene un efecto significativo negativo sobre la recuperación de EPI. Por lo tanto, se concluye que la preparación de la SRC es un parámetro importante para considerarse en la cuantificación de EPI en suero humano.

## 1.4 CONCLUSIONES

- La aplicación de diferentes metodologías de pre-concentración, como utilización de un capilar burbuja e inyección electrocinética amplificada, permite aumentar significativamente la sensibilidad del método, y de esta manera poder detectar y cuantificar exitosamente EPI en suero humano, a pesar de que en el paso de extracción se aplique un paso de dilución.
- La utilización de un estándar interno permite disminuir las variabilidades naturales de la EC y de esta manera mejorar la cuantificación de EPI.
- La aplicación de un diseño experimental Plackett-Burman permite seleccionar las variables que afectan la resolución entre los picos de EPI y LID y el tiempo de análisis, realizando un pequeño número de experiencias.
- El uso de diseños experimentales y la metodología de superficie de respuesta permite la aplicación de la función deseabilidad para resolver un sistema de múltiples respuestas y, de esta manera, calcular las condiciones experimentales óptimas donde el sistema genera resultados deseables.
- El proceso de validación permite concluir que el método analítico desarrollado puede aplicarse en la determinación de EPI en suero humano, debido a los resultados satisfactorios obtenidos para linealidad, precisión, exactitud, selectividad y robustez en el rango de concentración de EPI estudiado, que concuerdan con las especificaciones para métodos bioanalíticos descritos en los documentos de la FDA.

## **MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ASISTIDA CON MÉTODOS QUIMIOMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE DROGAS ANTIINFLAMATORIAS Y ANTIEPILÉPTICAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CON DETECCIÓN UV**

### **2.1 INTRODUCCIÓN**

Los **contaminantes emergentes** corresponden, en muchos casos, a contaminantes no regulados que pueden ser candidatos a una futura regulación, dependiendo de los estudios que se realicen sobre los efectos nocivos en la salud humana y sobre su persistencia en el ambiente (Barceló, 2003).

Entre los contaminantes emergentes podemos citar surfactantes, fármacos, productos de cuidado personal y aditivos de combustibles. No obstante, la mayoría son fármacos y, debido a su continuo incremento, son los que más preocupan, ya que no se conocen sus efectos sobre el medio ambiente (Barceló, 2003; Díaz-Cruz y col., 2003). Dentro de los medicamentos más vendidos y prescritos, podemos citar analgésicos y antiinflamatorios (ácido acetil salicílico, ibuprofeno, paracetamol, diclofenac, naproxeno), reguladores lipídicos, antibióticos para uso humano y veterinario ( $\beta$ -lactámicos, macrólidos, sulfonamidas, tetraciclinas),  $\beta$ -bloqueantes, drogas psiquiátricas, antiepilépticos y hormonas.

#### **2.1.1 Fármacos como contaminantes emergentes**

Como consecuencia de la aplicación de los nuevos procesos de extracción de analitos de matrices complejas desarrollados en los últimos años, en combinación con técnicas analíticas cada vez más sensibles, se alcanzaron a detectar niveles de drogas en agua comparables con niveles de pesticidas, que presentan efectos tóxicos sobre el medio ambiente.

Se encontraron principios activos en aguas superficiales en el rango de concentraciones de  $\mu\text{g L}^{-1}$  y  $\text{ng L}^{-1}$  (partes por billón y partes por trillón respectivamente).

Por esta razón, surge el mayor cuestionamiento: “¿Pueden las concentraciones residuales de los fármacos en el medio ambiente acuático tener impacto sobre la salud humana?” (Beausse, 2004).

Los fármacos se desarrollan con el objetivo de poseer un efecto biológico. Es por ello que resulta interesante considerarlos contaminantes emergentes. Por un lado, tienen carácter lipofílico, lo que les permite atravesar las membranas celulares. Por otra parte, son persistentes, para prevenir que la sustancia se inactive antes de cumplir su efecto. Por consiguiente, estas sustancias poseen las propiedades necesarias para bioacumularse y provocar efectos en los ecosistemas acuático y terrestre.

El inconveniente es que para muchos de estos contaminantes no hay datos disponibles acerca de su persistencia, de la toxicidad en el medio ambiente (estudios ecotóxicológicos) y de los riesgos sobre los seres humanos. En este contexto, es difícil predecir qué efectos pueden causar sobre la salud humana y sobre organismos acuáticos (Barceló, 2003; Pavlovic y col., 2007). Algunos autores informan que los estrógenos, como desecho, pueden causar feminización o hermafroditismo en organismos acuáticos, y que el incremento en el consumo de drogas, durante las últimas décadas, causó selección genética en muchas bacterias nocivas (Díaz-Cruz, 2003).

Otro agravante es que la cantidad de fármacos y sus metabolitos bioactivos liberados al medio ambiente es probablemente baja, pero su continua liberación puede generar una elevada concentración, provocando efectos adversos en el ecosistema. Los fármacos pueden acumularse tan lentamente que los efectos perjudiciales no se detectan hasta un momento en que se vuelven irreversibles (Díaz-Cruz, 2003).

Muchas drogas que se administran con prescripción médica persisten en el medio ambiente por períodos mayores que un año. No obstante, estos fármacos, para causar efectos negativos, no necesitan de su elevada persistencia, debido a que su alta biotransformación o remoción del ambiente se compensa con su continua liberación.

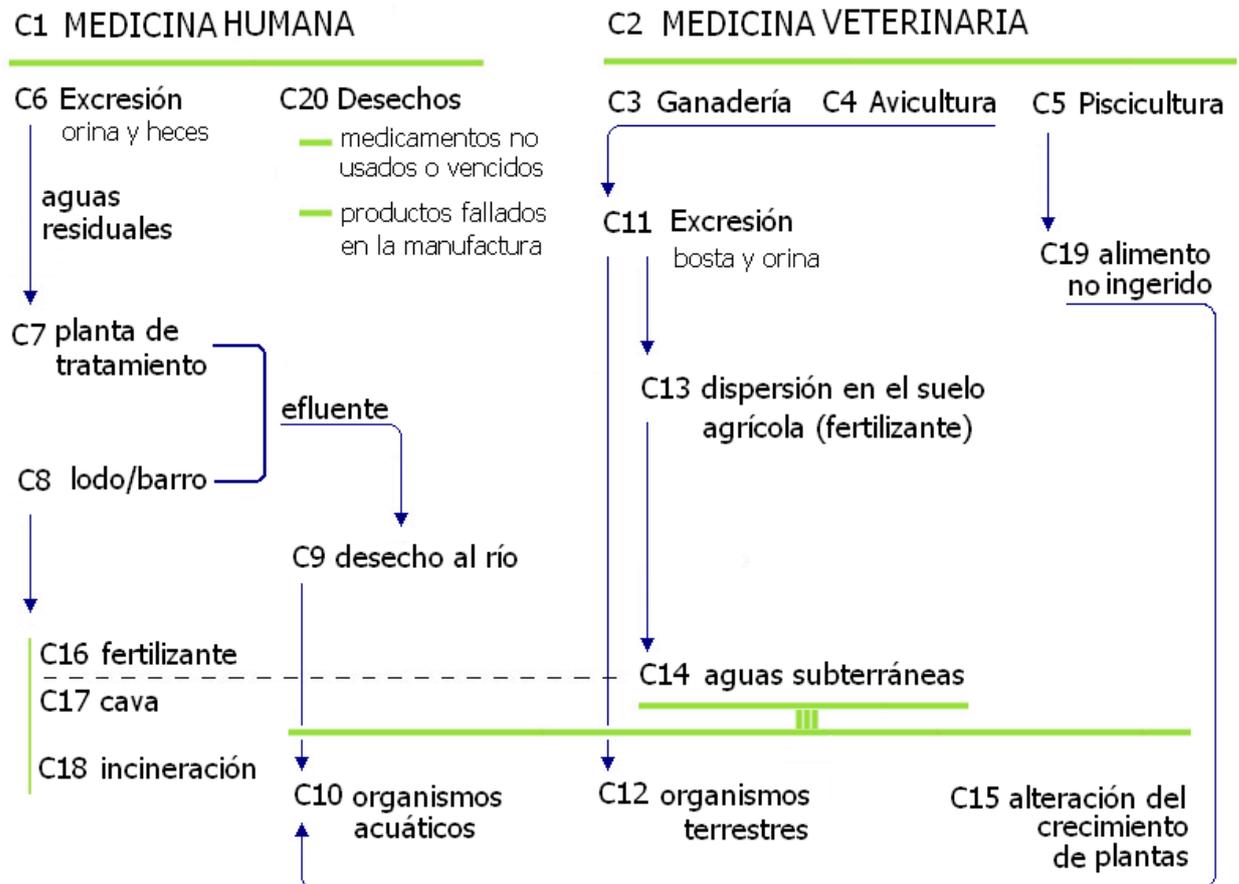
### **2.1.2 Vías de ingreso de fármacos al medio ambiente**

Los fármacos, junto con sus precursores sintéticos y sus productos de degradación, se arrojan constantemente al medio ambiente en enormes cantidades, a través de los efluentes del proceso de manufactura y de la excreción proveniente de su uso (Figura 2.1).

Los fármacos pueden dividirse rigurosamente en dos categorías: sustancias médicas utilizadas por humanos (C1) o utilizadas en medicina veterinaria (C2). A su vez, estos

últimos pueden subdividirse en sustancias utilizadas como promotores de crecimiento (aditivos alimenticios) o drogas terapéuticas, empleadas en la producción ganadera (C3), en la producción avícola (C4) y en la industria pesquera (C5).

**Figura 2.1:** Rutas de exposición al medio ambiente de los diferentes tipos de fármacos.



Las personas pueden consumir diferentes clases de fármacos en gran parte de sus vidas y por largos períodos de tiempo. Estos fármacos se excretan principalmente por orina y heces (C6), ingresando al sistema de aguas residuales como metabolitos activos o no metabolizados, para luego entrar a la planta de tratamiento de efluentes (C7).

La palabra *xenobiótico* ("xeno" ="extraño" y "bio"="vida") se aplica a los compuestos cuya estructura química es poco frecuente o inexistente en la naturaleza, ya que son compuestos que el hombre sintetiza en el laboratorio. La mayoría aparecieron en el medio ambiente durante los últimos 100 años.

Los procesos más importantes por los que se degradan los compuestos xenobióticos pueden dividirse en tres alternativas posibles:

1) la sustancia finalmente se mineraliza en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (procesos de oxidación y reducción química),

2) si la sustancia es lipofílica y no es fácilmente degradable, parte de esa sustancia puede quedar retenida por el lodo (C8),

3) la sustancia se metaboliza a una forma más hidrofílica que la que le dio origen, pero aún persistente. Esta nueva sustancia pasa a través de la planta de tratamiento de efluentes (C7) y se desecha en el río (C9). Si el metabolito es biológicamente activo, posiblemente afecte a los organismos acuáticos (C10).

También pueden ser sensibles a la fotodegradación por radiaciones solares y la biodegradación por microorganismos. Pero debido a su estructura inusual, algunos xenobióticos persisten mucho tiempo en la biosfera sin alterarse. Por este motivo, se dice que son recalcitrantes a la biodegradación, llegando a ser contaminantes. La razón fundamental por la que muchos compuestos sintéticos no se biodegradan fácilmente, radica en la gran estabilidad de su estructura química. Muchos compuestos sintéticos tienen estructuras químicas distintas a las de compuestos naturales, pero incluso los que tienen estructuras similares a las naturales suelen contener modificaciones que los hacen muy estables. Esto hace que las capacidades degradativas de los seres vivos actúen más lentamente.

Las excreciones de animales son una fuente de contaminación ambiental muy importante. La mayor parte de las sustancias usadas como promotores de crecimiento para animales (ganado vacuno y aves) terminan finalmente excretadas en la bosta y la orina (C11). Estas sustancias pueden afectar directamente a los organismos terrestres (C12) o pueden utilizarse como fertilizante en la agricultura (C13). Cuando estos desechos se esparcen en el campo, las drogas no metabolizadas (sustancias hidrofílicas) o los compuestos biológicamente activos migran hacia las aguas subterráneas (C14). Dependiendo de la consistencia de la tierra, pueden afectar a organismos terrestres y acuáticos (C10 y C12). Asimismo, determinadas drogas pueden alterar el desarrollo post-germinativo normal de las plantas y el crecimiento de las raíces y de las hojas (C15).

Una situación similar se verifica cuando el lodo proveniente de las plantas de tratamiento de efluentes se utiliza como fertilizante de suelos (C16). Durante el tratamiento de los residuos cloacales, muchos compuestos orgánicos se absorben dentro del lodo, concentrándose. El lodo puede arrojarse en cavas (C17), incinerarse (C18) o desecharse al río o cauce de agua (C9). El inconveniente es que muchas cavas no son espacios que se protegen y controlan. Por lo tanto, se pone en riesgo la calidad de aguas subterráneas cercanas (C14). Los compuestos resistentes al tratamiento quedan como remanente en el

efluente acuoso, el que luego se arroja al río o algún cauce de agua (C9), afectando la vida acuática y terrestre (C10, C12).

Otra fuente de contaminación es la piscicultura. El método más conveniente para controlar las enfermedades de los peces es la adición de antibióticos o sustancias quimioterapéuticas como aditivos alimenticios. Estas sustancias se arrojan directamente dentro del medio ambiente acuático. Sin embargo, se estima que el 70 % de las drogas administradas se eliminan al medio ambiente, a causa de la sobrealimentación, la pérdida de apetito por peces enfermos y la escasa adsorción de drogas. Estas sustancias pueden decantar y acumularse en el fondo del río (C19), afectando a los organismos acuáticos (C10). Además, la naturaleza polar y no volátil de muchas drogas previene su escape del medio ambiente acuático.

Finalmente, tanto los productos fallados durante su manufactura y distribución, como los medicamentos que no se utilizan o están vencidos, se arrojan directamente al sistema de residuos cloacales (C20) y de allí a la planta de tratamiento de efluentes (C7).

Como conclusión, es evidente la elevada probabilidad que tienen los fármacos de entrar en el medio ambiente desde diferentes rutas y de causar modificaciones irreversibles en el ecosistema (Jjemba, 2006; Petrovic y col., 2004; Díaz-Cruz y col., 2003; Petrovic y col., 2003; Halling-Sorensen y col., 1998).

### 2.1.3 Plantas de tratamiento de efluentes

Los efluentes provenientes de las plantas de tratamiento comprenden una de las mayores fuentes de contaminación, ya que continuamente liberan fármacos al medio ambiente (Pavlovic y col., 2007).

Los **efluentes industriales** están constituidos por un conjunto muy variado de residuos líquidos, sólidos o gaseosos, que se obtienen como consecuencia de la actividad industrial. Con el aumento de la población se multiplicaron los problemas que ocasionan no sólo los efluentes industriales, sino también las **aguas cloacales o efluentes domiciliarios**, que lógicamente van en aumento con aquélla.

Aunque existe una diferencia importante entre las aguas cloacales y los efluentes líquidos de la industria, el enfoque del problema es similar. En ambos casos, es indispensable reducir a límites bien determinados el contenido de compuestos contaminantes, antes de que esos líquidos puedan arrojarse a una corriente de agua.

### **2.1.4 Metodologías para la determinación de contaminantes emergentes**

En los últimos años se detectaron muchos analitos como consecuencia del creciente uso de nuevas técnicas analíticas como CLAR-MS y CLAR-MS-MS (Barceló, 2003).

Stumpf y colaboradores (Stumpf y col. 1996) fueron los primeros en identificar diclofenac, ibuprofeno, ácido acetil salicílico y ketoprofeno en agua de río. Desde ese entonces, numerosos autores reportaron la presencia de drogas antiinflamatorias no esteroideas y drogas antiepilépticas en agua superficial (Buser y col., 1998-a; Buser y col., 1998-b; Yu y col., 2007; Verenitch y col., 2006; Öllers y col., 2001; la Farré y col., 2001), en aguas subterráneas (Halling-Sorensen y col., 1998; Heberer, 2002) y efluentes de las plantas de tratamiento (Öllers y col., 2001; la Farré y col., 2001; Buser y col., 1999; Huppert y col., 1998; Ternes y col., 1998; Santos y col., 2005).

Las técnicas que más se utilizan para la determinación de fármacos en matrices medioambientales son CLAR-MS o CLAR-MS-MS (Petrovic y col., 2003; Petrovic y col., 2004; la Farré y col., 2001; Roberts y Thomas, 2006; Ahrer y col., 2001) y CG-MS (Kosjek y col., 2005; José Gómez y col., 2006; Öllers y col., 2001).

A pesar de que existen metodologías para determinar cada contaminante en forma individual, no hay disponibles métodos analíticos para la determinación de los distintos grupos. Existe la tendencia a desarrollar métodos analíticos con los que se puedan identificar y cuantificar residuos de distintas clases de contaminantes (Pavlovic y col., 2007).

### **2.1.5 Preparación de la muestra**

La amplia variedad de estructuras químicas que presentan los fármacos convierte al proceso de preparación de la muestra en una tarea difícil.

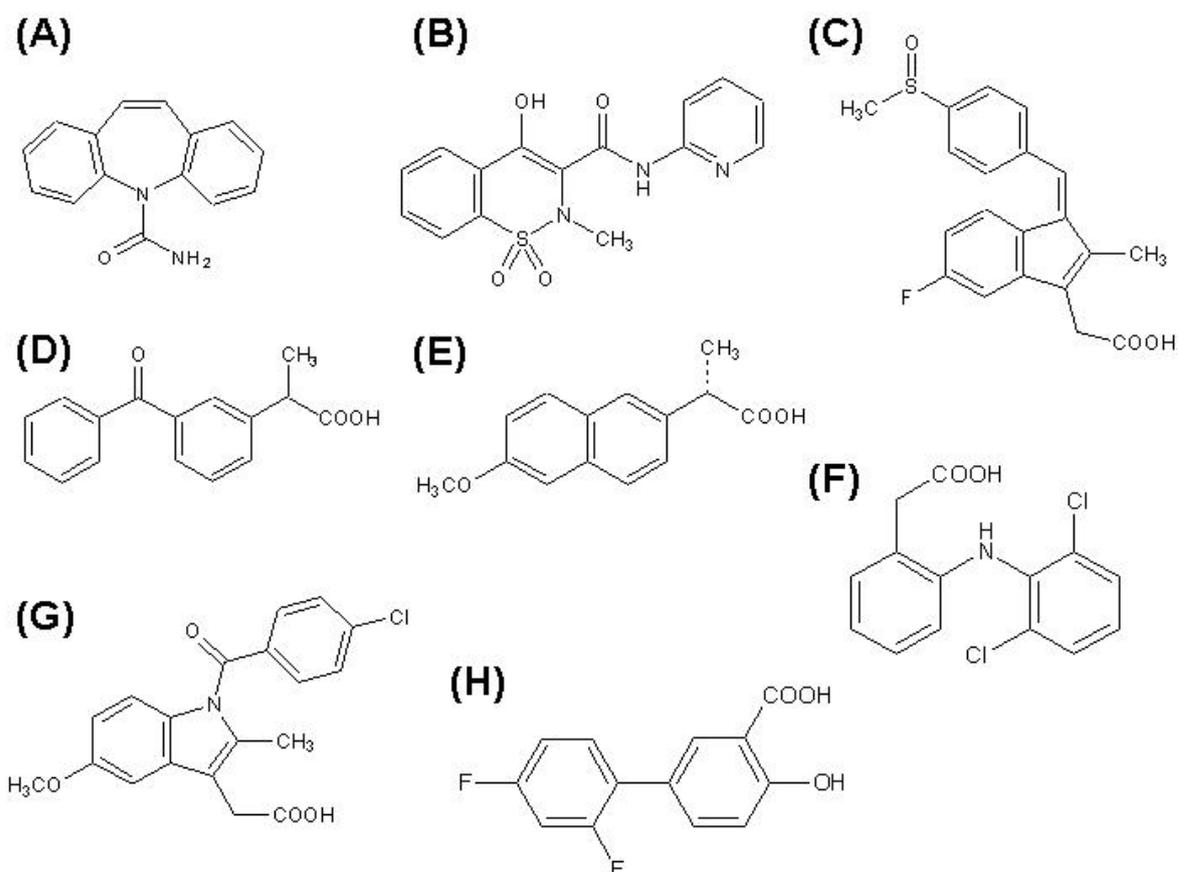
Las muestras medioambientales tales como aguas subterráneas, desechos cloacales y efluentes de las plantas de tratamiento, presentan matrices muy complejas. A menudo, contienen compuestos que pueden interferir con los analitos de interés, los que además se encuentran en concentraciones muy bajas. Por lo tanto, es necesario desarrollar un paso inicial para la preparación de la muestra, incluyendo la purificación y concentración de los analitos. El objetivo de convertir a la matriz real en una forma compatible con el sistema analítico.

En los últimos años, se incrementó el uso de la micro-extracción en fase sólida (MEFS) como técnica para la preparación de la muestra, para aislar fármacos y sus metabolitos de muestras medioambientales (Moeder y Schrader, 2000; Lamas y col., 2004;

Rodríguez y col., 2004; Salgado-Petinal y col., 2005; Mitani y Kataoka; 2006; Zorita y col., 2007). La MEFS es una innovadora tecnología, libre del uso de solventes, que permite no sólo la extracción de los analitos sino también su concentración, mejorando el límite de detección del método.

El objetivo de nuestro trabajo fue desarrollar un método de extracción mediante MEFS y determinar fármacos ácidos y neutros por cromatografía líquida con detección UV. Los fármacos investigados fueron drogas antiinflamatorias no esteroideas (naproxeno, ketoprofeno, diclofenac, piroxicam, indometacina, sulindac y diflunisal) y el antiepiléptico carbamazepina (Figura 2.2) en muestras de agua de río. La selección de los fármacos mencionados tiene relación directa con su frecuencia de aparición en aguas superficiales.

**Figura 2.2:** Estructuras químicas de los analitos estudiados: A) Carbamazepina, B) Piroxicam, C) Sulindac, D) Ketoprofeno, E) Naproxeno, F) Diclofenac, G) Indometacina y H) Diflunisal.



## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Equipamiento

Se utilizó un equipo de cromatografía líquida compuesto por una bomba modelo 600E y un detector de arreglo de diodos modelo 2969 (Waters Instrument). Las separaciones se realizaron con una columna Discovery RP-Amide C16 (150 mm × 4.6 mm, 5 µm de tamaño de partícula) provista por Supelco (Bellefonte, PA, USA).

Para el proceso de MEFS se utilizaron dos fibras: primeramente una fibra de poliacrilato (PA, 85 µm) y posteriormente una de polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB, 65 µm), ambas provistas por Supelco (Bellefonte, PA, USA).

La fibra se ensambló al equipo de cromatografía líquida (CL) a través de una interfase provista por Supelco (Bellefonte, PA, USA). La interfase MEFS-CL consistió en una válvula de inyección de seis puertos y una cámara de desorción de un volumen de 60 µL.

### 2.2.2 Programas de computación

Los datos de los cromatogramas se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una PC Sempron AMD para el subsiguiente análisis de los datos.

Los diseños experimentales, el análisis de datos y el cálculo de la función deseabilidad se realizaron utilizando el programa Design Expert versión 7.1.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis). La linealidad del método se estudió con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

### 2.2.3 Reactivos y materiales

Todas las drogas utilizadas fueron de calidad grado analítico. Las drogas naproxeno (**NAPRO**-( $\alpha$ S)-6-metoxi- $\alpha$ -metil-2-ácido naftalenoacetico) y ketoprofeno (**KETO**-3-benzoil- $\alpha$ -acido metil benzenoacetico) se adquirieron a Riedel de Haën (Seelze, Alemania); diclofenac sódico (**DICLO**-2-[(2,6-diclorofenil)amino] ácido benzenoacetico), piroxicam (**PIR**-4-hidroxi-2-metil-*N*-2-piridinil-2*H*-1,2-benzotiazina-3-carboxamida 1,1-dioxido), sulindac (**SUL**-(1*Z*)-5-fluoro-2-metil-1-[[4-(metilsulfinil)fenil]metileno]-1*H*-indeno-3-acido acético), diflunisal (**DIFLU**-2',4'-difluoro-4-hidroxi-[1,1'-bifenil]-3-ácido carboxílico) y carbamazepina (**CBZ**-5*H*-dibenz[*b,f*]azepine-5-carboxamida) fueron de la marca Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemania). La Indometacina (**INDO**-1-(4-clorobenzoil)-5-metoxi-2-metil-1*H*-indol-3-ácido acético) se obtuvo de Fluka (Buchs, Suiza).

Los solventes acetonitrilo (ACN) y metanol (MeOH) fueron de calidad cromatografía líquida, obtenidos a J.T. Baker (Deventer, The Netherlands). Para todas las soluciones se

utilizó agua ultrapura obtenida mediante un sistema de purificación de agua Milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).

Las drogas ácido clorhídrico (HCl-37%) y fosfato diácido de potasio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) de calidad grado analítico fueron de la marca Merck (Darmstadt, Alemania).

La parte acuosa de la fase móvil se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de  $0.45\ \mu\text{m}$  de poro, en cambio los solventes orgánicos se filtraron a través de un filtro de politetrafluoroetileno (PTFE) y se degasificaron con helio antes y durante su uso.

#### **2.2.4 Preparación de las soluciones madres y de trabajo**

La solución madre de cada fármaco utilizado se preparó por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de MeOH para alcanzar una concentración final de  $400\ \mu\text{g mL}^{-1}$ . Estas soluciones se guardaron en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$ , siendo estables por 3 meses. Las soluciones de trabajo se prepararon diariamente por dilución de un volumen determinado de solución madre en el solvente apropiado y se filtraron a través de filtros de membrana de PTFE (Millipore) de  $0.45\ \mu\text{m}$  de tamaño de partícula, antes de la inyección en el sistema cromatográfico.

Los estándares de trabajo se disolvieron en una solución de ACN- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (50:50, v/v) a pH 3.00.

#### **2.2.5 Preparación de la muestra**

Las muestras de agua se recolectaron del río Nacimiento (Almería, España) y se filtraron con una bomba de vacío utilizando un filtro con membrana de acetato de celulosa de  $0.45\ \mu\text{m}$  (Millipore) para eliminar la materia suspendida. A continuación, se les agregó HCl para su acidificación y se las guardó en oscuridad a  $4^\circ\text{C}$ .

Para las determinaciones de recuperación, las muestras de agua de río ajustadas a pH 3.00, se fortificaron con una mezcla de todos los analitos a diferentes niveles de concentración. Luego fueron analizadas mediante la metodología propuesta MEFS-CL-DAD.

#### **2.2.6 Procedimiento de MEFS**

Todas las experiencias de MEFS se desarrollaron con una fibra de sílice recubierta con una capa de fase estacionaria (PDMS-DVB de  $65\ \mu\text{m}$  de espesor) provista por Supelco (Bellefonte, CA, USA). Para asegurar buena selectividad y sensibilidad en las extracciones, la fibra se acondicionó antes de su uso de acuerdo con las recomendaciones del proveedor.

Ésta se colocó dentro de la cámara de desorción de la interfase MEFS–CL y se acondicionó con fase móvil (modo dinámico) durante 30 minutos.

El procedimiento de MEFS se realizó por introducción de la fibra dentro de 3.0 mL de soluciones estándares en agua Milli-Q y en muestras de agua de río, ambas ajustadas a pH 3.00 con HCl, colocadas dentro de un vial de vidrio de 4 mL de capacidad, cubierto con una tapa de PTFE.

Las muestras se agitaron con un agitador magnético a 1400 rpm, antes y durante la extracción. Las extracciones se realizaron a temperatura ambiente por inmersión directa de la fibra en la muestra durante 44 minutos, sin adicionarle sal ni de solventes orgánicos.

Después de la extracción, la fibra se colocó dentro del cromatógrafo a través de la interfase MEFS–CL. La fibra se remojó dentro de la cámara de desorción, con una mezcla de ACN–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50:50, v/v) a pH 3.00 durante 5 minutos. A continuación, los analitos se desorbieron y se transfirieron a la columna cromatográfica usando la fase móvil de ACN–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.025 mol L<sup>-1</sup> a pH 3.00) (40:60, v/v) a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El período de desorción de la fibra fue de 2 minutos. Finalmente se procedió a la separación y análisis de los analitos mediante CL convencional.

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1 Optimización de la separación cromatográfica

Para obtener una resolución favorable entre CBZ, PIR, SUL, KETO, NAPRO, DIFLU, INDO y DICLO se evaluaron y optimizaron las condiciones cromatográficas.

De acuerdo con las recomendaciones del proveedor, se seleccionó la columna Discovery RP–Amide C16 LC provista por Supelco para la separación de los analitos en estudio.

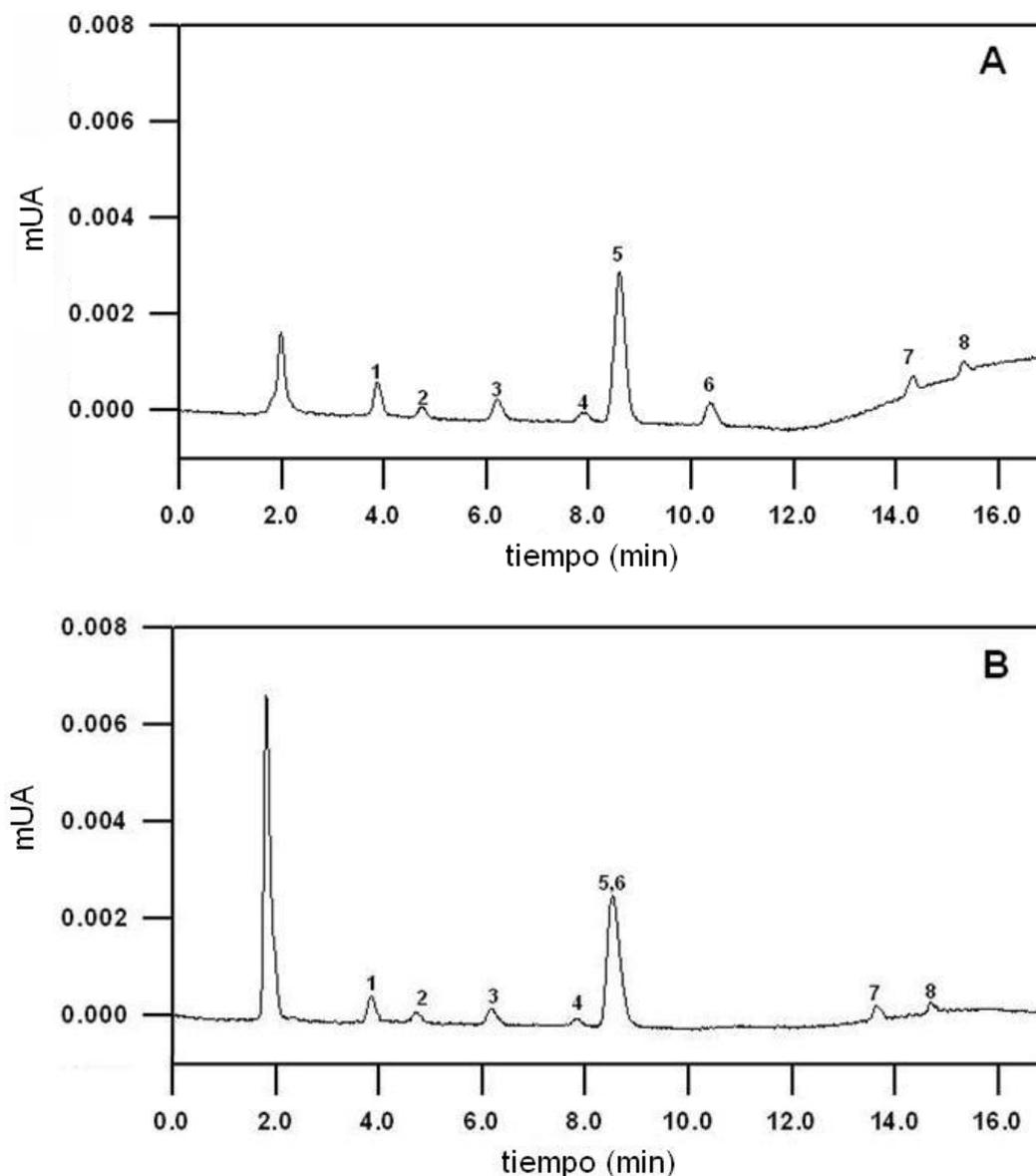
En las separaciones por cromatografía líquida en fase reversa, el contenido de solvente orgánico y el pH de la fase móvil son factores fundamentales que influyen fuertemente sobre la retención y/o la selectividad de los analitos. Debido a que la mayoría de los fármacos estudiados tienen comportamiento ácido, de acuerdo con sus valores de pKa (Tabla 2.1), es razonable comenzar el análisis con un gradiente utilizando una fase móvil con bajo pH. El objetivo es lograr una suficiente retención de los analitos dentro de la columna y lograr tiempos de retención reproducibles. La ventaja de utilizar una fase móvil con bajo pH es permitir que los grupos silanoles de la fase estacionaria se encuentren protonados (Si–OH) y, de esta manera, sólo exista interacción de los analitos con los grupos funcionales unidos a la sílice.

**Tabla 2.1:** Propiedades y usos de los fármacos estudiados.

Analito	Efectivo como	pKa	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	Grupos formadores de puente hidrógeno
CBZ	antiepiléptico	0.5	236.27	-NH <sub>2</sub>
PIR	antiinflamatorio	1.86 – 5.6	331.35	-OH
SUL	antiinflamatorio	4.7	356.42	-COOH
KETO	antiinflamatorio y analgésico	4.5	230.26	-COOH
NAPRO	antiinflamatorio, analgésico y antipirético	4.2	254.28	-COOH
DIFLU	antiinflamatorio y analgésico	3.3	250.2	-OH
INDO	antiinflamatorio, analgésico y antipirético	4.5	357.79	-COOH
DICLO	antiinflamatorio	4.0	296.15	-NHR

Para optimizar la separación cromatográfica se evaluaron diferentes fases móviles, que consistieron en mezclas de ACN y solución reguladora de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.025 mol L<sup>-1</sup> ajustadas a diferentes valores de pH, pero siempre menores que los pKa de los analitos estudiados para permitir su completa protonación. En cada caso se evaluó la resolución entre los picos de los analitos detectados (Figura 2.3).

**Figura 2.3:** Cromatograma de una solución estándar conteniendo  $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, usando una fase móvil de  $\text{ACN-KH}_2\text{PO}_4$   $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 3.00 (A) y a pH 3.50 (B). Orden de migración: 1 carbamazepina, 2 piroxicam, 3 sulindac, 4 ketoprofeno, 5 naproxeno, 6 diflunisal, 7 indometacina y 8 diclofenac.

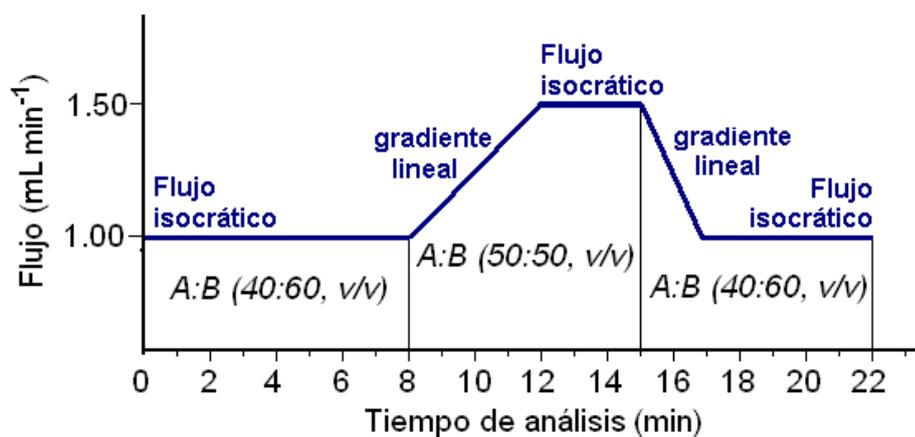


La Figura 2.3 muestra dos cromatogramas de una solución estándar conteniendo  $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito usando una fase móvil de  $\text{ACN-KH}_2\text{PO}_4$   $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 3.00 y a pH 3.50. Como se puede observar, en ambos casos se obtiene una separación satisfactoria para todos los analitos, excepto para NAPRO y DIFLU (pico 5 y 6 de la Figura 2.3 B, respectivamente), que aparecen con el mismo tiempo de retención cuando se utiliza una fase móvil a pH 3.50. A valores más altos de pH, pero aún en el rango ácido y a pHs

menores que el mayor valor de pKa de los analitos (pKa 5.6 correspondiente a PIR), se observa una superposición de picos considerablemente mayor.

Consecuentemente, las condiciones que muestran un buen compromiso entre una separación adecuada y un mínimo tiempo de análisis son: fase móvil de ACN–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.025 mol L<sup>-1</sup> a pH 3.00. Asimismo, todos los análisis cromatográficos se realizaron con un programa de gradiente de flujo con ACN como solvente A y 0.025 mol L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 3.00 como solvente B durante 22 minutos a una velocidad de flujo de 1.0 a 1.5 mL min<sup>-1</sup>. El programa del gradiente fue el siguiente: inicialmente 8 min de flujo isocrático a 1 mL min<sup>-1</sup> con A:B (40:60, v/v), luego 4 min de un gradiente lineal con A:B (50:50, v/v) hasta alcanzar una velocidad de flujo de 1.5 mL min<sup>-1</sup>. Seguidamente, 3 minutos de gradiente isocrático con A:B (50:50, v/v) a una velocidad de 1.5 mL min<sup>-1</sup>, seguido de un período adicional de 2 minutos de una gradiente lineal con las condiciones iniciales. Finalmente, 5 minutos bajo las condiciones iniciales fue suficiente tiempo antes del subsiguiente análisis (Figura 2.4).

**Figura 2.4:** Esquema del programa de gradiente de flujo utilizado para el análisis cromatográfico de los ocho analitos.



Bajo las condiciones cromatográficas descritas anteriormente, todos los analitos se analizaron simultáneamente con el DAD, usando un rango de longitudes de onda entre 200 y 350 nm, de acuerdo con el espectro de absorción de cada analito.

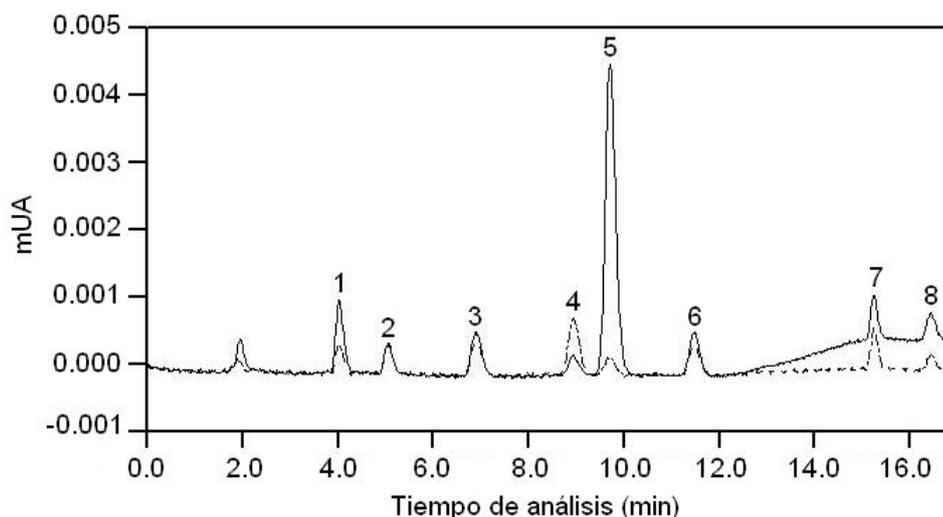
Con el objetivo de obtener una elevada señal, se evaluó la composición del solvente de dilución de los estándares y de las muestras. Para ello, se inyectaron en el sistema cromatográfico soluciones estándares de todos los analitos preparadas con diferentes porcentajes de ACN–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y ACN–agua. Se lograron los mejores resultados con una mezcla de ACN–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> a pH 3.00 (50:50, v/v) como solvente de dilución. En general, para

las demás mezclas analizadas se obtuvieron señales analíticas menores y para determinadas mezclas se observó superposición de picos en algunos analitos.

Para la optimización del volumen de inyección (en un rango entre 20 a 200  $\mu\text{L}$ ) se inyectó la misma cantidad de analito en el sistema cromatográfico bajo las condiciones detalladas anteriormente. Por encima de 50  $\mu\text{L}$ , el área y la forma de los picos fue constante, sin embargo, grandes volúmenes de inyección causan superposición de picos y pérdida de la resolución. Por este motivo, se utilizó un volumen de inyección de 50  $\mu\text{L}$ .

La Figura 2.5 muestra un cromatograma de los ocho fármacos estudiados bajo las condiciones óptimas determinadas. Las señales se registraron a 230 nm para la cuantificación de todos los analitos y a 254 nm para la cuantificación de KETO.

**Figura 2.5:** Cromatograma de una solución estándar conteniendo 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada fármaco analizado a 230 nm (—) y a 254 nm (----) bajo las condiciones cromatográficas óptimas.



