



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS EN AGUA Y FLUIDOS BIOLÓGICOS POR
MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSO CON SOLIDIFICACIÓN DE
GOTA ORGÁNICA FLOTANTE Y CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO

PRESENTA

MARIO ERNESTO RODRÍGUEZ MELÉNDEZ



MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: LUZ ELENA VERA ÁVILA
VOCAL: JOSÉ DE JESÚS GARCÍA VALDES
SECRETARIO: NURIA ESTURAU ESCOFET
1er. SUPLENTE: GLORIA GARCÍA RAMIREZ
2° SUPLENTE: SILVIA CITLALLI GAMA GONZÁLEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 115 DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO, EDIFICIO "B". FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Luz Elena Vera Ávila

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera

SUSTENTANTE:

Mario Ernesto Rodríguez Meléndez

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

RESUMEN

1

I. INTRODUCCIÓN

3

II. ANTECEDENTES

6

II.1. Contaminación Ambiental

6

II.1.1. El agua y su contaminación

7

II.2. Contaminantes emergentes

9

II.3. Fármacos

13

II.3.1. Fármacos, su consumo y contaminación en el país.

20

II.3.2. Muestras biológicas

22

II.3.3. Fármacos de interés

23

II.4. Métodos de análisis

27

II.4.1. Preparación de muestra

27

II.4.1.1. Extracción en fase sólida (EFS)

29

II.4.1.2. Microextracción en fase sólida (MEFS)

32

II.4.1.3. Extracción líquido-líquido (ELL)

33

II.4.1.4. Microextracción en gota suspendida (SDME)

34

II.4.1.5. Microextracción líquido-líquido disperso (DLLME)

35

II.4.1.6. Microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante (DLLME-SFO)

36

II.4.2. Análisis cromatográfico: CLAR/UV

37

III. OBJETIVOS

42

III.1. Objetivo General

42

III.2. Objetivos particulares

42

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

43

IV.1. Equipo y Materiales

43

IV.2. Reactivos y Disoluciones

44

IV.3. Procedimiento y metodología analítica

46

IV.3.1. Condiciones cromatográficas

46

IV.3.2. Condiciones de detección

47

IV.3.3. Metodología de la microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante (DLLME-SFO).

48

IV.3.3.1. Protocolo de la técnica optimizada para la extracción de fármacos a partir de muestras acuosas.

48

IV.3.3.2. Aplicación de la DLLME-SFO para la extracción de fármacos a partir de muestras de orina.

48

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

50

V.1. Separación y detección de los fármacos

50

V.2. Optimización de la técnica de microextracción

55

V.2.1. Condiciones iniciales y ensayos preliminares

55

V.2.2. Volumen de mezcla de extracción

59

V.2.3. Condiciones durante el tiempo de extracción	61
V.2.4. Variación del agente dispersante manteniendo constante al extractante	62
V.2.5. Cantidad de NaCl agregado a la fase acuosa	64
V.2.6. Condiciones finales para la extracción de fármacos por DLLME-SFO	65
V.3. Validación del método para la extracción y determinación de 8 fármacos en muestra acuosa	67
V.3.1. Precisión del método (repetibilidad)	67
V.3.2. Linealidad del método	68
V.3.3. Límites de detección y cuantificación	73
V.3.4. Factor de preconcentración	75
V.4. Aplicación del método analítico en muestras biológicas	77
V.4.1. Precisión del método en muestras de orina	80
V.4.2. Linealidad del método en muestras de orina	82
V.4.3. Límites de detección y cuantificación en muestras de orina	84
VI. CONCLUSIONES	86
VII. BIBLIOGRAFÍA	88
VIII. ANEXOS	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla II.1. Principales clases de contaminantes emergentes.	12
Tabla II.2. Tasas de excreción de fármacos y sus principales metabolitos.	18
Tabla II.3. Concentración de algunos fármacos en aguas residuales, aguas superficiales y subterráneas y en agua para consumo humano.	20
Tabla IV.1. Concentración de los fármacos en las disoluciones preparadas.	46
Tabla V.1. Longitudes de onda de los máximos y mínimos de absorbancia a los tiempos de elución de los fármacos.	54
Tabla V.2. Ensayos preliminares de microextracción. Recuperación promedio con las condiciones iniciales de la DLLME-SFO.	57
Tabla V.3. Estudio de precisión del método en muestras de agua grado reactivo fortificadas con 8 fármacos.	68
Tabla V.4. Linealidad del sistema: Parámetros estadísticos de la regresión lineal para las gráficas Área vs Concentración de los estándares.	69
Tabla V.5. Concentraciones de los fármacos en las muestras para el estudio de linealidad.	70
Tabla V.6. Linealidad del método: Parámetros estadísticos de la regresión lineal para las gráficas de Cantidad Recuperada vs Cantidad Adicionada.	71
Tabla V.7. Ecuaciones de calibración para calcular la concentración de los fármacos en la muestra acuosa a partir de la concentración medida en el extracto y el volumen de extracto.	73
Tabla V.8. Límites de detección (LDM) y de cuantificación (LCM) del método DLLME-SFO/CLAR/UV para la determinación de fármacos en muestras acuosas.	75
Tabla V.9. Factores de preconcentración de los fármacos a partir de muestras acuosas tratadas por la técnica DLLME-SFO.	76
Tabla V.10. Determinación de los fármacos en muestras de orina fortificada: Precisión (%CV) y recuperación relativa (%RR) (n=12).	81
Tabla V.11. Linealidad del método en muestras de orina: Parámetros estadísticos de la regresión lineal para las gráficas de Concentración Determinada vs Concentración Adicionada.	83
Tabla V.12. Límites de detección (LDM) y de cuantificación (LCM) del método DLLME-SFO/CLAR/UV para la determinación de fármacos en muestras de orina.	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura IV.1. Diagrama del proceso DLLME-SFO.	49
Fig. V.1. Separación de 10 fármacos por cromatografía en fase reversa en modo isocrático. Columna Gemini C-18	51
Fig. V.2. Separación de 10 fármacos por cromatografía en fase reversa con gradiente de elución. Columna Eurospher II.	52
Fig. V.3. Separación de los 8 fármacos seleccionados por cromatografía en fase reversa con gradiente de elución. Columna Eurospher II.	53
Fig. V.4. Efecto del volumen de mezcla extractante sobre la recuperación de los fármacos.	60
Fig. V.5. Efecto de las condiciones de extracción sobre la recuperación de los fármacos.	61
Fig. V.6. Efecto del volumen de dispersante sobre la recuperación de los fármacos.	63
Fig. V.7. Efecto de la cantidad de NaCl en la muestra acuosa sobre la recuperación de los fármacos.	65
Fig. V.8. Cromatogramas típicos obtenidos del análisis de muestras de orina, aplicando el método DLLME-SFO/CLAR/UV desarrollado.	78

RESUMEN

Los productos farmacéuticos forman parte de los denominados contaminantes emergentes cuya principal vía de introducción en el medio ambiente son las aguas de desecho urbanas y municipales, debido a que los tratamientos en las plantas depuradoras no son suficientes para eliminar totalmente este tipo de compuestos o sus metabolitos. Los contaminantes emergentes constituyen un peligro potencial para la salud humana, ya que pueden llegar a los cuerpos de agua que abastecen a las poblaciones e incluso ingresar a las redes de distribución de agua potable.

En el presente trabajo se estudió la capacidad de una técnica innovadora de preparación de muestra para extraer, concentrar y purificar fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos no esteroides (AINE's) a partir de matrices acuosas y fluidos biológicos. La técnica deriva de la miniaturización de la extracción líquido-líquido y es conocida como microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante.

En una primera etapa se establecieron las condiciones óptimas para la separación y cuantificación de los fármacos por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV. A partir de los ensayos realizados se seleccionaron 8 fármacos (acemetacina, diclofenaco, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, naproxeno y nimesulida) y se desarrolló un programa de gradiente de elución con detección UV a 215 nm para su determinación. Posteriormente, se optimizaron las condiciones de trabajo en la técnica de microextracción mediante el seguimiento de la tasa de recobro de los compuestos de interés al variar diferentes parámetros. Las condiciones finalmente establecidas fueron: volumen de muestra 10 mL; mezcla de extracción dodecanol-metanol (1:2, v/v) 300 μ L; condiciones y tiempo de extracción, 3 min en reposo a temperatura ambiente; cantidad de sal agregada a la fase acuosa, 300 mg de NaCl; separación de fases por centrifugación a 4500 rpm durante 10 min, seguida de enfriamiento en baño de hielo por 2 min. La gota

de extracto sólido obtenida se recupera con una espátula, se deja fundir y se inyecta en el cromatógrafo para su análisis.

El método analítico desarrollado se validó con muestras de agua grado reactivo fortificadas con los 8 fármacos. Los resultados obtenidos mostraron buena linealidad y precisión (%CV<6%), con recobros promedio superiores a 79% para todos los fármacos, excepto nimesulida (63%), y límites de detección entre 0.5 y 3 ppb. Los ensayos realizados con muestras de orina fortificada a concentraciones variables (entre las decenas de ppb y ~1.5 ppm), demostraron la aplicabilidad del método para la determinación de los fármacos en fluidos biológicos, con precisión y exactitud muy aceptables para esta compleja matriz (%CV<9.5%, recuperación relativa promedio de 85-96%).

I. INTRODUCCIÓN

Durante el último siglo, la ciencia y tecnología avanzaron a pasos agigantados pero, lamentablemente, este avance vino acompañado de la contaminación y destrucción de los recursos naturales que nos ofrece el planeta, debido fundamentalmente al uso masivo de sustancias químicas y su desecho no controlado al medio ambiente. La principal fuente de entrada de los contaminantes al ambiente son las aguas residuales, ya sean urbanas, industriales o de origen agrícola y ganadero.

La investigación científica a través de los años ha ido estudiando las diferentes sustancias químicas que entran al ambiente y ha dado voces de alerta sobre sus posibles efectos adversos. En respuesta a la preocupación generada en la sociedad por estas advertencias, los organismos responsables del cuidado del medio ambiente establecieron regulaciones muy severas para los principales contaminantes, conocidos como prioritarios. Los contaminantes prioritarios son compuestos cuyos efectos nocivos para los organismos vivos y el ser humano están ampliamente documentados.

En años recientes, el desarrollo de nuevas metodologías analíticas más eficaces, sensibles y selectivas, ha permitido identificar y estudiar otro tipo de sustancias potencialmente peligrosas, que han sido denominadas “contaminantes emergentes”. Dentro de este grupo están incluidos productos de uso común, como los agentes activos de los medicamentos y productos de cuidado personal (PPCP's, por las siglas del nombre en inglés: *Pharmaceuticals and Personal Care Products*), aditivos para gasolina, retardadores de llama, ciertos tensoactivos, entre muchos otros cuyos residuos son generalmente desechados y arrastrados por las aguas de drenaje. En el mejor de los casos, estas aguas pasan por plantas de tratamiento antes de ser vertidas a los cuerpos de agua; sin embargo, una fracción importante de los contaminantes emergentes no alcanza a ser eliminada y puede incluso terminar en reservas de agua utilizadas para el consumo doméstico.

Hasta ahora, la mayoría de estos productos no están regulados por las legislaciones ambientales, ya que aún se sabe poco sobre sus efectos a mediano y largo plazo y el impacto que pueden tener en el medio ambiente.

El estudio de los residuos de fármacos en el medio acuático ha atraído un interés particular, debido a que estos productos se diseñaron con la intención de provocar algún efecto biológico específico en ciertos organismos y tejidos vivos, pero se desconocen los efectos que pueden generar en otros organismos inferiores. A esto se debe añadir el hecho de que los fármacos, después de ser consumidos por el ser humano o los animales domésticos, pueden ser excretados sin cambio alguno o como una mezcla de muchos metabolitos. Aunque las concentraciones encontradas en aguas ambientales son sumamente bajas, la presencia simultánea de una gran variedad de compuestos bioactivos durante largos periodos de tiempo puede ocasionar que se alcancen niveles biológicamente relevantes.

Entre los fármacos más prescritos en medicina humana destacan los antiinflamatorios no esteroideos (AINE's), que son un grupo variado y químicamente heterogéneo de productos con propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas. Por su alto consumo, la presencia de este tipo de fármacos en aguas de desecho es muy factible, como lo demostró un estudio realizado en agua residual del Valle de Tula (México). En esta agua se encontraron 11 fármacos AINE's a concentraciones cercanas a 1 µg/L, que es un valor límite para el requerimiento de una evaluación de riesgo en E.U.

La determinación de compuestos polares e hidrofílicos, como los fármacos AINE's, a tan bajos niveles de concentración en el medio acuoso es un verdadero reto analítico. La técnica más apropiada para este fin es la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (CLAR/EM); sin embargo, esta instrumentación es costosa, delicada y aún son pocos los laboratorios que cuentan con ella en nuestro país. El desarrollo de métodos de preparación de muestra altamente eficientes es la mejor alternativa para alcanzar la sensibilidad y

selectividad requeridas en este tipo de análisis, utilizando instrumentación más convencional como CLAR/UV.

Las técnicas actuales de preparación de muestra se han enfocado a generar el mínimo impacto ambiental posible, disminuyendo drásticamente el consumo de disolventes y reactivos mediante la miniaturización. Estos esfuerzos han dado origen a una amplia variedad de técnicas de microextracción, rápidas, sencillas, económicas y ecológicas.

En este trabajo nos propusimos desarrollar un método analítico para determinación de fármacos AINE's en matrices acuosas, basado en una técnica de microextracción combinada con CLAR/UV. Se eligió a la "microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante", por ser una de las técnicas más rápidas y eficientes. Por todas sus características se espera que el método desarrollado se convierta en una de las mejores opciones para el estudio de este tipo de fármacos en aguas ambientales o en fluidos biológicos.

II. ANTECEDENTES

II.1. Contaminación Ambiental

La contaminación del medio ambiente es un problema global que se ha ido arrastrando a través de los años como un efecto paralelo al desarrollo de las civilizaciones. La contaminación se define como la introducción de cualquier tipo de sustancia en un medio determinado, que termina generando un desequilibrio y dañando al medio de tal manera que lo vuelve inseguro o no apto para su uso. Desde una perspectiva más amplia, los contaminantes pueden ser tanto compuestos químicos como alguna forma de energía (sonido, calor, luz, radioactividad).

La contaminación puede clasificarse según el tipo de fuente de donde proviene, o por la forma de contaminante que emite o medio que contamina. Las principales fuentes de contaminación son la antropogénica, derivada de procesos del hombre, o por fuentes naturales, generada por la misma naturaleza.

Durante muchos años, la investigación científica se enfocó al estudio del impacto ambiental en agua, suelo y aire de un grupo de contaminantes denominados prioritarios. Los contaminantes prioritarios son una gran variedad de sustancias cuyos efectos adversos en el hombre han sido bien comprobados, como su acción generadora de cáncer, deformaciones genéticas, mutaciones o toxicidad. Ejemplos de este tipo de contaminantes son los bifenilos policlorados, las dioxinas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los fenoles y los plaguicidas [1,2].

Los avances tecnológicos han hecho posible el desarrollo de métodos de análisis extremadamente sensibles y selectivos, con los que se ha puesto en evidencia la presencia sistemática en el ambiente de otro tipo de sustancias cuyos posibles efectos se desconocen, por lo que han sido catalogadas como contaminantes emergentes.

II.1.1. El agua y su contaminación

La palabra agua proviene del latín *aqua*; es un líquido transparente, incoloro, inodoro e insípido en estado puro, desde el punto de vista químico es un compuesto que está formado por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno (H₂O). Adopta tres diferentes formas en la naturaleza, sólida, líquida y gaseosa. Es el componente más abundante de la superficie terrestre y parte constituyente de todos los organismos vivos.

El agua cubre el 75% de la superficie de la Tierra, de ésta sólo el 2.53% es agua dulce, el 97.5% es agua salada de los mares y océanos. Del 2.53% de agua dulce, el hombre tiene acceso únicamente a 1% y únicamente el 0.3% está disponible en ríos y lagos [3]. A lo largo del tiempo el agua ha sido uno de los principales factores para el asentamiento urbano, desarrollo de la sociedad y evolución de las civilizaciones [4].

La Comisión Nacional del Agua ha hecho una clasificación de los principales usos del agua en México, señalando en particular los siguientes: el agropecuario, que incluye el agrícola, el pecuario y la acuicultura; el abastecimiento público para uso urbano y doméstico, que incluye todas las industrias y servicios que toman agua de las redes municipales; y el uso industrial, para la industria, servicios y generación de energía eléctrica. Una vez ocupada el agua para cualquiera de estos destinos, su calidad se altera en diferente grado, por lo que es necesario evaluarla [5].

Actualmente existe una gran preocupación en la sociedad por la contaminación del agua. Son variados los factores causantes de esta contaminación a nivel global, entre los principales se pueden mencionar el vertido de una combinación de desechos orgánicos y bacterias a los cuerpos de agua, la contaminación cada día más habitual de empresas de hidrocarburos, los desperdicios industriales, muchos de ellos sumamente tóxicos, los pesticidas usados en la agricultura, los productos químicos domésticos y los desechos radioactivos [3].

En cuanto a las reservas de agua, México ocupa un lugar bajo en la disponibilidad del recurso. La escasez y el uso excesivo del agua dulce, así como la cantidad desmedida de contaminantes que se vierten en ésta, plantean una creciente y seria amenaza para el desarrollo sostenible y la protección del medio ambiente [6]. Esta problemática ayudó a que se desarrollaron métodos cada vez más eficientes para purificar y de esta manera reusar el agua. El tratamiento de aguas residuales ofrece una alternativa como solución a los problemas de contaminación y escasez del agua, dándole propiedades y características adecuadas para el uso y consumo humano [7-9].

Las aguas residuales son de composición variada, ya que pueden provenir de fuentes individuales o de una mezcla de éstas. Las cuatro principales fuentes son:

- Aguas domésticas y urbanas
- Aguas residuales industriales
- Escorrentías de usos agrícolas
- Pluviales

En el caso de México, entre las industrias más contaminantes se encuentran la del papel y celulosa, la química y petroquímica, la de pinturas y la refresquera [10].

En datos reportados en el Inventario Nacional de Descargas de Aguas Residuales, la acuicultura es la industria que libera más aguas residuales ($68 \text{ m}^3/\text{s}$), pero con poca materia orgánica generada al año (7000 t/año). En cuanto al volumen de contaminación, las industrias azucarera, petrolera y agropecuaria en general son las más destacadas (1750, 1186 y 1063 miles de toneladas por año, respectivamente). Si se calcula una razón entre materia orgánica y descarga producida, las industrias agropecuaria y petrolera juntas resultan las más contaminantes en todo el país [5].

El análisis pre y post tratamiento de las aguas residuales es necesario para evaluar la eficacia que tiene el proceso de purificación, cuantificar la cantidad de impurezas remanentes y estimar los efectos que podrían provocar en el ambiente

o en los seres vivos. Para ello, se han desarrollado diferentes métodos que permiten conocer las características, composición y condición de estas aguas [9].

El hecho de reconocer y valorar adecuadamente los servicios que nos ofrece el agua, puede disminuir e incluso evitar la degradación ambiental, sobre todo en momentos de alto crecimiento poblacional. Es por eso que la prosperidad de una sociedad depende en gran medida de su capacidad para utilizar, proteger y regenerar sus recursos hídricos [11].

II.2. Contaminantes Emergentes

Entre las sustancias vertidas al medio ambiente están aquellas que por su toxicidad hacia los organismos vivos, incluyendo animales y humanos, son consideradas como contaminantes prioritarios y se encuentran legisladas por normas estrictas que regulan las cantidades máximas admisibles en los diferentes compartimientos ambientales. Sin embargo, desde hace varios años los investigadores empezaron a alertar sobre la presencia sistemática de otras sustancias potencialmente peligrosas, denominadas globalmente como contaminantes emergentes que hasta el momento no han sido legislados [12,13]. Estas sustancias en realidad no son compuestos químicos nuevos, ya que una buena parte de ellas ha sido utilizada por el hombre y ha estado en el ambiente desde hace mucho tiempo [1].

Los contaminantes emergentes se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales, cuya presencia en el medio ambiente genera gran preocupación por las posibles consecuencias de la misma. Actualmente, el estudio de este tipo de contaminación se encuentra entre las líneas de investigación prioritarias de los principales organismos dedicados a la protección de la salud pública y medioambiental, tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la agencia de protección ambiental de Estados Unidos (EPA) o la Comisión Europea.

En este grupo están incluidos un gran número de compuestos químicos, que se clasifican dependiendo de la ruta de entrada al ambiente, el uso que se les da, la función química, el mecanismo de reacción en contacto con otros compuestos y el efecto que puedan provocar [2]. Una característica importante de estos contaminantes es que no es necesario que permanezcan en el ambiente para producir efectos nocivos, ya que su transformación o eliminación son compensadas por la entrada continua y excesiva [14].

Estos compuestos entran en el ambiente a través de varias fuentes y vías, tales como aguas residuales de tipo doméstico e industrial, efluentes hospitalarios, aguas provenientes de actividades agrícolas y ganaderas, escorrentías de los tanques sépticos e incluso efluentes de las plantas de tratamiento.

Las aguas residuales contienen un gran número y variedad de contaminantes emergentes; en el mejor de los casos, estas aguas son sometidas a tratamiento, sin embargo, las plantas de depuración convencionales no están diseñadas para eliminar totalmente este tipo de compuestos. De esta manera, los contaminantes remanentes llegan a los cuerpos de agua superficial que son alimentados por los efluentes de las plantas de tratamiento, donde podrían alcanzar concentraciones ambientalmente relevantes. Cabe mencionar que, hasta ahora, los criterios de calidad ambiental, en lo que concierne a los contaminantes emergentes en el medio acuático, aún no se han podido especificar. Esta situación se ha convertido en un motivo de preocupación para los científicos y para las entidades ambientales [15].

Los contaminantes emergentes comprenden una gama muy amplia de compuestos, usualmente dividida en dos grandes grupos. En el primer grupo están incluidos los fármacos y productos de cuidado personal, los cuales están clasificados de acuerdo con el uso para el que son fabricados (antibióticos, anti-inflamatorios, repelentes de insectos, antibacteriales, etc.) [16]. En el segundo

grupo están los disruptores endocrinos, que son sustancias exógenas o mezclas de éstas capaces de alterar la estructura o función del sistema endocrino al mimetizar o antagonizar las funciones hormonales en el organismo. Los disruptores endocrinos se clasifican en función del efecto biológico generado en los organismos, así como por su mecanismo de acción. Ambos grupos pueden llegar a juntarse ya que algunos fármacos y productos de cuidado personal son disruptores endocrinos [17]. En la Tabla II.1 se muestran las principales clases de contaminantes emergentes y ejemplos de éstos.

Los estudios hasta ahora realizados muestran que estos contaminantes están presentes a concentraciones sumamente bajas en las aguas naturales, del orden de los microgramos a nanogramos por litro; no obstante, como se ha mencionado, los efectos que pueden provocar en la biota son desconocidos ya que en algunos casos sus metabolitos pueden ser más dañinos que los propios precursores [18].

Los primeros en detectarse fueron los fármacos de alto consumo, como antibióticos y antiinflamatorios, seguidos por fármacos de uso psiquiátrico, antisépticos, reguladores lipídicos y medios de contraste para rayos X. Por otro lado, los productos industriales como retardantes de flama, surfactantes y aditivos se han hecho presentes en el ambiente en función del desarrollo tecnológico y el poder adquisitivo de las personas. Es así como la presencia de contaminantes emergentes muestra la conexión inmediata entre las acciones y actividades de los individuos y el medio ambiente [17].

Tabla II.1. Principales clases de contaminantes emergentes [12].

Clases de compuestos	Ejemplos
Productos farmacéuticos Antibióticos usados en veterinaria y medicina	trimetoprim, eritromicina, lincomicina, sulfametoxazol

Medicamentos analgésicos y anti-inflamatorios	codeína, ibuprofeno, acetaminofen, ácido acetilsalicílico, diclofenaco
Medicamentos psiquiátricos	diazepam
Reguladores de lípidos	bezafibrato, ácido clofíbrico, ácido fenofíbrico
β -bloqueantes	metoprolol, propranolol, timolol
Medios de contraste de Rayos X	iopromide, iopamidol, diatrizoato
Esteroides y hormonas (anticonceptivos)	estradiol, estrona, estriol, dietilisobutilestriol
Productos de cuidado personal	
Perfumes	almizcles nitro, policíclicos y macrocíclicos
Agentes de protección solar	benzofenona, alcanfor, metilbencilideno
Repelentes de insectos	N,N-dietiltoluidamida
Antisépticos	triclosán, clorofeno
Detergentes tensoactivos y sus metabolitos	alquilfenoles etoxilados, alquilfenoles (nonilfenol y octilfenol), alquilfenol carboxilados
Retardadores de llama	difenil éteres polibrominados (PBDEs), tetrabromo bisfenol A, tris(2-cloroetil)fosfato
Aditivos y agentes industriales	agentes quelantes (EDTA), sulfonatos aromáticos
Aditivos de la gasolina	dialquil éteres, metil- <i>t</i> -butil éter (MTBE)
Subproductos de desinfección	trihalometanos, bromoacetonitrilos, bromoácidos, bromoaldehidos, yodo, cianoformaldehido, bromato.

