

10524  
55



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

ESTADO DE ESTUDIOS  
CUAUTITLAN

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLAN**

ESTADO DE ESTUDIOS  
CUAUTITLAN

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE PROCESOS FARMACÉUTICOS:**

**" DESARROLLO DE UN METODO ANALÍTICO PARA DETERMINAR  
SULFAMETAZINA EN HECES DE CABRA POR ELECTROFORESIS  
CAPILAR "**

**INFORME DE SERVICIO SOCIAL**

**T I T U L A C I O N**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :**

**QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLÓGICA**

**P R E S E N T A :**

**MARIA KARINA SANDOVAL GUERRERO**

**ASESORES DRA. Ma. GABRIELA VARGAS MARTINEZ  
DRA. RAQUEL LOPEZ ARELLANO**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO.

2003

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

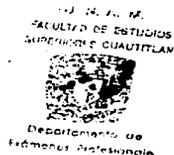
**TESIS CON  
FALLA DE  
ORIGEN**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN**  
**UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR**  
**DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

**TESIS CON FALLA DE ORIGEN**

**ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS**



**DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN**  
**P R E S E N T E**

**ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares**  
**Jefe del Departamento de Exámenes**  
**Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicarle a usted que revisamos:

El Informe de Servicio Social: Desarrollo y Validación de Procesos Farmacéuticos: "Desarrollo de un Método Analítico para determinar Sulfametazina en Heces de Cabra por Electroforesis Capilar".

que presenta la pasante: María Karina Sandoval Guerrero  
 con número de cuenta: 9656522-9 para obtener el título de:  
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 09 de Enero de 2003.

PRESIDENTE	<u>Q.M. Cecilia González Ibarra</u>	
VOCAL	<u>D.E.S.S. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Raquel López Arellano</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>Q.F.H. Héctor Coss Garduño</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>M. en C. Julio C. Botello Pozos</u>	

## AGRADECIMIENTOS.

A DIOS, por regalarme la vida, y permitirme cumplir una de las más grandes metas, y porque se que siempre esta conmigo.

Con mucho cariño a mis Padres: Misael e Isabel porque han hecho de mi lo que soy a quienes quiero con toda mi alma , y porque se que siempre contare con su apoyo y sobre todo por ese gran sacrificio, su gran amor y por esa confianza que siempre me han brindado de todo corazón, Gracias.

A mis Hermanos, Adán y Paúl por su apoyo incondicional, para lograr este objetivo en mi vida, por todos esos momentos tristes y alegres que hemos compartido, espero que siempre sigan adelante, los quiero mucho.

A mis dos nenucos, Karen y Emmitt porque se que en un futuro superen lo que yo he logrado.

A mis cuñadas Areli y Fabiola, quienes ya forman parte de mi vida, y porque sepan comprender a mis hermanos.

A mis abuelitos, tíos y primos, que de alguna manera me impulsaron y retaron a que diera este gran paso en mi vida, especialmente a Antonio G. (q.e.p.d), que a pesar de que ya no estas aprendí mucho de ti y porque me dejaste un gran ejemplo a seguir, y a tía Mago G. (q.e.p.d), porque se que tu también estarías orgullosa de mi.

A la Dra. Gaby, de manera muy especial , te agradezco el apoyo y confianza que en todo momento me brindaste , por tus tan valiosos consejos y conocimientos, y sobre todo por brindarme tu amistad, Gracias.

A la Dra. Alma Revilla y la Dra. Raquel López, quienes también me brindaron su amistad y por sus grandes aportaciones para la elaboración de esta tesis.

A todos mis amigos de la generación 23ava. Con quienes compartí momentos inolvidables en especial a Pako, Arturo, Xavier, Judit, Fili, Gaby, Marú, Gerardo, Elías, Nancy, Cristina, Adriana, Maclein y los caninos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Y un muy especial agradecimiento a:

Gris, Chio y a ti Paty porque ocupan un lugar muy especial en mi vida, gracias por su amistad y sus tan valiosos consejos que me ayudaron para culminar este trabajo y por aquellos tantos momentos inolvidables y por los que vendrán.

A todos los chicos del L-101, quienes también estuvieron conmigo este tiempo, porque aprendí de ustedes y por ser mis amigos: Rubencio, Toño, Olivier, Greta, Miriam, Luz y Ernesto.

A mis sinodales, por el tiempo que me regalaron, por sus consejos tan valiosos.

A Enrique Amador, porque eres una gran persona y un gran amigo, gracias por tus consejos y los tips que me diste sobre mi trabajo.

A el profesor Juan José, que me permitió ser parte del LEM- F por sus regaños y bromas, que hicieron que mi estancia fuera más feliz.

A Tere, gracias por todas las facilidades que me diste, porque en todo momento me ayudaste y sobre todo por haberme brindado tu amistad.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme forjarme en ella y por poder haber sido Universitaria, siempre estaré orgullosa de ello.

Sinceramente:

Karina

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

VUELVE A EMPEZAR

Aunque sientas el cansancio,  
Aunque el triunfo te abandone,  
Aunque un error te lastime,  
Aunque un negocio se quiebre,  
Aunque una traición te hiera,  
Aunque una ilusión se apague,  
Aunque el dolor quemc tus ojos,  
Aunque ignoren tus esfuerzos,  
Aunque la ingratitud sea la paga,  
Aunque todo parezca nada,

VUELVE A EMPEZAR.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE GENERAL

INDICE GENERAL	i
I INTRODUCCIÓN	1
II OBJETIVOS	
2.1 Objetivo General	3
2.2 Objetivos Particulares	3
2.3 Objetivo Académico	4
2.4 Objetivo Social	4
III MARCO TEORICO	
3.1 Características generales de la Sulfametazina	5
3.1.1 Nombre, fórmula condensada estructura y Sinónimos.	5
3.1.2 Propiedades físicoquímicas	6
3.1.3 Actividad Farmacológica	7
3.1.2 Generalidades de Electroforesis Capilar (E.C.)	
3.1.2.1 Definición de Electroforesis Capilar	8
3.1.2.2 Historia de la Electroforesis Capilar	8
3.1.2.3 Equipo de Electroforesis Capilar	9
3.1.2.1 Descripción General	9
3.1.2.4 Fundamento de la técnica	12
3.1.3 Factores que afectan la velocidad de migración	13
3.1.3.1 La muestra	13
3.1.3.2 Electrolito Soporte	13
3.1.3.2.1 Composición	13

3.1.3.2.2	Concentración	13
3.1.3.2.3	pH	14
3.1.3.2.4	Selección del Buffer	14
3.1.3.2.5	Clasificación de los sistemas buffer	15
3.1.3	Capilar	15
3.1.3.1	Características del capilar	16
3.1.4	Clasificación de la Electroforesis Capilar	16
3.1.4.1	Electroforesis Capilar de Zona	17
3.1.4.2	Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar	18
3.1.4.3	Electroforesis Capilar de Enfoque Isoeléctrico	19
3.1.4.4	Isotacoforesis Capilar	19
3.1.4.5	Electroforesis Capilar en gel	21
3.1.4.6	Electrocromatografía Capilar	21
3.1.5	Principios de Separación	21
3.1.5.1	Movilidad electroforética	21
3.1.5.2	Flujo electroosmótico	22
3.1.6	Introducción de la muestra	24
3.1.6.1	Inyección Hidrodinámica	25
3.1.6.2	Inyección Electrocinética	26
3.1.7	Manejo de los datos Obtenidos por E.C.	27
3.1.8	Importancia de la E.C. dentro de la Industria Farmacéutica	27
3.2	Extracción en fase sólida (EFS) para el pretratamiento de muestras	28
3.2.1	Fundamento teórico	28
3.2.2	Fases frecuentes	28

3.2.3	Metodología para la EFS	29
3.2.4	Aplicaciones de la EFS	32
3.3	Influencia del tipo de alimentación de las cabras en la composición de los fluidos biológicos (heces) a analizar.	32
3.3.1	Conducta alimenticia	32
3.3.2	Ideas generales sobre los alimentos	32
3.3.3	Alimentos para cabras	32
3.3.3.1	Arbustivas, Herbáceas y pastos	32
3.3.3.2	Menos y forrajes toscos	33
3.3.3.3	Ensilados y Raíces	33
3.3.3.4	Alimentos energéticos	33
3.3.3.5	Alimentos Proteicos	33
3.3.2	La Excreción	34
<b>IV PARTE EXPERIMENTAL</b>		
4.1	Equipo	35
4.2	Reactivos	35
4.3	Preparación de la muestra	35
4.3.1	Etapa I	36
4.3.2	Etapa II	36
4.4	Desarrollo del Método Analítico	37
<b>V RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		
5.1	Preparación del Sistema de Heces	39
5.2	Selección de la Longitud de onda para la detección	42
5.3	Tipo de Inyección	43
5.4	Condiciones del tiempo de lavado	47
5.5	Efecto del pH	50
5.6	Estudio del tipo de Electrolito Soporte a utilizar	53

5.7	Concentración del Buffer	57
5.8	Límite de detección	61
5.8.1	Límite de detección sin preconcentración	61
5.8.2	Límite de detección con preconcentración	62
5.9	Extracción en Fase Sólida	62
6.0	Evaluación de las Fases	65
6.1	Preconcentración de la muestra en línea	67
6.2	Aplicación del método desarrollado	70
VI CONCLUSIONES		72
INDICE DE FIGURAS		75
INDICE DE TABLAS		76
ANEXO I		77
ANEXO II		79
REFERENCIAS		80

INTRODUCCION

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

✓

# PAGINACIÓN DISCONTINUA

## INTRODUCCIÓN

La utilización de antibióticos con fines terapéuticos o profilácticos tanto en medicina humana como en veterinaria referida a animales de compañía, ha contribuido a mantener la salud pública. Su uso en animales productores de alimentos proporciona, de igual modo, innegables ventajas al promover el crecimiento y por tanto mejorar la producción, al mismo tiempo que facilita el control de sus enfermedades.

Como consecuencia de todo esto, existe el riesgo de que los residuos de medicamentos o sus metabolitos persistan en el animal y en los alimentos obtenidos a partir de él, llegando a la cadena de alimentación humana. Esto tiene importantes repercusiones en la calidad de los alimentos y sobre todo en el campo de la salud pública. Aunque los problemas de toxicidad aguda son poco probables, pueden llegar a producirse reacciones alérgicas en individuos sensibles.

Es preciso en primer lugar disponer de medicamentos de calidad, lo que implica compromiso entre eficacia y mínimo residuo, con la finalidad de controlar las enfermedades en los animales de cría y su vez garantizar que el producto llegue al consumidor libre de productos tóxicos. Por otro lado, su utilización debe ser correcta, lo que implica un adecuado control veterinario y farmacéutico [1].

Para implementar una legislación respecto al uso de un producto determinado, es condición indispensable disponer de un método de detección de dicho producto, que permita detectar el metabolito, que representa un daño al ser humano. Esto lleva implícito el desarrollo de técnicas analíticas que permitan comprobar esta presencia y su adecuación a los niveles permitidos.

Por lo que el desarrollo de un método analítico consiste en determinar, de acuerdo a las propiedades físicas y químicas del analito, las condiciones adecuadas para analizar cualitativa y/o cuantitativamente una muestra, considerándose la técnica que se aplique [2].

El presente trabajo tiene la finalidad de desarrollar un método que permita detectar la presencia de la Sulfametazina (SMZ) en una matriz biológica (heces de cabra), para garantizar la confiabilidad de los productos obtenidos de esta, ya que actualmente se ha encontrado que los residuos de las sulfas pueden presentar una amenaza a los consumidores (como por ejemplo la resistencia bacteriológica). Además de que la SMZ fue señalada como un posible cancerígeno y no existe reportado algún método que permita determinar a este tipo de antibióticos en las heces de ganado sometidos a este tratamiento.

Existen en la literatura diferentes técnicas analíticas para la cuantificación de SMZ, entre las cuales se encuentran: La espectrofotometría UV – Vis, cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía de gases (CG), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), cromatografía de fluidos supercríticos (CFS) y la electroforesis capilar (EC) [3].

Esta última presenta mayores ventajas sobre las anteriores ya que conjuga las características de alta eficiencia de separación, alta resolución, análisis rápidos y requerimientos de pequeños volúmenes de muestra y de reactivos, generando un método de cuantificación más confiable y económico[3]. Sin embargo la aplicación de la EC como método de análisis de SMZ siempre ha sido reportado en mezclas con otra docena de sulfonamidas y en otro tipo de muestras biológicas en las que no se incluye a las heces.

Por lo que esta tesis pretende aportar un método específico para el análisis de SMZ en la matriz de heces utilizando la técnica de EC.

BEINGS

## II. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

- ❑ Desarrollar un método analítico para la determinación de sulfametazina (SMZ) en heces de cabra utilizando la técnica de electroforesis capilar (EC) a fin de que exista un método barato y rápido que facilite los futuros estudios de biodisponibilidad de este analito en bolos de liberación prolongada.

### 2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ❑ Evaluar el efecto de diversos factores como son: la naturaleza, tipo, concentración y pH del buffer, tipo de inyección y tiempo de lavado, sobre el comportamiento de la SMZ medida por EC.
- ❑ Realizar el pretratamiento y la preconcentración de las muestras de SMZ mediante la utilización de la extracción en fase sólida (EFS) y la isotacoforesis capilar.
- ❑ Aplicar el método desarrollado a la cuantificación de SMZ en muestras reales de heces de cabra.

### 2.3 OBJETIVO ACADEMICO

- ❑ Establecer una metodología para evaluar sulfametazina en heces de cabras, y así crear casos de estudio para utilizarlos como instrumento de capacitación para los estudiantes de las asignaturas de: desarrollo analítico, control de calidad I, control de calidad II, análisis de medicamentos, toxicología e higiene pública de la carrera de Q.F.B. en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

### 2.4 OBJETIVO SOCIAL

- ❑ Desarrollar un método que permita cuantificar sulfametazina en heces de cabras, con el fin de que en futuros estudios de biodisponibilidad se establezca el tiempo de eliminación de la sulfonamida en dicho animal y así se suspenda la administración del medicamento antes de comercializar sus productos.

MARCO

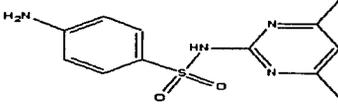
TEORICO

## III. MARCO TEORICO

## 3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SULFAMETAZINA

En la siguiente Tabla se resumen algunas de las características generales de la SMZ.

Tabla 1. Características generales de la SMZ

Nombre Químico [3].	4-amino-N-(4,6-dimetil-2-pirimidin)benzenosulfonamida.
Nombre Común	Sulfametazina, Sulfadimerazina, Sulfamidina, Sulfadimetilpirimidina, Sulfadimidina.
Fórmula Condensada [6].	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$
Peso Molecular	278.30 g/mol
Fórmula estructural [3].	

## 3.1.1 PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS

Apariencia color y olor.

Se presenta como cristales o polvo blanco o ligeramente amarillo, higroscópico. Estos se decoloran y se descomponen lentamente al exponerse al aire este compuesto absorbe dióxido de carbono y llega a ser menos soluble en agua [3].

Espectro en U.V. [5]

La figura 1 muestra el espectro ultravioleta de la Sulfametazina en agua a pH 6.6, en HCl 0.01 N y en NaOH 0.01 N. A pH de 6.6, se observa un máximo a 240 nm, con un hombro a 260 nm. La sulfametazina en NaOH 0.01 N muestra dos picos, uno en 241 nm y el otro en 297 nm, mientras que en HCl 0.01 N presenta dos máximos uno a 240 y otro a 257 nm.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

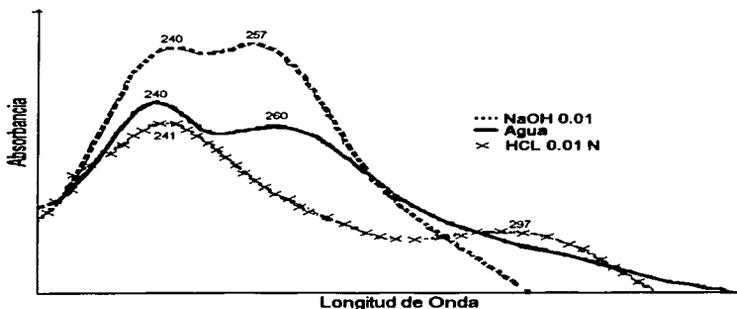


Fig. 1 Espectro en UV de la sulfametazina en diferentes Soluciones Acuosas.

Solubilidad[5].

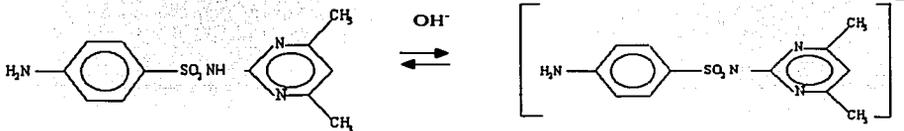
Es muy poco soluble en agua y cloroformo, ligeramente soluble en etanol, acetona y HCl 0.01 N, soluble en 0.1 N de NaOH e insoluble en benceno

Temperatura de fusión

La USP XIX reporta que la temperatura de fusión de la SMZ debe ser 197 ° C - 200 ° C.

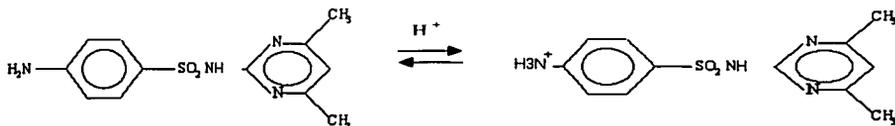
Constante de disociación [5].

Presenta un valor de pKa de 7.4 ± 0.2, para el siguiente equilibrio:



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Y un  $pK_a$  de  $2.65 \pm 0.2$  para el siguiente equilibrio:



### 3.1.3 Actividad farmacológica [7].

La sulfametazina presenta actividad antibacteriana, la cual es eficaz "in vitro" contra *Streptococos* y *Stafilococos*.

La smz que se asemeja mucho a la sulfamerazina en sus propiedades antimicrobianas, sus efectos tóxicos y sus usos terapéuticos, tiene una concentración efectiva mínima de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se le emplea como un componente de las mezclas de sulfonamidas en aquellas infecciones en las cuales están indicadas las acciones antimicrobianas sistémicas de esas drogas.

Una vida media más larga es compatible con el hecho de que las dosis necesarias para mantener niveles sanguíneos efectivos son más pequeñas y se administran a intervalos más prolongados que las de sulfadiazina. La droga es acetilada en un 70 a un 90 % en el hígado, alrededor del 80 % de la smz se une a proteínas plasmáticas.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.1.2 GENERALIDADES DE LA ELECTROFORESIS CAPILAR.

#### 3.1.2.1 DEFINICIÓN DE ELECTROFORESIS CAPILAR. [8]

La electroforesis capilar es una técnica relativamente nueva para la separación y análisis de compuestos químicos. Su alta eficiencia en la separación, alta sensibilidad, velocidad y bajos costos ha permitido que sea utilizada en varias áreas de las ciencias naturales tales como química, bioquímica clínica y general, biotecnología, farmacia, industria alimenticia, ambiente, ciencias médicas, ciencias veterinarias, ciencias forenses, etc.

Esta técnica puede ser usada para el análisis de moléculas polares iónicas, polares no iónicas y apolares no iónicas, así como también para moléculas de alto peso molecular como son las biomoléculas y compuestos quirales.

#### 3.1.2.2 HISTORIA DE LA ELECTROFORESIS

El término de electroforesis se emplea para describir la migración de las partículas, que se encuentran cargadas y bajo la influencia de un campo eléctrico, esta técnica representa una de las técnicas de separación más ampliamente utilizada en el área química [8].

El desplazamiento de sustancias bajo la acción de un campo eléctrico fue citado por Reuss en 1809 en las memorias de la sociedad Imperial Natural (1809)

Allí se describe la experiencia de la Fig. 2, donde se observa el comportamiento migratorio de pequeñas partículas de arena en un ámbito de agua transparente contenido en un recipiente de vidrio con un lecho de arena fina en su fondo y dos tubos conteniendo electrodos de una batería [9].