## 2.3.2 Procedimiento de extracción

### 2.3.2.1 Selección del modo de extracción

Todos los analitos considerados en este estudio poseen baja presión de vapor, debido a que sus pesos moleculares se encuentran en el rango de 150 a 450  $\text{g mol}^{-1}$ . Además, muchos de ellos contienen grupos hidrofílicos en su molécula, que le confieren la posibilidad de interactuar con las moléculas de solvente (ver Tabla 2.1). Por lo tanto, su concentración en el espacio cabeza es baja (Ulrich, 2000). Consecuentemente, la extracción se realizó usando MEFS por inmersión directa de la fibra en la muestra, en lugar de MEFS en el espacio cabeza.

### 2.3.2.2 Selección del recubrimiento de la fibra

Las fibras para MEFS comercialmente disponibles difieren básicamente en su habilidad para extraer varias clases de sustancias. La selección del recubrimiento más adecuado debe estar en relación con la polaridad, volatilidad, hidrofobicidad y tamaño molecular de los analitos. De acuerdo con la regla de *“lo similar atrae a lo similar”*, la polaridad del recubrimiento debe ser la misma que la polaridad del analito (Ulrich, 2000; Kumazawa y col., 2003).

Debido a que todos los analitos en estudio son polares, ya que contienen grupos formadores de puente hidrógeno, se seleccionaron dos fibras ideales para estos compuestos. Una de ellas con recubrimiento polimérico simple, como PA y la otra con recubrimiento polimérico asociado a un sólido, como PDMS-DVB.

Sin embargo, cuando la fibra PA se expuso durante 30 minutos a la fase móvil en la etapa de acondicionamiento, se observó que se dañaba considerablemente. Por este motivo, se seleccionó la fibra PDMS-DVB debido a su comportamiento más robusto.

### 2.3.3 Procedimiento de desorción

#### 2.3.3.1 Elección del modo de desorción

Se evaluaron dos modos de desorción para la fibra PDMS–DVB: el modo dinámico y el modo estático. Para ello, se realizó una extracción con 3.0 mL de una solución estándar conteniendo  $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito, disuelto en agua Milli-Q. Se utilizó una velocidad de agitación de 1000 rpm durante 20 minutos, temperatura ambiente y no se adicionó sal ni solvente orgánico.

En el modo dinámico, luego del proceso de extracción, la fibra se colocó dentro de la cámara de desorción. Inmediatamente se giró la válvula hacia la posición de inyección para que la fase móvil pase a través de la cámara durante un período de 15 minutos, con una velocidad de flujo de  $1 \text{ mL min}^{-1}$  y se complete la extracción de los analitos.

Por otro lado, para implementar el modo estático se utilizó una mezcla de ACN– $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 3.00 (80:20, v/v) como solvente de remojo, durante 15 minutos de tiempo de remojo y 15 minutos de tiempo de extracción.

Empleando el modo estático de desorción se obtuvieron las mejores recuperaciones. Además, con el modo dinámico se observó un ensanchamiento de los picos. Esto indica que la fibra adsorbe fuertemente a los analitos y la fase móvil los desorbe muy lentamente. Por este motivo, en las experiencias posteriores se utilizó el modo estático de desorción.

### 2.3.3.2 Efecto residual de los analitos

Luego del proceso de desorción, algunos analitos pueden quedar adsorbidos en el recubrimiento de la fibra, ocasionando cambios en la señal analítica en los análisis posteriores. Para evaluar la cantidad de analito remanente en la fibra, se procedió a realizar una experiencia blanco. Para ello, se llevó a cabo la extracción de una solución estándar, disuelta en agua Milli-Q, conteniendo  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito. Luego, los analitos se desorbieron mediante el modo dinámico y, posteriormente, se realizó una desorción adicional. Como resultado del análisis cromatográfico se detectaron pequeñas cantidades de todos los analitos, indicando un efecto residual.

Por este motivo, antes de cada paso de extracción, la fibra se colocó dentro de la cámara de desorción y se lavó sucesivamente con varias soluciones. Primero se lavó con 1 mL de una mezcla de ACN-agua (80:20, v/v), luego con 1 mL de una mezcla de ACN- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  [ $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 3.00 (50:50 v/v)] y finalmente con 1 mL de agua Milli-Q (pH 3.00). El objetivo fue eliminar cualquier traza de analito o residuo salino cristalizado, y que la fibra quede en condiciones óptimas para la próxima extracción.

### 2.3.4 Optimización del proceso de extracción

#### 2.3.4.1 Selección de factores

Para determinar los factores que afectan la eficiencia en el proceso de MEFS se construyó un diseño experimental de Plackett-Burman que consistió en la realización de 12 experiencias. Los factores analizados fueron:

**a)** En la etapa de extracción: velocidad y tiempo de agitación, pH y fuerza iónica de la muestra, adición de solventes orgánicos y temperatura.

**b)** En la etapa de desorción: tiempo de remojo, período de desorción y solvente de remojo.

Cada uno de estos factores se evaluó a dos niveles. Los niveles se seleccionaron en base a experiencias previas. La evaluación consistió en analizar una solución estándar conteniendo  $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$  de todos los analitos disueltos en agua Milli-Q, en todas las condiciones citadas (Tabla 2.2). Como parámetros de una buena recuperación, relacionados con la eficiencia del proceso de extracción, se evaluó el área y la forma de los picos.

**Tabla 2.2:** Combinaciones de los factores a evaluar en el diseño experimental de Plackett-Burman para la selección de factores donde **Solvente A:** ACN, **solvente B:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 3.00).

Experiencia	Solvente de remojo	Tiempo de remojo (min)	Tiempo de extracción (min)	Agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)	Temperatura <sup>a</sup> (°C)	pH	Adición de sal (g)	Adición de solvente orgánico (% v/v)
1	A:B (80:20, v/v)	5	2	500	30	ambiente	6	0.35	0
2	A:B (80:20, v/v)	5	5	1000	10	50	6	0.35	0
3	A:B (50:50, v/v)	5	2	500	10	ambiente	3	0	0
4	A:B (50:50, v/v)	10	5	500	30	50	6	0	0
5	A:B (50:50, v/v)	10	2	1000	30	ambiente	6	0.35	20
6	A:B (50:50, v/v)	10	5	1000	10	ambiente	3	0.35	0
7	A:B (80:20, v/v)	10	2	1000	30	50	3	0	0
8	A:B (80:20, v/v)	10	5	500	10	ambiente	6	0	20
9	A:B (80:20, v/v)	10	2	500	10	50	3	0.35	20
10	A:B (50:50, v/v)	5	5	500	30	50	3	0.35	20
11	A:B (80:20, v/v)	5	5	1000	30	ambiente	3	0	20
12	A:B (50:50, v/v)	5	2	1000	10	50	6	0	20

<sup>a</sup> El valor de temperatura ambiente corresponde a 25 °C.

Posteriormente, se aplicó un test ANOVA a los datos experimentales. En la Tabla 2.3 se muestran los valores de probabilidad obtenido para cada factor en función de la respuesta evaluada, indicando entre paréntesis el tipo de influencia sobre la respuesta (positiva o negativa). Una probabilidad ( $p$ ) menor a 0.05 indica que el factor es significativo con un 95 % de confianza. No obstante, es importante notar que para valores de  $p$  comprendidos entre 0.05 y 0.10 es muy difícil garantizar que el factor analizado no es significativo. Por lo tanto, se consideraron significativos todos los factores que presentaron valores de  $p$  menores 0.10.

Los coeficientes de correlación del ajuste  $R^2$  fueron mayores a 0.8823 para todas las respuestas. Además los residuos del ajuste presentaron una distribución aleatoria indicando que los modelos seleccionados son adecuados para describir los datos. Debido al muy buen ajuste de las respuestas al modelo y a que todos los factores fueron significativos, no se corroboró si había o no interacciones entre ellos.

Finalmente, se puede concluir que todos los factores evaluados resultaron significativos.

**Tabla 2.3:** Valores de probabilidad obtenidos del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño experimental de Plackett-Burman construido para la selección de factores.

Factor analizado	valor de probabilidad <sup>a,b</sup>								Forma de pico
	CBZ	PIR	SUL	KETO	NAPRO	DIFLU	INDO	DICLO	
Modelo	0.0015	0.0004	0.0019	0.0048	0.0128	0.0099	0.0027	0.0024	< 0.0001
A- Solvente de remojo	0.0044 (+)	0.0135 (+)	0.1411	0.2662	0.1992	0.2173	0.0077 (+)	0.0045 (+)	< 0.0001 (+)
B- Tiempo de remojo	0.0178 (-)	0.2377	0.0076 (+)	0.0795 (+)	0.1569	0.0564 (+)	0.1000	0.4407	0.1000
C- Período de desorción	0.0066 (+)	0.0095 (-)	0.0128 (-)	0.0884 (-)	0.1704	0.0274 (-)	0.0140 (-)	0.0053 (-)	0.1000
D- Velocidad de agitación	0.0039 (-)	0.1691	0.0047 (+)	0.0723 (+)	0.1348	0.0279 (+)	0.0417 (+)	0.0171 (+)	0.1000
E- Tiempo de agitación	0.0027 (+)	0.0486 (+)	0.2016	0.1000	0.1713	0.2687	0.0324 (+)	0.0207 (+)	0.1000
F- Temperatura	0.1000	0.1774	0.1000	0.2307	0.1000	0.1000	0.1523	0.0130 (-)	0.1000
G- pH de la muestra	0.0016 (+)	0.0236 (-)	0.0010 (-)	0.0039 (-)	0.0759 (-)	0.0046 (-)	0.0035 (-)	0.0019 (-)	0.1000
H- Fuerza iónica	0.0029 (+)	0.2159	0.0246 (-)	0.1185	0.2309	0.0476 (-)	0.4281	0.1000	0.1000
J- Solvente orgánico	0.0004 (-)	< 0.0001 (-)	0.0005 (-)	0.0016 (-)	0.0097 (-)	0.0029 (-)	0.0002 (-)	0.0004 (-)	0.1000

<sup>a</sup> Se considera significativo cuando es menor a 0.10.

<sup>b</sup> Los signos entre paréntesis corresponden a los efectos de las variables

Cuando el solvente de remojo, el tiempo de remojo, la velocidad y el tiempo de agitación se incrementan del nivel inferior al nivel superior, la eficiencia de extracción aumenta para la mayoría de los analitos estudiados.

Con respecto a los parámetros restantes, cuando el período de desorción, el pH y la temperatura de la muestra se incrementan del nivel inferior al nivel superior, y cuando se le adiciona sal o solvente orgánico, la eficiencia disminuye, para la mayoría de los analitos.

### **2.3.4.2 Análisis de efectos**

#### **2.3.4.2.1 Solvente de remojo**

El solvente de remojo se refiere al solvente que se utiliza para desorber a los analitos de la fibra dentro de la cámara de desorción durante el tiempo de remojo. Utilizando la mezcla de ACN–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [0.025 mol L<sup>-1</sup> pH 3.00 (80:20, v/v)] como solvente de remojo (valores correspondientes al nivel superior), se obtienen las mayores áreas de picos para CBZ, PIR, INDO y DICLO. Para los demás analitos este factor no tuvo influencia significativa.

Sin embargo, bajo estas condiciones, se observa el ensanchamiento de los picos causando superposición de los analitos y pérdida de su resolución. Por este motivo, se realizaron experiencias adicionales utilizando diferentes mezclas de ACN–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.025 mol L<sup>-1</sup> a pH 3.00) como solvente de remojo. Los mejores resultados se obtuvieron empleando una mezcla de ACN–KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [0.025 mol L<sup>-1</sup> pH 3.00 (50:50, v/v)], llegando a un buen compromiso entre una eficiente desorción, estimada con el área de pico, y buena forma de pico.

#### **2.3.4.2.2 Tiempo de remojo**

El tiempo de remojo es el período en el que la fibra se mantiene dentro de la cámara de desorción con el objetivo de transferir los analitos al solvente de remojo.

El tiempo de remojo tuvo efecto significativo positivo para SUL, KETO y DIFLU, es decir que, cuando este tiempo se incrementa de 5 a 10 minutos, se verifica un aumento en la eficiencia de extracción. Para CBZ el efecto fue significativo pero negativo.

El efecto positivo se debe a que, como la fibra está en contacto más tiempo con el solvente, se posibilita una mayor extracción de los analitos. Por lo tanto, el tiempo de remojo se consideró en el siguiente paso de optimización simultánea.

#### 2.3.4.2.3 Período de desorción

El período de desorción es el tiempo en el que la fibra está en contacto con la fase móvil dentro de la cámara de desorción. La fase móvil arrastra al solvente de remojo con los analitos extraídos para ingresarlos dentro de la columna.

Cuando el período de desorción se incrementa de 2 a 5 minutos, se observa una disminución en el área de los picos de PIR, SUL, KETO, DIFLU, INDO y DICLO. Para CBZ se verifica un aumento en la eficiencia de extracción. Por este motivo, en las experiencias posteriores se utilizó un período de desorción de 2 minutos, con el que se verifica la máxima eficiencia.

#### 2.3.4.2.4 Velocidad de agitación

La velocidad de agitación tuvo efecto significativo positivo para SUL, KETO, DIFLU, INDO y DICLO, es decir que cuando esta velocidad se incrementa de 500 a 1000 rpm se verifica un aumento en la eficiencia de extracción. Para CBZ se observa el comportamiento contrario.

Este comportamiento se debe a que, cuanto mayor es la velocidad de agitación, se permite que todas las moléculas tengan acceso al recubrimiento de la fibra, posibilitando su interacción y posterior adsorción. Además, bajo estas condiciones se llega más rápido al equilibrio. Por lo tanto, la velocidad de agitación se consideró en el siguiente paso de optimización simultánea.

#### 2.3.4.2.5 Tiempo de agitación

Cuando el tiempo de agitación se incrementa de 10 a 30 minutos, la eficiencia de extracción aumenta para CBZ, PIR, INDO y DICLO.

Antes del equilibrio se cumple que, cuanto mayor es el tiempo de exposición de la fibra con el analito, mayor es la cantidad que se adhiere al recubrimiento, aumentando la eficiencia de la extracción.

Los analitos estudiados no acceden de igual manera al recubrimiento de la fibra, debido a las diferencias en sus coeficientes de difusión. Por este motivo, el tiempo de agitación se consideró en el siguiente paso de optimización simultánea.

#### 2.3.4.2.6 Efecto de la temperatura

En general, para extracciones por inmersión directa se utiliza temperatura ambiente. El aumento de temperatura disminuye la viscosidad del medio y, por lo tanto, aumenta el coeficiente de difusión de los analitos. Este efecto cinético ocasiona una disminución en el

tiempo de extracción, aunque a costa de perder sensibilidad. No obstante, si la temperatura es demasiado elevada, se puede eliminar a los analitos de la fibra y reducir la sensibilidad. Esto sucede generalmente cuando se usan muestras líquidas y fibras absorbentes como PDMS (Ulrich, 2000).

En el sistema analizado, cuando se incrementa la temperatura a un valor de 50 °C (comenzando de temperatura ambiente), la eficiencia de extracción disminuye para DICLO. Para los analitos restantes la temperatura no tuvo efecto significativo. Por este motivo, las experiencias posteriores se realizaron a temperatura ambiente.

#### 2.3.4.2.7 Efecto del pH

Cuando el pH de la muestra se incrementa de 3.00 a 6.00, la eficiencia de extracción disminuye para todos los analitos excepto para CBZ.

Las drogas antiinflamatorias y antiepilépticas estudiadas en este trabajo presentan diferentes valores de pKa (ver Tabla 2.1). Por lo tanto, el fenómeno de partición entre la fibra y la muestra está fuertemente influenciado por el pH.

Todos los analitos estudiados presentan comportamiento ácido, por lo tanto trabajar a pH 3.00 (nivel inferior) permite que los analitos se encuentren en su forma neutra y sean menos solubles en el medio. De esta manera, presentan mayor afinidad por la fibra, aumentando su eficiencia de extracción.

Por consiguiente, todas las extracciones posteriores se realizaron a pH 3.00.

#### 2.3.4.2.8 Efecto del solvente orgánico

Cuando se le adiciona un 20 % de ACN a la muestra, la eficiencia de extracción disminuye para todos los analitos estudiados.

Este comportamiento se debe a que el solvente orgánico incrementa el carácter hidrofóbico de la solución y posiblemente disminuya la constante de equilibrio de cada analito entre ambas fases, y por consiguiente el número de moléculas de analito extraídas.

Por este motivo, las extracciones subsiguientes se realizaron sin adicionar solvente orgánico a la muestra.

#### 2.3.4.2.9 Efecto del agregado de sal

Cuando se adiciona 0.35 g de NaCl a la muestra, la eficiencia de extracción aumenta para CBZ, pero disminuye para SUL y DIFLU. Para los demás analitos la adición de sal no tuvo influencia significativa.

Por un lado, cuando se agrega sal a la muestra, se incrementa la fuerza iónica del medio y reduce la solubilidad de CBZ, resultando en un incremento del coeficiente de distribución en la nueva fase y, por lo tanto, la cantidad de analito extraída. Aunque este comportamiento no se observa para SUL y DIFLU.

Por otro lado, el uso de sal disminuye el tiempo de vida útil de la fibra. El empleo de altas concentraciones salinas puede ocasionar efectos negativos en la estabilidad de la fibra, debido a la cristalización de sales en su recubrimiento. Por este motivo, para preservar la estabilidad de la fibra, las experiencias posteriores se realizaron sin la adición de sal.

Finalmente, sólo el tiempo de remojo, el tiempo y la velocidad de agitación se consideraron en el siguiente paso de optimización.

#### **2.3.4.3 Metodología de superficie de respuesta**

Se determinaron las condiciones experimentales que permitieron obtener la mayor eficiencia en el proceso de MEFS. Para ello, se construyó un diseño experimental central compuesto que consintió en la realización de 20 experiencias (Tabla 2.4). Estas experiencias resultaron de la combinación de los factores que mostraron un efecto significativo positivo en los siguientes rangos: tiempo de remojo entre 5 y 17 minutos, velocidad de agitación entre 800 y 1400 rpm y tiempo de agitación entre 21 y 44 minutos.

Por otro lado, los restantes factores se mantuvieron constantes en un valor fijo, de acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis de efectos: la muestra se mantuvo temperatura ambiente, pH 3.00, sin la adición de sal ni de solventes orgánicos y se utilizó un solvente de remojo correspondiente a una mezcla de ACN-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> [0.025 mol L<sup>-1</sup> pH 3.00 (50:50, v/v)] con un tiempo de extracción de 2 minutos.

Las experiencias del diseño experimental se realizaron en dos bloques, correspondientes a dos días consecutivos, con el objetivo de eliminar las variaciones causadas por algún factor externo no controlado durante el transcurso de las experiencias.

**Tabla 2.4:** Diseño experimental central compuesto: Combinaciones de los factores seleccionados.

Experiencia	Bloque	Tiempo de remojo (min)	Velocidad de agitación (rpm)	Tiempo de agitación (min)
1	1	7	1300	25.00
2	1	11	1100	32.50
3	1	7	900	40.00
4	1	11	1100	32.50
5	1	11	1100	32.50
6	1	7	1300	40.00
7	1	15	1300	25.00
8	1	15	900	25.00
9	1	11	1100	32.50
10	1	15	1300	40.00
11	2	7	900	25.00
12	2	15	900	40.00
13	2	17	1100	32.5
14	2	11	1100	43.75
15	2	11	1100	21.25
16	2	11	800	32.50
17	2	11	1100	32.50
18	2	5	1100	32.50
19	2	11	1100	32.50
20	2	11	1400	32.50

Todas las experiencias se realizaron con extractos provenientes de soluciones estándar fortificadas con  $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$  de cada analito.

Los datos experimentales de las áreas de pico de cada analito se ajustaron mediante modelos polinomiales. Se eliminaron los valores de áreas de SUL y NAPRO, correspondientes a las experiencias 13 y 18, debido a su influencia negativa en el modelo seleccionado (Myers y Montgomery, 1995).

Los coeficientes del modelo se calcularon mediante regresión múltiple con eliminación por retroceso (Derringer y Suich, 1980) y se validaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 2.5).

**Tabla 2.5:** Resultados del ANOVA para las respuestas obtenidas en el diseño central compuesto.

Respuesta (Área de pico)	Modelo seleccionado	Valor de probabilidad <sup>a</sup>		R <sup>2</sup> ajustado	Coeficiente de variación (%)
		Modelo	Falta de ajuste		
CBZ	Lineal	< 0.0001	0.0804	0.743	3.91
PIR	Lineal	< 0.0001	0.8894	0.894	3.40
SUL	Cúbico	< 0.0001	0.8546	0.994	0.98
KETO	Lineal	< 0.0001	0.1115	0.705	6.41
NAPRO	Cuadrático	< 0.0001	0.0636	0.905	4.57
DIFLU	Lineal	< 0.0001	0.1717	0.879	4.06
INDO	Lineal	< 0.0001	0.0929	0.842	7.13
DICLO	Lineal	< 0.0001	0.0833	0.765	8.23

<sup>a</sup> se considera significativo cuando es menor a 0.05

Las áreas de pico de CBZ, PIR, KETO, DIFLU, INDO y DICLO se ajustaron mediante modelos lineales, el área de pico de SUL se ajustó mediante un modelo cúbico y el área de pico de NAPRO, mediante un modelo cuadrático. Estos modelos son los que mejor explican el comportamiento de dichas respuestas en relación a los factores estudiados, observándose una probabilidad menor 0.05 para las ocho respuestas, indicando que los términos del modelo son significativos.

Por otro lado, la prueba de falta de ajuste fue no significativa para todas las respuestas ( $p > 0.05$ ), es decir, no hubo falta de ajuste. Además, dichos modelos exhiben bajo coeficiente de variación (entre 0.28 y 8.23 %) y los cuadrados de los coeficientes de correlación ajustados obtenidos (entre 0.743 y 0.994) indican una buena relación entre los datos experimentales y los estimados por el modelo.

Los valores de probabilidad de los factores que se muestran en la Tabla 2.6 indican que, con un 95 % de confianza, el tiempo de remojo fue significativo para PIR, SUL y NAPRO, la velocidad de agitación para CBZ, NAPRO, DIFLU, INDO y DICLO, y el tiempo de agitación para las áreas de todos los analitos.

**Tabla 2.6:** Valores de probabilidad obtenidos para cada coeficiente en el ajuste de respuestas en el ANOVA realizado.

Parámetro	Valor de probabilidad <sup>a</sup>							
	CBZ	PIR	SUL	KETO	NAPRO	DIFLU	INDO	DICLO
Modelo	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
A- Tiempo de remojo (min)	0.7158	<b>0.0108</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	0.6934	<b>0.0023</b>	0.0608	0.0878	0.1752
B- Velocidad de agitación (rpm)	<b>0.0292</b>	0.6010	0.822	0.7462	<b>0.0096</b>	<b>0.0204</b>	<b>0.0076</b>	<b>0.0315</b>
C- Tiempo de agitación (min)	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
AB					0.0877			
AC			0.0842					
BC			<b>0.0002</b>					
A <sup>2</sup>					<b>0.0005</b>			
B <sup>2</sup>			0.0639		<b>0.0203</b>			
C <sup>2</sup>					<b>0.0009</b>			
ABC			<b>0.0118</b>					
A <sup>2</sup> C			<b>&lt; 0.0001</b>					
Falta de ajuste	0.0711	0.8704	0.8546	0.0888	0.0636	0.1717	0.0929	0.0833

<sup>a</sup> se considera significativo cuando es menor a 0.05

Algunos términos irrelevantes se consideraron en el modelo para mantener la jerarquización. La jerarquía de un modelo mantiene las relaciones entre los efectos principales, interacciones de dos factores, interacciones de tres factores, etc. Por ejemplo, en la Tabla 2.6, como la interacción BC en el ajuste de SUL es un término significativo, el modelo también debería incluir los efectos principales B y C, a pesar de que el efecto principal B no es estadísticamente significativo. Un modelo bien formulado deberá incluir todos los efectos principales presentes en las interacciones significativas.

#### 2.3.4.4 Aplicación de la función deseabilidad

Mediante el uso de la función deseabilidad se optimizaron simultáneamente las áreas de los ocho analitos estudiados. La Tabla 2.7 muestra los criterios que se utilizaron para optimizar cada respuesta en forma individual, los límites superior e inferior y la importancia que se le adjudica a cada respuesta con respecto a las demás.

**Tabla 2.7:** Criterios utilizados para la optimización de las respuestas, con su correspondiente importancia.

Respuesta (áreas de pico)	Criterios	Límite inferior	Límite superior	Importancia
CBZ	maximizar	153080	205584	5
PIR	maximizar	163579	239736	5
SUL	maximizar	333539	518286	3
KETO	maximizar	246031	434902	4
NAPRO	maximizar	1186719	2179539	1
DIFLU	maximizar	717205	1185552	2
INDO	maximizar	447500	926924	2
DICLO	maximizar	347938	689684	3

Todas las respuestas se maximizaron entre el valor mínimo y máximo registrado. Se le adjudicó mayor importancia a las áreas de CBZ y PIR, debido a que son los menores valores observados y, en orden decreciente a los demás analitos de acuerdo con el valor de su área.

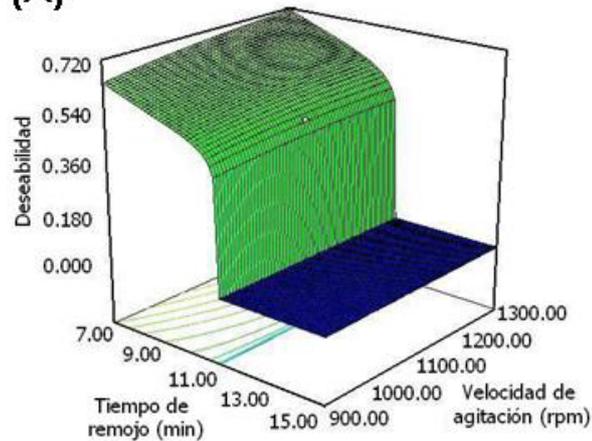
Luego se realizó la optimización obteniendo como resultado que las condiciones experimentales que generan el máximo de la función deseabilidad ( $D = 0.941$ ), es decir, que satisfacen todos los criterios son: tiempo de remojo 17 minutos, velocidad de agitación 1372 rpm y tiempo de agitación 43.75 minutos.

Para evaluar la posibilidad de reducir aún más el *tiempo de análisis*, se realizó un estudio complementario que consistió en adicionar esta nueva respuesta al proceso de optimización. Como consecuencia, las condiciones que generaron un máximo de la función deseabilidad ( $D = 0.766$ ) fueron: tiempo de remojo, 5 minutos, velocidad de agitación, 1400 rpm y tiempo de agitación, 44 minutos. Un tiempo de remojo de 5 minutos disminuye significativamente el tiempo de análisis, comparado con el obtenido anteriormente de 17 minutos, sin disminuir la eficiencia en la extracción.

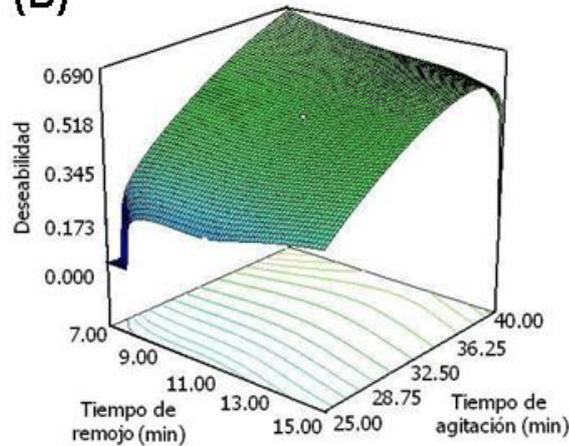
Las superficies de respuestas obtenidas de la función deseabilidad global se muestran en la Figura 2.6 A-C. Estas gráficas se obtuvieron para dos factores manteniendo los demás en sus valores óptimos.

**Figura 2.6:** Gráficas de superficie de respuesta correspondientes a la función deseabilidad en función de los siguientes pares de factores, manteniendo constantes en sus valores óptimos los factores restantes: (A) tiempo de remojo–velocidad de agitación; tiempo de agitación= 43.75 min, (B) tiempo de remojo–tiempo de agitación; velocidad de agitación = 1400 rpm y (C) velocidad de agitación–tiempo de agitación; tiempo de remojo = 5 min.

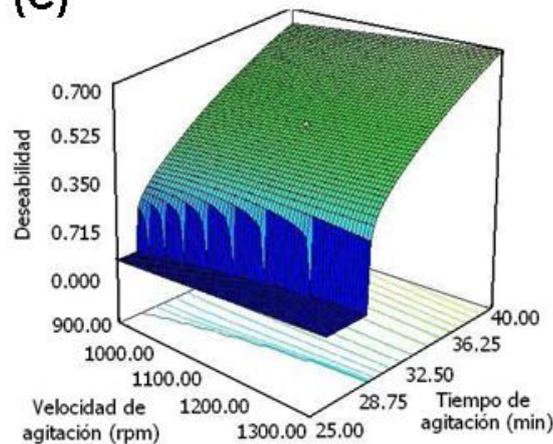
(A)



(B)



(C)



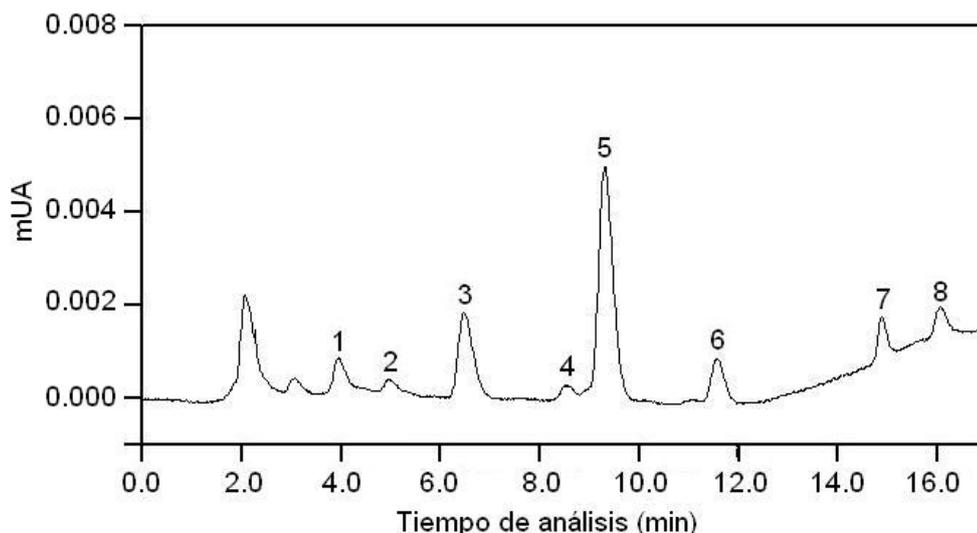
Como se puede ver en la Figura 2.6 A, cuando el tiempo de remojo adquiere valores entre 11 y 15 minutos, la deseabilidad vale 0 (en todo el rango de velocidad de agitación). Como el tiempo de remojo es tan elevado, se incrementa el tiempo de análisis, a pesar de incrementar el área de pico. La deseabilidad aumenta cuando el tiempo de remojo disminuye.

En la Figura 2.6 B la deseabilidad es mayor a 0 para todo el rango analizado de tiempo de remojo y tiempo de agitación. Sin embargo, cuando el tiempo de agitación se incrementa, la deseabilidad adquiere valores más altos, debido a que aumenta el tiempo de contacto de los analitos con la fibra y esto se traduce en una mejora en la eficiencia de extracción.

Finalmente, la Figura 2.6 C muestra que, cuando el tiempo de agitación es menor a 25 minutos, la deseabilidad adquiere valores iguales a 0. Este comportamiento se debe a que no hay suficiente tiempo de contacto entre la fibra y el analito, para obtener buenas recuperaciones. Sin embargo, a medida que el tiempo de agitación se incrementa, la deseabilidad aumenta.

Los valores obtenidos de la optimización se corroboraron experimentalmente. La Figura 2.7 muestra el cromatograma obtenido luego de la MEFS de una mezcla conteniendo  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, bajo las condiciones experimentales óptimas.

**Figura 2.7:** Cromatograma de un estándar conteniendo  $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito en solución acuosa bajo las condiciones experimentales óptimas.



### 2.3.5 Validación del método analítico desarrollado

En primer lugar, el método analítico desarrollado se validó mediante la metodología de calibración univariada, que se basa en la obtención de las áreas de los picos a una longitud de onda fija (252 nm para KETO y 230 nm para los demás analitos).

Las cifras de mérito de la calibración univariada se calcularon utilizando soluciones estándar acuosas, preparadas bajo las mismas condiciones que las muestras reales, empleando las condiciones óptimas del proceso de MEFS y de la separación cromatográfica.

Los límites de detección del método (LOD) se calcularon como propone la EPA, donde la estimación de este parámetro tiene en cuenta no sólo el efecto de la matriz, sino también la variabilidad introducida por todos los pasos del procesamiento de la muestra.

Para realizar esta estimación se fortificaron siete muestras de agua de río en diferentes niveles de concentración entre 5.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 10.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  dependiendo del compuesto. A continuación, cada replicado se procesó por el método analítico completo. La estimación inicial del LOD se calculó multiplicando la desviación estándar de los resultados por el estadístico  $t$  apropiado.

$$\text{LOD} = t_{(n-1, \alpha = 0.001)} \times S_A$$

donde  $n$  es el número de replicados analizados,  $S_A$  es la desviación estándar de los replicados y  $t$  es el estadístico  $t$  de Student para  $n-1$  grados de libertad con el 99 % de confianza. Los valores de los LOD para los analitos estudiados se encuentran en un rango de 1.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 4.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Luego, a siete alícuotas de muestras de agua de río, se les adicionaron cantidades de analito entre 8.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 20.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , dependiendo de cada compuesto. Se analizaron con el método analítico completo y se calculó la desviación estándar de la respuesta ( $S_B$ ). Luego de verificar que no existe diferencia estadísticamente significativa entre  $S_A$  y  $S_B$ , mediante la prueba  $F$ , las dos varianzas se combinaron para obtener  $S^2$ , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$s^2 = \frac{(n_A - 1)s_A^2 + (n_B - 1)s_B^2}{n_A + n_B - 2}$$

donde  $n_A$  y  $n_B$  son el número de muestras analizadas en cada set de datos. Posteriormente, se calcularon los LOD usando el valor de desviación estándar combinado  $S^2$  de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{LOD} = t_{(n_A+n_B-2, \alpha = 0.001)} \times S$$

Los valores de LOD obtenidos de esta manera se encuentran en un rango de 0.5 a 3.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  y se muestran en la Tabla 2.8.

Los límites de cuantificación (LOQ) se calcularon según la guía EURACHEM. El LOQ corresponde a la concentración de analito donde el coeficiente de variación (CV) de la señal es igual a un porcentaje fijo (el 10 % en este análisis). Cada replicado se procesó por el método analítico completo y los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 2.8.

El límite inferior del rango lineal para cada fármaco corresponde al valor obtenido del LOQ y el nivel superior corresponde a la concentración de analito donde la señal se desvía de un 3 a un 5 % de la linealidad.

Para obtener las curvas de calibración, se procesaron con el método analítico desarrollado ocho estándares cubriendo el rango lineal de concentración y cada punto se analizó por triplicado. Se observó buena relación lineal ( $R^2 > 0.993$ ) entre 1.0 y 50.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para NAPRO, entre 2.0 y 50.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para SUL, y entre 4.0 y 50.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para los demás analitos.

La repetibilidad se evaluó a un nivel de concentración intermedio por sextuplicado (de 20.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  para cada analito), obteniendo valores de coeficiente de variación (CV) menores o iguales al 8.2 %. La precisión intermedia también se analizó mediante 6 inyecciones repetidas de diferentes soluciones acuosas conteniendo 20.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito, y el CV obtenido fue menor o igual al 9.3 %.

Para estimar el efecto matriz se compararon, mediante una prueba  $t$  de Student, las pendientes de las gráficas de calibración obtenidas usando extractos de estándares disueltos en agua de río con las pendientes de las gráficas obtenidas utilizando los estándares disueltos en agua Milli-Q. Debido a que no se observaron diferencias significativas entre las pendientes de ambas gráficas, se puede concluir que la matriz del agua de río no afecta a la señal analítica para los productos farmacéuticos estudiados.

**Tabla 2.8:** Cifras de mérito para la determinación de los compuestos farmacéuticos en agua mediante MEFS-CL-UV.

Analito	Rango lineal ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	$R^2$	CV (%)*		LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
			Repetibilidad	Precision intermedia		
CBZ	4.0–50.0	0.994	8.0	8.5	3.0	4.0
PIR	4.0–50.0	0.994	4.6	6.1	2.6	4.0
SUL	2.0–50.0	0.997	4.9	5.4	0.8	2.0
KETO	4.0–50.0	0.991	7.7	8.9	2.2	4.0
NAPRO	1.0–50.0	0.999	8.2	9.3	0.5	1.0
DIFLU	4.0–50.0	0.992	4.3	5.1	0.7	4.0
INDO	4.0–50.0	0.998	4.4	7.6	2.2	4.0
DICLO	4.0–50.0	0.997	5.9	6.4	1.5	4.0

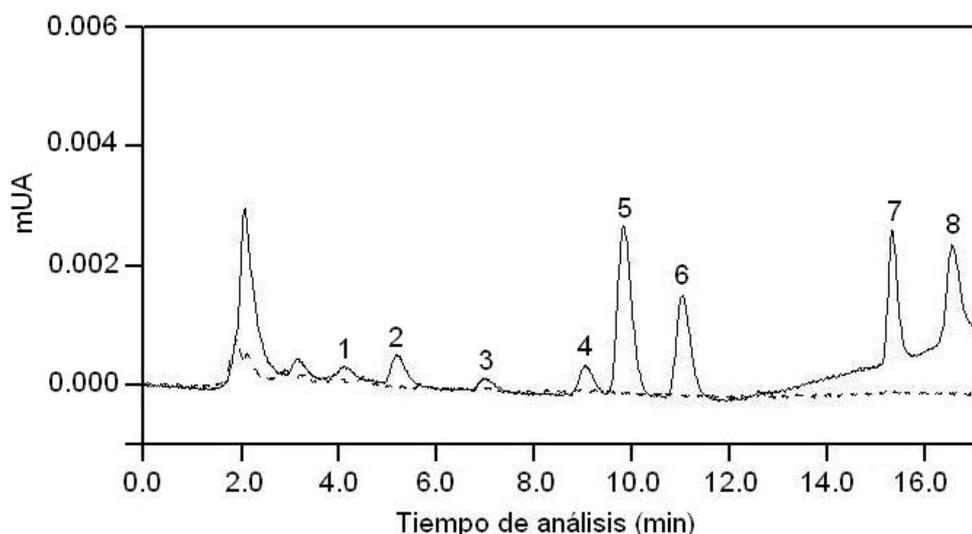
\* 20.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (n=6)

### 2.3.6 Aplicación del método a muestras de agua de río

El método desarrollado se utilizó para analizar muestras de agua del río Nacimiento, localizado en la provincia de Almería (España), a la que no se le adicionó ninguno de los compuestos estudiados.

La Figura 2.8 muestra dos cromatogramas correspondientes a extractos de una muestra de agua de río y una muestra de agua de río fortificada con  $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito. Como se observa en la Figura 2.8, los picos se encuentran con buena resolución entre sí, sin presentar ninguna interferencia correspondiente a la matriz del agua de río.

**Figura 2.8:** Cromatograma correspondiente al extracto de una muestra de agua de río sin fortificar con analitos (---) y a un extracto de agua de río fortificada con  $10.0 \mu\text{g L}^{-1}$  de cada analito (—).



Con el objetivo de verificar si el método es apto para determinar estos productos farmacéuticos en agua del río, se fortificaron cinco muestras de agua con diferentes cantidades de analitos en el rango de  $12.0$  a  $35.0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Se procedió a realizar la extracción y luego se analizaron con el método descrito.

Las recuperaciones de los analitos se calcularon usando las gráficas de calibración construidas con estándares disueltos en agua Milli-Q, y corresponden a valores entre el 71.6 y el 122.8 % (Tabla 2.9), considerados como satisfactorios. Los valores de CV % obtenidos son aceptables según los requerimientos para ensayos bioanalíticos (Guidance for industry-Bioanalytical method validation, 2001).

**Tabla 2.9:** Recuperaciones obtenidas para las muestras construidas mediante la adición de diferentes cantidades de analito a muestras reales de agua de río.

