



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS POR
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. EVERARDO TAPIA MENDOZA

TUTOR

DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, Cd. Mx., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“DETERMINACIÓN DE FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS POR
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. EVERARDO TAPIA MENDOZA



México, Cd. Mx.

2016

JURADO ASIGNADO

Presidente: M en C Juan Manuel Rodríguez

Vocal: Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez

Vocal: Dr. Alberto Rojas Hernández

Vocal: Dra. María del Pilar Cañizares Macías

Secretario: Dra. Helgi Jung Cook

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 208 “Análisis de trazas” del edificio F2 de la Facultad de Química.

Dra. Martha Patricia García Camacho
Tutor

Parte de este trabajo se presentó en el XXVIII Congreso Nacional de Química Analítica en Ixtapa, Guerrero, México. Junio 2015

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por los conocimientos brindados durante esta experiencia, así como todas las vivencias personales adquiridas.

Al programa del Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas. Gracias por dos años de sólida formación científica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACyT por el apoyo en el proyecto de Ciencia Básica 166389, y por la beca otorgada para la realización de los estudios de maestría (No. de becario 308234).

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México DGAPA-UNAM, proyecto PAPIIT IT203214.

A la Dra. Martha Patricia García Camacho por su paciencia y su brillante asesoría, que sin ella no se hubiera llegado a buen término este proyecto, gracias por darme la oportunidad de ser su alumno y aprender de usted.

A los miembros del jurado por las valiosas aportaciones realizadas a este trabajo.

A la M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera por todo su apoyo e incondicional cariño. Muchas gracias!!

A mis papás Marisela Mendoza López y José Guadalupe Tapia Aguilar por ser los padres que son, por darme tanto cariño, confianza, amistad, conocimiento y sobre todo por la educación que recibí. Este escalón en mi carrera profesional se los debo a ustedes, por lo que esta tesis va dedicada a ustedes.

A mi hermana Cinthia Lizzete, gracias por interesarte a lo largo de mi maestría por mi tema. Te quiero hermana y de nuevo tienes otra pequeña muestra de que si yo estoy caminando, ya quiero verte volar. Guarda este manuscrito, ya que va dedicada a ti. Y cuando te caigas voltea a ver el libro, toma la calma suficiente, alza tu mentón y sigue adelante.

A mis abuelas Francisca “Mamá chica” y Elena, que gracias a ustedes comenzó todo. Así también a todos mis tíos de la familia Tapia y Mendoza. Principalmente a mi tía Neno, a mi tía Adriana, a Beto y su familia.

A Xóchitl, cuantas cosas no hemos vivido. Que este escrito sea un ejemplo y un boleto de cambio, te doy mi tesis y quiero de vuelta tu título. Sé que viviste cosas intensas, pero el chiste es no quedarse tirado, te levantas, te sobas y comienzas a caminar de nuevo. Gracias por ser mi amiga, mi confidente, mi amor, mi todo y sabes que aunque seamos como agua y aceite te amo. Esta tesis va dedicada a ti.

Al joven Misael Torres, la vida te pone a las personas necesarias en el momento indicado, gracias por dejarme conocerte, realmente he aprendido a tratarte, y me he llevado una gratísima sorpresa. Sé que eres un amigo de esos que hay que cuidar día a día. Sabes el esfuerzo que me costó este escrito, por todas esas pláticas, consejos y recomendaciones, esta tesis va para ti también. Sé que no toda la vida son momentos de alegría, pero este escrito que sea un recordatorio de que siempre hay una razón para levantarte y seguir luchando, te quiero, y vamos por más experiencias juntos.

A la maestra Ana Adela Sánchez por todos esos desayunos, comidas, cenas, cafés, etc, que compartimos, fue mi maestra, mi mentora, ahora la considero mi amiga. No sabe lo agradecido que estoy por confiar en mí y siempre estar presente cuando la necesitaba. Por eso también la tesis va dedicada con mucho cariño para usted.

A Luis Daniel “Gigi Inba” gracias por todas esas noches de diversión y reflexión, aquí un ejemplo de que se puede, agradezco todo su tiempo y sus “minutos” prestados para la causa. Con esta tesis se cierra un ciclo lleno de aprendizajes y dichas, y se abren otros.

A mi tía preferida y ÚNICA madrina Olivier Mendoza, por apoyarme y creer en mí. Aquí se encuentra el primer fruto cosechado de la siembra. Gracias tía y te quiero.

A Aldo Arellano y Berenice Ovalle mi pareja más dispareja, los quiero a los dos y gracias por todos estos años de amistad, extraño los viernes con la “Tía”, hay que recuperarlos.

Por su puesto que mis amigas de la prepa. Esos tacos y cafés, así como noches de confesiones como olvidarlas. Las quiero mucho, y perdón Marco por generalizarte en femenino, pero ganó el número de mujeres. Esto va para ustedes, Anilú, Americ, Lupita y Marco.

Para Karen Janeth y Cinthia que a pesar de las veces que nos vemos, saben que este logro también es parte de ustedes.

Finalmente pero no menos importantes, a mis compañeros del laboratorio 208: Fer “blanco”, Joaquín, a “el Lalito” , a Jorge, por supuesto que el “Kikin” y como no mencionarte Mayra gracias por tus consejos, tu experiencias, pero sobre todo por tu amistad y confianza, espero seguir tratándote en más ocasiones, ¡¡Cuántos agradecimientos!!.

ABREVIACIONES Y SIMBOLOGÍA

AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
DMFS	Dispersión de Matriz en Fase Sólida
EFS	Extracción en Fase Sólida
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
UV	Ultravioleta
OMS	Organización Mundial de la Salud
EPA	Environmental Protection Agency
UE	Unión Europea
PCPs	Productos de cuidado personal
PTV	Programa de temperatura de vaporización
WCOT	Wall Coated Open Tubular (Recubierta en la pared)
SCOT	Support Coated Open Tubular (Soporte recubierto)
PLOT	Porous Layer Open Tubular (Sílice fundida)
TCD	Detector de conductividad térmica
FID	Detector de ionización de llama
ECD	Detector de captura de electrones
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
MS	Espectrometría de masas
UHPLC	Ultra High Performance Liquid Chromatography
MIP's	Polímeros molecularmente impresos
CG	Cromatografía de gases
ESI	Ionización por electrospray
AA	Ácido ascórbico
ACN	Acetonitrilo
DCM	Diclorometano
DVB	Divinilbenceno
FID	Detector de llama (por sus siglas en inglés)
MEEKC	Microemulsion electrokinetic chromatography
MTBE	Metil terbutiléter
PDMS/DVB	polidimetilsiloxano/polidivinilbenceno
TFA	ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
LD	Límite de detección
LC	Límite de cuantificación
FR	Fase reversa
CL	Cromatografía de líquidos
CG	Cromatografía de gases
MS	Espectrometría de masas
ELL	Extracción líquido-líquido
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva (siglas de inglés)
DAD	Detector de arreglo de diodos
HF-LPME	Microextracción líquido con fibra hueca
MAE	Extracción asistida por microondas
MIP	Polímero molecularmente impreso (por sus siglas en inglés)
PLE	Extracción con líquidos presurizados