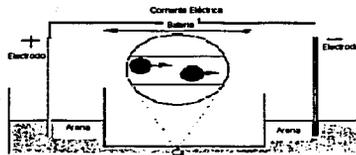


Fig. 2 Experimento de Reuss

El pasaje de la corriente produce un enturbiamiento en las proximidades del polo positivo producido por la migración de partículas de arena muy pequeñas que se movilizan por su carga eléctrica negativa [10].

Este experimento puede ser considerado como el primer aporte bibliográfico que revela la polarización de la sílice, pues la arena es dióxido de silicio y fundida permite obtener los capilares que se emplean en la electroforesis capilar. [11]

Varios años más tarde, en 1816, fue observado el transporte del agua por acción de la corriente galvánica generada por la polarización negativa del capilar que une los dos recipientes electródicos.

Desde entonces la electroforesis capilar ha crecido rápidamente como técnica analítica. En nuestros días se aplica a una amplia gama de problemas de separación, y ha experimentado un gran desarrollo en los últimos doce años. Esta técnica se caracteriza por su alta eficiencia de separación, así como su rapidez, por el bajo consumo de reactivos y disolventes orgánicos. Estos factores son muy importantes ya que influyen sobre la productividad y el costo de los análisis.

Las diferentes variantes de la EC permiten resolver gran variedad de problemas analíticos, para determinar una gran variedad de moléculas [12].

### 3.1.2.3 EQUIPO DE ELECTROFORESIS CAPILAR.

#### 3.1.2.3.1 DESCRIPCIÓN GENERAL DEL EQUIPO DE EC, P/ACE MDQ

Utilizando uno de los distintos modos de electroforesis capilar, el instrumento del sistema P/ACE MDQ separa los componentes de la muestra dentro de un capilar de sílice fundida. Todos estos modos son generalmente agrupados bajo la denominación general de Electroforesis capilar (EO). En el sistema P/ACE MDQ, la muestra es inyectada por medio de presión, vacío o voltaje. Bajo la acción del alto voltaje los componentes de la muestra migran de manera diferencial por el capilar [13].

A medida que estos componentes pasan por una ventana del capilar se les hace incidir un haz de luz mediante, un detector con longitud de onda UV o un detector de arreglo de fotodiodos (PDA) con múltiples longitudes de onda se mide el haz transmitido y por ende la absorbancia y se transmite la señal al ordenador. La señal puede ser transmitida

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

también a un registrador, integrador o sistema de datos externos por medio de un dispositivo de salida analógico.

Se puede utilizar el instrumento del sistema P/ACE MDQ (Fig. 3) para separar muchos tipos distintos de muestra, como peptidos, proteínas, ácidos nucleicos y fármacos en sus formas farmacéuticas. La EC ofrece la ventaja de tener un consumo de muestra muy bajo en relación a otras técnicas analíticas ( de 5 a 30 microlitros, siendo habitualmente el volumen de inyección efectivo de entre 5 y 50 nanolitros).

La EC requiere además muy poco tiempo, en comparación con las formas tradicionales de electroforesis. Según cual sea la longitud del capilar utilizado, el potencial aplicado y la movilidad de los componentes de la muestra, es posible efectuar las separaciones en línea base en unos minutos.

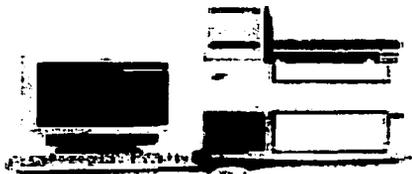


Fig. 3 Sistema de Electroforesis Capilar Bekman P/ACE MDQ

El mecanismo de separación en la EC es el mismo de la electroforesis convencional. La migración diferencial dentro de zonas discretas es debido a diferencias en las movilidades electroforéticas, las cuales a su vez están vinculadas a la relación masa/carga y a la conformación de los analitos. Esta técnica consiste en introducir en un capilar una mezcla de especies (cargadas o neutras), que se separan en función de su carga y su movilidad iónica en el medio en el que se encuentren bajo la influencia de un campo eléctrico, generado por la aplicación de una diferencia de potencial entre dos electrodos [ 13 ].

El equipo está constituido por una fuente de poder (FP) de alto voltaje (20 a 30 KV) y de 0 a 300  $\mu$ A, y un capilar de silice de 25 a 75  $\mu$ m de diámetro interno y de 200 a 400  $\mu$ m de diámetro externo, el que puede estar refrigerado por aire o líquido por efecto Peltier.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Los electrodos de platino se encuentran ubicados en el recipiente que contiene el buffer, que además de servir para su contacto recibe los extremos del capilar.

El carrusel puede estar termostatado y contiene los buffer y las muestras. Con un movimiento de ascenso y descenso puede enviar cada una de las soluciones empleadas en la corrida el capilar a los recipientes electródicos.

Los capilares de sílice dejan pasar la luz ultravioleta visible a distintas longitudes de onda, generando por arreglos de diodos, los espectros para la identificación de los compuestos separados por EC.

Un sistema de electroforesis es conceptualmente sencillo, los componentes principales son los siguientes:

- Electrodo (ánodo y cátodo)
- Depósito (viales) donde se colocan los electrodos respectivamente
- Capilar (compartimiento de la separación)
- Un sistema de enfriamiento capilar (típicamente en la forma de convección de aire forzado o de líquido recirculante).
- Un sistema de inyección y,
- Un detector

Los componentes básicos del sistema de Electroforesis Capilar, se muestra en la Figura 4.

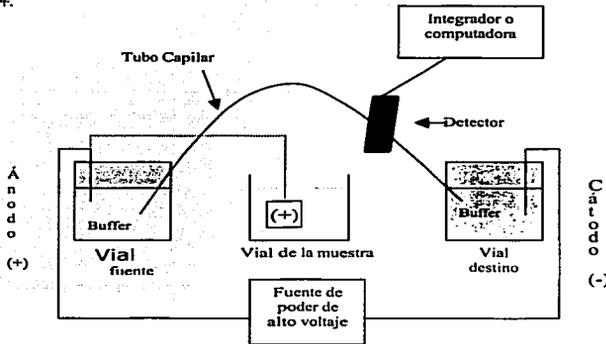


Fig. No. 4 Componentes básicos de un sistema de electroforesis Capilar .

El resultado se despliega como un electroferograma, que consiste en una gráfica de la respuesta contra el tiempo, cada pico corresponde a un soluto.

#### 3.1.2.4 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA.

Esta técnica se basa en el comportamiento electroforético, o sea en la migración de iones o partículas por acción de un campo eléctrico generado por la aplicación de una diferencia de potencial entre dos electrodos en un medio acuoso.

Los microcapilares (diámetros entre 30 - 100  $\mu\text{m}$ ) están constituidos por paredes de sílice fundida y al paso de la corriente eléctrica adquieren carga negativa como consecuencia de la polarización de los grupos silanol ubicados en su interior. Esta polarización genera una fuerza hidrodinámica opuesta al sentido de la migración de la corriente, que se denomina fuerza electroosmótica que se opone o coadyuva al desplazamiento de iones o moléculas. Las ventajas del método son: rapidez, alta resolución, sensibilidad elevada, bajo costo de funcionamiento. Es aplicable en el análisis de fenacetina, anfetaminas, analgésicos, drogas cardiovasculares, vitaminas hidrosolubles, acetaminofen, cafeína, naproxen, etc. [14].

Existen moléculas de importancia en biología, estos pueden ser los aminoácidos, péptidos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales poseen grupos ionizables y pueden tenerse en disolución en una forma cargada, ya sea como cationes (+) o como aniones (-). Además de que muchas moléculas que tienen cargas similares poseen distintas relaciones carga/masa, esto debido a inherentes diferencias de peso molecular.

Los cationes se trasladan hacia el cátodo (-) y los aniones hacia el ánodo (+) a velocidades que dependen del equilibrio entre la fuerza impulsora del campo eléctrico sobre los iones cargados de la muestra y las fuerzas de retardo entre las moléculas que migran y el medio circundante, que son principalmente fuerzas de fricción electrostáticas.

El material de la muestra debe estar disuelto o suspendido en algún disolvente conductor y miscible con agua (Ej. buffer) para que tenga efecto el fenómeno electroforético.

### 3.1.3 FACTORES QUE AFECTAN LA VELOCIDAD DE MIGRACIÓN:

#### 3.1.3.1 MUESTRA

La naturaleza de los compuestos con carga eléctrica afecta a su velocidad de migración de varias formas, como se describe a continuación.

- **Carga:** La velocidad de migración aumenta cuando hay un incremento de la carga del analito, generalmente, la magnitud de la carga depende del pH.
- **Tamaño:** La velocidad de migración es menor en las moléculas grandes, debido al incremento de las fuerzas de fricción y electrostáticas ejercidas por el medio circundante.
- **Forma:** Las moléculas de tamaño similar pero con diferentes formas, tales como las proteínas fibrosas y las globulares, exhiben distintas características migratorias a causa de los diferentes efectos de las fuerzas de fricción y electrostáticas.

#### 3.1.3.2 ELECTROLITO SOPORTE (BÚFFER O SISTEMA AMORTIGUADOR).

Este es un factor básico en la separación por EC.

El buffer determina y estabiliza el pH del medio de soporte, por lo que afecta a la velocidad de migración de los compuestos en diversas formas [16].

##### 3.1.3.2.1 COMPOSICIÓN.

Los buffer más usados son: formiato, acetato, citrato, barbitona, fosfato, TRIS, EDTA y piridina. Para separar carbohidratos, con frecuencia se utiliza búffer de boratos, pues tiene la ventaja de formar complejos con carga eléctrica con los carbohidratos. Dado que el búfer actúa como disolvente para la muestra, es inevitable que haya algo de difusión de la misma.

##### 3.1.3.2.2 CONCENTRACIÓN.

A medida que la fuerza iónica del buffer aumenta, la proporción de corriente conducida por éste crece y la participación de la muestra en dicha conducción de corriente disminuye, con lo que se reduce la velocidad de migración. Una elevada fuerza iónica del

buffer incrementa la intensidad global de corriente y, consecuentemente, la producción de calor.

Con bajas fuerzas iónicas, la proporción de corriente conducida por el buffer se reducirá y la participación en la conducción de corriente por parte de la muestra crecerá, aumentando su velocidad de migración. Una fuerza iónica pequeña reduce la corriente global y se traduce en una menor producción de calor, pero la difusión y la pérdida de resolución resultantes son mayores.

Por ello, la selección de la fuerza iónica generalmente se elige dentro de una gama de fuerzas iónicas comprendida entre 0.05-0.10 moles litro.

### 3.1.3.2.3 pH.

Tiene poca influencia sobre los compuestos completamente ionizados tales como las sales inorgánicas, pero en los compuestos orgánicos el pH determina la magnitud de la ionización de los ácidos orgánicos, es decir aumenta con el pH, mientras que lo inverso ocurre con las bases orgánicas; por lo tanto, su velocidad de migración depende del pH. En compuestos tales como los aminoácidos (zwitteriones), que tienen propiedades básicas y ácidas, se producen ambos efectos. La dirección, y también la magnitud de la migración de los zwitteriones son por lo tanto, dependientes del pH, y se pueden emplear buffer que van desde un pH de 1 hasta un pH de 11 para producir las separaciones requeridas. [16]

### 3.1.3.2.4 SELECCIÓN DEL BÚFFER.

La sensibilidad del flujo electroosmótico, al pH requiere el uso de un buffer que pueda mantener un pH constante. Los sistemas efectivos de buffer tienen un rango de dos unidades de pH aproximadamente centradas alrededor del valor de pKa.

Un búffer para ser utilizado en EC debe poseer las siguientes características:

- Buena capacidad de amortiguación en el rango seleccionado.
- Baja movilidad, para minimizar la generación de corriente.
- Baja absorbancia a la longitud de onda de detección (cuando aplique) [17, 18].

Una amplia variedad de búffer puede ser empleada en la electroforesis de zona (Capillary zone electrophoresis) (CZE). Por ejemplo, el más usado es el buffer de fosfatos de pH 2,5 y pH 7 y el borato a pH 9, siendo la concentración de 10-50-100 mM.

### 3.1.3.2.5 CLASIFICACIÓN DE LOS SISTEMAS BÚFFER:

Los sistemas buffer efectivos tienen un rango de amortiguamiento de aproximadamente dos unidades de pH alrededor del valor del pKa (tabla II).

Tabla II. Sistemas buffer más utilizados en Electroforesis Capilar.

NOMBRE	pKa	NOMBRE	pKa
Fosfato	2.12 (pK <sub>1</sub> )	TES	7.50
Citrato	3.00 (pK <sub>1</sub> )	Hepes	7.55
Formato	3.75	Hepes	8.00
Succlomato	4.19 (pKa)	Tricina	8.35
Citrato	4.74 (pKa)	Glicina amida	8.50
Succlonato	5.57 (pKa)	Glicil glicina	8.25
MES	6.7	TRIS	8.30
ADA	6.60	Vicien	8.35
BIS-TRIS propano	6.80	Morfolino	8.49
Pipes	6.80	Borato	9.24
Acce	6.90	CHES	9.50
Mopso	6.90	Chapso	9.60
Imidazol	7.00	CAPS	10.40
MOPSO	7.20	Fosfato	12.32 (pK <sub>2</sub> )
Fosfato	7.21 (pKa)		

Abreviaturas: MES, Ácido etansulfónico-2-[N-morfolino, MOPSO, (3-[Morpholino] ácido propanosulfónico TES, TRIS, Tris(hidroximetil)amino-metano, CHES, (2-[N-Ciclohexilamino] ácido etansulfónico CAPS, (3-[Ciclohexilamino]-1- ácido propanosulfónico.

### 3.1.3 CAPILAR.

Entiéndase como medio de soporte el material del cual está hecho el capilar; se emplean materiales relativamente inertes. La composición específica del medio ejerce varios efectos sobre la velocidad de migración de un compuesto, y la selección de un medio determinado, depende del tipo de muestra que hay que utilizar.

En la electroforesis clásica se han utilizado como medio de soporte papel, alúmina, lana de vidrio, almidón, agar-agar, gel de sílice y tiras de acetato de celulosa, entre otros. Actualmente se utilizan capilares hechos con sílice fundida porque posee una excelente

transparencia a la radiación UV además de ser química y eléctricamente inertes, flexibles, robustos, y económicos.

El corazón de la EC es el tubo capilar, el cual es económico y fácil de reemplazar. Es generalmente una columna de sílice fundida con una longitud máxima de 1 metro y con diámetros entre los 50 y 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.1.3.1 CARACTERÍSTICAS DEL CAPILAR SON:

- ✓ Generalmente son columnas de sílice fundida.
- ✓ Diámetro interno de 25-75  $\mu\text{m}$ .
- ✓ La longitud varía según su aplicación, pero normalmente se encuentran en un rango de 20 a 50 cm.
- ✓ El capilar posee una pequeña ventana, que consiste en una sección que no está recubierta por poliimida, en esta posición se sitúa al detector.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.1.4 CLASIFICACIÓN DE ELECTROFORESIS.

La necesidad de optimizar separaciones para una gran variedad de compuestos tiene como resultado diferentes modalidades de trabajo que se han desarrollado para expandir el número de aplicaciones de esta técnica con la gran ventaja de que se pueden realizar usando el mismo equipo. Las diferentes modalidades que se trabajan hasta el momento son: [7]

- \* Electroforesis capilar de zona (ECZ en inglés CZE).
- \* Cromatografía capilar electrocinética micelar (CCEM, en inglés MECC).
- \* Electroforesis capilar de enfoque isoeléctrico (ECEI, en inglés CIEF).
- \* Isotacoforesis capilar (en inglés ITFC).

- \* Electroforesis capilar en gel (ECCG, en inglés CGE).
- \* Electrocromatografía capilar (ECC en inglés CEC).

La EC es algunas veces referida como electroforesis capilar de zona (CZE), electroforesis capilar libre en solución (FSCE), electroforesis capilar de alta resolución (HPCE), o justamente como electroforesis capilar (CE).

#### 3.1.4.1 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA.

La electroforesis capilar de zona (ECZ) es por mucho la más utilizada como modo de separación, debido a la simplicidad de operación y su versatilidad.

La ECZ es la forma más simple de EC principalmente porque el capilar es llenado sólo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades. La separación de mezclas con analitos aniónicos y catiónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (FEO). Los analitos neutros no migran por sí solos, pero coeluyen en presencia del FEO.

El nombre de ECZ a veces confunde porque parece implicar que es el único modo en que la electroforesis es zonal. Sin embargo, la cromatografía electrocinética micelar capilar y la electroforesis capilar en gel también son técnicas zonales; en contraste, la electroforesis capilar de enfoque isoeléctrico esta definida como técnica de enfoque [18].

La Fig. 5 muestra lo que sucede en la ECZ

- a) El capilar se llena con el búffer o electrolito soporte y se introduce la muestra (mezcla de analitos).
- b) Los analitos A y B se separan en base a su distinta movilidad electroforética, al aplicarse un cierto potencial eléctrico.
- c) Los analitos A y B se han separado en zonas discretas.

Los incisos d-f representan el perfil de concentración a lo largo del capilar,

- d) Es el comienzo,
- e) Durante el proceso de separación y
- f) La continuación de la migración de A y B, mostrando dispersión.

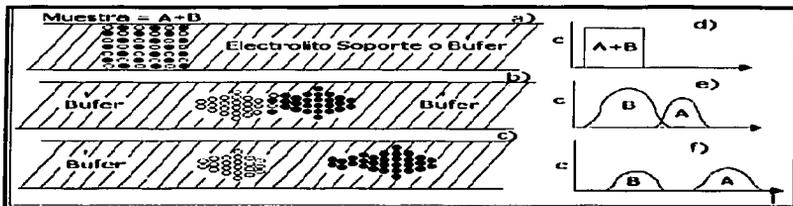


Fig. 5 Ilustración de una separación zonal

Cuando se tiene flujo electroosmótico ( $pH$  entre 4 - 12) y polaridad positiva, las especies cargadas positivamente se mueven a lo largo del capilar con una velocidad que es mayor que la del FEO, puesto que su movimiento se ve acelerado por la atracción de sus cargas al electrodo negativo.

Los analitos cargados negativamente se mueven en sentido contrario y más lentamente y en contra del flujo electroosmótico debido a que son atraídos por el electrodo positivo. Los analitos neutros se mueven a través del capilar con el FEO por lo general durante éste movimiento no se produce separación entre las especies no cargadas.

Este tipo de modalidad se utiliza para separar en general compuestos de bajo peso molecular, que no sufran de adsorción en la superficie del capilar [18].

### 3.1.4.2 CROMATOGRAFIA CAPILAR ELECTROKINÉTICA MICELAR

La cromatografía electrocinética micelar capilar (CEEM) es un híbrido de la electroforesis y la cromatografía y fue introducida por Terabe y compañía en 1984 [19]. Aquí se describe una modificación del método que permite la separación de fenoles y nitrocompuestos aromáticos de bajo peso molecular por la adición de surfactantes o tensoactivos, como el dodecil sulfato de sodio (DSS) al electrolito soporte, las micelas formadas ayudan a la separación de especies cargadas y neutras.

En la CEEM, se añaden al búffer cantidades de surfactante o tensoactivo que exceden de la concentración micelar crítica a fin de obtener las respectivas micelas. Hasta ahora en la mayoría de las aplicaciones los surfactantes que han sido más

utilizados son dodecil-sulfato de sodio (DSS), bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA) y bromuro de dodeciltrimetilamonio (BDTA) [18].

### 3.1.4.3 ELECTROFORESIS CAPILAR DE ENFOQUE ISOELÉCTRICO.

La electroforesis capilar de enfoque isoelectrico (CIEF) es una técnica de alta resolución usada generalmente para separar péptidos y proteínas basándose en su punto isoelectrico (pI), esta técnica es usada para la separación de especies zwitteriónicas las cuales cuentan con grupos funcionales que bajo ciertas condiciones la molécula tiene carga positiva o negativa, o bien ambos cargados pero la molécula en electro neutralidad y tiene una diferencia de 0.005 unidades o menos respecto a su pI [18].