Muestra	Cantidad adicionada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Cantidad encontrada ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )*							
		CBZ	PIR	SUL	KETO	NAPRO	DIFLU	INDO	DICLO
1	12	8.9	14.2	10.4	14.7	14.2	13.2	13.4	14.1
		(74.1)	(118.6)	(86.8)	(122.8)	(118.1)	(110.0)	(111.6)	(117.4)
2	15	11.5	17.8	11.3	16.5	16.1	11.2	12.9	12.3
		(76.6)	(119.0)	(75.2)	(109.8)	(107.3)	(74.9)	(85.9)	(82.2)
3	25	18.1	29.7	22.0	29.7	28.2	24.7	26.3	27.2
		(72.4)	(119.0)	(88.0)	(119.0)	(113.0)	(99.0)	(105.1)	(108.7)
4	25	19.8	28.1	24.3	26.6	29.5	25.4	25.3	26.8
		(79.4)	(112.3)	(97.3)	(106.2)	(117.9)	(101.8)	(101.1)	(107.1)
5	35	25	36.5	31.4	33.8	34.2	25.3	31.1	33.3
		(71.6)	(104.2)	(89.7)	(96.6)	(97.6)	(72.5)	(89.0)	(95.1)
	Recuperación promedio (%)	74.82	114.62	87.4	110.88	110.78	91.64	98.54	102.1
	CV (%)	4.27	5.66	9.10	9.41	7.75	18.43	11.01	13.39

\*Los valores entre paréntesis corresponden a las recuperaciones % de analito

## 2. 4 CONCLUSIONES

- El empleo de la microextracción en fase sólida y la cromatografía líquida acoplada a la detección con detector de arreglo de diodos proporciona una metodología de extracción y análisis simple, eficiente, selectiva y económica para la determinación de siete drogas antiinflamatorias no esteroideas y el antiepiléptico carbamazepina.
- La aplicación del diseño experimental de Plackett-Burman permite seleccionar las variables que afectan la eficiencia de la MEFS.
- La estrategia de la utilización de diseños experimentales y la metodología de superficie de respuesta permiten aplicar la función deseabilidad para resolver un sistema de múltiples respuestas y, de esta manera, calcular las condiciones experimentales óptimas en el proceso de MEFS, disminuyendo considerablemente el tiempo de procesamiento de la muestra, sin perder eficiencia en la extracción.
- La comparación de las gráficas de calibración construidas con agua de río con las obtenidas con agua Milli-Q resulta imprescindible para detectar la presencia de efecto matriz en las muestras analizadas.
- El proceso de validación demostró que el método analítico desarrollado puede aplicarse en la determinación de siete drogas anti-inflamatorias no esteroideas (naproxeno, ketoprofeno, diclofenac, piroxicam, indometacina, sulindac y diflunisal) y un anticonvulsivo (carbamazepina) presentes en agua de río. El proceso de validación proporcionó resultados satisfactorios en relación a linealidad, precisión, exactitud, selectividad y robustez, en los rangos de concentración estudiados.

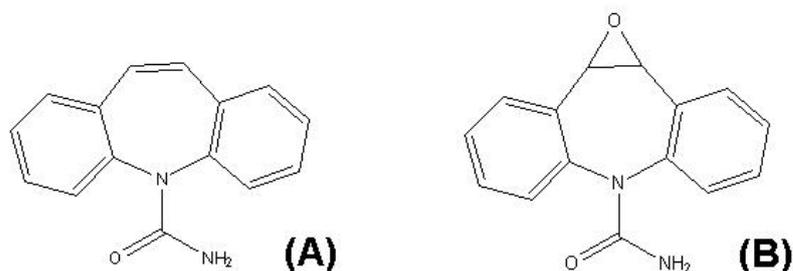
## RESOLUCIÓN QUIMIOMÉTRICA DE PICOS ELECTROFORÉTICOS TOTALMENTE SOLAPADOS: CUANTIFICACIÓN DE CARBAMAZEPINA EN SUERO HUMANO EN PRESENCIA DE DIVERSAS INTERFERENCIAS

### 3.1 INTRODUCCIÓN

La Carbamazepina (5H-dibenz[b, f]azepina-5-carboxamida–**CBZ**) (Figura 3.1A) es una droga que pertenece al grupo de las drogas antiepilépticas clásicas (DAE) de segunda generación, utilizada para el tratamiento de la epilepsia y otros desórdenes psiquiátricos.

El principal producto de su biotransformación es el 10, 11 epóxido (1a,10b-dihidro-6H-dibenzo-[b,f]oxireno[d]azepina-6-carboxamida–**CBZ-EP**) (Figura 3.1B) que posee actividad antiepiléptica y alcanza niveles de concentración menores a los de la CBZ. La CBZ-EP se metaboliza posteriormente, dando productos inactivos; siendo el principal, la 10, 11-dihidroxi-carbamazepina.

**Figura 3.1:** Estructura química de A) carbamazepina y B) carbamazepina epóxido.



Luego de la administración de 200 a 1200 mg de CBZ se obtiene una concentración plasmática media en el rango de 4.0 a 12.0 mg L<sup>-1</sup>, siendo la concentración plasmática media de CBZ-EP el 25 % de la registrada para CBZ (Kuldvee y Thormann, 2001).

### 3.1.1 Importancia de determinar CBZ en suero humano

Un fármaco antiepiléptico ideal debería suprimir todas las convulsiones sin generar efectos adversos de ninguna clase. Desafortunadamente, las DAE de uso actual logran el control de la actividad convulsiva en algunos pacientes, no sin causar efectos adversos que varían en gravedad. Para reducir la toxicidad, suele buscarse el tratamiento con un solo fármaco. Si no se eliminan las convulsiones con concentraciones plasmáticas adecuadas del medicamento inicial, puede administrarse otro fármaco, mientras se suspende lentamente el primero. Sin embargo, quizá se requiera el empleo de múltiples fármacos (Goodman Gilman y col., 1996).

Las respuestas al tratamiento farmacológico entre los pacientes dependen de varios parámetros que se relacionan con la naturaleza de la crisis epiléptica y factores que dependen del paciente. En otras palabras, estas respuestas varían significativamente de un paciente a otro. Por consiguiente, la **determinación de los niveles plasmáticos de las DAE** a intervalos apropiados es sumamente útil para determinar el cumplimiento del régimen prescrito, la interacción fármaco-cinética y las dosis inadecuadas o excesivas del fármaco con el fin de minimizar los efectos adversos relacionados con la dosis.

Conocer la concentración plasmática del fármaco durante el tratamiento farmacológico múltiple es sumamente útil. Si sobreviene intoxicación, la vigilancia ayudará a identificar al compuesto o compuestos causales, y si se produce interacción farmacológica, podrá orientar al reajuste del régimen de dosificación.

### 3.1.2 Métodos empleados para su detección

En la literatura científica se proponen varios métodos para la determinación de CBZ en suero humano, que se basan fundamentalmente en técnicas cromatográficas.

La cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) con detección UV es la técnica de elección. En todos los casos, la determinación de CBZ en suero se asocia a la determinación de otras drogas (Patil y Bodhankar, 2005; Franceschi y Furlanut, 2005; Bugamelli y col., 2002; Mandrioli y col., 2001; Bhatti y col., 1998; Chollet y col., 1996; Dumortier y col., 2001; Khoschorur y col., 2001; Matar y col., 1999; Lensmeyer y col., 1997; Queiroz y col., 2002-a; Potter y Donnelly, 1998; Ramachandran y col., 1994).

Otra alternativa es la utilización de detectores de masa con ionización electro-spray (CLAR-MS-ESI) (Van Rooyen y col., 2002) o detectores de masa acoplados (CLAR-MS-MS) (Abdel-Hamid y Phillips, 2003). Por otra parte, se propuso el uso de espectrometría UV en combinación con el método de calibración multivariada (PLS) (Cámara y col., 2005; Rezaei y col., 2005).

También se presentaron algunos métodos que se basan en cromatografía gaseosa (CG) con detección de masa (MS) (Hallbach y col., 1997), detección ultravioleta (UV) (Queiroz y col., 2001) y con detección específica termiónica (Queiroz y col., 2002-b). En la mayoría de los casos, la determinación de CBZ se encuentra asociada a la determinación de otros fármacos antiepilépticos

En los últimos años, la electroforesis capilar (EC) se utilizó para la separación de CBZ de sus metabolitos y de otras drogas antiepilépticas en suero. La mayoría de los autores utilizan detección UV (Lancas y col., 2003; Kuldvee y Thormann, 2001; Pucci y Raggi, 2005; Makino y col., 1997; Spencer y col., 1997; Lee y col., 1992; Meier y Thormann, 1991; Pucci y col., 2003; Ivanova y col., 2003; Ivanova y col., 2002; Marziali y col., 2002; Raggi y col., 2002; Thormann y col., 2001; Izzo y col., 2001).

Como se mencionó con anterioridad, la administración de CBZ en el tratamiento de la epilepsia y otras patologías relacionadas puede asociarse a la administración de otros medicamentos antiepilépticos (terapia múltiple). Es lógico pensar, entonces, que los pacientes tratados con CBZ deban consumir fármacos para aliviar los diversos efectos adversos, considerando que también puedan estar bajo tratamiento de alguna otra patología.

Por este motivo, cuando se realicen análisis sanguíneos de pacientes tratados con CBZ, se podrá encontrar una diversidad de fármacos, desde antiepilépticos y benzodiazepinas hasta analgésicos, anti-inflamatorios, antibióticos, estimulantes del sistema nervioso central, entre otros.

## **3.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Equipamiento**

Todas las experiencias se realizaron usando un equipo de electroforesis capilar Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) con un detector de arreglo de diodos (DAD). Para la recolección de datos se utilizó una PC Pentium 4 HP Compaq.

Para las separaciones electroforéticas se utilizó un capilar desnudo de sílice fundida (Microsolv, USA) de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y una longitud total de 53.5 cm (45 cm hasta el detector). El cartucho que contiene al capilar se mantuvo a 25 °C y las separaciones electroforéticas se realizaron en solución de borato de sodio 0.025 mol L<sup>-1</sup> a pH 9.20, aplicando un voltaje de 20 kV alcanzando una corriente promedio de 90  $\mu\text{A}$ . Se utilizó inyección hidrodinámica mediante la aplicación de 50 mbar durante 10 segundos.

Para la degasificación de todas las soluciones de trabajo se utilizó un baño ultrasónico Cole Palmer 8891 (Illinois, USA). Para la evaporación del solvente de extracción se utilizó una manta calefactora.

### 3.2.2 Programas de computación

Para el control y la adquisición de datos electroforéticos se utilizó la interfaz gráfica provista por Agilent Technologies. Para cada electroferograma se registraron los espectros de absorbancia en el rango de 189 a 351 nm con un intervalo de recolección de 2 nm, a intervalos regulares de 0.003 s durante un tiempo total de 5 minutos. Por lo tanto, se generaron matrices de tamaño 616 × 82 por muestra, aunque se seleccionaron regiones antes de realizar la calibración multivariada.

Para cuantificar CBZ por calibración univariada se utilizó la longitud de onda de 214 nm. En todos los casos, los electroferogramas se registraron de manera aleatoria con respecto a las concentraciones de analito y los correspondientes a las muestras de calibración se obtuvieron en días diferentes a los del juego de validación. La linealidad del método se estudió con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

Los datos se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una PC Sempron AMD para luego analizarse por los programas quimiométricos. MCR-ALS (Resolución Multivariada de Curvas por Cuadrados Mínimos Alternantes) se implementó usando la interfaz gráfica provista por R. Tauler, disponible en su página <http://www.ub.edu/mcr/welcome.html> (Jaumot y col., 2005). Las muestras correspondientes al sistema espectroscópico-electroforético se sometieron a corrección de la línea de base a través de un código de MATLAB escrito por Eilers (Eilers y col., 2006). Además, se les realizó la corrección del corrimiento del tiempo de migración empleando un código de MATLAB escrito de acuerdo a lo publicado por Prazen y colaboradores (Prazen y col., 1998). Todas las aplicaciones se ejecutaron utilizando MATLAB 7.0 (MATLAB 7.0, The Mathworks, Natick, Massachusetts, 2003).

### 3.2.3 Reactivos y Materiales

Carbamazepina, su metabolito principal carbamazepina epoxido, fenobarbital (5-etil-5-[1-metilbutil]-2,4,6-trioxohexahidro-pirimidina-**PHB**), fenitoína (5,5-difenilhidantoina-**PHT**), fenilefrina (3-(1-hidroxi-2-metilamino-etil)-fenol-**FEN**), ibuprofeno ( $\alpha$ -metil-4-[isobutil] ácido fenilacético-**IBU**), paracetamol (4- acetamidofenol-**PAR**), teofilina (1,3-dimetilxantina-**TEO**), cafeína (1,3,7-trimetilxantina-**CAF**) y ácido acetilsalicílico (2-acetoxi-ácido benzoico-**AAS**) se adquirieron en Signa Aldrich. Lamotrigine (6-(2,3-diclorofenil)-1,2,4-triazina-3,5-diamina-**LAMO**) se adquirió en Química Alkano S.A. (México).

Todos los reactivos utilizados para realizar las experiencias fueron de calidad para análisis y de marca Cicarelli: borato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ), fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), ácido tricloroacético (TCA), hidróxido de sodio (NaOH) y diclorometano.

Los solventes metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), isopropanol y etanol absoluto (EtOH) fueron de calidad cromatografía líquida. El agua utilizada para las disoluciones y las diluciones fue de calidad ultrapura.

Las soluciones estándares madres de los analitos se prepararon por pesada de una determinada cantidad de droga sólida y posterior disolución en los siguientes solventes: CBZ, CBZ-EP y LAMO en MeOH; FEN, PHB, PHT, PAR, AAS, CAF y TEO en agua ultrapura e IBU en EtOH, para alcanzar concentraciones de  $2.00 \text{ g L}^{-1}$ . Estas soluciones se guardaron en oscuridad a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las soluciones estándar de trabajo de todos los analitos se prepararon al comienzo del día de trabajo por dilución de las soluciones madres en la solución reguladora de corrida (SRC).

Las SRC y las soluciones de lavado se prepararon en el día y, previo a la inyección en el sistema electroforético, se filtraron a través de filtro jeringa de  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  de poro con membrana de nylon (Sartorius, Alemania) y se degasificaron en baño ultrasónico durante 5 minutos.

### 3.2.4 Acondicionamiento del capilar

El procedimiento de lavado y acondicionamiento del capilar se realizó de acuerdo a lo especificado en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1:** Secuencia de lavados del capilar para los distintos momentos del análisis.

Momento del lavado	Soluciones para el acondicionamiento del capilar				
	NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ )	NaOH ( $0.1 \text{ mol L}^{-1}$ )	Agua Milli-Q	SRC	aire
Capilar nuevo	10 min	10 min	10 min	10 min	
Comienzo del día		10 min	10 min	10 min	
Entre corridas		3 min	3 min	3 min	
Final del día		5 min	5 min		3 min

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer objetivo en el desarrollo del método analítico fue separar CBZ de su metabolito principal CBZ-EP, para su posterior cuantificación mediante calibración univariada. Debido a que CBZ y CBZ-EP presentan idénticas propiedades fisicoquímicas y eléctricas es imposible su separación mediante electroforesis capilar zonal (ECZ).

Una de las alternativas para solucionar este inconveniente es emplear ciclodextrinas (CD). La CD son moléculas utilizadas comúnmente en la separación de enantiómeros (Spencer y col., 1997; Marziali y col., 2002; Izzo y col., 2001). Los analitos de interés (CBZ y CBZ-EP) no son isómeros entre sí, pero su estructura difiere sólo en la presencia de un átomo de oxígeno, justificando de esta manera la utilización de las CD.

Otra de las alternativas factibles es el empleo de cromatografía micelar electrocinética (CMEC), una metodología de EC que utiliza surfactantes para separar tanto analitos neutros como cargados. En CMEC la separación se basa en interacciones hidrofóbicas-iónicas diferenciales entre el surfactante, agregado a la SRC y los analitos. La mayoría de los trabajos ya citados utilizan el surfactante aniónico dodecil sulfato de sodio (SDS) para la separación de CBZ y CBZ-EP (Kuldvee y Thormann, 2001; Makino y col., 1997; Lee y col., 1992; Meier y Thormann, 1991; Pucci y col., 2003; Ivanova y col., 2003; Ivanova y col., 2002; Raggi y col., 2002; Thormann y col., 2001; Izzo y col., 2001).

Dada la gran cantidad de alternativas presentadas en la literatura acerca del tema en estudio, consideramos novedoso desarrollar un método simple para la cuantificación de CBZ en suero humano, basado en ECZ acoplada a procesamiento quimiométrico, que insuma un tiempo considerablemente menor que los informados por otros autores.

#### 3.3.1 Desarrollo del método analítico

En una primera instancia se analizó la separación electroforética de los analitos con diferentes soluciones reguladoras: fosfato de sodio pH 4.20 y borato de sodio pH 9.20, a tres niveles de concentración cada uno: 0.015, 0.025 y 0.035 mol L<sup>-1</sup>, un total de seis soluciones reguladoras. La evaluación consistió en analizar una solución de trabajo conteniendo 5.00 mg L<sup>-1</sup> de CBZ y de CBZ-EP, preparada en tres matrices diferentes; agua ultrapura, MeOH y la SRC correspondiente para cada análisis.

Se utilizó un capilar desnudo de sílice fundida de 75 µm de diámetro interno y una longitud total de 53.5 cm (45 cm hasta el detector). Las separaciones electroforéticas se realizaron aplicando un voltaje de 20 kV y se utilizó inyección hidrodinámica mediante la aplicación de 50 mbar durante 10 s. Los electroferogramas se obtuvieron a 214 nm de longitud de onda y el capilar se mantuvo a 25 °C

El análisis de las 18 corridas electroforéticas mediante ECZ mostró que los analitos CBZ y CBZ-EP presentan un solapamiento total, debido a sus idénticas propiedades eléctricas y peso molecular. Puesto que CBZ y CBZ-EP no poseen carga eléctrica, migran por el capilar arrastrados por el FEO. Otra observación que se hizo fue que a pesar de que el perfil del flujo sea plano y minimice la dispersión radial, la forma del pico es parabólica a causa de la dispersión longitudinal a lo largo del capilar.

Después de una inspección visual de cada electroferograma, se decidió continuar trabajando con una solución de borato de sodio  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  a pH 9.20, disolviendo los analitos en SRC. Bajo estas condiciones electroforéticas:

- se obtiene la mejor forma de pico, sin deformaciones apreciables,
- se minimiza el tiempo de análisis, cercano a los 3.50 minutos y
- se minimiza el ruido de la línea de base.

### 3.3.2 Extracción de CBZ y CBZ-EP del suero

La inyección directa del suero no proporcionó ninguna señal apreciable atribuible a la presencia de CBZ o CBZ-EP. El suero presenta una viscosidad considerablemente elevada (de 1.0 a 1.8 centi-poise), por lo que en la inyección (de acuerdo con la *Ecuación 3.1* citada en el desarrollo teórico) ingresa poca cantidad de muestra, disminuyendo la sensibilidad del método. Además, los componentes endógenos del suero pueden interferir no sólo en la detección de la señal del analito, sino también modificando sus propiedades fisicoquímicas.

Por lo tanto, es necesario separar ambos analitos de los componentes del suero y extraerlos en una solución compatible con la metodología de inyección y técnica de análisis.

Para ello, se evaluaron distintas estrategias de extracción para CBZ y CBZ-EP:

- precipitación de las proteínas e inyección del sobrenadante.
- precipitación de las proteínas y extracción en fase sólida.
- extracción líquido-líquido; con y sin precipitación proteica.

#### 3.3.2.1 Precipitación de las proteínas e inyección del sobrenadante

Los trabajos encontrados en la literatura científica proponen realizar una precipitación proteica del suero con ACN y utilizar como técnica de análisis CLAR o CG (Khoschorur y col., 2001; Bhatti y col., 1998; Queiroz y col., 2002-a; Hallbalch y col., 1997).

En la presente tesis se evaluaron distintos agentes precipitantes como ACN, MeOH y ácido TCA. Para ello, se adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de suero y una determinada cantidad de solución de trabajo de CBZ para obtener una concentración final de  $5.00 \text{ mg L}^{-1}$  a 3 tubos de centrifuga distintos y posteriormente se agitó con vortex. A continuación, a cada tubo se le

adicionó una determinada cantidad de agente precipitante (ver Tabla 3.2) y, por inspección visual, se evaluó la cantidad de proteína precipitada y el grado de turbidez del sobrenadante. Para todos los ensayos, la cantidad de proteína precipitada y la turbidez del sobrenadante fueron comparables.

La cantidad necesaria de ACN y de MeOH para precipitar la misma cantidad de proteínas en un mismo volumen de muestra, corresponde al doble del volumen requerido cuando se utiliza TCA, por lo que la eficacia de este último es mayor, resultando en una dilución mínima. Cuando se dispone de muestras biológicas, donde la cantidad disponible es limitada y la concentración de analito baja, generalmente, el efecto de la dilución es sumamente importante, ya que disminuye la concentración de los analitos, dificultando su detección por EC.

Para calcular la cantidad extraída de analito por cada agente precipitante y para evaluar la propiedad residual del sobrenadante, se inyectaron en el equipo de EC los tres sobrenadantes. También se inyectó un estándar de CBZ disuelto en SRC para realizar la comparación de áreas e inferir acerca de la cantidad de CBZ recuperada.

**Tabla 3.2:** Secuencia para la extracción de CBZ por precipitación proteica.

Tubo	Suero ( $\mu\text{L}$ ) con $5 \text{ mg L}^{-1}$ de CBZ	Agente precipitante	dilución	eficacia	Análisis electroforético
1	500	<b>A)</b> ACN (500 $\mu\text{L}$ )	intermedia	regular	CBZ co-migra con ACN
2	500	<b>B)</b> MeOH (500 $\mu\text{L}$ )	intermedia	regular	CBZ co-migra con MeOH
3	500	<b>C)</b> TCA (250 $\mu\text{L}$ )	mínima	muy buena	ensanchamiento de banda

En el electroferograma obtenido para la inyección del sobrenadante **A** y **B** se observó que MeOH y ACN (utilizados usualmente como marcadores del FEO) presentan el mismo tiempo de migración que CBZ, ocasionando problemas en la lectura de las áreas.

Por otro lado, los aditivos salinos o ácidos como el TCA otorgan una elevada conductividad a la matriz. Esto no resulta favorable ya que, cuando se aplica el voltaje de separación, los analitos disminuyen su movilidad a causa del campo eléctrico bajo, originando el ensanchamiento de banda. Sumado a esto, cuando se aplica voltaje, la corriente generada dentro del capilar es lo suficientemente elevada como para ocasionar la deformación de los picos.

De esta manera, se concluye que no se puede inyectar el sobrenadante **C** debido a que ocasiona inconvenientes que repercuten en la forma del pico.

### 3.3.2.2 Precipitación de las proteínas y extracción en fase sólida

Los trabajos encontrados en la literatura científica proponen realizar la extracción de CBZ con cartuchos de carbono-18 o carbono-8 (Franceschi y Furlanut, 2005; Bugamelli y col., 2002; Mandrioli y col., 2001; Bhatti y col., 1998; Pucci y col., 2003; Ivanova y col., 2003; Raggi y col., 2002).

Para evaluar la extracción de CBZ en fase sólida se realizaron pruebas con cartuchos Oasis HLB (cuyo sorbente está compuesto por partículas hidrofílicas y lipofílicas) y cartuchos de Sep-pak de C-18. Luego del acondicionamiento de cada cartucho, se transfirieron los sobrenadantes **A**, **B** y **C**, y se realizaron extracciones con 100  $\mu$ L de MeOH. A estos extractos se les agregó 400  $\mu$ L de SRC y se realizaron las corridas electroforéticas correspondientes (Tabla 3.3).

**Tabla 3.3:** Resultados de la combinación entre precipitación proteica y extracción en fase sólida.

Sobrenadante de la precipitación proteica	Extracción en fase sólida	Análisis electroforético
<b>A)</b> ACN	no retiene al analito	no se visualiza señal
<b>B)</b> MeOH	no retiene al analito	no se visualiza señal
<b>C)</b> TCA	retención del analito	Co-migración de CBZ y MeOH

### 3.3.2.3 Extracción líquido-líquido

#### 3.3.2.3.1 Con precipitación proteica

Los trabajos encontrados en la literatura científica proponen realizar una precipitación proteica bajo condiciones alcalinas con ACN y extracción con acetato de etilo, utilizando como técnica de análisis CMEC (Kuldvee y Thormann, 2001; Thormann y col., 2001) o CLAR-MS-ESI (Van Rooyen y col., 2002).

Para este sistema se propuso realizar una extracción con diclorometano, luego de cada precipitación proteica anterior.

Como se concluyó anteriormente, utilizando ACN y MeOH, como agentes precipitantes, la precipitación proteica es muy eficiente, pero ambos solventes son miscibles con diclorometano imposibilitando su posterior extracción. En cambio, el sobrenadante **C**, obtenido mediante la precipitación con TCA, es inmiscible con diclorometano posibilitando realizar la extracción de CBZ.

A continuación, el sobrenadante **C** se colocó en un tubo de centrifuga y se le adicionó 3 porciones de 1.0 mL cada una de diclorometano. Luego se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos para favorecer la separación de fases. La fase orgánica se evaporó a 45 °C en una manta calefactora y el residuo se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de SRC. El área obtenida se comparó con la de un estándar conteniendo 5.00  $\text{mg L}^{-1}$  de CBZ en SRC verificándose una extracción satisfactoria.

#### 3.3.2.3.2 Sin precipitación proteica

Los trabajos encontrados en la literatura científica proponen realizar una extracción directa del suero con éter etílico, utilizando como técnica de análisis CLAR (Matar y col., 1998). Otros autores utilizan acetato de etilo o pentano para la extracción de CBZ y como técnica de análisis emplean la EC (Makino y col., 1997; Meier y Thormann, 1991).

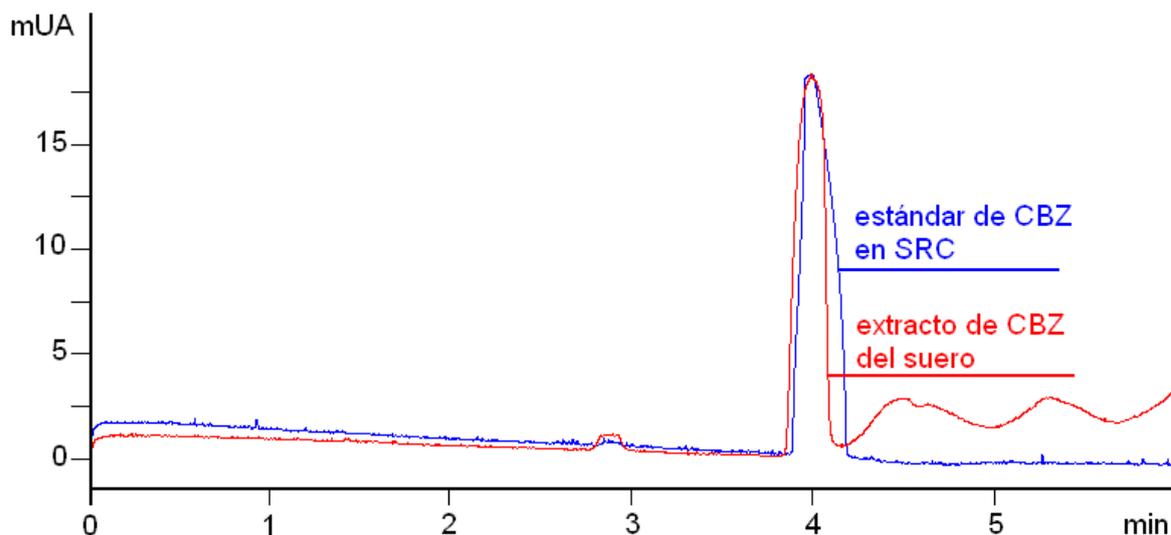
Todos los solventes utilizados en los trabajos citados son inmiscibles con soluciones acuosas, por lo que pueden utilizarse para la extracción de CBZ de una muestra de suero sin precipitar. A pesar de esto, se continuó trabajando con diclorometano debido a que, en las experiencias anteriores, se verificó la correcta extracción de CBZ.

#### 3.3.2.4 Procedimiento de extracción final para CBZ y CBZ-EP

En dos tubos de centrifuga de polipropileno se colocaron 500  $\mu\text{L}$  de suero y a cada tubo se le adicionó una cantidad adecuada de solución de trabajo de CBZ y CBZ-EP para alcanzar una concentración final de 5.00  $\text{mg L}^{-1}$ . Luego, se adicionaron 3 porciones de 1.0 mL cada una de diclorometano, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos, para favorecer la separación de fases. Posteriormente, las fases orgánicas se transfirieron a dos tubos limpios y se evaporaron a sequedad en una manta calefactora a 45 °C. Finalmente, el residuo se reconstituyó con 500  $\mu\text{L}$  de SRC. Antes de su inyección en el capilar, la muestra se filtró a través de un filtro jeringa de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

Las áreas obtenidas para ambos extractos se compararon con la de los estándares correspondientes disueltos en SRC, conteniendo 5.00  $\text{mg L}^{-1}$  de CBZ y CBZ-EP. Este análisis dio como resultado una buena recuperación para ambos analitos. La Figura 3.2 muestra el electroferograma obtenido para la extracción de CBZ de la muestra de suero y su comparación con la de un estándar de la misma concentración.

**Figura 3.2:** Electroferograma correspondiente a la extracción de una muestra de suero conteniendo  $5.00 \text{ mg L}^{-1}$  de CBZ (línea roja) superpuesto con el extracto de un estándar de la misma concentración (línea azul) bajo las condiciones experimentales óptimas:  $0.025 \text{ mol L}^{-1}$  de borato de sodio a pH 9.20, con un voltaje aplicado de 20 kV y una temperatura de  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 10 s y una longitud de onda de 214 nm.



La operación completa del procesamiento de la muestra requiere aproximadamente 20 minutos, un tiempo considerablemente menor que el tiempo requerido por otros procesos de extracción citados en la literatura (Franceschi y Furlanut, 2005; Batí y col., 1998; Mandrioli y col., 2001; Bugamelli y col., 2002; Härtter y col., 1998; Kataoka y Makino, 1998; Raggi y col., 2002; Lancas y col., 2003; Kuldvee y Thormann, 2001).

El método de extracción propuesto es simple y fácil de aplicar, es económico, se obtiene buena recuperación de CBZ y CBZ-EP y no consume cantidades considerables de solventes orgánicos.

### 3.3.3 Calibración univariada y cifras de mérito

#### 3.3.3.1 Construcción de las curvas de calibración

Para verificar la linealidad del método en el rango de concentración de aproximadamente  $1.00$  a  $15.00 \text{ mg L}^{-1}$  de CBZ y de CBZ-EP se prepararon tres replicados de soluciones de calibrado a 7 niveles de concentración (un total de veintiuna muestras estándares para cada analito). Las soluciones de calibrado se prepararon por dilución de cantidades conocidas de soluciones madres de CBZ y CBZ-EP en SRC. Este rango incluye la concentración terapéutica sérica promedio de CBZ reportada en la literatura (de  $4.0$  a  $12.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Smith y Reynard, 1993). Los niveles de concentración se indican en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4:** Concentraciones de las soluciones de calibración, expresadas en mg L<sup>-1</sup> de CBZ y CBZ-EP, utilizadas para la evaluación de linealidad en calibración univariada.

Solución de calibración	Concentración de CBZ (mg L <sup>-1</sup> )	Concentración de CBZ-EP (mg L <sup>-1</sup> )
1	0.99	1.00
2	2.48	2.50
3	4.96	4.99
4	7.50	7.60
5	9.93	9.98
6	12.51	12.50
7	14.89	14.97

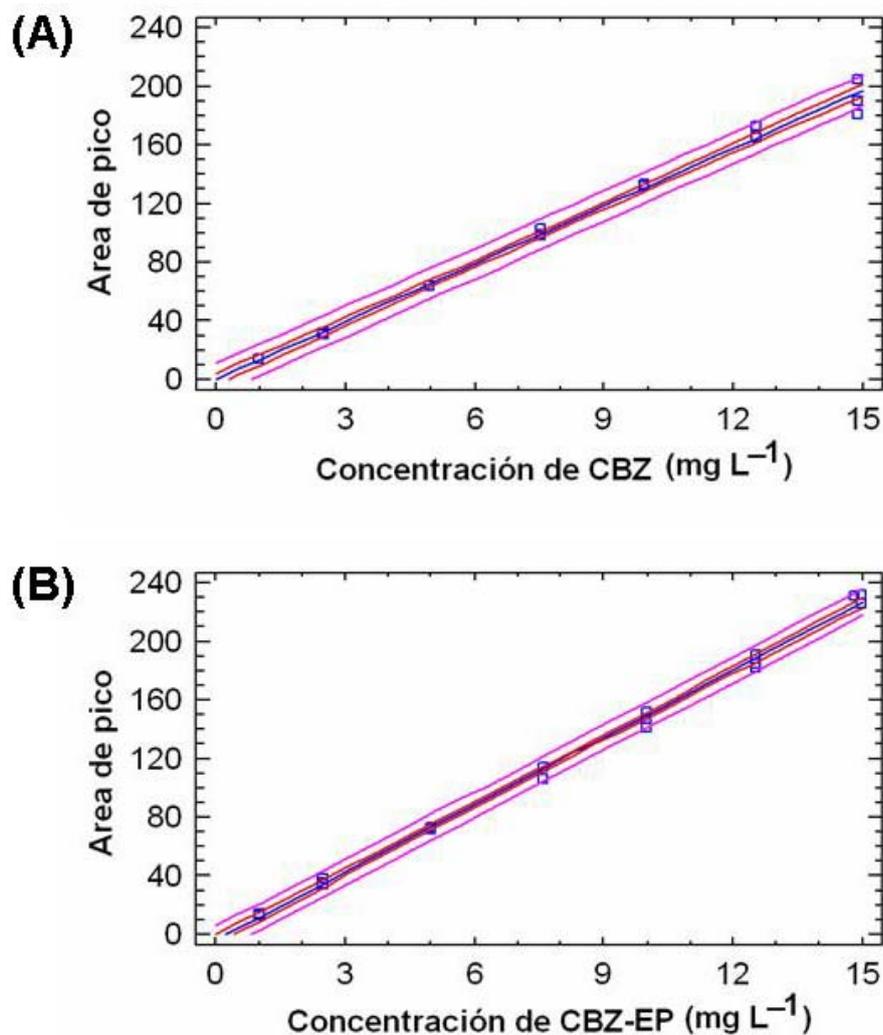
#### 3.3.3.1.1 Medición de la respuesta de las soluciones de calibración

Cada una de las soluciones de calibración se inyectó en el sistema electroforético bajo las condiciones experimentales óptimas: 0.025 mol L<sup>-1</sup> de borato de sodio a pH 9.20, con un voltaje aplicado de 20 kV y una temperatura de 25 °C, inyección hidrodinámica a 50 mbar durante 10 s. Con los datos obtenidos se construyeron las gráficas de calibración colocando en el eje de las ordenadas el área de pico (respuesta registrada a 214 nm) y en el eje de las abscisas la concentración (mg L<sup>-1</sup>) de CBZ y de CBZ-EP.

#### 3.3.3.1.2 Estimación de los parámetros de regresión

Se aplicó regresión lineal sobre los puntos individuales sin promediar utilizando el método de los cuadrados mínimos ordinarios (Figura 3.3 A y B). La ecuación de la recta de ajuste fue:  $y = a + b * x$ , donde  $y$  es la respuesta correspondiente al área de pico de CBZ y de CBZ-EP,  $a$  es la ordenada al origen,  $b$  la pendiente y  $x$  la concentración de analito expresada en mg L<sup>-1</sup>.

**Figura 3.3:** Gráficas de calibración obtenida para el análisis de linealidad entre: (A) concentración de CBZ en  $\text{mg L}^{-1}$  y el área de pico y (B) concentración de CBZ-EP en  $\text{mg L}^{-1}$  y el área de pico.



En las Figuras 3.3 A y 3.3 B, la línea azul corresponde a la recta de ajuste de los datos experimentales, la línea roja a los límites de confianza (extremos del intervalo de confianza) y la línea rosada a los límites de predicción.

Se realizó un test ANOVA para verificar la linealidad del método en el rango estudiado. Los valores del límite de detección (LOD) y el límite de cuantificación (LOQ) se calcularon de acuerdo a las recomendaciones IUPAC (Danzer y Currie, 1998). Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5:** Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico.

Parámetros	CBZ	CBZ-EP
$R^2$	0.9946	0.9972
$a$	0 (2)	-3 (2)
$b$	13.1 (0.2)	15.3 (0.2)
Valor de probabilidad del modelo <sup>a</sup>	0.0000	0.0000
Valor de probabilidad de falta de ajuste <sup>a</sup>	0.522	0.176
LOD (mg L <sup>-1</sup> )	0.94	0.67
LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	2.84	2.04

<sup>a</sup> se considera significativo cuando es menor a 0.05

Los valores de ordenada al origen y pendiente se presentaron con su correspondiente incertidumbre entre paréntesis.

### 3.3.3.1.3 Análisis de regresión para CBZ y CBZ-EP

Dado que los valores de  $p$  (probabilidad) del análisis de varianza (ANOVA) del modelo son inferiores a 0.05, existe relación estadísticamente significativa entre el área de pico y la concentración de CBZ y CBZ-EP.

Los estadísticos  $R^2$  (0.9946 para CBZ y 0.9972 para CBZ-EP) indican que el modelo lineal elegido explica más de un 99 % de la variabilidad del área de pico de CBZ y de CBZ-EP.

El test de falta de ajuste relaciona la variancia de falta de ajuste con la variancia del error puro. Dado que los valores de probabilidad para la falta de ajuste son mayores a 0.05 (0.522 para CBZ y 0.176 para CBZ-EP), el modelo lineal seleccionado es adecuado para los datos observados, comprobándose la linealidad del método en el rango analizado.

Los valores de LOD (0.94 mg L<sup>-1</sup> para CBZ y 0.67 mg L<sup>-1</sup> para CBZ-EP) y de LOQ (2.84 mg L<sup>-1</sup> para CBZ y 2.04 mg L<sup>-1</sup> para CBZ-EP) obtenidos, son los suficientemente bajos como para determinar y cuantificar concentraciones terapéuticas de CBZ y CBZ-EP en suero de pacientes tratados con dosis entre 200 a 1200 mg de CBZ. Esta dosis origina una concentración plasmática promedio de CBZ en el rango de 4.0 a 12.0 mg L<sup>-1</sup> y de CBZ-EP en el rango de 1.0 a 3.0 mg L<sup>-1</sup> (el 25 % de la concentración de CBZ).

### 3.3.3.2 Estimación de la recuperación de CBZ y CBZ-EP del suero

La exactitud del método se evaluó mediante ensayos de recuperación. A ocho tubos de centrífuga se les adicionaron 500  $\mu\text{L}$  de suero de pacientes sanos. A cuatro de ellos se les agregaron cantidades conocidas de solución estándar de CBZ y a los cuatro restantes cantidades conocidas de solución estándar de CBZ-EP, en ambos casos para obtener las siguientes concentraciones: 2.00, 4.00, 6.00 y 8.00  $\text{mg L}^{-1}$  de cada analito. A dichas mezclas se les realizó el proceso de extracción y se las analizó en el sistema electroforético.

La cantidad recuperada de CBZ y de CBZ-EP se calculó por interpolación del área obtenida para cada nivel de concentración con la curva de calibrado realizada y comparación con la cantidad teórica adicionada de CBZ y de CBZ-EP según corresponda (Tablas 3.6 y 3.7).

**Tabla 3.6:** Cantidades recuperadas de CBZ adicionada a suero humano.

Muestra	Cantidad de CBZ adicionada al blanco de suero ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Cantidad recuperada de CBZ ( $\text{mg L}^{-1}$ )
1	2.00	1.97 (98.7 %)
2	4.00	4.13 (103.2 %)
3	6.00	5.95 (99.2 %)
4	8.00	8.12 (101.5 %)
Recuperación promedio (%)	–	<b>100.6</b>
CV (%)		<b>2.09</b>

**Tabla 3.7:** Cantidades recuperadas de CBZ-EP adicionada a suero humano.

Muestra	Cantidad de CBZ-EP adicionada al blanco de suero ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Cantidad recuperada de CBZ-EP ( $\text{mg L}^{-1}$ )
1	2.00	1.92 (95.9 %)
2	4.00	3.90 (97.5 %)
3	6.00	6.04 (100.7 %)
4	8.00	7.85 (98.1 %)
Recuperación promedio (%)	–	<b>98.1</b>
CV (%)		<b>2.04</b>

La cantidad recuperada promedio del 100.6 % para CBZ y del 98.1 % para CBZ-EP, con bajos coeficientes de variación (2 % para ambos casos) indican una recuperación satisfactoria para los cuatro niveles de concentración. Estos resultados están de acuerdo con los requerimientos para los ensayos bioanalíticos especificados por la FDA (Guidance for industry-Bioanalytical method validation, 2001).