PHWE
SFE
SPME
USP

Extracción con agua caliente presurizada (siglas en inglés)
Extracción con fluidos supercríticos
Microextracción en fase sólida (por sus siglas en inglés)
Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	12
INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS	16
HIPÓTESIS	17
CAPÍTULO 1	18
ANTECEDENTES	18
1.1 Contaminación del agua	18
1.1.1 Panorama general	18
1.1.2. Contaminantes emergentes.....	19
1.1.3. Fuentes de producción de los contaminantes emergentes	20
1.1.4. Fármacos como contaminantes emergentes.....	21
1.1.5 Regulación y panorama actual en la investigación	22
1.2. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE)	23
1.2.1. Modo de acción.....	23
1.2.2. Clasificación	24
1.2.3. Quiralidad.....	26
1.2.4. Analitos de estudio: ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, fenilbutazona, flurbiprofeno y ketoprofeno.	26
1.2.4.1. Estructuras químicas	26
1.2.4.2. Propiedades físico-químicas de los analitos.....	27
1.3. Técnicas de análisis instrumentales usadas para AINE	29
1.3.1 Cromatografía de gases (CG).....	29
1.3.2. Cromatografía de líquidos	31
1.3.3. Nuevas tecnologías y sistemas acoplados a los sistemas cromatográficos	34
1.4. Preparación de muestra para el análisis cromatográfico	36
1.4.1. Generalidades y características en la preparación de muestra	36
1.4.2. Técnicas de extracción	37
1.4.2.1. Objetivo de la extracción	37
1.4.2.2. Extracción en fase sólida (EFS)	38
1.4.2.2.1 Parámetros que afectan a la EFS en fase reversa	42
1.4.2.2.2. Ventajas y limitaciones de la EFS	44
1.4.2.3. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)	44
1.4.2.3.1. Parámetros que afectan a la DMFS	46
1.4.2.3.2. Ventajas y limitaciones de la DMFS	47
1.4.2.4. Nuevos adsorbentes	47
1.5. Aplicaciones de las técnicas para el aislamiento y cuantificación de AINE en diversas matrices.	48
CAPÍTULO 2	66
METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	66
2.1 Materiales y equipos	66
2.1.1. Disolventes y reactivos.....	66
2.1.2. Sistema cromatográfico.....	66
2.1.3. Sistema de extracción	67
2.1.4. Muestras vegetales.....	68

2.2. Preparación de disoluciones estándar de AINE	68
2.3. Experimentación	69
2.3.1 Optimización de la detección con los espectros UV de los fármacos.....	70
2.3.2. Optimización de la separación cromatográfica de los AINE	70
2.3.3. Validación instrumental para los diferentes analitos en cuestión	71
2.3.4. Desarrollo y optimización del método de extracción de los AINE mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)	72
2.3.4.1. Evaluación de los frentes de elución de los analitos	72
2.3.4.2. Evaluación de los interferentes e implementación de la secuencia de elución	74
2.3.4.3. Estudio del efecto matriz y su interacción con los analitos	75
2.3.4.4. Estudios acerca de la estabilidad de la muestra almacenada y del extracto, la humedad de la muestra y las relaciones muestra:adsorbente en la DMFS	76
2.3.5. Validación del método por Dispersión de Matriz en Fase Sólida y HPLC-UV	77
2.3.6. Aplicación de la metodología propuesta para la extracción y determinación de AINE en diferentes tipos de lechuga	79
2.3.7. Búsqueda de los AINE en otras muestras vegetales de tipo hoja	81
CAPÍTULO 3	82
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	82
3.1 Optimización de la detección con los espectros UV de los fármacos	82
3.2. Optimización de la separación cromatográfica de los AINE	83
3.3. Validación instrumental para los diferentes analitos en cuestión.....	88
3.4. Desarrollo y optimización del método de extracción de los AINE mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)	91
3.4.1. Evaluación de los frentes de elución de los analitos.....	91
3.4.2. Evaluación de interferentes e implementación de la secuencia de elución.....	98
3.4.3. Estudio del efecto matriz y su interacción con los analitos	101
3.4.4. Estudios de estabilidad de la muestra almacenada y del extracto, la humedad de la muestra y las relaciones muestra:adsorbente en la DMFS	105
3.5. Validación del método DMFS-HPLC-UV	107
3.7. Búsqueda de los AINE en diferentes matrices vegetales.....	115
CAPITULO 4	118
CONCLUSIONES	118
REFERENCIAS.....	120
ANEXOS.....	131

RESUMEN

Los contaminantes emergentes corresponden en la mayoría de los casos a sustancias no reguladas. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos. En este trabajo, nos centramos en los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) porque hasta el momento en México existen pocos estudios de toda la gama de contaminantes emergentes en alimentos.

Dado que se ha reportado la presencia de algunos AINE como el diclofenaco en los sistemas acuáticos de la Ciudad de México, con una concentración de 5 ng/L (Cañedo, 2010), alimentos como la lechuga y otros vegetales podrían contener estos fármacos. Partiendo de esta premisa, se desarrolló y optimizó un método para determinar seis fármacos pertenecientes a esta familia de uso común y no regulado en México: Ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco, flurbiprofeno y fenilbutazona en lechuga fresca, mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) y Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia con detección UV (HPLC-UV).

Se optimizó una separación cromatográfica y se validó el sistema, obteniendo coeficientes de variación para ensayos intra-día e inter-día aceptables, 0.53-2.27 y 0.95 – 2.68 respectivamente. Se demostró con buenos coeficientes de correlación (r^2) que la respuesta de los analitos presentan un comportamiento lineal en un intervalo de concentración de 0.05 a 10.0 mg/L También se obtuvieron los límites instrumentales de detección (0.007-0.015 mg/L) y los límites de cuantificación (0.021-0.051 mg/L)

Se optimizó y validó el método de preparación de muestra, basado en la técnica de la DMFS, con el adsorbente C18 previamente acondicionado y con muestra fortificada en una relación 1:1, logrando obtener una secuencia de elución que elimina a los interferentes que afectan a la detección de los analitos en la muestra y obteniendo porcentajes de recuperación mayores al 80 % de los compuestos de interés. Respecto a la validación del método DMFS-HPLC-UV, los coeficientes de variación para la repetibilidad y la precisión intermedia fueron aceptables, menores al 5 %; se obtuvo un comportamiento lineal en un intervalo de concentración de 0.25 a 50 ng/mg. Los límites de detección (0.014-0.027 ng/mg) y los límites de cuantificación (0.026-0.081 ng/mg) son considerados bajos para el sistema de detección UV. También se evaluó la robustez del método, aplicándolo a otras muestras vegetales de tipo hoja y en una microalga, la *Spirulina*, utilizada como

suplemento alimenticio obteniendo resultados similares, por lo que se puede decir que el método propuesto fue robusto y cumple con las tendencias modernas de la Química Analítica. Finalmente, se aplicó la metodología analítica a veinte lechugas diferentes adquiridas en distintos mercados representativos de la Ciudad de México, donde se determinó que dichas muestras estaban ausentes de los AINE de estudio.