En electroforesis capilar de enfoque isoelectrico (ECEI) el electrolito soporte es una mezcla (ácido / base o de anfóteros) que generan un gradiente de pH durante la aplicación de voltaje. La muestra es inyectada a bajo pH en el capilar y como está positivamente cargada entonces migrará a lo largo del capilar hacia el cátodo. Cuando el analito alcanza la posición donde  $pH = pI$  (a lo largo del gradiente de pH en el capilar) el número de cargas positivas es exactamente igual al número de cargas negativas, por lo que el analito queda neutro, deja de migrar y se mantiene en esa posición.

### 3.1.4.4 ISOTACOFORESIS CAPILAR.

Isotacoforesis significa electroforesis a velocidad uniforme. Esto quiere decir que el tiempo de recorrido en el capilar bajo condiciones isotacoforetica es independiente de la velocidad. Es una técnica de separación por desplazamiento. A pesar de la cantidad de instrumentación comercial con una extensiva teoría y aplicaciones, ITP no se ha convertido en una técnica de separación de rutina en muchos laboratorios analíticos. Es más conocida en Europa que en Estados Unidos y Japón.

La selección del electrolito líder y terminal depende del conocimiento de los valores del  $pK_a$  para todos los componentes de la muestra. Todas las zonas se mueven a la misma velocidad y se intercalan entre los electrolitos líder y terminal.

En isotacoforesis los picos están siempre en contacto con la zona adyacente. Esta característica es necesaria para mantener la continuidad eléctrica a lo largo del sistema, dado que no hay un electrolito de soporte homogéneo. El electrolito líder, debe tener

una velocidad de migración mayor que la del electrolito terminal, para que el analito se separe en base a su velocidad de migración.

Esta técnica puede ser usada para determinar cationes y aniones. Generalmente la isotacoforesis capilar (IC) se ha efectuado bajo condiciones de cero  $\text{pH}$  aunque no es una restricción. Los isotacofogramas pueden mostrar diferencias en el orden de migración en presencia o no de  $\text{pH}$ .

Los factores que influyen en la separación isotacoforética son principalmente:  $\text{pH}$  del búffer, fuerza iónica del electrolito, aditivos al búffer como disolventes orgánicos, tensoactivos y/o ciclodextrinas, voltaje aplicado, temperatura, longitud y diámetro del capilar, etc. Estos actúan de forma distinta respecto a otras técnicas de separación de mayor tradición, por lo que en la mayoría de los casos, los resultados son complementarios [ 18 ].

Para el análisis de aniones se selecciona como electrolito guía el búffer que contiene al anión con una movilidad efectiva más alta que la de los analitos. De manera similar el anión terminal debe tener la movilidad más baja con respecto a los analitos. Cuando el campo eléctrico es aplicado los aniones comienzan a migrar hacia el ánodo. Puesto que el anión principal tiene la más alta movilidad, se mueve más rápido y es seguido del anión con la siguiente movilidad más alta y así sucesivamente [ 20 ].

Este modo de operación es distinto a los otros modos de electroforesis capilar, caracterizada por las zonas de la muestra, que cambian continuamente su forma y posición relativa. En el caso típico en ECZ el electroferograma obtenido contiene los picos pertenecientes a la muestra similares a los obtenidos en las separaciones cromatográficas y en el caso de IC el isotacofograma obtenido contiene una serie de pasos donde cada paso representa una zona del analito.

Antes de iniciar la corrida, el capilar se debe llenar con un electrolito líder ó guía en un extremo. Este debe tener una gran movilidad, y debe ser mayor que la de los componentes a separar. Luego se introduce la muestra seguido del electrolito terminal o cola, cuya movilidad debe ser menor que cualquiera de los componentes de la muestra. La selección de los electrolitos guías y terminales depende del conocimiento de los valores de las movilidades y del  $\text{pK}_a$  para todos los componentes de la muestra [ 21 ].

### 3.1.4.5 ELECTROFORESIS CAPILAR EN GEL

La mayoría de las moléculas de gran tamaño de interés biológico tienen carga y por ello es factible separarlas y analizarlas por métodos electroforéticos. En el pasado, éstos análisis se llevaban a cabo en muchos casos a macro-escala y en geles poliméricos, en los que se minimizaban las perturbaciones convectivas debidas al calentamiento eléctrico. [ 18 ].

La electroforesis capilar en gel (ECG) es directamente comparable con la electroforesis en gel tradicional ya que los mecanismos de separación son idénticos.

### 3.1.4.6 ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR.

La electrocromatografía capilar, es considerada un método híbrido de separación que junta la alta eficacia de la separación de la EC con algunas características del HPLC, en la que el tubo capilar está lleno con una fase estacionaria, pero se utiliza un campo eléctrico para mover la fase móvil en lugar de presión hidráulica.

Puesto que no hay una alta presión aplicada, es posible utilizar empaques de diámetro pequeño y alcanzar altas eficiencias. Por lo anterior una ventaja adicional de electrocromatografía capilar es el perfil de flujo en un sistema bajo presión es parabólico, mientras que en un sistema conducido eléctricamente el flujo es plano y por lo tanto mucho más eficiente y con análisis muy cortos [ 2 ].

## 3.1.5 PRINCIPIOS DE SEPARACIÓN.(9)

Hay dos factores que causan la movilidad de los solutos, la movilidad electroforética de los analitos y la presencia FEO.

### 3.1.5.1 La movilidad electroforética:

Es la respuesta al campo eléctrico, que consiste en la migración de los cationes al cátodo, de los aniones al ánodo y que las moléculas neutras no sean afectadas. El campo eléctrico es generado al aplicar una diferencia de potencial entre dos electrodos sumergidos en un electrolito soporte.

La velocidad electroforética  $v_{ef}$  es la rapidez con que migra un soluto. Se expresa matemáticamente como:

$$V_{ef} = \mu_{ef} E$$

Donde:

$\mu_{ef}$  = movilidad electroforética

$E$  = Magnitud del campo aplicado

$$\mu_{ef} = q / (6\pi \eta r)$$

y Donde:

$q$  = carga del soluto

$\eta$  = viscosidad del buffer

$r$  = radio del soluto

TESIS CON  
FALLA DE O. IGEN

La movilidad electroforética se incrementa al aumentar la carga y al disminuir el tamaño del soluto por lo que esta depende de: la especie iónica, tamaño, carga, temperatura, naturaleza y concentración del analito.

### 3.1.5.2 El flujo electroosmótico:

Un constituyente fundamental de la electroforesis capilar es el llamado *Flujo Electroosmótico (FEO)*. El flujo electroosmótico es el flujo que origina la presencia del campo eléctrico en una solución iónica cuando entra en contacto con una superficie sólida cargada.

Por ejemplo, en un capilar de sílice fundida, la interfase se pone en contacto con la solución que contiene el electrolito soporte, la superficie del sólido está con carga negativa debido a la ionización del grupo silanol (a pH mayor de 7-8) y conjuntamente con sus contraiones forman una doble capa eléctrica, por lo que el FEO es la migración de los solutos en respuesta al movimiento del buffer causado por el campo eléctrico. Bajo condiciones normales, el buffer se dirige hacia el cátodo.

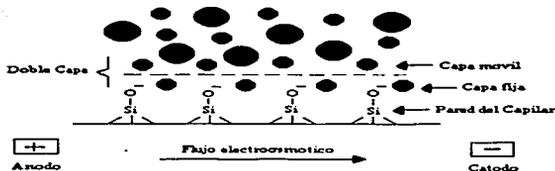


Fig.6 Representación del flujo electroosmótico en un capilar

Cuando el buffer se coloca en el interior del capilar, la superficie interna del capilar adquiere una carga, esta estará dada por la ionización de la superficie del capilar (grupos silanol) o por la adsorción de iones de buffer en la pared del capilar.

En el caso de capilares de sílica fundida, la superficie formada por grupos silanol ( $\text{Si-OH}$ ) es ionizada a cargas negativas de grupos silanoato ( $\text{Si-O}^-$ ) en pH mayores a 3. Esta ionización se realiza mediante el paso de una solución básica a través del capilar, seguida por un buffer. Las cargas negativas de los grupos silanoato atraen los iones cargados positivamente del buffer formándose así una capa interna de cationes en la pared del capilar. Estos cationes no poseen la suficiente densidad para neutralizar todas las cargas negativas, por lo que se forma una segunda capa de cationes. La capa interna es conocida como, capa fija y la capa externa de cationes es la capa móvil. Estas dos capas de cationes forman una doble capa difusa.

Cuando el campo eléctrico es aplicado, la capa móvil de cationes solvatados es atraída hacia el cátodo. Estos cationes empujan a todo el buffer libre con ellos, esto causa el FEO.

El control del flujo electroósmótico esta dado por: [ 22 ]

- Campo eléctrico
- pH del buffer
- Fuerza iónica o concentración del buffer
- Temperatura (cambia la viscosidad)
- Modificadores orgánicos (cambian la viscosidad)
- Surfactantes
- Recubrimientos covalentes
- Polimeros hidrofílicos neutros

Los iones presentes en el sistema (incluyendo a los contraiones de los grupos silanol,  $\text{H}^+$ ) bajo la influencia del voltaje aplicado son desplazados hacia el cátodo o ánodo de acuerdo a su carga y arrastrando solvente con ellos dada su solvatación, originando así el denominado FEO, es importante señalar que este puede modificar la migración de los iones. Como se muestra en la tabla III, los cationes son impulsados por el FEO a mayor velocidad, siendo que por otra parte la especie se mueve en contra del FEO su velocidad disminuye.

Una especie no cargada se moverá a la velocidad del flujo electroosmótico, este hecho es utilizado experimentalmente para determinar la velocidad del FEO en un sistema dado.

Tabla III. Velocidades relativas de migración de acuerdo al tipo de analito

CARGA	TIPO DE ANALITO	VELOCIDAD RELATIVA DE MIGRACION
-1	Anión monovalente pequeño	4
-1	Anión monovalente grande	3
-2	Anión divalente pequeño	2
-2	Anión divalente grande	1
0	Molécula pequeño neutra	6
0	Molécula grande neutra	5
+1	Catión monovalente pequeño	8
+1	Catión monovalente grande	7
+2	Catión divalente pequeño	10
+2	Catión divalente grande	9

Una de las ventajas del FEO es que provoca el movimiento de todas las especies presentes, prescindiendo de la carga, en la misma dirección, bajo condiciones normales cuando la superficie del capilar esta cargada negativamente, el flujo va del ánodo al cátodo.

Los cationes fluirán rápidamente hacia el cátodo dependiendo de la magnitud del flujo y puede ser en un orden mayor a sus movilidades electroforéticas. Por otro lado, los aniones tratarán de migrar hacia el ánodo pero si el FEO es mayor que su movilidad electroforética pueden ser arrastrados hacia el cátodo.

Así, los cationes, neutrales y aniones, pueden ser separados y analizados en una corrida individual, ya que todos "migran" en la misma dirección.

Los cationes migran más rápidamente hacia el cátodo porque el FEO va en la misma dirección, mientras los neutros son acarreados a la velocidad del FEO pero no son separados, y los aniones migran más lento ya que ellos son atraídos hacia el ánodo pero son acarreados por el flujo electroosmótico hacia el cátodo. La modificación de la carga de la pared del capilar puede disminuir el FEO dejando la movilidad del analito no afectada. En estas circunstancias los aniones y cationes pueden migrar en direcciones opuestas [23, 24, 25].

### 3.1.6 INTRODUCCION DE LA MUESTRA [ 26 ].

Los objetivos de la introducción de la muestra es que ésta entre al capilar de una manera adecuada y reproducible. Es un paso importante puesto que en EC los

capilares tienen un diámetro interno pequeño (entre 25 y 200  $\mu\text{m}$ ), por lo que el volumen de muestra se limita a sólo algunos nanolitros (nL); grandes volúmenes provocan ensanchamiento de picos y pueden afectar la separación.

La magnitud de la inyección se vuelve un parámetro más crítico cuando se quiere hacer una preconcentración. Esto corresponde a una longitud de inyección de pocos milímetros (correspondientes a 1 - 50nL) dependiendo de la longitud y del diámetro interno del capilar. Esto es una ventaja cuando el volumen de la muestra es pequeño (Ej. 5 microlitros) pues se pueden realizar numerosas inyecciones con una sola muestra, por otro lado, volúmenes pequeños aumentan las dificultades de sensibilidad para muestras diluidas.

La sobrecarga de muestra puede tener dos efectos significativos, y los dos perjudican la resolución:

1. Si la magnitud de la inyección es más grande que el ensanchamiento de pico, entonces este será proporcional al ancho del pico.
2. Esto puede alterar la homogeneidad del campo y distorsionar la forma del pico provocada por la mala conductividad entre el electrolito soporte y la de la muestra.

Por lo que técnicamente hablando, la muestra no es inyectada, sino introducida, aunque comúnmente se utiliza el término "inyección" en electroforesis capilar.

El capilar es llenado inicialmente con buffer. La muestra es introducida por el ánodo al sumergir un extremo del capilar dentro de la muestra, causando que ésta entre en el tubo. La muestra puede ser introducida por inyección hidrodinámica o inyección electrocinética.

A continuación se describe cada una de ellas:

### 3.1.6.1 INYECCIÓN HIDRODINÁMICA:

La inyección hidrodinámica también llamada inyección neumática, se realiza mediante diferencia de presión, por bombeo o bien por vacío, es decir, forzando la introducción de la muestra al capilar. Este es un sistema confiable y no selectivo.

Con un control preciso de la presión y el tiempo de inyección se pueden obtener inyecciones altamente reproducibles [ 25 ].

1. Inyección por presión: al generar una presión diferencial (vacío, presión).



2. Sifón: la muestra es empujada dentro del tubo por gravedad.

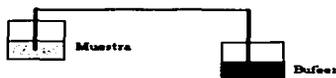


Fig. 7 Tipos de Inyección Hidrodinámica

La cantidad de muestra requerida es muy pequeña (en el orden de 1 ng), pero la concentración debe ser relativamente alta ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) porque el máximo volumen que puede ser cargado sin perturbar seriamente la separación es pequeño (en el rango de nL) [ 23 ].

### 3.1.6.2 INYECCIÓN ELECTROKINÉTICA:

La inyección electrocinética se realiza mediante la electromigración de los iones presentes en la muestra al aplicarse un campo eléctrico, por lo que el FEO es un factor que afecta esta modalidad de inyección [27, 28]. La muestra es introducida aplicando un pequeño voltaje, normalmente de 5kV (positivo o negativo), por un tiempo determinado (normalmente 5 - 15 segundos). El voltaje provoca que los iones de la muestra (cationes o aniones, dependiendo del signo del voltaje aplicado) migren selectivamente al interior del capilar. Siendo que los distintos componentes de la muestra migran en distintas proporciones, la cantidad de cada componente que entra al capilar es distinta a la presente en la muestra.

Con esta modalidad de inyección, por un lado se tiene la ventaja que es una inyección selectiva, solo un tipo de iones entra al capilar y los componentes neutros no se introducen, sin embargo, por otro lado al realizarse la inyección ésta modifica la composición de la muestra y, por lo tanto, ésta no puede volver a ser utilizada para fines

de cuantificación. Un hecho importante es que la inyección electrocinética es la única que puede utilizarse con capilares llenos de gel [24].

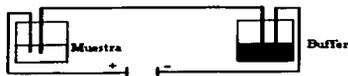


Fig.8 Inyección Electrocinética

### 3.1.7 MANEJO DE LOS DATOS:

Un electroferograma es una grafica de la respuesta dada por el detector contra tiempo, como muestra la siguiente figura.

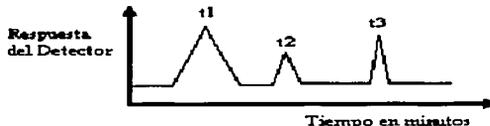


Fig. 9 Representación grafica de un electroferograma

El análisis cuantitativo se realiza por la comparación de las áreas o alturas de los picos, entre un estándar y la muestra analizada.

### 3.1.8 IMPORTANCIA DENTRO DE LA INDUSTRIA FARMACEUTICA.

El explosivo avance de la electroforesis capilar se ha extendido al área biomédica, en el campo de las proteínas, péptidos, ADN, análisis de líquidos de perfusión, monitorco de drogas, marcadores genéticos tumorales y neurobioquímicos, drogas xenobióticas, de abuso, y pericias forenses.

En el área biofarmacéutica, para el control de calidad de productos farmacéuticos y biotecnológicos, quimioterápicos y de estructura quiral.

En el área de alimentos, se la aplica al fraccionamiento y cuantificación de aminoácidos, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, aditivos y contaminantes.

En el área de control ambiental, permite la identificación de contaminantes y sus metabolitos, pesticidas, metales pesados e hidrocarburos.

Dentro del área farmacéutica es uno de los campos de acción donde la electroforesis es muy empleada. Esta técnica se puede utilizar dentro de varios puntos importantes dentro de los cuales encontramos a: cada uno de los pasos de producción de los medicamentos como en, la caracterización y control de las materias primas cuantificación de el(los) principio(s) activo(s) a lo largo de todo el proceso de producción (Ej. prueba de disolución) y en el producto final, además durante el desarrollo y prueba de nuevos medicamentos y en estudios farmacocinéticos en el monitoreo terapéutico de los principios activos y sus metabolitos), y hasta en química forense.

Como todo desarrollo de un área analítica nueva, la incorporación de técnicas acopladas como la espectroscopía de masa, fluorescencia inducida por láser y otras variantes permiten augurar un promisorio futuro [ 23 ].

## 3.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

### 3.2.1 FUNDAMENTO TEÓRICO

La extracción en fase sólida (EFS) es una alternativa más fácil, económica y rápida que la extracción líquido - líquido, que es el método tradicional empleado para concentración de muestras. Los métodos de EFS reducen significativamente el volumen necesario de solventes orgánicos clorados y no clorados comúnmente necesarios para la preparación de la muestra. En el comercio se ofrecen diferentes alternativas de rellenos, que permiten un gran número de posibilidades de trabajo para cualquier sistema matriz/analito.

### 3.2.2 FASES FRECUENTES.

- ✓  $C_8$  y  $C_{18}$  fases enlazadas a sílice
- ✓ Sílice sin modificar
- ✓ Resinas poliméricas, polímeros DVD
- ✓ Fluorosil (silicato magnésico activado)
- ✓ Alúmina

✓ Carbón vegetal

Silice y fases enlazadas son similares a las que se usan en cromatografía líquida. El tamaño es más grande que el de cromatografía (40 - 60  $\mu\text{m}$  de diámetro). La EFS puede usarse de dos maneras en la preparación de muestras. En la primera, los analitos de interés se retienen en el material de relleno, y la muestra con la mayoría de los componentes no deseados, pasan por el relleno sin ser retenidos; los componentes no deseados retenidos en el relleno son eliminados selectivamente, mientras que los analitos de interés son eluidos con un pequeño volumen del solvente apropiado.

En la segunda manera, la muestra pasa por el medio de separación para la EFS y los analitos de interés se recogen al pasar por el adsorbente, sin ser retenidos. Los contaminantes se quedan en el relleno y pueden ser desechados junto con el adsorbente. La segunda estrategia es la escogida cuando el componente de interés se presenta en altas concentraciones. Mientras que cuando el componente de interés presenta bajos niveles, o existen múltiples componentes que desean aislarse y presentan polaridades ampliamente diferentes, la primera estrategia es empleada. Esta manera también es empleada para el enriquecimiento de muestras que tienen de trazas de compuestos y para la concentración de muestras diluidas [ 29 ]. En cualquiera de los casos, el sorbente debe ser primero acondicionado con un solvente apropiado. Después del acondicionamiento, se pasa la muestra a través del sorbente y las impurezas (interferencias) son desorbidas con un solvente de lavado y finalmente, el analito se eluye con el solvente apropiado. Los componentes orgánicos no polares se retienen en el sorbente y el agua junto con los compuestos polares son eliminados. La elución con el solvente apropiado permite concentrar la muestra y obtener concentraciones detectables de los compuestos a analizar [ 19 ].

### 3.2.3 METODOLOGIA PARA LA EXTRACCION EN FASE SÓLIDA.

Para la preparación de las muestras por EFS [20] se utilizan los pasos que se describen a continuación [ 30 ].