### 3.3.3.4 Estudio de interferencias

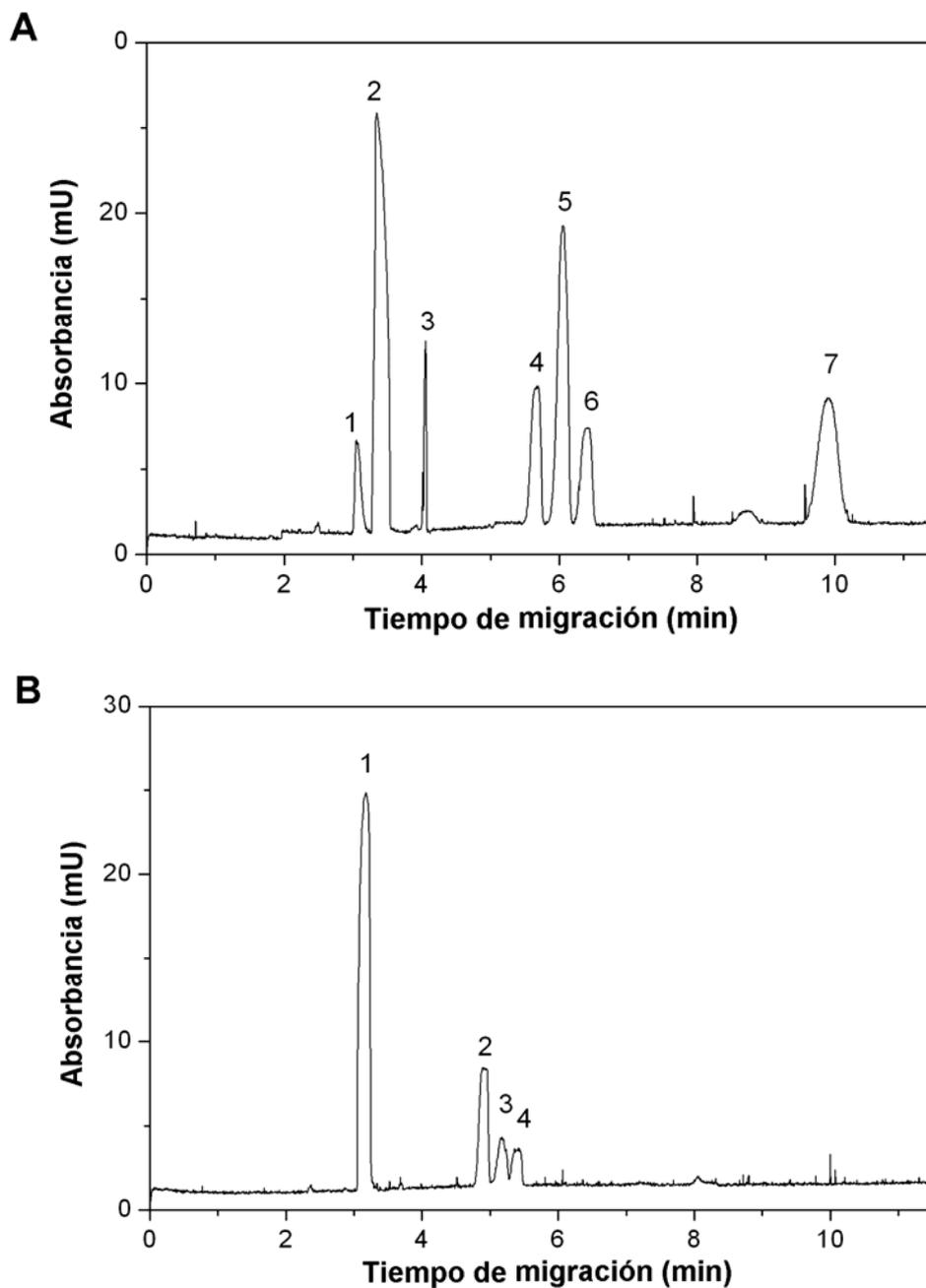
Para realizar un estudio de las interferencias que podrían encontrarse en el suero de pacientes tratados con CBZ, se prepararon dos muestras conteniendo idénticos analitos en el mismo nivel de concentración. Una de ellas consistió en 500  $\mu\text{L}$  de SRC fortificado no sólo con CBZ y su metabolito principal CBZ-EP (5.00  $\text{mg L}^{-1}$ , cada uno), sino también otras drogas antiepilépticas, como PHT, PHB y LAMO (10.00  $\text{mg L}^{-1}$ , cada uno). La elección de estas drogas se basa en que pueden ser co-administradas con CBZ (en terapias múltiples). Asimismo, la muestra se fortificó con una amplia variedad de otros fármacos usados comúnmente, con o sin prescripción médica, como PAR, TEO, IBU CAF y AAS (10.00  $\text{mg L}^{-1}$ , cada uno) y FEN (20.00  $\text{mg L}^{-1}$ ). A esta muestra se le realizó el proceso de extracción correspondiente obteniendo un extracto disuelto en SRC. La otra muestra (solución estándar) contenía los mismos analitos anteriormente señalados, adicionados a una matriz acuosa de SRC, a la que no se le realizó el proceso de extracción.

La Figura 3.4 A muestra un electroferograma completo de la solución estándar disuelta en SRC. Como puede observarse, para algunos analitos, la separación electroforética no es completa, observándose una superposición entre CBZ, CBZ-EP, CAF y LAMO (pico número 2) y entre TEO e IBU (pico número 5).

Además, el proceso de extracción aplicado a las muestras recupera tres de los cuatro analitos incluidos en el pico 2 (CBZ, CBZ-EP y LAMO), imposibilitando el análisis por calibración univariada (Figura 3.4 B)

Resulta interesante hacer notar que, a pesar de que otros analitos también se extrajeron (PHT, IBU, TEO y PHB), su presencia no representa una potencial interferencia debido a su completa separación del analito en estudio.

**Figura 3.4:** A) Electroferograma (recogido a 214 nm) de una solución estándar disuelta en SRC conteniendo los siguientes analitos en el siguiente orden de migración: 1) FEN; 2) CBZ, CBZ-EP, CAF y LAMO; 3) PAR; 4) PHT; 5) IBU y TEO; 6) PHB y 7) AAS. B) Electroferograma (recogido a 214 nm) de un extracto (disuelto en SRC) de suero humano fortificado con CBZ, CBZ-EP, LAMO, PHT, PHB, FEN, PAR, TEO, IBU, CAF, AAS, donde sólo se observan los analitos extraídos: CBZ, CBZ-EP y LAMO (pico 1), PHT (pico 2), IBU y TEO (pico 3) y PHB (pico 4).



### 3.3.4 Aplicación de herramientas quimiométricas

Como se ha visto hasta ahora, cuando se desarrolla un método analítico por EC, es necesario optimizar las condiciones experimentales para garantizar la separación completa de todos los componentes presentes en la muestra (Hanrahan y col., 2008). A pesar de todos los esfuerzos realizados para separar CBZ de su metabolito principal CBZ-EP mediante alternativas económicas, confiables y rápidas, no se obtuvieron resultados satisfactorios.

Sin embargo, el uso de herramientas quimiométricas es una alternativa útil para la cuantificación exacta de analitos que presentan solapamiento parcial o total (Sentellas y Saurina, 2003), siempre que se cuente con la posibilidad de registrar datos de segundo orden. En este contexto, se encuentran en la literatura un pequeño número de aplicaciones en las que se resolvieron picos parcialmente solapados a través de MCR-ALS (Sentellas y col., 2001, Li y col., 2003, Zhang y Li 2006, Li y col., 2006), aunque también se aplicaron de manera satisfactoria metodologías tales como redes neuronales artificiales (Zhang y col., 2006-b) y transformada de *wavelet* (Jiao y col., 2008).

Por lo tanto, en el presente trabajo se postuló la siguiente estrategia, que consiste en utilizar las condiciones electroforéticas más simples para mostrar como la aplicación de quimiometría puede asistir al análisis electroforético, aún bajo condiciones donde la resolución entre los analitos y algunos componentes de la muestra no sólo es incompleta sino que el solapamiento es total.

Para ello, primeramente se realizó una corrección de la línea de base y de los tiempos de migración y luego se estudió la resolución entre los picos electroforéticos totalmente solapados mediante el procesamiento de datos de segundo orden (EC-DAD) por el algoritmo MCR-ALS.

El procesamiento de estos datos con algoritmos adecuados puede conducir al aprovechamiento de una propiedad intrínseca, la ventaja de segundo orden, que permite cuantificar al analito en presencia de componentes no esperados, por ejemplo compuestos no incluidos en el juego de calibración. Esta propiedad permite entrenar un modelo de calibración con un número limitado de soluciones estándares y luego cuantificar al analito en presencia de potenciales interferencias (Escandar y col., 2007).

#### 3.3.4.1 Diseño de los juegos de calibración y validación

Se prepararon varias muestras de validación conteniendo mezclas de CBZ y CBZ-EP a niveles de concentración diferentes a los empleados para calibración univariada, mediante dilución de las soluciones estándares madres en SCR (muestras B1-B5, ver Tabla 3.8).

**Tabla 3.8:** Composición de las muestras de validación.

Muestra <sup>a</sup>	CBZ (mg L <sup>-1</sup> )	CBZ-EP (mg L <sup>-1</sup> )	LAMO (mg L <sup>-1</sup> )
B1	2.50	2.50	–
B2	2.98	5.99	–
B3	3.97	7.99	–
B4	6.99	2.00	–
B5	7.50	7.38	–
SA1	3.02	5.99	–
SA2	3.02	7.03	–
SA3	3.97	2.00	–
SA4	3.97	7.99	–
SA5	6.03	5.99	–
SB1	2.00	8.00	–
SB2	3.00	5.00	–
SB3	4.00	6.00	–
SB4	6.00	4.00	–
SB5	8.00	2.00	–
SC1	4.96	4.99	5.66
SC2	4.96	4.99	7.55
SC3	4.96	4.99	9.44
SC4	4.96	4.99	11.33
SC5	4.96	4.99	13.21

<sup>a</sup> La primera letra mayúscula corresponde al tipo de matriz en la que se preparó cada muestra: B=SRC y S=suero. La segunda letra mayúscula identifica otros componentes presentes en cada muestra: A=CBZ-EP; B=CBZ-EP y componentes no esperados del suero; C=CBZ-EP y LAMO.

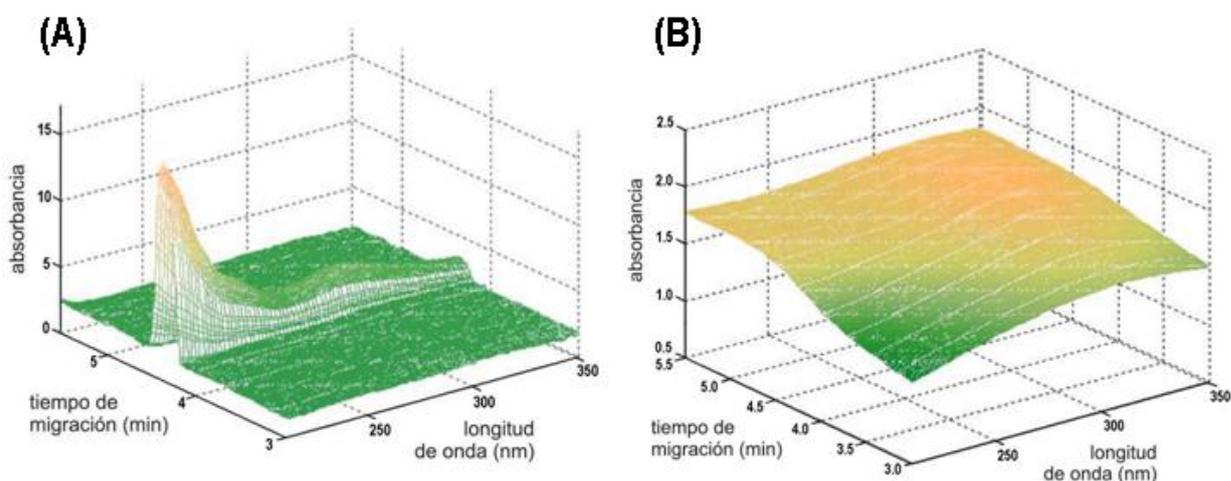
Además, se prepararon quince muestras de validación compuestas por sueros blanco, obtenidos de pacientes sanos, que no estaban bajo tratamiento con antiepilépticos, fortificados con cantidades conocidas de solución estándar de CBZ y CBZ-EP: SA1-SA5, SB1-SB5 y SC1-SC5 (ver Tabla 3.8). Las cinco últimas, además, se fortificaron con concentraciones conocidas de LAMO. Las mezclas resultantes se sometieron al procedimiento de extracción. Varias muestras de suero que contenían la misma concentración de CBZ se emplearon para evaluar precisión (muestras SC1-SC5).

### 3.3.4.2 Corrección de la línea de base y de los tiempos de migración

Con el objetivo de simplificar la complejidad de los datos a analizar, se procedió a la eliminación de la línea de base y a la corrección del corrimiento de los tiempos de migración en los datos de segundo orden electroforéticos-espectrales. Ambos procedimientos de preprocesamiento se implementaron a través de algoritmos previamente adaptados por sus autores a datos multivariados (Eilers y col 2006, Fraga y col 2001).

Para obtener la matriz de corrección del ruido de fondo (*background*) **F** se usaron diez funciones de base *spline* con un sólo parámetro de regularización cuyo valor fue 1. La Figura 3.5 A muestra la superficie correspondiente a una muestra de suero (SC1 en la Tabla 3.8) fortificada con CBZ, CBZ-EP y LAMO. Como se puede ver en esta figura, hay un sólo pico en el dominio temporal, indicando el solapamiento completo de las tres sustancias. La Figura 3.5 B muestra la correspondiente matriz *background* (**F**). Se usó una escala diferente con el propósito de mostrar la variación de la línea de base a diferentes longitudes de onda.

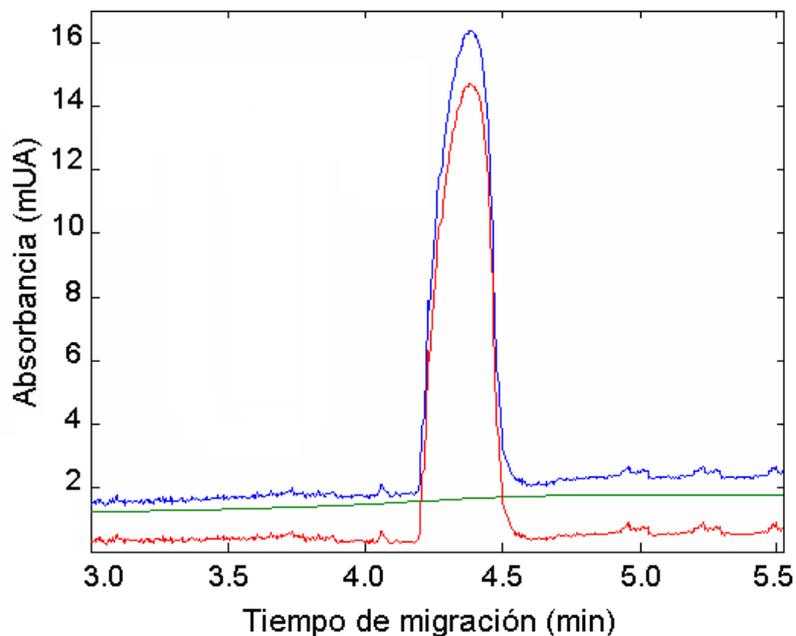
**Figura 3.5:** A) Superficie correspondiente a una muestra de suero (SC1) fortificada con CBZ (4.96 mg L<sup>-1</sup>), CBZ-EP (4.99 mg L<sup>-1</sup>) y LAMO (5.66 mg L<sup>-1</sup>). B) Matriz *background* correspondiente a la superficie de la Figura 3.5 A.



Como se puede observar, la línea de base electroforética se incrementa con las longitudes de onda, hasta que se alcanza un máximo a 300 nm aproximadamente, hecho que justifica el uso de un algoritmo de corrección de la línea de base en ambas dimensiones simultáneamente. La sustracción de esta matriz permite obtener una matriz de datos corregida, que a continuación se somete a la corrección del corrimiento temporal.

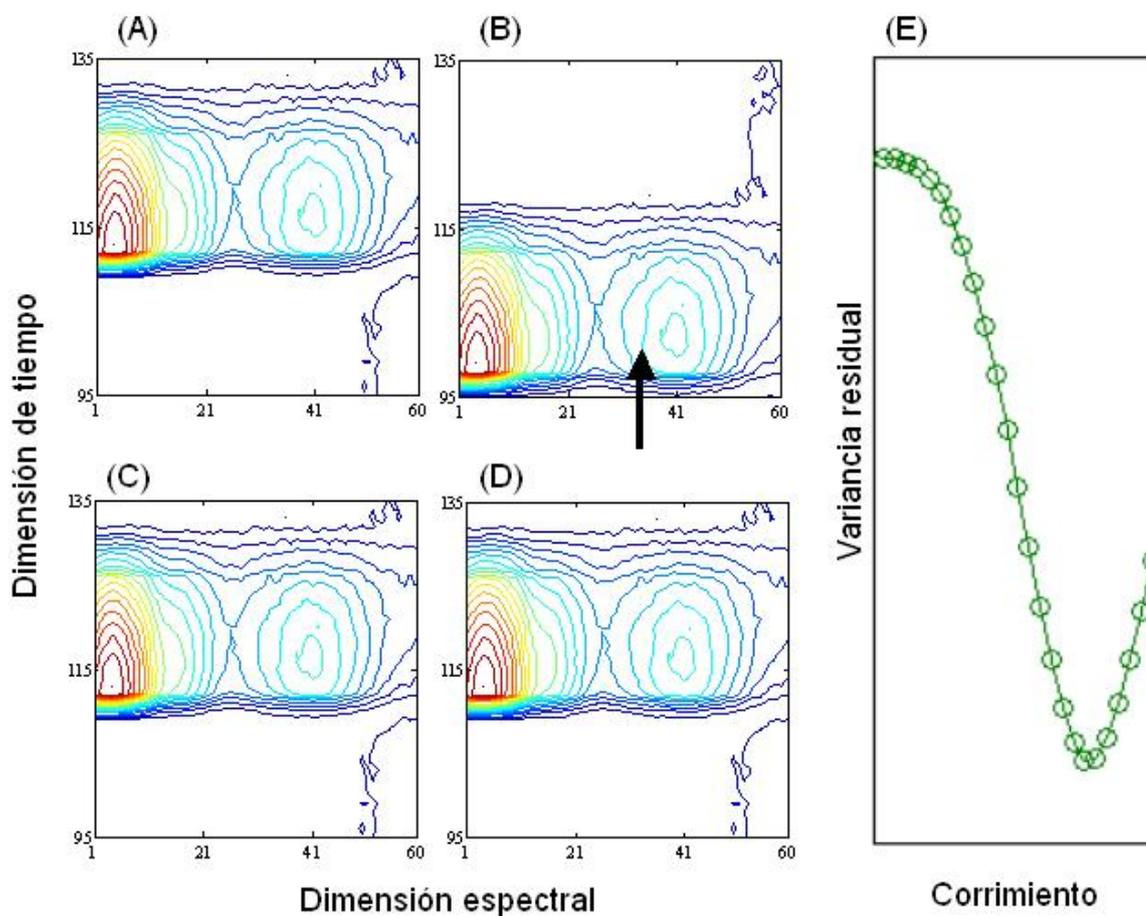
Finalmente, la Figura 3.6 muestra el electroferograma original graficado a 250 nm y el correspondiente electroferograma con la línea de base y el corrimiento corregidos.

**Figura 3.6:** Electroferograma correspondiente a una muestra de suero (SC1–línea azul:); su correspondiente *background* (línea verde) y el electroferograma final corregido (línea roja) todos registrados a 250 nm.



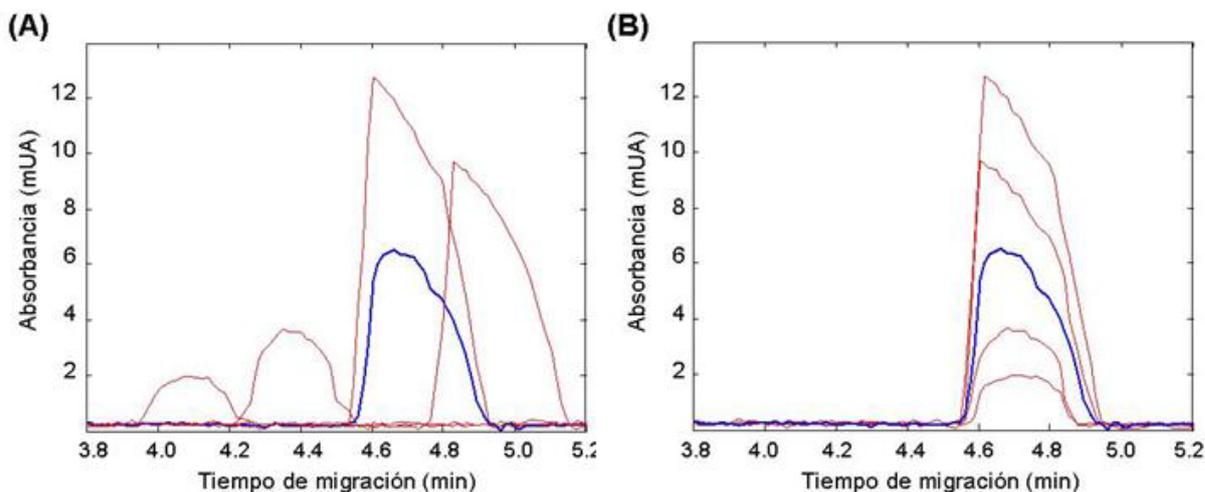
La corrección de una matriz **M** (visualizada como gráfica de contorno Figura 3.7 B), tomando una matriz **N** como referencia (Figura 3.7 A), consiste en realizar la descomposición en valores singulares de la matriz de datos conjunta **N/M**. El número de componentes necesarios fue de 2 ó 3, dependiendo de la matriz analizada. Además, la ventana se varió con el objetivo de optimizar la aplicación. Finalmente la Figura 3.7 C y 3.7 D corresponden a las matrices **M** y **N** alineadas, donde se obtiene el mínimo de variancia residual. A modo de ejemplo, la Figura 3.7 E muestra la variación del RES (%) cuando la matriz estudiada se cambia con respecto a la matriz de referencia. Como puede apreciarse en las Figuras 3.7 A y B, fue necesario un desplazamiento de aproximadamente 20 puntos para obtener el mínimo registrado en la Figura 3.7 E.

**Figura 3.7:** Gráficas de contorno de las matrices **M** y **N**; A y B) antes del ser alineadas, C y D) Luego de ser alineadas; E) Cambio de la variancia residual (RES%) cuando la matriz estudiada se modifica con respecto a la matriz de referencia.



La necesidad de la corrección temporal se puede apreciar en la Figura 3.8 A, en donde se graficaron los electroferogramas de cinco estándares de CBZ, registrados a 250 nm. El corrimiento de los tiempos de migración es evidente y, aunque MCR es capaz de hacer frente a datos no sincronizados, análisis posteriores mostraron que la corrección mejora los resultados. La Figura 3.8 B, muestra los electroferogramas para los cinco picos alineados con respecto al de referencia (línea azul). Resulta interesante ver que aunque los picos parecen aproximadamente alineados, la pérdida de trilinealidad es evidente, debido a que las formas de las bandas individuales son todas diferentes, haciendo necesaria la aplicación del algoritmo MCR para la resolución.

**Figura 3.8:** A) Electroferograma registrado a 250 nm para cinco estándares de CBZ, B) Electroferogramas con corrimientos corregidos registrados a 250 nm. En azul se representa el electroferograma usado como referencia para corregir los restantes.



### 3.3.4.3 Análisis multivariado

Debido a que los perfiles temporales de los analitos presentes en las muestras son prácticamente idénticos (tiempos de migración), el análisis mediante MCR-ALS se realizó construyendo matrices **D** aumentadas en el único modo posible, es decir, el modo temporal.

Cada una de las muestras de validación se analizó como se explica a continuación. La matriz espectral-temporal para una dada muestra se aumentó en el modo temporal con las 21 matrices registradas para las muestras de calibración (que sólo contenían CBZ). Una matriz adicional de un estándar de CBZ-EP se añadió en todos los casos a la matriz aumentada. Finalmente, en el caso de las muestras de suero SC, se agregó una matriz de un estándar de LAMO. Las matrices de CBZ-EP y LAMO se agregaron con el propósito de brindar a MCR suficiente información para la resolución de los componentes presentes en las muestras.

La Tabla 3.9 muestra los resultados del análisis de las muestras de validación para CBZ. La aplicación de SVD (Descomposición en Valores Singulares) permitió establecer la presencia de dos componentes para los sets B y SA, uno para CBZ y el otro para CBZ-EP, mientras que se necesitó un componente adicional para los sets SB y SC, correspondiente a un componente no esperado del suero y a LAMO, respectivamente. Para los sets de muestras B, SA y SC, que contienen CBZ y CBZ-EP (y también LAMO en el último caso), las estimaciones iniciales se construyeron a partir de los espectros de los estándares puros de cada analito. Aquellas para el set SB también incluyeron el perfil de un componente no esperado obtenido a través de la aplicación de SIMPLISMA (Windig y Guilment 1991) a una muestra SB. Las restricciones impuestas durante el procedimiento ALS fueron no

negatividad en concentración y espectros, unimodalidad en los perfiles de concentración y correspondencia entre especies.

**Tabla 3.9:** Concentraciones de las muestras de validación y resultados de la predicción mediante MCR-ALS.

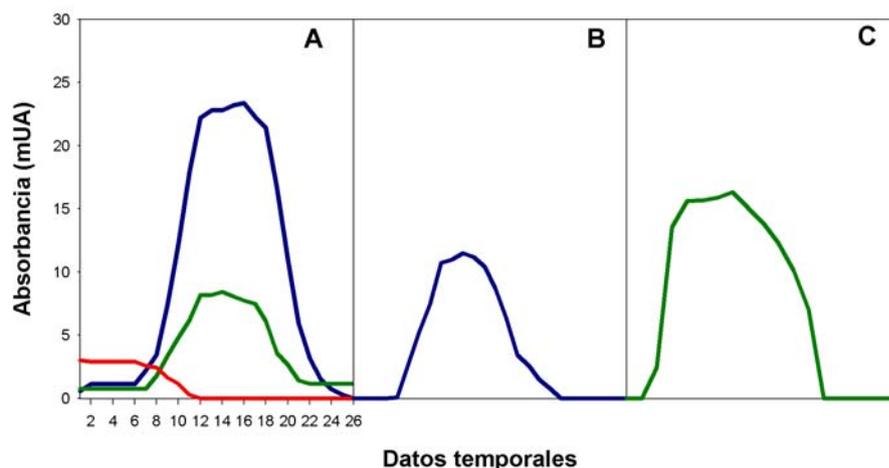
Muestra <sup>a</sup>	Concentración de CBZ (mg L <sup>-1</sup> )		Recuperación (%)
	Nominal	Predicha	
B1	2.50	2.42	96.8
B2	2.98	2.81	94.3
B3	3.97	4.47	112.6
B4	6.99	7.07	101.1
B5	7.50	8.13	108.4
SA1	3.02	2.30	76.2
SA2	3.02	2.91	96.4
SA3	3.97	3.58	90.2
SA4	3.97	4.23	106.5
SA5	6.03	3.86	64.0
SB1	2.00	1.92	95.8
SB2	3.00	2.44	81.4
SB3	4.00	4.42	110.4
SB4	6.00	5.52	92.0
SB5	8.00	9.15	114.4
SC1	4.96	4.71	95.0
SC2	4.96	4.98	100.4
SC3	4.96	4.64	93.5
SC4	4.96	4.53	91.3
SC5	4.96	4.53	91.3

<sup>a</sup> La primera letra mayúscula corresponde al tipo de matriz en la que se preparó cada muestra: B, SCR; S, suero. La segunda letra mayúscula identifica otros componentes presentes en cada muestra: A, CBZ-EP; B, CBZ-EP y componentes no esperados del suero; C, CBZ-EP y LAMO.

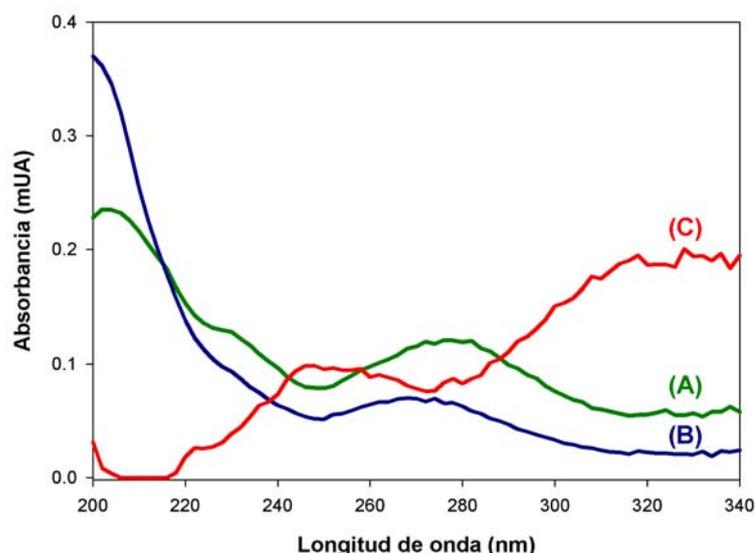
Las Figuras 3.9 A-C y 3.10 muestran los perfiles temporales y espectrales correspondientes a los tres componentes encontrados mediante el análisis por MCR-ALS para una muestra SB. Es evidente que el solapamiento en ambas dimensiones es severo, sin embargo MCR-ALS es capaz de descomponer correctamente los datos en sus

contribuciones relevantes. Esto permite aislar la señal atribuible al analito en cada muestra de validación y su cuantificación exacta.

**Figura 3.9:** Perfiles temporales obtenidos del procesamiento de una muestra SB mediante MCR-ALS correspondientes a: A) los tres componentes encontrados en la matriz SB; B) estándar de CBZ-EP (5.00 mg L<sup>-1</sup>), y C) estándar de CBZ (5.00 mg L<sup>-1</sup>).



**Figura 3.10:** Perfiles espectrales obtenidos del procesamiento de una muestra SB mediante MCR-ALS correspondientes a: A) estándar de CBZ (5.00 mg L<sup>-1</sup>), B) estándar de CBZ-EP (5.00 mg L<sup>-1</sup>) y C) componente no esperado del suero.



Los resultados de la predicción pueden considerarse altamente aceptables, ya que están incluidos en el rango tolerable sugerido por la ICH (Harmonised Tripartite Guideline 1994). Además, aquellos obtenidos para el set SC, compuesto de cinco muestras que tienen la misma concentración de CBZ, no sólo muestran excelentes recuperaciones sino además una muy buena reproducibilidad debido al bajo coeficiente de correlación alcanzado (CV(%) = 4.0 %).

### 3.4 CONCLUSIONES

- El método de extracción líquido-líquido desarrollado para el acondicionamiento de la muestra y extracción de los analitos permite recuperar satisfactoriamente CBZ y CBZ-EP del suero, transformando su matriz en una forma compatible con el sistema de análisis. Asimismo, posibilita la eliminación eficiente de gran cantidad de compuestos interferentes presentes en la matriz, sin adicionar de nuevas interferencias.
- La utilización de este tipo de extracción posibilita el desarrollo de métodos robustos y reproducibles, a pesar de las variaciones intrínsecas propias de la matriz del suero.
- En el proceso de extracción líquido-líquido, la cantidad de solvente orgánico utilizado para extraer ambos analitos es compatible con los conceptos de la química verde, minimizando los riesgos sobre la salud humana. Asimismo, es un método simple, económico y rápido, que consumió aproximadamente 20 minutos, un tiempo considerablemente menor que el tiempo requerido por otros procesos citados en la literatura.
- Se demostró cómo la aplicación de quimiometría puede asistir al análisis electroforético, aún bajo condiciones donde la resolución entre los analitos CBZ y CBZ-EP y algunos componentes de la muestra no sólo es incompleta sino que el solapamiento es total.
- Se evidenció que MCR-ALS es un algoritmo adecuado para procesar datos de segundo orden con distintos grados de solapamiento en la dimensión espectral o temporal.
- En presencia de solapamiento temporal severo, el aumento en la dimensión temporal permite alcanzar la ventaja de segundo orden, valiéndose de las diferencias espectrales entre el analito y las interferencias, y por lo tanto resolver el sistema de manera satisfactoria.

## ESTRATEGIAS PARA LA PRE-CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE MEDIANTE ELECTROFORESIS CAPILAR

### 4.1 INTRODUCCIÓN

El término antibiótico (ATB) normalmente se reserva para un amplio rango de sustancias químicas, sintéticas, semi-sintéticas o producidas por microorganismos que se utilizan para tratar una infección bacteriana y que, por sus efectos, matan o impiden el crecimiento de ciertas clases de bacterias, pero que normalmente son inofensivas para el huésped.

En términos estrictos, un antibiótico es una sustancia secretada por un microorganismo que mata o inhibe el crecimiento de células bacterianas. Los ATB sólo tienen actividad antibacteriana, es decir, no poseen actividad contra los virus, hongos y parásitos. En este sentido, una denominación más precisa es el de agentes antibacterianos.

#### 4.1.1 Usos y abusos de los antibióticos

De acuerdo con datos recientes, proporcionados por la Organización Mundial de la salud (OMS), se producen unos 28 millones de kilogramos de ATB por año en el mundo, lo que indica que diariamente se aportan al medio unos 7700 kilogramos de ATB. De estas cantidades sorprendentes, la mitad es para uso clínico en humanos y la otra mitad para uso veterinario, agrícola e industrial.

Actualmente, los principales objetivos en las grandes explotaciones de la industria ganadera son conseguir una tasa de natalidad elevada, así como una mayor rapidez en la capacidad de engorde y en el crecimiento de la producción animal. Ante estas situaciones, el uso de los antibióticos tiene dos aplicaciones. En primer lugar, éstos pueden utilizarse con  **fines terapéuticos y/o profilácticos** . En segundo lugar, pueden emplearse como  **promotores de crecimiento**  animal, adicionados al alimento balanceado en dosis sub-terapéuticas durante su período de crecimiento. El objetivo es favorecer el control de la flora

bacteriana, lo que conlleva a un mejor aprovechamiento de los nutrientes y a un aumento considerable de peso (Hernández y col., 2003).

Sin embargo, los antibióticos constituyen uno de los agentes farmacológicos peor usados tanto a nivel médico como veterinario. En muchas ocasiones se administran de manera irracional y en dosis inadecuadas. Actualmente, el uso veterinario de antibióticos, especialmente los empleados como promotores de crecimiento animal, es objeto de duras críticas y presiones legales. La razón se debe a que, al parecer, estos agentes podrían causar resistencia a los medicamentos antimicrobianos en el hombre. Por un lado, los alimentos procedentes de animales tratados terapéuticamente con agentes antimicrobianos pueden contener trazas de éstos. A través de la cadena alimentaria se incorporan al organismo humano, provocando la aparición de microorganismos resistentes. Por otro lado, el consumo prolongado de antibióticos como promotores de crecimiento, aún a concentraciones sub-terapéuticas, fomenta la aparición de cepas de microorganismos resistentes, que por diferentes vías de transmisión, especialmente a través de la cadena alimentaria, pueden llegar al ser humano.

## **4.1.2 Contaminación de la leche con antibióticos**

### **4.1.2.1 Principios farmacológicos**

Los ATB pueden administrarse por vía oral o parenteral (intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa). Desde el punto de vista de la higiene de la leche, la administración ya sea oral, intramuscular o intravenosa tiene menos importancia que la aplicación por vía intramamaria, utilizada frecuentemente para el tratamiento de la mastitis.

Cuando se introduce un ATB en la ubre, éste se distribuye en el tejido mamario por los conductos galactóforos y se transfiere al torrente sanguíneo por un mecanismo fisicoquímico que depende del valor del pKa del preparado, del valor del pH del plasma sanguíneo, del grado de unión a las proteínas plasmáticas y del valor del pH de la leche. También la distribución de cada fármaco depende de la capacidad excretora de cada individuo, de la unión del fármaco a componentes específicos y de la presencia de otros fármacos. En este contexto, la reabsorción del producto es muy variable en relación con preparado y al animal (Ocampo Camberos, <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia>).

De la dosis que se administra a la glándula mamaria, una parte se absorbe por el torrente sanguíneo, otra se inactiva por la leche y por los productos generados durante la infección, y el resto, que es la mayor parte, se excreta por la leche durante los ordeños posteriores. El ordeño frecuente aumenta el efecto de la dilución y por lo tanto, acorta el tiempo de eliminación del ATB.

#### **4.1.2.2 Vías de contaminación de la leche**

La contaminación de la leche con diferentes fármacos como ATB, antisépticos y promotores del crecimiento entre otros, es una secuela frecuente, posterior al tratamiento o prevención de enfermedades, que afecta a los animales de producción. Pero también es cierto que cuando los ATB se utilizan o manejan de manera inadecuada, unas veces por negligencia y otras por desconocimiento, pueden dar origen a una contaminación de la leche considerablemente mayor.

El animal tratado con ATB debe retirarse de la ordeña durante un período de tiempo tal que permita la eliminación completa del fármaco, aunque si esta exclusión es muy estricta, y sin datos específicos, las pérdidas económicas para el productor son significativas. Sería lógico pensar, entonces, que el empleo de cualquier tipo de fármacos debe supervisarse por médicos veterinarios. El objetivo es asegurarse que no queden concentraciones nocivas de estas drogas en leche, carne y otros productos de origen animal, con el fin de que la población reciba un alimento de buena calidad.

También es muy importante considerar que las cualidades nutritivas de la leche y sus derivados, la sitúan entre los alimentos básicos por excelencia. Las consecuencias de permitir la distribución de productos contaminados pueden acarrear serios problemas en la salud pública y en los procesos tecnológicos.

#### **4.1.2.3 Importancia en la salud pública**

Luego de un período de sensibilización, los ATB ocasionan en el consumidor reacciones de tipo alérgicas, alteración de la flora intestinal, estimulación de bacterias antibiótico-resistentes, desarrollo de microorganismos patógenos y reducción de la síntesis de vitaminas. También se demostró el efecto tóxico y cancerígeno de algunos residuos de antibióticos presentes en alimentos.

Quizá el aspecto que más temor causa es la incertidumbre de que aún no se sabe cuáles y qué tan graves efectos tendrán los residuos de tantos fármacos ingeridos de manera crónica.

#### **4.1.2.4 Problemas tecnológicos**

La presencia de ATB en leche dificulta el desarrollo de diversos procesos de fermentación de interés en la industria alimentaria, provocando grandes pérdidas en calidad del producto y, por esta razón, pérdidas económicas.

A causa del efecto de los ATB, las bacterias que se emplean en la fabricación de productos fermentados presentan cambios morfológicos, transformándose en

microorganismos indeseables. Estos nuevos microorganismos reemplazan a los cultivos iniciadores del proceso de fermentación, provocando la inutilización del producto o convirtiéndolo en peligroso para su consumo.

En la producción de quesos y productos fermentados, los ATB demoran la acidificación y coagulación, disminuyen la retención de agua, posibilitan el desarrollo de microorganismos indeseables y alteran las características normales del producto.

Del mismo modo, la presencia de ATB perjudica las pruebas de control de calidad a la que es sometida la leche a nivel de recepción. Por otra parte, los tratamientos térmicos a los que se somete la leche no destruyen totalmente los residuos de antibióticos.

#### 4.1.2.5 Regulaciones sanitarias

En respuesta a este problema, las organizaciones sanitarias (el SENASA en Argentina) establecieron, tanto a nivel nacional como internacional, un **límite máximo residual (LMR)** de fármacos en los alimentos. Este concepto se basa en la máxima cantidad de droga permitida que resulte inocua para el consumo humano. A estas concentraciones habitualmente se las conoce como niveles de tolerancia, en relación con los antecedentes de toxicidad para cada droga en particular.

Todas las sustancias nuevas o existentes que se empleen en animales destinados a la producción de alimentos o leche requieren del establecimiento del LMR. Un producto veterinario conteniendo una nueva droga no se aprobará si antes no cuenta con un estudio que permita determinar ese límite.

En la mayoría de los países industrializados existen diversas reglamentaciones que pretenden lograr un equilibrio entre la pérdida económica para el productor y el nivel de residuos inocuos tolerables por el hombre. En nuestro país, el Código Alimentario Argentino, Capítulo VIII- Artículo 556 - (Res Conj. SP y RS y SAGPA N° 33/2006 y N° 563/2006) referente a alimentos lácteos establece lo siguiente: "Las leches que respondan a lo establecido en los artículos 554 y 555, que hayan sido sometidas o no a filtración simple y/o enfriamiento y/o calentamiento a una temperatura no superior a 40 °C o tratamiento de efecto equivalente, se considerarán **no aptas** para ser consumidas como tal o para ser destinadas a la elaboración de leche y productos lácteos, debiendo ser decomisadas cuando se verifiquen que":

- Hayan sido obtenidas de animales cansados, desnutridos, mal alimentados, clínicamente enfermos, *tratados con medicamentos veterinarios no autorizados o que pasen a la leche*, o manipulados por personas afectadas de enfermedades infecto-contagiosas.

- Contengan residuos de los siguientes antimicrobianos, en cantidad superior a los máximos indicados en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1:** Límite máximo superior permitido de residuos de antimicrobianos en leche según el Código Alimentario Argentino, capítulo VIII- Artículo 556 - (Res Conj. SP y RS y SAGPA N° 33/2006 y N° 563/2006) referente a alimentos lácteos.