INTRODUCCIÓN

Los contaminantes emergentes corresponden en la mayoría de los casos a compuestos no regulados, que pueden ser candidatos a regulación futura dependiendo de investigaciones sobre sus efectos potenciales en la salud y los datos de monitoreo con respecto a su incidencia. Ejemplos de los compuestos que han emergido recientemente, como particularmente relevantes, son: surfactantes, productos farmacéuticos, productos para el cuidado personal, aditivos de las gasolinas, retardantes de fuego, antisépticos, aditivos industriales, esteroides, hormonas y subproductos de la desinfección del agua. La característica de estos grupos de contaminantes es que no necesitan persistir en el ambiente para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se pueden compensar por su introducción continua en el ambiente. Para la mayoría de estos contaminantes emergentes, la incidencia, la contribución de riesgo y los datos ecotoxicológicos no están disponibles, así que es difícil predecir qué efectos de salud pueden tener en seres humanos y organismos acuáticos (Barceló, 2003).

Este trabajo se centra en los contaminantes emergentes conocidos como los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (abreviados AINE), los cuales son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipirético (Page et al., 1998). El consumo de AINE en el mundo se estima en torno a 216 millones de dosis al día, con una media de consumo de 100 comprimidos de aspirina por persona al año en EE.UU (Buer, 2014). El consumo desmedido de este tipo de fármacos, y por ende la demanda para las farmacéuticas en la síntesis de dichos compuestos, así como la nula regulación en el manejo de residuos farmacéuticos ha generado interés en la comunidad científica sobre su existencia y persistencia de este tipo de compuestos en la naturaleza (Barceló, 2003).

Existe evidencia científica que estos contaminantes emergentes ya se encuentran presentes en los sistemas efluentes de México, tales como ríos, lagos y mares. Además se sabe que los sistemas actuales de tratamiento de agua no son lo suficientemente efectivos para removerlos, ya que su diseño no fue realizado para la remoción de este tipo de compuestos (Jiménez, 2001). Por esta razón la preocupación de su incidencia y persistencia en alimentos que están en frecuente contacto con el agua y la tierra es de mayor importancia.

Así, alimentos como las frutas y verduras son de interés dado su gran contenido en agua en el mismo, lo que hace probable la existencia de los AINE en este tipo de matrices.

Dado lo novedoso y lo específico del tema, en la literatura científica no se cuenta con demasiada información acerca de la presencia de AINE en alimentos susceptibles de contaminación, esto se debe a que este grupo de contaminantes en México apenas se están estudiando, y no se cuentan con suficientes metodologías involucradas en la preparación de muestras de tipo alimenticio para el posterior análisis cromatográfico de los analitos de interés.

La Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) es un técnica de extracción que se caracteriza por su eficiencia para la separación de una amplia gama de fármacos, pesticidas y otros compuestos de diversos tipos de muestras sólidas o semisólidas, ya sean vegetales o animales. La técnica consiste en dispersar la muestra en los adsorbentes convencionales utilizados en la Extracción en Fase Sólida (EFS), formando una columna con carácter cromatográfico único donde los componentes de la muestra a su vez son fraccionados por eluentes apropiados (Steven, 2007).

Si la cantidad de la muestra disponible es muy pequeña, existe la posibilidad de miniaturizar los métodos basados en DMFS, disminuyendo la cantidad de fase dispersante a utilizar y los disolventes de limpieza y elución (Kristenson, 2001). Considerando las características de la DMFS, es de notarse que puede ser aplicada a la extracción de los AINE en muestras sólidas de tipo alimenticio.

OBJETIVOS

1. Desarrollar y validar un método analítico basado en la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS) y a la Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) con detección por ultravioleta (UV) para la determinación de ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco, flurbiprofeno y fenilbutazona en vegetales de hoja.
2. Efectuar la aplicación de este método analítico a la búsqueda de estos AINE en distintos vegetales de hoja como lo son: lechugas, acelgas, perejil, espinaca, col blanca, germen de trigo, epazote, apio, cilantro y la *Spirulina* una alga que se comercializa como cápsulas, adquiridos en mercados distribuidos en diferentes zonas de la Ciudad de México.

HIPÓTESIS

Dada la presencia de los fármacos antiinflamatorios (AINE) no esteroideos en los sistemas acuáticos de México, y conociendo que los sistemas actuales de purificación de la misma tanto del agua de riego como potable no eliminan a los AINE. Alimentos de hoja como la lechuga, al estar en contacto con esta agua de riego, y al ser una matriz que absorbe cantidades apreciables de agua, se encontrarán AINE en un orden de magnitud de una parte por millón, según reportes encontrados (Dodgen, 2013). Por lo que la metodología que se proponga permitirá identificar estos compuestos en dichas matrices alrededor 1 ng/mg.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1 Contaminación del agua

1.1.1 Panorama general

El agua es un recurso natural escaso, indispensable para la vida humana y el sostenimiento del medio ambiente, que como consecuencia del rápido desarrollo humano y económico y del uso inadecuado que se ha hecho de ella como medio de eliminación de sustancias, ha sufrido un alarmante deterioro. Durante décadas, toneladas de sustancias biológicamente activas, sintetizadas para su uso en la agricultura, la industria, la medicina, etc., han sido vertidas al medio ambiente sin reparar en las posibles consecuencias. Al problema de la contaminación, que comenzó a hacerse notable ya a principios del siglo XIX, cabe añadir el problema de escasez del agua. (Daughton, 2004)

Las medidas legislativas que se han ido adoptando progresivamente para evitar la contaminación química del agua y los riesgos que se derivan de ella han contribuido a paliar parcialmente esta situación. Sin embargo, la creciente demanda de agua y el descubrimiento continuo de nuevos contaminantes potencialmente peligrosos dejan clara la necesidad de seguir investigando en todas aquellas áreas que puedan contribuir a proteger la salud humana y la del medio ambiente, conseguir un uso sostenible del agua y atenuar los efectos de la sequías y el cambio climático.

La aparición de elementos no deseables y tóxicos, y la variación en las concentraciones de los constituyentes comunes, tiene su origen en el denominado "ciclo del agua". En alguna parte de este ciclo, en el cual confluyen distintos compartimentos ambientales y actividades humanas, es donde se produce la contaminación del agua, o mejor dicho, la alteración de su calidad. De acuerdo con este ciclo, las principales vías de entrada de contaminantes en el medio ambiente acuático son las aguas residuales, entre las que se incluyen las urbanas, industriales, y las de origen agrícola o ganadero. La prevalencia de una u otra depende en gran medida del tipo de contaminación de que se trate y del nivel de depuración o atenuación natural que experimentan (Sole et al, 2012).

1.1.2. Contaminantes emergentes

Durante décadas, la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de los contaminantes químicos cuya presencia en el medio ambiente ha estado o está regulada en las distintas legislaciones, contaminantes en su mayoría apolares, tóxicos, persistentes y bioacumulables, como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, los policlorobifenilos (PCBs) o las dioxinas (Calderón-Preciado et al, 2011).

Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de nuevos y más sensibles métodos de análisis ha permitido alertar de la presencia de otros contaminantes, potencialmente peligrosos, denominados globalmente como emergentes, donde estudios en México (Cañedo F, 2010) ha reportado concentración del orden de ppb para algunos analitos como el diclofenaco, ketoprofeno y naproxeno en agua potable.

Los contaminantes emergentes, cuyo estudio 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 para la Protección del Medio Ambiente (EPA), o la Comisión Europea, se definen como contaminantes previamente desconocidos o no reconocidos como tales cuya presencia en el medio ambiente no es necesariamente nueva, pero sí la preocupación por las posibles consecuencias de la misma (Daugton, 2004).

Los contaminantes emergentes son compuestos de los cuales se sabe relativamente poco o nada acerca de su presencia e impacto en los distintos compartimentos ambientales, razón por la cual y a su vez consecuencia de que no hayan sido regulados, y de que la disponibilidad de métodos para su análisis sea nula o limitada. Otra particularidad de estos compuestos, es que debido a su elevada producción y consumo, y a la continua introducción de los mismos en el medio ambiente, no necesitan ser persistentes para ocasionar efectos negativos (Petrovic et al., 2003).

La lista de contaminantes emergentes incluye una amplia variedad de productos de uso diario con aplicaciones tanto industriales como domésticas. Algunos de ellos, a raíz de las intensas investigaciones llevadas a cabo en los últimos años, han sido incluidos en la lista de sustancias prioritarias en el agua. Este es el caso de los retardantes de llama difenil éteres polibromados, los detergentes de tipo alquilfenol etoxilado y sus derivados y las

parafinas cloradas. Otros compuestos, como los pesticidas, ya estaban sujetos a legislación en el agua, pero el descubrimiento de productos de degradación tóxicos, ha renovado el interés por los mismos. Por último, en otros casos, como en el de los detergentes perfluorados, o los fármacos, la toma de conciencia del riesgo que ocasiona su presencia en el medio ambiente es relativamente reciente, y no se tienen aún datos suficientes para una valoración apropiada de su impacto. Además, muchos de ellos, como por ejemplo los retardantes de llama bromados, los detergentes de tipo alquilfenol etoxilado y algunos fármacos, son disruptores endócrinos, lo que implica que una exposición a los mismos puede dar lugar a alteraciones en el crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento de los organismos vivos, de las más alarmantes y mejor documentadas es la feminización en organismos acuáticos superiores (Barceló, 2003).

De acuerdo con las revisiones bibliográficas realizadas en los últimos años (Daughton, 2011) tanto por el autor de este trabajo como por otros grupos científicos internacionales, entre las clases de contaminantes emergentes que demandan una mayor y más urgente atención (debido a la escasez de datos ambientales, datos ecotoxicológicos, de métodos para su análisis, y a las posibles consecuencias de su presencia en el medio ambiente) se encuentran:

- ✚ Los retardantes de llama bromados
- ✚ Los cloroalcanos
- ✚ Pesticidas polares
- ✚ Los compuestos perfluorados
- ✚ Los fármacos
- ✚ Drogas de abuso, y
- ✚ Metabolitos y/o productos de degradación de las clases de sustancias anteriores

1.1.3. Fuentes de producción de los contaminantes emergentes

Dentro de las principales fuentes de producción hacia el medio ambiente de este tipo de contaminantes tenemos las siguientes: 1. La ineficiente disposición de residuos sólidos (incineración continua y los numerosos tiraderos de basura), 2. Los derrames de productos peligrosos, 3. La aplicación masiva de pesticidas en la agricultura, 4. La recarga artificial

del agua subterránea, 5. La disposición en el suelo de los lodos de las plantas de tratamiento de aguas residuales y 6. Las actividades de consumo humano, que incluye la excreción y la disposición natural de una amplia gama de productos químicos tales como los productos de cuidado personal (PCPs). Las actividades de consumo se han reconocido recientemente como una fuente potencialmente importante de contaminación dispersa no controlada (Farré, 2002).

1.1.4. Fármacos como contaminantes emergentes

De todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos y, en particular, los antibióticos. El consumo de fármacos en los países de la Unión Europea (UE) se cifra en toneladas por año, y muchos de los más usados, entre ellos los antibióticos, se emplean en cantidades similares a la de los pesticidas (Castiglioni, 2005).

Las primeras evidencias de la presencia de fármacos en el medio acuático se produjeron en los años 70 con la identificación en aguas residuales en EEUU del ácido clofibrico, que es el metabolito activo de varios reguladores de lípidos en sangre (clofibrato, etofilin clofibrato, y etofibrato). Sin embargo, no ha sido hasta principios de la década de los 90 que el tema de los fármacos en el medio ambiente ha surgido con fuerza, como demuestran los numerosos artículos publicados desde entonces, los cuales han despertado un gran interés científico y social (Gross et al., 2006).

Entre los fármacos más prescritos destacan los analgésicos/antiinflamatorios como el ibuprofeno y el diclofenaco, los antiepilépticos como la carbamazepina, antibióticos como la amoxicilina y el sulfametoxazol, y los β - bloqueantes como el metoprolol (Buser et al., 1999). Según las propiedades físico-químicas de los fármacos y sus metabolitos y productos de degradación, y las características de los suelos, estas sustancias pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidas en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. En consecuencia, para una evaluación realista del medio acuático es necesario un estudio integrado agua subterránea-suelo/sedimento-agua superficial-suelo.

Los fármacos que se han detectado en el medio ambiente acuático, ya sea

directamente o sus metabolitos, incluyen analgésicos/antiinflamatorios, antibióticos, antiepilépticos, β -bloqueantes, reguladores de lípidos, medios de contraste en rayos X, anticonceptivos orales, esteroides y otros, como broncodilatadores, tranquilizantes, etc. (Hernando et al., 2006).

Las concentraciones a las que se han encontrado en aguas superficiales (como consecuencia de una eliminación incompleta en las plantas de depuración de aguas) o en aguas subterráneas (debido a la escasa atenuación que experimentan algunos compuestos durante la filtración a través de suelos) se sitúan normalmente en el intervalo de ng/L o $\mu\text{g/L}$, mientras que en suelos y sedimentos, en donde pueden persistir durante largos periodos de tiempo (la vida media del ácido clofibrico, por ejemplo, se estima en 21 años), alcanzan concentraciones de hasta g/Kg (Hernando et al., 2006; Fent et. al., 2006). Pero lo que ha despertado una mayor preocupación ha sido el hallazgo de algunos de ellos (como el ibuprofeno, el diclofenaco, la carbamazepina, o el ácido clofibrico) en aguas potables (Hullman, 2009).

En muchos casos, las consecuencias de su presencia en el medio ambiente no están aún claras, pero en otros el riesgo parece evidente, y alarmante. Por ejemplo, el diclofenaco, aparte de afectar a los riñones en los mamíferos, se ha asociado (como consecuencia de su uso en veterinaria) con la desaparición de los buitres blancos en la India y Pakistán, lo que supone, según el autor de este estudio (Fent et al., 2006), un desastre ecológico comparable al acontecido en el pasado con el DDT.