- **Activación de la Columna.** Dicha operación tiene por objeto solvatar los grupos funcionales del material de relleno de la columna, debido a que los analitos no pueden interactuar con el relleno de la columna si sus grupos no se encuentran

totalmente "Activados". Para lograr dicha activación se fluye metanol u otros solventes menos polares como podrían ser el acetonitrilo o el tetrahidrofuran.

- **Lavado.** Para lograr el lavado del cartucho se hace pasar agua desionizada o ya sea un amortiguador de pH apropiado. Esto se hace con el fin de remover los excesos del metanol y así mismo prepara a la superficie para la muestra. Es importante que el solvente sea tan similar como sea posible en polaridad, fuerza iónica y valor de pH de la muestra que va a ser extraída.
- **Aplicación de la muestra.** Al aplicar la muestra sobre la columna se hace mediante la utilización de un flujo determinado ( de 1 a 10 ml/min), es importante que este paso se efectúe lentamente porque caudales demasiado rápidos a través de la columna pueden producir una menor interacción entre los analitos y el material de relleno, lo cual conlleva a bajas recuperaciones del analito. Las muestras biológicas son generalmente viscosas y cuando sea posible deben ser diluidas. La selección del solvente de dilución depende del modo de trabajo que se seleccione.
- **Lavado de la Columna.** Esta operación se refiere a la eliminación de la impurezas retenidas del paso anterior. Utiliza un solvente apropiado que remueva selectivamente compuestos endógenos de la muestra. El lavado de la columna no es indispensable, pero en general es recomendable porque produce muestras más "limpias", con menos sustancias que interfieran en el subsecuente análisis.
- **Elusión del Analito.** Finalmente el analito se eluye con un solvente tal que posea la fuerza de elusión apropiada utilizando para ello desde 5 hasta 20 volúmenes de columna.

Las etapas necesarias a seguir, para la realización de la EFS se muestran a continuación en la Fig. 11

#### CARGA DE MUESTRA

- ✓ La muestra se introduce en el cartucho
- ✓ El objetivo es retener bien sea los analitos o los componentes matriciales
- ✓ Lo primero se hace para preconcentrar analitos
- ✓ Lo segundo para eliminar interferencias

#### LAVADO.

- ✓ Se pasa un disolvente con el fin de eliminar cualquier sustancia retenida.

ELUCIÓN.

✓ Paso final, se recuperan los analitos.

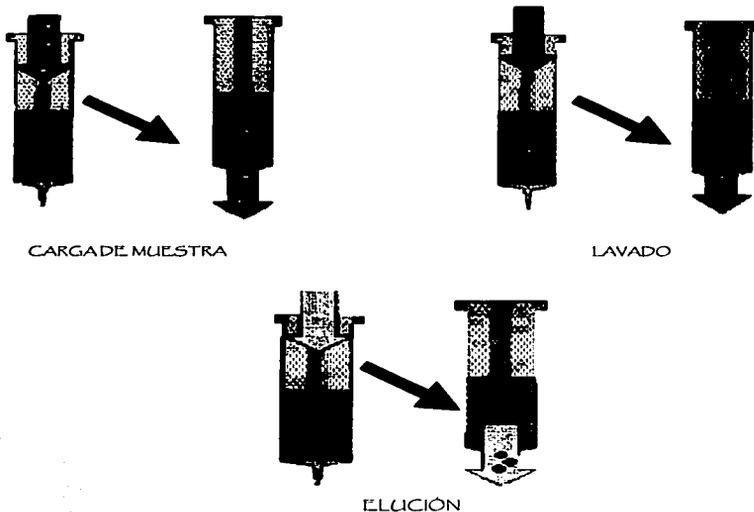


Fig. 10 Proceso para la extracción en fase sólida

La idea básica consiste en retener las sustancias que interesen en el adsorbente y luego extraerlas, con un segundo disolvente. Esto sirve para:

- o Eliminar interferencias
- o Preconcentrar analitos

El dispositivo utilizado es el de jeringuilla.

TESES CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.2.4 APLICACIONES DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Una de las principales ventajas de la extracción en fase sólida son la selectividad debido a la amplia variedad de fases enlazadas, disponibles en el mercado, la velocidad y el menor tiempo para la preparación de un gran número de muestras al día y hace frente a un amplio intervalo de analitos de polaridad distinta.

### 3.3 INFLUENCIA DEL TIPO DE ALIMENTACIÓN DE LAS CABRAS EN LA COMPOSICIÓN DE LOS FLUIDOS BIOLÓGICOS (heces) A ANALIZAR.

#### 3.3.1 CONDUCTA ALIMENTICIA:

Una de las características más peculiares de las cabras es su inquisitiva conducta alimenticia. Entre las especies domésticas, son únicas en escoger y consumir su dieta. Discriminan entre partes de plantas o partículas de alimento que parecen idénticas. Su alimento debe estar fresco, limpio y sin tocar.

#### 3.3.2 IDEAS GENERALES SOBRE ALIMENTOS:

Podemos clasificar los alimentos según los siguientes grupos: 1) granos: fundamentalmente de cereales y de leguminosas, 2) subproductos de los granos: ej. Salvado, harina de soya, 3) alimentos suculentos o azucarados: zanahorias y pulpas, 4) heno y paja: forrajes verdes (praderas y forrajes propiamente dichos) entre los granos de cereales los más utilizados son la avena y con mucha menos importancia el maíz, el sorgo y el trigo.

Dentro de la cría caprina, la alimentación es uno de los pilares básicos del éxito ganadero, estrechamente relacionada con la sanidad y la genética y unidas por las instalaciones y un manejo adecuado.

#### 3.3.3 ALIMENTOS PARA CABRAS

##### 3.3.3.1 ARBUSTIVAS, HERBÁCEAS Y PASTOS / LEGUMINOSAS

Arbustivas se refiere a las partes comestibles (hojas, tallos, ramas) de vegetación leñosa. Herbáceas se refiere a las hierbas de agostadero que no son pastos; también se conocen como malezas. Muchas arbustivas palatables tienen un valor limitado por la

presencia de sustancias inhibidoras que ligan o impiden la utilización de ciertos nutrientes (lignina, aceites esenciales, taninos). Los forrajes proveen de la mayor parte de los nutrientes requeridos para mantenimiento, por lo tanto, es importante conocer su valor alimenticio para complementarlos cuando sea necesario.

Generalmente los forrajes de agostadero son pobres en P y sal y a menudo marginales en vit. A, Ca y minerales traza. Una pastura de buena calidad y una fuente de minerales es todo lo que se requiere para alimentar a las cabras a un nivel de mantenimiento. En la cabra en lactación, la pastura puede reemplazar hasta la mitad del concentrado en la ración, pero se necesitan pasturas mejoradas [ 15 ].

### 3.3.3.2 HENOS Y FORRAJES TOSCOS

Un heno de leguminosa de buena calidad o un heno de pasto / leguminosa son una excelente fuente de nutrientes altamente digestibles, el heno de pasto requiere de una complementación con concentrado.

### 3.3.3.3 ENSILADO Y RAÍCES

Los ensilados se utilizan principalmente en cabras lecheras, pero su uso no es tan común como el de los henos. A las cabras les gustan las raíces y las hortalizas: zanahorias, remolachas y coles, deben darse de la misma manera que los ensilados por su elevado contenido de agua.

### 3.3.3.4 ALIMENTOS ENERGÉTICOS

Los más comunes son: maíz, avena, cebada, sorgo y trigo (y sus sub-productos) y melaza. La cantidad a suministrar depende de las demandas de producción, una cabra seca no necesita de complementación energética mientras que una cabra en el pico de la lactación requiere cantidades importantes de energía.

### 3.3.3.5 ALIMENTOS PROTÉICOS

Las fuentes proteicas más utilizadas son la pasta de soya y la harina de algodón, pero pueden utilizarse: pasta de coco, pasta de cacahuete, pasta de girasol, pasta de cártamo, alimento de gluten de maíz, granos secos de destilería y granos secos de cervecera.

### 3.3.2 EXCRECIÓN

Es así que una vez aprovechados los valores nutritivos el alimento ingerido por los organismos durante su vida en cautiverio, es aprovechado en gran parte para su crecimiento y aquella fracción que no es digerida y absorbida por el cuerpo, se excreta en forma de heces y orina dentro del mismo cerramiento donde conviven todos. Los desechos de excreta están compuestos por material orgánico, que a su vez será descompuesto en elementos menores, principalmente por medio de la acción biológica de las bacterias, algas y hongos que se desarrollan en los mismos cerramientos de cultivo. Durante este proceso de descomposición, se consumirá también oxígeno disuelto en el agua (por efecto de las reacciones químicas producidas) y se liberarán nutrientes que quedarán disponibles en el agua [15].

PARTE

EXPERIMENTAL

EQUIPO, MATERIAL, REACTIVOS Y SOLUCIONES.

4.1 EQUIPO

- Equipo de Electroforesis Capilar P/ ACE MDQ, Beckman Coulter (Fullerton, CA)
- Bomba de vacío con trampa para líquidos DGP 144, Mel de México.
- Centrifuga IEC Clinical centrifuge, Damon IEC división, con una velocidad mínima de 3000 r.p.m. con rotor de capacidad para 8 tubos.
- Balanza analítica, mettler Toledo AB204-S con 0.0001 g de precisión.
- Equipo desionizador de agua tipo 1 MilliQ<sub>plus</sub> Millipore

4.2 REACTIVOS:

- Estándar de Sulfametazina, Spectrum Quality Products, Inc, Lote: LEO167, Pureza: 99 %
- Estándar de Sulfatiazol, Helm de México, Lote: 12519, Pureza: 99 %
- Fosfato de Sodio Monobásico, J.T. Baker, Lote: 10049-21-S Pureza: 102 %
- Hidróxido de Sodio, Merck, Lote: UN1823W6K1, Pureza: 99 %
- Bis - Tris - Propano, Sigma Ultra, Lote: 57H5724, Pureza: > 99 %
- Trizma® Hydrochloride, Sigma, Lote: 50K5407, Pureza: 99 %
- TetraBorato de Sodio, J.T. Baker, Lote: L42635, Pureza: 100.8 %
- Ácido Bórico, J.T. Baker, Lote: N36C55, Pureza: 100.7 %
- Ácido Acético Glacial, J.T. Baker, Lote: N40C5, Pureza: 99.8 %, Densidad: 1.05 g/mL
- Oxido de mesitol, Sigma, Lote: 54H9488, Pureza: ≈ 98 %
- MES, Sigma Ultra, Lote: 79H5424, Pureza: > 99.5 %

METODOLOGIA

4.3 PREPARACION DE LA MUESTRA.

Después del estudio de la forma óptima de preparación de la muestra (lo cual se explicara detalladamente en el análisis de resultados, esta que do como sigue:

La preparación de la muestra consta de las siguientes etapas:

- I. Caracterización y separación de la sulfametazina de la muestra biológica
- II. Limpieza a través de la EFS

### 4.3.1 I ETAPA.

Dentro de la primer etapa se siguió el procedimiento que se muestra a continuación:

1. Pesar aproximadamente 1 g de heces de cabra
2. Adicionar 10 mL de NaOH 0.1 N
3. Mezclar con el vortex por un periodo de 5 min.
4. Centrifugar a 3500 rpm, durante 8 min.
5. Filtrar a vacío con papel Whatman 40 (125 mm).
6. Refiltrar la solución anterior con papel Whatman 40 (125 mm).
7. La solución obtenida es tratada bajo las condiciones de la segunda etapa.

### 4.3.2 II ETAPA.

La segunda etapa consiste en limpiar en lo más posible la muestra, más aun cuando se trata de la determinación de pequeñas cantidades, así como también en los casos en el que la matriz que contiene al analito es muy compleja.

La Extracción en fase sólida (EFS), se realizó a través del siguiente procedimiento:

- ✓ ACONDICIONAMIENTO DEL CARTUCHO C<sub>18</sub>
  - ✓ Eluir 2 mL de metanol a una velocidad de 2 mL / 10 s.
  - ✓ Posteriormente eluir 2 mL de Buffer MES pH 8 a una velocidad de 2 mL / 10 s.
- ✓ CARGA DE LA MUESTRA
  - ✓ Colocar 2 mL de la muestra y 1 mL de Sulfatiazol a 40 µg / mL (estandar interno), mezclar y tomar 2 mL de dicha solución pasándola a una velocidad de 0.2 mL / 10 s.
  - ✓ Adicionar 2 mL de aire a una velocidad de .02 mL / 10 s

- ✓ LIMPIEZA
  - ✓ Hacer Pasar por la columna 2 ml de l buffer MES pH 8 a una velocidad de 0.2 mL / 10 s. mas 2 mL de aire a una velocidad de 0.2 mL / 10 s.
- ✓ ELUSIÓN DE LA SULFAMETAZINA
  - ✓ Eluir 2 mL de metanol mas 2 mL de aire a una velocidad de 0.2 mL / 10 s. Esta elusión se recoge en un vial seco y limpio.

## 5. DESARROLLO DEL MÉTODO

Para el desarrollo del método para la determinación de la Sulfametazina en heces de caba por electroforesis capilar, se realizo el estudio de cada uno de los factores involucrados en la separación como son los que se muestran a continuación en la tabla IV.

Tabla IV. Factores y criterios considerados para la selección de la mejor respuesta por parte del analitos de interés.

OBJETIVO	FACTORES DE ESTUDIO	CRITERIO DE SELECCIÓN
Selección de la longitud de onda óptima para la detección	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elaboración de un espectro de absorción de la SMZ.</li> </ul>	Obtener el máximo de absorción de la SMZ.
Tipo, concentración y pH del electrolito soporte	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Naturaleza, concentración a diferentes niveles (25, 50, 75 y 100 mM) y pH en un rango de 2 - 8 del buffer.</li> </ul>	Obtener la respuesta analítica con una mayor eficiencia, resolución, forma gausiana del pico y un menor tiempo de migración, así como la reproducibilidad del mismo.
Tipo de inyección	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Evaluación de los 2 tipos de inyección: Hidrodinámica y Electrocinética, bajo la modificación de valores en tiempo, presión y voltaje.</li> </ul>	
Tiempo de lavado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Obtener tiempos de migración semejantes con el menor CV posible</li> </ul>	
Preconcentración de la muestra mediante isotacoforesis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Disminuir el limite de detección, con la utilización de la isotacoforesis capilar</li> </ul>	
Limpieza a través de la EFS	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Comparar la respuesta a la aplicación de 3 diferentes tratamientos de limpieza en la muestra.</li> </ul>	

El estudio de la selección de los valores óptimos de cada uno de los parámetros será explicado detallado en el análisis de resultados pero de forma general para llevar a cabo el desarrollo del método se siguió la estrategia que se describe en la Fig. 11 siguiente:

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

## PARTE EXPERIMENTAL

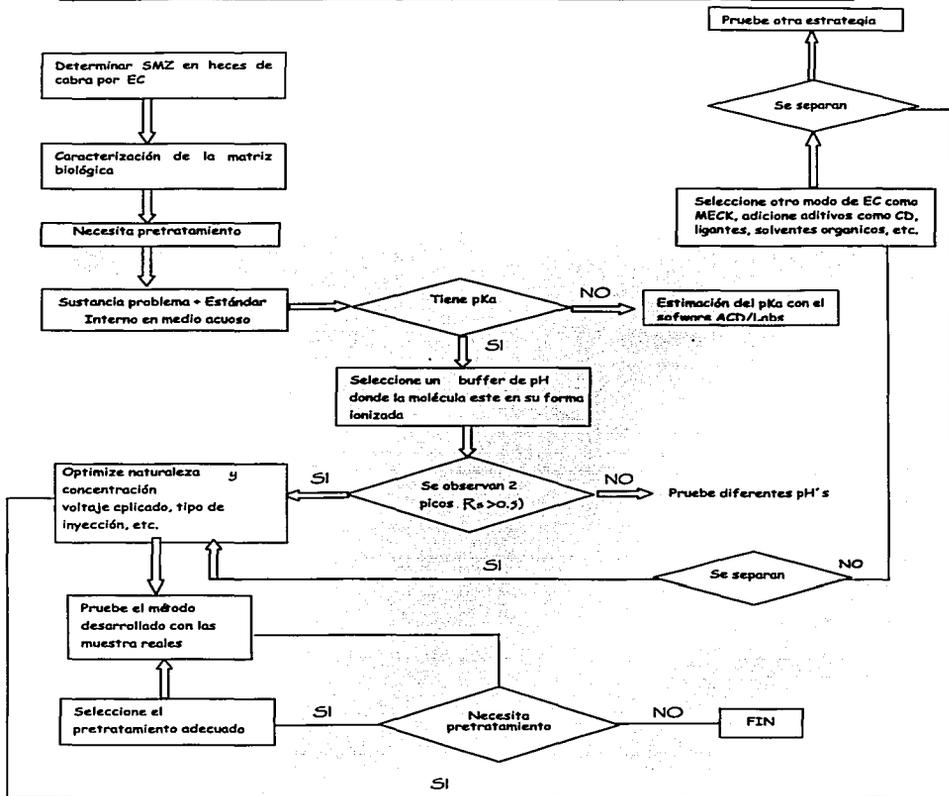


Fig. 11 Estrategia utilizada para el desarrollo del método analítico para la determinación de sulfametazina por Electroforesis Capilar

RESULTADOS

Y

DISCUSION

## V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 5.1 PREPARACIÓN DEL SISTEMA DE LAS HECES

Como las heces de cabra contiene diferentes tipos de pigmentos, dentro de los cuales se pueden encontrar a los carotenos y fibra que pueden adherirse y acumularse dentro del capilar se estudio la manera de pretratar la muestra y así poder evitar la posible interferencia de estos componentes con el analito de interés (Sulfametazina), al realizar las medidas en el equipo de Electroforesis Capilar.

El tratamiento seguido para la preparación de la preparación de la muestra, se mostró previamente en la metodología (Pág. 39).

Este procedimiento se utilizo tanto para la preparación de una muestra de placebo de heces, como la de una muestra de placebo de heces cargadas con estándar de SMZ (Fig. 12)

El comportamiento presentado por el placebo de heces de cabra, en el sistema de E.C, se muestran en la Fig. 12-B

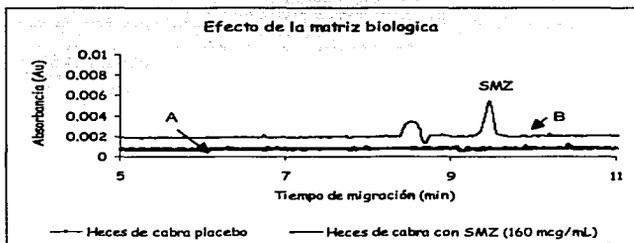
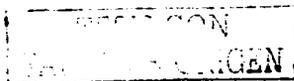


Fig. 12 (A) Electroferograma de las heces cargadas con SMZ (160  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y (B) el placebo de heces. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50,2 cm de long. Total (40 cm de long. al detector), 50  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, buffer de fosfatos 50 mM, pH 6,85, 20 kV de voltaje aplicado, inyección hidrodinámica 0,5 psi por 5 s, 25  $^{\circ}\text{C}$ , detección a 214 nm.

Se pudo observar que las heces de cabra no presentan respuesta bajo las condiciones experimentales utilizadas, previamente impuestas (Fig. 12-B). Por lo anterior se cargo



esta misma matriz de heces con SMZ a una concentración de  $160 \mu\text{g} / \text{mL}$ , para así ver el comportamiento del analito bajo estas mismas condiciones (Fig. 12-A).

Podemos ver que los componentes del placebo no presentaron ningún tipo de interferencia con el pico de la SMZ por lo que se determino que el procedimiento de preparación de la muestra es adecuado, ya que nos permitió identificar de manera selectiva a la SMZ además de obtener una buena señal, es decir se obtienen picos gausianos y con buena resolución.

A continuación se evaluaron diferentes medios de disolución (Tabla V), tanto para la matriz biológica como para el estándar de SMZ a fin de poder concluir que medio era mejor, observando que electroferogramas tenía picos más altos y eficientes (Fig. 13 y 14). Dichos medios fueron el  $\text{NaOH } 0.1 \text{ N}$  y el  $\text{MeOH}$ .

Lo anterior se ilustra en la siguiente tabla:

Tabla. V Diferentes solventes probados para la disolución de SMZ estándar y heces de cabra.