Por estas razones, la mayoría de las nuevas investigaciones han centrado sus estudios en la aparición de estos contaminantes orgánicos en aguas superficiales, aguas de arroyos, aguas residuales con tratamiento biológico y agua potable, ya que éstas son más susceptibles de contener concentraciones mayores de contaminantes emergentes que las aguas subterráneas [15]. La detección y

determinación de estos compuestos y de muchos otros que antes eran difícilmente analizados, se debe principalmente al desarrollo de técnicas analíticas acopladas, como la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos acopladas a espectrometría de masas, que son sumamente sensibles y permiten alcanzar límites de detección en el orden de trazas ($\mu\text{g/L}$ o menores) [19].

II.3. Fármacos

Los fármacos son productos químicos utilizados para el diagnóstico, tratamiento (curación o mitigación), alteración o prevención de enfermedades, con el objeto de mejorar las condiciones de salud, la estructura o el funcionamiento del cuerpo humano. Esta definición se extiende también a los productos farmacéuticos veterinarios en el caso de los animales, así como a las drogas ilícitas [14]. En este grupo se incluyen antibióticos, antidepresivos, tranquilizantes, medicamentos psiquiátricos, para tratamiento del cáncer, antiinflamatorios, antihipertensivos, analgésicos, antisépticos, reguladores de lípidos, anticonceptivos orales, agentes de diagnóstico, aquellos para mejorar el rendimiento sexual, entre otros [20].

Un aspecto importante de los fármacos, desde el punto de vista medioambiental, es que presentan ciertas características que los hacen diferentes a los contaminantes químicos industriales convencionales:

- Las sustancias farmacológicamente activas incluyen compuestos formados por moléculas grandes y químicamente complejas, así como moléculas relativamente pequeñas y simples, por lo que dentro de este grupo se presentan diferencias importantes en peso molecular, estructura, funcionalidad, forma, etc.
- En general son moléculas polares y tienen a menudo más de un grupo ionizable. El grado de ionización, estabilidad, solubilidad en agua y otras propiedades dependen del pH de la solución.

- La permanencia en el medio ambiente es muy variable, hay algunos como ciclofosfamida, naproxeno y sulfametoxazol que pueden llegar a 1 año e incluso otros que pueden persistir varios años, como el ácido clofíbrico, por lo que pueden acumularse alcanzando niveles biológicamente activos [21].

Los productos farmacéuticos no eran considerados contaminantes ambientales dado que se desconocía su acumulación o la de sus productos de transformación en suelo, agua, aire, tejidos vegetales y tejidos animales. Por lo anterior, la concentración de éstos en matrices ambientales y en especial en los cuerpos de agua es indeterminada y fue sólo a partir de los años noventa que se comenzaron a cuantificar algunos fármacos en aguas superficiales, detectando niveles del orden de las partes por billón (ppb) y partes por trillón (ppt).

Actualmente, se sabe que los residuos de productos farmacéuticos representan un riesgo ambiental debido a su persistencia y distribución en el agua, el suelo, el aire y los alimentos. Su amplio uso hospitalario, veterinario y doméstico explica el creciente aumento de su descarga y la de sus productos de transformación en el ambiente, con la posibilidad de que puedan manifestarse efectos adversos en los componentes vivos de los ecosistemas [22].

La principal razón por la que los fármacos son de gran interés, es porque se desarrollan con la intención de provocar un efecto biológico específico en el organismo y tejidos vivos; a su vez, los efectos secundarios, que a menudo pasan desapercibidos tras su uso en personas y animales, podrían ser de enorme importancia en organismos inferiores. Por otro lado, la presencia simultánea de numerosos principios activos farmacológicos que presentan diferentes modos de acción podría causar efectos significativos debido a fenómenos de sinergismo. La continua introducción en el mercado de nuevas fórmulas farmacéuticas aumenta la cantidad de componentes activos, cuya actividad biológica en el ambiente es hoy en día desconocida [23].

Las principales rutas de acceso de los fármacos a los cuerpos de agua son:

- a) La excreción por animales y seres humanos. Una fracción importante de los fármacos consumidos puede ser excretada sin cambio alguno o como una mezcla de muchos metabolitos. En general, los fármacos son metabolizados en el organismo por diversos mecanismos (oxidación, reducción, hidrólisis, conjugaciones, etc.) y luego excretados en forma de derivados más polares y solubles en agua, que presentan una actividad farmacológica mucho menor a la del compuesto original [1,16].
- b) Eliminación directa. Se refiere al desecho de los fármacos por el lavabo o retrete para evitar el almacenamiento y la ingesta accidental de medicamentos caducados. Los resultados de encuestas realizadas en Inglaterra indicaron que el 50% de las personas en tratamiento médico no lo terminaron, por lo que se desecharon a la basura dos tercios de esos medicamentos para no almacenarlos, una quinta parte se regresó a la farmacia y aproximadamente una décima parte fue desechada por el desagüe, generando de esta manera una contaminación en las redes de agua.
- c) Aguas residuales. Una vez que son desechados, tanto los fármacos como sus metabolitos, ingresan a los colectores de agua residual y llegan a las estaciones depuradoras donde su eliminación no está garantizada. De esta manera, los fármacos remanentes en los efluentes de las plantas son vertidos en las reservas de agua superficial o enviados a los sistemas de integración de agua tratada [21].

A continuación se describen algunos de los grupos más representativos de sustancias farmacológicamente activas.

- Los *antinflamatorios* y *analgésicos* son usados fundamentalmente para combatir el dolor. La mayor parte de estos fármacos tienen también propiedades antipiréticas. Dentro de este grupo los compuestos más empleados son el paracetamol, ácido acetilsalicílico, ibuprofeno y diclofenaco.

- Los *antidepresivos*, entre los más frecuentes están las benzodiazepinas que son fármacos que aumentan la actividad de ciertos neurotransmisores inhibidores, reduciendo así el funcionamiento de ciertas áreas del cerebro. Producen somnolencia, descenso en la ansiedad y relajación de los músculos.
- Entre los *antiepilépticos*, el más común es la carbamazepina. Los nervios y el cerebro están formados por una gran cantidad de células nerviosas, que se comunican entre sí a través de impulsos eléctricos. La carbamazepina evita el cúmulo excesivo, rápido y repetitivo de impulsos eléctricos, manteniendo normal la actividad cerebral.
- Los *antineoplásicos* son fármacos empleados para el tratamiento del cáncer, entre los que se encuentran el bisulfán y las ciclofosfamidias.
- Los *antilipemiantes* son aplicados principalmente para bajar los niveles de colesterol en sangre en personas con arterioesclerosis. Entre los fármacos más frecuentes se encuentran los fibratos (derivados del ácido fíbrico) y las estatinas que elevan los niveles de lipoproteínas y bajan el nivel de triglicéridos
- Los *betabloqueantes* se usan para bloquear los receptores beta que existen en el corazón, consiguiendo disminuir la necesidad de oxígeno de este órgano, reducir el ritmo cardíaco, disminuir la fuerza de contracción y reducir la contracción de los vasos sanguíneos. Están indicados para combatir la hipertensión arterial, angina de pecho y arritmias cardíacas; entre los más utilizados están el atenolol, propranolol y metoprolol.
- Los *antiulcerosos* y *antihistamínicos* se emplean contra la acidez de estómago, úlceras y otras alteraciones estomacales. Son bloqueadores de receptores H1 y H2 de la histamina. Estos receptores se encuentran en unas células que recubren el estómago, cuando la histamina se une a ellos las células producen ácido. Estos fármacos reducen la unión de la histamina a esos receptores, por lo que la producción de ácido disminuye. Los más usados son la ranitidina y la famotidina.

- Entre los *antibióticos* más importantes se encuentran las sulfonamidas, fluoroquinolonas, cloranfenicol, tilosina y trimetoprim.
- También pueden ser consideradas otras sustancias que de cierta manera alteran la mente sin una necesidad médica y que con frecuencia son usadas en abuso como por ejemplo el alcohol, marihuana, cocaína, barbitúricos, metadona, heroína y otros narcóticos, anfetaminas, LSD (dietilamina del ácido lisérgico) y la PCP (fenilciclidina).

Como se mencionaba antes, de manera general los principios activos de los fármacos son metabolizados. Sin embargo, una fracción significativa de la sustancia original no se metaboliza y se excreta a través de orina y heces, que son descargados en el agua residual. Además, algunos de los metabolitos excretados se pueden incluso transformar de nuevo en el principio activo original [1]. En la Tabla II.2 se muestran algunos ejemplos de fármacos y los metabolitos derivados de éstos, indicando el porcentaje de fármaco excretado ya sea como el compuesto original o como derivado hidrolizable.

Es importante considerar que la cantidad real de cada uno de los numerosos medicamentos comerciales que se ingieren o se desechan es una verdadera incógnita, lo que impide hacer cualquier predicción sobre su posible presencia, distribución y concentración en las aguas naturales. Estas variables dependen de diversos parámetros como: cantidad de fármaco fabricado, frecuencia y cantidad de dosificación, eficiencia con la que son excretados (orina y heces), entre muchos otros [24].

Los productos farmacéuticos con aplicación veterinaria, una vez excretados son a menudo dispersados en el campo, desde donde puede entrar en el medio acuático por efecto de las lluvias, ya sea por escurrimientos que se vierten en los cuerpos de aguas superficiales o por lixiviación e infiltración a través del suelo hacia las aguas subterráneas.

Tabla II.2. Tasas de excreción de fármacos y sus principales metabolitos [21].

Compuesto	Compuesto original	Conjugados hidrolizables	Metabolitos
Ibuprofeno	10%	5%	1- y 2- hidroxibuprofeno, 2-carboxibuprofeno, 2-hidroximetil ibuprofeno, acil glucorónido
Diclofenaco	22%	15%	3-, 4- y 5- hidroxidiclofenaco, diclofenaco-O-glucorónido
Naproxeno	10%	60%	O-desmetil naproxeno, O-desmetil naproxeno glucorónido, acil glucorónido
Ácido acetilsalicílico	8%	85%	ácido salicílico, ácido salicílico, ácido gentísico, ácido glucorónido
Ketoprofeno	10%	70%	ácido (3-hidroxil carboximetil) hidratópico, acil glucorónido
Trimetoprim	43%	2%	α -hidroximetoprim
Sulfametoxazol	30%	1%	N4-acetil sulfametoxazol
Acetaminofen	3%	93%	Acetofenitidina
Carbamazepina	31%	2%	2- y 3- hidroxicarbamazepina, 10,11-dihidro carbamazepina, 10,11-dihidro-10,11 epoxy carbamazepina, 10,11-dihidro-10,11 dihidroxicarbamazepina

Los productos farmacéuticos de uso humano, en general son excretados o desechados (medicamentos caducos) por el drenaje doméstico y conducidos a través del sistema de alcantarillado hacia los colectores de aguas residuales, las cuales son enviadas a las plantas de tratamiento antes de ser vertidas en los cuerpos receptores. Sin embargo, como ya se comentó anteriormente, los efluentes de depuradoras de aguas residuales son actualmente considerados

como una de las más importantes fuentes de entrada de contaminantes emergentes al medio ambiente. Por otra parte, los cuerpos receptores de aguas tratadas pueden a su vez ser fuente de alimentación de plantas potabilizadoras, lo que explica el hecho de que algunos productos farmacéuticos y de cuidado personal se encontraran en el agua potable [25].

El primer reporte de la presencia de fármacos en aguas residuales tratadas y de sus efectos adversos sobre la fauna y la flora fue presentado en 1976 en Kansas, Estados Unidos, pero no causo gran efecto sino hasta los 90's cuando se publicaron revisiones bibliográficas donde se describe el potencial de estas sustancias para persistir en el ambiente. Con base en estos informes, la Administración de Drogas y Alimentos-FDA de los Estados Unidos y la Unión Europea (UE) comenzaron a orientar muchos de sus estudios hacia la evaluación del impacto ambiental de sustancias farmacológicamente activas y al desarrollo de estrategias de tratamiento, estudio de metabolitos, toxicidad, remoción y técnicas instrumentales para su identificación y cuantificación [13,22].

Tiempo después fue posible confirmar la presencia de diversos fármacos en efluentes de estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) de ciertos países como Holanda, Brasil, Suiza, Reino Unido, Estados Unidos, Francia, Suecia, Grecia, Canadá, España y Australia, demostrando de esta manera que las plantas tienen una baja capacidad para eliminar los residuos farmacológicos en su totalidad, por lo que terminan ingresando a los cuerpos de agua, como ríos, lagos, mares, acuíferos y llegan incluso en concentraciones muy pequeñas a las redes de agua potable. En la Tabla II.3 se muestran, a manera de ilustración, las concentraciones reportadas para diversos fármacos a la entrada y salida de las plantas de estaciones depuradoras, así como las concentraciones que pueden alcanzar en las aguas superficiales, subterráneas y en el agua potable.

Tabla II.3. Concentración de algunos fármacos en aguas residuales (influentes y efluentes de plantas depuradoras), aguas superficiales y subterráneas y en agua para consumo humano [1].

Fármaco	Influyente (µg/L)	Efluente (µg/L)	Agua superficial (µg/L)	Agua subterránea (µg/L)	Agua potable (µg/L)
Acetaminofen	0.13-26.09	nd-5.99	nd-0.25	0.015	0.0081 - 0.0653
Aspirina			0.037		
Carbamazepina	2.1	0.75	0.5	0.071	0.043-0.09
Diclofenaco	0.16	0.12	0.12	0.05	
Eritromicina	0.71-0.141	0.145-0.29	nd-0.07	0.075	
Ibuprofeno	3.59	0.15	0.22	0.129	0.009
Indometacina	0.151	0.091	0.066		
Naproxeno	3.65	0.25	0.25		
Sulfametoxazol	0.52	0.13	nd-0.12	0.012	nd-0.0592

* nd: no detectado

2.3.1. Fármacos, su consumo y contaminación en el país.

En México el estudio sobre contaminantes orgánicos emergentes es aún incipiente. La mayor parte de los trabajos que abordan este tema se realizan en instituciones académicas y enfocados al desarrollo de metodologías analíticas para su determinación en diversas matrices ambientales y biológicas [17,26-32]. No obstante, estas metodologías no han permeado hacia los laboratorios oficiales de análisis ambiental (CONAGUA, SEMARNAT), puesto que el monitoreo de este tipo de compuestos en cuerpos de agua de nuestro país o los estudios de su posible impacto ambiental son hasta ahora inexistentes.

En la actualidad, el consumo de fármacos en México se da por dos diferentes vías, la prescripción médica y la automedicación. La automedicación representa un reto más grande debido a la mala educación médica de la población, así como la cultura o los usos y costumbres de cada comunidad, fuertemente influenciados por

la mercadotecnia que promueve el uso excesivo de fármacos. Aún en un nivel socioeconómico medio-alto de la población, se encontró que el 83% de las personas que almacenan medicamentos como analgésicos, psicofármacos y antimicrobianos, los usan sin prescripción médica en cuadros clínicos similares a los propios.

En un estudio realizado en 1992 en Cuernavaca [33], se menciona que el 80% de la población encuestada ha consumido fármacos; de ellos, el 64.9% de hombres y el 53.3% de mujeres lo hicieron por automedicación, es decir, más de la mitad de la población consumió fármacos sin tener una prescripción médica y haciéndolo por recomendación de familiares, amigos, etc. El grupo de edad más vulnerable para la automedicación son los niños menores de un año con un 91.3%, seguido por personas de 5 a 24 años. De acuerdo con el estudio, los fármacos más consumidos en Cuernavaca son los antibióticos con un 21.59%, seguidos por los analgésicos (15.30%) y los antigripales (11.51%).

Si se considera la Ciudad de México, con sus aproximadamente 20 millones de habitantes, la cantidad de residuos farmacológicos vertidos al drenaje debe alcanzar niveles realmente alarmantes. Una gran parte del agua de desecho proveniente del uso doméstico, industrias, escuelas y hospitales se vierte en el Río Tula, de ahí pasa al Río Pánuco y finalmente desemboca en el Golfo de México. Es por eso que la contaminación que se genera en la Ciudad de México afecta directamente a varios estados de la República Mexicana, como San Luis Potosí, Hidalgo y Tamaulipas, así como la zona costera del Golfo de México.

Sólo una porción del agua residual que llega al Valle de Tula recibe un tratamiento parcial en un sistema de tres presas interconectadas (presa Endhó, presa Rojo Gómez y presa Vicente Aguirre). Aproximadamente 10,000 hectáreas del valle son irrigadas con agua residual cruda y cerca de 35,000 más reciben una mezcla de 80% agua residual y 20% agua pluviofluvial [17].

En un trabajo publicado en 2008 se realizó una estimación de las cantidades de fármacos introducidas al Valle de Tula a través del agua residual utilizada para riego, con base en las ventas registradas y el flujo de aguas negras dirigido a esa zona [34]. Los autores encontraron que el consumo de fármacos en la Ciudad de México es en promedio de 4 gramos por persona al año, cantidad comparable con el consumo en los países de la Unión Europea que está entre 4 y 6 gramos por persona al año. Las concentraciones de 11 fármacos, antibióticos y antiinflamatorios, introducidas al ambiente por medio del agua residual fueron calculadas en cerca de 1 µg/L, valor que resulta ser el límite para el requerimiento de una evaluación de riesgo ambiental en Estados Unidos.

II.3.2. Muestras biológicas

Una muestra biológica humana es una parte del cuerpo humano separada del mismo que alberga ácidos nucleicos y que contiene la dotación genética característica de una persona.

Debe de cumplir con tres características básicas que son:

- 1) Ser una parte del cuerpo
- 2) Estar separada del cuerpo
- 3) Albergar la dotación genética característica de una persona.

La muestra biológica es, pues, un soporte de datos y una parte del cuerpo.

En caso de que se necesite aislar células para su estudio, se debe obtener una suspensión de éstas. Los fluidos corporales, como la sangre u orina, ya tienen esa suspensión y no es necesaria la preparación [35].

Como se mencionó, los fármacos pueden ser excretados del organismo de manera inalterado o en forma de metabolitos. El órgano responsable de la mayor excreción es el riñón por la vía de la orina. Los pulmones, aparato digestivo, la piel y algunas glándulas también participan en la excreción por vías alternas como saliva, lágrimas, aire expirado, heces, sudor, bilis, entre otras. Sin embargo, en lo

que concierne a la excreción de fármacos de bajo peso molecular, la vía más importante es la orina ya que la filtración glomerular permite que estos compuestos polares o sus metabolitos pasen directamente a ella [36].

II.3.3. Fármacos de interés

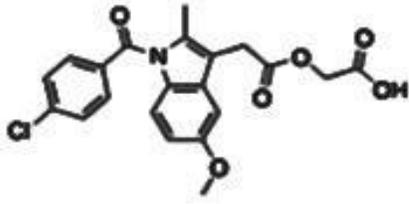
Los fármacos analgésicos antipiréticos antiinflamatorios no esteroideos (AINE's) son un grupo de agentes de estructura química diferente. Toda la actividad de los AINE's gira alrededor de la inhibición que ejercen sobre la enzima ciclooxigenasa (COX), que es la encargada de la síntesis de prostaglandinas, las cuales son mediadoras de la producción de fiebre, dolor e inflamación y otras actividades fisiológicas, incluyendo la protección de mucosa gástrica. Hace pocos años se descubrió que esta enzima tenía dos isoformas, la COX-1 y la COX-2, la primera es constitutiva y expresada en múltiples tejidos como en tracto intestinal, las plaquetas y los riñones, mientras que la COX-2 es una enzima inducible a la respuesta de múltiples estímulos de la reacción inflamatoria.

La aspirina (ácido acetil salicílico) es el prototipo de este grupo de fármacos y es con quien los distintos AINE's son comparados. Debido a esto también se conocen como fármacos "tipo aspirina".

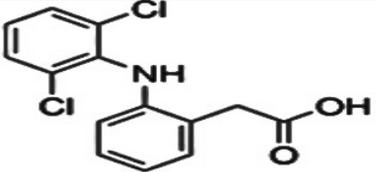
Los AINE's son los fármacos más vendidos en el mundo, son muy comúnmente utilizados tanto por prescripción como por automedicación. Se expenden toneladas por año en todo el mundo. En estudios realizados en los 90's se reporta que ocho AINE's son utilizados en el 70% de las prescripciones y 14 son usados en el 90% de los pacientes. Se piensa que solo 10 o 15 AINE's son necesarios para proveer una elección razonable.

Una característica de estos fármacos son las propiedades ácido-base que presentan. A continuación se describen las características principales de los diez fármacos estudiados en el presente trabajo [37-39].

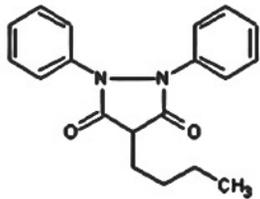
Acemetacina

 Chemical structure of Acemetacina, showing a central indole ring system with a 4-chlorophenyl group, a methyl group, and a propionic acid side chain.	Peso molecular 415.82 g/mol	pKa 3.76	p.f. 151.5 °C	Solubilidad Etanol
<p>Es clasificado como un derivado indolacético.</p> <p>Es utilizado para el tratamiento del dolor leve o moderado. Una vez introducido al cuerpo, se metaboliza como Indometacina, la única ventaja evidente sobre ésta, es la disminución de efectos gastrointestinales.</p>				

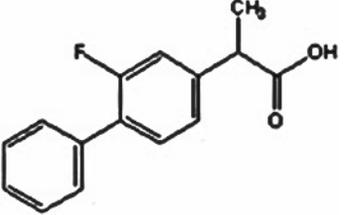
Diclofenaco

 Chemical structure of Diclofenaco, showing a central benzene ring with two chlorine atoms and an acetamide side chain.	Peso molecular 296.19 g/mol	pKa 4.0	p.f. 160-162 °C	Solubilidad Agua
<p>Fármaco derivado del ácido acético.</p> <p>Es utilizado para el alivio del dolor de leve a moderado.</p>				

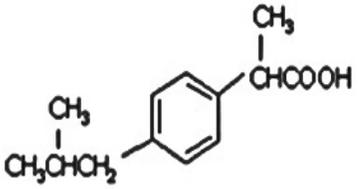
Fenilbutazona

 Chemical structure of Fenilbutazona, showing a central pyrazolone ring system with two phenyl groups and a propyl side chain.	Peso molecular 308.37 g/mol	pKa 4.5	p.f. 104-107 °C	Solubilidad Etanol
<p>Derivado de ácidos enólicos.</p> <p>Utilizado para fines antiinflamatorios y analgésicos.</p>				

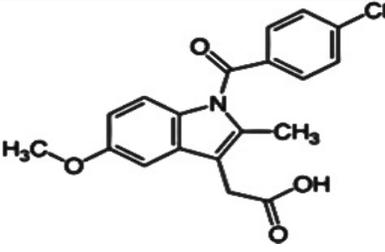
Flurbiprofeno

	Peso molecular 244.26 g/mol	pKa 4.22	p.f. 117 °C	Solubilidad Etanol
<p>Fármaco de la familia de los ácidos arilpropiónicos.</p> <p>Utilizado para el alivio del dolor y en el tratamiento de dismenorrea primaria (problema de producción excesiva de prostaglandina).</p>				

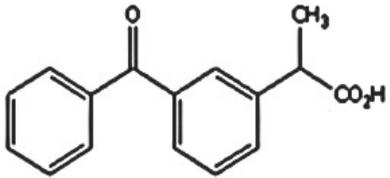
Ibuprofeno

	Peso molecular 206.29 g/mol	pKa 5.22	p.f. 76 °C	Solubilidad Etanol
<p>Fármaco derivado de los ácidos arilpropiónicos.</p> <p>Utilizado en tratamiento de osteoartritis, en el alivio de dolor leve a moderado y fiebre.</p>				

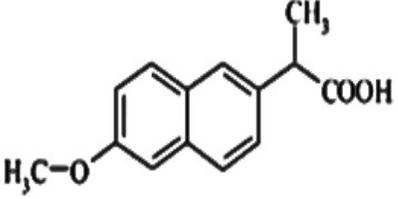
Indometacina

	Peso molecular 357.8 g/mol	pKa 4.5	p.f. 158 °C	Solubilidad Etanol
<p>Fármaco de derivados indolacéticos. Es uno de los AINE's más potentes, pero también más tóxicos.</p> <p>Es útil en ataques agudos de gota, espondilitis anquilosante, enfermedad de Barther.</p>				

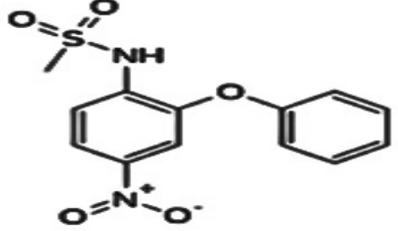
Ketoprofeno

	Peso molecular 254.28 g/mol	pKa 5.94	p.f. 94-97 °C	Solubilidad Etanol
<p>Fármaco derivados de ácidos arilpropiónicos.</p> <p>Utilizado en alivio del dolor leve o moderado, fiebre y en el tratamiento de osteoartritis.</p>				

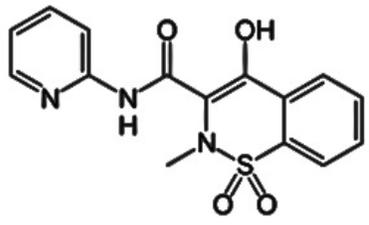
Naproxeno

	Peso molecular 230.26	pKa 4.5	p.f. 153 °C	Solubilidad Etanol
<p>Fármaco derivado de ácidos arilpropiónicos.</p> <p>Utilizado en la disminución de la inflamación, alivio del dolor leve a moderado, tratamiento de osteoartritis y fiebre.</p>				

Nimesulida

	Peso molecular 308.3	pKa 6.5	p.f. 145-147 °C	Solubilidad Etanol
<p>Es clasificado como una sulfoanilida. Es más selectivo por la COX2.</p> <p>Sus principales usos son para el alivio del dolor, fiebre y disminución de la inflamación.</p>				

Piroxicam

	Peso molecular 331.35	pKa 6.3	p.f. 198- 200 °C	Solubilidad Etanol
Derivado de ácidos enólicos; oxicam. Utilizado para el tratamiento de dismenorrea primaria, para el alivio del dolor y fiebre.				