Sustancia		Concentración máxima de residuo (LMR) ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) <sup>(a)</sup>	Métodos de análisis
Grupo	Compuestos		
$\beta$ -lactámicos	Bencilpenicilina	4 <sup>(b)</sup>	FIL 57: 1970
	Bencilpenicilina procaínica		
Tetraciclinas	Tetraciclina	100 <sup>(d)</sup>	AOAC 16 th
	Oxitetraciclina	100 <sup>(d)</sup>	Ed. 995.04
	Clortetraciclina	100 <sup>(d)</sup>	
Sulfonamidas	Sulfadimetoxina	100 <sup>(e)</sup>	AOAC 16 th
	Sulfaquinoxalina	100 <sup>(e)</sup>	Ed. 993.32
	Sulfametazina	100 <sup>(e)</sup>	
	Sulfatiazol	100 <sup>(e)</sup>	
	Sulfadiazina	100 <sup>(e)</sup>	
	Sulfisoxazol	100 <sup>(e)</sup>	
	Sulfamerazina	100 <sup>(e)</sup>	
	Sulfametoxipiridacina	100 <sup>(e)</sup>	
	Sulfametoxazol	100 <sup>(e)</sup>	

-(a) Podrá ser expresado en su equivalente en  $\mu\text{g L}^{-1}$  tomando para la conversión el valor de densidad (a 15°C) correspondiente.

-(b) El LMR se refiere a la sumatoria de los residuos de Bencilpenicilina y Bencilpenicilina procaína, expresados como bencilpenicilina.

-(c) Para aquellas sustancias que poseen un LMR igual a cero se considerará que el LMR es igual al límite de detección más bajo de los métodos de análisis existentes.

-(d) El LMR se refiere a la sumatoria de las tres tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina y clortetraciclina).

-(e) El LMR se refiere a la sumatoria de todas las sulfonamidas.

Para la determinación cualitativa rutinaria de  $\beta$ -lactámicos, tetraciclinas y sulfonamidas, el Código Alimentario Argentino propone la utilización de métodos microbiológicos, colorimétricos, inmunoenzimáticos o de receptor microbiano.

Si se detectan residuos de antimicrobianos con los métodos de detección mencionados, será imprescindible determinar el cumplimiento de las concentraciones máximas de residuos establecidas en el presente artículo. Para ello, se deberá cuantificar los residuos detectados mediante la aplicación de los métodos de análisis correspondientes.

#### **4.1.3 Importancia de la detección de antibióticos en leche**

Detectar los residuos de ATB en leche es importante debido a varias razones fundamentales:

1. No hacerlo es ilegal.
2. Es posible que la leche contenga patógenos, además de ATB, puesto que generalmente provienen de una infección.
3. La presencia de fármacos y metabolitos activos puede facilitar el desarrollo de reacciones anafilácticas o de otros efectos colaterales en el ser humano.
4. Los residuos de ATB en leche pueden afectar la industrialización de los productos derivados así como su calidad.

Por otra parte, Santa Fe es una de las cuencas lecheras más importantes del país, que ofrece una alta calidad de leche. Por este motivo, consideramos indispensable que nuestra región cuente con sistemas de control de calidad para la leche, destinada para consumo local y para exportación.

#### **4.1.4 Métodos para la detección de residuos de antibióticos en leche**

Para la determinación de ATB en leche, los métodos oficiales publicados por la AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 1995) son métodos biológicos. Estos se basan en la inhibición del crecimiento bacteriano en presencia de leche contaminada con residuos de ATB. El principal problema de este tipo de ensayo radica en su inespecificidad, que conlleva a la aparición, en determinadas ocasiones, de falsos positivos. Aunque se debe destacar que existen *kits* comerciales de fácil utilización que se basan en el mismo principio que los métodos biológicos y permiten a los productores realizar análisis en el tambo, controlando de forma simple y segura la calidad del producto que entrega a las empresas.

Existen varias metodologías analíticas propuestas para la determinación de una amplia variedad de ATB en leche. Los métodos cromatográficos juegan un rol importante, especialmente CLAR, una técnica que se emplea comúnmente para la determinación de

residuos de ATB en leche (Spisso y col., 2007; Koesukwiwat y col., 2007; Nicolish y col., 2006; Van Hoof y col., 2005; Marazuela y Moreno-Bondi, 2004; Becker y col., 2004; Ramírez y col., 2003; Moats y Romanowski, 1998; Sorensen y col, 1997). También, se presentaron trabajos que utilizan biosensores inmunoquímicos (Flores y col., 2007; Rinke y Riik, 2006; Mellgren y Sternesjö, 1998) y cromatografía gaseosa (Meetschen y Petz, 1990, Balizs y Arnold, 1989).

Por otra parte, la electroforesis capilar aparece como una alternativa prometedora a las técnicas cromatográficas. Es una técnica que se puede aplicar para el monitoreo de ATB en una amplia variedad de matrices biológicas como plasma, tejidos y leche (Zhou y col., 2008; Santos y col., 2007; Lara y col, 2006; Santos y col., 2005; Tjornelund y Honore-Hansen, 1997; Chen y Gu, 1995; Barrón y col., 2001).

En el siguiente capítulo de tesis se propone la utilización de la EC acoplada a un detector de arreglo de diodos para la identificación y cuantificación simultánea de residuos de ATB presentes en leche destintada para el consumo humano. Asimismo, se propone el estudio de diferentes estrategias de pre-concentración y extracción con el objetivo de detectar ATB en leche cuando su concentración se encuentre dentro del LMR exigidos por las organizaciones sanitarias del país.

## **4.2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.2.1 Equipamiento**

Todas las experiencias se realizaron usando un equipo de electroforesis capilar (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) con detector de arreglo de diodos (DAD). Para la recolección de datos se utilizó una PC Pentium 4 HP.

Para las separaciones electroforéticas se utilizó un capilar desnudo de sílice fundida de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y una longitud total de 60 cm (51.5 cm hasta el detector) provisto por MicroSolv (Microsolv Technology Corporation, Eatontown, NJ, USA).

El pH de la solución reguladora de corrida (SRC) se ajustó mediante un pHmetro (HANNA Instrument). Para la degasificación de todas las soluciones de trabajo se utilizó un baño ultrasónico Cole Palmer 8891 (Cole Palmer, Illinois, USA).

Se utilizó una centrífuga para la separación del precipitado proteico de la muestra de leche y una manta calefactora para la evaporación de los solventes de extracción.

#### 4.2.2 Programas de computación

Para el control y la adquisición de datos se utilizó el programa *Chemstation CE* provisto por Agilent Technologies. Los diseños experimentales, el análisis de datos y el cálculo de la función deseabilidad se realizaron utilizando el programa Design Expert versión 7.1.0 (Stat-Ease Inc., Minneapolis). La linealidad del método se estudió con el programa estadístico Statgraphics Plus 5.1.

#### 4.2.3 Reactivos y materiales

Todos los reactivos utilizados para realizar las experiencias fueron de calidad grado analítico marca Cicarelli: fosfato de sodio monobásico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), borato de sodio ( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ), hidróxido de sodio (NaOH), ácido tricloroacético (TCA), éter etílico y diclorometano. Los solventes acetonitrilo (ACN), etanol absoluto (EtOH) y metanol (MeOH) fueron de calidad para cromatografía líquida marca Cicarelli. El agua que se utilizó para las disoluciones y las diluciones fue de calidad ultrapura.

Todas las drogas utilizadas fueron de la marca Sigma Aldrich: ampicilina sódica (**AMP**), amoxicilina trihidrato (**AMX**), penicilina sódica (**PEN**), cloranfenicol (**CLOR**), gentamicina (**GEN**), neomicina (**NEO**), sulfametoxazol (**SMX**), sulfanilamida (**SNA**), enrofloxacina (**ENF**), ciprofloxacina (**CPF**), tetraciclina (**TC**), oxitetraciclina (**OTC**), clortetraciclina (**CTC**), demeclociclina (**DMC**), minociclina (**MNC**), doxiciclina (**DOC**), metaciclina (**MTC**) y meclociclina (**MCC**).

La SRC y las soluciones de lavado se prepararon en el día. Previo a la inyección en el sistema electroforético, se filtraron a través de filtro jeringa de  $0.45\ \mu\text{m}$  de poro con membrana de nylon (Sartorius, Alemania) y se degasificaron en baño ultrasónico durante 5 minutos. Los extractos de ATB se filtraron a través de un filtro jeringa de  $0.2\ \mu\text{m}$  de poro de membrana de PTFE (Sartorius, Alemania).

Los cartuchos para la extracción en fase sólida Oasis HLB y Sep-Pack C-18 se adquirieron a Waters Corporation (Milford, Massachussets).

#### 4.2.4 Preparación de las soluciones madres y de trabajo

Las soluciones madres de los ATB que se nombran a continuación se prepararon por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de agua ultrapura para obtener las siguientes concentraciones: AMP ( $2900\ \text{mg L}^{-1}$ ), AMX ( $2510\ \text{mg L}^{-1}$ ), PEN ( $2070\ \text{mg L}^{-1}$ ), GEN ( $330\ \text{mg L}^{-1}$ ), NEO ( $2060\ \text{mg L}^{-1}$ ), ENF ( $2190\ \text{mg L}^{-1}$ ) y CPF ( $2130\ \text{mg L}^{-1}$ ). Los

restantes ATB: CLOR (2000 mg L<sup>-1</sup>), SMX (2350 mg L<sup>-1</sup>) y SNA (1950 mg L<sup>-1</sup>) se disolvieron en EtOH para alcanzar la concentración final indicada.

Las tetraciclinas: TC (2000 mg L<sup>-1</sup>), OTC (210 mg L<sup>-1</sup>), CTC (216 mg L<sup>-1</sup>), DMC (196 mg L<sup>-1</sup>), MNC (200 mg L<sup>-1</sup>), DOC (200 mg L<sup>-1</sup>), MTC (196 mg L<sup>-1</sup>) y MCC (210 mg L<sup>-1</sup>) se prepararon por disolución de la droga sólida en un volumen determinado de MeOH para alcanzar una concentración final indicada.

Todas las soluciones madres se conservaron en oscuridad a 4°C. Las soluciones de trabajo se prepararon cada día mediante dilución de un volumen determinado de solución madre en una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v). Estas soluciones se filtraron a través de filtro jeringa de 0.45 µm de poro de membrana de nylon y se degasificaron en baño ultrasónico durante 5 minutos.

#### 4.2.5 Acondicionamiento del capilar

El proceso completo de acondicionamiento y lavado del capilar se realizó de acuerdo a lo especificado en la Tabla 4.2.

**Tabla 4.2:** Secuencia de lavados del capilar para los distintos momentos del análisis.

Momento del lavado	Soluciones para el acondicionamiento del capilar				
	NaOH (1 mol L <sup>-1</sup> )	NaOH (0.1 mol L <sup>-1</sup> )	Agua Milli-Q	SRC	Aire
Capilar nuevo	10 min	10 min	10 min	10 min	
Comienzo del día		10 min	10 min	10 min	
Entre corridas		2 min	2 min	2 min	
Final del día		5 min	5 min		5 min

### 4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.3.1 Selección de los antibióticos a estudiar

En la literatura científica consultada se presentaron varias publicaciones referentes a la separación de ATB por electroforesis capilar. Muchas de ellas están orientadas a la detección y cuantificación de ATB que pertenecen a un mismo grupo, con propiedades fisicoquímicas similares, facilitando de esta manera su extracción de la matriz y su posterior análisis.

Algunos autores utilizan la metodología de electroforesis capilar zonal (ECZ) para la separación de quinolonas (Zhou y col., 2008; Lara y col., 2006) y tetraciclinas (Vargas

Mamani y col, 2006). Otros autores utilizan la cromatografía micelar electrocinética (CMEC) para la separación de tetraciclinas (Chen y Gu, 1995; Chen y Lin, 1998), diferentes  $\beta$ -lactámicos (Bailón Pérez y col., 2007), penicilinas (Nozal y col., 2004) y sulfonamidas (Santos y col., 2005; Lin y col., 1997). También se presentaron alternativas que consisten en el empleo de EC con solventes no acuosos para la separación de tetraciclinas (Tjornelund y Hansen, 1997).

Sólo algunos autores describen la determinación simultánea de diferentes grupos de ATB (Santos y col., 2007; Hows y col., 1997; Vargas Mamani y col., 2008), pero sólo el trabajo publicado por Santos y colaboradores realiza la determinación en leche.

Debido a la amplia variedad de alternativas existentes para la separación de diferentes ATB, es necesario, en primera medida, decidir con qué clases de ATB se realizará el análisis. Dado que la leche contaminada puede contener una extensa variedad de ATBs, optamos por restringir el análisis sólo a algunos. Por tal motivo, se seleccionaron cinco ATB pertenecientes a familias distintas: CLOR, CPF, AMP, TC y SMX. Esta elección se basa en su disponibilidad, en su uso en la actualidad y en las restricciones para el consumo que presentan algunos de ellos. En la Tabla 4.3 se resumen los usos y restricciones de los antibióticos, como así también algunos efectos adversos producidos en humanos.

**Tabla 4.3:** Usos y efectos adversos de los antibióticos seleccionados.

	<b>Usos en la actualidad</b>	<b>Efectos adversos</b>
<b>CLOR</b>	Su uso está prohibido en medicina humana y en animales destinados a la producción de alimentos.	Depresión de la médula ósea (anemia aplástica), afección en el sistema nerviosos central.
<b>CPF</b>	Uso exclusivo en medicina veterinaria.	Daño nervioso, tendinoso y en el tejido muscular, hipoglucemia y problemas cardíacos.
<b>AMP</b>	Útil en medicina humana y veterinaria para el tratamiento de infecciones bacterianas. Alternativa frente al uso de TC y CLOR.	Dolor abdominal, diarrea, vómitos, urticaria, astenia, infección vaginal.
<b>TC</b>	Útil en el tratamiento de mastitis bovina, como profiláctico de enfermedades y como promotor de crecimiento en animales de producción.	Afecciones gastrointestinales, toxicidad hepática, renal y sobre tejidos calcificados.
<b>SMX</b>	Se usa en medicina animal y humana para el tratamiento de infecciones respiratorias y gastrointestinales.	Dolor de las articulaciones y en los músculos, fiebre, dolor de garganta y problemas cutáneos.

### 4.3.2 Análisis electroforético

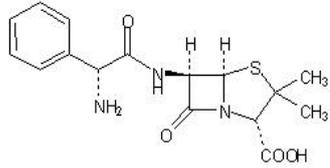
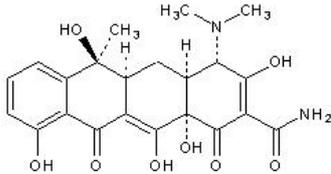
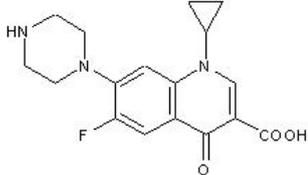
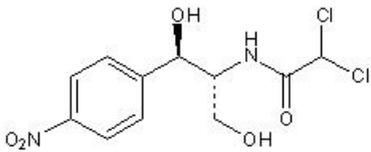
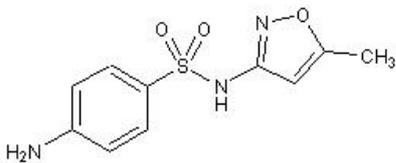
Para evaluar la separación de los ATB seleccionados, se inyectó en el equipo de EC una solución conteniendo  $2.00 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB bajo diferentes condiciones electroforéticas. Se evaluaron soluciones de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  a diferentes pHs y concentraciones. En algunos casos se les adicionó, a estas SRC, surfactantes como SDS, Tritón X-100 o Tween-80. En otros casos se les adicionó EDTA o ácido oxálico para evitar la adherencia de la TC a la pared del capilar. Se evaluaron también ambos modos de inyección, hidrodinámica y electrocinética.

En cada corrida electroforética se evaluó la resolución entre los picos de los analitos detectados, la intensidad de la señal generada, la forma del pico y el tiempo de análisis.

De las alternativas evaluadas, todos los analitos presentan mayor sensibilidad y buena resolución con solución reguladora de  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$   $0.02 \text{ mol L}^{-1}$  pH 9.20 con un voltaje de separación de 20 kV y con inyección hidrodinámica aplicando 50 mbar durante 20 s. El orden de migración de los ATB es: COR, CPF, AMP, TC y SMX.

Consecuentemente, las propiedades fisicoquímicas de los ATB seleccionados, la naturaleza iónica, los múltiples sitios de ionización y las diferentes solubilidades en agua, hacen de estos compuestos aptos para la separación por electroforesis capilar. En la Tabla 4.4 se resumen algunas características fisicoquímicas relevantes de los ATB estudiados.

**Tabla 4.4:** Características fisicoquímicas y estructura de los analitos seleccionados.

Analito	Clase de ATB	Peso molecular (g mol <sup>-1</sup> )	pKa	Estructura
AMP Na	β-lactámicos	371.4	2.8 - 7.2	
TC HCl	Tetraciclina	480.9	3.32 - 7.78 - 9.58	
CLOR	Fenicoles	323.1	5.5	
CPF HCl	Quinolonas	367.9	3.01 - 6.14 - 8.70 - 10.58	
SMX	Sulfonamidas	253.3	1.85 - 5.60	

#### 4.3.2.1 Análisis de interferencias

A continuación se realizó un estudio de interferencias que podrían encontrarse en muestras de leche. Para ello se adicionaron cantidades conocidas de soluciones estándar de diferentes clases de ATB a soluciones que contenían 2.00 mg L<sup>-1</sup> de cada uno de los cinco ATB seleccionados. Como posibles interferencias se consideraron: β-lactámicos como AMX y PEN; tetraciclinas como OTC, CTC, DMC, MNC, DOC, MTC y MCC, aminoglicósidos como GEN y NEO, otra quinolona como ENF y otra sulfonamida como SNA.

Cada solución se inyectó en el sistema electroforético bajo las condiciones experimentales óptimas y se observó que:

**a)** Existe insuficiente resolución entre las TCs, verificándose superposición severa entre algunas de ellas, a causa de su escasa diferencia entre los valores de sus pKa's (características eléctricas).

b) Los  $\beta$ -lactámicos analizados AMX, PEN y AMP difieren muy poco en sus valores de pKa. En efecto, resulta imposible su completa separación.

c) Las quinolonas CPF y ENF, como así también las sulfonamidas SNA y SMX, presentan un comportamiento similar al de los  $\beta$ -lactámicos.

A partir del análisis realizado, se puede concluir que la metodología desarrollada es útil para separar CLOR, CPF, AMP, TC y SMX en muestras que no contienen los ATB citados anteriormente. Caso contrario, estos ATB actuarán como interferencias, dificultando la cuantificación de los ATB seleccionados.

### 4.3 Selección de factores

Para determinar los factores que afectan la resolución entre los picos de los analitos seleccionados, tanto como el tiempo de análisis y la corriente generada dentro del capilar, se realizó un diseño experimental de Plackett-Burman. El tiempo de análisis se asignó al tiempo que implica realizar una corrida electroforética, sin tener en cuenta el tiempo en la preparación de la muestra. El diseño consistió en la realización de 12 experiencias, resultantes de la combinación de los factores: concentración y pH de la SRC, voltaje de separación y temperatura. Estos factores se evaluaron a dos niveles cada uno. (Tabla 4.5).

**Tabla 4.5:** Combinaciones de los factores a evaluar en el diseño experimental de Plackett-Burman para la selección de factores.

Experiencia	Concentración de la SRC (mol L <sup>-1</sup> )	pH	Voltaje (kV)	Temperatura (°C)
1	0.025	9.50	20	30
2	0.025	8.50	28	30
3	0.025	9.50	28	20
4	0.025	8.50	28	20
5	0.015	8.50	20	30
6	0.015	8.50	28	30
7	0.025	8.50	20	20
8	0.015	9.50	28	20
9	0.015	9.50	20	20
10	0.025	9.50	20	30
11	0.015	9.50	28	30
12	0.015	8.50	20	20

La evaluación consistió en analizar una solución estándar de una mezcla conteniendo  $2.50 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB en todas las condiciones citadas. En cada caso, se evaluó la cantidad de picos identificados como así también su resolución, el tiempo de análisis y la corriente. El tiempo de análisis corresponde al tiempo de migración del analito más lento (SMX).

En la Tabla 4.6 se resumen los resultados experimentales obtenidos para cada combinación de factores. Debido a que los analitos se enfocan en zonas muy estrechas, pequeñas diferencias en su movilidad (menor al 0.05 %) son suficientes para que la resolución entre ellos sea completa. Cuando la resolución entre dos analitos es mayor a 1.50 se considera que están totalmente resueltos (Guzmán, 1993).

Posteriormente, se aplicó un test ANOVA a los datos experimentales. Algunos valores de respuestas (que se marcan en negrita en la Tabla 4.6) se eliminaron debido a su influencia negativa sobre el modelo.

**Tabla 4.6:** Resultados experimentales correspondientes a las experiencias realizadas en el diseño experimental de Plackett-Burman.

Experiencia	Resolución 1 (CLOR/CPF)	Resolución 2 (CPF/AMP)	Resolución 3 (AMP/TC)	Resolución 4 (TC/SMX)	Tiempo de análisis (min)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
1	<b>0.00</b>	<b>0.64</b>	1.18	<b>0.00</b>	<b>5.61</b>	91.7
2	0.79	<b>1.30</b>	0.23	1.55	5.96	<b>130.0</b>
3	0.46	1.13	1.67	0.95	6.88	<b>131.0</b>
4	0.00	1.06	0.00	<b>1.33</b>	6.50	107.0
5	0.66	1.64	<b>0.43</b>	1.76	10.18	50.5
6	1.08	1.49	0.20	1.32	6.45	80.0
7	0.61	2.07	0.44	2.00	<b>18.38</b>	66.5
8	0.70	<b>0.94</b>	<b>1.42</b>	0.92	6.33	72.0
9	0.55	1.23	<b>1.30</b>	0.98	11.60	46.0
10	0.26	1.10	1.48	0.94	9.15	<b>92.0</b>
11	0.64	0.80	1.18	<b>0.00</b>	4.54	95.0
12	0.00	0.99	<b>0.00</b>	1.40	<b>12.40</b>	44.2

En la Tabla 4.7 se muestran los valores de probabilidad obtenidos para cada factor en función de la respuesta evaluada.

**Tabla 4.7:** Resultados del test ANOVA aplicado a los datos experimentales del diseño Plackett-Burman.

Respuesta	Valor de probabilidad para cada factor <sup>a</sup>				
	Modelo	Concentración de la SRC (mol L <sup>-1</sup> )	pH	Voltaje (kV)	Temperatura (°C)
Resolución 1 (CPF/CLOR)	<b>0.0189</b>	<b>0.0195 (+)</b>	<b>0.0222 (+)</b>	0.1000	<b>0.0213 (+)</b>
Resolución 2 (CLOR/AMP)	<b>0.0376</b>	0.1000	<b>0.0352 (+)</b>	<b>0.0225 (-)</b>	<b>0.0392 (-)</b>
Resolución 3 (AMP/TC)	<b>0.0039</b>	<b>0.0090 (+)</b>	0.1000	<b>0.0118 (-)</b>	<b>0.0139 (+)</b>
Resolución 4 (TC/SMX)	<b>0.0050</b>	0.2331	0.1329	<b>0.0405 (-)</b>	0.0844
Tiempo de análisis (min)	<b>0.0004</b>	0.1279	0.1415	<b>0.0001 (-)</b>	<b>0.0462(-)</b>
Corriente (μA)	<b>0.0042</b>	<b>0.0063 (+)</b>	<b>0.0445 (-)</b>	<b>0.0029 (+)</b>	<b>0.0049 (+)</b>

<sup>a</sup> se considera significativo cuando es menor a 0.05.

A partir del análisis realizado, se puede concluir que todos los factores evaluados resultan significativos ( $p$  menor 0.05) y deben considerarse en el análisis de optimización.

#### 4.3.3.1 Análisis de los efectos

##### 4.3.3.1.1 Efecto de los factores sobre la resolución

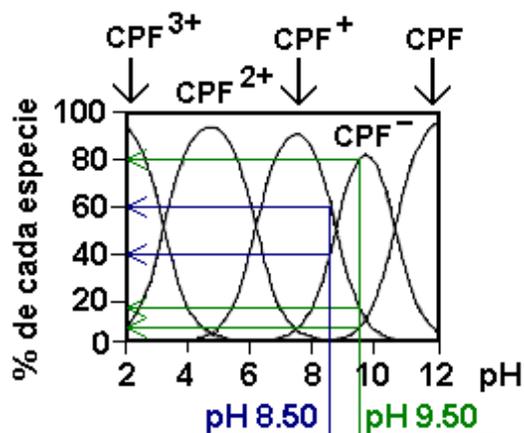
- El incremento en la concentración de la SRC de 0.015 a 0.025 mol L<sup>-1</sup> aumenta las resoluciones 1 y 3, mientras que, este cambio no influye sobre las resoluciones 2 y 4. El aumento de la fuerza iónica resulta en una compresión de la doble capa, disminuyendo el potencial  $\zeta$  y, por lo tanto, el FEO. Si la movilidad del FEO disminuye, la migración de los analitos será preponderantemente debida a sus movilidades intrínsecas y su resolución dependerá de la diferencia entre dichas movilidades. En este análisis se observó que el cambio en la concentración de la SRC afectó de manera diferencial a las resoluciones entre analitos a causa de sus diferencias estructurales, que resultan en un cambio de selectividad.

- El incremento en el pH de la SRC de 8.50 a 9.50 se traduce en un aumento en las resoluciones 1 y 2, mientras las resoluciones 3 y 4 no se modificaron.

El cambio de pH afectó la ionización de la CPF, involucrada en las resoluciones 1 y 2. A pH 8.50, según la Figura 4.1, existe aproximadamente un 60 % de especies positivas y un 40 % de especies negativas, indicando que la migración de especies se realiza

mayoritariamente hacia el cátodo. En cambio, a pH 9.50, el 80 % de las especies son negativas, el 15 % positivas y el 5 % restante no posee carga. Este fenómeno implica que la movilidad de la CPF disminuye. En síntesis, el pico de CPF se aleja del pico de CLOR y, por consiguiente, aumenta la resolución 1 (CLOR/CPF).

**Figura 4.1:** Especies iónicas de CPF a diferentes pH (figura extraída de Qiang y Adams, 2004).



- Cuando el voltaje de separación aumenta de 20 a 28 kV se observa una disminución en las resoluciones 2, 3 y 4, mientras que, este cambio no afecta la resolución 1. Un aumento en el voltaje se traduce en un aumento en la movilidad electroforética de los analitos y, por consiguiente, se produce la superposición de las bandas de separación lo que conlleva a una disminución en la resolución.

- El incremento en la temperatura de 20 a 30 °C causa disminución en la resolución 2, y aumento en las resoluciones 1 y 3. Este cambio no influye sobre la resolución 4. En este caso coexisten dos fenómenos opuestos. Por un lado, un incremento de temperatura disminuye la viscosidad de la SRC produciendo el aumento en la movilidad electroforética de los analitos y su consecuente acercamiento, como sucede con la resolución 2. Asimismo, permite un mejor apilamiento de las especies iónicas generando bandas de separación más angostas. Por lo tanto, se obtiene una mayor resolución, como se verifica para las resoluciones 1 y 3.

#### 4.3.3.1.2 Efecto de los factores sobre el tiempo de análisis

Los cambios de concentración y de pH, en los niveles analizados, no afectan el tiempo de análisis. Por el contrario, el incremento en el voltaje y en la temperatura reduce el tiempo de análisis.

- La velocidad de los analitos depende de la movilidad electroforética y del campo eléctrico aplicado. El campo eléctrico es función del voltaje y de la longitud del capilar. Si se mantiene constante la longitud del capilar y se incrementa el voltaje, se producirá un aumento en la velocidad de los analitos, disminuyendo el tiempo de análisis.
- El incremento en la temperatura de 20 a 30 °C se traduce en una disminución en el tiempo de análisis, debido a que disminuye la viscosidad de la SRC produciendo un incremento en la movilidad de los analitos y del FEO.

#### 4.3.3.1.3 Efecto de los factores sobre la corriente

- El incremento en la concentración de la SRC, en combinación con un aumento en el voltaje y en la temperatura, producen un aumento en la corriente debido al incremento del efecto Joule.

### 4.3.4 Optimización de la separación electroforética

Se determinaron las condiciones experimentales que permitieron obtener valores aceptables de resolución, un mínimo tiempo de análisis y un valor aceptable de corriente.

#### 4.3.4.1 Construcción del diseño experimental

Se construyó un diseño experimental central compuesto, que consistió en 30 experiencias resultantes de la combinación entre las variables independientes seleccionadas en los siguientes rangos: concentración de la SRC 0.018 – 0.028 mol L<sup>-1</sup>, pH 8.00 – 10.00, voltaje de separación 15 – 30 kV y temperatura 16.0 – 32.0 °C.

El límite superior e inferior de cada factor quedó delimitado por las restricciones instrumentales. Por otro lado, la inyección de la muestra se realizó de manera hidrodinámica a 50 mbar durante 20 s (modo normal de apilamiento) y la longitud de onda se fijó en 200 nm, donde todos los analitos presentan su máxima absorbancia. Todas las experiencias del diseño experimental se realizaron con soluciones de trabajo de 2.00 mg L<sup>-1</sup> de cada ATB y en orden aleatorio para minimizar los efectos de los factores incontrolados que pueden introducir errores en las mediciones.

Las respuestas obtenidas para cada combinación de factores se muestran en la Tabla 4.8.

**Tabla 4.8:** Respuestas obtenidas para cada combinación de factores en el diseño central compuesto: resoluciones, tiempo de análisis y corriente.

Experiencia	Resolución 1 (CLOR/CPF)	Resolución 2 (CPF/AMP)	Resolución 3 (AMP/TC)	Resolución 4 (TC/SMX)	Tiempo de análisis (min)	Corriente ( $\mu$ A)
1	0.57	1.39	0.53	1.31	9.64	62.0
2	0.59	1.80	0.00	2.57	9.82	54.5
3	0.39	1.38	0.00	1.95	14.38	63.5
4	0.00	<b>1.11</b>	0.00	1.87	9.00	91.0
5	1.30	3.04	0.36	2.30	6.18	111.3
6	0.00	1.36	0.47	1.95	25.93	59.5
7	0.72	<b>1.23</b>	0.63	1.37	24.41	70.6
8	0.78	1.13	1.31	1.06	7.29	104.0
9	0.80	1.42	1.90	1.01	16.06	116.0
10	0.50	2.90	0.66	2.61	9.95	93.5
11	0.00	2.43	<b>1.47</b>	2.06	<b>14.63</b>	56.5
12	0.00	1.92	1.01	2.60	12.34	73.7
13	0.00	1.12	1.06	1.76	12.95	94.5
14	1.15	1.06	0.44	1.39	5.69	79.0
15	<b>1.84</b>	<b>1.60</b>	0.71	1.25	21.33	88.3
16	0.00	1.29	0.37	1.66	9.18	81.0
17	0.00	1.31	0.37	1.36	7.43	80.0
18	0.00	1.21	0.25	1.80	7.28	78.0
19	0.85	1.09	0.93	0.90	15.34	107.0
20	0.77	1.89	0.75	1.61	<b>5.76</b>	123.4
21	0.70	1.02	2.38	1.00	9.63	115.0
22	0.78	2.58	0.57	3.47	22.77	67.1
23	0.00	<b>1.97</b>	0.00	2.57	15.59	76.0
24	0.00	1.42	<b>1.95</b>	<b>0.00</b>	<b>17.92</b>	104.0
25	1.23	1.74	0.00	2.29	8,03	152.0
26	0.00	1.13	0.83	1.24	24,29	74.5
27	0.43	1.48	0.65	1.33	9.89	67.5
28	0.63	1.63	1.88	0.98	11.09	126.5
29	0.79	1.11	<b>2.97</b>	0.61	9.91	151.0
30	0.00	1.30	0.84	<b>0.00</b>	<b>21.76</b>	102.6

#### 4.3.4.2 Modelado de las respuestas

Los datos experimentales de las resoluciones, el tiempo de análisis y la corriente se ajustaron mediante modelos polinomiales. Algunos datos experimentales se eliminaron debido al estudio de los parámetros que indican la influencia de cada punto individual sobre el modelo seleccionado. Los datos eliminados (que se indican en negrita en la Tabla 4.8) mostraron una influencia desproporcionada sobre el modelo (Myers y Montgomery, 1995).

Los coeficientes del modelo se calcularon mediante regresión múltiple con eliminación por retroceso (Derringer y Suich, 1980) y se validaron mediante el análisis de varianza (ANOVA). Los resultados se muestran en la Tabla 4.9.

**Tabla 4.9:** Resultados del ANOVA para las respuestas obtenidas en el diseño central compuesto.

Parámetro	Resolución 1 (CLOR/CPF)	Resolución 2 (CPF/AMP)	Resolución 3 (AMP/TC)	Resolución 4 (TC/SMX)	Tiempo de análisis (min)	Corriente ( $\mu\text{A}$ )
Modelo seleccionado	<b>Cúbico</b>	<b>Cúbico</b>	<b>Cuadrático</b>	<b>Lineal</b>	<b>Cuadrático</b>	<b>Cuadrático</b>
	Valor de probabilidad <sup>a</sup>					
Modelo	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	<b>0.0030</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
A. Concentración de la SRC (mol L <sup>-1</sup> )	0.8662	0.9432	<b>0.0337</b>	0.3358	<b>0.0624</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
B. pH	0.1673	<b>&lt; 0.0001</b>	0.8852	<b>&lt; 0.0001</b>	0.2195	<b>0.0587</b>
C. Voltaje (kV)	0.8434	<b>0.0474</b>	0.2258	<b>0.0088</b>	<b>0.0013</b>	<b>&lt; 0.0001</b>
D. Temperatura (°C)	<b>0.0044</b>	<b>&lt; 0.0001</b>	0.3225	<b>0.0062</b>	0.4093	<b>&lt; 0.0001</b>
A <sup>2</sup>	0.7144	0.7922	0.5701		0.9583	0.7472
B <sup>2</sup>	0.4048	< 0.0001	< 0.0001		0.844	0.0007
C <sup>2</sup>	0.3544	< 0.0001	0.0158		0.0746	0.0090
D <sup>2</sup>	0.3208	0.0001	0.0505		0.4221	0.1895
AB	0.2530	0.7244	0.9912		0.0387	0.7268
AC	0.9417	< 0.0001	0.7342		0.6773	0.0104
AD	0.4289	< 0.0001	0.0096		0.0471	0.4047
BC	0.0066	0.6698	< 0.0001		0.4267	0.2843
BD	0.9746	0.1610	0.1959		0.7811	0.0976
CD	0.0001	0.8384	0.3467		0.3423	0.0050
<b>Falta de ajuste</b>	<b>0.9984</b>	<b>0.9878</b>	<b>0.9773</b>	<b>0.1354</b>	<b>0.8862</b>	<b>0.5422</b>

<sup>a</sup> se considera significativo cuando es menor a 0.05.

Como se puede ver en la Tabla 4.9, se utilizó un modelo lineal para ajustar los datos experimentales de la respuesta R4, modelos cuadráticos para las respuestas R3, corriente y tiempo de análisis, y modelos cúbicos para las respuestas R1 y R2. Estos modelos son los que mejor explican el comportamiento de dichas respuestas en relación a los factores estudiados, observándose una probabilidad menor 0.05 para las tres respuestas, indicando que los términos del modelo son significativos.

Algunos términos irrelevantes se consideraron en el modelo para mantener la jerarquización. Por otro lado, la prueba de falta de ajuste resultó no significativa para todas las respuestas ( $p > 0.05$ ).

Además, los modelos seleccionados exhiben baja desviación estándar (entre 0.07 y 6.56 %) y los cuadrados de los coeficientes de correlación ajustados (entre 0.57 y 0.98) indican una buena relación entre los datos experimentales y los estimados por el modelo.

#### 4.3.4.3 Aplicación de la función deseabilidad

Mediante el uso de la función deseabilidad se optimizaron simultáneamente las seis respuestas, consistentes en las cuatro resoluciones, el tiempo de análisis y la corriente. La Tabla 4.10 muestra los criterios que se utilizaron para optimizar cada respuesta en forma individual, los límites superior e inferior y la importancia que se le adjudicó a cada respuesta con respecto a las demás.

**Tabla 4.10:** Criterios utilizados para optimización de las respuestas individuales, con sus correspondientes límites superior e inferior y la importancia.

<b>Respuestas</b>	<b>Criterio de optimización</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>Importancia</b>
Resolución 1	maximizar	0.50	1.30	5
Resolución 2	en el rango	1.02	3.04	3
Resolución 3	valor fijo = 1.50	1.00	2.38	3
Resolución 4	valor fijo = 1.50	1.00	3.47	3
Corriente ( $\mu\text{A}$ )	en el rango	54.50	100.00	3
Tiempo análisis (min)	minimizar	5.69	15.00	5

La resolución 1 se maximizó en un rango comprendido entre 0.5 y el valor máximo registrado de 1.30. Se le adjudicó mayor importancia a esta respuesta debido a que es la resolución más comprometida. De la misma manera, el tiempo de análisis presenta una

importancia elevada, ya que uno de los objetivos principales de la optimización es realizar el análisis de los ATB en el menor tiempo posible.

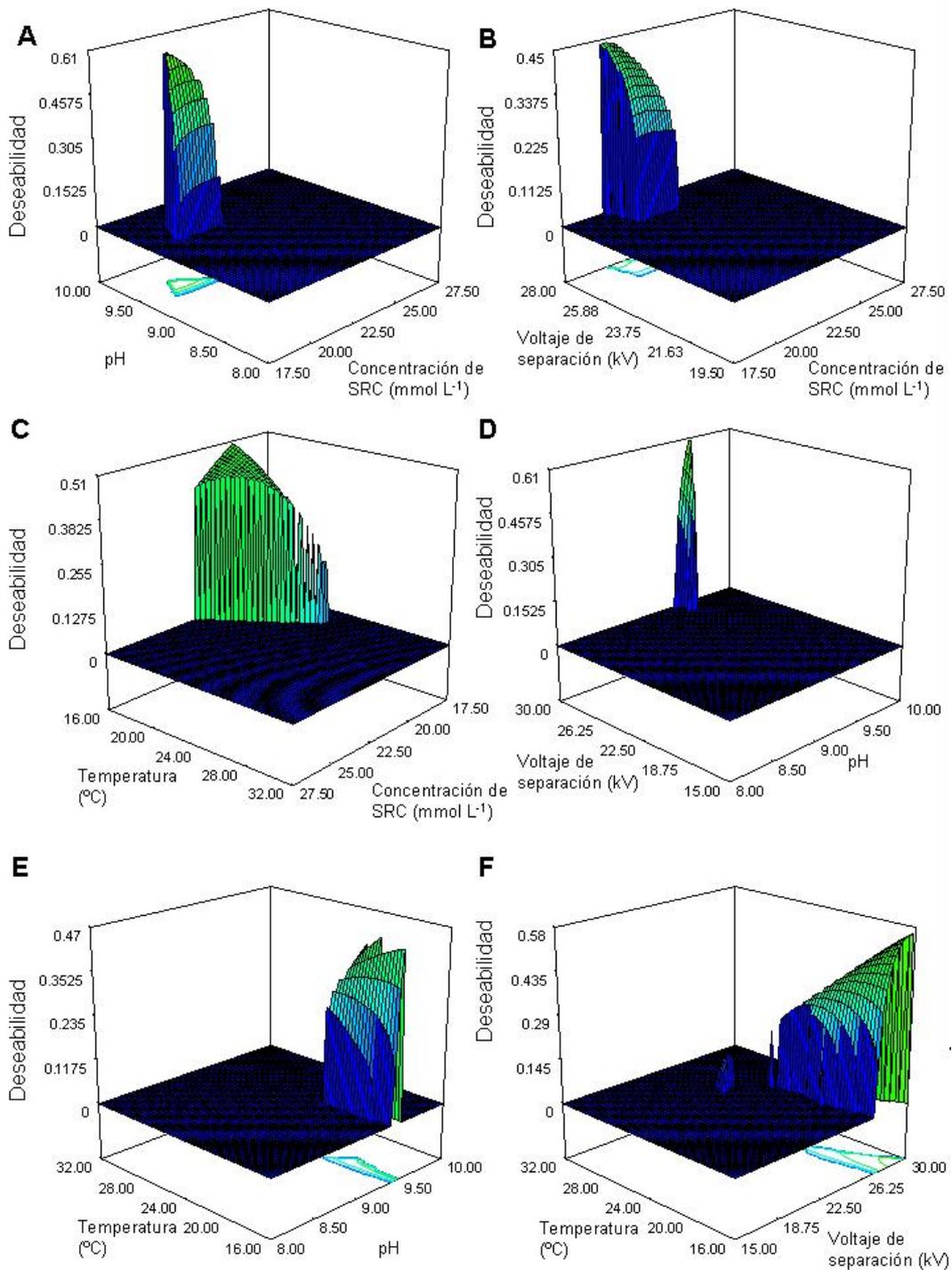
La resolución 2 se mantuvo en el rango comprendido entre el valor mínimo y el valor máximo registrado. A pesar de que el valor mínimo no es superior a 1.50 (analitos totalmente resueltos) se verificó la completa resolución. Las resoluciones 3 y 4 se ajustaron a un valor fijo de 1.50, en un rango comprendido entre 1.0 y el valor máximo registrado.

La corriente se mantuvo en un rango comprendido entre el valor mínimo registrado y un máximo relacionado con las restricciones instrumentales (donde se evita el calentamiento del capilar por el efecto Joule). Finalmente, el tiempo de análisis se minimizó en el rango de valores experimentales registrados.