ESTANDAR	MEDIO UTILIZADO
SMZ	$\text{NaOH } 0.1 \text{ N}$
SMZ	$\text{MeOH}$
HC / $\text{NaOH}$	$\text{NaOH } 0.1 \text{ N}$
HC / $\text{MeOH}$	$\text{MeOH}$

HC= Heces de cabra

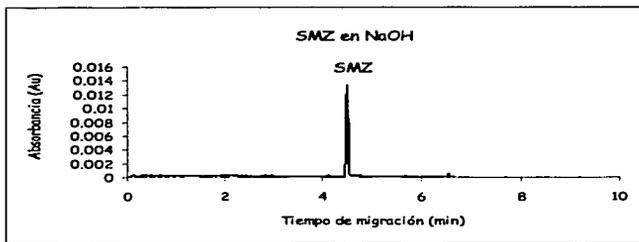


Fig. 13 Electroferograma de la SMZ en  $\text{NaOH } 0.1 \text{ N}$  Condiciones: iguales que la Fig. 12

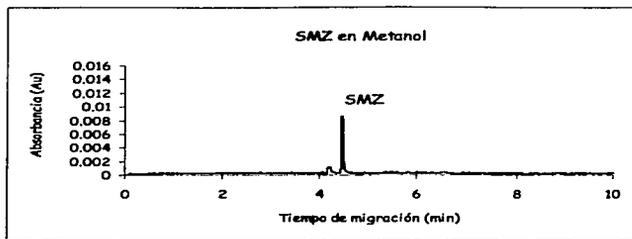


Fig. 14 Electroferograma del estándar de SMZ disuelto en MeOH. Condiciones: iguales que la Fig. 12

En la Fig. 13 podemos observar el estándar de SMZ disuelto en NaOH 0.1 N. El cual presenta un pico bastante eficiente con una absorbancia de aprox. 0.013, mientras que en la Fig. 14 se observa el pico del estándar de SMZ disuelto en metanol, el cual es aunque también bastante eficiente, pero que presenta una menor absorbancia. (aprox. 0.008), que cuando se utiliza NaOH 0.1 N como disolvente.

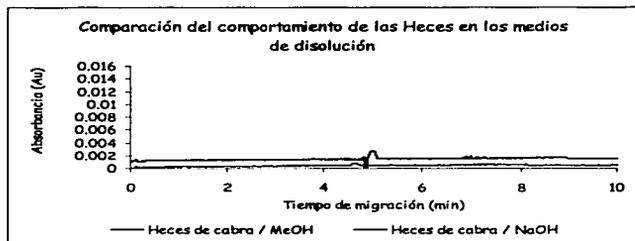


Fig. 15 Electroferograma del efecto del medio de disolución de la SMZ. Medio MeOH. Mismas condiciones que Fig. 12

De acuerdo a los gráficos anteriores y al comportamiento presentado por la SMZ en ambos medios (MeOH y NaOH), pudo notarse claramente la diferencia en eficiencia de los picos del analito, debido a que en el NaOH se obtienen absorbancias mucho más altas a diferencia del metanol, además de que retrasa la respuesta e la SMZ.

Dentro del comportamiento de las heces de cabra, (Fig. 15) pudo observarse que no existe respuesta por parte de los componentes de esta bajo las diferentes condiciones del medio, lo cual es de gran importancia para evitar interferencias indeseables, y la posible adsorción de sustancias no deseadas sobre la superficie del capilar y como consecuencia el retraso del analito.

## 5.2 SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA ÓPTIMA.

Para poder determinar en que longitud de onda la SMZ, presenta su máximo de absorbancia, se preparo una solución stock (véase Anexo 1) de una concentración de  $80 \mu\text{g}/\text{mL}$ .

Posteriormente se leyó la solución en el espectrofotómetro UV - Visible Cary 1E obteniéndose las lecturas correspondientes, observándose que a esta concentración se da una absorbancia mayor a 3 y por tanto el aparato no leyó adecuadamente esta solución por estar muy concentrada.

Por lo que se realizaron dos diluciones a partir de esta, las cuales fueron:

- \*  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$
- \*  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$

Se tomó la lectura de ambas diluciones, esto con el fin de poder determinar exactamente a que longitud de onda se trabajaría y por tanto este representaría la longitud adecuada para realizar detección de la SMZ.

A continuación se muestra el espectro de adsorción que se obtuvo para establecer la longitud de onda óptima y poder realizar la identificación de la SMZ en las heces de cabra (Fig. 16).

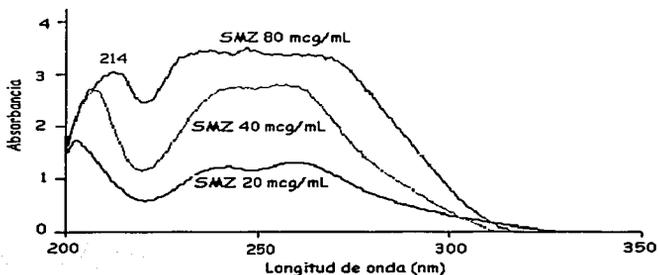


Fig. 16 Comportamiento espectral del estándar de SMZ.

En la figura 16 se observa el espectro de absorción característico de la SMZ el cual coincide al reportado en la literatura también en medio alcalino (6) en el que podemos observar que la SMZ disuelta en NaOH 0.1N presenta 3 máximos, el mayor a 214 nm y los otros dos a 276 y 254 nm. Por lo tanto la longitud de onda que seleccionamos como óptima es la de 214 nm ya que nuestras lecturas serán más sensibles en estas condiciones. Dicha longitud fue determinada a la concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ya que a concentraciones más altas el aparato ya no realiza las lecturas adecuadamente.

### 5.3 TIPO DE INYECCIÓN:

Dentro de los métodos para introducir la muestra, se encuentran la inyección electrocinética y la inyección hidrodinámica. El tipo de inyección es un parámetro secundario que también debe ser optimizado al desarrollarse un método analítico, el estudio de las condiciones del tipo de inyección se determino al realizar diferentes corridas, evaluando la modificación de algunos de los factores involucrados los cuales son:

- ~ Tiempo (5-20 s)
- ~ Presión (0.5 - 1.8 psi)
- ~ Voltaje (5 - 20 kV)

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

En la tabla No. VI se muestran los factores a estudiar así como el tipo de inyección correspondiente.

Tabla VI Condiciones a evaluar en los 2 tipos de Inyección

Tipo de Inyección	Tiempo	Presión	Voltaje
Hidrodinámica: ✓ A1	Constante	Variable	No se aplica
✓ A2	Variable	Constante	No se aplica
Electrocrinética: ✓ B1	Constante	No se aplica	Variable
✓ B2	Variable	No se aplica	Constante

Dentro de lo que corresponde a la inyección hidrodinámica, como se menciona anteriormente, se probarán 2 tipos de condiciones (Ver tabla VI). Las condiciones de trabajo se aprecia en la siguiente Tabla VII

Tabla VII. Condiciones impuestas para la optimización de la Inyección Hidrodinámica en la medición de SMZ

A1		A2	
Presión (psi)	Tiempo (s)	Presión (psi)	Tiempo (s)
0.5	5	0.8	5.0
0.5	10	1.1	5.0
0.5	15	1.4	5.0
0.5	20	1.6	5.0
		1.8	5.0

Una vez establecidas las condiciones de trabajo para la inyección hidrodinámica, se realizaron las medidas de la SMZ con la utilización de buffer de fosfatos a un pH = 6.85. El comportamiento presentado para el primer caso (A1) se muestra en la Fig. 17 y para el segundo caso (A2) en la Figura 18.

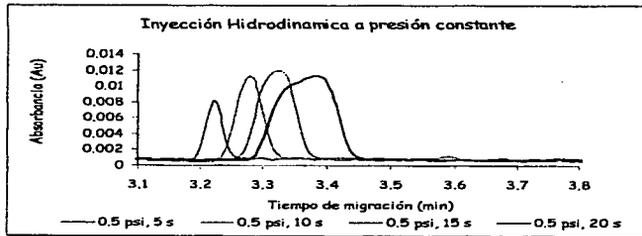


Fig. 17 Electroferogramas de la influencia del tiempo de inyección en el pico de la SMZ. Condiciones: Inyección hidrodinámica 0.5 psi a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 s). Demás condiciones como en la Fig. 12

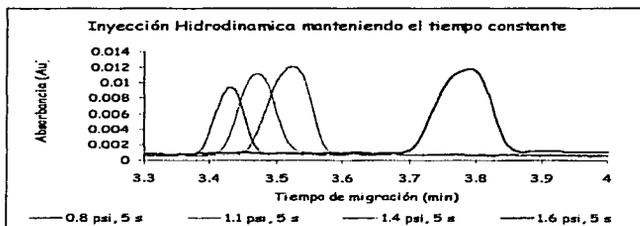


Fig. 18 Electroferograma de la Inyección Hidrodinámica de SMZ manteniendo el Tiempo constante y la presión variable. Condiciones: como en la Fig. 17 excepto la forma de inyección como se especifica el EFG anterior.

También se evaluó la introducción de la muestra a través de la Inyección Electrocinética. Las condiciones que se impusieron para su evaluación se muestran a continuación en la tabla VIII.

Tabla VII . Condiciones impuestas para la optimización de la Inyección Electrocinética en la medición de la SMZ.

B1		B2	
Voltaje (kV)	Tiempo (s)	Voltaje (kV)	Tiempo (s)
5	5	5	5
10	5	5	10
15	5	5	15
20	5	5	20

Los electroferogramas representativos de la evaluación de este tipo de inyección se muestran a continuación en las Fig. 19 y 20

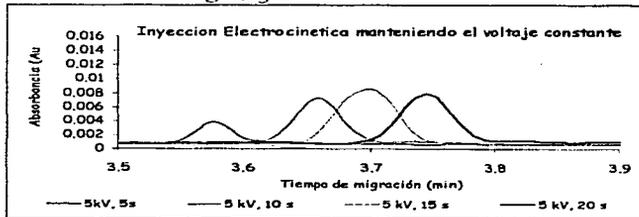


Fig. 19 Electroferograma de la Inyección Electrocinética manteniendo el voltaje constante. Condiciones: Inyección Electrocinética (5 kV) a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 s) demás condiciones como en la Fig. 12

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

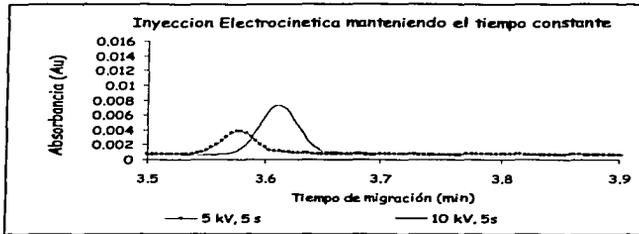


Fig. 20 Electroferograma de la Inyección Electrocinética de SMZ manteniendo el tiempo constante. Condiciones: Inyección Electrocinética a 5 s a diferentes voltajes (5 y 10 KV), demás condiciones como en la Fig. 12

Para el primer caso en el que mantuvieron modificados los tiempos de introducción de la muestra (ver Fig. 17) se manifiestan menores cambios en la absorbancia. Esto pone de manifiesto que mediante la Inyección electrocinética la introducción de la muestra es más selectiva por lo que a una mayor inyección se enriquece más el analito el volumen final introducido.

También puede observarse en la inyección hidrodinámica que al aumentar demasiado el volumen introducido, el pico empieza a presentar deformación además de incrementarse el tiempo de análisis, este efecto se presentó a las condiciones de 0.5 psi, 20 s.

Para el segundo caso (B2) en el que se modificaron los valores de presión (Fig. 18), se tuvieron comportamientos semejantes a los presentados en la Fig. 17, ya que la deformación se presentó a las condiciones de 1.6 psi, 5 s, y para las otras tres condiciones se presentó un pico gauseano con diferentes absorbancias, presentándose una mayor respuesta (0.0119  $\mu$ Au) a 1.4 psi, 5 s.

Por otra parte y comparando ambos tipos de inyección, se observa que en la Inyección electrocinética (Fig. 19 y Fig. 20) mostraron absorbancias más pequeñas a que las obtenidas en las mediciones hechas hidrodinámicamente.

Posteriormente se estudio el efecto provocado al analito, pero con la introducción de la muestra de manera electrocinética, a la que se le ve aplicado un cierto voltaje.

Esta evaluación se hizo bajo las condiciones de la tabla VII, en la que se modificaron tanto el tiempo de introducción como el voltaje aplicado. La Fig. 19 muestra los EFG's en los que se modifico el tiempo (5, 10, 15 y 20 s), notando modificación en los tiempos de migración y absorbancias pero no en la forma del pico ya que en todas la mediciones se presentan picos gauseanos. La mayor absorbancia que se obtuvo en la Fig. 19 fue de 0.0083  $\mu$ Au, que corresponde a 5KV, 15 s.

Por otro lado al modificarse el voltaje (Fig. 20) aplicado (5 y 10 KV), la SMZ tuvo una absorbancia de 0.0038  $\mu$ Au para 5 KV y 0.0073  $\mu$ Au para 10 KV, mostrándose también que los picos tienen una forma gauseana, es decir no se presenta la deformación de ellos.

Estableciendo que bajo las condiciones electrocinéticas no favorece a la SMZ, ya que se obtiene el pico de esta con una menor eficiencia, que las realizadas con la inyección hidrodinámica por lo que nos permite establecer que se obtiene una mejor respuesta en cuanto, a la forma y la eficiencia del pico a 0.5 psi, 15 s. que corresponde a las condiciones de inyección hidrodinámica.

#### 5.4 CONDICIONES DEL TIEMPO DE LAVADO.

Uno de los parámetros esenciales es el determinar el tiempo adecuado para el lavado del capilar, esto con el fin de garantizar que exista reproducibilidad de tiempo de migración de los picos, y asegurar que no se acumulen sobre la superficie del capilar ciertas impurezas ajenas al mismo.

Antes de realizar cualquier tipo de ensayo y al inicio del día es necesario acondicionar el capilar de sílice fundida, este acondicionamiento se realizo bajo las condiciones que se muestran en la tabla No. IX

Tabla IX. Condiciones impuestas para el acondicionamiento del capilar de sílice fundida al inicio de cada día.

Solvente	Tiempo (min.)
NaOH 0.1 N	10
Agua	10
Buffer *	10

\* El lavado con el Buffer se hizo con Fosfatos 50 mM, pH = 6.85

Es importante que el NaOH sea el primer solvente para acondicionar el capilar ya que este permite que la pared interna del capilar utilizado (sílice fundida) presenta carga negativa debido a la ionización de los grupos silanol ( $\text{Si} - \text{O}^-$ ) de la superficie, con lo cual cualquier impureza adsorbida por los grupos silanol será arrastrada por la solución

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

de lavado. Al introducir enseguida agua desionizada se disminuye el pH al interior del capilar, para finalmente acondicionarlo con el lavado con buffer de corrida.

Una vez acondicionado el capilar al inicio del día, se procedió a evaluar el tipo de lavado entre corridas con las condiciones propuestas en la tabla No. X

Tabla No. X Condiciones aplicadas para el tiempo de lavado entre corridas.

Disolvente	Tiempo (min.)
NaOH 0.1 N	2
Agua desionizada	2
Buffer de fosfatos 50 mM, pH = 6.85	5

Para la realización de dicho ensayo se realizo la medición de la solución estándar de SMZ a una concentración de 160 µg/mL por quintuplicado, implicando el lavado del capilar entre cada corrimiento, bajo las condiciones impuestas previamente (ver tabla X). El comportamiento presentado se muestra a continuación en la Fig. 21

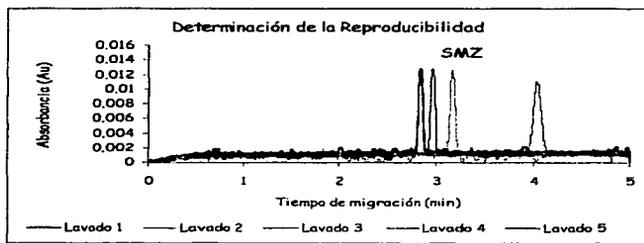


Fig. 21. Electroferogramas correspondientes a las primeras 5 inyecciones de SMZ al lavado entre corridas propuesto en la tabla IX. Condiciones: No hubo reemplazo en el buffer, condiciones que la Fig. 12

Para la evaluación de estas primeras cinco inyecciones se utilizo un solo buffer, con lo que puede observarse que existe un efecto en el cambio de composición del buffer con el uso consecutivo en 5 corridas, lo cual se refleja en la variación de los tiempos de migración de la SMZ. El efecto anterior se minimizo realizando otros 5 corrimientos en el cual se cambiaron los buffers tanto de lavado como de corrida, esto con la finalidad de mantener acondicionado al capilar, asegurándose que se utilizan buffers de la misma composición. El fin de dicho ensayo es que la SMZ presente tiempos de migración

similares bajo dichas condiciones de lavado. La Fig. 22 muestra el comportamiento presentado por los 5 posteriores corrimientos.

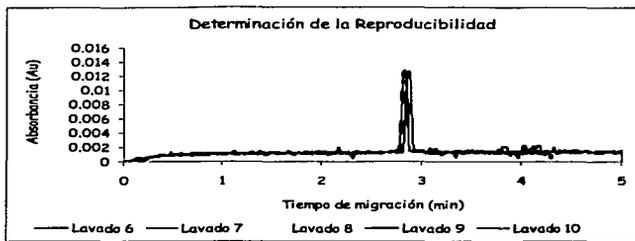


Fig. 22 Electroferograma correspondiente a los segundos 5 corrimientos de la SMZ a las condiciones propuestas de la tabla X. Condiciones: Reemplazo de buffer fresco entre cada corrida, demás condiciones que la Fig. 12

Comparando el comportamiento existente entre ambos Fig. 21 y 22 se puede ver claramente, que el tiempo de migración para las primeras condiciones impuestas, varia demasiado es decir la respuesta se presenta a tiempos diferentes, por lo que los picos a cada inyección se ven desfasados, a diferencia de las corridas de la Fig. 22, ya que con el cambio del buffer entre cada corrida nos permitió obtener picos reproducibles, obteniéndose así la migración de la Sulfametazina en los mismos tiempos.

Posteriormente se determino el %RSD para los primeros EFG's, en el que se utilizo un mismo buffer y para los posteriores EFG's a los que se midieron con el reemplazo de el buffer entre cada medición. Los resultados se muestran en la tabla XI.

Tabla XI. %RSD para el tiempo de migración de las mediciones hechas para la optimización del tiempo de lavado entre corridas.

	s/reemplazo de Buffer		c/reemplazo de Buffer	
	No. De lavado	T. De migración	No. De lavado	T. De migración
	1	2.97	6	2.84
	2	3.17	7	2.83
	3	3.35	8	2.83
	4	2.84	9	2.88
	5	2.84	10	2.84
Desvest.		0.2223		0.0207
Prom.		3.0341		2.844
C.V.		7.3279		0.7291

Es así que analizando la tabla X, en la que se muestran los C.V. para los tiempos de migración, se observa que al realizar el cambio de buffer entre cada corrida se obtiene un C.V. del 0.7291 %. Indicándonos así que este cumple con el parámetro de aceptación, el cual debe tener un C.V. menor al 1.5 %, valor en el que los segundos cinco corrimientos cumple.

### 5.5. EFECTO DEL pH

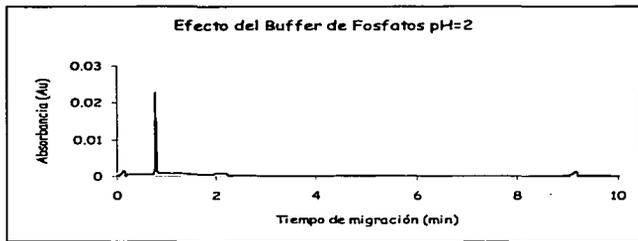
Debido a que el pH es un parámetro extremadamente importante en el desarrollo de un método por EC, se procedió a estudiar su efecto. La selección de los valores de este parámetro se realizó tomando en cuenta que debe ser aquel que permita tener a la SMZ y al STZ como especies ionizadas, para así favorecer la migración de las especies dentro del sistema de EC.