II.4. Métodos de análisis

II.4.1. Preparación de muestra

A pesar de los grandes avances tecnológicos en lo que concierne a la instrumentación analítica, hoy en día es todavía imposible determinar contaminantes orgánicos directamente en las matrices ambientales. Por ello, la etapa de preparación de muestra sigue siendo uno de los puntos críticos en los métodos analíticos.

Para un análisis efectivo, se debe seleccionar un método de preparación afín a la muestra. Entre los principales factores que se deben de tomar en cuenta están los siguientes:

- Las propiedades físicas y químicas de los analitos: estructura química, peso molecular, propiedades ácido-base (pKa), etc.
- La concentración del analito dentro de la muestra. Si los analitos se encuentran en altas concentraciones, el procedimiento será mucho más sencillo, con operaciones básicas como filtración o solubilización, pero en caso de que los analitos se encuentren en bajas concentraciones se requerirán pasos adicionales que logren aumentar su concentración hasta alcanzar un nivel detectable y/o cuantificable.

- La naturaleza de la matriz. Se debe poner especial atención en que la señal generada por el analito sea detectable, eliminando impurezas de la matriz que puedan interferir, así como sustancias que puedan causar algún daño a los instrumentos analíticos.

El análisis de residuos de fármacos en matrices acuosas representa un gran reto para la Química Analítica. Por un lado, estos compuestos son polares, con carácter marcadamente hidrofílico y se encuentran a concentraciones sumamente bajas, en el rango de ng/L (ppt) a µg/L (ppb), en las aguas ambientales (superficiales y subterráneas) y en las aguas residuales pre- y post-tratamiento (ver Tabla II.2). Adicionalmente, estas matrices contienen altas concentraciones de materia orgánica, tanto de origen natural (ácidos húmicos y fúlvicos) como antropogénico (aceites, grasas, hidrocarburos, tensoactivos, etc.), que interfieren significativamente en la detección y cuantificación de los analitos de interés.

Probablemente el paso crucial en el análisis de trazas de compuestos orgánicos en muestras acuosas es la extracción de éstos a partir de la matriz. Idealmente, durante esta operación los analitos son separados cuantitativamente de la fase acuosa, aislados de otros componentes presentes en la muestra y concentrados en la fase de extracción. Una vez finalizado este tratamiento, se espera obtener un extracto concentrado y purificado con el fin de satisfacer los requerimientos en cuanto a límites de detección y cuantificación [40].

En la actualidad, una de las principales tendencias en los métodos de preparación de muestra es que sean respetuosos con el medio ambiente, es decir, que se trate de minimizar el consumo de disolventes y reactivos y de esta manera la generación de residuos. Sería contradictorio que al intentar controlar los niveles de contaminación ambiental, fueran los mismos laboratorios de análisis una fuente de ella [41].

Las principales técnicas para la preparación de muestras acuosas son la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida. A continuación se detallan las principales características de cada una y algunas de sus modalidades miniaturizadas, surgidas en los últimos años con el fin de hacerlas más acordes con los requerimientos del mundo actual.

II.4.1.1. Extracción en fase sólida (EFS)

La extracción en fase sólida (EFS) está basada en la retención más o menos selectiva de los analitos en un adsorbente apropiado y su posterior elución. La técnica es en realidad una cromatografía de líquidos trabajada bajo la modalidad conocida como análisis frontal en la primera etapa (carga de muestra) y bajo la modalidad de elución en la última etapa (desorción de los solutos).

El sistema está constituido por una fase estacionaria (el adsorbente), empacada en un cartucho, en una pequeña precolumna o depositada en forma de capa sobre una membrana porosa (disco), y una fase móvil (la muestra acuosa o el eluyente). Para la siguiente descripción del proceso, se supondrá que el adsorbente está empacado en un cartucho.

En la etapa de carga, a medida que la muestra pasa a través del cartucho, los compuestos que ésta contiene se reparten entre las dos fases en función de su afinidad. Los compuestos con mayor afinidad por la fase estacionaria que por la fase móvil quedan retenidos, saturando poco a poco el lecho adsorbente. Una vez que una porción del lecho queda saturada con respecto a un determinado soluto (es decir, que se alcanza el estado de equilibrio entre las fases para ese soluto en esa región), la adición de más muestra con soluto hace que éste pase a la siguiente porción de lecho y el proceso de retención-saturación recomienza. Así, para cada soluto se genera un frente de migración, cuyo avance a lo largo del lecho depende del volumen de muestra percolado y de la constante de distribución del soluto. La adición de muestra se detiene antes de que el frente de migración del analito de interés menos retenido llegue al final del cartucho. Los solutos con

poca afinidad por la fase estacionaria y gran afinidad por la fase acuosa prácticamente no se retienen, por lo que su frente de migración viaja a la misma velocidad que la fase móvil y emergen del cartucho en un volumen igual o muy cercano al volumen muerto [42].

Normalmente, después de la etapa de carga se realiza una etapa intermedia “de lavado”, con el fin de remover algunas impurezas de la muestra que pudieran quedar retenidas en el adsorbente. En esta etapa se pasan por el cartucho algunos mililitros de un disolvente relativamente débil, tal que no provoque la desorción de los analitos pero que logre eluir otros compuestos retenidos con menor fuerza. Cuando la EFS se utiliza para la preparación de muestras acuosas, es usual utilizar como disolvente de lavado agua pura o agua con una cierta proporción (a ajustar) de un modificador orgánico como acetonitrilo o metanol.

Para la etapa final (elución), se elige como fase móvil un disolvente fuerte, es decir un disolvente por el cual los compuestos de interés tengan una gran afinidad, de modo que al pasarlo por el cartucho logre la desorción total de los analitos con el mínimo volumen posible. El extracto obtenido, con los analitos concentrados y libres de interferencias (hasta cierto punto), puede ser analizado directamente, o bien, puede someterse a evaporación para reducir su volumen y aumentar el factor de concentración.

El proceso descrito corresponde a la modalidad de EFS llamada “fuera de línea”. En ésta, el dispositivo de extracción es un cartucho o un disco. Existe otra modalidad de la técnica, denominada “en línea”, en la cual el dispositivo de extracción es una pequeña precolumna de acero inoxidable empacada con el adsorbente. La precolumna se inserta entre dos puertos de una válvula de conmutación, colocada entre el inyector y la columna analítica de un cromatógrafo de líquidos. Las etapas de carga y lavado son idénticas a las del proceso descrito, excepto que la muestra y la solución de lavado se hacen pasar por la precolumna con ayuda de una bomba auxiliar, conectada a la válvula de conmutación. La

diferencia mayor entre las dos modalidades radica en la etapa de elución. Ésta se lleva a cabo rotando la válvula de conmutación y enviando la fase móvil de las bombas del cromatógrafo hacia la precolumna, con lo cual todos los compuestos retenidos son eluidos y transferidos directamente a la columna analítica para su separación y determinación. Este diseño permite que todo el proceso analítico (preparación de muestra- análisis cromatográfico) pueda ser automatizado [43,44].

La EFS en línea es una técnica más exacta, precisa y sensible que la EFS fuera de línea, ya que la manipulación de la muestra es menor y, como todo el extracto se analiza mandándolo hacia la columna cromatográfica, se alcanzan límites de detección y cuantificación mucho más bajos. Entre sus desventajas se puede mencionar que es una técnica más compleja, requiere de aditamentos adicionales (válvulas de conmutación), los métodos son más difíciles de optimizar y es menos flexible que la EFS fuera de línea, por lo que esta última es más popular en los laboratorios de análisis. Incluso, desde hace varios años la EPA incluyó a la EFS fuera de línea como técnica de preparación de muestra para análisis ambientales y se desarrollaron métodos “oficiales” para determinación de algunos contaminantes orgánicos basados en dicha técnica. Su mayor inconveniente es que normalmente requiere de pasos adicionales de evaporación y reconstitución del extracto para aumentar el factor de enriquecimiento o para hacerlo compatible con el método de análisis.

Los adsorbentes utilizados en EFS son del mismo tipo que las fases estacionarias comúnmente empleadas en cromatografía de líquidos, excepto por el tamaño de partícula que es mucho más grande, particularmente en el caso de los cartuchos y discos. Para la EFS de muestras acuosas se utilizan adsorbentes de fase reversa (apolares) como las fases enlazadas C18 (cadenas octadecilo unidas a un soporte de sílice) o las fases poliméricas estireno-divinilbenceno, aunque en algunas ocasiones también pueden utilizarse fases de intercambio iónico. La retención y selectividad pueden modularse ajustando la composición o el pH de la fase líquida, ya sea en las etapas de carga y lavado o en la etapa de elución.

II.4.1.2. Microextracción en fase sólida (MEFS)

Es la forma miniaturizada de la EFS. Esta técnica fue introducida por Belardi y Pawliszyn en 1989 [45]; desde entonces se aplica para la extracción de una gran variedad de compuestos orgánicos a partir de diversas matrices, alcanzando gran popularidad. Uno de los principales atractivos de esta técnica de preparación de muestra es la eliminación del uso de solventes orgánicos que, además de ser caros, son muchas veces nocivos y contaminantes.

El dispositivo de extracción utilizado en MEFS tiene la apariencia de una jeringa. Su principal componente es una delgada fibra de sílice fundida recubierta en una de sus extremidades por un adsorbente, ya sea un polímero líquido o una fase sólida. La fibra está colocada al interior de un tubo hueco de acero inoxidable (aguja) y conectada por su otra extremidad a un montaje mecánico accionado por un émbolo; mediante éste la fibra puede retraerse al interior de la aguja o sacarse al exterior de ésta, quedando así expuesta a la muestra.

Usualmente la muestra (5-10 mL) se coloca en un vial cerrado, cuyo tapón puede ser perforado por la aguja del dispositivo de MEFS para introducir la fibra. El proceso de extracción consta básicamente de dos etapas:

- Etapa de extracción. Puede llevarse a cabo de tres diferentes maneras. La primera es sumergiendo directamente la fibra en el interior de la muestra líquida (direct immersion). La segunda es manteniendo la fibra en el espacio o fase gaseosa sobrenadante entre la muestra y el tapón del vial; esta modalidad, llamada head space (HS), se emplea para solutos volátiles que se reparten de manera importante en la fase gaseosa en equilibrio con la muestra líquida. La tercera modalidad se utiliza cuando las muestras contienen partículas suspendidas que pueden dañar al recubrimiento de la fibra; en este caso, la fibra se sumerge en la muestra protegida por una membrana porosa [27].
- Etapa de desorción. Una vez transcurrido el tiempo establecido para la extracción, la fibra se retira del vial y se introduce directamente en el

inyector de un cromatógrafo de gases o en un accesorio especial adaptado al inyector de un cromatógrafo de líquidos; los analitos retenidos en la fibra son desorbidos térmicamente o por disolución en la fase móvil, respectivamente [43].

La microextracción en fase sólida es una técnica muy sencilla y amigable con el ambiente ya que la desorción de los analitos extraídos y concentrados en la fibra se realiza directamente en el instrumento cromatográfico; además es posible automatizar el proceso. Su principal inconveniente es que está basada en procesos de reparto que pueden involucrar hasta tres fases, por lo que el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio puede ser muy largo. Por esta razón la MEFS generalmente se trabaja bajo condiciones de no equilibrio, lo que hace necesario tener un control muy riguroso de las condiciones experimentales para lograr resultados reproducibles. Otro inconveniente es la imposibilidad de conservar una fracción del extracto para análisis posteriores [27].

II.4.1.3. Extracción líquido-líquido (ELL)

Es la técnica de preparación de muestras acuosas más antigua y por muchos años fue la única aceptada por la EPA para el análisis de contaminantes orgánicos en aguas naturales y tratadas. Está basada en el reparto de los analitos entre la fase acuosa y un disolvente orgánico inmiscible en agua, en función de la afinidad relativa por cada fase. Esa afinidad relativa está determinada por su coeficiente de reparto.

Aunque la técnica es relativamente sencilla, las operaciones necesarias para alcanzar una recuperación y purificación satisfactoria de los solutos, así como altos factores de concentración, son largas y tediosas (extracciones sucesivas, evaporación del extracto, reconstitución, etc.). La continua manipulación de la muestra durante estas operaciones puede repercutir en la exactitud y precisión de las determinaciones. Adicionalmente se tiene el problema de formación de emulsiones cuando se trabaja con algunas muestras complejas.

Estas desventajas, unidas al alto consumo de disolventes orgánicos (que deben ser de muy alta pureza) y su posterior evaporación, hacen de la ELL una técnica cara, poco amigable con el ambiente y poco adaptada a las necesidades y requerimientos actuales [41]. Sin embargo, puesto que es una técnica de extracción muy poderosa y más flexible que la EFS, se ha buscado contrarrestar sus desventajas mediante la miniaturización. Así, en la última década surgió una amplia variedad de técnicas miniaturizadas basadas en la ELL y conocidas globalmente como microextracción en fase líquida (LPME, por las siglas del nombre en inglés: liquid phase microextraction). Todas estas técnicas se caracterizan por utilizar volúmenes de muestra pequeños (5-10 mL) y mínimas cantidades del disolvente de extracción (generalmente menos de 200 μ L). A continuación se detallarán algunas de las principales.

II.4.1.4 Microextracción en gota suspendida (SDME)

La microextracción en gota suspendida (SDME, por el nombre en inglés: single drop microextraction) fue la primera técnica del grupo LPME que surgió, propuesta inicialmente por Liu y Dasgupta en 1996 [46] y poco después por el grupo de H.K. Lee [47]. En esta modalidad, una pequeña gota de un disolvente orgánico inmisible en agua es suspendida en el extremo de la aguja de una microjeringa convencional o en un pequeño rodillo de teflón con una muesca en el extremo que facilite la adherencia de la gota. Esta gota es expuesta al espacio situado sobre la muestra acuosa (head space) o sumergida en ella. Los analitos migran desde el seno de la fase acuosa hasta este aceptor orgánico en función de su mayor o menor polaridad y de su afinidad por el aceptor. Una vez transcurrido el tiempo de extracción, la gota es analizada inyectándola directamente en el cromatógrafo de gases o de líquidos. La transferencia de masa se da por convección-difusión, manteniendo la muestra acuosa bajo agitación continua. Las principales ventajas que ofrece la técnica son: mínimo consumo de disolvente orgánico (8-10 μ L), alto factor de concentración, separación de fases muy sencilla e inmediata al término del proceso y transferencia de todo el extracto para su análisis. Sus mayores

desventajas son la inestabilidad de la gota suspendida y el largo tiempo necesario para alcanzar el estado de equilibrio. En caso de interrumpir el proceso antes del equilibrio, para disminuir el tiempo de análisis, se deben controlar perfectamente las variables experimentales como: velocidad de agitación, tiempo de extracción, composición y fuerza iónica de la fase acuosa e incluso temperatura, para tener resultados reproducibles.

II.4.1.5. Microextracción líquido-líquido disperso (DLLME)

En el año 2006, Assadi y colaboradores propusieron una novedosa técnica denominada microextracción líquido-líquido disperso (DLLME, del inglés: dispersive liquid-liquid microextraction) que permitió reducir drásticamente el tiempo requerido para alcanzar el equilibrio [48].

LA DLLME se basa en un sistema ternario de disolventes, constituido por la fase acuosa (la muestra) y una mezcla de dos disolventes orgánicos, el extractante inmisible en agua y el dispersante que debe ser miscible con el agua y con el extractante. La mezcla dispersante-extractante se inyecta rápidamente en la muestra, lo que provoca la formación de una emulsión de microgotas del extractante dispersas en la fase acuosa. La gran superficie de contacto entre las dos fases acelera notablemente la transferencia de masa, por lo que el equilibrio de reparto se alcanza en unos cuantos minutos. Posteriormente, las fases se separan rompiendo la emulsión mediante centrifugación; el disolvente orgánico con los solutos extraídos queda flotando como una gota en la superficie de la fase acuosa (disolventes menos densos que el agua) o sedimenta en el fondo del recipiente (disolventes más densos que el agua).

La técnica es muy sencilla y rápida. Su principal desventaja es la dificultad para recuperar cuantitativamente el extracto, especialmente cuando el disolvente de extracción es menos denso que el agua. Sin embargo, el uso de disolventes de extracción más densos que el agua (disolventes clorados) ha sido criticado, debido

a que son tóxicos y nocivos para el ambiente. Por otra parte, también se menciona que la adición de agente dispersante aumenta la solubilidad de los analitos en la fase acuosa, disminuyendo el rendimiento de extracción.

En trabajos posteriores se presentan diversas propuestas para reducir estos problemas. Por ejemplo, se desarrollaron algunos dispositivos que facilitan la recolección de extractos menos densos que el agua [49]. También se propusieron diversas variantes de la técnica. Una de ellas consiste en eliminar el agente dispersante sustituyéndolo por radiación ultrasónica para generar la emulsión; esta variante se conoce con el nombre de microextracción con emulsificación asistida por ultrasonido (USAEME, del inglés: ultrasound assisted emulsification microextraction) [50]. Aunque la USAEME ha tenido cierto éxito, el tiempo requerido para generar la emulsión y alcanzar el equilibrio es un poco más largo que en la DLLME convencional y no se demostró fehacientemente que el rendimiento de extracción sea mayor. En la siguiente sección se describe otra variante de la DLLME que presenta ventajas muy interesantes por lo que adquirió gran popularidad.

II.4.1.6. Microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante (DLLME-SFO)

La DLLME-SFO (por las siglas del nombre en inglés: dispersive liquid-liquid microextraction with solidification of floating organic drop), surgió en los años 2008-2009 con los trabajos de Leong y Huang [51] y Hui Xu et al. [52]. Al igual que en la DLLME, la técnica se basa en generar una emulsión de microgotas del extractante dispersas en la muestra con ayuda de un agente dispersante, o bien, con ultrasonido. La diferencia radica en que el extractante debe ser un disolvente orgánico menos denso que el agua y con punto de fusión cercano a la temperatura ambiente. Una vez terminada la extracción y separadas las fases por centrifugación, el recipiente que contiene la muestra, con la gota de extracto flotando en la superficie, se somete a un ligero enfriamiento, lo que provoca la

rápida solidificación del extracto. La gota sólida puede entonces colectarse y transferirse a un vial donde se deja fundir a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Esta modalidad presenta varias ventajas frente a la DLLME: 1) se utilizan disolventes de extracción de baja toxicidad y menos nocivos para el ambiente, 2) el extracto se colecta fácilmente con una cucharilla o espátula, 3) la recuperación del extracto es cuantitativa, lo que redundará en una mejor precisión y exactitud en la determinación de los analitos. En contrapartida, la desventaja principal de la DLLME-SFO es que son pocos los disolventes que poseen las características necesarias para poder utilizarse como extractantes. En efecto, el disolvente debe tener las siguientes propiedades: baja solubilidad en agua, buena afinidad por los analitos, punto de fusión comprendido entre los 10 y 25 °C, menor densidad que el agua tanto en su estado líquido como en su estado sólido y buen comportamiento cromatográfico (no debe dañar la columna ni dar señales que interfieran en la detección de los analitos). Ejemplos de disolventes que han sido utilizados en esta técnica son: 1-undecanol, 1- y 2-dodecanol, n-hexadecano y n-heptadecano [51-57].

II.4.2. Análisis cromatográfico: CLAR/UV

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) es una de las principales técnicas analíticas para la separación de mezclas de compuestos en una muestra. Está basada en la migración diferencial de los solutos a lo largo de una columna empacada en función de su interacción relativa con la fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes que migra por la columna a velocidad constante, impulsada por la(s) bomba(s) del cromatógrafo. La fase estacionaria está constituida por partículas muy finas de un material sólido cuya superficie contiene los sitios activos o grupos funcionales responsables de la interacción. La retención de los solutos en este sistema depende tanto de la

naturaleza del compuesto como de la naturaleza y composición de las fases estacionaria y móvil.

La naturaleza de la fase estacionaria es quien impone el mecanismo de separación y define la técnica cromatográfica de trabajo. Las principales técnicas de la cromatografía de líquidos son las siguientes:

➤ Cromatografía en fase normal

Los compuestos son separados con base en su polaridad. La fase estacionaria está constituida por una pequeña cadena alquílica (generalmente propilo) con grupos polares en su extremidad (ciano, amino o diol), enlazada a un soporte de sílice. La fase móvil es un disolvente o mezcla de disolventes poco polar. Es utilizada para separar compuestos con grupos funcionales polares, poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Los mecanismos de retención están basados en interacciones por puentes de hidrógeno y uniones dipolo-dipolo.

➤ Cromatografía en fase reversa

Es comúnmente utilizada para separar compuestos orgánicos contenidos en una muestra acuosa. Los compuestos orgánicos son separados con base en el tamaño de su área hidrocarbonada o en el número y polaridad de sus grupos funcionales. En esta técnica la fase estacionaria es apolar y la fase móvil es polar. La fase estacionaria más común está constituida por cadenas hidrocarbonadas químicamente enlazadas a un soporte de sílice; las más populares son las fases con cadenas octilo (C8) u octadecilo (C18). También se emplean como fases estacionarias copolímeros del tipo estireno-divinilbenceno, cuyo poder de retención es mayor que el de las fases químicamente unidas. Las interacciones entre los solutos y la fase estacionaria son relativamente débiles por lo que el mecanismo responsable de la retención y separación es el efecto hidrofóbico, ya que la fase móvil está constituida por mezclas de agua con un disolvente orgánico polar, como metanol o acetonitrilo. Entre más grande sea la proporción de agua en la fase móvil, mayor será la retención de los solutos.

➤ Cromatografía de adsorción

Es similar a la cromatografía en fase normal, pero en este caso la fase estacionaria es un adsorbente con mayor poder de retención, tal como la sílice o la alúmina. El mecanismo de separación se explica con ayuda de dos modelos. El primero se basa en la competencia entre el soluto y los componentes de la fase móvil por los grupos activos de la fase estacionaria polar. El segundo modelo se basa en la formación de una doble capa de disolvente en la superficie del adsorbente, los solutos desplazan moléculas de disolvente de la segunda capa para quedar retenidos. Puesto que los adsorbentes utilizados son polares, los solutos más retenidos son los más polares. Las fases móviles son mezclas de un disolvente poco polar y uno más polar; su fuerza eluyente aumenta a medida que aumenta la proporción del disolvente más polar.