1.1.5 Regulación y panorama actual en la investigación

Como resultado de las investigaciones llevadas a cabo hasta ahora, algunos fármacos están siendo considerados por la US EPA como posibles candidatos a ser incluidos en la lista de los contaminantes orgánicos prioritarios en el agua potable, como es el caso del diclofenaco (antiinflamatorio), la carbamazepina (antiepiléptico), y el cloranfenicol (antibiótico). En la UE, por el momento, no se han fijado límites máximos en el agua potable, y por tanto, no es necesario el seguimiento de tales compuestos, sin embargo, lo más probable es que en un futuro próximo sean regulados.

Como es de esperar al no existir regulación alguna en la Unión Europea, así como en los Estados Unidos de Norteamérica; México se encuentra con muchos años de atraso en

este t3pico, mientras que para el 2000 ya hab3a art3culos publicados sobre contaminantes emergentes en los sistema fluviales, en M3xico apenas se estaba informando a la comunidad cient3fica de estos nuevos contaminantes y por ende abriendo nuevas l3neas de investigaci3n. Esto conlleva a que no hay regulaci3n alguna para los f3rmacos en los sistemas acu3ticos en la Rep3blica Mexicana.

Por el momento el n3mero de art3culos dedicados al an3lisis de f3rmacos en aguas es muy superior al del an3lisis en matrices s3lidas (Hernando et al., 2006). Ello probablemente es debido a la falta de metodolog3as anal3ticas para el estudio de estos compuestos en tales matrices complejas. Sin embargo, los avances tecnol3gicos habidos en el campo de la Qu3mica Anal3tica permiten afrontar hoy por hoy este reto con grandes probabilidades de 3xito.

Para el an3lisis de f3rmacos se han empleado fundamentalmente la cromatograf3a de gases y la de l3quidos con espectrometr3a de masas, pero la tendencia es a emplear, tanto en una como en otra, la espectrometr3a de masas en t3ndem para poder diferenciar entre posibles is3meros (Barcel3, 2003; Petrovic et al., 2003; Petrovic et al., 2013). En la **secci3n 1.3** (m3todos de an3lisis) se profundizar3 sobre este aspecto.

1.2. F3rmacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

1.2.1. Modo de acci3n

Los antiinflamatorios no esteroideos disponibles en el mercado inhiben la actividad tanto de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) como a la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y, por lo tanto, la s3ntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Se piensa que es la inhibici3n de la COX-2 la que en parte conlleva a la acci3n antiinflamatoria, analg3sica y antipir3tica de los AINE, sin embargo, aquellos que simult3neamente inhiben a la COX-1 tienen la capacidad de causar hemorragias digestivas y 3lceras, por ejemplo el 3cido acetil salic3lico. Por lo tanto, se enfatizan las ventajas de inhibidores selectivos para la COX-2 (Hardman, 1996).

El AINE prototipo es la aspirina[®] y le acompa3an una gran variedad de 3cidos org3nicos, incluyendo derivados del 3cido prop3lico (como el ibuprofeno y naproxeno), derivados del 3cido ac3tico (como la indometacina) y 3cidos en3licos (como el piroxicam), todos competidores con el 3cido araquid3nico por el sitio activo de la ciclooxigenasa. A

partir del año 2012 en los consensos internacionales el paracetamol se excluye de los AINE's, por su poca/nula acción antiinflamatoria.

1.2.2. Clasificación

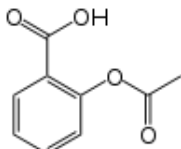
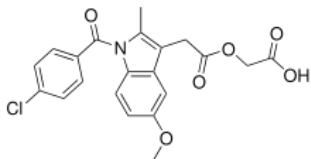
La tendencia actual en las clasificaciones es a agruparlos según su capacidad de inhibir el 50% de la COX-2 en comparación con la concentración necesaria para inhibir el 50% de la COX-1. De ahí que resumiendo todos los datos obtenidos se ha intentado agrupar a los AINE según (Castells et al., 2007):

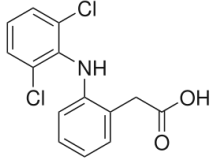
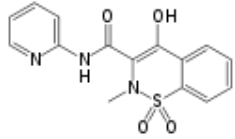
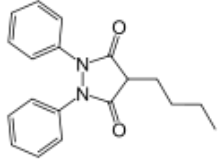
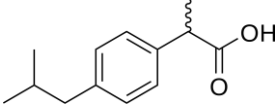
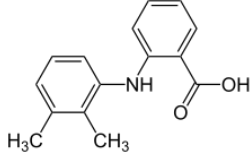
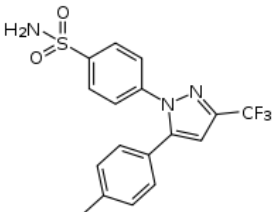
1. La equipotencia inhibidora de COX-2 versus COX-1
2. El porcentaje de inhibición de COX-1 cuando se inhibe el 80% de la COX-2, que correspondería a la concentración necesaria de un AINE para lograr efectos terapéuticos relevantes

De otras clasificaciones posibles para los AINE, quizás la más utilizada sea la que se basa en su estructura molecular.

En la **tabla 1.1** se puede observar la clasificación en función de la estructura química básica sobre la que se desarrolla cada fármacos.

Tabla 1.1 Clasificación de los AINE según su estructura molecular

	Clasificación	Ejemplo
Fármacos antiinflamatorios no esteroideos	Salicilatos	Ácido acetilsalicílico 
	Derivados indol-acéticos	Acemetacina 

	Clasificación	Ejemplo
Fármacos antiinflamatorios no esteroideos	Derivados arilos-acéticos	<p style="text-align: center;">Diclofenaco</p> 
	Ácidos enólicos	<p style="text-align: center;">Piroxicam</p> 
	Pirazolonas	<p style="text-align: center;">Fenilbutazona</p> 
	Derivados arilpropiónicos	<p style="text-align: center;">Ibuprofeno</p> 
	Fenematos	<p style="text-align: center;">Ácido mefenámico</p> 
	Coxibes	<p style="text-align: center;">Celecoxib</p> 

1.2.3. Quiralidad

La mayoría de los AINE, especialmente los derivados del ácido propiónico, son moléculas que tienen un centro de asimetría, por lo que pueden existir en dos isómeros ópticos o enantiómeros, el diclofenaco es una notable excepción. Para algunos de estos casos, existen enzimas isomerasas en el organismo que convierten al enantiómero inactivo a su forma opuesta activa. Por ejemplo, el ibuprofeno y el ketoprofeno existen en preparaciones compuestas sólo por el enantiómero activo: el *dexibuprofeno* y *dexketoprofeno* respectivamente, que son los enantiómeros de configuración (*S*). Por su parte, el naproxeno siempre ha sido preparado en su forma enantiómera inactiva; ambos enantiómeros son activos y tienen efectos antiinflamatorios equiparables. El resto de los AINE con quiralidad vienen en presentaciones mixtas de enantiómeros, es decir, la misma cantidad del enantiómero *R* que del *S* (mezcla racémica).