Durante dicho ensayo se realizaron mediciones empleando buffer de fosfatos a con un rango de 2 - 8. Los pH's utilizados se muestran a continuación:

Tabla. XII Rango de pH's estudiados.

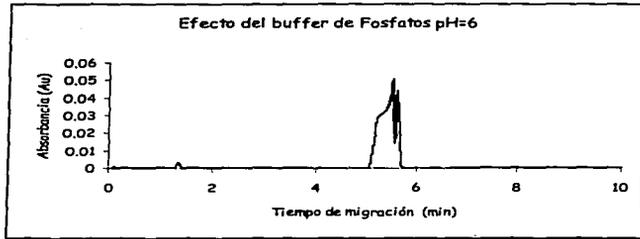
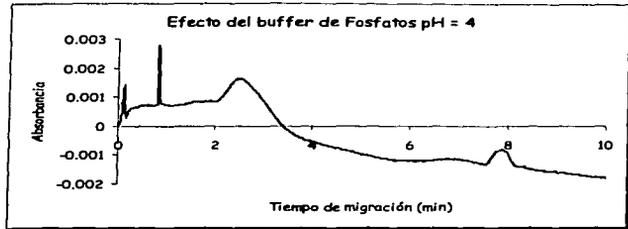
Buffer	pH a estudiar
Fosfatos	2.0
Fosfatos	4.0
Fosfatos	6.0
Fosfatos	6.85
Fosfatos	8.0

El comportamiento individual para cada corrimiento en Buffer de Fosfatos a diferentes pH's se muestran en las (Fig. 23 A, B, C y D) respectivamente.



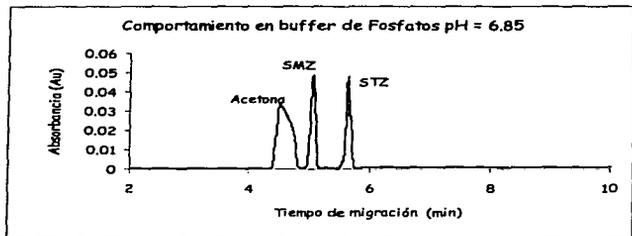
(A)

(B)

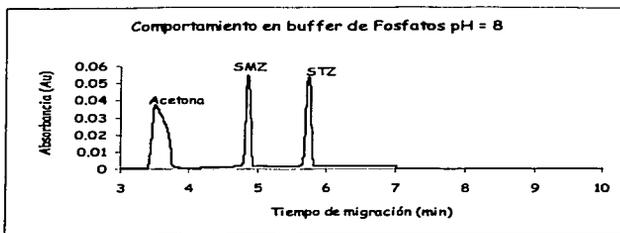


(C)

(D)



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



(E)

Fig. 23 Electroferograma de la SMZ, STZ y el marcador neutro en buffer de Fosfatos (A= pH 2, B= pH 4, C= pH 6,0, D= pH 6,85, E= pH 8,0). Condiciones: iguales que la Fig. 12 excepto pH

Cabe mencionar que para la realización de este ensayo, se le adiciono 100  $\mu\text{L}$  de acetona al estándar de SMZ, para así poder denotar la migración respectiva (catódica o anódica) de cada especie, siendo que la acetona es una especie neutra.

Con lo que respecta a su comportamiento a pH de 2, mostrándose esta en la Fig. 23 - A, puede observarse que solo se logra obtener un pico lo que quiere decir que todas las especies poseen la misma movilidad bajo estas condiciones, por lo que no se puede determinar con exactitud de que especie se trata.

Haciendo una comparación entre el efecto que tiene el pH dentro del buffer, el cual afecta a la respuestas que se dan por parte de la SMZ, se puede observar que a pH de 4 y 6 (Fig. 23 - B y Fig. 23 - C), la respuesta es muy similar entre ambos, es decir la migración por parte de la SMZ, STZ y la acetona es la misma, por lo que no logran separarse a dichos valores de pH.

A pH 6,85 y 8 ya se logra la separación tanto la acetona como de la SMZ y el STZ. Concluyéndose que el pH 8, resulto ser el más adecuado, ya que se observan claramente las tres respuestas, correspondientes a la acetona, la SMZ y el STZ, además de que presentan absorbancias más grandes (SMZ 0,052 y 0,05 para el STZ), así como una mejor resolución entre ellos Fig. 23 - E.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

5.6 ESTUDIO DEL TIPO DE ELECTROLITO SOPORTE A UTILIZAR.

Este es una de los parámetros básicos a estudiar en el desarrollo de un método de separación por EC. Tanto el EOF como la ionización del analito pueden alterarse por pequeños cambios en el pH por lo que se requiere buffers que mantengan el pH constante.

Es bien sabido que los sistemas buffers son efectivos en un rango de aproximadamente dos unidades de pH alrededor del valor del pKa (véase Pág. 17).

Para establecer que tipo de electrolito soporte, se utilizaría en la identificación de SMZ en heces de cabra, se realizó una selección previa en base al pH, por lo que este debe amortiguar en el pH deseado, es decir a pH 8 el cual fue seleccionado en el apartado anterior.

El rango de pH que amortigua cada buffer se muestra a continuación en la siguiente tabla:

Tabla XIII. Características de los buffer a utilizar

TIPO DE BUFFER	NATURALEZA	pKa's	RANGO DE AMORTIGUAMIENTO DE pH
Fosfatos	Química	2.12, 7.21, 12.32	1.14 - 3.14 // 6.20 - 8.20
Boratos	Química	8.14, 10.14	8.14 - 10.15
Trizma	Biológica	8.1	7 - 9.20
Bis-Tris-Propano	Biológica	6.8, 9.0	6.3 - 9.5

En base a lo anterior se procedió a analizar el comportamiento del estándar de SMZ en cada uno de los electrolitos soporte. Primeramente se realizaron las mediciones utilizando los buffer de naturaleza química dentro de los cuales se encuentra el fosfatos y boratos, ambos a un pH = 8, y a una concentración de 50 mM.

Dichas inyecciones se hicieron a partir de muestras de solución estándar de SMZ a una concentración de 160 µg/mL preparadas en NaOH 0.1 N, adicionando SFZ como estándar interno, a las mismas condiciones. El comportamiento presentado, bajo dichas condiciones se muestran en la Fig. 24 para fosfatos y en la Fig. 25 para boratos.

TESIS CON  
SELLO DE ORIGEN

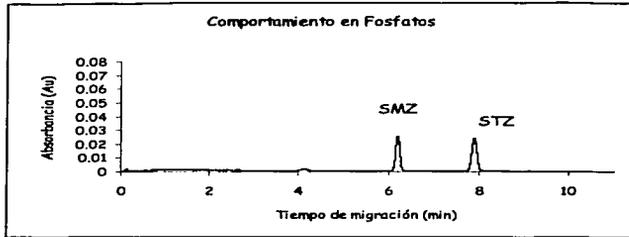


Fig. 24 Comportamiento presentado por parte de la SMZ y SFZ en el Buffer de Fosfatos. Condiciones: mismas que Fig. 12, excepto que el pH del buffer es 8.0

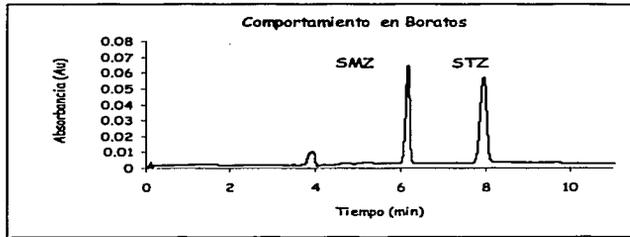


Fig. 25 Electroferograma correspondiente al comportamiento presentado por la SMZ y SFZ en buffer de Boratos. Condiciones: iguales que Fig. 12, excepto que el electrolito soporte es pH 8.

Dentro de la evaluación también, se realizaron medidas utilizando de 2 buffer de naturaleza biológica, dentro de los cuales se encuentra a el Bis - Tris - propano y Trizma (Ver Tabla XIII).

Las condiciones que se manejaron para dichos buffers, son exactamente las mismas que para los buffer de naturaleza química, (50 mM a  $pH = 8$ )

El comportamiento observado para el estándar en dichos buffer (Trizma y Bis - Tris - propano) se muestra en la Fig. 26 y 27 respectivamente.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

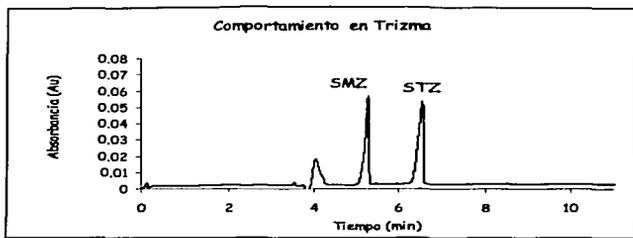


Fig. 26 Electroferograma correspondiente al comportamiento presentado por la SMZ en Trizma. Condiciones: iguales que Fig. 25

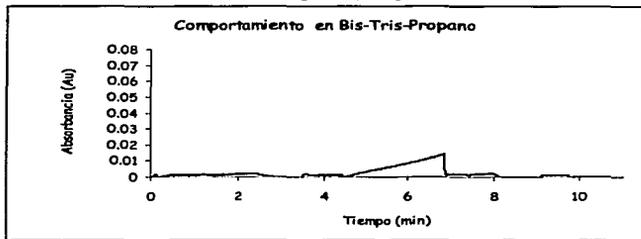


Fig. 27 Electroferograma correspondiente al comportamiento de la SMZ con Bis - Tris - propano como electrolito soporte. Condiciones: iguales que Fig. 25

Una vez hecho el análisis se hizo una comparación de los electroferogramas obtenidos en buffer de trizma, fosfatos y boratos a fin de determinar en que electrolito soporte la respuesta es mejor, tomándose como criterios la obtención de picos más eficientes, altos y sobre todo gaussianos. Dicha comparación se muestra en la Fig. 28

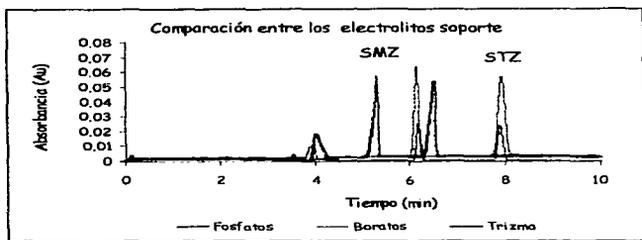


Fig. 28 Comparación entre los diferentes tipos de electrolitos utilizados. Condiciones: mismas Fig. 25

Podemos observar que con la utilización de los buffer químicos ( fosfatos y boratos), los cuales muestran su comportamiento en la Fig.24 y 25 respectivamente obtenemos picos eficientes, gauseanos y simétricos, aunque en buffer de boratos la absorbancia presentada por la SMZ es mucho mayor (0.07) que en el buffer de fosfatos(0.05).

Por otro lado utilizando los buffer de naturaleza biológica, como es trizma (Fig. 26 ) obtenemos picos con absorbancias comparables, a las que se obtienen usando boratos como buffer, con la diferencia que los picos en buffer trizma son bastante asimétricos. Por ultimo al utilizar bis-tris-propano, también de naturaleza biológica (Fig. 27 ), existe una gran deformación en los picos, teniendo como consecuencia que estos sean anchos y asimétricos e inclusive negativo el pico del STZ.

Lo anterior sugiere que este buffer aporta considerablemente a la absorbancia y a esta longitud de onda ya que el pico del STZ absorbe menos que el buffer a estas condiciones experimentales . Además es posible que con la utilización de este buffer se ven favorecidos los fenómenos de adsorción, lo que explicaría lo anchos y asimétricos que se aprecian los picos.

Es por lo anterior que se determino utilizar, como electrolito soporte a boratos ya que este nos permite obtener picos altos, gauseanos y tiempos cortos de análisis tanto para la SMZ como para el STZ .

5.7 CONCENTRACION DEL BUFFER

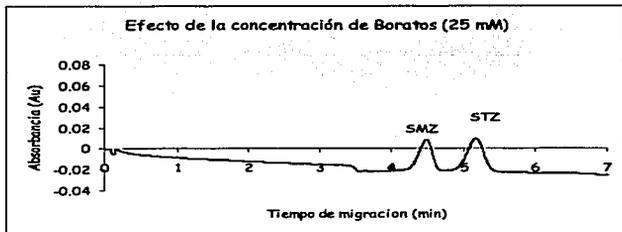
Una vez establecido el pH y el tipo de buffer más adecuado para el análisis, se evaluó de la misma manera la concentración en la cual este debía de encontrarse. Dentro de la evaluación de dicho ensayo se realizaron varias medidas utilizando el electrolito soporte a diferentes concentraciones, bajo las mismas condiciones. A continuación se muestran las establecidas para cada concentración:

Tabla . XIV Condiciones para cada una de las concentraciones a evaluar.

Tipo de Buffer	Concentración	pH
Boratos	25 mM	8
Boratos	50 mM	8
Boratos	75 mM	8
Boratos	100 mM	8

Para dicha evaluación se preparó una mezcla de los estándares a medir tanto del analito de interés como el del estándar interno a una concentración de 160 µg/mL y colocados ambos en un volumen de 800 µL.

Una vez establecidas las concentraciones a evaluar, se realizaron las mediciones, con la mezcla de estándares. El comportamiento presentado para cada concentración se muestran los siguientes electroferogramas (Fig. 29 - A, B, C, y D)



(A)

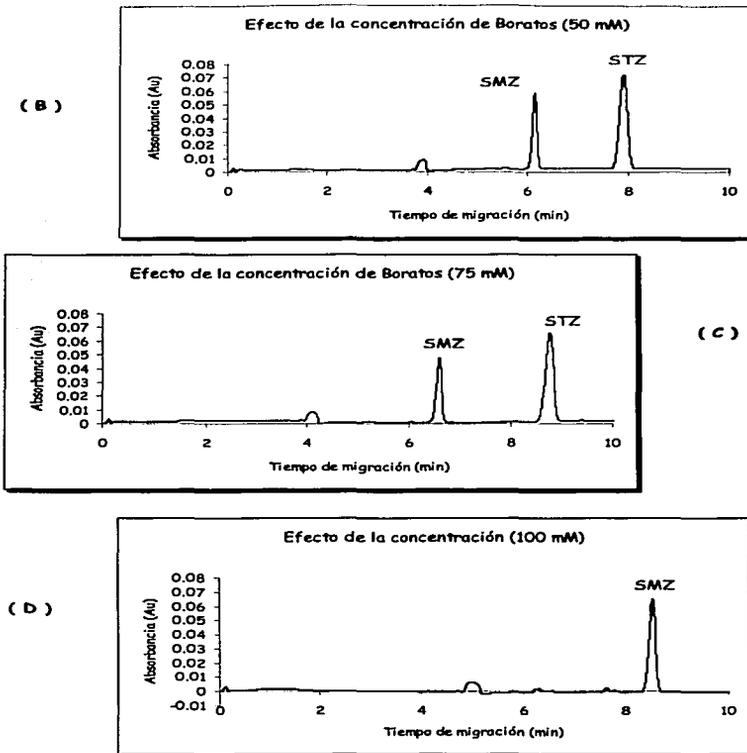


Fig. 29 Electroferogramas de cada uno de los corrientes del electrolito soporte (Boratos) para determinar la concentración más adecuada. (A = 25 mM, B = 50 mM, C = 75 mM y D = 100 mM). Condiciones: buffer de boratos, pH 8, como electrolito soporte a diferentes concentraciones, demás condiciones como en la Fig. 12

Cabe mencionar que el EFG exhibido en las Fig. 29-A y 29-B presentan valores negativos en el eje de las abscisas (absorbancia), lo cual desde luego no significa que se hayan obtenido valores negativos de esta propiedad si no que en estos experimentos la línea base de los electroferogramas cayo por debajo de cero de la escala debido a que no se logro estabilizar la señal emitida por el buffer de corrida antes de que el equipo aplicara el inicio del EFG al autozero.

Para realizar el estudio de que concentración es mejor para la determinación de la SMZ, se tomo un rango de 25 a 100 mM, que es el que generalmente se establece en análisis por E.C.

La Fig. 29 - A muestra el EFG de la concentración del buffer boratos a 25 mM, en el que se observa que ambos analitos (SMZ y STZ), presentan absorbancias negativas (previamente explicado) y una pequeña respuesta por parte de ellos reflejándose en los valores de absorbancia obtenidos, ya que para la SMZ fue de 0.0072  $\mu$ Au y para el STZ de 0.0071  $\mu$ Au.

Posteriormente se evaluó a una concentración de 50 mM, observándose el efecto causado en la Fig. 29 - B, manifestándose las respuestas con una buena resolución entre los picos así como buenas alturas (absorbancias de 0.057 Au para la SMZ y 0.069 Au para el STZ), valores superiores a las demás mediciones realizadas.

Por otro lado al comparar la Fig. 29 - C y 29 - D en las que se evaluaron concentraciones de 75 y 100 mM respectivamente, la primera tiene alturas menores en comparación a la 50 mM y los tiempos de análisis se prolongaron más. Por otra parte la Fig. 29 - D la cual muestra el efecto del buffer de boratos a una concentración de 100 mM la cual no favorece al análisis, ya que durante el tiempo de medición impuesto al análisis no se observa el pico del STZ, además de que a dicha concentración no se asegura que se alcance el voltaje impuesto, pues la corriente generada llega al limite permisible por el equipo.

De acuerdo al comportamiento presentado por la SMZ, en las diferentes concentraciones del electrolito soporte, se determino que la más adecuada para realizar el análisis es la concentración de 50 mM, ya que con ella se obtienen picos altos, gauseanos y eficientes.

Dentro de la comparación de algunos de los parámetros importantes para la determinación de la concentración más adecuada, están el número de platos teóricos (N), y la resolución, los cuales se muestran en la Fig. 30 y 31 respectivamente.

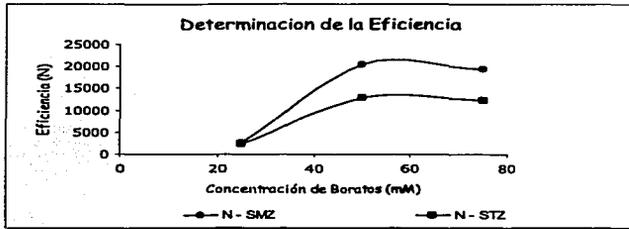


Fig. 30 Efecto de la concentración del electrolito soporte (boratos) en la eficiencia de los picos de la SMZ y el STZ. Condiciones: iguales que la Fig. 29

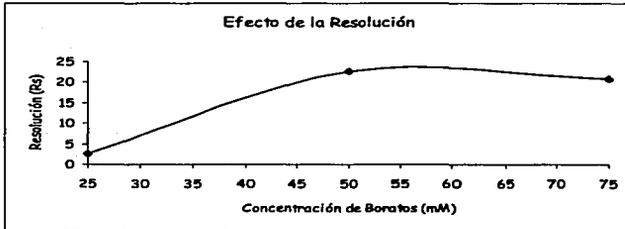


Fig. 31 Efecto de la concentración del buffer en la resolución de SMZ y STZ. Condiciones: iguales que la Fig. 29

Por lo que, basándose en los parámetros mencionados anteriormente, logra determinarse como óptima la concentración de boratos a 50 mM, ya que con ella se obtienen un máximo de platos teóricos, lo que puede verse en la Fig. 30 y una mayor

resolución entre el pico de la SMZ y el STZ en la matriz de heces, (Fig. 31) sin el aumento excesivo en la corriente.

Cabe mencionar, que dentro del análisis y de los parámetros decisivos para la elección de la concentración adecuada del electrolito soporte no se vio incluido a la concentración de 100 mM, ya que este tuvo aproximadamente 300  $\mu\text{A}$  de corriente por lo que no se alcanzó el voltaje impuesto de 20 kV, si no que fluctuó en valores menores a este.

### 5.8 LIMITE DE DETECCION .

Para poder evaluar que concentración es la más pequeña en la cual es posible distinguir de una manera confiable la señal del analito del ruido, es decir, el limite en el cual las lecturas hechas representarían la confiabilidad de esta, se realizaron mediciones del estándar de SMZ determinándole su (S/N) a cada concentración .