➤ Cromatografía de exclusión molecular

Se conoce también como cromatografía por filtración en gel o de permeación en gel. Los componentes de la muestra son separados en función de su tamaño. En esta técnica, en principio, la fase estacionaria no interacciona con los solutos y la fase móvil sólo funge como vehículo para transportarlos. Dependiendo de su tamaño, los solutos penetran o son excluidos de los poros de la fase estacionaria y permean una fracción mayor o menor del poro. El poder de resolución de esta técnica es bajo por lo que, a nivel analítico, generalmente es utilizada en los pasos preliminares del proceso de purificación de muestra, para separar analitos pequeños de grandes moléculas presentes en la matriz. También es utilizada en la separación de grandes biomoléculas y polímeros sintéticos. En la industria de los polímeros es la técnica de elección para el estudio de la distribución de pesos moleculares.

➤ Cromatografía de intercambio iónico.

Es utilizada para separar compuestos iónicos o ionizables en muestras acuosas. La retención se basa en la atracción eléctrica que se da entre los iones en solución y los grupos funcionales iónicos de carga contraria

inmovilizados en la fase estacionaria. La fase móvil es una solución acuosa de sales y/o buffers que, dependiendo de los analitos a tratar, puede contener una mayor o menor proporción de un disolvente orgánico polar. La retención y selectividad se ajustan por modificación del pH, la fuerza iónica y/o la proporción de disolvente orgánico en la fase móvil.

➤ Cromatografía de afinidad.

El sólido que constituye la fase estacionaria tiene enlazado un ligando específico (anticuerpo, proteína o enzima) que interacciona selectivamente con un analito (antígenos, sustrato).

Una vez separados en la columna, los analitos ingresan al sistema de detección acoplado al cromatógrafo de líquidos para su determinación y cuantificación. Los detectores utilizados en HPLC son muy variados, entre ellos se cuentan: el espectrofotómetro UV/Visible, el detector de índice de refracción, el detector de fluorescencia, el detector electroquímico, el detector de dispersión de luz y el espectrómetro de masas. De todos estos, el más utilizado es el detector UV.

El detector UV es muy robusto, estable, poco sensible a pequeñas variaciones de flujo o temperatura, de precio moderado y, aunque no es universal, permite detectar una gran variedad de compuestos. Su intervalo lineal es bastante amplio, abarcando varios órdenes de magnitud de concentración de los analitos. Se puede utilizar con la mayor parte de los disolventes comúnmente empleados en la fase móvil y es compatible con el uso de gradientes de elución. Su sensibilidad es buena, en casos favorables puede llegar a límites de detección del orden del nanogramo inyectado o ligeramente menor. Su selectividad es moderada y depende en gran medida de la longitud de onda a la que se trabaje [58].

Los detectores espectrofotométricos miden el cambio en la intensidad de la luz emitida por una fuente luminosa cuando atraviesa la celda por la que circula el efluente de la columna. Para ello, el haz de luz se divide en dos fracciones, una es enviada directamente a un fotodetector y la otra es dirigida a la celda de flujo y

captada por un segundo fotodetector colocado detrás de ésta. La cantidad de luz recibida por ambos fotodetectores se compara continuamente, transformando la diferencia en una señal eléctrica, la cual es amplificada y enviada al sistema de adquisición de datos. Cuando un compuesto capaz de absorber luz a la longitud de onda de la radiación incidente atraviesa la celda, se genera una señal cuya intensidad (registrada en unidades de absorbancia o de voltaje) es proporcional a la concentración de la especie absorbente de acuerdo con la Ley de Lambert-Beer.

Actualmente, la mayoría de los detectores UV disponibles en el comercio son de longitud de onda variable o con arreglo de diodos, la mayoría cubren también la región del visible. Los detectores UV de longitud de onda variable permiten seleccionar la longitud de onda que corresponde a la máxima absorbancia del soluto de interés para optimizar la sensibilidad; alternativamente, se puede seleccionar una longitud de onda que permita eliminar o disminuir la respuesta de posibles compuestos interferentes. El detector de arreglo de diodos (UV/DAD) permite medir simultáneamente la absorbancia del analito presente en la celda a múltiples longitudes de onda, cubriendo toda la región espectral UV. La señal generada por cada diodo es almacenada en la memoria del instrumento y posteriormente puede ser reprocesada para obtener cromatogramas de la misma muestra a diferentes longitudes de onda, o bien para obtener espectros de absorción de los analitos que eluyen a diferentes tiempos de retención.

III. OBJETIVOS

III.1 Objetivo General

Desarrollar un método analítico simple, rápido, económico y ecológico para la determinación de residuos de fármacos en medios acuosos, utilizando la microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante como técnica de preparación de muestra. Aplicar el método desarrollado en muestras de un fluido biológico para determinar su comportamiento y capacidades en una matriz compleja.

III.2 Objetivos particulares

- Establecer las condiciones óptimas para la separación y detección de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos por cromatografía de líquidos con detección UV, tomando en cuenta el disolvente en que estarán disueltos después de su extracción.
- Implementar la técnica de microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante, optimizando las condiciones experimentales para obtener la mejor recuperación posible de los fármacos seleccionados.
- Validar el método desarrollado determinando la repetibilidad (precisión), recuperación y límites de detección y cuantificación de los fármacos en muestras de agua gado reactivo fortificadas con los analitos.
- Aplicar el método para la cuantificación de los fármacos en un fluido biológico (orina) y determinar su precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación en este tipo de matriz.

IV. DESARROLLO EXPERIMENTAL

IV.1 Equipo y Materiales

- Cromatógrafo de líquidos con capacidad para gradiente de elución binario, constituido por dos bombas Gilson, modelos 305 y 306, detector UV con arreglo de diodos (UV/DAD) Spectromonitor 5000 de Thermo Separation Products, válvula de inyección Rheodyne con rizo de 20 μ L y software para tratamiento de datos Clarity versión 2.8.1.584.
- Horno para columnas Eppendorf CH-30.
- Centrífuga Fisher Scientific, modelo Centrific 225 A con rotor de ángulo fijo E-47859.
- Balanza analítica Ohaus AP210S, con capacidad de 210 g y precisión de 0.1 mg.
- Columna para cromatografía de líquidos Eurospher II C18 de Knauer (150 \times 4.6 mm, d.i., 100 A°, 5 μ m).
- Columna para cromatografía de líquidos Gemini C-18 de Thermo Electron (150 \times 4.6 mm, d.i., 5 μ m).
- Sistema purificador y desionizador de agua NANOpure, Barnstead Thermolyne modelo 04747.
- Baño de ultrasonido, P-Selecta Ultrasons serie 0416297.
- pHmetro Corning modelo 220.
- Jeringa de 100 μ L para cromatografía de líquidos, Hamilton 710 SNR
- Electrodo combinado de vidrio-calomel, Cole-Palmer modelo 60648.
- Micropipetas Eppendorf de 250 y 1000 μ L con puntas Transferpette, Wertheim Alemania.
- Material de vidrio común (matraces aforados y erlenmeyer, pipetas volumétricas, vasos de precipitados, probetas graduadas, etc.)

IV.2 Reactivos y Disoluciones

Reactivos y disolventes

- 1-Dodecanol 98%, Sigma Aldrich.
- Cloruro de sodio R.A., 98%, J.T. Baker.
- Ácido perclórico R.A., 69%, J.T. Baker.
- Hidróxido de sodio R.A., perlas, 98%, J.T. Baker
- Metanol (MeOH) grado HPLC, Tecsiquim.
- Acetonitrilo (ACN) grado HPLC, Tecsiquim.
- Agua grado reactivo, obtenida del sistema purificador NANOpure.
- Fenilbutazona, Sigma Aldrich.
- Indometacina (99%), Sigma Aldrich.
- Ibuprofeno (98%), Sigma Aldrich.
- Naproxeno, Sigma Aldrich.
- Nimesulida, Sigma Aldrich.
- Diclofenaco, Sigma Aldrich.
- Ketoprofeno, Sigma Aldrich.
- Flurbiprofeno, Sigma Aldrich.
- Acemetacina, Sigma Aldrich.
- Piroxicam, Sigma Aldrich.

Preparación de disoluciones

a) Mezclas de extracción.

Mezcla 1: dodecanol-metanol 1:2, v/v (extracción con 300 μ L)

Mezcla 2: dodecanol-metanol 1:1, v/v (extracción con 200 μ L)

Mezcla 3: dodecanol-metanol 2:1, v/v (extracción con 150 μ L)

Mezcla 4: dodecanol-metanol 1:3 (extracción con 400 μ L)

Mezcla 5: dodecanol-metanol 1:4, v/v (extracción con 500 μ L)

b) Disolución de HClO₄ aproximadamente 1 M

Se preparó realizando una dilución 1:10 del HClO₄ concentrado (~ 11 M).

c) Buffer de acetatos 1 M, pH 4.35

Se pesaron 2.7 g de CH_3COONa y se disolvieron en agua, se agregaron 3.8 mL de CH_3COOH concentrado, se ajustó el pH a 4.35 con una disolución de NaOH y se aforó a 100 mL con agua.

d) Soluciones de fármacos.

Soluciones stock.- Se prepararon soluciones individuales de los fármacos a alta concentración en MeOH, con excepción del diclofenaco que se disolvió en agua. Las concentraciones se ajustaron en función de la respuesta de cada compuesto en el detector UV a 215 nm, de modo a tener picos de tamaño similar en el análisis cromatográfico. En la Tabla IV.1 se reportan estas concentraciones.

Mezcla madre.- Para la preparación de la mezcla madre, se tomó 1 mL de cada solución stock y se aforó a 25 mL con MeOH (Tabla IV.1).

Soluciones estándar.- Se prepararon soluciones estándar de diferente concentración tomando alícuotas apropiadas de la mezcla madre y aforando a 10 mL con metanol o con 1-dodecanol. Los estándares metanólicos se emplearon para fortificar las muestras, tanto las de agua grado reactivo como las de orina. Inicialmente se utilizó también un estándar en metanol como estándar externo para el cálculo de recuperación de los solutos en los extractos durante los ensayos de optimización de la técnica de microextracción. Posteriormente, para la validación de la metodología desarrollada y su aplicación en muestras biológicas, se utilizaron disoluciones estándar de los fármacos en dodecanol como estándar externo para la cuantificación de los solutos en los extractos.

Las soluciones stock y la mezcla madre se almacenaron en el congelador a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ cuando no estaban en uso. Las soluciones estándar se guardaron en refrigeración a $4\text{ }^\circ\text{C}$.

e) Soluciones de trabajo.

Durante el desarrollo del presente proyecto se utilizaron soluciones de trabajo en agua grado reactivo fortificada con los fármacos a varias concentraciones. Para preparar las soluciones de trabajo se tomó una alícuota de 1 mL de la mezcla madre o de alguna de las soluciones estándar en metanol (dependiendo de la concentración deseada), se agregó 1 mL de HClO₄ ~1 M y se aforó a 100 mL con agua. Estas soluciones se prepararon a medida que se iban requiriendo y se desecharon al terminar los ensayos correspondientes. En los ensayos realizados para poner a punto las condiciones experimentales de la técnica de microextracción se utilizó la solución de trabajo 1 y para los ensayos de repetibilidad de la técnica optimizada se empleó la solución de trabajo 2; las concentraciones de los fármacos en estas soluciones se indican en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1. Concentración de los fármacos en las disoluciones preparadas^a.

Fármaco	Concentración de las disoluciones				
	Stock (ppm)	Madre (ppm)	Estándar (ppm)	Trabajo 1 (ppb)	Trabajo 2 (ppb)
Ketoprofeno	990	39.6	3.96	396	39.6
Nimesulida	1080	43.2	4.32	432	43.2
Naproxeno	352	14.08	1.408	141	14.1
Acemetacina	1100	44.0	4.40	440	44.0
Flurbiprofeno	1080	43.2	4.32	432	43.2
Diclofenaco	500	20.0	2.00	200	20.0
Indometacina	1000	40.0	4.00	400	40.0
Ibuprofeno	1140	45.6	4.56	456	45.6

^a ppm = mg/L; ppb = µg/L

IV.3 Procedimiento y metodología analítica

IV.3.1. Condiciones cromatográficas

Para poner a punto la separación de los fármacos se utilizó una solución estándar de los solutos en metanol a las concentraciones marcadas en la Tabla IV.1,

incluyendo además a la fenilbutazona (5.05 ppm) y al piroxicam (8.30 ppm). En todos los ensayos la columna cromatográfica se mantuvo a temperatura constante de 30 °C. Las condiciones finalmente adoptadas para la separación se muestran a continuación.

Columna Eurospher II C-18 de Knauer (150 × 4.6 mm, d.i., 100 Å, 5 µm)

Separación por gradiente de elución: fase móvil A (débil): MeOH-H₂O (buffer de acetatos 10⁻² M, pH=4.35) 20:80 (v/v), fase móvil B (fuerte): MeOH-H₂O (buffer de acetatos 10⁻² M, pH=4.35) 90:10 (v/v).

Velocidad de flujo: 1 mL/min.

Temperatura de la columna: 30 °C

Programa de gradiente

Tiempo (min)	Fase B (%)
0	60
15	100
20	100

Cabe señalar que estas condiciones se aplicaron para la separación de los 8 fármacos finalmente seleccionados ya que, por diversas razones que se detallarán en el capítulo de resultados, se decidió descartar al piroxicam y a la fenilbutazona.

IV.3.2. Condiciones de detección

Una vez establecidas las condiciones de separación, se programaron barridos de longitud de onda (190 a 360 nm) en el detector UV/DAD a los tiempos de elución de los 8 fármacos. Con base en los máximos y mínimos de absorción de cada compuesto y los resultados obtenidos en algunos ensayos, se seleccionó una longitud de onda de 215 nm para la detección.

IV.3.3 Metodología de la microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante (DLLME-SFO).

IV.3.3.1. Protocolo de la técnica optimizada para la extracción de fármacos a partir de muestras acuosas.

En una serie de tubos de centrifuga con capacidad de 12 mL se introducen 300 mg de NaCl y 10 mL de la muestra acuosa o la solución de trabajo fortificada con los fármacos. Posteriormente se añaden 300 μ L de la mezcla de extracción dodecanol-MeOH (1:2, v/v), inyectándola rápidamente con una jeringa de modo que se forme una dispersión homogénea de microgotas orgánicas en la fase acuosa (solución turbia). Los tubos se dejan reposar a temperatura ambiente durante 3 minutos, luego se centrifugan por 10 minutos a 4500 rpm y finalmente se transfieren a un baño de hielo. La gota sólida que queda flotando en la superficie de la fase acuosa se separa cuidadosamente con una espátula, se transfiere a un vial con fondo cónico y se deja fundir a temperatura ambiente. El volumen de extracto orgánico obtenido se mide con una microjeringa para los cálculos de recuperación de los fármacos. Finalmente, una alícuota del extracto se analiza por CLAR/UV. En la Figura IV.1 se ilustran los diferentes pasos de este procedimiento.

IV.3.3.2. Aplicación de la DLLME-SFO para la extracción de fármacos a partir de muestras de orina.

Previo a la aplicación de la técnica de microextracción, la muestra de orina sin fortificar (muestra blanco), o fortificada con los analitos, se prepara de acuerdo con el siguiente procedimiento. A un volumen conocido de la muestra se le agregan unas gotas de ácido clorhídrico concentrado hasta ajustar su pH a \sim 2, lo que origina la precipitación de algunos componentes de la orina. La fracción sólida se separa por centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos. Se transfieren 10 mL del sobrenadante a un matraz aforado de 50 mL, se agregan 500 μ L de metanol y se lleva a la marca de aforo con agua.

El proceso de microextracción, detallado en la sección IV.3.3.1, se realiza con alícuotas de 10 ml de la muestra diluida. A diferencia de las muestras acuosas donde se obtiene una gota sólida blancuzca y muy compacta, en el caso de la orina la gota solidificada tiene una ligera coloración anaranjada y es más suave, ya que mantiene atrapada en su interior una pequeña cantidad de fase acuosa. En consecuencia, al fundir la gota transferida al vial, se observa una separación de dos fases. La capa acuosa (inferior) se retira cuidadosamente con una microjeringa y se desecha; la capa orgánica se recupera para su análisis cromatográfico, midiendo previamente su volumen con una microjeringa.

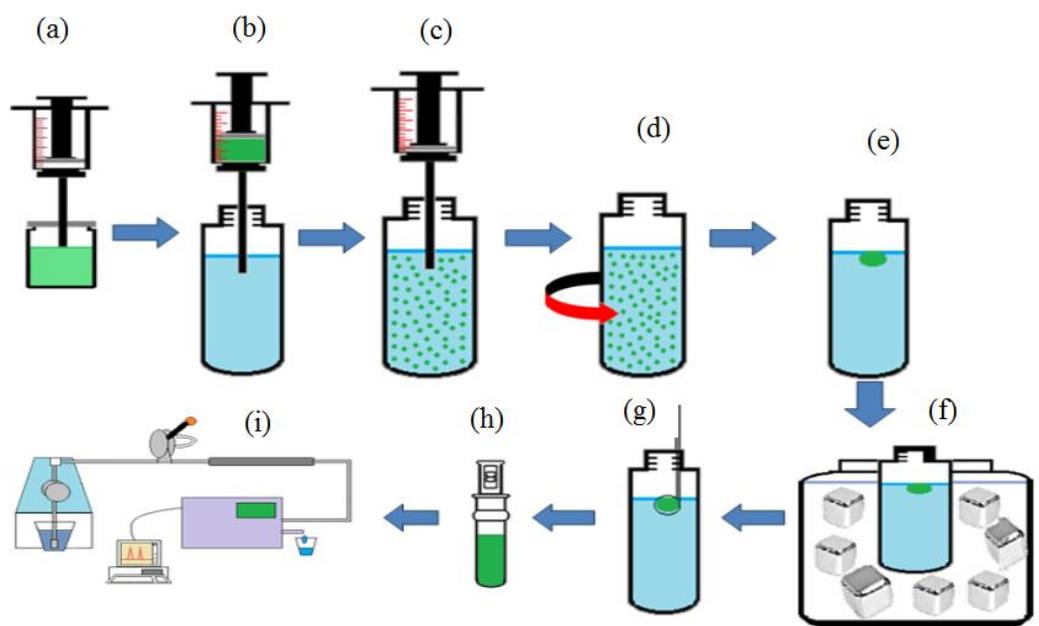


Figura IV.1. Diagrama del proceso DLLME-SFO. (a) mezcla extractante-dispersante, (b) inyección de la mezcla en la muestra acuosa, (c) formación de emulsión, (d) sonido y centrifugado, (e) gota flotante de extracto orgánico, (f) solidificación del extracto en baño de hielo, (g) recuperación de la gota solidificada, (h) extracto fundido a temperatura ambiente, (i) análisis cromatográfico.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

V.1. Separación y detección de los fármacos

Los fármacos estudiados en este trabajo son compuestos polares con carácter ácido, poco estables a altas temperaturas y muy solubles en disolventes orgánicos polares como el metanol o el acetonitrilo. Por ello, la técnica más adecuada para su separación es la cromatografía de líquidos en fase reversa. Idealmente sería deseable utilizar un acoplamiento CLAR-EM (cromatografía de líquidos de alta resolución-espectrometría de masas) para lograr una alta selectividad y sensibilidad en el análisis, sin embargo, no se cuenta con esa instrumentación. Estos equipos son sumamente costosos y delicados, requieren de personal muy especializado para su manejo y todavía son pocos los laboratorios que cuentan con acoplamientos CLAR-EM en México. Dadas las características de los compuestos de interés, la mejor alternativa para su detección y cuantificación es el detector UV con arreglo de diodos. Este detector es más convencional y económico, muy robusto, de fácil manejo y, en caso de requerirse, permite verificar la identidad de un pico mediante el trazo de su espectro de absorbancia.

Las pruebas iniciales se realizaron con un grupo de 10 fármacos: piroxicam, ketoprofeno (KET), fenilbutazona, nimesulida (NIM), naproxeno (NAP), acetaminofeno (ACE), flurbiprofeno (FLU), diclofenaco (DIC), indometacina (IND) e ibuprofeno (IBU). Para la separación de estos compuestos por cromatografía en fase reversa se ensayaron primero condiciones isocráticas, se utilizó la columna Gemini con fases móviles ACN-agua o MeOH-agua en diferentes proporciones y con diversos modificadores de pH en la fracción acuosa (HClO_4 10^{-2} M, $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ 10^{-2} M y buffer acetato 10^{-2} M a pH 4.35).

Los mejores resultados se obtuvieron con una fase móvil MeOH-buffer acetato (10^{-2} M, pH=4.35) 60:40, v/v. En la Fig. V.1 se muestra el cromatograma obtenido. Como puede observarse, en estas condiciones fue posible separar en la columna

Gemini los 10 fármacos ensayados con buena resolución. Sin embargo, el tiempo de análisis fue superior a los 30 minutos y los picos de los compuestos más retenidos se ensancharon considerablemente, lo que conduce a menor exactitud y precisión en la integración del pico y menor sensibilidad en la detección.

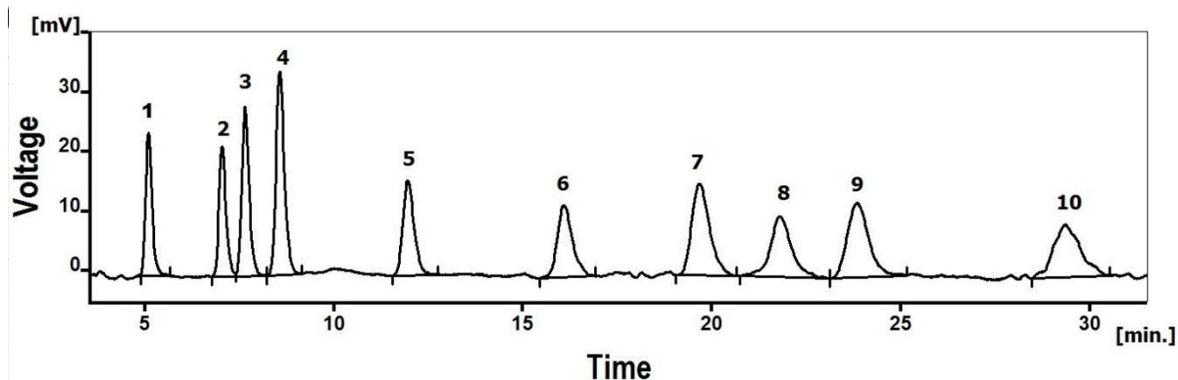


Fig. V.1. Separación de 10 fármacos por cromatografía en fase reversa en modo isocrático. Columna Gemini C-18, fase móvil MeOH-buffer acetato (10^{-2} M, pH=4.35) 60:40, v/v. Solutos: (1) piroxicam, (2) KET, (3) fenilbutazona, (4) NIM, (5) NAP, (6) ACE, (7) FLU, (8) DIC, (9) IND, (10) IBU.

Posteriormente se optó por trabajar en modo gradiente de elución para reducir el tiempo de la corrida cromatográfica y disminuir el ensanchamiento de los picos más retenidos. La columna empleada en los ensayos isocráticos empezó a tener problemas de alta presión debido a la compactación del empaque después de un largo tiempo de uso. Por tal motivo, los siguientes experimentos se realizaron con una nueva columna de características similares, la Eurospher II. Con esta columna se probaron diferentes programas de gradiente con fases móviles acetonitrilo-agua y metanol-agua, variando el pH de la fracción acuosa así como la velocidad de flujo de la fase móvil. Sin embargo, no fue posible lograr una buena separación de los 10 fármacos, ya que la resolución del par fenilbutazona-nimesulida fue insuficiente en todas las condiciones probadas. A manera de ejemplo, en la Figura V.2 se muestra el cromatograma de una de las mejores separaciones lograda en estos ensayos.

Debido a la escasa resolución entre los fármacos fenilbutazona y nimesulida, se decidió reducir el grupo en estudio descartando a la fenilbutazona. Por otra parte, la Fig. V.2 también muestra una fuerte deformación del pico de piroxicam que eluye al inicio del cromatograma. Esto se atribuye a que el estándar inyectado está disuelto en metanol, que es un disolvente fuerte con respecto a la fase reversa. Aunque es sabido que la inyección de una muestra en un disolvente fuerte provoca la dispersión de las bandas de los solutos poco retenidos, esta condición era necesaria porque en el proceso de microextracción se obtiene un extracto de los solutos disueltos en dodecanol. Dicho extracto se analiza inyectándolo directamente en el cromatógrafo, o bien diluyéndolo un poco con metanol antes de inyectarlo, ya que no es miscible en agua. En ensayos que se detallarán posteriormente se comprobó que la extracción del piroxicam a partir de medios acuosos era muy poco favorable (recuperación sumamente baja), por lo que este soluto también fue descartado.