Luego de realizar la optimización, se obtuvo como resultado que las condiciones experimentales que generan el máximo de la función deseabilidad, es decir, que satisfacen todos los criterios son:  $19.35 \text{ mol L}^{-1}$  de SRC pH 9.51 a una temperatura de  $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$  con un voltaje aplicado de 29.87 kV. La función deseabilidad tomó un valor de 0.619. Las respuestas individuales correspondientes son: resolución 1: 0.88, resolución 2: 1.02, resolución 3: 1.50, resolución 4: 1.29, corriente:  $93 \text{ } \mu\text{A}$  y el tiempo de análisis de 9.11 minutos.

Las superficies de respuestas obtenidas de la función deseabilidad global se muestran en la Figura 4.2 A–F. Estas gráficas se obtuvieron para dos factores manteniendo los demás en sus valores óptimos.

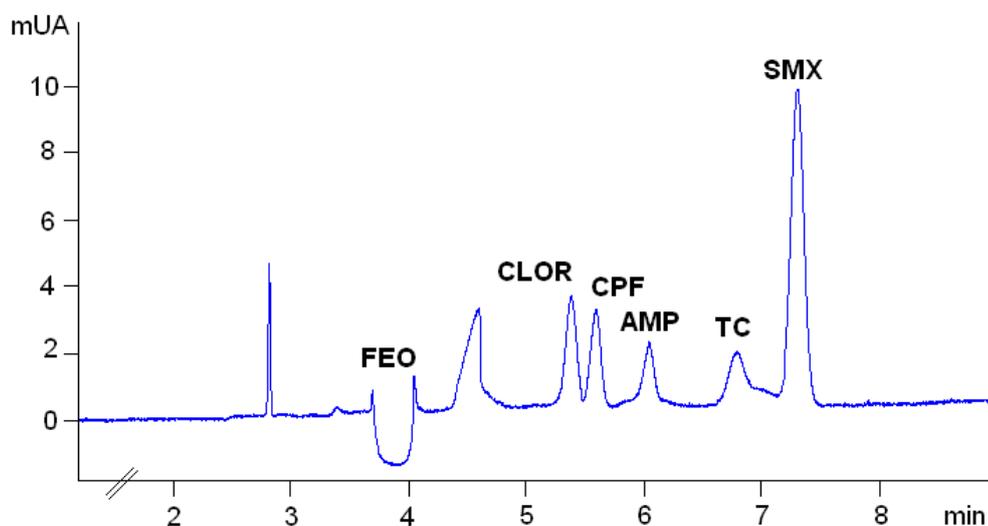
**Figura 4.2:** Gráficas de superficie de respuesta correspondientes a la función deseabilidad en función de los siguientes pares de factores, manteniendo constantes en sus valores óptimos los factores restantes: A) concentración SRC vs. pH; B) concentración SRC vs. Vs; C) concentración SRC vs. temperatura; D) pH vs. Vs; E) pH vs. temperatura y F) Vs vs. temperatura.



Del análisis global de las gráficas de la Figura 4.2 A-F se puede observar que sólo zonas muy pequeñas satisfacen todos los criterios especificados. Esto se debe a las

múltiples respuestas que se analizaron. Finalmente, los valores obtenidos de la optimización se corroboraron experimentalmente. El electroferograma correspondiente se muestra en la Figura 4.3.

**Figura 4.3:** Electroferograma correspondiente a un estándar de  $2.00 \text{ mg L}^{-1}$  de CLOR, CPF, AMP, TC y SMX disueltos en una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) bajo las condiciones experimentales óptimas. Respuestas: Resolución 1: 0.78, Resolución 2: 1.13, Resolución 3: 1.3, Resolución 4: 1.06, tiempo de análisis 7.3 min, corriente  $95 \mu\text{A}$ .

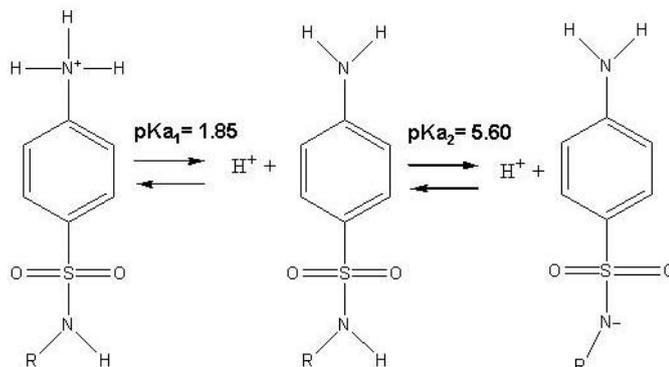


Teniendo en cuenta que la separación se realizó bajo condiciones alcalinas (pH 9.50), se puede analizar si el orden de migración concuerda con la relación carga masa de los analitos.

El electroferograma correspondiente a la separación de los ATB bajo las condiciones óptimas (Figura 4.3), muestra que el FEO migra delante de todos los analitos, con un tiempo de migración de aproximadamente 3.84 minutos. Esto indica que todos los ATB presentan carga neta negativa.

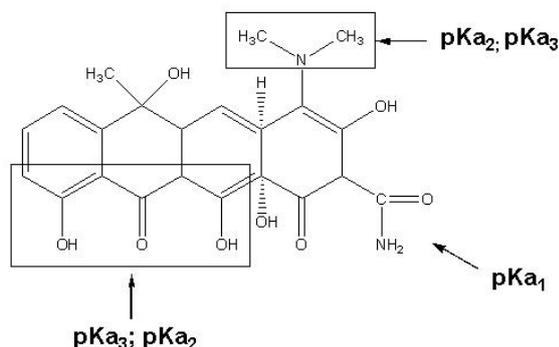
- En la molécula de SMX el grupo  $-\text{NH}_2$  (grupo amino básico) se relaciona con el  $\text{pK}_{a1}$  de 1.85 y el grupo  $-\text{NH}$  (grupo amino ácido) corresponde al  $\text{pK}_{a2}$  de 5.60. La disociación de la sulfonamida se ilustra en la Figura 4.4. Debido a que el pH óptimo de 9.50 es mayor al  $\text{pK}_{a2}$ , la molécula posee carga neta negativa.

Figura 4.4: Esquema de la disociación de sulfonamidas (figura extraída de Qiang y Adams, 2004).



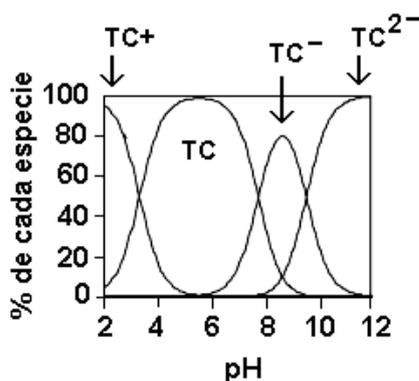
- La TC posee tres constantes de disociación cuyos pKa son aproximadamente 3, 7 y 9. En la Figura 4.5 se grafican los grupos funcionales que corresponden a sus correspondientes pKa's.

Figura 4.5: Grupos funcionales de la molécula de TC que corresponden a sus respectivos pKa's (figura extraída de Qiang y Adams, 2004).



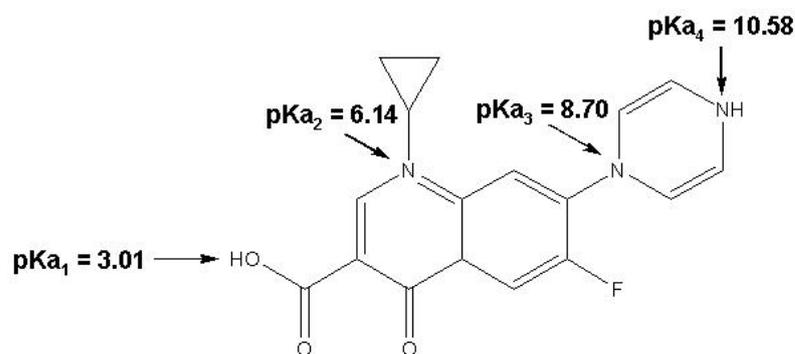
En la Figura 4.6 se representa la distribución de especies de TC en función del pH. Se puede observar que a pH 9.50 todas las especies de la TC poseen carga neta negativa.

Figura 4.6: Distribución de especies de TC en función del pH (figura extraída de Qiang y Adams, 2004).



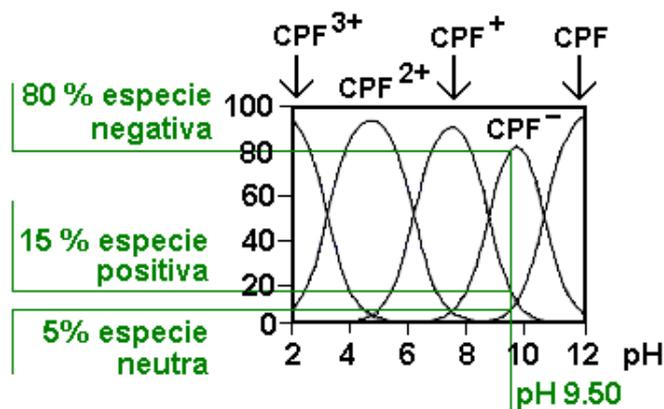
- La CPF posee un grupo carboxílico y tres nitrógenos básicos, exhibiendo cuatro valores de pKa (Figura 4.7).

**Figura 4.7:** Grupos funcionales de la molécula de CPF que corresponden a sus respectivos pKa's (figura extraída de Qiang y Adams, 2004).



En la Figura 4.8 se representa la distribución de especies de CPF en función del pH.

**Figura 4.8:** Distribución de especies de CPF en función del pH (figura extraída de Qiang y Adams, 2004).



Se puede observar que a pH 9.50 el 80 % de las especies en equilibrio presentan carga neta negativa, el 15 % positiva y el 5 % restante no posee carga.

- En la molécula de AMP (ver Tabla 4.4) se observa la presencia de un grupo carboxílico y un grupo amino, lo que condice con sus 2 valores de pKa encontrados de 2.8 y 7.2. Dado que el pH óptimo de trabajo es superior al  $pK_{a2}$ , la molécula posee carga neta negativa.

En el trabajo que presentaron Qiang y Adams, referente a la determinación potenciométrica de las constantes de disociación de algunos ATB, no se publicó ningún

valor de pKa para el CLOR en el rango de pH comprendido entre 3 y 11 (Qiang y Adams, 2004). Algunos autores citan como pKa del CLOR un valor de 5.5 (Kan y Petz, 2000; Gómez y col., 2003). De acuerdo con este valor de pH y trabajando en el pH experimental óptimo de 9.50, el CLOR tendrá carga neta negativa.

A pesar de que todos los analitos poseen carga neta negativa, la separación electroforética es posible debido a la relación favorable entre su densidad de carga con su peso molecular.

### 4.3.5 Validación del método

#### 4.3.5.1 Construcción de las curvas de calibración

Para verificar la linealidad del método en el rango de concentración de aproximadamente 0.25 a 4.50 mg L<sup>-1</sup> de cada ATB, se prepararon tres replicados de soluciones de calibrado a 6 niveles de concentración. Los niveles de concentración se indican en la Tabla 4.11. Las soluciones de calibrado se prepararon por dilución de cantidades conocidas de soluciones madres de cada ATB en una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v). Cada solución se analizó en el sistema electroforético bajo las condiciones experimentales óptimas: borato de sodio 0.019 mol L<sup>-1</sup> a pH 9.50, con un voltaje de 30 kV y una temperatura de 16 °C.

**Tabla 4.11:** Concentraciones de las 6 soluciones de calibración, expresadas en mg L<sup>-1</sup>, utilizadas para la evaluación de linealidad.

Nivel	Concentración de analito (mg L <sup>-1</sup> )				
	CLOR	CPF	AMP	TC	SMX
1	0.28	0.26	0.25	0.28	0.25
2	0.57	0.52	0.50	0.56	0.50
3	1.14	1.04	1.00	1.12	1.00
4	2.27	2.08	2.00	2.24	2.00
5	3.41	3.12	3.00	3.36	3.00
6	4.54	4.16	4.00	4.48	4.00

##### 4.3.5.1.1 Medición de la respuesta de las soluciones de calibración

Cada una de estas soluciones de calibración se inyectó en el sistema electroforético por triplicado y con los datos obtenidos se construyeron las gráficas de calibración

colocando en el eje de las ordenadas el área de pico (registrada a 200 nm) y en el eje de las abscisas la concentración de cada ATB ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

#### 4.3.5.1.2 Estimación de los parámetros de regresión

Se aplicó regresión lineal sobre los puntos individuales sin promediar utilizando el método de los cuadrados mínimos ordinarios.

La ecuación de la recta de ajuste fue  $y = a + b * x$ , donde  $a$  es la ordenada al origen,  $b$  la pendiente y  $x$  la concentración de cada analito expresada en  $\text{mg L}^{-1}$ . Los parámetros obtenidos se muestran en la Tabla 4.12.

**Tabla 4.12:** Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico.

Parámetro	CLOR	CPF	AMP	TC	SMX
ordenada al origen	-0.9 (0.3)	0.4 (0.2)	0.1(0.3)	-0.5 (0.1)	1.3 (0.7)
pendiente	7.4 (0.1)	5.9 (0.1)	5.1 (0.1)	3.6 (0.1)	20.6 (0.4)
$R^2$	0.9950	0.9970	0.9919	0.9947	0.9945
$R^2$ ajustado	0.9947	0.9967	0.9913	0.9943	0.9941
Error estándar	0.86	0.37	0.67	0.33	1.63

En la Tabla 4.12, los valores de ordenada al origen y pendiente se presentaron con su correspondiente incertidumbre entre paréntesis.

Para el ajuste de CLOR y AMP se utilizaron los 6 patrones de calibración, en cambio, para el ajuste de CPF, TC y AMP se eliminó el patrón de calibración de concentración más elevada, debido a que presentaba desviación a la linealidad.

Dado que el valor de probabilidad ( $p$ ) del análisis de varianza (ANOVA) obtenido para todos los ajustes es inferior a 0.05, existe relación estadísticamente significativa entre el área de pico y la concentración del ATB para un nivel de confianza del 95 %.

El estadístico  $R^2$  indica que el modelo lineal elegido explica más de un 99 % de la variabilidad del área de pico de los ATB.

#### 4.3.5.2 Precisión

Para evaluar la dispersión entre las áreas obtenidas debido a errores instrumentales, se inyectó 6 veces consecutivas la solución de calibración 3, utilizada para el análisis de linealidad. Los resultados se muestran en la Tabla 4.13.

**Tabla 4.13:** Áreas de cada ATB obtenidas por inyección de la solución de calibración 3, con su correspondiente promedio y CV % (coeficiente de variación porcentual).

Replicado	Área <b>CLOR</b>	Área <b>CPF</b>	Área <b>AMP</b>	Área <b>TC</b>	Área <b>SMX</b>
1	7.00	6.80	5.00	3.40	21.40
2	7.00	7.00	5.10	3.70	21.10
3	7.50	7.00	5.50	3.08	21.80
4	7.20	7.40	5.60	3.36	21.90
5	7.00	7.20	5.80	3.52	21.90
6	7.40	7.10	5.50	3.04	22.10
Promedio	7.18	7.08	5.42	3.35	21.70
Desviación estándar	0.20	0.19	0.28	0.23	0.34
CV %	<b>2.83</b>	<b>2.63</b>	<b>5.16</b>	<b>6.93</b>	<b>1.57</b>

Se observa una correlación entre imprecisión y sensibilidad. La mayor desviación estándar se obtiene para la TC, el ATB con menor área de pico, mientras que la menor desviación estándar se obtiene para el SMX, ATB con mayor área de pico.

#### 4.3.5.3 Límites de detección y cuantificación

Los valores de límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se presentan en la Tabla 4.14. Estos se calcularon de acuerdo con las ecuaciones surgidas de las recomendaciones de IUPAC (Danzer y Curie, 1998).

$$LOD = \frac{3.3 \times S_B}{b} \quad LOQ = \frac{10 \times S_B}{b}$$

siendo  $b$  la pendiente de la recta de regresión y  $S_B$  la desviación estándar del blanco que se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$S_B = S_{x/y} \times \sqrt{\left(\frac{1}{m}\right) + \left(\frac{1}{n}\right) + \left(\frac{\bar{x}^2}{\sum(x_i - \bar{x})^2}\right)}$$

donde  $S_{xy}$  es la desviación estándar de la regresión,  $m$  es el número de patrones de calibrado,  $n$  es el número de replicados,  $\bar{x}$  es el promedio de las concentraciones de calibrado.

**Tabla 4.14:** Límites de detección y cuantificación para cada ATB con su correspondiente límite máximo residual.

Parámetro	CLOR	CPF	AMP	TC	SMX
LOD (mg L <sup>-1</sup> )	0.29	0.17	0.33	0.24	0.20
LOQ (mg L <sup>-1</sup> )	0.89	0.51	1.01	0.72	0.61
LMR (mg L <sup>-1</sup> )	ausencia	0.10	0.04	0.10	0.10

Para todos los ATB se observa que los LOD y los LOQ obtenidos son mayores a sus correspondientes LMR. Resulta imposible, entonces, detectar y cuantificar valores por debajo de los límites máximos residuales de CLOR, CPF, AMP, TC y SMX en leche contaminada con el método analítico desarrollado, que implica inyectar directamente una muestra de leche sin procesar dentro del capilar. Por consiguiente, resulta indispensable desarrollar un método analítico que involucre la pre-concentración de los ATB y que permita detectar concentraciones de ATB correspondientes a los LMR establecidos por las autoridades sanitarias.

### 4.3.6 Métodos electroforéticos para la pre-concentración de ATB

#### 4.3.6.1 Modo normal del apilamiento

Una de las alternativas para aumentar la sensibilidad en la detección es aplicar metodologías de pre-concentración dentro del capilar. El modo normal de apilamiento, aplicando 50 mbar durante 20 s, es el modo que se utilizó para inyectar los ATB dentro del capilar. Esta metodología no fue suficiente para alcanzar los límites de detección deseados. En la primer fila de la Tabla 4.15 se muestran los valores correspondientes a las áreas obtenidas para 0.25 mg L<sup>-1</sup> de cada ATB.

En experiencias posteriores se aumentó progresivamente el tiempo de inyección, manteniendo constante la presión en su valor máximo (50 mbar). El máximo tiempo permitido de inyección es de 40 s, ya que luego de ese tiempo comienzan a detectarse

problemas con la estabilidad en la corriente (segunda fila de la Tabla 4.15). Aún así no se observa un aumento significativo en las áreas de los analitos para alcanzar el LOD deseado.

#### 4.3.6.2 Inyección de un gran volumen de muestra

Se aplicó la metodología de inyección de un gran volumen de muestra (LVSS). Para llevar a cabo dicha metodología, una solución estándar conteniendo  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB disuelta en una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) se inyectó a diferentes tiempos en el sistema electroforético. La matriz se eliminó mediante la aplicación de  $-20 \text{ kV}$ , hasta alcanzar el 95 % de la corriente máxima del sistema. En las filas 3 a 8 de la Tabla 4.15 se muestran las áreas obtenidas para cada ATB en relación al tiempo de inyección aplicado. El pico correspondiente a CLOR no se visualizó en ningún electroferograma. Esto puede deberse a que se elimina junto con la matriz. Además, se observó que a partir de 360 s de tiempo de inyección, el incremento en el área era poco significativo, indicando que se llega a la capacidad máxima de inyección.

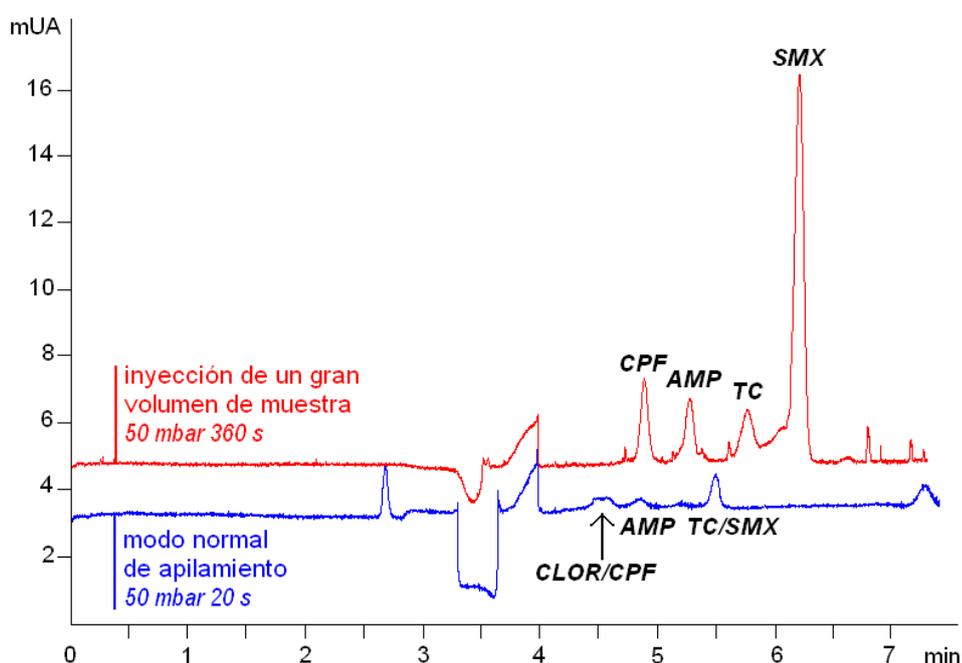
En la última fila de la Tabla 4.15 se especifica el factor de concentración. Dicho factor es el cociente entre el área de pico obtenido con la inyección de un gran volumen de muestra y eliminación de la matriz (50 mbar 360 s y  $-20 \text{ kV}$ ) y el área de pico obtenido mediante el modo normal de apilamiento (50 mbar 20 s).

**Tabla 4.15:** Áreas obtenidas de CLOR, CPF, AMP, TC y SMX para las diferentes metodologías de inyección.

Tiempo (seg.)	Área <b>CLOR</b>	Área <b>CPF</b>	Área <b>AMP</b>	Área <b>TC</b>	Área <b>SMX</b>
20	1.70	1.70	1.50	0.87	5.43
40	4.05	4.05	2.50	1.40	11.90
60	–	6.16	4.80	2.60	25.80
120	–	6.70	5.50	3.30	29.10
180	–	10.40	7.60	7.70	51.70
240	–	10.50	8.50	8.06	54.60
300	–	11.43	8.90	8.25	58.50
360	–	11.50	11.90	10.30	72.00
Factor de concentración		<b>7</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>13</b>

En la Figura 4.9 se representa una superposición entre un electroferograma de una mezcla de ATB de  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  inyectada mediante 50 mbar durante 20 s (línea azul) y un electroferograma de la misma mezcla de ATB, inyectada mediante 50 mbar durante 360 s y posterior remoción de la matriz (línea roja). En la figura 4.9 se observa claramente el aumento en las áreas de los picos cuando se trabaja con la inyección de un gran volumen de muestra.

**Figura 4.9:** Superposición entre un electroferograma de una mezcla de ATB de  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  inyectada mediante 50 mbar durante 20 s (línea azul) y un electroferograma de la misma mezcla de ATB inyectada mediante 50 mbar durante 360 s y posterior remoción de la matriz (línea roja).



Posteriormente se inyectaron concentraciones decrecientes de ATB hasta alcanzar una concentración de  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$ . Para ese nivel de concentración se comenzó a verificar poca reproducibilidad en las áreas de los ATB. El cambio en las áreas se observa en la tabla 4.16.

**Tabla 4.16:** Áreas obtenidas para diferentes concentraciones de CPF, AMP, TC y SMX inyectadas mediante 50 mbar durante 360 s.

ATB ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Area CPF	Area AMP	Area TC	Area SMX
0.20	9.10	5.50	6.30	40.0
0.12	5.43	5.02	5.18	33.4
0.08	4.00	5.20	3.10	19.4

Con esta metodología se pudieron detectar cantidades inferiores a los LMR de CPF, TC y SMX (ver tabla 4.14); no así de AMP y CLOR. A pesar de ello, la variabilidad que se observó, en los análisis con pequeñas concentraciones de ATB, es tal que impediría la utilización confiable de esta metodología para detectar residuos de ATB en leche.

Por otra parte, un requisito fundamental para la aplicación de la metodología LVSS es que la matriz de la muestra sea de baja conductividad, por lo que sería imposible la inyección de la muestra de leche directamente dentro del capilar sin un proceso previo de acondicionamiento.

### 4.3.7 Métodos externos para la extracción y pre-concentración de ATB

Dado que los métodos electroforéticos presentaron algunas limitaciones para su aplicación se continuó con la siguiente estrategia que fue aplicar metodologías externas que no sólo permiten la pre-concentración de analitos sino también posibilitan la eliminación de compuestos interferentes presentes en la matriz.

Para evaluar la extracción de los cinco ATB estudiados, disueltos en agua ultrapura, se emplearon dos metodologías:

- **extracción líquido-líquido**, donde se evaluaron dos tipos de solventes orgánicos, diclorometano y éter etílico.
- **extracción en fase sólida**, donde se evaluaron dos tipos de cartuchos: Oasis HLB y C-18 de 30 mg de relleno cada uno.

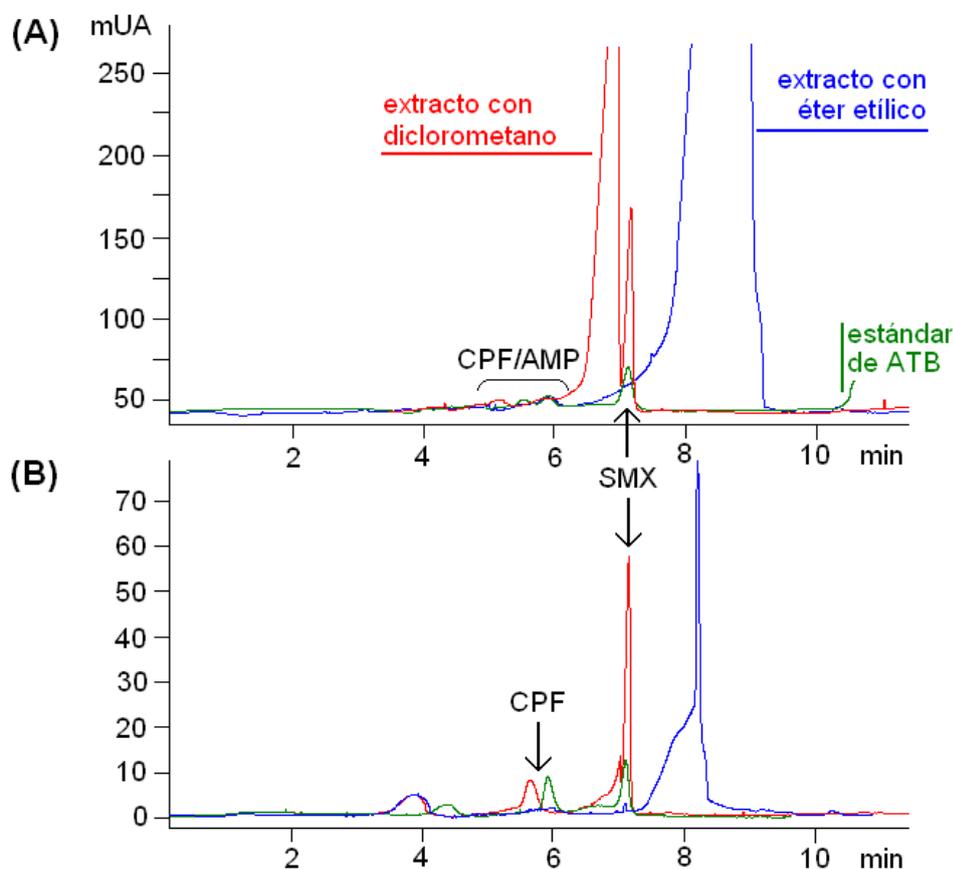
#### 4.3.7.1 Extracción líquido-líquido

Se prepararon 10.0 mL de dos soluciones estándar conteniendo  $0.20 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB. Para la extracción de los ATB, a una de ellas se le adicionaron 3 porciones de 2.0 mL cada una de diclorometano (A), y a la restante, 3 porciones de 2.0 mL cada una de éter etílico (B). Para ambas extracciones, luego de cada adición de solvente, la mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos para favorecer la separación de fases. Se combinaron los extractos y la solución resultante se evaporó en una manta calefactora a la temperatura de ebullición correspondiente a cada solvente orgánico utilizado. El residuo se resuspendió en 500  $\mu\text{L}$  de una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) y se filtró a través de un filtro jeringa con membrana de PTFE de 0.45  $\mu\text{m}$  de poro.

Los extractos obtenidos se inyectaron en el sistema electroforético bajo las condiciones experimentales óptimas, empleando la metodología LVSS con cambio de

polaridad aplicando 50 mbar durante 360 s y un voltaje negativo de 20 kV. También, se inyectó una solución estándar disuelta en una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) conteniendo  $1.00 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB, sin el proceso de extracción. La concentración del estándar corresponde a la concentración final teórica que deberían tener los extractos luego de su resuspensión. Los electroferogramas obtenidos se muestran en la Figura 4.10.

**Figura 4.10:** Electroferogramas correspondientes a la extracción líquido-líquido de 10.0 mL de una solución estándar de  $0.20 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB (línea roja: extracción con diclorometano, línea azul: extracción con éter, línea verde: estándar de  $1.00 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB sin el proceso de extracción). Los electroferogramas se registraron a 200 nm (Figura 4.10 A) y a 275 nm (Figura 4.10 B).



Realizando la comparación entre los electroferogramas que se muestran en la Figura 4.10, se puede concluir que la extracción con diclorometano (línea roja) es más eficiente que la extracción con éter (línea azul). En esta última extracción no se observó ningún pico que indique la presencia de los analitos estudiados. En cambio, en la extracción con diclorometano se observó claramente la presencia de tres picos correspondientes a CPF, AMP y SMX, que concuerdan con los obtenidos para el estándar (línea verde). Como se concluyó anteriormente, en la inyección por el método de LVSS, el CLOR se elimina en el proceso de remoción de la matriz.

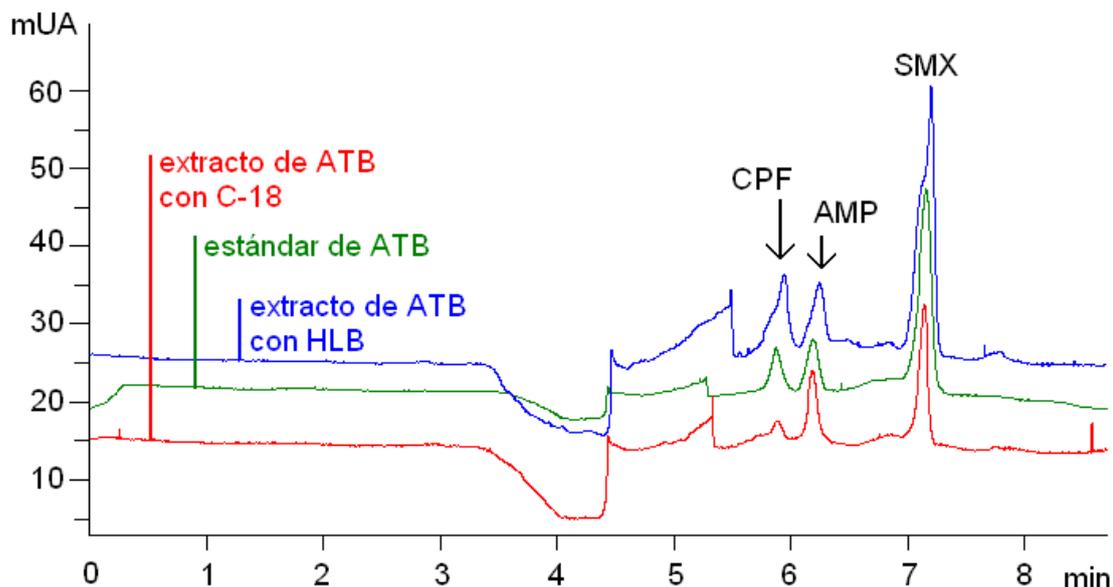
Debe notarse que en la Figura 4.10 B los electroferogramas se registraron a 275 nm donde predomina la señal de CPF y SMX ante la señal de la matriz y se aprecia mejor la recuperación de ambos analitos. Se puede observar, además, que la señal correspondiente al SMX en el extracto supera a la señal del estándar. Este fenómeno puede deberse a interferencias provenientes del solvente de extracción.

#### 4.3.7.2 Extracción en fase sólida

Los cartuchos evaluados se acondicionaron mediante sucesivos lavados con: 2 mL de agua ultrapura, seguido de 2 mL de MeOH y finalmente con 2 mL de agua ultrapura. Posteriormente, se transfirieron a cada cartucho 10.0 mL de una solución acuosa de 0.04 mg L<sup>-1</sup> de cada ATB, con una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Dicha concentración de ATB corresponde al LMR especificado para AMP. Los cartuchos se lavaron con 2 mL de agua para eliminar los compuestos no deseados o retenidos débilmente. Finalmente, los ATB se eluyeron con 300 µL de una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:560 v/v). Para aumentar la eficiencia en la extracción, la elución se realizó con dos porciones de 150 µL cada una teniendo en cuenta un tiempo de contacto entre el eluyente y el sorbente de aproximadamente 40 s. La concentración final aproximada de ATB en el extracto resuspendido es de 1.33 mg L<sup>-1</sup>.

Los extractos, junto con una solución estándar de 1.00 mg L<sup>-1</sup>, se inyectaron en el sistema electroforético mediante la metodología LVSS y se obtuvieron los electroferogramas que se muestran en la Figura 4.11. La concentración del estándar corresponde a la concentración final esperada para los extractos luego de su elución.

**Figura 4.11:** Electroferogramas recogidos a 200 nm correspondientes a los extractos obtenidos mediante extracción en fase sólida con cartuchos HLB (línea azul) y C-18 (línea roja) inyectados mediante la metodología LVSS. La línea verde corresponde al estándar de 1.00 mg L<sup>-1</sup> de cada ATB.



Realizando la comparación de las áreas obtenidas en los electroferogramas que se muestran en la Figura 4.11, se concluye que la extracción con los cartuchos HLB es más eficiente que la extracción realizada con los cartuchos C-18, debido a que se extrae más cantidad de CPF y SMX. La cantidad de AMP recuperada por ambos cartuchos es comparable. Los picos de los ATB identificados coinciden con los que se visualizan para el estándar. Como se concluyó anteriormente, la ausencia de CLOR puede deberse a que se elimina junto con la matriz en la aplicación de voltaje negativo. Además, se revisó el registro de datos espectrales en función del tiempo de corrida de los extractos y en ninguno de ellos se visualizó alguna señal correspondiente a la TC. Posiblemente su extracción sea mínima o nula.

#### 4.3.7.2.1 Evaluación del efecto matriz del cartucho

Para evaluar el efecto que tiene la matriz del cartucho sobre la extracción de los analitos, se prepararon cinco soluciones acuosas conteniendo los cinco ATB en los siguientes niveles de concentración: 0.02, 0.05, 0.07, 0.10 y 0.12 mg L<sup>-1</sup>. Este rango incluye el LMR de todos los ATB en estudio (ver Tabla 4.14). Posteriormente 10.0 mL de cada solución se transfirieron a un cartucho individual, previamente acondicionado. El cartucho se lavó con 2 mL de agua y finalmente se procedió a realizar la extracción de los ATB con 300  $\mu$ L de una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) en dos porciones de 150  $\mu$ L cada una.

A continuación, se inyectaron en el sistema electroforético los extractos junto con soluciones estándar de concentraciones correspondientes a los extractos finales resuspendidos: 0.83, 1.60, 2.50, 3.33 y 4.16 mg L<sup>-1</sup>. A pesar de que con la inyección LVSS se obtiene una mayor sensibilidad en la detección, se utilizó el modo normal de inyección (50 mbar durante 20 s) para evitar la eliminación de CLOR.

Se calculó la recuperación de cada analito detectado para cada nivel de concentración por comparación de las áreas obtenidas para los extractos con las áreas obtenidas para los estándares puros (Tabla 4.17).

**Tabla 4.17:** Recuperaciones de cada analito detectado luego de la aplicación de la metodología de extracción en fase sólida para cada nivel de concentración evaluado.

Nivel	Concentración de analito en 10.0 ml de leche (µg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)		
		CPF	AMP	SMX
1	0.02	48.31	–	–
2	0.05	62.49	149.44	88.10
3	0.07	64.22	125.09	90.47
4	0.10	65.51	129.55	90.85
5	0.12	60.82	127.73	96.65
Promedio		<b>60.27</b>	<b>132.95</b>	<b>91.52</b>

En los electroferogramas obtenidos para los extractos del estándar, el pico correspondiente a CLOR no se diferencia de los restantes identificados. La ausencia de este analito puede deberse a dos causas posibles. Una alternativa es que el proceso de extracción no recupera una cantidad considerable de CLOR para que se detecte mediante la metodología desarrollada. Otra opción es que el pico de CLOR se superpone con el de CPF a causa de interferencias provenientes de la matriz del cartucho que modifican la movilidad de ambos analitos.

De acuerdo con los resultados de recuperación expuestos de la Tabla 4.17 se concluye que:

**a)** La recuperación de CPF no es satisfactoria, ya que es menor a la esperada. Dado que la extracción se realizó sobre un estándar acuoso de CPF, se puede suponer ausencia del efecto matriz de la muestra. Además, la cantidad de CPF transferida al cartucho (de 0.25 a 1.25 µg, nivel 1 y 5 respectivamente) está muy por debajo de su capacidad (0.3 mg). En

otras palabras, toda la CPF puede interactuar con los sitios disponibles del sorbente y retenerse sin inconvenientes en el cartucho.

El sorbente del cartucho Oasis HLB es un copolímero compuesto por dos monómeros, divinilbenceno (lipofílico) y N-vinilpirrolidona (hidrofílico). La retención de CPF, contenida en un solvente polar como agua, se debe principalmente a uniones carbono-hidrógeno entre el analito y los grupos funcionales de los monómeros que componen el sorbente. El solvente de extracción que se utilizó para eluir la CPF del cartucho debería ser suficiente como para romper la fuerza de interacción que une el analito con el empacado. Asimismo, el volumen de elución que se utilizó (300  $\mu\text{L}$ ) es mucho mayor al volumen del elución teórico del cartucho (72  $\mu\text{L}$ ), por lo que todo el analito retenido podría ser fácilmente eluido.

En consecuencia, se concluye que la cantidad de analito transferida al cartucho es óptima y que, tanto el solvente como el volumen de elución son suficientes para romper las interacciones de unión de la CPF con el sorbente.

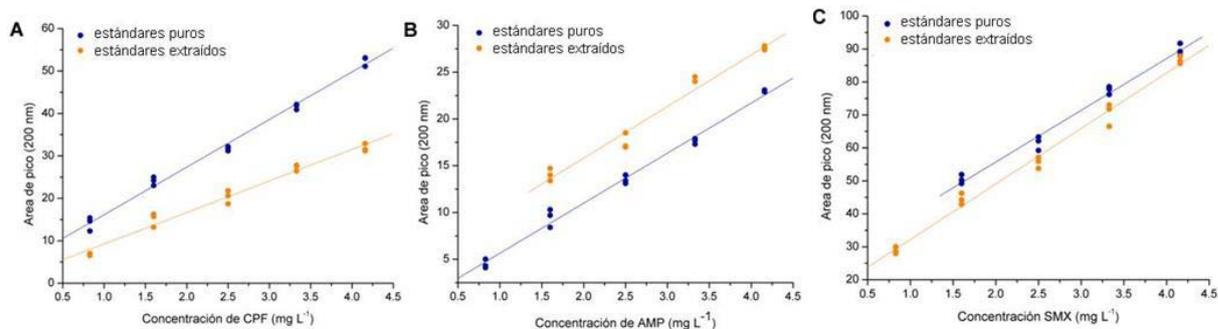
En este contexto, para que la retención sea óptima, es conveniente usar un pH donde el analito de interés no presente carga neta. La solución estándar de CPF se encuentra a pH 5.00, por lo que la molécula de CPF (ver Figura 4.8) posee carga neta positiva. Por este motivo, la retención de CPF es lo suficientemente débil como para que el disolvente de la muestra o los lavados posteriores con agua ultrapura eluyan al analito, disminuyendo de esta manera la recuperación.

**b)** La recuperación de AMP es superior a la esperada, posiblemente a causa de alguna molécula interferente proveniente del relleno del cartucho. Esta interferencia presenta el mismo tiempo de migración que la AMP imposibilitando su diferenciación. En la determinación de AMP, y para todos los niveles de concentración analizados, dicha interferencia causa un error sistemático constante de una magnitud relativa superior a la cantidad adicionada de AMP.

**c)** La recuperación de SMX es cercana al 100 %, cumpliendo con los requerimientos de extracción deseados.

Posteriormente, se graficaron las áreas obtenidas para cada solución (estándar puro y estándar extraído) con su correspondiente concentración (Figura 4.12 A–C).

**Figura 4.12:** Comparación de las rectas de regresión obtenidas con las áreas de pico de los estándares extraídos (línea naranja) y de los estándares puros (línea azul) para distintos niveles de concentración de (A) CPF, (B) AMP y (C) SMX.



Se aplicó regresión lineal por cuadrados mínimos ordinarios y se compararon las pendientes de las rectas de regresión obtenidas (Tabla 4.18) a través de una prueba *t* para la comparación de pendientes y detección de efecto matriz (Massart, 1997).