La determinación del limite de detección se hizo a partir de:

1. Mediciones de la SMZ a pequeñas concentraciones (8, 14, 16 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), sin preconcentración.
2. Mediciones de la SMZ a pequeñas concentraciones (2, 4, 8 y 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), con preconcentración en línea.

Cada una de estas se explica a continuación:

#### 5.8.1 LIMITE DE DETECCIÓN SIN PRECONCENTRACIÓN

Se hizo a partir de 4 concentraciones diferentes que son:

8, 14, 16 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

El número de veces de señal ruido encontradas para 8 y 14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fue de una S/N = 2 y 3 respectivamente, y para 16 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se obtuvieron valores por encima de los especificado (S/N = 2 o 3) lo que nos indica que estas ultimas se encuentran fuera de dicha especificación.

Siendo que las concentraciones evaluadas representan cantidades relativamente altas, esto porque se esperan cantidades mas pequeñas al limite de detección determinado sin preconcentración (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en las muestras reales, se vio en la necesidad de hacer

un estudio para la posible disminución de los límites de detección. Es por lo anterior que se recurrió a la determinación del límite de detección con la ayuda de la isotacoforesis capilar en línea.

### 5.8.2 LIMITE DE DETECCIÓN CON PRECONCENTRACIÓN

Se evaluaron 4 niveles de concentración sin mediciones repetidas y sin replicas, a las que también se le determino su  $S/N$  a cada una, las concentraciones evaluadas son:

- 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$
- 12  $\mu\text{g}/\text{mL}$

A cada una de las concentraciones anteriores, se les evaluó la señal ruido, obteniendo los datos siguientes:

Concentración evaluada	Número de veces señal Ruido ( $S/N$ )
2 $\mu\text{g}/\text{mL}$	2
4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3
8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	3
12 $\mu\text{g}/\text{mL}$	8

Se observo que la concentración mínima detectable para la determinación de la SMZ en heces de cabra corresponde a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , debido a que en dicha concentración se obtienen una  $S/N = 2$ , lo que indica que a concentraciones mayores, se tendrá la seguridad de que se trata del analito y no representara confusión con la línea base (o ruido) del aparato.

### 5.9 EXTRACCION EN FASE SÓLIDA.

El desarrollo del método analítico explicado ampliamente en los resultados y discusión de los capítulos anteriores fue realizado utilizando estándares acuosos de sulfametazina y su estándar interno sulfatiazol. Las condiciones optimas serán aplicadas a la evaluación de SMZ presente en muestras de heces, por lo que fue necesario realizar el pretratamiento de las muestras antes de su posterior medición por EC.

El objetivo principal de la extracción en fase sólida, es la desarrollar una metodología que nos permitiera limpiar o purificar las muestras de heces cargadas con un analito o activo como es la sulfametazina, es decir una proceso suficiente para separa los constituyentes no deseados de la matriz biológica y dejar a nuestro analito o activo libre de las impurezas que contiene esta matriz biológica, para así someterla a un análisis posterior, por EC.

El procedimiento analítico debería ser capaz de permitirnos eliminar todas las sustancias o impurezas presentes en las heces y dejar a nuestro analito en solución, a una concentración tal que pudiera ser analizada por EC.

Debido a las propiedades físicas y químicas tanto para la SMZ, las heces y la columna utilizada C<sub>18</sub> (octadecilsilanol) en este estudio, y en base a los mecanismos por los cuales se puede obtener a un analito (Véase Pág. 33) se determino utilizar el segundo tipo, el cual consiste en retener las impurezas de la muestra y eluir de forma selectiva a el analito de interés, es decir, eliminar todas las impurezas o sustancias endógenas de las heces para posteriormente obtener la SMZ.

Se evaluaron tres diferentes tratamientos, bajo las siguientes condiciones:

Tabla. XV Pretratamiento seguido para la evaluación de las condiciones de limpieza de las muestras de heces cargadas con SMZ estándar.

Número de tratamiento	Condiciones impuestas
I	Carbón activado y pasado por acrodisco 0.45 µm.
II	Carbón activado , filtración por acrodico 0.45 µm y limpieza a través del Sep-pak.
III	Limpieza a través del sep-pak y filtración por acrodisco 0.45 µm.

Los procesos se describen en el anexo II.

Dichos tratamientos se realizaron con la finalidad de eliminar en lo más posible los pigmentos que se pudieran filtrar a la solución . Una vez realizados los tratamientos antes mencionados se obtuvieron los electroferogramas correspondientes a cada tratamiento los cuales se muestran a continuación:

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

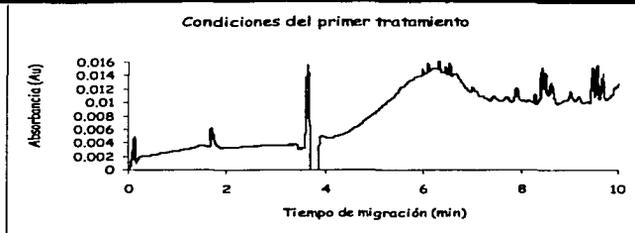


Fig. 32 Electroferograma correspondiente a la SMZ en heces de cabra utilizando el tratamiento I para la limpieza de la muestra. Condiciones: Buffer Boratos 50 mM, pH 8, Iny. Hidrodinámica 0.5 psi, 15 s, demás condiciones como en la Fig. 12

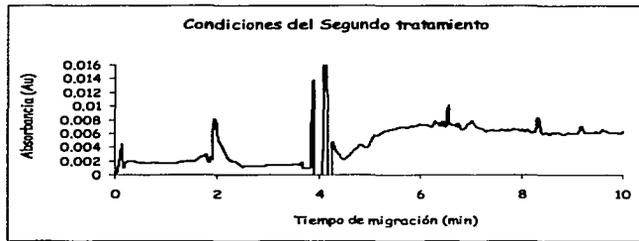


Fig. 33 Electroferograma de la SMZ en heces de cabra correspondiente al tratamiento II para la limpieza de la muestra. Mismas condiciones de Fig. 32

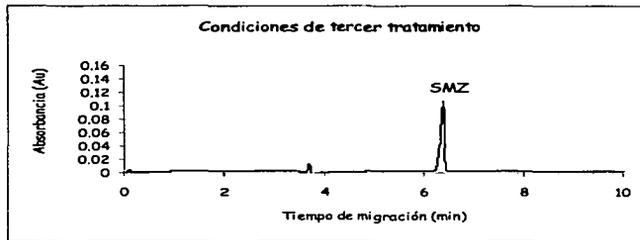


Fig. 34 Electroferograma de la SMZ en heces de cabra correspondiente al tratamiento III para la limpieza de la muestra. Mismas condiciones de Fig. 32

Para la evaluación de la limpieza de la muestra se cambiaron los buffer entre cada corrida, esto con la finalidad de mantener acondicionado el capilar.

En base al comportamiento anterior, se pudo establecer que la utilización de la extracción en fase sólida para limpiar la muestra de los pigmentos de las heces, mediante la utilización de un buffer orgánico (MES 50 mM, pH= 8) nos permitio eliminar los pigmentos que podrían interferir en el análisis, debido a que se presentan menos interferencias bajo las condiciones del tratamiento No. III

## 6.0 EVALUACIÓN DE LAS FASES.

Una vez determinado que se logra la limpieza de la muestra a través de la extracción en fase sólida, se evaluó la posibilidad de que la SMZ pudiera eluirse junto con el buffer, siendo que para garantizar que esto no sucediera se sometieron a el sistema de EC.

Dentro del proceso de extracción en fase sólida se evaluó cual sería el mejor buffer de limpieza y que al mismo tiempo eliminara la posibilidad de tener perdida del analito en la fase del buffer (etapa de limpieza). Para asegurarse de que no existiera perdidas del analito en el buffer se realizo un experimento en el que se analizaron las dos fases involucradas (buffer y metanol).

Para realizar en una forma más completa el ensayo, se recurrió a la utilización de dos tipos de buffer acetatos y MES, el buffer de acetatos el cual tiene un rango de pH de amortiguamiento de 3.7 a 5.7, por lo que amortigua en un rango de pH intermedio entre el valor de los pKa's de la SMZ (2.65 y 7.4). Al pH utilizado de 5.0 la SMZ se encuentra como una especie neutra, por lo que los pigmentos presentes en la muestra que son de naturaleza lipofílica y no tienen afinidad por los solventes polares como el metanol se quedarían retenidos dentro del sep-pak, desde el inicio mientras que la SMZ eluye con el MeOH.

La comparación entre el buffer de acetatos y MES como soluciones de limpieza obtenidas después de la EFS; se muestra a continuación (Fig. 35)

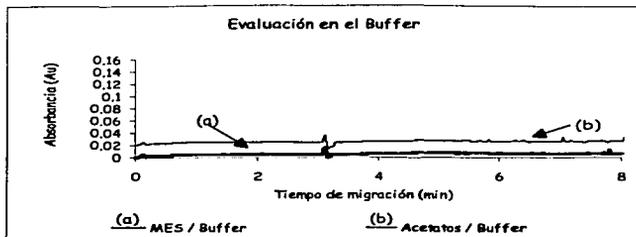


Fig.35 Electroferogramas de la evaluación de la presencia o no de SMZ en el Buffer de Acetatos 50 mM, pH 5.0 y MES pH 8.0, 50 mM en el medio de limpieza (buffer). Condiciones: iguales que la Fig. 34 excepto tipo de buffer.

La Fig. 35 muestra que las soluciones de lavado no arrastran consigo al analito que queda retenido en la fase estacionaria, por lo que independientemente de la naturaleza del buffer, ambas son soluciones eficaces para este paso de limpieza.

Así mismo se evaluó en el solvente para la elusión (metanol). El comportamiento se muestra en la Fig. 36

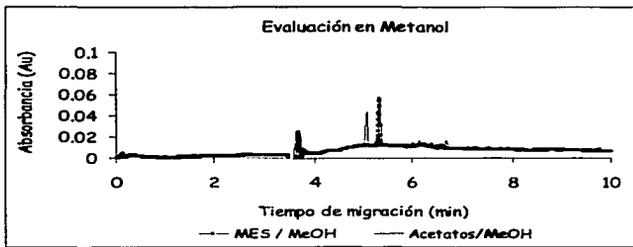


Fig. 36 Evaluación en el medio de elusión (metanol) para la limpieza a través del sep-pak utilizando el buffer de acetatos y MES respectivamente. Mismas Fig. 35

Una vez evaluadas ambas fases, y observándose el efecto de cada electrolito soporte se pudo determinar que efectivamente en la fase de limpieza (buffer) no existe pérdida

del analito (SMZ), a pesar de que en cada uno de los buffer la SMZ se encuentra en diferente forma, es decir, como una especie neutra (en acetatos) y como una especie aniónica (en MES), lo que representa que se obtiene esta en su totalidad en la fase de elusión (metanol), no importando la forma en que la especie se encuentre.

El hecho de que al utilizar buffer de acetatos pH 5 ó MES pH 8 para el lavado influya en el tamaño del pico que se obtiene de la SMZ ya que al parecer influye en la cantidad de SMZ que es eluida por el MeOH. Por lo que a pH 8 se eluye mas SMZ que a pH 5.

### 6.1 PRECONCENTRACION DE LA MUESTRA EN LINEA.

La preconcentración de la muestra en línea, es decir dentro del capilar, se logra mediante la aplicación de la isotacoforesis capilar, la cual es una técnica de separación por desplazamiento. Es importante que antes de iniciar la corrida, el capilar se llene con el electrolito líder o guía en un extremo, este debe tener una gran movilidad, mayor que la de todos los componentes a separar. Luego se introduce la muestra, seguida del electrolito terminal, cuya movilidad debe ser menor que cualquiera de los componentes de la muestra (SMZ).

La selección del electrolito soporte y terminal dependen de los valores de pKa y la movilidad de los analitos de interés. Es por lo anterior que la selección se hizo en base a dicho parámetro.

En la cual se selecciono como electrolito líder a boratos y terminal a MES. Para evaluar la preconcentración de la muestra, se procedió a realizar la isotacoforesis bajo cuatro diferentes condiciones, las cuales se muestran en la tabla (XVI, XVII, XIII y XIX) respectivamente.

Tabla No. XVI Condiciones de preconcentración en línea I de la SMZ

Condiciones	Medio	Condiciones de tiempo y presión
Lavado	NaOH 0.1 N	3 min.
Lavado	Agua	3 min.
Lavado	Buffer de Boratos 50 mM, pH = 8	5 min.
Inyección	NaOH 0.1 N	0.3 psi, 5 seg.
Inyección	Muestra	0.5 psi, 15 seg.
Inyección	Ac. Borico 100 mM	0.3 psi, 15 seg.
Separación	Buffer de Boratos 50mM, pH = 8	15 min.

Tabla No. XVII Condiciones de preconcentración en línea II de la SMZ

Condiciones	Medio	Condiciones de tiempo y presión
Lavado	NaOH 0.1 N	3 min.
Lavado	Agua	3 min.
Lavado	Buffer de Boratos 50 mM, pH = 8	5 min.
Inyección	Ac. Acético 0.01 M	0.5 psi, 15 seg.
Inyección	Muestra	0.5 psi, 15 seg.
Separación	Buffer de Boratos 50mM, pH = 8	15 min.

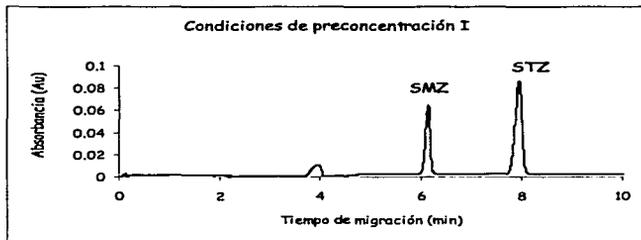
Tabla No. XVIII Condiciones de preconcentración en línea III de la SMZ.

Condiciones	Medio	Condiciones de tiempo y presión
Lavado	NaOH 0.1 N	3 min.
Lavado	Agua	3 min.
Lavado	Buffer de MES 50 mM, pH = 8	5 min.
Inyección	Muestra	0.5 psi, 15 seg.
Separación	Buffer de MES 50mM, pH = 8	15 min.

Tabla No. XIX Condiciones de preconcentración en línea IV de la SMZ.

Condiciones	Medio	Condiciones de tiempo y presión
Lavado	NaOH 0.1 N	3 min.
Lavado	Agua	3 min.
Lavado	Buffer de MES 50 mM, pH = 8	5 min.
Inyección	Buffer de Boratos 50 mM, pH = 8	0.5 psi, 15 seg.
Inyección	Muestra	0.5 psi, 15 seg.
Separación	Buffer de MES 50mM, pH = 8	15 min.

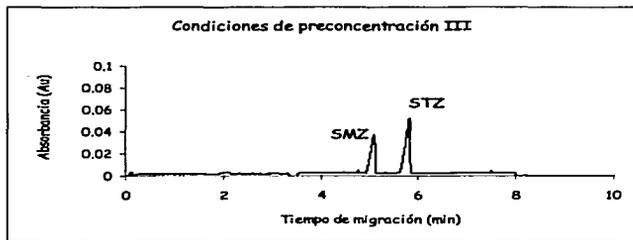
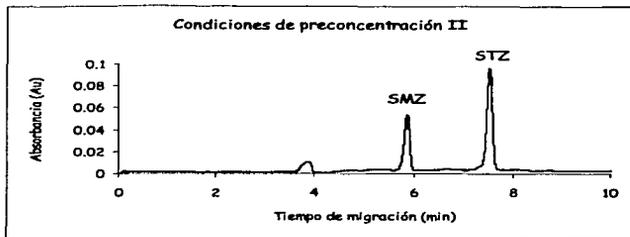
Para evaluar las condiciones de preconcentración (III y IV) se utilizó un buffer orgánico (MES), el cual es una molécula con estructura más grande y una menor carga y por lo tanto se genera una menor corriente al ser un buffer de menor fuerza iónica. Los gráficos representativos a cada una de las condiciones establecidas se muestran en la Fig. 37(A, B, C y D) respectivamente)



(A)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

( B )



( C )

( D )

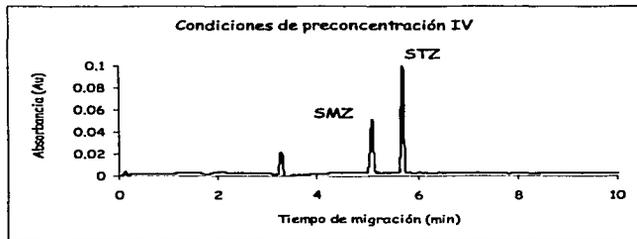


Fig. 37 Electroferogramas representativos de la SMZ y STZ utilizando formas de preconcentración en línea (A: TI, B: TII, C: TIII y TIV.) Condiciones: Buffer líder Boratos 50 mM, pH 8 y Buffer terminal 50 mM, pH 8 y demás condiciones como en la Fig. 12

Para visualizar claramente dicha diferencia se interpusieron dichos electroferogramas, notándose que el tratamiento de preconcentración más adecuado es el tratamiento N. 4, obteniéndose picos más altos, eficientes y gaussianos que es lo que se buscaba finalmente. Dicho comportamiento se muestra a continuación en la Fig. 38

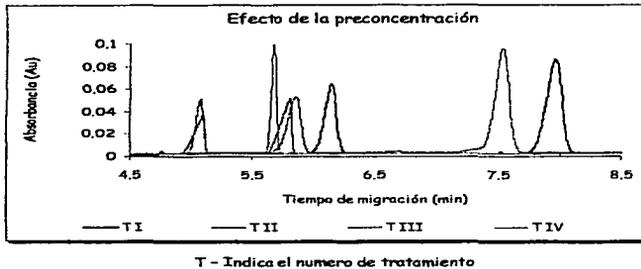


Fig. 38 Comparación entre los 4 tratamientos, para lograr la preconcentración de la muestra dentro del sistema de EC. Mismas condiciones de la Fig. 37

Dentro de la evaluación de la preconcentración de la SMZ, después de haber realizado la evaluación bajo las diferentes condiciones y así lograr dicha preconcentración, observando el comportamiento presentado por el analito (Fig. 34), se determino que la más adecuada es bajo las condiciones impuestas es la preconcentración IV. Debido a que en ella se obtienen picos más altos, simétricos y con un menor tiempo de migración.

## 6.2 APLICACIÓN DEL METODO DESARROLLADO.

En los apartados anteriores se explica cada uno de los parámetros optimizados para el desarrollo del método para determinar SMZ en heces de cabra, encontrándose finalmente que las condiciones óptimas para el estudio son las mostradas en la tabla XX.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla XX Condiciones óptimas para la determinación de SMZ en heces de cabra por E.C.

Factor de Estudio	Condición Óptima
Solvente para disolución de las heces	NaOH 0.1 N
Longitud de onda	214 nm.
Preparación de la muestra	Filtración y aplicación de EFS
Tiempo de lavado	NaOH 2 min., Agua Desionizada 2 min., Buffer de corrida 5 min.
Límite de detección	2 µg/mL
Tipo de Inyección	Hidrodinámica, 0.5 psi, 15 s.
Tipo, concentración y pH del Buffer	Buffer de Boratos, 50 mM a pH 8
Preconcentración de la muestra	Por Isotacoforesis Capilar
Estándar Interno	Sulfatiazol

Finalmente se aplicó el método desarrollado bajo las condiciones establecidas en la tabla No. XX para obtener cualitativamente a la SMZ en muestras reales de heces de cabra, obtenidas estas de animales tratados con una dosis única del bolo de SMZ.

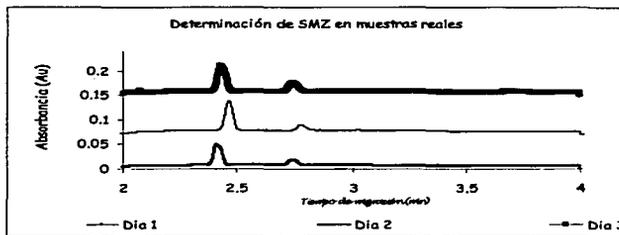


Fig. 39 Electroferogramas obtenidos a partir del análisis de SMZ en muestras reales de heces, con dosis única. Condiciones: Iguales que la Fig. 37

En la Fig. 39, se observa los EFG's, obtenidos de las muestras reales tomadas de 3 días en los que se aprecia tanto a la SMZ como al STZ, con tiempos de migración semejantes y picos simétricos.