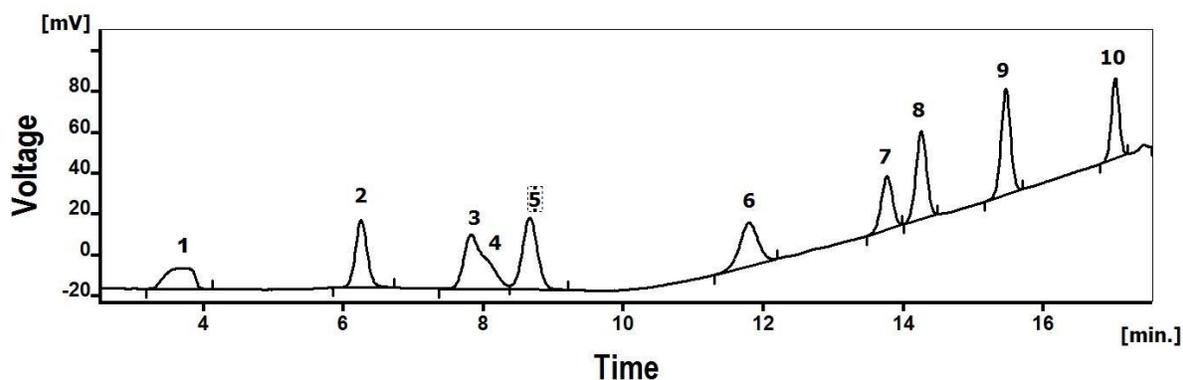


Fig. V.2. Separación de 10 fármacos por cromatografía en fase reversa con gradiente de elución. Columna Eurospher II, fase A: MeOH-buffer acetato (10^{-2} M, pH=4.35) 20:80, v/v, fase B: MeOH-buffer acetato (10^{-2} M, pH=4.35) 90:10, v/v, programa: 0 min-60% B, 8 min-60% B, 15 min-90% B, 20 min-100% B. Solutos: (1) piroxicam, (2) KET, (3) fenilbutazona y NIM, (4) NAP, (5) ACE, (6) FLU, (7) DIC, (8) IND, (9) IBU.

Finalmente, el grupo de fármacos seleccionados para el presente estudio quedó integrado por 8 compuestos. La Figura V.3. muestra el cromatograma obtenido con las fases móviles y el programa de gradiente óptimos, descritos en la parte experimental. Como puede observarse, con estas condiciones se logra la

separación de los 8 fármacos con buena resolución en un tiempo ligeramente menor a 13 minutos. Todos los picos son más o menos simétricos y tienen aproximadamente la misma anchura, lo que conlleva a una buena sensibilidad y precisión en los análisis. Por lo tanto, estas condiciones se utilizaron en todos los experimentos posteriores.

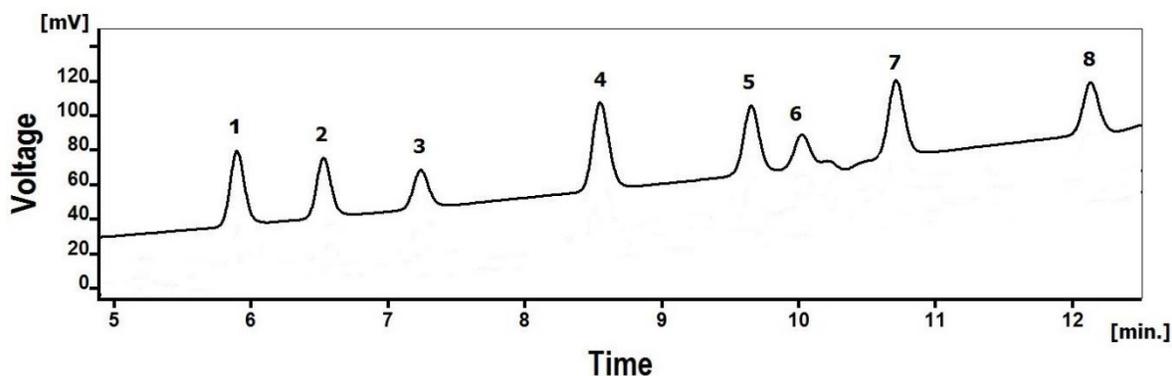


Fig. V.3. Separación de los 8 fármacos seleccionados por cromatografía en fase reversa con gradiente de elución. Columna Eurospher II, fase A MeOH-buffer acetato (10^{-2} M, pH=4.35) 20:80, v/v, fase B MeOH-buffer acetato (10^{-2} M, pH=4.35) 90:10, v/v, programa: 0 min-60% B, 15 min-100% B, flujo: 1 mL/min, temperatura: 30 °C, detección UV a 215 nm. Solutos: (1) KET, (2) NIM, (3) NAP, (4) ACE, (5) FLU, (6) DIC, (7) IND, (8) IBU.

Una vez establecidas las condiciones de separación, se programaron barridos de longitud de onda a los tiempos de retención de los picos de interés. En el Anexo A1 se muestran los espectros de absorbancia obtenidos para los 8 fármacos durante la corrida cromatográfica, es decir en presencia de la fase móvil en la que está disuelto cada uno de ellos al momento de su elución. En la Tabla V.1 se muestran las longitudes de onda correspondientes a los máximos y mínimos de absorbancia más importantes reportados por el detector UV/DAD para los picos que eluyeron en los tiempos programados.

Tabla V.1. Longitudes de onda de los máximos y mínimos de absorbancia a los tiempos de elución de los fármacos.

Fármacos	Tiempo de retención (min)	Máximos* (nm)	Mínimos (nm)
KET	6.03	<u>202</u>, 260	235
NIM	6.71	<u>201</u>, 301	266
NAP	7.40	200, <u>230</u> , 273	205, 256, 296
ACE	8.50	<u>201</u> , 262, 320	243, 305
FLU	9.74	<u>201</u> , <u>249</u>	227, 308
DIC	10.09	<u>196</u> , <u>227</u>	251
IND	10.82	<u>200</u> , <u>263</u> , 319	251, 305
IBU	12.25	<u>197</u> , 265	251

* Máximo principal subrayado y en negritas, máximo secundario en negritas si su absorbancia es importante (ver espectros en Anexo A.1).

Aunque todos los fármacos muestran alta absorbancia a 200 nm, e incluso la mayoría de ellos tienen su máximo principal cerca de esta longitud de onda, fue necesario trabajar a longitudes de onda mayores para evitar una fuerte deriva de la línea base. En efecto, entre más baja es la longitud de onda, mayor es la absorbancia (y la diferencia de absorbancia) de los componentes de la fase móvil, lo que causa que la línea base derive de manera muy notable cuando se utiliza un gradiente de elución en la separación cromatográfica. Con base en los datos de la tabla anterior, se ensayó un programa de cambio de longitud de onda durante la corrida cromatográfica iniciando a 215 nm, cambiando a 230 nm durante la elución del pico del naproxeno y regresando de nuevo a 215 nm hasta finalizar la corrida. Con estas condiciones se logró un aumento considerable en el tamaño del pico del naproxeno, sin embargo, debido a que la nimesulida y el naproxeno eluyen cercanos, pequeñas variaciones en los tiempos de retención de una inyección a otra provocaban que se cortara parte del área de alguno de estos picos por el cambio de longitud de onda. Para evitar este riesgo se decidió mantener la longitud de onda de detección constante a un valor de 215 nm, que es el mejor

compromiso para controlar la línea base y obtener buena respuesta de todos los compuestos.

V.2. Optimización de la técnica de microextracción

La microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica (DLLME-SFO) es una técnica novedosa de preparación de muestra, perteneciente al grupo de técnicas conocidas como microextracción en fase líquida (LPME). La DLLME-SFO ha sido aplicada previamente por nuestro grupo de investigación para la extracción de algunos contaminantes orgánicos típicos a partir de matrices acuosas [53,59]; con el presente trabajo se pretende explorar la posibilidad de aplicación de la técnica en la extracción de compuestos con propiedades farmacológicas. En la primera parte del estudio, los fármacos seleccionados se extrajeron de muestras de agua fortificada, variando algunos parámetros experimentales de la técnica con el fin de establecer un protocolo de extracción simple, rápido y robusto, con la mejor recuperación posible de los analitos. Una vez determinadas las condiciones óptimas, el método analítico, conformado por la extracción, preconcentración y análisis cromatográfico de los fármacos, fue validado para evaluar su precisión, linealidad y límites de detección y cuantificación en una matriz acuosa “limpia” (agua grado reactivo fortificada). Posteriormente, el método se aplicó para la extracción de los solutos a partir de una muestra biológica.

V.2.1. Condiciones iniciales y ensayos preliminares

Para este estudio se partió inicialmente de las condiciones establecidas en trabajos anteriores del grupo de investigación, se buscó adecuar y optimizar los parámetros experimentales críticos de la DLLME-SFO con el fin de obtener un buen recobro de los fármacos de interés, simplificando lo más posible el procedimiento de microextracción. Las condiciones iniciales de trabajo fueron las siguientes [59]:

Volumen de muestra acuosa: 10 mL, ajustada a pH ~2.

Cantidad de NaCl agregado en la fase acuosa: 0.050 g.

Volumen de mezcla de extracción: 300 μ L.

Composición de la mezcla de extracción: dodecanol-metanol 1:2, v/v.

Tiempo de extracción: 3 min

Condiciones durante el tiempo de extracción: inmersión en baño de agua a 40 °C sometido a radiación por ultrasonido (US).

Separación de fases: inducida por centrifugación a 4500 rpm durante 10 min.

Solidificación de la gota orgánica flotante: baño de hielo durante ~2 min.

Reconstitución del extracto: la gota sólida se disuelve con metanol y se lleva a volumen en un tubo aforado de 1 mL, con metanol previo a su análisis por CLAR/UV

Estas condiciones se emplearon para realizar pruebas preliminares de recuperación de los 10 fármacos inicialmente contemplados en este trabajo, con el objeto de determinar si la DLLME-SFO podía ser aplicada para la extracción de estos solutos polares a partir de medios acuosos. Debido a los problemas mencionados anteriormente en lo que respecta a la separación cromatográfica de los 10 solutos, se hicieron dos conjuntos de ensayos. En el primero, las muestras fueron fortificadas sólo con los fármacos piroxicam y fenilbutazona; el análisis del extracto se efectuó por cromatografía en fase reversa bajo condiciones isocráticas con una fase móvil metanol-agua (HClO_4 10^{-2} M) 70:30 (v/v) a flujo de 1 mL/min, temperatura de la columna 30 °C y detección UV a 215 nm. El segundo conjunto de ensayos se realizó fortificando las muestras con los 8 fármacos restantes y analizando el extracto bajo las condiciones cromatográficas descritas en la parte experimental (sección IV.3.1). En la Tabla V.2 se reportan las recuperaciones promedio obtenidas en la extracción y análisis de cuatro réplicas para los dos grupos de solutos.

Tabla V.2. Ensayos preliminares de microextracción. Recuperación promedio con las condiciones iniciales de la DLLME-SFO (n = 4).

Fármaco	Concentración en fase acuosa (ppb)	% Recuperación (\pm 1D.E. *)
Piroxicam	505	15.4 \pm 1.3
Fenilbutazona	830	83.2 \pm 1.6
KET	396	77.0 \pm 3.5
NIM	432	57.5 \pm 1.0
NAP	141	80.2 \pm 3.1
ACE	440	87.7 \pm 2.5
FLU	432	91.9 \pm 4.5
DIC	200	91.7 \pm 3.0
IND	400	91.6 \pm 3.7
IBU	456	95.2 \pm 4.6

* D.E. = desviación estándar.

Los resultados obtenidos en estos primeros ensayos muestran claramente que la técnica de microextracción no es apta para extraer un soluto tan polar e hidrofílico como lo es el piroxicam. Los demás solutos se extraen razonablemente bien, siendo la nimesulida la que se extrae en menor proporción (<60%). No obstante, una recuperación absoluta de este nivel puede considerarse aceptable si se demuestra que es precisa y constante en el intervalo de concentraciones de interés, y si permite alcanzar la sensibilidad deseada en los análisis. Con base en estos resultados se decidió descartar al piroxicam. Por otra parte, como se mencionó anteriormente, la fenilbutazona fue también descartada porque no se logró separar suficientemente de la nimesulida. De esta manera, el grupo en estudio quedó reducido a 8 fármacos, para los cuales se buscó optimizar el proceso de extracción. En las siguientes secciones se describen los resultados obtenidos al variar algunos parámetros de la técnica de microextracción. Todos los

ensayos se realizaron utilizando como muestra la solución de trabajo 1 y, como referencia para el cálculo de recuperaciones, un estándar metanólico de los fármacos; las concentraciones correspondientes están indicadas en la Tabla IV.1.

Para los cálculos de recuperación se utilizó la siguiente serie de ecuaciones (Ec. V.1-V.4):

Concentración del fármaco en el extracto (C_{ext})

$$C_{ext} = (A_{ext} / A_{std}) \times C_{std} \quad (\text{Ec. V.1})$$

Donde: A_{ext} es el área del pico del fármaco en cuestión en el cromatograma obtenido del análisis del extracto, A_{std} es el área del pico del mismo fármaco en el cromatograma obtenido del análisis del estándar y C_{std} es la concentración del fármaco en dicho estándar.

Cantidad de fármaco recuperado (Q_{rec})

$$Q_{rec} = C_{ext} \times V_{ext} \quad (\text{Ec. V.2})$$

Donde: V_{ext} es el volumen de extracto. En los ensayos de optimización de la técnica este volumen fue de 1 mL, ya que la gota de extracto recuperada se diluyó a dicho volumen; posteriormente, este volumen se midió en cada experimento.

Cantidad de fármaco adicionado (Q_{ad})

$$Q_{ad} = C_m \times V_m \quad (\text{Ec. V.3})$$

Donde: C_m es la concentración del fármaco en la muestra acuosa fortificada (concentración adicionada) y V_m es el volumen de muestra acuosa (en todos los casos 10 mL).

Por ciento de recuperación del fármaco (%R)

$$\%R = (Q_{rec} / Q_{ad}) \times 100 \quad (\text{Ec. V.4})$$

V.2.2. Volumen de mezcla de extracción

El volumen de la mezcla de extracción (dodecanol-metanol 1:2, v/v) que se inyecta en la muestra acuosa para generar una microemulsión puede tener diversos efectos en el proceso de extracción y preconcentración de los solutos. Por una parte, este volumen incide directamente sobre la relación de fases (volumen de fase orgánica extractante / volumen de fase acuosa) afectando el rendimiento de extracción (ecuación V.5).

$$\%R = [(K_D \times \varphi) / (K_D \times \varphi + 1)] \times 100 \quad (\text{Ec V.5})$$

Donde: %R es el rendimiento de extracción (se asimilará al porcentaje de recuperación de los solutos en el extracto analizado), K_D es la constante de reparto y φ es la relación de fases. Desde este punto de vista, un mayor volumen de mezcla de extracción significa mayor volumen de extractante (dodecanol) lo que debería favorecer la recuperación de los solutos. Sin embargo, también aumenta la cantidad de metanol añadido en la fase acuosa, lo que a su vez puede provocar un incremento en la solubilidad de los solutos en esta fase y menor tendencia de éstos a ser extraídos.

Por otra parte, al aumentar el volumen del extractante disminuye el factor de preconcentración y con ello la sensibilidad en el análisis pues los solutos extraídos estarán más diluidos en la fase orgánica recuperada. No obstante, este último factor no fue tomado en cuenta en los ensayos iniciales, ya que en todos estos experimentos el extracto sólido recuperado se diluyó siempre a 1 mL para disminuir la incertidumbre debida a la variabilidad de volumen del extracto fundido. Con base en la discusión anterior y debido a que los fármacos en estudio son compuestos polares, se consideró de interés determinar si una disminución en la cantidad de mezcla extractante, y por lo tanto en el contenido de metanol en fase acuosa, resultaba favorable o desfavorable para la extracción de estos solutos. En la Figura V.4 se muestran los resultados de recuperación de los 8 fármacos al variar el volumen de mezcla de extracción en el intervalo de 100 a 300 μL .

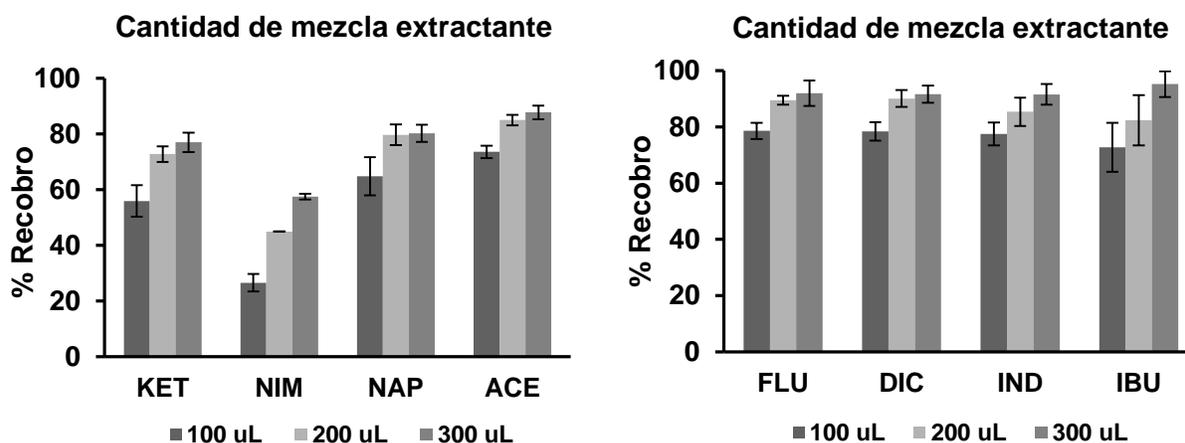


Fig. V.4. Efecto del volumen de mezcla extractante sobre la recuperación de los fármacos. Muestras de agua grado reactivo (10 mL) fortificadas y con adición de NaCl (50 mg); mezcla de extracción: dodecanol-MeOH 1:2, v/v; condiciones de extracción: 3 min a 40 °C con agitación por ultrasonido. Las barras de error representan ± 1 D.E. (n = 3 o 4).

La figura anterior muestra una clara disminución en la recuperación de los fármacos al disminuir el volumen de la mezcla de extracción. Este efecto es más notable en el caso de los solutos más polares, lo que no es de extrañar ya que la relación de fases tiene un impacto más importante en el rendimiento de extracción cuando la constante de reparto es más pequeña. En los ensayos realizados las cantidades de extractante (dodecanol) y dispersante (MeOH), y la relación de fases (φ) considerando 10 mL de muestra acuosa, fueron las siguientes:

100 μ L de mezcla: 33.3 μ L dodecanol, 66.6 μ L MeOH, $\varphi = 3.33 \times 10^{-3}$

200 μ L de mezcla: 66.6 μ L dodecanol, 33.3 μ L MeOH, $\varphi = 6.66 \times 10^{-3}$

300 μ L de mezcla: 100 μ L dodecanol, 200 μ L MeOH, $\varphi = 1.00 \times 10^{-2}$

Por otra parte, en la Fig. V.4 también se observa una mayor dispersión de resultados cuando el volumen añadido de mezcla de extracción es el más bajo, lo cual fue probablemente debido a la mayor dificultad que se tiene para recoger en forma cuantitativa la gota de extracto solidificado cuando ésta es muy pequeña. Por lo tanto, se decidió mantener el volumen de mezcla de extracción en 300 μ L para asegurar recuperaciones más altas y menos variables.

V.2.3. Condiciones durante el tiempo de extracción

En los experimentos de las secciones anteriores, una vez generada la microemulsión, el tubo con la muestra se colocaba en un baño de agua a 40 °C y se sometía a radiación por ultrasonido (US) durante 3 min, después se procedía a inducir la separación de fases por centrifugación. Con el fin de determinar si estas condiciones tenían algún efecto sobre la recuperación de los fármacos se realizaron dos ensayos adicionales. En el primero se eliminó el sonicado dejando los tubos de muestra únicamente reposando en el baño de agua a 40 °C durante 3 min. En el segundo ensayo se eliminó también el baño de agua y los tubos se dejaron reposando a temperatura ambiente (TA) durante 3 min. En la Figura V.5 se muestran los resultados obtenidos en estos ensayos.

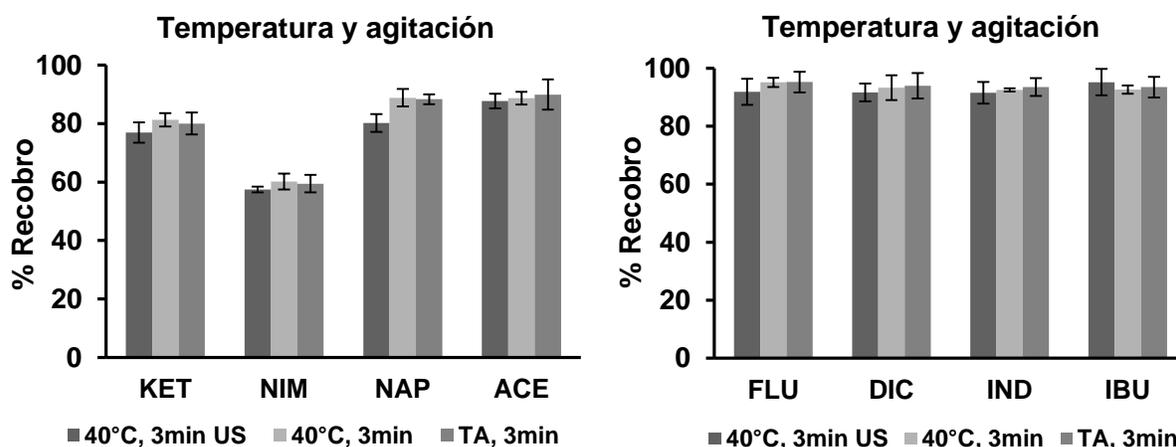


Fig V.5. Efecto de las condiciones de extracción sobre la recuperación de los fármacos. Muestras de agua grado reactivo (10 mL) fortificadas y con adición de NaCl (50 mg); mezcla de extracción: 300 μ L (dodecanol-MeOH 1:2, v/v). Las barras de error representan \pm 1D.E. (n=4).

De acuerdo con lo mostrado en la figura anterior se puede decir que no existe una diferencia significativa en la recuperación de ninguno de los fármacos al variar las condiciones de extracción. De hecho, tampoco se observa una tendencia marcada en la dispersión de los resultados obtenidos al variar la temperatura o cambiar la agitación por ultrasonido a un estado de reposo sin ningún tipo de agitación. Puesto que el procedimiento se simplifica eliminando el baño de agua y el

sonicados, los siguientes experimentos se realizaron dejando la muestra en reposo durante 3 min a temperatura ambiente antes de la centrifugación.

Las técnicas de microextracción con dispersión de fase orgánica, como la DLLME y la DLLME-SFO, se caracterizan por alcanzar el equilibrio de reparto entre las fases muy rápidamente. Como se ha comprobado en trabajos anteriores del grupo de investigación [53,59], y en otros trabajos publicados [51,52,54-57,60,61], un tiempo de extracción de 3 min es largamente suficiente para alcanzar el estado de equilibrio. Por ello, se consideró innecesario realizar ensayos adicionales modificando este parámetro.

V.2.4. Variación del agente dispersante manteniendo constante al extractante

La mezcla de extracción está conformada por dodecanol que actúa como extractante y metanol que actúa como dispersante. En ensayos anteriores (sección V.2.2) se comprobó que al reducir el volumen de mezcla de extracción agregada a la muestra disminuía significativamente el rendimiento de extracción, debido muy probablemente a la disminución en la relación de fases. Por lo tanto, en este nuevo conjunto de ensayos se mantuvo constante la cantidad de dodecanol en 100 μL , para mantener la relación de fases en un valor de 0.01, y se varió únicamente la cantidad de metanol en el intervalo de 50 a 400 μL . Esto implica una variación en la relación extractante-dispersante desde 2:1 hasta 1:4 (v/v), así como una variación en el volumen de mezcla extractante inyectada de 150 a 500 μL . En la Figura V.6 se muestran los efectos observados sobre el rendimiento de extracción de los fármacos.