1.2.4. Analitos de estudio: ibuprofeno, naproxeno, diclofenaco, fenilbutazona, flurbiprofeno y ketoprofeno.

1.2.4.1. Estructuras químicas

En la **figura 1.1** se pueden observar las estructuras químicas de los analitos que se trabajaron en este proyecto.

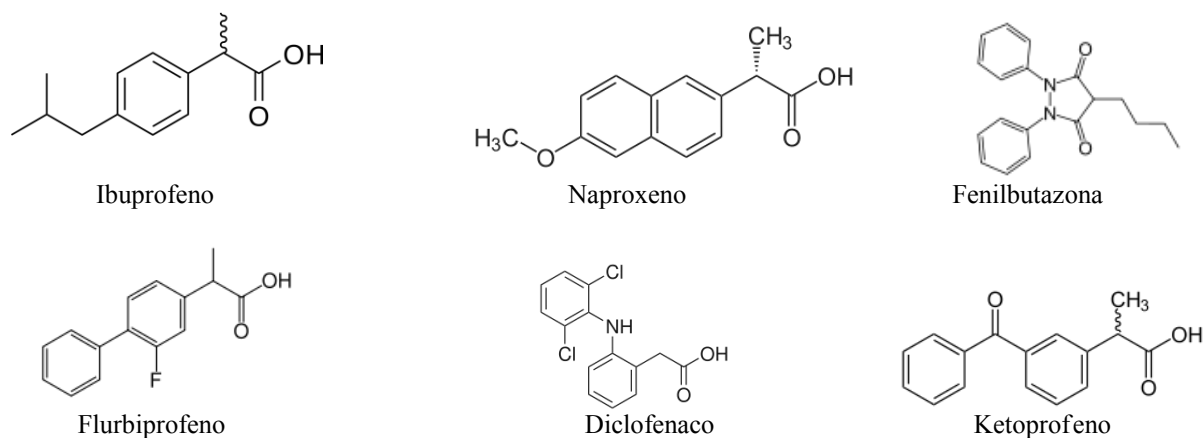


Figura 1.1 Estructuras de los AINE seleccionados para este trabajo

Como se puede observar en las estructuras de la **figura 1.1** cinco compuestos de los seis de estudio presentan el grupo funcional ácido carboxílico, por lo que es lógico esperar que dichos fármacos tenga asociado un valor de pKa.

El diclofenaco es un AINE de tipo arilo-acéticos. El ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y el flurbiprofeno por la cadena de tres átomos de carbono del lado del ácido carboxílico pertenecen a la familia de los derivados de arilpropiónicos. En cuanto a la fenilbutazona, pertenece a la familia de los ácidos enólicos, específicamente a las pirazolonas, por ende también presentará propiedades ácido-base. Por sus estructuras también se puede observar que son compuestos relativamente estables por la presencia de los electrones π conjugados, lo que con lleva que sean sólidos a temperatura ambiente y su volatilidad sea pequeña. Son solubles en varios disolventes orgánicos, pero muy poco solubles en agua en su forma molecular.

1.2.4.2. Propiedades físico-químicas de los analitos

La solubilidad, estabilidad, propiedades ácido-base, volatilidad y la hidrofobicidad ($\log k_w'$)¹ son propiedades que se deben conocer y entender de los analitos antes de realizar cualquier procedimiento experimental. En la **tabla 1.2** a modo de resumen se encuentran las propiedades citadas con anterioridad para los seis fármacos de estudio.

Tabla 1.2. Propiedades físico-químicas de los AINE de interés. (Costas, 2013).

Analito	PM (g/mol)	Pfus (°C)	Solubilidad en agua (25 °C) en mg/L	pKa	Log k_w'
Ketoprofeno	254.28	94	51	4.50	3.12
Naproxeno	230.26	153	15.9	4.15	3.18
Fenilbutazona	308.15	105	34	4.45	3.16
Flurbiprofeno	244.26	117	8	4.42	4.16
Diclofenaco	296.18	158	2.37	4.15	4.51
Ibuprofeno	206.13	77	21	4.91	3.97

¹ Log k_w' = logaritmo del factor de retención en agua pura extrapolado mediante una curva con diferentes fases móviles hidrometanólicas a, pH= 2.0 y fase estacionaria C18..

Existen constantes que es útil conocer antes de comenzar con el trabajo de desarrollo en el laboratorio de química analítica y también para poder realizar una eficiente experimentación, una de ellas es el coeficiente de reparto octanol/agua ($\log P_{\text{oct}}$), este es un parámetro que caracteriza la hidrofobicidad de los analitos y por ende es un reflejo de la polaridad de los mismos. Este parámetro también se puede relacionar con el logaritmo del factor de retención cuando es agua pura ($\log k'_w$), este parámetro es difícil de encontrar en la literatura científica, ya que existe pocas publicaciones que lo reportan. Se sabe que cuando el log de P_{oct} ó $\log k'_w$ es mayor a 3.0 unidades se puede asumir un comportamiento apolar de los analitos, cuando está entre 1 y 3 decimos que son medianamente polares y menores a 1.0 son polares (Pawel et. al., 2008).

En la **tabla 1.2** se observa el $\log k'_w$ para los seis fármacos, esta constante se encuentra entre 3.1 y 4.16, lo que nos indica que la mayoría de los compuestos presentan un carácter medianamente polar, siendo el menos polar o el más hidrófobo el diclofenaco

El valor de k'_w de una sustancia está relacionado con su capacidad de adsorción o su potencial de bioconcentración en tejidos grasos. Un valor bajo de k'_w indica la probable movilidad y transporte de ese material por su buena solubilidad, y fácil metabolización y biodegradación, es decir, hay que esperar una escasa bioacumulación. Por el contrario, un valor alto de k'_w indica posible adsorción en tejidos grasos, suelo y sedimentos. Por tanto, es probable la bioconcentración o bioacumulación. Su escasa movilidad favorece la toxicidad de estas sustancias (Gert-Jande de Maagd et al., 1997).

Otra constante muy usada en el análisis de matrices ambientales como el aire, es la constante de Henry, esta nos dice que tan fácil es que un analito que se asume tiene volatilidad apreciable pase a la fase gaseosa. Dada la matriz que se trabajó en este proyecto, esta constante no se reportó, sin embargo en la literatura se encontró para algunos de estos fármacos una constante de Henry con un orden de magnitud de 10^{-8} . Es sabido que conforme la constante de Henry aumenta, la volatilidad del compuesto es mayor, en este caso éstas son muy pequeñas, es decir, la volatilidad de estos fármacos puede ser despreciable lo que hará que en matrices gaseosas sea muy difícil encontrar este tipo de analitos.

También se observa que los valores de pKa oscilan entre 4.1 y 4.9, esto nos dice que se tratan de ácidos que están totalmente disociados en medio acuoso natural y que para una

extracción y separación de los mismos en una muestra el pH tendrá un papel importante. Por debajo del valor de pKa los analitos se encontrarán en su forma molecular, mientras que un pH por arriba del valor de pKa los compuestos se encontrarán en su forma disociada.