Con lo anterior se concluye que el método desarrollado para la determinación de SMZ en heces de cabra es selectivo.

## CONCLUSIONES

- Se desarrolló un método analítico para determinar sulfametazina en heces de cabra por electroforesis capilar.
- Las condiciones óptimas para la determinación fueron evaluadas a través del tipo de buffer, concentración, pH, tipo de inyección, tiempo de lavado, encontrándose que utilizando un buffer de naturaleza biológica (MES, pH 8.0, 50 mM) con una inyección hidrodinámica 0.5 psi, 5s. y 20 kV, se obtuvieron los mejores electroferogramas.
- Se lograron buenos límites de detección ( $2 \mu\text{g/mL}$ , con una  $S/N= 2$ ) usando preconcentración por isotacoforesis en línea.
- El método desarrollado será usado en un estudio futuro, de la biodisponibilidad de SMZ en heces después de la administración de bolos de liberación prolongada en cabras.

## LISTA DE FIGURAS

Pagina

Figura 1	Espectro UV de la Sulfametazina en diferentes soluciones acuosas	6
Figura 2	Experimento de Reuss	8
Figura 3	Sistema de Electroforesis Capilar Beckman P/ACE MDQ	10
Figura 4	Componentes básicos de un sistema de Electroforesis Capilar	11
Figura 5	Ilustración de una separación zonal	18
Figura 6	Representación del flujo electroósmotico en un capilar	22
Figura 7	Tipos de Inyección hidrodinamica	26
Figura 8	Inyección electrocinetica	27
Figura 9	Representación grafica de un electroferograma (EFG)	27
Figura 10	Proceso para la extracción en Fase sólida	31
Figura 11	Estrategia utilizada para el desarrollo del método analítico para la determinación de Sulfametazina por Electroforesis Capilar.	38
Figura 12	(A) Electroferograma de entre las heces cargadas con SMZ (160 $\mu\text{g/ml}$ ) y (B) el placebo de heces. Condiciones: Capilar de sílice fundida de 50.2 cm de long. Total (40 cm de long. al detector), 50 $\mu\text{m}$ de diámetro interno, buffer de fosfatos 50 mM, pH 6.85, 20 KV de voltaje aplicado, inyección hidrodinámica 0.5 psi por 5 s, 25 °C. detección a 214 nm.	39
Figura 13	Electroferograma de la SMZ en NaOH 0.1 N Condiciones: mismas que la Fig. 12	40
Figura 14	Electroferograma del estándar de SMZ, disuelta en MeOH. Condiciones: mismas que la Fig. 12.	41
Figura 15	Electroferograma del efecto del medio de disolución de la SMZ., Medio MeOH. Mismas condiciones que Fig. 12	41
Figura 16	Comportamiento espectral del estándar de SMZ.	43
Figura 17	Electroferogramas de la influencia del tiempo de inyección en el pico de la SMZ. Condiciones: Inyección hidrodinámica 0.5 psi a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 s). Demás condiciones como en la Fig. 12	44
Figura 18	Electroferograma de la Inyección Hidrodinámica de SMZ manteniendo el Tiempo constante y la presión variable. Condiciones: como en la Fig. 17 excepto la forma de inyección, como se especifica en el EFG anterior.	45

Figura 19	Electroferograma de la Inyección Electrocinética manteniendo el voltaje constante. Condiciones: Inyección Electrocinética (5 kV) a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 s) demás condiciones como en la Fig. 12	45
Figura 20	Electroferograma de la Inyección Electrocinética de SMZ manteniendo el tiempo constante. Condiciones: Inyección Electrocinética a 5 s a diferentes voltajes (5 y 10 KV), demás condiciones como en la Fig. 12	46
Figura 21	Electroferogramas correspondientes a las primeras 5 inyecciones de SMZ al lavado entre corridas propuesto en la tabla IX. Condiciones: No hubo reemplazo en el buffer, mismas condiciones que la Fig. 12	48
Figura 22	Electroferograma correspondiente a los segundos 5 corrimientos de la SMZ a las condiciones propuestas de la tabla IX. Condiciones: Reemplazo de buffer fresco entre cada corrida, demás condiciones que la Fig. 12	49
Figura 23	Electroferograma de la SMZ, STZ y el marcador neutro en buffer de Fosfatos (A = pH 2, B = pH 4, C = pH 6, D = pH 6.85 y E = pH 8). Condiciones: mismas que la Fig. 12 excepto pH.	52
Figura 24	Comportamiento presentado por parte de la SMZ y SFZ en el Buffer de Fosfatos. Condiciones: mismas que Fig. 12, excepto que el pH del buffer es 8.	54
Figura 25	Electroferograma correspondiente al comportamiento presentado por la SMZ y SFZ en buffer de Boratos. Condiciones: mismas que Fig. 8, excepto el tipo de electrolito soporte es pH 8.	54
Figura 26	Electroferograma correspondiente al comportamiento presentado por la SMZ en Trizma. Condiciones: mismas que Fig. 25	55
Figura 27	Electroferograma correspondiente al comportamiento de la SMZ con Bis - Tris - propano como electrolito soporte. Condiciones: mismas que Fig. 21	55
Figura 28	Comparación entre los diferentes tipos de electrolitos utilizados. Condiciones: mismas Fig. 25	56
Figura 29	Electroferogramas de cada uno de los corrimientos del electrolito soporte (Boratos) para determinar la concentración más adecuada. (A = 25 mM, B = 50 mM, C = 75 mM y D = 100 mM). Condiciones:	58

	Buffer de boratos, pH 8, como electrolito soporte a diferentes concentraciones, demás condiciones como en la Fig. 12	
Figura 30	Efecto de la concentración del electrolito soporte (Boratos) en la eficiencia de los picos de la SMZ y el STZ. Condiciones: mismas que la Fig. 29	60
Figura 31	Efecto de la concentración del buffer en la resolución de SMZ y STZ. Condiciones: mismas que la Fig. 29	60
Figura 32	Electroferograma correspondiente a la SMZ en heces de cabra utilizando el tratamiento I para la limpieza de la muestra. Condiciones: Buffer Boratos 50 mM, pH 8, Iny. Hidrodinámica 0.5 psi, 15 s, demás condiciones como en la Fig. 12.	64
Figura 33	Electroferograma de la SMZ en heces de cabra correspondiente al tratamiento II para la limpieza de la muestra. Mismas condiciones de Fig. 32	64
Figura 34	Electroferograma de la SMZ en heces de cabra correspondiente al tratamiento III para la limpieza de la muestra. Mismas condiciones de Fig. 32	64
Figura 35	Electroferogramas de la evaluación de la presencia o no de SMZ en el Buffer de Acetatos 50 mM, pH 5.0 y MES pH 8.0, 50 mM en el medio de limpieza (buffer). Condiciones: mismas que la Fig. 34 excepto tipo de buffer.	66
Figura 36	Evaluación en el medio de elusión (metanol), para la limpieza a través del sep-pak utilizando el buffer de acetatos y MES respectivamente. Mismas Fig. 35	66
Figura 37	Electroferogramas representativos de la SMZ y STZ utilizando formas de preconcentración en línea (A: TI, B: TII, C: TIII y TIV.) Condiciones: Buffer líder Boratos 50 mM, pH 8 y Buffer terminal 50 mM, pH 8 demás condiciones como en la Fig. 12	69
Figura 38	Comparación entre los 4 tratamientos, para lograr la preconcentración de la muestra dentro del sistema de EC. Mismas condiciones de la Fig. 34	70
Figura 39	Electroferogramas obtenidos a partir del análisis de SMZ en muestras reales de heces, con dosis única. Condiciones: Mismas que la Fig. 37	71

## LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I	Características generales de la SMZ	5
Tabla II	Sistemas Buffer más utilizados en Electroforesis Capilar	15
Tabla III	Velocidades relativas de migración de acuerdo al tipo de analito.	24
Tabla IV	Factores y criterios considerados para la selección de la mejor respuesta por parte del analito de interés	37
Tabla V	Diferentes solventes probados para la disolución de SMZ estándar y heces de cabra.	40
Tabla VI	Condiciones a evaluar en los 2 tipos de Inyección	43
Tabla VII	Condiciones impuestas para la optimización de la Inyección Hidrodinámica en la medición de SMZ	44
Tabla VIII	Condiciones impuestas para la optimización de la Inyección Electrocínética en la medición de la SMZ.	45
Tabla IX	Condiciones impuestas para el acondicionamiento del capilar de sílice fundida al inicio de cada día.	47
Tabla X	Condiciones aplicadas para el tiempo de lavado entre corridas.	48
Tabla XI	%RSD para el tiempo de migración de las mediciones hechas para la optimización del tiempo de lavado entre corridas	49
Tabla XII	Rango de pH's estudiados	50
Tabla XIII	Características de los buffer a utilizar	53
Tabla XIV	Condiciones para cada una de las concentraciones a evaluar	57
Tabla XV	Pretratamiento seguido para la evaluación de las condiciones de limpieza de las muestras de heces cargadas con SMZ estándar.	63
Tabla XVI	Condiciones de preconcentración en línea I de la SMZ	67
Tabla XVII	Condiciones de preconcentración en línea II de la SMZ.	68
Tabla XVIII	Condiciones de preconcentración en línea III de la SMZ.	68
Tabla XIX	Condiciones de preconcentración en línea IV de la SMZ.	68
Tabla XX	Condiciones óptimas para la determinación de SMZ en heces de cabra por E.C.	71

PREPARACION DE SOLUCIONES UTILIZADAS EN EL ENSAYO PARA EL DESARROLLO DE SULFAMETAZINA EN HECEZ DE CABRA.

- Preparación de la solución stock de Sulfametazina (160  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ):

Pesar exactamente 0.1 g de SMZ disolverlos con 10 mL de Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N, transferir la solución a un matraz volumétrico de 25 mL, lavar el contenedor donde se peso con suficiente NaOH 0.1 N. Llevar al volumen de aforo con NaOH.

Tomar 1 mL de la solución anterior y transferirlos a un matraz volumétrico de 25 mL. Llevar al volumen de aforo con NaOH 0.1 N.

- Hidróxido de sodio 0.1 N

Pesar 4.040g de NaOH G.R. Disolver con 20 mL de Agua hervida fría y transferirlos a un matraz volumétrico de 1000 mL lavar el contenedor donde se peso con suficiente agua. Llevar al volumen de aforo con agua.

- Preparación del buffer de fosfatos, 50 mM a pH = 6.85

Pesar exactamente 0.1749g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  Disolver la cantidad pesada con 20 mL de Agua desionizada. Ajustar con NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N hasta el pH deseado. Colocar la solución en un matraz volumétrico de 25 mL lavar el contenedor donde se peso con suficiente agua desionizada. Llevar al volumen de aforo con agua.

- Preparación de los electrolitos soporte (Boratos, Trizma y Bis - Tris propano), pH 8.0, 50 mM.

Pesar la cantidad indicada en la siguiente tabla:

Tipo de Buffer	Cantidad pesada (g)
Boratos	0.4767
Trizma	0.1970
Bis - Tris - Propano	0.3564

Pesar por separado la cantidad indicada para cada Buffer, disolverlos con 15 mL de agua desionizada y medir el pH. Ajustar con NaOH 0.1 N o HCl 0.1 N hasta el pH deseado. Colocar la solución en un matraz volumétrico de 25 mL lavar el contenedor donde se peso con suficiente agua desionizada. Llevar al volumen de aforo con agua.

- Preparación del buffer de Fosfatos en un intervalo de pH 2 - 8, 50 mM:

Pesar exactamente 0.1749g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ . Disolver la cantidad pesada con 20 mL de Agua desionizada. Ajustar con  $\text{NaOH}$  0.1 N o  $\text{HCl}$  0.1 N hasta el pH deseado (2, 4, 6, 6.85, 8). Colocar la solución en un matraz volumétrico de 25 mL lavar el contenedor donde se peso con suficiente agua desionizada. Llevar al volumen de aforo con agua.

- Preparación del Buffer MES pH 8, 50 mM:

Pesar exactamente 2.678 g de MES. Disolver la cantidad pesada con 200 mL de Agua desionizada. Ajustar con  $\text{NaOH}$  0.1 N o  $\text{HCl}$  0.1 N hasta el pH deseado (8). Colocar la solución en un matraz volumétrico de 250 mL lavar el contenedor donde se peso con suficiente agua desionizada. Llevar al volumen de aforo con agua.

- Preparación del Buffer de Boratos a las diferentes concentraciones (25, 50, 75 y 100 mM) pH 8.

Pesar la cantidad indicada en la siguiente tabla:

Concentración	Cantidad pesada (g)
25	0.2583
50	0.4767
75	0.7150
100	0.9534

Pesar por separado la cantidad indicada para cada concentración del Buffer, disolverlos con 15 mL de agua desionizada y medir el pH. Ajustar con  $\text{NaOH}$  0.1 N o  $\text{HCl}$  0.1 N hasta el pH deseado (8). Colocar la solución en un matraz volumétrico de 25 mL lavar el contenedor donde se peso con suficiente agua desionizada. Llevar al volumen de aforo con agua.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**PROCESO SEGUIDO A CADA UNO DE LOS PRETRATAMIENTOS, PARA LA EVALUACIÓN DE LAS CONDICIONES DE LIMPIEZA POR LA EFS.**

I) Procedimiento seguido para la evaluación de la muestra, bajo las condiciones del primer tratamiento ( con la adición de carbón activado).

1. Pesar 1 g de heces de cabra.
2. Adicionar 10 mL de NaOH 0.1 N
3. Agitar con el vortex durante 5 min.
4. Centrifugar a 3000 rpm, por 8 min.
5. Filtrar a vacío con papel Whatman 90 mm.
6. Adicionar carbón activado.
7. Refiltrar la solución anterior a vacío con papel Whatman
8. La solución obtenida, filtrar con un acrodisco 0.45 µm.
9. Inyectar la solución al sistema de E.C.

II) Procedimiento seguido para la evaluación de la muestra, bajo las condiciones impuestas al segundo tratamiento ( adición de carbón activado y con la utilización del Sep-pak).

1. Pesar 1 g de heces de cabra.
2. Adicionar 10 mL de NaOH 0.1 N
3. Agitar con vortex durante 5 min.
4. Centrifugar a 3000 rpm, por 8 min.
5. Filtrar a vacío con papel Whatman 90 mm.
6. Adicionar carbón activado.
7. Refiltrar la solución anterior a vacío con papel Whatman
8. La solución obtenida, pasarla a través del cartucho sep - pak bajo las condiciones del mismo ( ver anexo 2).
9. La solución obtenida pasarla por el acrodisco 0.45 µm.
10. Inyectar en el sistema de E.C.

III) Procedimiento seguido para la evaluación de la muestra, bajo las condiciones impuestas al tercer tratamiento ( utilización de Sep-pak y filtración por acrodisco).

1. Pesar 1 g de heces de cabra.
2. Adicionar 10 mL de NaOH 0.1 N
3. Agitar con vortex durante 5 min.
4. Centrifugar a 3000 rpm, por 8 min.
5. Filtrar a vacío con papel Whatman 90 mm.
6. Refiltrar la solución anterior a vacío con papel Whatman
7. La solución obtenida, pasarla a través del cartucho sep - pak bajo las condiciones del mismo ( ver anexo 2).
8. La solución obtenida pasarla por el acrodisco 0.45 µm.
9. Inyectar en el sistema de E.C.

REFERENCIAS:

- [ 1 ] Meiger N. David, (1997)\* High performance Capillary Electrophoresis \*. Hewlett Packard Company. 3a ed. Francia. Pp 13-29, 36-39, 42-75, 78-93
- [ 2 ] Internet: <http://www.cfnavarra.es/salud/anales/textos/suple2/suple26.html#top>
- [ 3 ] Clarke's 1986, "isolation and identification of drugs". 2da. Ed. The Pharmaceutical press. Great Britain, pág. 981-985
- [ 4 ] Ching-Erh Lin, Chia-Chieh Chang, 1996 "Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis" II. Positively charged species at low pH. Journal of Chromatography A 739 pág. 203-209.
- [ 5 ] Florey Klaus (1978). "Analytical Profiles of drugs substance". Vol. 7., Academia press Inc. U.S.A.
- [ 6 ] Internet: <http://chemfinder.cambridgesoft.com>
- [ 7 ] Meyer L. 1982 "Farmacología terapéutica veterinaria". 2da. Ed. Hispanoamericana. México. Pág. 378
- [ 8 ] Bezhn Chankvetadze., "Capillary Electrophoresis in Chiral Analysis", John Wiley & Sons, 1997 pág. 6-72
- [ 9 ] Foret Frantisek, Bocek T., Krivanková L., 1995 "Capillary Zone Electrophoresis" Ed. VCH, Alemania, Pp. 7-35, 133-186
- [ 10 ] Internet: <http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/electrophoresis/>
- [ 11 ] Levêque D. Gallion, Montiel, F Jehl, 1997 "Capillary electrophoresis for pharmacokinetic studies" Journal of Chromatography B, 697 pág. 67-75.
- [ 12 ] Fanali Salvatore, Cristalli Michelle, Nardi Annalisa, 1990 "Capillary zone electrophoresis in pharmaceutical analysis" Società chimica italiana, 45, No. 6, Pp. 693-702
- [ 13 ] Smith Norman. 1999 "Capillary ElectroChromatography" Beckman Coulter. Inc., Fullerton California, U.S.A., Pp. 3-13.
- [ 14 ] Valerie B. Reeves., "Confirmation of multiple sulfonamide residues in bovine milk by gas Chromatography - positive chemical ionization mass spectrometry". Journal of Chromatography B, 723 pág. 127-137.
- [ 15 ] Internet: [http://www.nuestromar.com/Acuicultura/aspectos\\_manejo\\_acuicola.htm](http://www.nuestromar.com/Acuicultura/aspectos_manejo_acuicola.htm)

- [ 16 ] Ching-Erh Lin, Chia-Chiech Chang, 1997 "Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis" III. Citrate buffer as a background electrolyte. *Journal of Chromatography A*, 768 pág. 105-112
- [ 17 ] Marina M. L. Torre M. 1994 "Capillary Electrophoresis" *Talanta*, 41, Pp. 1+11-1+33.
- [ 18 ] Internet: [www.ceandccc.com/cetheory.htm](http://www.ceandccc.com/cetheory.htm)
- [ 19 ] Internet: <http://www.idrc.ca/lacro/bioensayos/solida.html>
- [ 20 ] Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A., 2001 "Principios de Análisis Instrumental" Capítulo 30: Electroforesis Capilar y Electro cromatografía, Mc Graw Hill. 5 a ed., Madrid, España.
- [ 21 ] Internet: <http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/electrophoresis/>
- [ 22 ] Timothy Blanc, Schaufelberger D., 1997. "Capillary Electrophoresis" Ortho Biotech Inc., A Johnson & Johnson Company, Raritan, New Jersey.
- [ 23 ] Internet: [http://www.aqfu.org.uy/nueva/revista/28/revista\\_N28\\_julio\\_2000\\_electroforesis\\_capilar.htm](http://www.aqfu.org.uy/nueva/revista/28/revista_N28_julio_2000_electroforesis_capilar.htm)
- [ 24 ] Internet: <http://www.relaq.mx>
- [ 25 ] Rivera Vega, María F. 1996 "Electroforesis Capilar, una nueva herramienta para la química analítica" Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. México. Pp. 1-15.
- [ 26 ] <http://www.ntri.tamuk.edu/ce/laser-induced.html>
- [ 27 ] Schmutz André, Thormann Wolfagns, 1994 "Assessment of impact of physico-chemical properties on monitoring drug levels by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct serum injection" *Electrophoresis*, 15, Pp. 1295-1303.
- [ 28 ] Skoog Douglas, James J. L., 1994 "Análisis Instrumental" 4a ed. Mc Graw Hill. España Pp. 785-787.
- [ 29 ] Quattrocchi, O. A., Abclaira S. Laba R. F. (1992). "Introducción a la HPLC". La Argentina. Argentina pp 6, 40, 56-110, 301-324