Los resultados obtenidos muestran que la variación de agente dispersante en la mezcla de extracción, y en consecuencia el cambio en la relación extractante-dispersante, tienen poco efecto sobre la recuperación de los solutos en el intervalo de condiciones estudiado. Esto significa que la presencia de hasta 5% (v/v) de MeOH en la fase acuosa (donde 100 μL provienen de la fortificación), no altera significativamente el rendimiento de extracción de los fármacos. Por otra parte,

cuando la proporción de metanol en la mezcla de extracción es muy baja, la solución resultante es viscosa y difícil de manejar; por el contrario, con un exceso de metanol la mezcla es más fluida pero su volumen aumenta, dificultando su inyección rápida y continua en la fase acuosa. Con base en estos resultados y considerando la mayor conveniencia experimental, se decidió mantener una relación extractante-dispersante 1:2 (v/v), con 100 μ L de dodecanol y 200 μ L de metanol, como condición definitiva para la DLLME-SFO.

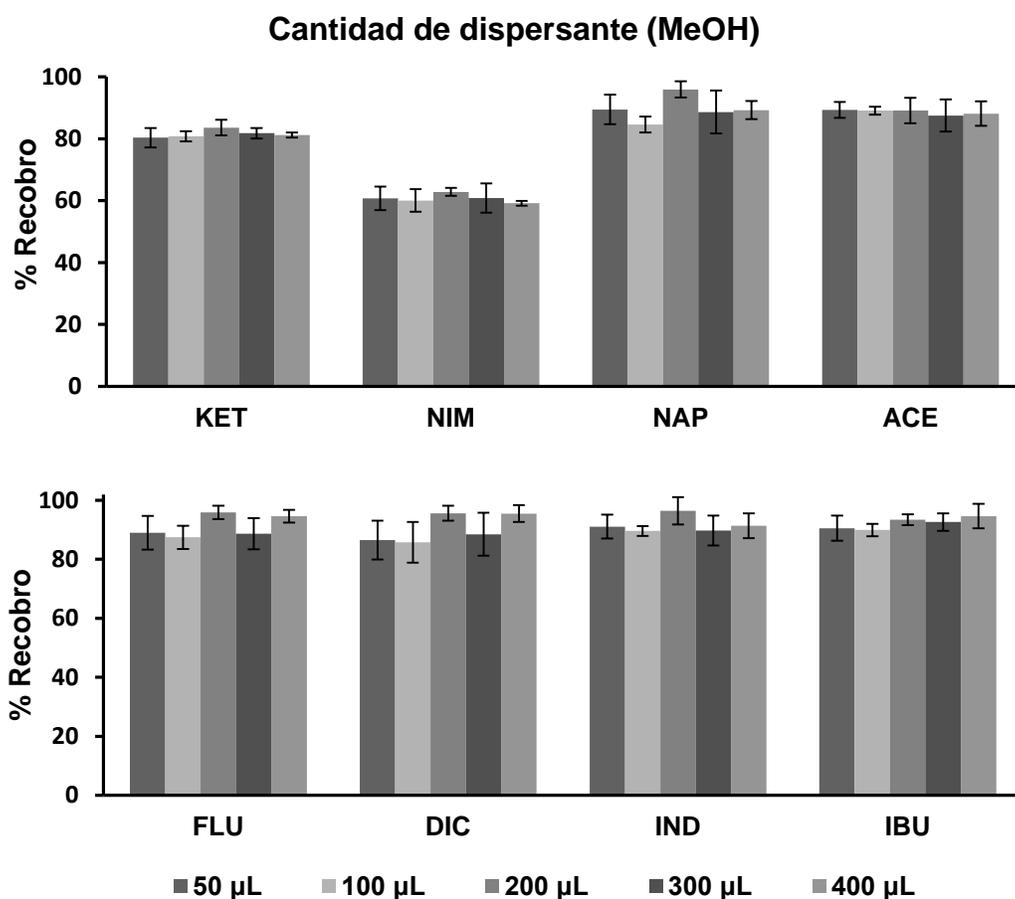


Fig V.6. Efecto del volumen de dispersante sobre la recuperación de los fármacos. Muestras de agua grado reactivo (10 mL) fortificadas y con adición de NaCl (50 mg). Extractante: dodecanol 100 μ L; relación extractante-dispersante: 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, y 1:4, v/v, para 50, 100, 200, 300 y 400 μ L de MeOH, respectivamente; condiciones de extracción: 3 min en reposo a TA. Las barras de error representan \pm 1D.E. (n = 3 o 4).

V.2.5. Cantidad de NaCl agregado a la fase acuosa

La adición de NaCl a la muestra acuosa modifica la fuerza iónica del medio y, en consecuencia, tiene un fuerte impacto sobre la actividad de los solutos iónicos. En nuestro caso la muestra acuosa está ajustada a un pH de aproximadamente 2, por lo que todos los fármacos estudiados se encuentran en su forma molecular. Sin embargo, la presencia de un electrolito fuerte a concentración relativamente elevada disminuye la cantidad de “agua libre” disponible para disolver a los solutos, lo que puede ocasionar una disminución de su solubilidad en el medio acuoso promoviendo un mayor reparto hacia la fase orgánica (efecto conocido como “salting out”).

En la literatura se encuentran reportes muy variados sobre el efecto de la sal en la extracción de solutos moleculares; en algunos artículos se proclama un aumento en el rendimiento de extracción, mientras que en otros se reporta un efecto adverso, o bien, nulo.

Considerando lo anterior, se decidió estudiar el efecto de este parámetro en la extracción de los fármacos seleccionados. Se realizaron una serie de ensayos variando la concentración de NaCl en la fase acuosa de 0-5% p/v (0-0.85 M), es decir, añadiendo 0-0.50 g de sal en los 10 mL de muestra. En la figura V.7 se muestran los resultados de recuperación obtenidos.

Como muestra la figura V.7, el rendimiento de extracción de los fármacos es poco afectado por la presencia de sal en el intervalo de concentraciones estudiado. Sin embargo, se observó que este parámetro sí tiene cierta influencia en el comportamiento del sistema de extracción. En ausencia de sal se dificulta la completa agregación y separación de fases durante el paso de centrifugación, quedando adheridas algunas gotas de dodecanol en las paredes del tubo de muestra. Por el contrario, a la más alta concentración de NaCl (5%, p/v), la gota de extracto solidificado tiene una débil consistencia y se quiebra fácilmente al tratar de recuperarla. Con 100 y 300 mg de sal añadida, el dodecanol se separa cuantitativamente de la fase acuosa y la gota solidificada es compacta y se colecta

con facilidad. Por lo tanto, tomando en cuenta la conveniencia experimental, se decidió añadir 300 mg de NaCl en la fase acuosa (3%, p/v, o 0.51 M) para todos los siguientes experimentos.

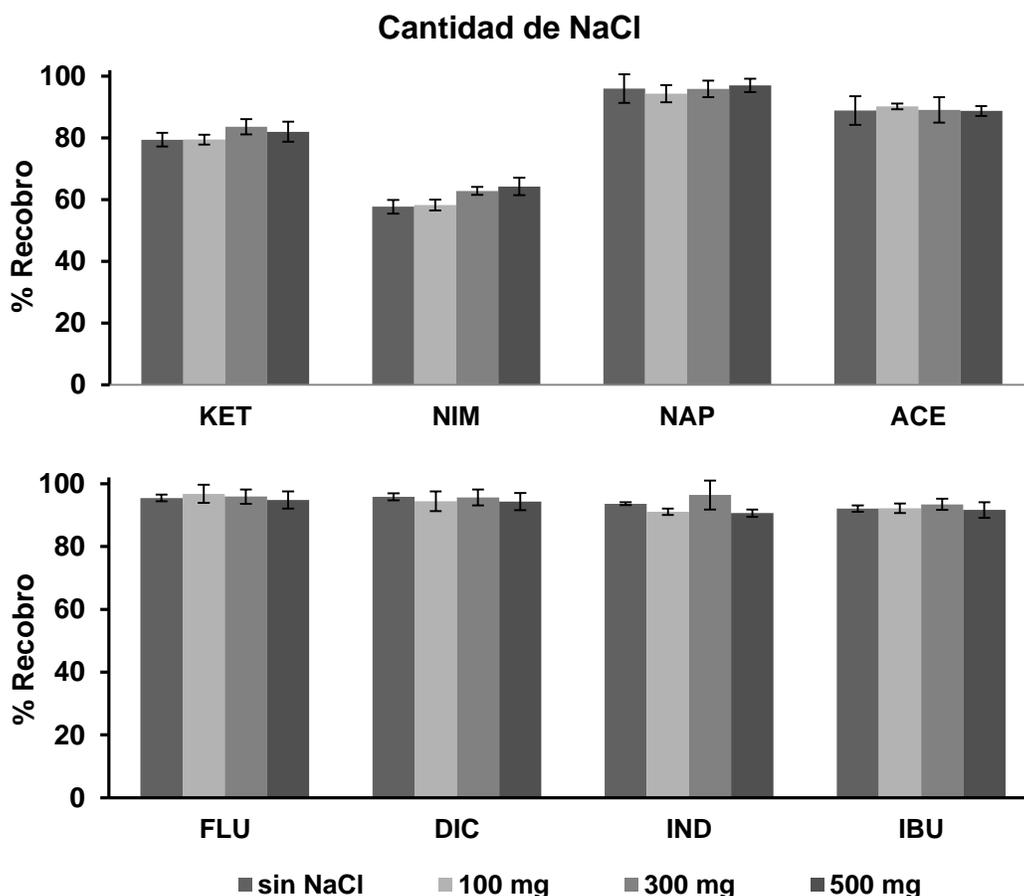


Fig V.7. Efecto de la cantidad de NaCl en la muestra acuosa sobre la recuperación de los fármacos. Muestras de agua grado reactivo (10 mL) fortificadas; mezcla de extracción: 300 μ L (dodecanol-MeOH 1:2, v/v); condiciones de extracción: 3 min en reposo a TA. Las barras de error representan \pm 1D.E. (n=4).

V.2.6. Condiciones finales para la extracción de fármacos por DLLME-SFO

Después de haber ensayado diferentes condiciones de trabajo, variando algunos parámetros de la técnica de microextracción, se logró desarrollar un protocolo experimental más simple y rápido, con las mejores recuperaciones posibles para los fármacos seleccionados. Adicionalmente, con el objeto de alcanzar un factor

de preconcentración más alto para los analitos, se decidió suprimir la dilución del extracto final e inyectar directamente éste en el cromatógrafo.

El procedimiento detallado se describió en la parte experimental (sección IV.3.3.1), a continuación se presenta en forma resumida una lista de las condiciones finalmente adoptadas.

Volumen de muestra acuosa: 10 mL, ajustada a pH ~2.

Cantidad de NaCl agregado en la fase acuosa: 300 mg

Volumen de mezcla de extracción: 300 μ L.

Composición de la mezcla de extracción: dodecanol-metanol 1:2, v/v.

Tiempo de extracción: 3 min

Condiciones durante el tiempo de extracción: reposo a temperatura ambiente.

Separación de fases: inducida por centrifugación a 4500 rpm durante 10 min.

Solidificación de la gota orgánica flotante: baño de hielo durante ~2 min.

Tratamiento del extracto: la gota sólida se transfiere a un vial donde funde a temperatura ambiente, se mide el volumen del líquido con una microjeringa y una alícuota de éste se analiza por CLAR/UV.

Tiempo total de preparación de muestra por DLLME-SFO: < 25 min

Es importante puntualizar que este procedimiento es tan sencillo que permite la preparación simultánea de varias muestras (hasta 12 o 16 dependiendo de la capacidad de la centrífuga). Por lo tanto, el tiempo de análisis de una muestra queda determinado realmente por el análisis cromatográfico del extracto y el(los) estándar(es) externo(s).

Las condiciones arriba mencionadas forman parte integral del método analítico que se propone en este trabajo para la extracción, preconcentración y determinación de fármacos en matrices acuosas. Dependiendo de la complejidad y características de la muestra en cuestión, podría ser necesario incluir algunos pasos extra de tratamiento antes de la microextracción, como filtración, centrifugación, dilución, etc.

V.3. Validación del método para la extracción y determinación de 8 fármacos en muestras acuosas.

A diferencia de los ensayos anteriores, la validación del método desarrollado se realizó con disoluciones más diluidas de los fármacos (muestras acuosas) ya que, al eliminar la dilución del extracto, el factor de preconcentración aumenta aproximadamente 10 veces. Asimismo, se utilizaron como estándares externos disoluciones de los fármacos en dodecanol, de modo a tener la misma matriz en la referencia y en los extractos. Algunos experimentos de prueba mostraron que el ensanchamiento y forma de los picos no es idéntico cuando se inyectan en el cromatógrafo soluciones de estos solutos en dodecanol o en metanol.

V.3.1. Precisión del método (repetibilidad)

Para este estudio se utilizó como muestra la solución de trabajo 2 y su estándar correspondiente en dodecanol; las concentraciones de ambos están indicadas en la Tabla IV.1. Se realizaron 14 réplicas de extracción y determinación de los fármacos en dicha muestra utilizando la metodología desarrollada. Para cada réplica se midió el volumen del extracto fundido obtenido al final de la microextracción, los datos correspondientes fueron los siguientes:

Volumen promedio del extracto orgánico = 100.2 μL (n=14)

Desviación estándar = 1.5 μL

Coefficiente de variación = 1.5%

Estos datos indican que las condiciones de extracción establecidas permiten recuperar prácticamente todo el dodecanol que fue inyectado en la fase acuosa y que la medición del volumen de extracto con una microjeringa es aceptablemente precisa. En la Tabla V.3 se reporta la recuperación promedio de los fármacos con su desviación estándar (D.E.) y coeficiente de variación (%CV).

Si se compara la Tabla V.3 con la Tabla V.2 se observa que la recuperación de los solutos y la variabilidad de recuperación en ensayos replicados no cambiaron

significativamente al usar las condiciones iniciales y las condiciones finales en el proceso de microextracción. Esto se debe a que los parámetros modificados durante los ensayos de optimización de la técnica prácticamente no tuvieron efecto sobre la recuperación, pero sí permitieron simplificar el método. La diferencia más notable entre los dos conjuntos de resultados es la concentración de los solutos en la muestra acuosa. Al eliminar la dilución del extracto se obtuvo una fuerte ganancia en sensibilidad, se mantuvo la recuperación de solutos y la precisión del método semejantes. De hecho, los coeficientes de variación mostrados en la Tabla V.3 son muy satisfactorios para los niveles de concentración trabajados, por lo que se considera que el método desarrollado tiene una buena precisión.

Tabla V.3. Estudio de precisión del método en muestras de agua grado reactivo fortificadas con 8 fármacos a la concentración C_m ($n = 14$).

Fármaco	C_m (ppb)	%R	D.E.	%CV
Ketoprofeno (KET)	39.6	77.9	3.0	3.9
Nimesulida (NIM)	43.2	59.5	2.6	4.3
Naproxeno (NAP)	14.1	82.4	3.6	4.3
Acemetacina (ACE)	44.0	81.5	3.6	4.4
Flurbiprofeno (FLU)	43.2	86.8	3.5	4.0
Diclofenaco (DIC)	20.0	88.3	2.7	3.0
Indometacina (IND)	40.0	87.1	2.6	3.0
Ibuprofeno (IBU)	45.6	87.3	5.2	5.9

V.3.2. Linealidad del método

Para este estudio se prepararon estándares de la mezcla de fármacos a diferentes niveles de concentración, tanto en metanol como en dodecanol. A partir de los estándares metanólicos se prepararon las soluciones de trabajo (muestras), según se indicó en la parte experimental. Los estándares en dodecanol se usaron como

estándares externos para la cuantificación de los compuestos en el análisis cromatográfico de los extractos orgánicos.

Primeramente se verificó la linealidad del sistema, para lo que se analizaron los estándares en dodecanol inyectándolos directamente en el cromatógrafo. En la Tabla V.4 se reportan los parámetros estadísticos obtenidos al aplicar el análisis de regresión lineal, por el método de mínimos cuadrados, a los datos de *Área vs Concentración*. Como se muestra en la tabla, todos los coeficientes de determinación son ≥ 0.99 , indicando que la respuesta analítica es directamente proporcional a la concentración de la solución inyectada en el intervalo de concentraciones estudiado para cada soluto.

Tabla V.4. Linealidad del sistema: Parámetros estadísticos de la regresión lineal para las gráficas *Área vs Concentración* de los estándares.

Fármaco	Intervalo de concentración (ppm)	r^2 *	Ordenada (D.E.)	Pendiente (D.E.)
KET	0.396 – 28.5	0.9983	19.7 (6.3)	64.8 (0.6)
NIM	0.432 – 31.1	0.9997	-3.58 (2.2)	54.8 (0.2)
NAP	0.141 – 10.1	0.9996	0.65 (1.8)	117.4 (0.5)
ACE	0.440 – 33.7	0.9948	12.8 (11.7)	65.7 (1.0)
FLU	0.432 – 8.64	0.9995	15.5 (3.8)	57.9 (0.3)
DIC	0.200 – 3.00	0.9996	-1.7 (3.2)	75.4 (0.3)
IND	0.400 – 8.00	0.9989	9.7 (5.8)	75.9 (0.5)
IBU	0.456 – 9.12	0.9976	33.3 (6.8)	34.8 (0.5)

* r^2 = coeficiente de determinación

En el caso del ibuprofeno, que eluye al final del cromatograma, se presentó un problema de interferencia debido a un “pico de gradiente” contiguo, lo que ocasionó cierta incertidumbre en la medida del área del pico de interés, Por ello, su ordenada al origen es relativamente alta; no obstante, el área de pico para la concentración más baja de este soluto fue de 55.6, muy por encima del valor de la

ordenada al origen. Los picos de gradiente son señales que suelen aparecer hacia el final de los cromatogramas cuando se trabaja por este modo de elución. En general estas señales son pequeñas pero su tamaño aumenta a medida que la sensibilidad de detección es mayor y la longitud de onda de trabajo más baja.

Una vez comprobada la linealidad del sistema, se realizó el estudio de linealidad del método. En la Tabla V.5 se indican las concentraciones de cada fármaco en las muestras de agua fortificada usadas en este estudio. Estas muestras se trataron y analizaron según el método desarrollado, con 3 o 4 réplicas para cada nivel de concentración. En todos los experimentos se midió el volumen de extracto obtenido al final de la microextracción con el fin de determinar la recuperación de los solutos. El valor promedio de la gota de extracto fue de 105 μL con una desviación estándar de 3.5 μL ($n=34$), lo que corrobora que el disolvente de extracción (dodecanol) se recupera totalmente, aunque es posible que una muy pequeña cantidad del metanol presente en el sistema (añadido como agente dispersante) quede disuelto en la fase orgánica, dando como resultado un volumen de extracto ligeramente mayor a los 100 μL de dodecanol adicionados.

Tabla V.5. Concentraciones de los fármacos en las muestras para el estudio de linealidad.

Fármaco	Niveles de concentración (ppb)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
KET	3.96	7.92	9.9	11.9	19.8	29.7	39.6	59.4	79.2
NIM	4.32	8.64	10.8	13.0	21.6	32.4	43.2	64.8	86.4
NAP	1.41	2.82	3.52	4.22	7.04	10.6	14.1	21.1	28.2
ACE	4.40	8.80	11.0	13.2	22.0	33.0	44.0	66.0	88.0
FLU	4.32	8.64	10.8	13.0	21.6	32.4	43.2	64.8	86.4
DIC	2.00	4.00	5.00	6.00	10.0	15.0	20.0	30.0	40.0
IND	4.00	8.00	10.0	12.0	20.0	30.0	40.0	60.0	80.0
IBU	4.56	9.12	11.4	13.7	22.8	34.2	45.6	68.4	91.2

Con los datos de área de pico obtenidos en el análisis de las muestras y el área y concentración de sus correspondientes estándares externos, así como los volúmenes de los extractos, se calculó la cantidad recuperada de cada soluto a los diferentes niveles de concentración (Ec. V1-V.3) y se trazaron las gráficas de *Cantidad Recuperada vs Cantidad Adicionada*. Los parámetros estadísticos de las rectas de regresión obtenidas por el método de mínimos cuadrados se reportan en la Tabla V.6 y las gráficas para cada soluto se presentan en el Anexo A.2. Como se muestra en la tabla, los coeficientes de determinación fueron mayores a 0.99 para todos los solutos, lo que confirma la linealidad del método y demuestra que la recuperación de los fármacos es constante en el intervalo de concentraciones estudiado.

Tabla V.6. Linealidad del método: Parámetros estadísticos de la regresión lineal para las gráficas de *Cantidad Recuperada vs Cantidad Adicionada*.

Fármaco	Intervalo C _m (ppb)	r ² *	Ordenada al origen (D.E.)**	Pendiente×100 (D.E.×100)
KET	3.96 – 79.2	0.997	0.12 (3.1)	79.7 (0.8)
NIM	4.32 – 86.4	0.996	0.29 (3.3)	63.0 (0.8)
NAP	1.41 – 28.2	0.996	0.99 (1.3)	86.6 (1.0)
ACE	4.40 – 88.0	0.996	-6.0 (5.0)	90.8 (1.1)
FLU	4.32 – 86.4	0.993	1.27 (6.4)	93.9 (1.4)
DIC	2.00 – 30.0	0.994	1.04 (2.3)	89.1 (1.5)
IND	4.00 – 80.0	0.999	2.02 (2.5)	89.5 (0.6)
IBU	4.56 – 91.2	0.992	-1.24 (10.1)	91.7 (1.9)

* r² = coeficiente de determinación

** (ng)

La ordenada y la pendiente de las rectas de *Cantidad Adicionada vs Cantidad Recuperada* son indicadores importantes de las características del método. Una ordenada al origen estadísticamente igual a cero significa que el método no presenta errores sistemáticos. Por otra parte, la pendiente multiplicada por cien representa la recuperación promedio del analito en el intervalo de concentraciones

estudiado. A partir de los valores de la tabla para la ordenada al origen y su desviación estándar, se puede afirmar que el método desarrollado no presenta errores sistemáticos. Adicionalmente se observa que las recuperaciones promedio son mayores al 79% para todos los fármacos, con excepción de la nimesulida cuya recuperación es del 63%; estos resultados son similares a los obtenidos en el estudio de repetibilidad, en donde se trabajó a una concentración fija.

Una vez que se ha demostrado que la recuperación de los analitos es constante e independiente de su concentración en la muestra (al menos en el intervalo estudiado), es posible utilizar factores de corrección por recuperación cuando el método se aplica para la determinación de esos compuestos en otras muestras.

Alternativamente, con los datos experimentales obtenidos en el estudio de linealidad se pueden trazar curvas de calibración del tipo: *Concentración en el Extracto vs Concentración en la Muestra* (C_{ext} vs C_m) y utilizar las ecuaciones de regresión correspondientes para determinar la concentración de los fármacos en cualquier otra muestra de interés, a partir de la concentración medida en el respectivo extracto. En este último caso, la corrección por recuperación va implícita en la ecuación de regresión utilizada para el cálculo.

Puesto que en este trabajo ya se tienen las ecuaciones de regresión de las curvas Q_{rec} vs Q_{ad} , basta con hacer algunas sustituciones (Ec. V.2 y V.3) para obtener las ecuaciones de regresión en función de la concentración en el extracto y la concentración en la muestra. En estas sustituciones el volumen de muestra (V_m) es 10 mL y para el volumen de extracto (V_{ext}) se recomienda dejarlo como variable en la ecuación debido a que, en muestras complejas, los componentes de la matriz podrían ocasionar variaciones significativas en este volumen. La medida del volumen de extracto es rápida y sencilla ya que se realiza con la misma microjeringa utilizada para inyectar una porción del extracto en el cromatógrafo. En la Tabla V.7 se enlistan las ecuaciones deducidas para cada fármaco.

Tabla V.7. Ecuaciones de calibración para calcular la concentración de los fármacos en la muestra acuosa a partir de la concentración medida en el extracto y el volumen de extracto.

Fármaco	Intervalo C_m (ppb)	Ecuación de regresión C_{ext} vs C_m
KET	3.96 – 79.2	$C_{ext} = (0.123/V_{ext}) + (7.97/V_{ext}) \times C_m$
NIM	4.32 – 86.4	$C_{ext} = (0.294/V_{ext}) + (6.303/V_{ext}) \times C_m$
NAP	1.41 – 28.2	$C_{ext} = (0.991/V_{ext}) + (8.659/V_{ext}) \times C_m$
ACE	4.40 – 88.0	$C_{ext} = (-6.00/V_{ext}) + (9.080/V_{ext}) \times C_m$
FLU	4.32 – 86.4	$C_{ext} = (1.27/V_{ext}) + (9.388/V_{ext}) \times C_m$
DIC	2.00 – 30.0	$C_{ext} = (1.04/V_{ext}) + (8.914/V_{ext}) \times C_m$
IND	4.00 – 80.0	$C_{ext} = (2.02/V_{ext}) + (8.945/V_{ext}) \times C_m$
IBU	4.56 – 91.2	$C_{ext} = (-1.24/V_{ext}) + (9.167/V_{ext}) \times C_m$

V.3.3. Límites de detección y cuantificación

El límite de detección de un método (LDM) representa la concentración más baja de analito en la muestra que puede ser detectada, pero no forzosamente cuantificada con suficiente precisión y exactitud, cuando se aplica la metodología desarrollada para el análisis de dicha muestra.