**Tabla 4.18:** Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico de los estándares puros y extraídos junto con los valores obtenidos en la prueba *t* de Student para comparación de pendientes.

	CPF		AMP		SMX	
	puro	extraído	puro	extraído	puro	extraído
Ordenada al origen <sup>a</sup>	4.9 (0.8)	1.8 (0.9)	0.7 (0.6)	4 (1)	24 (2)	15 (1)
Pendiente <sup>a</sup>	11.2 (0.3)	7.4 (0.3)	5.1 (0.2)	5.5 (0.4)	15.7 (0.6)	16.8 (0.5)
R <sup>2</sup> ajustado	0.9907	0.9755	0.9733	0.9359	0.9836	0.9873
<i>t</i> <sub>experimental</sub>	11.74		0.89		2.10	
<i>t</i> <sub>tabla</sub>	2.06		2.16		2.06	

<sup>a</sup> los valores entre paréntesis corresponden a las incertidumbres de cada parámetro calculado.

El **efecto matriz** consiste en la disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. En otras palabras, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real no proporciona la misma respuesta instrumental que para una disolución estándar del analito puro. El efecto matriz provoca un error sistemático proporcional, es decir, dependiente de la concentración de analito en la muestra (Boqué, 2005).

Luego de la aplicación de la prueba *t* se concluye que el valor de *t*<sub>experimental</sub> para CPF es mayor a su correspondiente *t*<sub>de tabla</sub> (calculados con el 95 % de confianza), por lo que la pendiente de la recta obtenida con los estándares puros es estadísticamente

diferente a la pendiente de la recta obtenida con los estándares extraídos, y esto es un indicativo de la presencia de efecto matriz. Por otra parte, para AMP el valor de *t experimental* es menor a su correspondiente *t de tabla*, mientras que para SMX el valor de *t experimental* es prácticamente el mismo que el valor de *t de tabla*, por lo que para AMP y SMX, las pendientes de las rectas de regresión obtenidas con los estándares puros son estadísticamente similares a las obtenidas con los estándares extraídos, indicando que no existe efecto matriz.

### **4.3.8 Metodologías para la extracción y pre-concentración de ATB en leche**

Las muestras de leche necesitan de un exhaustivo procedimiento de limpieza y acondicionamiento para eliminar los componentes presentes en la matriz. Estos compuestos son potenciales interferentes para los análisis posteriores.

La leche posee una densidad de  $1.03 \text{ g L}^{-1}$  a  $15 \text{ }^\circ\text{C}$ . Desde el punto de vista químico la composición de la leche es compleja: contiene alrededor del 87 % de agua, un 3.5 % de grasas finamente subdivididas, casi el 4 % corresponde a prótidos (sustancias orgánicas nitrogenadas), un 4.5 % de lactosa, un 0.5 % de sales inorgánicas y vitaminas A y D.

#### **4.3.8.1 Metodologías propuestas en la literatura científica**

Las técnicas usuales para realizar el pre-tratamiento de la leche y para la extracción de los ATB incluyen la ultrafiltración (Spisso y col., 2007; Santos y col., 2007; Marazuela y Moreno-Bondi, 2004) y la desproteinización con ácidos como tricloroacético (Koesukwiwat y col., 2007; Marazuela y Moreno-Bondi, 2004; Tjornelund y Hansen, 1997), con solventes orgánicos como MeOH (Van Hoof y col., 2005) o ACN (Becker y col., 2004; Ramírez y col., 2003; Sorensen y Snor, 2000). También se pueden utilizar sales como tungstato de sodio en medio sulfúrico (Sornesen y col., 1997).

Luego de la precipitación proteica, los ATB pueden extraerse mediante extracción líquido-líquido (Zhou y col., 2008; Nicolish y col., 2006; Ramírez y col., 2003) o mediante extracción en fase sólida (Zhou y col., 2008; Spisso y col., 2007; Koesukwiwat y col., 2007; Santos y col., 2007; Lara y col., 2006; Becker y col., 2004; Sorensen y Snor, 2000; Chen y Gu, 1995).

Cabe destacar que sólo algunos de los autores citados anteriormente emplean la EC como técnica para la determinación y cuantificación de ATB en leche. Estos autores emplean detección electroquimioluminiscente para cuantificar CPF alcanzado un LOD de  $15 \mu\text{g L}^{-1}$  (Zhou y col., 2008), espectrometría de masas para detectar CPF y SMX con un LOD

de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  (Lara y col., 2006; Santos y col., 2005) y fluorescencia para detectar tetraciclinas con LOD menores a  $25 \mu\text{g L}^{-1}$  (Tjornelund y Honoré Hansen, 1997).

Se encontraron dos trabajos que emplean detección UV, uno de ellos determina CLOR, TC y AMP, entre otros ATB, con LOD de 0.72, 0.78 y  $0.48 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente (Santos y col., 2007) y el otro determina TCs alcanzando LODs entre 1.3 y  $5.6 \mu\text{g L}^{-1}$  (Chen y Gu, 1995).

#### **4.3.8.2 Metodología desarrollada 1- Extracción en fase sólida**

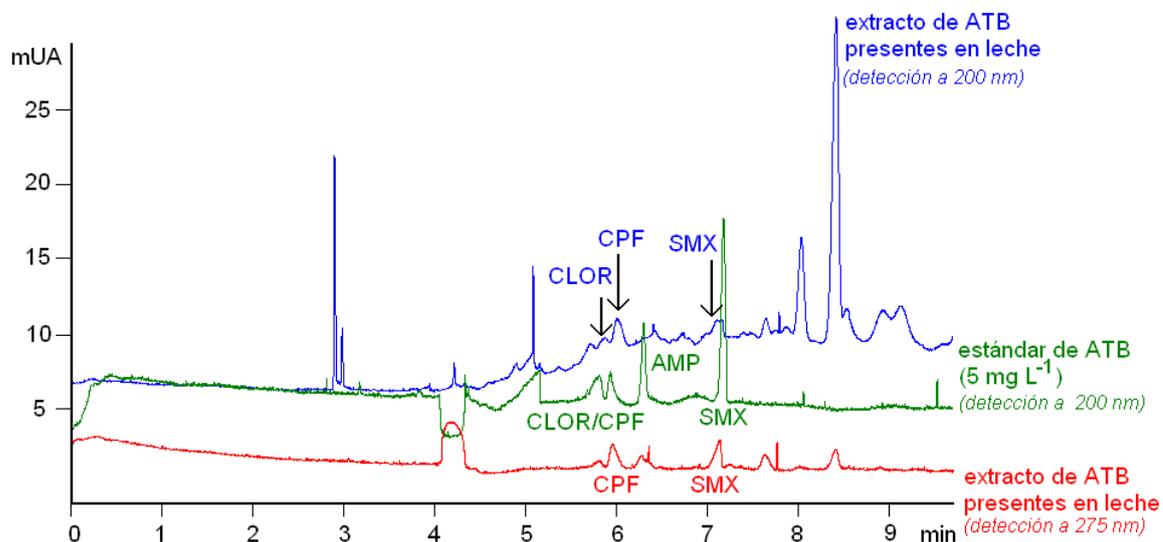
Una alícuota de 10.0 mL de leche entera adquirida en un supermercado local se colocó en un tubo centrífuga de polipropileno y se le adicionó un volumen determinado de solución estándar de cada ATB para obtener una solución de  $0.15 \text{ mg L}^{-1}$ . La muestra se agitó vigorosamente en un vortex por 30 s y luego se conservó en oscuridad a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , al menos por 20 minutos para que la matriz alcance el equilibrio.

Posteriormente, se eliminó la grasa que contiene la leche mediante centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos y se separó de la fase acuosa con la ayuda de una espátula. A continuación, se adicionaron 2.0 mL de una solución saturada de ácido tricloroacético (TCA) para precipitar las proteínas de la leche. Luego de la centrifugación a 4000 rpm durante 10 minutos se recolectó el sobrenadante translúcido para su posterior tratamiento.

Debido a los resultados obtenidos en la extracción en fase sólida con los cartuchos Oasis HLB, que pueden considerarse satisfactorios, se decidió continuar trabajando con dicha metodología de extracción y acondicionamiento de la muestra.

Seguidamente y previo acondicionamiento de los cartuchos, como se detalló anteriormente, se transfirió el sobrenadante resultante de la precipitación proteica con TCA a un cartucho Oasis HLB. El cartucho se lavó con 2 mL de agua y finalmente los ATB se eluyeron con  $300 \mu\text{L}$  de una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) en dos porciones de  $150 \mu\text{L}$  cada una. La concentración final aproximada de ATB en el extracto fue de  $5.00 \text{ mg L}^{-1}$ . En la Figura 4.13 se muestra el electroferograma correspondiente al extracto junto con un estándar inyectado mediante la aplicación de 50 mbar durante 20 s.

**Figura 4.13:** Electroferogramas recogidos a 200 nm y 275 nm correspondientes al extracto de ATB presentes en leche ( $5.00 \text{ mg L}^{-1}$  de cada ATB, línea azul 200 nm; línea roja 275 nm) junto con un estándar de la misma concentración (línea verde a 200 nm) donde se visualizan los picos de los analitos detectados.

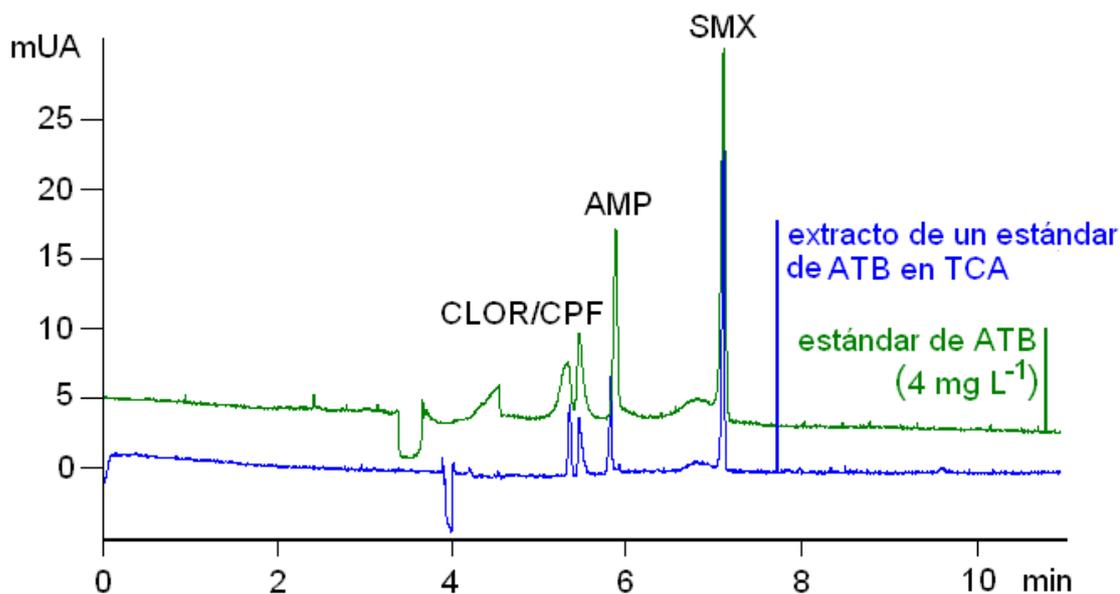


En el electroferograma correspondiente al extracto de ATB presentes en leche (detección a 200 nm, línea azul) se observan los picos correspondientes a CLOR, CPF y SMX con dificultad debido a interferencias provenientes de la matriz de la muestra. Por otro lado, cuando la señal se recoge a 275 nm (línea roja) se minimizan las interferencias de los componentes extraídos de la leche, pero la sensibilidad disminuye, detectándose solamente CPF y SMX.

#### 4.3.8.2.1 Evaluación del efecto del TCA

Posteriormente, se evaluó si el TCA que se adiciona para precipitar las proteínas de la leche puede afectar de alguna manera la extracción de los ATB o presenta una señal que interfiera en su detección. Para ello, se disolvió un volumen apropiado de una mezcla de solución estándar de ATB en 10.0 mL de una solución de TCA al 10 % para obtener una concentración de  $0.20 \text{ mg L}^{-1}$  de cada uno. Luego, se procedió a realizar la extracción en fase sólida como se detalló anteriormente recogiendo el extracto en 300  $\mu\text{L}$  de una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v). El extracto resultante se inyectó en el sistema electroforético mediante la aplicación de 50 mbar durante 20 s obteniendo el electroferograma que se muestra en la Figura 4.14.

**Figura 4.14:** Electroferogramas correspondientes a la extracción de un estándar de ATB disuelto en TCA al 10 % eluido con una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) ( $4.00 \text{ mg L}^{-1}$  finales) y a un estándar de la misma concentración que el extracto, inyectados mediante la aplicación de 50 mbar durante 20 s y recogidos a 200 nm.

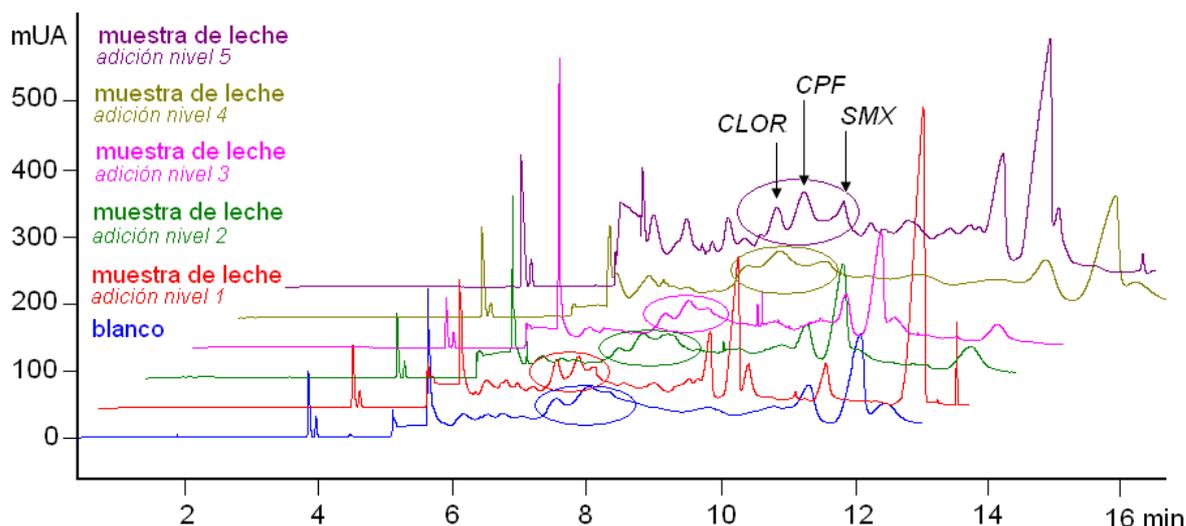


En los electroferogramas de la Figura 4.14 sólo se identifican cuatro picos, que corresponden a los antibióticos CLOR, CPF, AMP y SMX; sin observar ningún otro pico que corresponda al efecto residual del TCA. Por comparación de las áreas de los picos obtenidos se concluye que los niveles que se recuperan son menores a los esperados.

En las retenciones en fase reversa (como la que se realizó), lo deseable es retener al analito de interés, por lo tanto, para una retención favorable, los analitos no deberán presentar carga. A causa del bajo pH del TCA, las moléculas de ATB se encuentran protonadas, lo que disminuye su interacción con los grupos funcionales de la matriz del sorbente, disminuyendo de esta manera su recuperación.

Con el objetivo de disminuir aún más la concentración de ATB presentes en la muestra se prepararon 6 muestras de 10.0 mL leche, cinco de ellas fortificadas con diferentes niveles de ATB ( $0.02$ ,  $0.05$ ,  $0.07$ ,  $0.10$  y  $0.12 \text{ mg L}^{-1}$ ), la restante se utilizó como blanco de muestra. A las seis muestras se les realizó el procedimiento de extracción en fase sólida y se analizaron electroforéticamente los extractos junto con sus correspondientes estándares, obteniendo los electroferogramas que se muestran en la Figura 4.15.

**Figura 4.15:** Electroferogramas recogidos a 200 nm correspondientes a extractos de distintos niveles de ATB presentes en leche junto con una muestra blanco.



En la Figura 4.15 se indica con círculos la posición de migración de los analitos identificados: CLOR, CPF y SMX. Como se puede observar, la gran cantidad de interferencias proporcionadas por la leche confunde no sólo la detección de los analitos estudiados sino que imposibilita su cuantificación por calibración univariada. Además, en el electroferograma correspondiente al ensayo blanco (línea azul) se observa que al tiempo de migración de los ATB existe una señal correspondiente a componentes no identificados de la leche. Por otra parte, los electroferogramas recogidos a 275 nm no presentan ninguna señal que corresponda a los analitos estudiados.

Estos datos además se analizaron con el algoritmo MCR-ALS (Resolución Multivariada de Curvas por Cuadrados Mínimos Alternantes) sin poder llegar a resultados satisfactorios por los siguientes motivos:

**a)** Para este análisis los datos obtenidos no son reproducibles, ya que existe una gran variabilidad entre las corridas consecutivas y NO SE VERIFICA una correlación entre el tamaño del pico y la concentración adicionada (las muestras analizadas corresponden a adiciones estándar de ATB a muestras de leche). Esto hace imposible aplicar cualquier método de calibración multivariada.

**b)** Además, en algunos casos, el corrimiento de los picos produce su ensanchamiento, lo que conlleva al aumento de su área, pero que no guarda relación con su concentración.

### **4.3.8.3 Metodología desarrollada 2–Extracción líquido-líquido combinada con extracción en fase sólida.**

#### **4.3.8.3.1 Ensayos de recuperación de ATB**

La recuperación de una droga desde una matriz biológica es la cantidad de droga obtenida después de los procesos de purificación-extracción.

El ensayo de recuperación se llevó a cabo mediante la adición de concentraciones conocidas de solución estándar de ATB a muestras de leche, posterior aplicación del método de extracción propuesto, análisis en el sistema electroforético y comparación de las áreas obtenidas con las áreas de estándares puros con concentraciones correspondientes al 100 % de la extracción.

Para realizar dicha experiencia, a cuatro alícuotas de 100.0 mL de leche entera adquirida en un supermercado local se le adicionaron volúmenes conocidos de una solución estándar de cada ATB para obtener los siguientes niveles de concentración: 0.02, 0.04, 0.06 y 0.10 mg L<sup>-1</sup>. La muestra fortificada se homogeneizó y luego se conservó en oscuridad a 4 °C al menos por 20 minutos para que la matriz alcance el equilibrio.

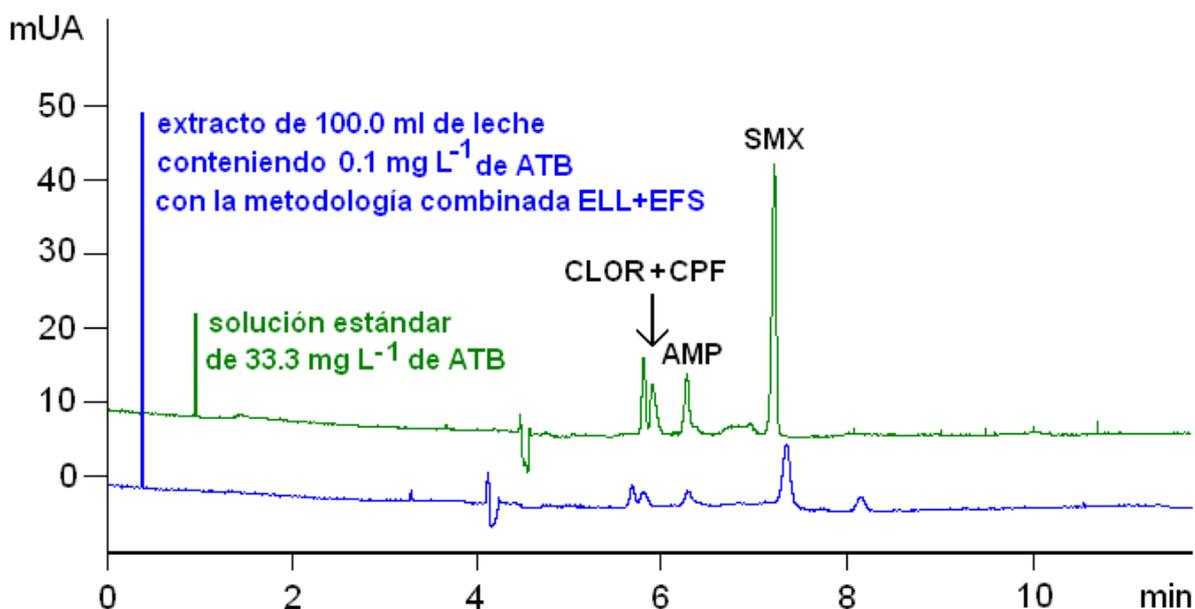
Posteriormente, se eliminó la grasa que contiene la leche mediante centrifugación a 4000 rpm durante 20 minutos. A continuación, se adicionaron 10.0 mL de una solución saturada de ácido tricloroacético (TCA) para precipitar las proteínas y se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos. Cada sobrenadante se colocó en una ampolla de decantación y se le adicionaron 3 porciones de 20 mL cada una de diclorometano para la extracción de ATB. Luego de cada adición de solvente, la mezcla se agitó vigorosamente y se extrajo la fase orgánica. Se combinaron los extractos y la solución resultante se evaporó en una manta calefactora a 45 °C. El residuo obtenido se resuspendió en 1.0 mL etanol y luego se le adicionó 1.0 ml de agua ultrapura. Finalmente se filtró a través de un filtro jeringa de 0.45 µm de poro de membrana de PTFE.

La utilización de etanol en la disolución del residuo, se debe a que dicho residuo presenta una consistencia oleosa, proveniente de la grasa presente en la leche que no se eliminó, lo que dificulta su disolución en agua. Además, el etanol es el disolvente más apropiado debido a que presenta una polaridad similar a la del agua, permitiendo la utilización del extracto en el siguiente paso de extracción en fase sólida.

Posteriormente, se transfirió cada extracto resuspendido a un cartucho Oasis HLB previamente acondicionado. Cada cartucho se lavó con una mezcla de etanol: agua (50:50) y los ATB se eluyeron con dos porciones de una mezcla de agua ultrapura-ACN (50:50 v/v) de 150 µL cada una.

El factor de pre-concentración de la metodología de extracción completa es de **1000:3**, ya que se analizaron 100.0 mL de muestra y se obtuvo un extracto final resuspendido en 300  $\mu$ L. Los eluidos se filtraron a través de un filtro jeringa y se inyectaron en el sistema electroforético mediante la aplicación de 50 mbar durante 20 s junto con estándares cuyas concentraciones corresponden a las esperadas para los extractos. En la Figura 4.16 se muestra un electroferograma que corresponde a una extracción de 100.0 ml de leche fortificado con 0.10  $\text{mg L}^{-1}$  de cada ATB a la que se le aplicó el proceso de extracción combinado, superpuesto con el de un estándar conteniendo 33.30  $\text{mg L}^{-1}$  de ATB.

**Figura 4.16:** Superposición de un electroferograma correspondiente a la extracción combinada ELL + EFS de 100.0 mL de una muestra de leche fortificada con 0.10  $\text{mg L}^{-1}$  de cada ATB (línea azul) y un electroferograma correspondiente a un estándar 33.30  $\text{mg L}^{-1}$  de cada ATB (línea verde) sin el proceso de extracción.



En la Tabla 4.19 se resumen los valores de recuperaciones porcentuales obtenidos para cada analito en cada nivel de concentración evaluado.

**Tabla 4.19:** Recuperaciones de cada analito detectado luego de la aplicación de la metodología de extracción combinada (ELL-EFS) para cada nivel de concentración evaluado.

Nivel	Recuperación (%)			
	CLOR	CPF	AMP	SMX
1	42.47	41.04	42.09	40.17
2	46.71	48.19	53.63	47.36
3	47.70	44.30	62.65	51.12
4	43.79	30.18	56.96	40.31
promedio	<b>45.17</b>	<b>40.92</b>	<b>53.83</b>	<b>44.74</b>
CV (%)	5.42	18.91	16.10	12.11

La recuperación indica la eficiencia de todos los procesos involucrados en el método analítico. La recuperación no necesita ser del 100%, pero la cantidad recuperada de droga debe ser consistente, precisa y reproducible. Cuanto más próxima al 100% sea la recuperación más efectivo es el método de purificación/extracción.

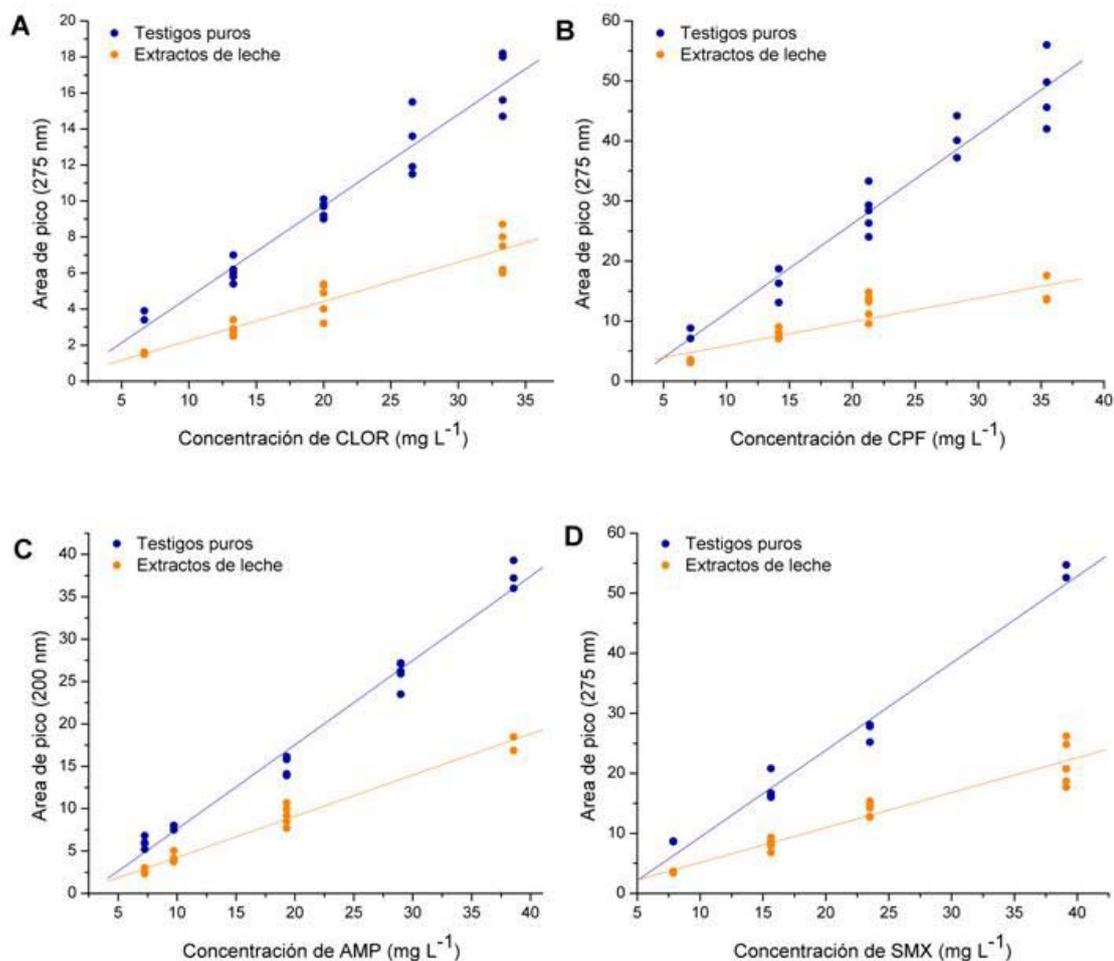
Para los cuatro analitos detectados, la recuperación se encuentra entre el 40 y el 50 %. Estos valores tan bajos de recuperación tienen su justificación debido a que procedimiento de extracción desarrollado consta de varias etapas, donde existe la posibilidad de perder una cantidad considerable de analito. Por otro lado, la eficiencia en los 2 pasos de la extracción es diferente para cada uno de ellos ya que, analitos que presentan estructuras y comportamientos físicos y químicos totalmente diferentes entre si, se extraen bajo las mismas condiciones experimentales.

No obstante, de acuerdo con el trabajo presentado por Hubert y colaboradores (Hubert y col., 1999), estos valores tan bajos de recuperación pueden aceptarse si el método presenta un LOD suficientemente bajo como para poder detectar al analito extraído.

Los coeficientes de variación del proceso de extracción indican la reproducibilidad del proceso de extracción. Dichos valores cumplen con los requerimientos para métodos bioanalíticos especificados por la FDA (Guidance for Industry-Bioanalytical Method Validation, 2001).

Posteriormente, se graficaron las áreas obtenidas para cada solución (estándar puro y extractos de leche) con su correspondiente concentración (Figura 4.17 A–D), se aplicó regresión lineal por cuadrados mínimos ordinarios y se compararon las pendientes de las rectas de regresión obtenidas a través de una prueba *t* para la comparación de pendientes (Massart, 1997). Los resultados se muestran en la Tabla 4.20.

**Figura 4.17:** Comparación de las rectas de regresión obtenidas con las áreas de pico de los estándares puros (línea azul) y con las áreas de pico de los extractos de leche (línea naranja) para distintos niveles de concentración de (A) CLOR, (B) CPF, (C) AMP y (D) SMX.



**Tabla 4.20:** Parámetros estadísticos obtenidos del ajuste de las variables concentración de analito y área de pico de los estándares puros y de los extractos junto con los valores obtenidos en la prueba *t* de Student para comparación de pendientes.

	CLOR		CPF		AMP		SMX	
	puro	extraído	puro	extraído	puro	extraído	puro	extraído
Ordenada al origen <sup>a</sup>	-0.4 (0.7)	0.1 (0.4)	-4 (2)	2 (1)	-2.4 (0.9)	-0.6 (0.4)	-5 (1)	-1 (1)
Pendiente <sup>a</sup>	0.51 (0.03)	0.22 (0.02)	1.5 (0.1)	0.40 (0.05)	0.99 (0.04)	0.48 (0.02)	1.45 (0.06)	0.58 (0.04)
R <sup>2</sup> ajustado	0.9385	0.8928	0.9315	0.7807	0.9782	0.9713	0.9761	0.9157
<i>t</i> <sub>experimental</sub>	12.28		9.84		11.40		43.18	
<i>t</i> <sub>tabla</sub>	2.04		0.45		0.43		2.04	

<sup>a</sup> los valores entre paréntesis corresponden a las incertidumbres de cada parámetro calculado.

Luego de la aplicación de la prueba  $t$  se concluye que los valores de  $t$  experimental para todos los ATB, son mayores a sus correspondientes  $t$  de tabla (calculados con el 95 % de confianza), por lo que las pendientes de las rectas obtenidas con los estándares puros son estadísticamente diferentes a las pendientes de las rectas obtenidas con los extractos de leche. Esto es un indicativo de la presencia de efecto matriz.

La mejor alternativa para soslayar el efecto matriz es utilizar la técnica de las *adiciones estándar* (Miller y Miller, 2002; Massart, 1997). Esta técnica consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes del analito a la propia muestra problema, la lectura de las correspondientes respuestas instrumentales y la posterior construcción de la recta de adiciones estándar. La cuantificación del analito se realiza por extrapolación de la recta de calibrado al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero. El mayor inconveniente de esta técnica es que se necesita construir una recta de adiciones estándar para cada muestra que se desee analizar, suponiendo un incremento sustancial en el volumen de trabajo del laboratorio.

#### 4.3.8.3.2 Límites de detección y cuantificación

Los valores de correspondientes al LOD y LOQ se calcularon de acuerdo con las recomendaciones de IUPAC (Danzer y Curie, 1998) y se muestran en la Tabla 4.21.

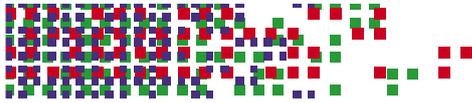
**Tabla 4.21:** Límites de detección y cuantificación para cada ATB para el método desarrollado con su correspondiente límite máximo residual.

	<b>CLOR</b>	<b>CPF</b>	<b>AMP</b>	<b>SMX</b>
LOD ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.03	0.03	0.03	0.03
LOQ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	0.09	0.11	0.09	0.08
LMR ( $\text{mg L}^{-1}$ )	no detectable	0.10	0.04	0.10

En resumen, los analitos en estudio, contenidos en una matriz muy compleja y en muy baja concentración, se sometieron a un proceso de extracción compuesto por varias etapas (desgrasado y precipitación proteica, extracción líquido-líquido, evaporación, resuspensión del residuo y extracción en fase sólida). Luego se analizaron por EC acoplada a un detector universal como UV. A pesar de que esta técnica separativa presenta una sensibilidad considerablemente baja, se obtienen límites de detección que permiten detectar residuos de todos los analitos en estudio, cuando se encuentren presentes en leche en concentraciones correspondientes a sus LMR.

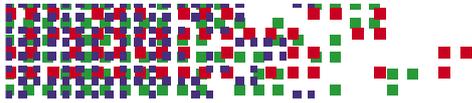
#### 4.4 CONCLUSIONES

- La aplicación de la metodología electroforética más simple, la electroforesis capilar zonal, permite separar exitosamente cinco antibióticos pertenecientes a familias distintas, que presentan propiedades fisicoquímicas diferentes.
- El estudio de potenciales interferencias que podrían encontrarse en muestras de leche, se demostró que la metodología desarrollada es útil para separar CLOR, CPF, AMP, TC y SMX en muestras de leche que sólo contienen los ATB seleccionados, libre de otros ATB.
- La aplicación de diversas metodologías de pre-concentración, dentro y fuera del capilar, a estándares puros y a muestras de leche, permite encontrar la mejor manera de aumentar la sensibilidad de la técnica EC con el objetivo de detectar residuos de CLOR, CPF, AMP y SMX en leche.
- El estudio de las diferentes estrategias para la extracción de residuos de ATB presentes en leche, proporciona una metodología combinada entre un proceso de acondicionamiento mediante el desgrasado de la leche, posterior precipitación de las proteínas y extracción de los ATB mediante extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.
- A pesar de que la eficiencia del proceso de extracción combinado (ELL-EFS) es considerablemente baja, se pueden obtener límites de detección que permiten detectar todos los analitos en estudio en muestras de leche contaminadas con residuos de ATB cuando se encuentren en concentraciones correspondientes a sus LMR.

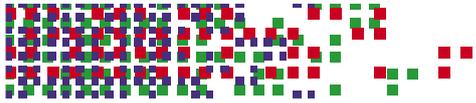


Del presente trabajo de Tesis, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Los métodos analíticos desarrollados por electroforesis capilar o cromatografía líquida de alta resolución, permitieron la determinación simultánea de una amplia variedad de fármacos contenidos en matrices complejas. Asimismo, la utilización de las condiciones electroforéticas y cromatográficas de separación más simples, posibilitó la resolución completa de todos los analitos en tiempos de análisis relativamente bajos.
- La utilización de diversas metodologías de pre-concentración, dentro y fuera del capilar, permitió encontrar la mejor manera de aumentar la sensibilidad de las técnicas aplicadas, con el objetivo de cuantificar cada fármaco en su matriz correspondiente.
- Los métodos de extracción líquido-líquido aplicados, no solo permitieron recuperar satisfactoriamente los analitos EPI, CBZ y CBZ-EP, sino que también transformaron la matriz del suero humano, en una forma compatible con el sistema de análisis. Además, eliminaron eficientemente gran cantidad de compuestos interferentes presentes en la matriz, sin incorporar nuevas interferencias al sistema. La utilización de este tipo de extracción, posibilitó el desarrollo de métodos robustos y reproducibles, a pesar de las variaciones intrínsecas propias de la matriz del suero.
- La utilización de un capilar burbuja e inyección electrocinética amplificada posibilitó la detección y cuantificación de niveles séricos normales de EPI en suero humano, a pesar de que en su proceso de extracción se necesitó de un paso de dilución. Asimismo, la utilización de un estándar interno resultó esencial para disminuir las variabilidades naturales de la EC, mejorando de esta manera la cuantificación de EPI.
- El empleo de la innovadora tecnología de microextracción en fase sólida proporcionó una estrategia para el acondicionamiento y extracción de siete drogas anti-inflamatorias no esteroides y el antiepiléptico carbamazepina en muestras de agua de río. Dicho procedimiento se ajustó a los lineamientos de la química verde en relación a la eliminación del uso de solventes, minimizando de esta manera los riesgos sobre el analista y sobre el medio ambiente.

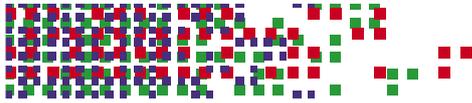


- El estudio de las diferentes estrategias para la extracción de residuos de ATB presentes en leche, proporcionó una metodología combinada entre un proceso de acondicionamiento mediante el desgrasado de la leche, precipitación de las proteínas y extracción de los ATB mediante extracción líquido-líquido y en fase sólida. A pesar de que la eficiencia del proceso de extracción combinado (ELL-EFS) es considerablemente baja, se obtienen límites de detección que permiten identificar todos los analitos en estudio en muestras de leche contaminadas con residuos de ATB, cuando los mismos se encuentran en concentraciones correspondientes a sus LMR.
- La aplicación de técnicas de diseño experimental y optimización multi-respuesta, resulta una herramienta contundente para:
  - a)** seleccionar las variables que afectan la resolución entre los picos de los analitos estudiados, el tiempo de análisis y parámetros electroforéticos como la corriente generada dentro del capilar
  - b)** seleccionar las variables que afectan la eficiencia del proceso de micro-extracción en fase sólida
  - c)** estudiar la robustez del método desarrollado frente a pequeños cambios de las variables seleccionadas
  - d)** resolver un sistema de múltiples respuestas y de esta manera calcular las condiciones experimentales óptimas donde el sistema genera resultados deseables.
- Se evidenció que MCR-ALS es un algoritmo adecuado para procesar datos de segundo orden con distintos grados de solapamiento en la dimensión temporal. En presencia de solapamiento temporal severo, el aumento en la dimensión temporal permitió alcanzar la ventaja de segundo orden, valiéndose de las diferencias espectrales entre el analito y las interferencias, y por lo tanto resolver el sistema de manera satisfactoria. Este hecho convierte a MCR-ALS en una herramienta de gran utilidad ya que permitiría obviar tediosos pasos para lograr la separación completa en sistemas con un alto número de analitos.

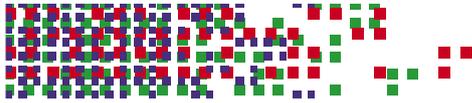


## conclusiones

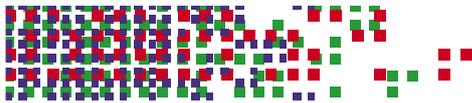
- Se demostró que los métodos analíticos desarrollados pueden ser aplicados en la determinación de EPI en suero humano; en la determinación de siete drogas anti-inflamatorias no esteroideas (naproxeno, ketoprofeno, diclofenac, piroxicam, indometacina, sulindac y diflunisal) y un anticonvulsivo (carbamazepina) presentes en agua de río, en la cuantificación de CBZ en suero humano en presencia de interferencias y en la cuantificación de cinco ATB en leche vacuna aún cuando los mismos se encuentren en concentraciones correspondientes a sus LMR.



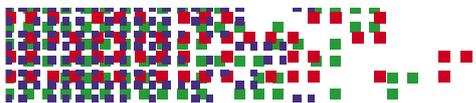
- Abdel-Hamid, M.E.; Phillips, O.A. (2003) LC-MS/MS determination of carbamazepine, pindolol, and theophylline in human serum. *J. Liq. Chromatogr* 26: 1937–1957.
- Ahrer, W.; Scherwenk, E.; Buchberger, W. (2001). Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry *J. Chromatogr. A* 910: 69–78.
- AOAC Official Methods of Analysis (1995). Dairy Products, Chapter 33, p.38–47.
- Armenta, J.; Gu, B., Thulin, C.; Lee, M. (2007). Coupled affinity-hydrophobic monolithic column for on-line removal of immunoglobulin G, preconcentration of low abundance proteins and separation by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1148: 115–122.
- Arthur, C.L.; Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62: 2145–2148.
- Bailón Pérez, M.; Cuadros Rodríguez, L.; Cruces-Blanco, C. (2007). Analysis of different  $\beta$ -lactams antibiotics in pharmaceutical preparations using micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43: 746–752.
- Balizs, G.; Arnold, D. (1989). Reference standards for residue analysis of chloramphenicol in meat and milk: A critical study. *Chromatographia* 27: 489–493.
- Barceló, D. (2003). Emerging pollutants in water analysis. Editorial. *Trends Anal. Chem.* 22: XIV–XVI.
- Barrón, D.; Jiménez-Lozano, E.; Cano, J.; Barbosa, J. (2001). Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis. *J Chromatogr. B* 759: 73–79.
- Beausse, J. (2004). Selected drugs in solid matrices: a review of environmental determination, occurrence and properties of principal substances. *Trends Anal. Chem.* 23: 753–761.
- Becker, M.; Zittlau, E.; Petz, M. (2004). Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 520: 19–32.
- Benavente, F.; Vescina, M.C.; Hernández, E.; Sanz-Nebot, V.; Barbosa, J.; Guzman, N. (2007). Lowering the concentration limits of detection by on-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1140: 205–212.