Al tratarse de compuestos orgánicos aromáticos de peso molecular arriba de 200 unidades de masa atómica, su solubilidad en agua es baja, sin embargo dado el grupo ácido carboxílico que presenta estos compuestos son solubles en disolventes polares próticos, como son el metanol o etanol, ya que los fármacos se asociarán por puentes de hidrógeno con alguno de los disolventes mencionados, formando fuerzas intermoleculares de la misma magnitud, logrando una solubilidad total del fármaco sólido.

1.3. Técnicas de análisis instrumentales usadas para AINE

1.3.1 Cromatografía de gases (CG)

Esta técnica se ha utilizado para realizar análisis de AINE en diversas matrices, sin embargo no es la técnica cromatográfica que se utiliza con frecuencia para este tipo de analitos, ya que estos son analitos presentan presiones de vapor más bajas que los compuestos que se suelen comúnmente analizar por cromatografía de gases.

En la **tabla 1.3** se muestran las publicaciones reportadas en los últimos años para el análisis de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos en diversas matrices utilizando la cromatografía de gases. Para realizar la discusión de manera más sencilla, sólo se presentan los AINE que se utilizaron, la matriz de las que se extrajo, si se tuvo que hacer alguna reacción de derivatización y el autor de la referencia. Más adelante, en las tablas de la sección 1.5 titulada aplicaciones de las técnicas y métodos de preparación de muestra para el aislamiento y cuantificación de AINE en diversas matrices, se encuentra descrito las condiciones del análisis (tipo de columna, gradientes, límites de detección etc) así mismo se encuentra descrita la metodología de extracción utilizada para cada caso particular reportado.

Tabla 1.3. Análisis publicados para los AINE utilizando cromatografía de gases

AINE's	Matriz	Observaciones	Referencia
Ibuprofeno, ácido flufenámico, diclofenaco	Orina y plasma	Derivatización con yoduro de metilo	Cárdenas et al, 1996
Ibuprofeno y ácido flufenámico	Aguas residuales	Derivatización con sulfato de dimetilo. Detector de masas	Araujo et al, 2008
Ácido clofibrico, ibuprofeno y naproxeno	Aguas residuales	Derivatización con una carbodiimida. Detector masas	Grueiro-Noche et al, 2011
Ibuprofeno	Agua residuales	Derivatización con trifluoroetilamina. Detector de masas	Casas-Ferreira et al, 2011
Ibuprofeno, naproxeno y diclofenaco	Agua residual	Derivatización con un derivado del diazometano. Detector de masas.	Hu et al, 2011
Ibuprofeno, naproxeno, ketoprofeno y diclofenaco	Agua residual	Derivatización con agentes sililantes. Detector masas	Sebok et al, 2008
Ácido salicílico, Ibuprofeno, diclofenaco, paracetamol y fenilbutazona	Tejidos animales Sangre y orina Suelos y sedimentos	Derivatización con trifluoroacetamida. Detector masas	Azzous et al, 2011
Ibuprofeno, naproxeno, ácido meclofenámico	Leche de bovinos	Derivatización con un clorofomato. Detector masas.	Arroyo et al, 2011
Ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno	Aguas de ríos y lagos	Derivatización con feniletilamina	Hashim et al, 2011
Paracetamol y ácido salicílico	Sangre y plasma humano	Detector de masas.	Meyer et al, 2011
Naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno	Agua de ríos y lagos	Detector FID	Sarafraz-Yazdi et al, 2012
Naproxeno, ibuprofeno y ketoprofeno	Agua de ríos y lagos	Derivatización con sulfato de tetrabutilamonio. Detector FID	Eshaghi et al. 2009
Naproxeno e ibuprofeno	sangre	Detector FID y confirmación de masas	Engelhart et al, 2007

Como se puede observar en la tabla, la mayoría de los análisis para este tipo de analitos requieren una previa derivatización, lo que hace que el análisis sea más tardado, además de tener un paso más que necesita ser optimizado, también el análisis se limita a mezcla de pocos fármacos, ya que al tener presiones de vapor similares, la separación no es tan eficiente, lo que limita también el número de analitos a cuantificar.

Por lo anterior, la técnica cromatográfica que se utiliza con mayor frecuencia en el análisis de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos es la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, cuyas aplicaciones para AINE se describen en el siguiente apartado.

1.3.2. Cromatografía de líquidos

En la **tabla 1.4** se muestran de la misma forma a modo de resumen las publicaciones más recientes para el análisis de los AINE, haciendo uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia para diversas matrices. Como ya se mencionó, y de la misma forma que en el apartado anterior, esta tabla sólo tiene como finalidad presentar el número de publicaciones que se han realizado en los últimos años para la identificación de AINE haciendo uso de HPLC, las características del análisis y la preparación de muestra se encuentran en la sección de aplicaciones (sección 1.5).

Tabla 1.4. Análisis publicados para los AINE utilizando cromatografía de líquidos de alta eficiencia

AINE's	Matriz	Condiciones	Referencia
Ibuprofeno, ácido flufenámico, piroxicam, diclofenaco y paracetamol	Preparaciones homeopáticas fraudulentas	HPLC-ESI-MS	Panusa et al, 2007
Firocoxibe	Orina y plasma de caballo y perro	Comparación de HPLC-UV (254 nm) con HPLC-MS/MS.	Letendre et al, 2007
Diclofenaco	Plasma humano	Detección UV (276 nm).	Rigato et al, 2009
Aspirina, tenoxicam, ketorolaco, tolmetin, naproxeno, flurbiprofeno, diclofenaco e ibuprofeno	Sangre, plasma y eritrocitos	Comparación en HPLC-UV-MS Con UHPLC	Sultan et al, 2005

Tabla 1.4. (Continuación)			
AINE´s	Matriz	Condiciones	Referencia
Aspirina, paracetamol, diclofenaco e ibuprofeno	Suelos y sedimentos	LC-MS/MS	Pérez-Carrera et al, 2010
Ketoprofeno, naproxeno, diclofenaco e ibuprofeno	Lodo	LC-ESI-MS/MS	Sagristrá et al, 2010
Meloxicam, flunixin ácido tolfenámico y fenilbutazona	Plasma y leche de bovino	LC-ESI-MS/MS	Dowling et al, 2010
Meloxicam, carprofeno, ácido tolfenámico y ácido clofibrico	Muestras de hígado	HPLC-MS	Igualada et al, 2007
Firocoxib, propilfenazona, ramifenazona y piroxicam	Plasma de bovino	LC-ESI-MS/MS	Dowling et al, 2011
Flunixin, diclofenaco, meloxicam, carprofeno y ácido tolfenámico	Músculo animal	LC-MS/MS	Jedziniak et al, 2010
Ácido mefenámico, indometacina, etodolaco y ketoprofeno	Agua de río	LC-MS/MS	Hoshina et al, 2011
Aspirina, diclofenaco, ibuprofeno, naproxeno, ácido mefenámico, paracetamol	Agua tratada de hospitales	LC-ESI-MS/MS	Sim et al, 2011
Ibuprofeno, ketoprofeno y naproxeno	Orina	LC-ESI-MS/MS Con derivatización tipo carbodiimida	Kretschmer et al, 2011
Ketoprofeno, fenbufeno, ibuprofeno y naproxeno	Muestras acuosas ambientales	Detector UV (276 nm). Columna monolítica C18	Luo et al, 2011