Existen diferentes criterios para la determinación del LDM. Por ejemplo, en muchas publicaciones se utiliza el llamado “límite de detección experimental” que considera al LDM como aquella concentración que genera una señal claramente distinguible del ruido de fondo en el cromatograma o cualquier otro tipo de gráfica obtenida del análisis de la muestra; usualmente se toma como criterio una relación señal/ruido igual a 3.

Otra manera más elaborada para determinar el LDM se basa en el uso de la recta de regresión obtenida en el estudio de linealidad del método. El LDM (llamado en

este caso “límite de detección teórico”) se calcula multiplicando la desviación estándar de la ordenada al origen por 3 y dividiéndola entre la pendiente de la recta de regresión. En el presente trabajo, este cálculo da un resultado en nanogramos de analito adicionado a la muestra (Q_{ad}), por lo que es necesario dividir entre el volumen de muestra (10 mL) para obtener el LDM en unidades de concentración (Ec. V.6). Los resultados obtenidos para el límite de detección del método, aplicando la ecuación V.6 a los datos de la Tabla V.6, se presentan en la Tabla V.8.

$$\text{LDM (ppb)} = 3 \times \text{D.E.}_{(\text{ordenada al origen})} / (\text{pendiente} \times 10) \quad (\text{Ec. V.6})$$

El límite de cuantificación de un método (LCM) representa la concentración más baja de analito que puede cuantificarse en una muestra con precisión y exactitud aceptables. Al igual que con el límite de detección, existen diferentes criterios para evaluar el LCM. En este trabajo se utilizó el criterio recomendado por la IUPAC (Ec. V.7) [62]:

$$\text{LCM} = \text{LDM} \times 3.104 \quad (\text{Ec. V.7})$$

El límite de cuantificación del método, en muestras de agua grado reactivo fortificadas con los fármacos estudiados, se reporta en la Tabla V.8. Es importante mencionar que los límites de detección y cuantificación de un método no son valores fijos, sino que dependen de la matriz de la muestra con la que se esté trabajando. Evidentemente, entre más compleja sea la muestra más altos serán los valores de LDM y LCM.

De acuerdo con lo mostrado en la Tabla V.8, el método propuesto en este trabajo permitirá detectar concentraciones de los fármacos iguales o menores a 3.3 ppb en muestras acuosas relativamente “limpias”, como agua potable y, eventualmente aguas subterráneas. En una sección posterior se examinarán las capacidades del método cuando se aplica a muestras complejas como los fluidos biológicos.

Tabla V.8. Límites de detección (LDM) y de cuantificación (LCM) del método DLLME-SFO/CLAR/UV para la determinación de fármacos en muestras acuosas*.

Fármaco	D.E. _(o.o.) ^{&} (ng)	LDM (ppb)	LCM (ppb)
Ketoprofeno	3.10	1.2	3.6
Nimesulida	3.26	1.6	4.8
Naproxeno	1.34	0.5	1.4
Acemetacina	5.03	1.7	5.2
Flurbiprofeno	6.41	2.0	6.4
Diclofenaco	2.28	0.8	2.4
Indometacina	2.51	0.8	2.6
Ibuprofeno	10.05	3.3	10.2

* Evaluados con muestras de agua grado reactivo fortificadas.

[&] D.E._(o.o.): desviación estándar de la ordenada al origen en las gráficas de Q_{rec} vs Q_{ad}

V.3.4. Factor de preconcentración

Los métodos de preparación de muestra para la determinación de compuestos a niveles traza tienen por objeto no sólo aislar los analitos de la matriz separándolos de los componentes mayoritarios que pueden interferir en su determinación, sino también concentrarlos suficientemente para que alcancen a ser detectados y cuantificados por el método instrumental seleccionado. El factor de preconcentración o factor de enriquecimiento es la relación entre la concentración del compuesto de interés en la solución final que será analizada por el instrumento (en nuestro caso el extracto orgánico fundido), y su concentración inicial en la muestra original. Aplicando a esta definición algunas ecuaciones dadas anteriormente (Ec. V.2-V.4), se obtiene lo siguiente (Ec. V.8):

$$\text{Factor de preconcentración} = C_{ext} / C_m = (\%R/100) \times (V_m / V_{ext}) \quad (\text{Ec. V.8})$$

En las condiciones de trabajo utilizadas, $V_m = 10$ mL y $V_{ext} \approx 0.100$ mL, por lo que el factor de preconcentración es igual al porcentaje de recuperación. En la Tabla

V.9 se enlistan los factores de preconcentración de cada fármaco, determinados a partir de la recuperación promedio obtenida en el estudio de linealidad.

Tabla V.9. Factores de preconcentración de los fármacos a partir de muestras acuosas tratadas por la técnica DLLME-SFO.

Fármaco	Factor de preconcentración
KET	79.7
NIM	63.0
NAP	86.6
ACE	90.8
FLU	93.9
DIC	89.1
IND	89.5
IBU	91.7

De acuerdo con la ecuación V.8, el factor de preconcentración puede ser incrementado disminuyendo el volumen de extracto, ya sea empleando condiciones de extracción donde el extractante no se recupera cuantitativamente, o bien, disminuyendo la cantidad de extractante (dodecanol) agregado a la muestra acuosa. Ambas estrategias han sido utilizadas en diversos trabajos publicados que emplean técnicas de microextracción líquido-líquido [51,52,54-57,60,61]. Sin embargo, en cualquiera de estas dos opciones también disminuye el rendimiento de extracción porque disminuye la relación de fases. El efecto real del volumen de extracto sobre el factor de preconcentración puede conocerse sustituyendo la ecuación de rendimiento (Ec. V.5) en la ecuación V.8, dando como resultado la siguiente relación (Ec. V.9):

$$\text{Factor de preconcentración} = (K_D \times V_m) / (K_D \times V_{\text{ext}} + V_m) \quad (\text{Ec. V.9})$$

Esta ecuación indica que una reducción en el volumen de extracto globalmente aumenta el factor de preconcentración, pero el efecto es más moderado de lo que sugiere la ecuación V.8 y depende en gran medida de la constante de reparto del soluto. Entre más pequeña sea la constante de reparto, menor será el efecto de la reducción del volumen de extracto sobre el factor de preconcentración. Por otra parte, desde el punto de vista experimental, una reducción en el volumen de extracto tiene la desventaja de que la gota solidificada es más pequeña y frágil lo que dificulta su recuperación íntegra.

V.4. Aplicación del método analítico en muestras biológicas

Este estudio se realizó con muestras de orina colectadas el mismo día en que se llevaba a cabo su análisis según el método establecido. El donante de la orina no ingirió ningún medicamento durante el periodo de estudio ni en las 4 semanas anteriores, lo que asegura que en las muestras colectadas no estaba presente ningún fármaco. Cada muestra fue homogeneizada y a partir de ella se preparó una solución de trabajo fortificada con los fármacos y un blanco (orina sin fortificar).

Inicialmente se intentó aplicar la DLLME-SFO directamente a la muestra de orina, tal como se había hecho con las muestras de agua. Sin embargo, no se logró obtener una gota sólida de extracto orgánico al final de la microextracción, sólo se formó una capa semisólida y grasosa en la superficie de la fase acuosa que fue imposible de coleccionar. Por ello se tuvo que trabajar con muestras de orina diluida. Después de una serie de ensayos probando diferentes aditivos y valores de pH en la orina diluida, así como diversas estrategias (filtración, centrifugado, doble extracción, etc.), se pudo establecer un procedimiento adecuado y relativamente sencillo y rápido para el pretratamiento de esta muestra biológica (descrito en la parte experimental, sección IV.4.2). Con estas condiciones, la gota solidificada pudo coleccionarse íntegramente, aunque su consistencia fue más blanda debido a

que dentro del extracto orgánico quedó sistemáticamente atrapada una pequeña cantidad de fase acuosa. Probablemente, una fracción de las especies polares presentes en la orina fue extraída arrastrando consigo parte de su capa de solvatación acuosa, la cual solidificó junto con la fase orgánica durante el paso de enfriamiento en baño de hielo. Por ello, al fundir la gota se observó la separación de dos fases. La capa inferior acuosa se retiró cuidadosamente con una microjeringa y se desechó, ya que un ensayo realizado inyectándola en el cromatógrafo demostró que no contenía a los fármacos ni ninguna otra especie en cantidades detectables. Finalmente, la capa orgánica fue analizada, no sin antes medir su volumen.

En la Fig. V.8 se presentan cromatogramas típicos obtenidos del análisis de una muestra de orina fortificada y el blanco de la misma muestra después de ser preparadas, diluidas y extraídas según el método establecido; también se incluye, a modo de comparación, el cromatograma de un estándar de los fármacos en dodecanol.

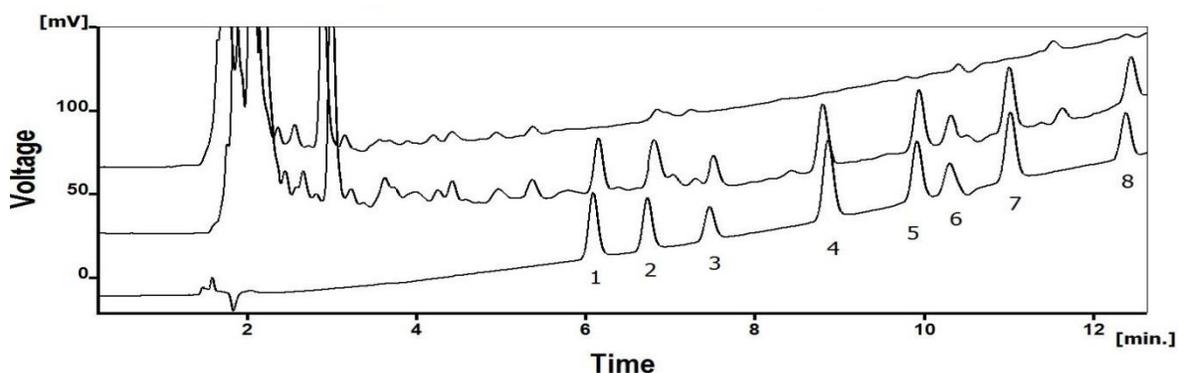


Fig. V.8. Cromatogramas típicos obtenidos del análisis de muestras de orina, aplicando el método DLLME-SFO/CLAR/UV desarrollado. Blanco de muestra de orina (superior), muestra de orina fortificada con los 8 fármacos (intermedio), estándar de fármacos en dodecanol (inferior). Solutos: 1 KET, 2 NIM, 3 NAP, 4 ACE, 5 FLU, 6 DIC, 7 IND, 8 IBU.

Los cromatogramas de la orina muestran abundantes señales de gran intensidad que eluyen a tiempos de retención bajos, por lo que debe tratarse de compuestos

bastante polares que alcanzaron a ser extraídos, al menos parcialmente, por el dodecanol. En la zona donde eluyen los fármacos persisten algunas señales provenientes de la matriz pero de mucho menor intensidad. En particular se puede observar que las interferencias de matriz afectarán principalmente al pico de la nimesulida y en menor grado al del naproxeno. Por otra parte, en los 3 cromatogramas se observa una pequeña perturbación de línea base justo al final del pico del diclofenaco, la cual es probablemente debida a la elución del dodecanol en el que están disueltos tanto los extractos como el estándar. Después de realizar algunas pruebas preliminares, se decidió utilizar alturas de pico en la cuantificación de los solutos, ya que éstas permitieron minimizar los efectos de las interferencias mencionadas, dando resultados más precisos que los obtenidos por medida de áreas. Por lo tanto, la ecuación utilizada para el cálculo de la concentración de los fármacos en el extracto orgánico (Ec. V.1), fue sustituida por la siguiente en el caso de las muestras de orina (Ec. V.10):

$$C_{\text{ext}} = (h_{\text{ext}} / h_{\text{std}}) \times C_{\text{std}} \quad (\text{Ec. V.10})$$

Donde, h_{ext} y h_{std} se refieren a la altura del pico del fármaco en los cromatogramas del extracto y del estándar externo, respectivamente. La concentración de los fármacos en la muestra de orina diluida analizada (C_m) se obtuvo utilizando las ecuaciones de calibración reportadas en la Tabla V.7. Finalmente, la “Concentración Determinada” en la muestra original de orina (C_{det}) se calculó tomando en cuenta el factor de dilución 1:5 (Ec. V.11).

$$C_{\text{det}} = 5 \times C_m \quad (\text{Ec. V.11})$$

Esta concentración determinada se comparó con la concentración real (conocida) a la cual fue fortificada la muestra de orina original antes de comenzar cualquier paso del proceso de preparación de muestra. La concentración de fortificación es generalmente llamada “Concentración Adicionada” y el parámetro de comparación entre ambas concentraciones se denomina “Recuperación Relativa”, aunque

también puede ser considerado como una medida de la exactitud del método cuando se aplica a este tipo de muestra (Ec. V.12).

$$\%RR = (C_{\text{det}} / C_{\text{ad}}) \times 100 \quad (\text{Ec. V.12})$$

Donde: %RR es la recuperación relativa expresada en porcentaje y C_{ad} es la concentración adicionada. La recuperación relativa permite estimar hasta que punto influye la matriz de la muestra en las características y capacidades del método desarrollado. Las matrices muy complejas, como las muestras biológicas, suelen tener un fuerte efecto en las capacidades de cualquier método analítico (%RR más bajo, menor precisión, mayores límites de detección y cuantificación).

V.4.1. Precisión del método en muestras de orina

La precisión del método para determinación de fármacos en orina se evaluó mediante el análisis de muestras fortificadas a las concentraciones indicadas en la Tabla V.10. Las muestras de orina fueron colectadas, fortificadas y analizadas en diferentes días. Los resultados obtenidos de un total de 12 determinaciones para los 8 fármacos se reportan en la misma tabla.

El volumen de extracto orgánico recuperado al aplicar la DLLME-SFO a las muestras de orina diluida fue un poco menor y más variable que en el caso de las muestras de agua. En promedio se obtuvo un volumen de extracto de 94.4 μL , con una desviación estándar de 5.0 μL ($n=12$). Esta disminución pudo ser debida, en parte, a que los componentes de la matriz aumentaron ligeramente la solubilidad del dodecanol en la fase acuosa. Además, como ya se mencionó, con estas muestras fue necesario retirar una pequeña capa de agua que se separó de la fase orgánica al fundir la gota de extracto. La imprecisión asociada a este proceso probablemente ocasionó menor exactitud y precisión en el volumen de extracto determinado.

Tabla V.10. Determinación de los fármacos en muestras de orina fortificada: Precisión (%CV) y recuperación relativa (%RR) (n=12).

Fármaco	C _{ad} ^a (ppm)	C _{det} ^b (ppm)	%RR	%CV
KET	0.197	0.170	86.3	6.1
NIM	0.215	0.196	91.1	9.4
NAP	0.070	0.061	86.5	5.1
ACE	0.219	0.180	82.2	7.3
FLU	0.215	0.193	89.9	6.4
DIC	0.100	0.087	87.9	7.7
IND	0.199	0.176	88.5	6.5
IBU	0.227	0.201	88.8	6.9

^a C_{ad}: concentración adicionada ^b C_{det}: concentración determinada

De acuerdo con los resultados mostrados en la tabla anterior, los coeficientes de variación para la determinación de los fármacos en esta matriz compleja estuvieron comprendidos en el intervalo de 5.1-9.4%, con una exactitud en la determinación de su concentración entre 82.2 y 91.1%. Es importante hacer notar que la concentración de fármacos en las muestras sometidas a microextracción y analizadas fue en realidad 5 veces menor que lo marcado en la Tabla V.10, ya que se trabajó con la orina diluida 1:5. De hecho, las concentraciones en esas muestras fueron idénticas a las del estudio de repetibilidad del método con muestras de agua grado reactivo fortificada (Tabla V.3), para las cuales la precisión fue de 3.0-5.9%, dependiendo del fármaco. En general se puede decir que la pérdida de precisión debida a la matriz de orina fue muy moderada.

Por otra parte, la recuperación relativa (con respecto a las muestras de agua pura) fue un poco baja, lo que indica que los componentes de la orina probablemente interaccionan con estos solutos polares ocasionando una disminución en sus coeficientes de reparto.

V.4.2. Linealidad del método en muestras de orina

Este estudio se llevó a cabo con muestras de orina colectadas diariamente, excepto en el fin de semana. Con cada muestra se preparó la solución de trabajo (orina fortificada) y el blanco. Las soluciones de trabajo fueron fortificadas a 6 niveles de concentración y de cada una se analizaron 3 réplicas aplicando el método desarrollado. El intervalo de concentraciones en la orina fortificada (C_{ad}), estudiado para cada fármaco, se presenta en la Tabla V.11.

El análisis de los blancos permitió comprobar que los analitos de interés no estaban presentes en ninguna de las muestras originales. Al igual que en los estudios anteriores, en todos los experimentos se midió el volumen de extracto obtenido al final de la microextracción. El valor promedio de la gota de extracto fue de 90.1 μL con una desviación estándar de 4.7 μL ($n=18$). Con los datos de V_{ext} y las concentraciones determinadas en los extractos (C_{ext}), se calcularon las concentraciones en la orina diluida (C_m) aplicando las ecuaciones de calibración (Tabla V.7). Finalmente, considerando el factor de dilución (Ec. V.11), se calcularon las concentraciones en las muestras originales de orina (C_{det}). El resultado del tratamiento estadístico de los datos por el método de mínimos cuadrados se reporta en la tabla V.11.

Los coeficientes de determinación para las rectas de *Concentración Determinada vs Concentración Adicionada* fueron mayores a 0.99, lo que demuestra la linealidad del método en las muestras orina. Por otra parte, la pendiente multiplicada por cien representa la recuperación relativa promedio en el intervalo de concentraciones estudiado (concentración adicionada a la orina). Como puede verse en la tabla, la recuperación no es del 100%, lo que comprueba que la capacidad del método para extraer los solutos a partir de orina es menor que a partir de una matriz limpia, como el agua grado reactivo. Esto significa que la exactitud con la que se determinarían estos analitos en muestras reales (orina no

fortificada) oscilaría aproximadamente entre 86 y 96%, en promedio, dependiendo del fármaco.

Tabla V.11. Linealidad del método en muestras de orina: Parámetros estadísticos de la regresión lineal para las gráficas de *Concentración Determinada vs Concentración Adicionada*.

Fármaco	Intervalo C _{ad} (ppm)	r ² *	Ordenada al origen (D.E.)** (×100)	Pendiente (D.E.) (×100)
KET	0.0475 – 1.426	0.999	-0.81 (0.4)	95.7 (0.7)
NIM	0.0518 – 1.555	0.999	-0.01 (0.6)	87.7 (0.8)
NAP	0.0169 – 0.507	0.999	-0.06 (0.2)	92.6 (0.7)
ACE	0.0562 – 1.685	0.995	1.18 (1.3)	85.6 (1.7)
FLU	0.0509 – 1.526	0.998	0.71 (0.8)	88.0 (1.0)
DIC	0.0480 – 1.440	0.998	-1.93 (0.7)	93.8 (1.1)
IND	0.0518 – 1.555	0.998	-1.15 (0.8)	95.8 (1.1)
IBU	0.0595 – 1.786	0.998	-0.14 (1.0)	92.8 (1.2)

* r² = coeficiente de determinación

** ppm

En estudios farmacológicos (p. ej. de bioequivalencia), una exactitud superior al 80% es aceptable para niveles de concentración cercanos o inferiores a la ppm. Por lo tanto se considera que el método desarrollado tiene un buen potencial para ser aplicado en este tipo de estudios, con la ventaja de ser más rápido, simple, económico y ecológico que los métodos tradicionalmente empleados..

En la literatura hay reportados muy pocos trabajos utilizando la técnica DLLME-SFO para la extracción de analitos a partir de muestras de orina, ninguno de ellos se refiere a los fármacos tratados en el presente trabajo. No obstante, a modo de comparación, se darán los resultados obtenidos en dos trabajos que aplicaron la DLLME-SFO, asistida por ultrasonido (en vez de agente dispersante), para la determinación de 5 fenoles o 3 antidepresivos en muestras de orina. Los resultados reportados para los fenoles fueron: %RR = 74.8-86.1% y %CV = 5.9-

9.4% para concentraciones de 0.025 ppm en la muestra original [63]. En el caso de los antidepresivos los resultados fueron: %RR = 93.6-109% y %CV = 7.2-10.6% para concentraciones de 0.200 ppm en la orina inicial [64]. Como puede constatar por los datos de las tablas V.10 y V.11, los resultados obtenidos en el presente trabajo son similares, tanto en lo que se refiere a recuperación relativa como a precisión.

V.4.3. Límites de detección y cuantificación en muestras de orina

Al igual que con las muestras de agua, se utilizaron los datos del estudio de linealidad para determinar los límites de detección del método cuando se aplica a una matriz de orina. En este caso, puesto que nos basamos en las curvas de *Concentración Determinada vs Concentración Adicionada* (ambas en unidades de ppm), el LDM en ppb se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación (Ec. V.13):

$$\text{LDM (ppb)} = 3 \times \text{D.E. (ordenada al origen)} \times 1000 \quad (\text{Ec. V.13})$$

Así mismo, se empleó el criterio de la IUPAC (Ec. V.7) para evaluar los límites de cuantificación de los fármacos en esta matriz. En la tabla V.12 se reportan los resultados obtenidos.

Si se comparan los LDM en orina con los obtenidos en muestras de agua grado reactivo (Tabla V.8), se puede constatar que en el fluido biológico la sensibilidad es de 10 a 30 veces menor, dependiendo del analito, lo cual se atribuye a la gran complejidad de esta matriz comparada con agua pura. Independientemente de ello, los límites de detección del orden de unas decenas de ppb son generalmente suficientes para la mayoría de los estudios farmacológicos en los que podría aplicarse esta metodología.

Por otra parte, comparando las tablas V.11 y V.12, se observa que algunos límites de cuantificación son superiores al valor más bajo del intervalo de concentración estudiado para cada fármaco. Sin embargo, cuando se realizó el estudio de linealidad, los picos de los analitos en el nivel de concentración más bajo pudieron

integrarse y cuantificarse con una precisión bastante aceptable (%CV entre 2.76 y 10.3%, para el análisis por triplicado). Esto es debido a que los límites de detección y cuantificación “teóricos” (basados en los parámetros estadísticos de las curvas de linealidad), generalmente están sobreevaluados con respecto a lo que en realidad puede alcanzarse experimentalmente.

Tabla V.12. Límites de detección (LDM) y de cuantificación (LCM) del método DLLME-SFO/CLAR/UV para la determinación de fármacos en muestras de orina.

Fármaco	D.E. _(o.o.) * (ppb)	LDM (ppb)	LCM (ppb)
Ketoprofeno	4.36	13.7	42.5
Nimesulida	5.76	19.7	61.2
Naproxeno	1.55	5.02	15.6
Acemetacina	13.4	47.0	146
Flurbiprofeno	7.46	25.4	78.9
Diclofenaco	7.39	23.6	73.4
Indometacina	8.01	25.1	77.9
Ibuprofeno	9.68	31.3	97.2

* D.E._(o.o.): desviación estándar de la ordenada al origen (gráficas C_{det} vs C_{ad}) \times 1000

Considerando el conjunto de resultados obtenidos para las muestras de orina se puede concluir que el método propuesto presenta una precisión, exactitud y sensibilidad adecuados para la determinación de los 8 fármacos a niveles de concentración inferiores a la ppm en esta matriz. Comparado con otros métodos para determinación de fármacos en fluidos biológicos, basados en técnicas de extracción convencionales como la extracción líquido-líquido y la extracción en fase sólida, el método propuesto representa una excelente alternativa por su rapidez, simplicidad, bajo consumo de reactivos y disolventes y, por lo tanto, mínima generación de desechos y costos mucho más bajos.