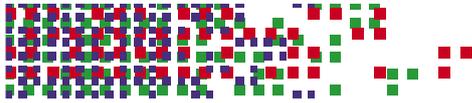
- Bhatti, M.M., Hanson, G.D., Schultz, L. (1998). Simultaneous determination of phenytoin, carbamazepine, and 10,11-carbamazepine epoxide in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. Pharm Biom. Anal.* 16: 1233–1240.
- Bilek, G.; Kremseer, L.; Blaas, D.; Kenndler, E. (2006). Analysis of liposomes by capillary electrophoresis and their use as carrier in electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. B* 841: 38–51.
- Boqué, R. (2005) La selectividad en análisis químico. Grupo de Quimiometría y Cualimetría. Universidad Rovira i Virgili (Tarragona). Disponible en la página web: <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/selectividad.pdf>.
- Bugamelli, F.; Sabbioni, C.; Mandrioli, R.; Kenndler, E.; Albani, F.; Raggi, M.A. (2002) Simultaneous analysis of six antiepileptic drugs and two selected metabolites in human plasma by liquid chromatography after solid-phase extraction. *Anal. Chim Acta* 472: 1–10.
- Bulletin 910 (1998). Guide to solid phase extraction. Supelco-Bellefonte, PA,16823–0048 USA.
- Bulletin 923 (1998). Solid phase microextraction: theory and optimization of conditions. Supelco-Bellefonte, PA,16823–0048 USA.
- Burgi, D.; Chien, R. (1991). Optimization in sample stacking for high-performance capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 63: 2042–2047.
- Buser, H.-R. ; Müller, M.D. ; Theobald, N. (1998-a). Occurrence of the Pharmaceutical Drug Clofibric Acid and the Herbicide Mecoprop in Various Swiss Lakes and in the North Sea. *Environ. Sci. Technol.* 32: 188–192.
- Buser, H.-R. ; Poiger, T. ; Müller, M.D. (1998-b). Occurrence and Fate of the Pharmaceutical Drug Diclofenac in Surface Waters: Rapid Photodegradation in a Lake. *Environ. Sci. Technol.* 32: 3449–3456.
- Buser, H.-R. ; Poiger, T. ; Müller, M.D. (1999). Occurrence and Environmental Behavior of the Chiral Pharmaceutical Drug Ibuprofen in Surface Waters and in Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 33: 2529–2535.
- Cámara, M.S., Mastandrea, C., Goicoechea, H.C. (2005) Chemometrics-assisted simple UV-spectroscopic determination of carbamazepine in human serum and comparison with reference methods. *J. Biochem. Biophys.* 64: 153–166.



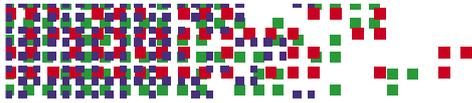
- Chen, C.; Gu, X. (1995). Determination of tetracycline residues in bovine milk, serum and urine by capillary electrophoresis. *J. AOAC* 78: 1369–1377.
- Chen, S.; Lee, M. (2000). Automated instrumentation for comprehensive isotachopheresis-capillary zone electrophoresis. *Anal. Chem.* 72: 816–820.
- Chen, Y.; Lin, C. (1998). Migration behavior and separation of tetracycline antibiotics by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A* 802: 95–105.
- Chien, R. (1991). Mathematical modeling of field-amplified sample injection in high-performance capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 63: 2866–2869.
- Chollet, D.; Castella, E.; Combe, P.; Arnera, V. (1996) High-speed liquid chromatography method for the monitoring of carbamazepine and its active metabolite, carbamazepine-10,11-epoxide, in human plasma. *J. Chromatogr. B* 683: 237–243.
- Código Alimentario Argentino (2006). Capítulo VIII. Artículo 556 - (Res Conj. SPyRS y SAGPA N° 33/2006 y N° 563/2006) referente a alimentos lácteos.
- Cortés-Borrego, P.; López-Pérez, G.; Sierra-Monje, J.; González-Díaz, S.; Canseco-Villareal, J.; Dillman-Arroyo, C.; Domínguez-Henkel, R.; Segovia-Ayala, C. (1998). Estudio comparativo de la eficacia y seguridad de epinastina versus loratadina en el tratamiento de pacientes con rinitis alérgica. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátrica*. Vol. 7: 90–87.
- Currie, L.A. (1995). Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations 1995) *Pure Appl. Chem* 67: 1699 –1723.
- Danzer, D.; Currie, L.A. (1998). Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC Recommendations 1998) *Pure Appl. Chem.* 70: 993–1014.
- Daszykowski, M.; Walczak, B. (2006). Use and abuse of chemometrics in chromatography. *Trends Anal. Chem.* 25: 1081–1096.
- De Juan, A.; Casassas, E.; Tauler, R. (2000). Soft modeling of analytical data in: Meyers, R.A. (Ed.) *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester pp. 9800–9837.
- De Juan, A.; Tauler, R. (2003). Chemometrics applied to unravel multicomponent processes and mixtures. Revisiting latest trends in multivariate resolution. *Anal. Chim. Acta.* 500: 195 – 210.



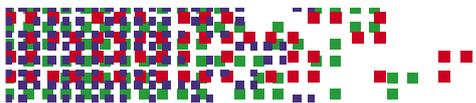
- De Zan, M.M.; Gil García, M.D.; Culzoni, M.J.; Siano, R.G.; Goicoechea, H.C.; Martínez Galera, M. (2008) Solving matrix effects exploiting the second order advantage in the resolution and determination of eight tetracycline antibiotics in effluent wastewater by modelling liquid chromatography data with multivariate curve resolution-alternating least squares and unfolded-partial least squares followed by residual bilinearization algorithms. *J. Chromatogr. A* 1179: 106–114.
- Derringer, G.; Suich, R. (1980). Simultaneous optimization of several response variables. *J. Qual. Technol.* 12, 214–219.
- Díaz-Cruz M.S.; López de Alda, M.J.; Barceló, D. (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends Anal. Chem.* 22: 340–351.
- Dumortier, G.; Pons, D.; Zerrouk, A.; Januel, D.; Saba, G.; Degraassat, K. (2001). Concomitant HPLC method for determination of lamotrigine, carbamazepine and 10,11-carbamazepine epoxide in plasma using dual UV 240-220 nm wavelength detection. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24: 3171–3180.
- Eilers, P.H.C. (2004). Parametric Time Warping. *Anal. Chem.* 76: 404–411.
- Eilers, P.H.C.; Currie, I.D.; Durbán, M. (2006). Fast and compact smoothing on large multidimensional grids. *Comp. Stat. Data Anal.* 50: 61–76.
- Escandar, G.M.; Faber, N.M.; Goicoechea, H.C.; Muñoz de la Peña, A.; Olivieri, A.C.; Poppi, R.J. (2007). Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *Trends Anal. Chem.* 26: 752–765.
- EURACHEM (1993) Guidance Document No. 1/WELAC Guidance Document No. WGD 2. Accreditation for Chemical Laboratories. Guidance on the interpretation of the EN 45000 series of Standard and ISO/IEC Guide 25, Available from the EURACHEM Secretariat, P.O. Box 46, Teddington, Middlesex TW11 ONH, UK.
- Flores, J.; Fernández de Córdoba, M.; a Díaz, A. (2007). Flow-through optosensor combined with photochemically induced fluorescence for simultaneous determination of binary mixtures of sulfonamides in pharmaceuticals, milk and urine. *Anal. Chim. Acta* 600: 164–171.
- Fraga, C.G.; Prazen, B.J.; Synovec, R.E. (2001). Objective Data Alignment and Chemometric Analysis of Comprehensive Two-Dimensional Separations with Run-to-Run Peak Shifting on Both Dimensions. *Anal. Chem.* 73: 5833–5840.



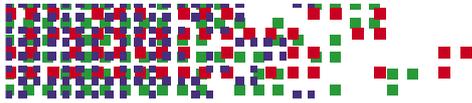
- Franceschi, L.; Furlanut, M. (2005). A simple method to monitor plasma concentrations of oxacarbazepine, carbamazepine, their main metabolites and lamotrigine in epileptic patients. *Pharm. Reserch* 51: 297–302.
- Gómez, M.; Olsina, R.; Martínez, L.; Silva M. (2003). Simultaneous determination of chloramphenicol, salicylic acid and resorcinol by capillary zone electrophoresis and its application to pharmaceutical dosage forms. *Talanta* 61: 233–238.
- Goodman Gilman, A.; Ruddon, R.W.; Molinoff, P.B.; Limbird, L.E.; Hardman, J.G. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, 9<sup>na</sup> edición (1996) Ed. McGraw-Hill Interamericana, México. Sección III: Fármacos con acción en el sistema nervioso central, Capítulo 20: Fármacos eficaces para el tratamiento de la epilepsia: 490–519.
- Guidance for industry. Bioanalytical method validation. (2001). U.S. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration (FDA).
- Guzmán, N. (1993). *Capillary electrophoresis Technologies*. Marcel Dekker Inc., New York.
- Hallbach, J.; Vogel, H.; Guder, W.G. (1997). Determination of lamotrigine, carbamazepine and carbamazepine epoxide in human serum by gas chromatography-mass spectrometry. *Eur J. Clin. Chem. Clin Biochem* 35: 755–759.
- Halling-Sorensen, B.; Nielsen, S.N.; Lanzky, P.F.; Ingerslev, F.; Lutzhoft, H.C.; Jorgensen, S.E. (1998). Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment-A Review. *Chemosphere* 36: 357–393.
- Hanrahan, G.; Montes, R.; Gomez, F.A. (2008). Chemometric experimental design based optimization techniques in capillary electrophoresis: a critical review of modern applications. *Anal. Bional. Chem.* 390: 169–179.
- He, H. X.; Zhou, Y.D.; Li, B.Y.; Li, X.L. (2005). Determination of epinastine hydrochloride in human plasma by RP-HPLC. *Chin. Pharm. J.* 40: 849–851.
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicol. Lett.* 131: 5–17.
- Heiger, D. (2000) *High performance capillary electrophoresis—An introduction*. Hewlett–Packard Agilent Technologies.



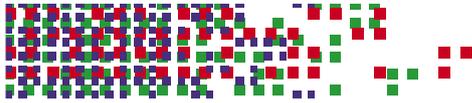
- Hernández, M.; Borrull, F.; Calull, M. (2003). Analysis of antibiotics in biological samples by capillary electrophoresis. *Trends in Anal. Chem.* 22: 416–427.
- Hernández-Borges, J.; Borges-Miguel, T.; Rodríguez-Delgado, M.; Cifuentes, A. (2007). Sample treatments prior to capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1153: 214–226.
- Heyden, Y.V.; Nijhuis, A.; Smeyers-Verbeke, J.; Vanderginste, B.G.M.; Massart, D.L. (2001). Guidance for robustness/ruggedness tests in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24: 723–753.
- Hows, M.; Perrett, D.; Kay, J. (1997). Optimization of a simultaneous separation of sulfonamides, dihydrofolate reductase inhibitors and  $\beta$ -lactam antibiotics by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 768: 97–104.
- Hubert, Ph.; Chiap, P.; Crommen, J.; Boulanger, B.; Chapuzet, E.; Mercier, N.; Bervoas-Martin, S.; Chevalier, P.; Grandjean, D.; Lagorce, P.; Lallier, M.; Laparra, M.C.; Laurentie, M.; Nivet, J.C. (1999) The SFSTP guide on the validation of chromatographic methods for drugs bioanalysis: from the Washington Conference to the Laboratory. *Analytica Chimica Acta* 391: 135–148.
- Huppert, N., Würtele, M., Hahn, H.H. (1998). Determination of the plasticizer N-butylbenzenesulfonamide and the pharmaceutical Ibuprofen in wastewater using solid phase microextraction (SPME). *Fres. J. Anal. Chem.* 362: 529–536.
- ICH (1994). Harmonised Tripartite Guideline, Q2A and Q2B, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human use.
- Index Merck (2001). Thirteenth Edition. New Jersey. USA.
- Ivanova, M.; Marziali, E.; Raggi, M.A.; Kenndler, E. (2002). Microemulsion electrokinetic chromatography for the separation of carbamazepine, oxacarbazepine, and their metabolites. *J. Sep. Sci.* 25: 863–871.
- Ivanova, M.; Piunti, A.; Marziali, E.; Komarova, N.; Raggi, M.A.; Kenndler, E. (2003). Microemulsion electrokinetic chromatography applied for separation of levetiracetam from other antiepileptic drugs in polypharmacy. *Electrophoresis* 24: 992–998.
- Izzo, G.; Raggi, M.A.; Maichel, B.; Kenndler, E. (2001) Separation of olanzapine, carbamazepine and their main metabolites by capillary electrophoresis with pseudo-stationary phases. *J. Chromatogr. B* 752: 47–53.



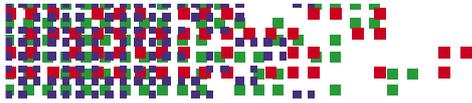
- Jaumot, J.; Gargallo, R.; De Juan, A.; Tauler, R. (2005). A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76: 101 – 110.
- Jeannot, M.; Cantwell, F. (1996). Solvent microextraction into a single drop. *Anal. Chem.* 68: 2236–2240.
- Jiao, L.; Gao, S.; Zhang, F.; Li, H. (2008). Quantification of components in overlapping peaks from capillary electrophoresis by using continuous wavelet transform method. *Talanta* 75: 1061–1067.
- Jjemba, P.K. (2006). Excretion and ecotoxicity of pharmaceutical and personal care products in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 113–130.
- José Gómez, M.; Petrovic, M.; Fernández Alba, A.; Barceló, D. (2006). Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewater. *J. Chromatogr. A* 1114: 224–233.
- Junting, L.; Peng, C.; Suzuki, O. (1998). Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forensic Science International* 97: 93–100.
- Kaczmarek, K.; Walczak, B.; de Jong, S.; Vandeginste, B.G.M. (2005). Baseline reduction in two dimensional gel electrophoresis images. *Acta Chromatogr.* 15: 82–95.
- Kan, C.; Petz, M. (2000). Residues of Veterinary Drugs in Eggs and Their Distribution between Yolk and White. *J. Agric. Food Chem.* 48: 6397–6403.
- Kanazawa, H.; Kizu, J.; Matsushima, Y. (2000). Simultaneous determination of theophylline and its metabolites by HPLC. *Yakugaku Zasshi* 120: 1051-1060.
- Kataoka, H. (2003). New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends Anal. Chem.* 22: 232–244.
- Khoschsorur, G.A.; Fruehwirth, F.; Halwachs-Baumann, G. (2001). Simple and rapid HPLC method for the simultaneous determination of multiple antiepileptic drugs in human serum. *Chromatographia* 54: 345–349.
- Koesukwiwat, U.; Jayanta, S.; Leepipatpiboon, N. (2007). Solid-phase extraction for multiresidue determination of sulfonamides, tetracyclines and pyrimethamine in Bovine's milk. *J. Chromatogr. A* 1149: 102–111.



- Kosjek, T.; Heath, E.; Krbavcic, A. (2005). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environment International* 31: 679–685.
- Kuldvee, R.; Thormann, W. (2001) Determination of carbamazepine and carbamazepine-10,11-epoxide in human serum and plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography in the absence of electroosmosis. *Electrophoresis* 22: 1345–1355.
- Kumazawa, T.; Lee, X.P.; Sato, K.; Suzuki, O. (2003). Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis. *Anal. Chim. Acta* 492: 49–67.
- la Farré, M.; Ferre, I.; Ginebreda, A.; Figueras, M.; Olivella, L.; Tirapu, L.; Vilanova, M.; Barceló, D. (2001). Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *J. Chromatogr. A* 938: 187–197.
- Lamas, J.P.; Salgado-Petinal, C.; García Jares, C.; Llompant, M.; Cela, R.; Gómez, M. (2004). Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. *J. Chromatogr. A* 1046: 241–247.
- Lancas, F.M.; Sozza, M.A.; Queiroz, M.E.C. (2003). Simultaneous plasma lamotrigine analysis with carbamazepine, carbamazepine-10,11-epoxide, primidone, phenytoin, phenobarbital, and PEMA by micellar electrokinetic capillary chromatography (MECC). *J. Anal. Toxicol.* 27: 304–308.
- Lara, F.; García-Campaña, A.; Alés-Barrero, F.; Bosque-Sendra, J.; García-Ayuso, L. (2006). Multiresidue method for the determination of quinolone antibiotics in bovine raw milk by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 78: 7665–7673.
- Lee, K.J.; Heo, G.S.; Kim, N.J.; Moon, D.C. (1992). Analysis of antiepileptic drugs in human plasma using micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr.* 608: 243–250.
- Lensmeyer, G.L.; Gidel, B.E.; Wiebe, D.A. (1997). Optimized high-performance liquid chromatographic method for the determination of lamotrigine in serum with concomitant determination of phenytoin, carbamazepine, and carbamazepine epoxide. *Ther. Drug Monit.* 19: 292–300.
- Li, H.; Hou, J.; Wang, K.; Zhang, F. (2006). Resolution of multicomponent overlapped peaks: A comparison of several curve resolution methods. *Talanta* 70: 336–343.
- Li, H.; Zhang, F.; Havel, J. (2003). Quantification of analytes in overlapping peaks from capillary electrophoresis using multivariate curve resolution-alternating least squares methods. *Electrophoresis* 24: 3107–3115.

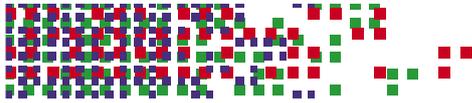


- Lin, C.; Lin, W.; Chen, Y.; Wang, S. (1997). Migration behavior and selectivity of sulfonamides in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 792: 37–47.
- Liu W.; Hu, Y.; Zhao, J.; Xu, Y.; Guan, Y. (2006). Physically incorporated extraction phase of solid-phase microextraction by sol-gel technology. *J. Chromatogr. A* 1102: 37–43.
- Lloyd, D. (1996). Capillary electrophoretic analysis of drugs in body fluids: sample pretreatment and methods for direct injection of biofluids. *J. Chromatogr. A* 735: 29–42.
- Makino, K.; Goto, Y., Sueyasu, M.; Futagami, K.; Kataoka, Y.; Oishi, R. (1997) Micellar electrokinetic chromatography for therapeutic drug monitoring of zonisamide. *J. Chromatogr. B* 695: 417–425.
- Mandrioli, R.; Albani, F.; Casamenti, G.; Sabbioni, C.; Raggi, M.A. (2001) Simultaneous high-performance liquid chromatography determination of carbamazepine and five of its metabolites in plasma of epileptic patients. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.* 762: 109–116.
- Marazuela, M.; Moreno-Bondi, M. (2004). Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A* 1034: 25–32.
- Marziali, E.; Raggi, M.A.; Komarova, N.; Kenndler, E. (2002). Octakis-6-sulphato-gamma-cyclodextrin as additive for capillary electrokinetic chromatography of dibenzoazepines, carbamazepine, oxacarbazepine and their metabolites. *Electrophoresis* 23: 3020–3026.
- Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Buydens, L.M.C.; De Jong, S.; Lewi, P.J.; Smeyers-Verbeke, J. (1997) *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Chapter 8: Straight Line Regression and Calibration.* Elsevier. Amsterdam. The Netherlands.
- Matar, K.M.; Nicholls, P.J.; Tekle, A.; Bawazir, S.A.; Al-Hassan, M.I. (1999). Liquid chromatographic determination of six antiepileptic drugs and two metabolites in microsamples of human serum. *Ther. Drug Monit.* 21: 559–566.
- Meetschen, U.; Petz, M. (1990). Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk. *J. AOAC* 73: 373–379.
- Meier, P.; Thormann, W. (1991). Determination of thiopental (thiopentone) in human serum and plasma by high-performance capillary electrophoresis-micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr.* 559: 505–513.

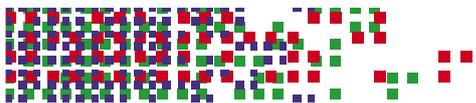


## referencias

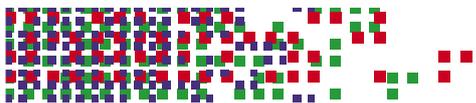
- Mellgren, C.; Sternesjö, A. (1998). Optical immunosensor assay for determining enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk. *J. AOAC* 81: 394–397.
- Meyer, V.R. (2002). Minimizing the effect of sample preparation on measurement uncertainty. *LC.GC Europe*. 15: 398–404.
- Miller, J.C.; Miller, J.N. (2002). *Estadística y quimiometría para química analítica*. Capítulo 5: Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación. Cuarta edición. Prentice Hall. Pearson Education S.A.
- Mitani, K.; Kataoka, J. (2006). Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 562: 16–22.
- Moats, W.; Romanowski, R. (1998). Multiresidue determination of  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and tissues with the aid of high-performance liquid chromatographic fractionation for clean-up. *J. Chromatogr. A* 812: 237–247.
- Moeder, M.; Schrader, S. (2000). Solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry of biologically active substances in water samples. P. Popp, J. *Chromatogr. A* 873: 95–106.
- Montgomery D.C. (1991). *Diseño y análisis de experimentos*. Capítulo 1: introducción, Capítulo 16: Métodos y Diseños de Superficie de Respuesta. Grupo Editorial Iberoamérica México.
- Moore Jr.; A.W., Jorgenson, J.W. (1995). Comprehensive Three-Dimensional Separation of Peptides Using Size Exclusion Chromatography/ Reversed Phase Liquid Chromatography/Optically Gated Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* 67: 3456–3463.
- Muñoz, G.; De Juan A. (2007). pH- and time-dependent hemoglobin transitions: A case study for process modelling. *Anal. Chim. Acta*. 595: 198 – 208.
- Musteata, F.M., Pawliszyn, J. (2007). Bioanalytical applications of solid-phase microextraction. *Trens in Analytical Chemistry* 26: 36-45.
- Myers, R.H.; Montgomery D. (1995). *Response Surface Methodology*. Capítulo 6: The analysis of Response Surfaces. A.Wiley–Interscience. Publication JOHN WILEY and SONS. INC.



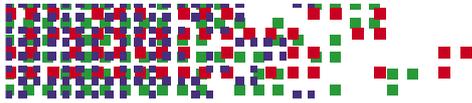
- Nicolish, R.; Werneck-Barroso, E.; Sípoli Marques, M. (2006). Food safety evaluation: Detection and confirmation of chloramphenicol in milk by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 565: 97–102.
- Nishi, H.; Kuwahara, Y. (2002). Enantiomer separation by capillary electrophoresis utilizing carboxymethyl derivatives of polysaccharides as chiral selectors. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 27: 577–585.
- Novales, S.; Ramos-Garibay, A.; Pérez, A.; Ocampo, C.; González, R.; Domínguez-Henkel, R.; Segovia-Ayala, C. (1998). Estudio doblemente a ciegas para evaluar la eficacia y seguridad de epinastina vs placebo en el tratamiento de la dermatitis por contacto. *Alergia, Asma e Inmunología Pediátricas*. Vol 7: 98–106.
- Nozal, L.; Arce, L.; Simonet, B.M.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (2006). New supported liquid membrane-capillary electrophoresis in-line arrangement for direct selective analysis of complex sample. *Electrophoresis* 27: 3075–3085.
- Nozal, L.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (2004). Development of a screening method for analytical control of antibiotic residues by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Anal. Chim. Acta* 523: 21–28.
- Ocampo Camberos, L. *Farmacología veterinaria* (3ª ed.) McGraw-Hill / Interamericana de México Disponible en la página web: <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia.pdf>.
- Ogiso, T.; Kasutani, M.; Tanaka, H.; Iwaki, M.; Tanino, T. (2001). Pharmacokinetics of epinastine and a possible mechanism for double peaks in oral plasma concentration profiles. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 790–794.
- Ohtani, H.; Kotaki, J.; Sawada, Y.; Iga, T. (1996). Quantitative determination of epinastine in plasma by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 683: 281–284.
- Öllers, S.; Singer, H.P.; Fässler P.; Müller, S.R. (2001). Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. *J. Chromatogr. A* 911: 225–234.
- Palmer, C.; McCarney, J. (2004). Developments in the use of soluble ionic polymers as pseudo-stationary phases for electrokinetic chromatography and stationary phase for electrochromatography *J. Chromatogr. A* 1044: 159–176.



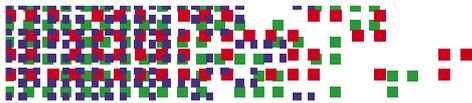
- Palmer, J.; Munro, N.; Landers, J. (1999). A universal concept for stacking neutral analytes in micellar capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* 71: 1679–1687.
- Paschke, A. (2003). Consideration of the physicochemical properties of sample matrices-an important step in sampling and sample preparation. *Trends Anal. Chem.* 22: 78–89.
- Patil, K.M.; Bodhankar, S.L. (2005) Simultaneous determination of lamotrigine, phenobarbitone, carbamazepine and phenytoin in human serum by high-performance liquid chromatography. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 39: 181–186.
- Pavlovic, D.M.; Babic, S.; Horvat, A.J.M.; Kastelan-Macan, M. (2007). Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends Anal. Chem.* 26: 1062–1075.
- Pawliszyn, J. (2002). Sampling and sample preparation for field and laboratory: Fundamentals and new directions in sample preparation. *Comprehensive Anal. Chem.* Vol. 37, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
- Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K.E. (2005). Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. *J. Chromatogr. B* 817: 3–12.
- Petersson, M.; Wahlund, K-G.; Nilsson, S. (1999). Miniaturised on-line solid-phase extraction for enhancement of concentration sensitivity in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 841: 249–261.
- Petrovic M.; Eljarrat E.; López de Alda M.J.; Barceló D. (2004). Endocrine disrupting compounds and other emerging contaminants in the environment: A survey on new monitoring strategies and occurrence data. *Anal. Bioanal. Chem.* 378: 549–562.
- Petrovic, M.; González, S.; Barceló, D. (2003). Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *Trends in Analytical Chemistry* 22: 685–696.
- Potter, J.M.; Donnelly, A. (1998). Carbamazepine-10,11-epoxide in therapeutic drug monitoring. *Ther. Drug Monit.* 20: 652–657.
- Prazen, B.J.; Synovec, R.E.; Kowalski, R.B. (1998). Standardization of Second-Order Chromatographic/Spectroscopic Data for Optimum Chemical Analysis. *Anal. Chem.* 70: 218–225.
- Pucci, V.; Kenndler, E.; Raggi, M.A. (2003). Quantitation of oxcarbazepine and its metabolites in human plasma by micellar electrokinetic chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 17: 231–238.



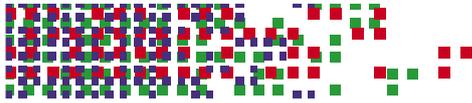
- Pucci, V.; Raggi, M.A. (2005) Analysis of antiepileptic drugs in biological fluids by means of electrokinetic chromatography. *Electrophoresis* 26:767–782.
- Puig, P.; Borull, F.; Calull, M.; Aguilar, C. (2007). Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-EC). *Trend Anal. Chem.* 26: 664–678.
- Puig, P.; Borull, F.; Calull, M.; Benavente, F.; Sanz-Nebot, V.; Barbosa, J.; Aguilar, C. (2007). Improving the sensitivity of the determination of ceftiofur by capillary electrophoresis in environmental water samples: In-line solid phase extraction and sample stacking techniques. *Anal. Chim Acta.* 587: 208–215.
- Qiang, Z.; Adams, C. (2004). Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water Research* 38: 2874–2890.
- Queiroz, M.E.C.; Carrilho, E.; Carvalho, D.; Lancas, F.M. (2001). Comparison of high-resolution gas chromatography and high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of lamotrigine and carbamazepine in plasma. *Chromatographia* 53: 485–489.
- Queiroz, M.E.C.; Silva, S.M.; Carvalho, D.; Lancas, F.M. (2002-a). Solid-phase microextraction-liquid chromatography (SPME-LC) determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine and carbamazepina 10, 11-epoxide in human plasma. *J. Sep. Science* 25: 91–95.
- Queiroz, M.E.C.; Silva, S.M.; Carvalho, D.; Lancas, F.M. (2002-b). Determination of lamotrigine simultaneously with carbamazepine, carbamazepine epoxide, phenytoin, Phenobarbital, nad primidone in human plasma by SPME-GC-TSD. *J. Chrom. Science* 40: 219–223.
- Quirino, J.; Dulay, M.; Zare, R. (2001). On-line preconcentration in capillary electrochromatography using a porous monolith together with solvent gradient and sample stacking. *Anal. Chem.* 73: 5557–5563.
- Quirino, J.; Otsuka, K.; Terabe, S. (1998). On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography VI. Stacking using reverse migrating micelles and a water plug. *J. Chromatogr. B* 714: 29–38.
- Quirino, J.; Terabe, S. (1997). On-line concentration of neutral analytes for micellar electrokinetic chromatography I. Normal stacking mode. *J. Chromatogr. A* 781: 119–128.
- Quirino, J.; Terabe, S. (1999). Sweeping of analytes zones in electrokinetic chromatography. *Anal. Chem.* 71: 1638–1644.



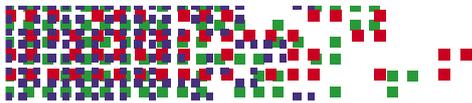
- Quirino, J.P.; Terabe, S. (2000). Sample stacking of cationic and anionic analytes in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 902: 119–135.
- Raggi, M.A.; Pucci, V.; Maurizio, A.; Muzikar, J.; Kenndler, E. (2002) Separation of carbamazepina and five metabolites, and analysis in human plasma by micellar electrokinetic capillary chromatography. *J. Chromatogr. B* 770: 217–225.
- Ramachandran, S.; Underhill, S.; Jones, S.R. (1994). Measurement of lamotrigine under conditions measuring phenobarbitone, phenytoin and carbamazepine using reversed-phase high-performance liquid chromatography at dual wavelength. *Ther. Drug Monit.* 16: 75–82.
- Ramautar, R.; Demirci, A.; de Jong, G.J. (2006). Capillary electrophoresis in metabolomics. *Trends Anal. Chem.* 25: 455–466.
- Ramírez, A.; Gutiérrez, R.; González, C.; Escobar, I.; Castro, G.; Díaz, G.; Noa, M. (2001). Detección de antibióticos en leche comercializada en la ciudad de México. *Rev. Salud Anim.* Vol. 23: 37–41.
- Rasmussen, K.E.; Pedersen-Bjergaard, S. (2004). Developments in hollow fibre-based, liquid phase microextraction. *Trends Anal. Chem.* 23: 1–10.
- Rezaei, Z.; Hemmateenejad, B.; Khabnadideh, S.; Gorgin, M. (2005) Simultaneous spectrophotometric determination of carbamazepine and phenytoin in serum by PLS regression and comparison with HPLC. *Talanta* 65: 21–28.
- Rinke, T.; Riik, H. (2006). Determination of antibiotic residues and their interaction in milk with lactate biosensor. *J. Biochemical and Biophysical methods* 66: 12–21.
- Roberts, P.; Thomas, K.V. (2006). The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluent and surface waters of the Tyne catchment. *Science of the total Environment* 356: 143–153.
- Rodríguez, I.; Carpinteiro, J.; Quintana, J.B.; Carro, A.M.; Lorenzo, R.A.; Cela, R. (2004). Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples. *J. Chromatogr. A* 1024: 1–8.
- Rubinson, J.F.; Rubinson, K. (2000). *Química analítica Contemporánea*. Capítulo 4: Tratamiento de la muestra, interferencias y estándares. Primera Edición.
- Ruckebusch, C. ; De Juan, A. ; Duponchel, L. ; Huvenne, J.P. (2006). Matrix augmentation for breaking rank-deficiency: A case study. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 80: 209–214.



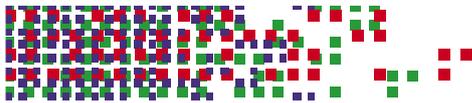
- Saavedra, L.; Maeso, N.; Cifuentes, A.; Barbas, C. (2007). Development of a frit-free SPE-based in-column preconcentration system for capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44: 471–476.
- Salgado-Petinal, C.; Lamas, J. P.; García-Jares, C.; Llompart, M.; Cela, R. (2005). Rapid screening of selective serotonin re-uptake inhibitors in urine samples using solid-phase microextraction gas chromatography–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 382: 1351–1359.
- Santos, B.; Lista, A.; Simonet, B.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (2005). Screening and analytical confirmation of sulfonamide residues in milk by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26: 1567–1575.
- Santos, B.; Simonet, B.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (2004). Rapid determination of aliphatic amines in water samples by pressure-assisted monolithic octadecylsilica capillary electrochromatography-mass spectrometry. *Electrophoresis* 25: 3231–3236.
- Santos, B.; Simonet, B.M.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (2006). Automatic sample preparation in commercial capillary-electrophoresis equipment. *Trend Anal. Chem.* 25: 968–976.
- Santos, J. L.; Aparicio, I.; Alonso, E.; Callejón, M. (2005). Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors. *Anal. Chim. Acta* 550: 116–122.
- Santos, S.; Henriques, M.; Duarte, A.; Esteves, V. (2007). Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta* 71: 731–737.
- Sarashina, A.; Tatami, S.; Yamamura, N.; Tsuda, Y.; Igarashi, T. (2004). Population pharmacokinetics of epinastine, a histamine H1 receptor antagonist, in adults and children. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 59: 43–53.
- Sentellas, S.; Saurina, J. (2003). Chemometrics in capillary electrophoresis. Part B: Methods for data analysis. *J. Sep. Sci.* 26: 1395–1402.
- Sentellas, S.; Saurina, J.; Hernández-Cassou, S.; Galceran, M.T.; Puignou, L. (2001). Resolution and quantification in poorly separated peaks from capillary zone electrophoresis using three-way data analysis methods. *Anal. Chim. Acta* 431: 49–58.



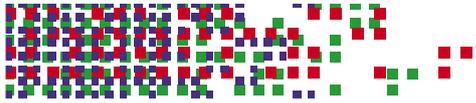
- Shihabi, Z. (1996). Peptide stacking by acetonitrile-salt mixtures for capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 744: 231–240.
- Simonet, B.M.; Ríos, A.; Valcárcel, M. (2003). Enhancing sensitivity in capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.* 22: 605–614.
- Smith, C.M., Reynard, A.M. (1993) *Farmacología*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Capítulo II Fármacos que actúan en los sitios sinápticos y neuroefectores, Sub-capítulo 14 Fármacos adrenérgicos, pp. 152–178; Capítulo III Fármacos que actúan sobre el sistema sensorial y nervioso central; Sub-capítulo 23 Fármacos utilizados en el tratamiento de la epilepsia, pp. 318–336; Capítulo IV Autacoides y fármacos anti-inflamatorios, Sub-capítulo 28 Inflamación y fármacos anti-inflamatorios no esteroides, pp. 394–423; Capítulo XI: Aspectos terapéuticos seleccionados Sub-capítulo 62 Farmacoterapia del asma, pp. 985–1000.
- Smith, R.M. (2003). Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr. A* 1000: 3–27.
- Sorensen L.; Rasmussen, B.; Boison, J.; Keng, L. (1997). Simultaneous determinations of six penicillins in cow's raw milk by a multiresidue high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr. B* 694: 383–391.
- Sorensen, L.; Snor, L. (2000). Determination of cephalosporines in raw bovine milk by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr A* 882: 145–151.
- Spencer, B.J.; Zhang, W.B.; Purdy, W.C. (1997). Capillary- electrophoretic separation of tricyclic antidepressants using charged carboxymethyl-beta-cyclodextrin as a buffer additive. *Electrophoresis* 18: 736–744.
- Spisso, B.; Olivera e Jesus, A.; Gonçalves de Araújo Júnior, M.; Alves Monteiro, M. (2007). Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk. *Anal. Chim. Acta* 581: 108–117.
- Stumpf, M.; Ternes, T.A.; Haberer, K.; Seel, P.; Bauman W. (1996). Proof of medicine remains in purification plants and assembly-line waters. *Vom Wasser* 86: 291–303.
- Svec, F. (2006). Less common applications of monoliths: Preconcentration and solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B* 841: 52–64.
- Tempels, F.; Underberg, W.; Somsen, G.; de Jong, G. (2008). Design and applications of coupled SPE-CE. *Electrophoresis* 29: 108–128.



- Ternes, T.A.; Hirsch, R.; Mueller, J.; Haberer, K. (1998) Methods for the determination of neutral drugs as well as betablockers and beta-2 sympathomimetics in aqueous matrices using GC/MS and LC/MS/MS. *Fres. J. Anal. Chem.* 362: 329–340.
- Thormann, W.; Theurillat, R.; Wind, M. Kuldvee, R. (2001) Therapeutic drug monitoring of antiepileptics by capillary electrophoresis. Characterization of assays via analysis of quality control sera containing 14 analytes. *J. Chromatogr. A* 924: 429–437.
- Tjornelund, J.; Honoré Hansen, S. (1997). Use a metal complexation in non-aqueous capillary electrophoresis systems for the separation and improved detection of tetracyclines. *J. Chromatogr. A* 779: 235–243.
- Ulrich, S. (2000). Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J. Chromatogr. A* 902: 167–194.
- Van Hoof, N.; De Wasch, K.; Okerman, L.; Reybroeck, W.; Poelmans, S.; Noppe, H.; De Brabander, H. (2005). Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products. *Anal. Chim. Acta* 529: 265–272.
- Van Rooyen, G.F.; Badenhorst, D.; Swart, K.J.; Hundt, H.K.L.; Scanes, T.; Hundt, A.F. (2002) Determination of carbamazepine and carbamazepine 10,11-epoxide in human plasma by tandem liquid chromatography-mass spectrometry with electrospray ionization. *J. Chromatogr. B* 769: 1–7.
- Vargas Mamani, M.; Amaya Faryán, J.; Reyes Reyes, F.; Rath, S. (2006). Simultaneous determination of tetracyclines in pharmaceuticals by CZE using experimental design. *Talanta* 70: 236–243.
- Vargas Mamani, M.; Amaya-Farfán, J.; Reyes Reyes, F.; Fracassi da Silva, J.; Rath, S. (2008). Use of experimental design and effective mobility calculations to develop a method for the determination of antimicrobials by capillary electrophoresis. *Talanta* 76: 1006–1014.
- Varian Analytical Instruments (2001-2002). Chromatography and Spectrometry supplies.
- Verenitch, S.; Lowe, C.J.; Mazmder, A. (2006). Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1116: 193–203.
- Visser, N.; van Harmelen, M.; Lingeman, H.; Irth, H. (2003). On-line SPE-CE for the determination of insulin derivatives in biological fluids. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 33: 451–462.



- Vizioli, N.; Rusell, M.L.; Carducci, C. (2004). On-line preconcentration capillary electrophoresis for purity profiling of synthetic peptides. *Anal. Chim. Acta* 514: 167–177.
- Wardencki, W.; Curylo, J.; Namiesnik, J. (2007). Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70: 275–288.
- Wey, A.B.; Thormann, W. (1999). Head-column field-amplified sample stacking in binary-system capillary electrophoresis: The need for the water plug. *Chromatographia* 49: S12-S20.
- Windig, W.; Guilment J. (1991). Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal. Chem.* 63; 1425–1342.
- Wu, X-Z. (2003). New approaches to sample preparation for capillary electrophoresis. *Trends Anal. Chem.* 22: 48–58.
- Yu, C.; Davey, M.; Svec, F.; Fréchet, J. (2001). Monolithic porous polymer for on-chip solid phase extraction and preconcentration prepared by photoinitiated in situ polymerization within a microfluidic device. *Anal. Chem.* 73: 5088–5096.
- Yu, Z.; Peldszus, S.; Huck, P.M. (2007). Optimizing gas chromatographic–mass spectrometric analysis of selected pharmaceuticals and endocrine-disrupting substances in water using factorial experimental design. *J. Chromatogr. A* 1148: 65–77.
- Zhang, F.; Li, H. (2006). Resolution of overlapping capillary electrophoresis peaks by using chemometric analysis: Improved quantification by using internal standard. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 82: 184–192.
- Zhang, M.; Wei, F.; Zhang, Y-F; Nie, J.; Feng, Y-Q. (2006-a). Novel polymer monolith microextraction using a poly(methacrylic acid-ethylene glycol dimethacrylate) monolith and its application to simultaneous analysis of several angiotensin II receptor antagonists in human urine by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A* 1102: 294–301.
- Zhang, M.; Xie, J.; Zhou, Q.; Chen, G.; Liu, Z. (2003). On-line solid-phase extraction of ceramides from yeast with ceramide III imprinted monolith. *J. Chromatogr. A* 984: 173–183.
- Zhang, Y.; Li, H.; Hou, A.; Havel, J. (2006-b). Artificial neural networks based on principal component analysis input selection for quantification in overlapped capillary electrophoresis peaks. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 82: 165–175.



## referencias

- Zhou, X.; Zhu, D.; Tang, Y.; Jia, L. (2008). Development and application of a capillary electrophoresis-electrochemiluminiscent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk. *Talanta* 75: 1300–1306.
- Zorita, S.; Barri, T.; Mathiasson, L. (2007). A novel hollow-fibre microporous membrane liquid–liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1157: 30–37.