VI. CONCLUSIONES

- Se optimizó la técnica de microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de la gota orgánica flotante (DLLME-SFO) para la extracción, concentración y purificación de 8 fármacos AINE's: Acemetacina, Diclofenaco, Flurbiprofeno, Ibuprofeno, Indometacina, Ketoprofeno, Naproxeno y Nimesulida.
- Se establecieron las condiciones óptimas para la separación y análisis de los fármacos de interés por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección UV (HPLC/UV).
- La combinación de los procedimientos para el tratamiento de muestra y su análisis dio como resultado un método sencillo, rápido, económico y amigable con el medio ambiente, que permite determinar los 8 fármacos a niveles de concentración del orden de las ppb (ng/mL) en muestras acuosas.
- La validación del método con muestras de agua grado reactivo fortificadas con los fármacos demostró su excelente linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado ($r^2 > 0.99$), buena precisión (%CV < 6%) y muy aceptable recuperación absoluta para estos solutos hidrofílicos (%R promedio > 79%, excepto nimesulida 63%). Los límites de detección (LDM) y cuantificación (LCM) estimados estuvieron comprendidos entre 0.5-3 ppb y 1.4-10 ppb, respectivamente, dependiendo del fármaco.
- El método desarrollado se aplicó en muestras de un fluido biológico (orina), requiriendo sólo un sencillo pre-tratamiento (acidificación, centrifugación y dilución). Las pruebas realizadas con muestras de orina fortificada permitieron corroborar la linealidad y precisión del método en esta matriz

compleja ($r^2 > 0.99$ y $\%CV < 9.5\%$), así como una exactitud aceptable en la determinación de los analitos (recuperación relativa promedio en el intervalo de 85-96%, dependiendo del fármaco). Los LDM estimados estuvieron entre 5-25 ppb y los LCM entre 16-79 ppb.

- Los resultados obtenidos confirman la viabilidad del método DLLME-SFO/CLAR/UV, propuesto en este trabajo, para la determinación de fármacos AINE's en muestras biológicas complejas. Este método es mucho más simple, rápido y económico que los métodos tradicionalmente usados en estudios farmacológicos de este tipo de compuestos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. D. Aga. *Fate of Pharmaceuticals in the Environment and in Water Treatment Systems*. CRC Press, Taylor & Francis Group, E.U., 2008, 3-101.
2. C.G. Daughton, T.A. Ternes, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?, *Environ. Health Perspec.* 107 (1999) 907-938.
3. R. Avellaneda, P.Y. Peñataro, M. Brañas. *El Agua es Vida*. En: Cuidado y gestión sostenible de las fuentes tradicionales de agua en comunidades rurales amazónicas, Perú, 2011.
4. P. Ávila. *El Valor Social y Cultural del Agua*. En: Gestión y cultura del agua, Tomo II, México, 2006.
5. CONAGUA: Estadísticas del agua en México, Edición 2011, Comisión Nacional del Agua, México, 2011.
6. CONAGUA: Situación del Subsector Agua Potable, Alcantarillado y Saneamiento. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional del Agua, México, 2010.
7. M.V. López. *Tratamiento Biológico de Aguas Residuales*. En: Perspectiva de la Biotecnología en México, Ed. CONACYT, México, 1981, 259-284.
8. D. Russell. *Tratamiento de aguas residuales: Un enfoque práctico*. Editorial Reverté, Global Environmental Operations, Georgia, USA, 2006.
9. R.S. Ramalho. *Tratamiento de Aguas Residuales*. Editorial Reverté, Barcelona, 1991.

- 10.J. Peña Ramírez. *El Agua, Espejo de los Pueblos*. Ensayos de ecología política sobre la crisis del agua en México en el umbral del milenio, Facultad de Estudios Superiores Acatlán, UNAM-Plaza y Valdés, México, 2004.
- 11.A. Aguilar. *Calidad del Agua: Un Enfoque Multidisciplinario*, Instituto de Investigaciones Económicas, UNAM, México, 2010.
- 12.D. Barceló, Emerging pollutants in water analysis. *Trends Anal. Chem.* 22 - 10 (2003).
- 13.S.A. Snyder, K.L. Elly, A.H. Grange, G.W. Sovocool, E.M. Snyder, J. Giesy, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Scientific and regulatory issue, *Amer. Chem. Soc.* 791 (2001) 116-140.
- 14.B. Halling-Sorensen, N. Nielsen, P.F. Lansky, F. Ingerslev, H.C. Hansen Lützholf, S.E. Jorgensen, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment: A review, *Chemosphere* 36 (1998) 357-394.
- 15.M. Gil, Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos, *Revista Producción Más Limpia* 7, No. 2 (2012) 52-73
- 16.C.G. Daughton, Non-regulated water contaminants: Emerging research, *Environ. Impact Assess. Res.* 24 (2004) 711-732.
- 17.J. Durán Álvarez. Cuantificación de doce contaminantes emergentes, provenientes del agua residual empleada para riego, en suelos del distrito de riego 03 "Tula" Hidalgo. Tesis de Maestría, UNAM, México, 2009.

18. M. La Farré, S. Pérez, L. Kantiani, D. Barceló, Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, *Trends Anal. Chem.* 27 (2008) 991-1007.
19. G.R. Boyd, H. Reemtsma, D.A. Grimm, S. Mitra, Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario Canada. *Sci. Total Environ.* 311 (2006) 135-149.
20. C.G. Daughton. *Pharmaceuticals in the Environment: Sources and Their Management*. In: Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle, M. Petrovic, D. Barcelo, Eds., *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry Series*, 50, Ch. 1, Elsevier Science, 2007, 1-58.
21. J. Cortacans, A. Hernández, I. Del Castillo, E. Montes, A. Hernández. Presencia de fármacos en aguas residuales y eficacia de los procesos convencionales en su eliminación. Cátedra de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Universidad Politécnica de Madrid, 2005, 1-30.
22. C. Jiménez, Contaminantes orgánicos emergentes en el ambiente: Productos farmacéuticos, *Revista Lasallista de Investigación* 8, No. 2 (2011) 143-153.
23. J.L. Santos Morcillo. Análisis y distribución de principios activos farmacológicos en los procesos convencionales de depuración de aguas residuales urbanas. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, España, 2006, 20-200.
24. J.L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, M. Calle, Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors, *Anal. Chim. Acta* 550 (2005) 116-122.

- 25.K. Fent, A.A. Weston, D. Caminada, Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquat. Toxicol.* 76 (2006) 122–159.
- 26.B.L. Saldaña Díaz. Metodología para la determinación de residuos de fármacos en matrices acuosas por Extracción en Fase Sólida-Cromatografía de Líquidos/UV. Aplicación en muestras de agua de los canales de Xochimilco. Tesis de maestría, UNAM, México, 2012.
- 27.L.A. Castillo Alanís. Identificación y cuantificación de PPCP's en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). Tesis de maestría, UNAM, México, 2009.
- 28.R. Bahamonde Soria. Desarrollo de una metodología analítica por EFS-CLAR/UV para la determinación de sulfas a niveles traza en aguas ambientales. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México, 2011.
- 29.E. Díaz Torres. Determinación de disruptores endocrinos por cromatografía de gases-masas en la zona lacustre de Xochimilco, Distrito Federal. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología, UNAM, México, 2009.
- 30.F.B. Fernández Reyes. Desarrollo de un método para la determinación de contaminantes emergentes en matrices vegetales utilizando extracción con barra magnética (SBSE) seguido de cromatografía de gases-espectrometría de masas, Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México, 2012.

- 31.L.A. Díaz Flores. Determinación de contaminantes emergentes en sedimentos de plantas de tratamiento de aguas residuales por extracción asistida con ultrasonido seguido de cromatografía de gases-espectrometría de masas (EAUS-CG-EM), Informe de Trabajo de Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México, 2012.
- 32.S. García Ramos. Determinación de fluoxetina en agua residual municipal y orina mediante microextracción en fase sólida (MEFS) y cromatografía de gases, Informe de Trabajo de Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México, 2012.
- 33.P. Angeles–Chimipal, M. Medina Flores, J. Molina Rodríguez, Automedicación en población urbana de Cuernavaca, Morelos, Salud Pública de México 34 (1992) 554-561.
- 34.J. Siemens, G. Huschek, C. Siebe, M. Kaupenjohann, Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system Mexico City-Mezquital Valley, Water Res. 42 (2008) 2124-2134.
- 35.Instituto Roche. Guía práctica para la utilización de muestras en investigación biomédica. Madrid, 2006.
- 36.R.C. Milán Segovia. Eliminación de fármacos. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México, 2006.
- 37.V. Hall Ramirez, N. Murillo Porras, M. Rocha Palma, E. Rodríguez Vega. Antiinflamatorios no esteroideos (AINE's). Centro Nacional de Información de Medicamentos, Costa Rica, 2001.

38. P. Brooks, R. Day, Non esteroidal antiinflammatory drugs, differences and similarities, N. Engl. J. Med. 324, No. 24 (1991) 1717-1726.
39. <http://www.scbt.com/> Fichas técnicas. Última revisión 20 de marzo de 2014
40. J.E. Becerril. Optimización de metodologías analíticas para la determinación de contaminantes emergentes en aguas de abastecimiento y residuales. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela, España, 2012.
41. R.M. Montes Goyanes. Avances en técnicas de microextracción para la determinación de compuestos traza en muestras medioambientales y alimenticias. Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, España, 2009.
42. L.E. Vera-Avila, J.L. Gallegos-Pérez, E. Camacho-Frías, Frontal analysis of aqueous phenol solutions in amberlite XAD-4 columns. Implications on the operation and design of solid-phase extraction systems, Talanta 50 (1999) 509-526.
43. L.A. Berrueta, A review of solid-phase extraction: Basic principles and new developments, Chromatographia 40, No.7 (1998) 474-483.
44. M.-C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography, J. Chromatogr. A 856 (1999) 3-54.
45. R.P. Belardi, J.P. Pawliszyn, Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns, Water. Pollut. Res. J. Can. 24 (1989) 179-191.
46. H. Liu, P.K. Dasgupta, Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop, Anal. Chem. 68 (1996) 1817-1821.

47. Y. He, H.K. Lee, Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634-4640.
48. M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1-9.
49. Kocúrová, I.S. Balogh, J. Šandrejová, V. Andruch, Recent advances in dispersive liquid-liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review, *Microchem. J.* 102 (2012) 11-17.
50. J. Regueiro, M. Llompert, C. García-Jares, J.C. García-Monteagudo, R. Cela, Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 2008, 1190, 27-38.
51. M.-I. Leong, S.-D. Huang, Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop combined with gas chromatography with electron capture or mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 8-12.
52. H. Xu, Z. Ding, L. Lv, D. Song, Y.-Q. Feng, A novel dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous samples, *Anal. Chim. Acta* 636 (2009) 28-33.
53. L.E. Vera-Avila, T. Rojo-Portillo, R. Covarrubias-Herrera, A. Peña-Alvarez, Capabilities and limitations of dispersive liquid-liquid microextraction with

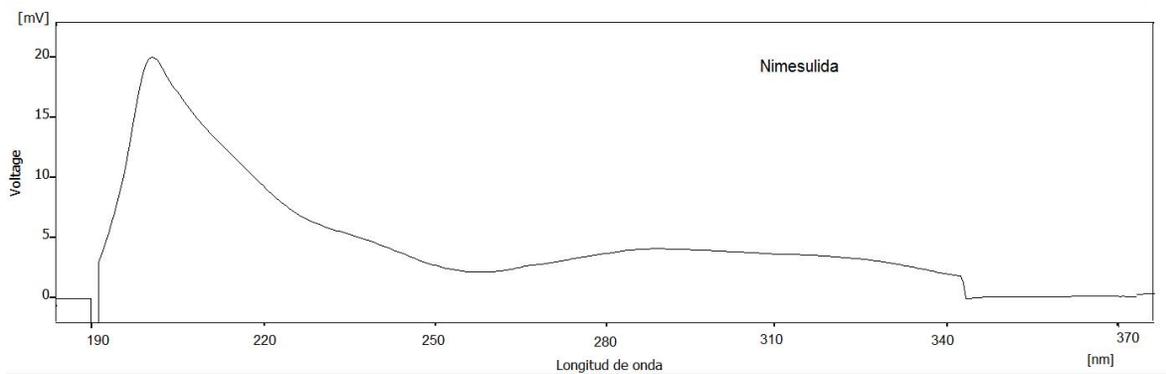
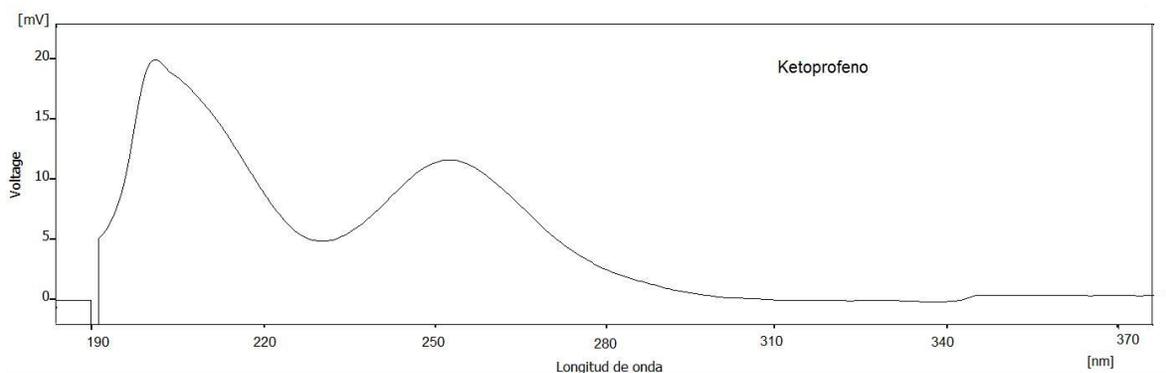
solidification of floating organic drop for the extraction of organic pollutants from water samples, *Anal. Chim. Acta* 805 (2013) 60-69.

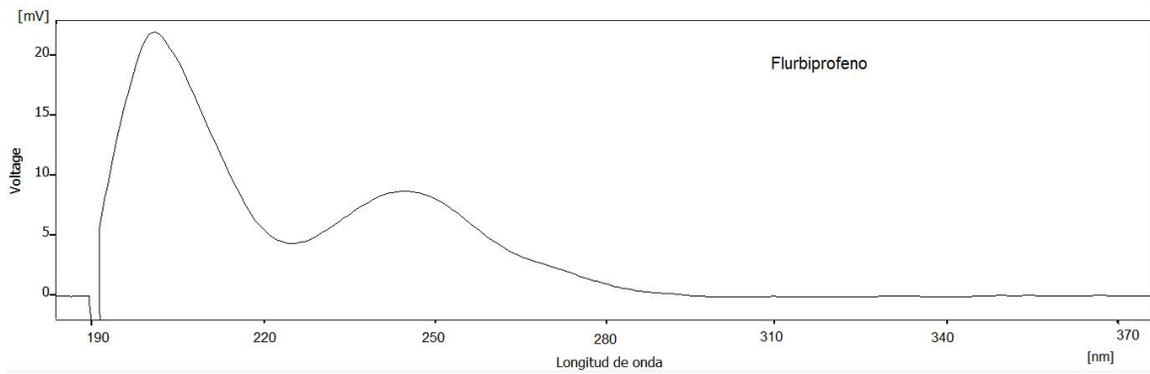
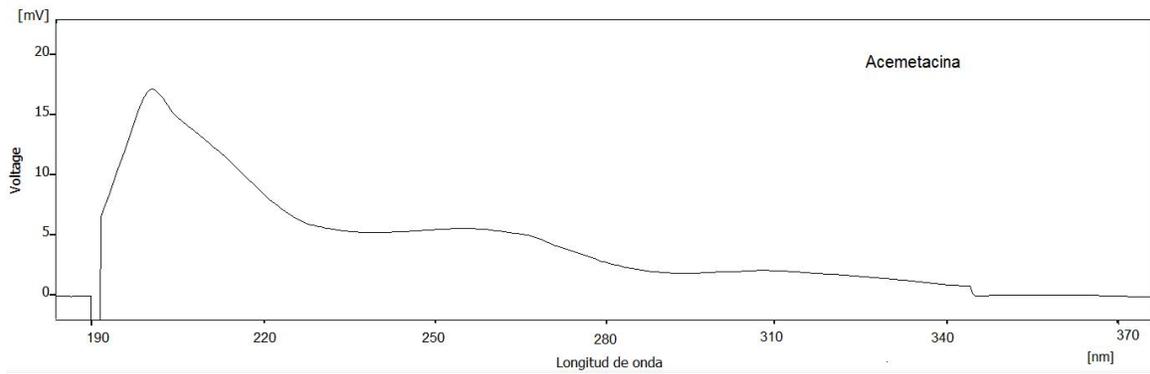
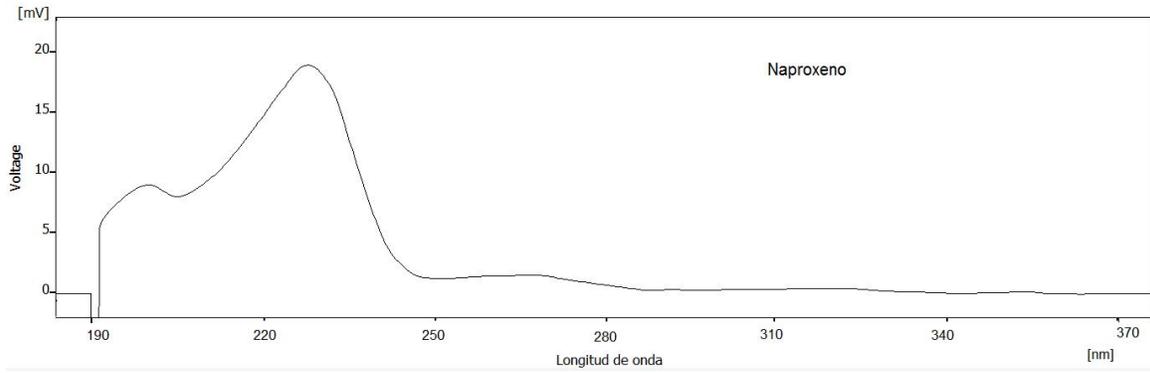
54. M.I. Leong, S.D. Huang, Dispersive liquid-liquid microextraction method based on solidification of floating organic drop for extraction of organochlorine pesticides in water samples, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 7645-7650.
55. H. Farahani, Y. Yamini, S. Shariati, M.R. Khalili-Zanjani, S. Mansour-Baghahi, Development of liquid phase microextraction method based on solidification of floated organic drop for extraction and preconcentration of chlorine pesticides in water samples, *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 166-173.
56. C. Zheng, J. Zhao, P. Bao, J. Gao, J. He, Dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplet followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection and liquid chromatography – tandem mass spectrometry for the determination of triclosan and 2,4-dichlorophenol in water samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 3830-3836.
57. F. Hou, T. Deng, X. Jiang, Dispersive liquid-liquid microextraction of phenolic compounds using solidified floating organic droplets, and their determination by HPLC, *Microchim. Acta* 180 (2013) 341-346.
58. C.D. Harris. *Análisis Químico Cuantitativo*. 2^a ed., Editorial Reverté, Barcelona, 1999, 692-720.
59. T. Rojo Portillo. 2012. Estudio de la microextracción líquido-líquido disperso con solidificación de fase orgánica, aplicada al análisis de compuestos de interés ambiental en matrices acuosas. Tesis de Maestría, Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM, México, 2012.

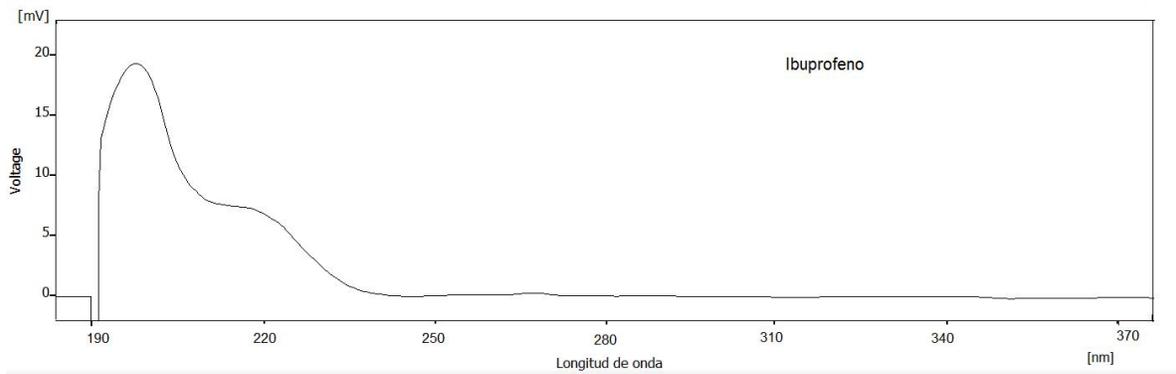
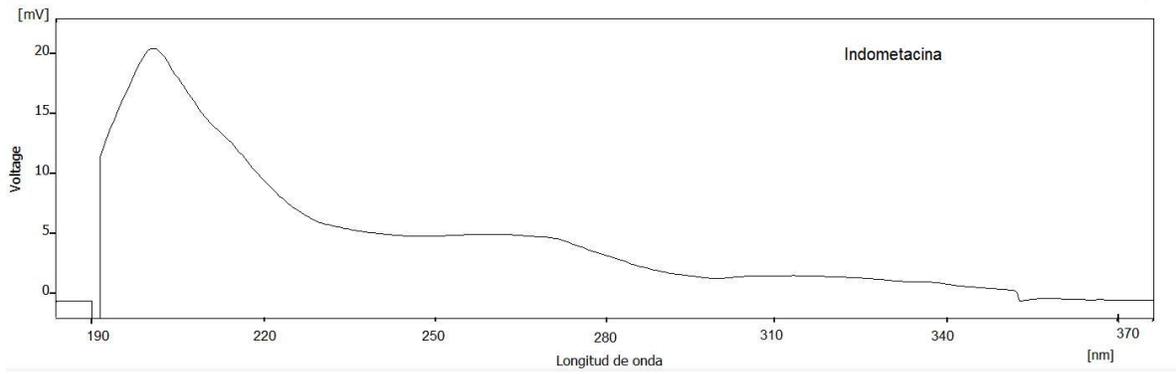
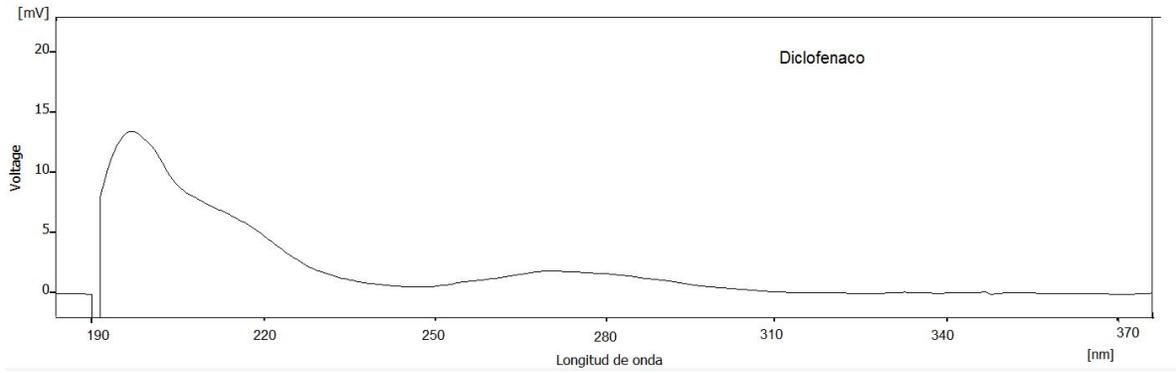
- 60.N. Fattahi, Y. Assadi, M.R.M. Hosseini, E.Z. Jahromi, Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron capture detection, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 23-29.
- 61.M.I. Pinto, G. Sontag, R.J. Bernardino, J.P. Noronha, Pesticides in water and the performance of liquid-phase microextraction based techniques. A review, *Microchem. J.* 96 (2010) 225-237.
- 62.L.A. Currie, L.A., Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities (IUPAC Recommendations), *Anal. Chim. Acta* 391 (1995) 105-126.
- 63.H. Wang, H. Yang, C. Wang, F. Chen, M. Ma, W. Wang, X. Wang, Analysis of phenolic pollutants in human samples by high performance capillary electrophoresis based on pretreatment of ultrasound-assisted emulsification microextraction and solidification of floating organic droplet, *J. Chromatogr. A* 1256 (2012) 16-21
- 64.H. Ebrahimzadeh, Z. Saharkhiz, M. Tavassoli, F. Kamarei, A.A. Asgharinezhad, Ultrasound-assisted emulsification microextraction based on solidification of floating organic droplet combined with HPLC-UV for the analysis of antidepressant drugs in biological samples, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1275-1282.

VIII. ANEXOS

Anexo A1. Espectros de absorbancia de los fármacos obtenidos con el detector UV/DAD por programación de barridos de longitud de onda a los tiempos de elución de cada uno.







Anexo A.II Linealidad del método en muestras acuosas

Gráficas de Cantidad Recuperada vs Cantidad Adicionada.