Tabla 1.4. (Continuación)			
AINE´s	Matriz	Condiciones	Referencia
Aceclofenaco	Suero humano	Detector UV (258 nm)	Ohja et al, 2009
Meloxicam	Plasma humano	Detector UV (355 nm)	Bae et al, 2007
Flurbiprofeno, naproxeno, ketoprofeno e indometacina	Orina	Detector UV (254 nm) Fase móvil: Metanol/agua/ácido acético	Cruz-Vera et al, 2009
Celecoxibe	Plasma humano	Separación (nucleosil-NO ₂) Detector UV 260 nm	Rose et al, 2000
Firocoxibe	Plasma de caballo y perro	Detector UV 290 nm	Kvaternick et al, 2007.
Diclofenaco	Aguas residuales	Detector DAD (272 nm) comparación con detector de masas	Dai et al, 2011
Diflunisal, fenoprofeno, flurbiprofeno, diclofenaco, indometacina, aspirina y paracetamol	Aguas residuales	HPLC –DAD	Shaaban et al, 2011
Ketorolaco	Plasma de ratas	UHPLC-MS/MS. Gradiente con acetonitrilo: buffer	Radwan et al, 2010
Paracetamol, ketoprofeno, aspirina y sus metabolitos más comunes	Orina de humano y agua potable	UHPLC, Columna monolítica C18	Baranowska et al, 2010
Multi-residuo AINE´s	Músculo de cerdo	UHPLC-ESI-MS/MS	Hu et al, 2011
Ketoprofeno	Piel de humano	UHPLC-ESI-MS/MS	Tetty-Amlalo et al, 2009
Naproxeno, felbinaco y ácido clofibrico	Plasma humano	Derivatización. Detección Fluorescencia	Sakaguchi et al, 2011

Tabla 1.4. (Continuación)			
AINE´s	Matriz	Condiciones	Referencia
Flurbiprofeno, carprofeno, naproxeno, ácidos flúmicos	Leche de bovino	Detección fluorescencia	Gallo, et al, 2010
Naproxeno	Lodos	Detección fluorescencia	Larsson et al, 2009
Ketoprofeno, flurbiprofeno y etodolaco	-	Reacción de derivatización quiral	Jin et al, 2008

MS: Espectrometría de masas. HPLC: Cromatografía de líquidos por sus siglas en inglés. DAD: Arreglo de diodos. UV: Ultravioleta. ESI: Ionización por electrospray

Como se puede observar los análisis realizados con HPLC son más numerosos que con la cromatografía de gases, además de que en la mayoría de los casos no se requiere derivatizar los analitos, lo que hace que el análisis sea más económico y con un paso menos, lo que se traduce en una fuente de incertidumbre menor al análisis, y mayor reproducibilidad en el mismo.

Haciendo una comparación en las **tablas 1.3 y 1.4**, se puede observar que los artículos más recientes, tienden a presentar trabajos en donde se tienen acoplados los cromatógrafos a detectores muy sensibles, como lo es un espectrómetro de masas, motivo por el cual la siguiente sección se trata un poco de las ventajas de estos equipos.

1.3.3. Nuevas tecnologías y sistemas acoplados a los sistemas cromatográficos

Actualmente dada la necesidad de alcanzar métodos más sensibles, la espectrometría de masas ha tomado gran importancia en las técnicas analíticas. La espectrometría de masas (MS) es una de las técnicas analíticas más completas que existen. Recientemente, esta técnica se utiliza no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc. Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación de forma prácticamente inequívoca, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Cuantitativa: permite medir la concentración de las sustancias.

- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb y en casos específicos se puede llegar hasta ppt.
- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida: se puede realizar un espectro en décimas de segundo, por lo que puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de compuestos.

Dentro del espectrómetro de masas, se procede a la ionización de la muestra mediante diferentes métodos. El sistema de ionización más frecuente es el de impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones de una cierta energía, capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón de las moléculas y así ionizarlas.

La cromatografía de gases y líquidos como ya se mencionó son técnicas separativas que tiene la cualidad de conseguir la separación de mezclas muy complejas. Pero una vez separados, detectados, e incluso cuantificados todos los componentes individuales de una muestra problema, el único dato de que disponemos para la identificación de cada uno de ellos es el tiempo de retención o volumen de retención de los correspondientes picos cromatográficos. Este dato no es suficiente para una identificación inequívoca, sobre todo cuando analizamos muestras con un número elevado de componentes, como es frecuente en la mayoría de los análisis de rutina e investigaciones.

Por otra parte, la espectrometría de masas puede identificar de manera casi inequívoca cualquier sustancia pura, pero normalmente no es capaz de identificar los componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes, debido a la extrema complejidad del espectro obtenido por superposición de los espectros particulares de cada componente.

Por lo tanto, la asociación de la técnica cromatográfica y el espectrómetro de masas, da lugar a técnicas combinadas GC-MS y HPLC-MS que permiten la separación e identificación de mezclas complejas. Por ejemplo: la utilización de la cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas requiere sistemas especiales de conexión. En principio, se trata de dos técnicas que trabajan en fase gaseosa y necesitan una muy

pequeña cantidad de muestra para su análisis, por lo que son muy compatibles.

De la misma forma si se combina la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas el resultado puede proporcionar una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad. Por este motivo, cada vez son más numerosas las publicaciones que aplican técnicas basadas en el acoplamiento LC-MS.

También dentro de las nuevas tendencias analíticas está la miniaturización y la cromatografía no está exenta de esto. Los métodos que se tenían para el análisis de fármacos y otros compuestos por HPLC se le adaptó al uso de columnas de diámetro interno menor y longitudes mucho más pequeñas, de esta manera se logran velocidades de flujo mayores, con presiones más elevadas, lo que implica análisis mucho mejor resueltos y más rápidos, esta técnica se le conoce como Ultrahigh-pressure Liquid Chromatography (UHPLC). Como se podrá ver en la parte de aplicaciones, efectivamente los artículos más recientes utilizan la UHPLC para separación de AINE en diversas matrices.

Finalmente existen en la actualidad múltiples investigaciones sobre nuevas fases estacionarias para la cromatografía de líquidos, que sean económicas, selectivas y de alta estabilidad, materiales que se ha reportado ya su uso: Polímeros enlazados a las cadenas alquílicas, materiales magnéticos, polímeros molecularmente impresos (MIP's por sus siglas en inglés), nanomateriales, inmunoabsorbentes por mencionar algunos. En la sección 1.4.2.4 se discutirán con mayor profundidad las características de estas fases estacionarias.

1.4. Preparación de muestra para el análisis cromatográfico

1.4.1. Generalidades y características en la preparación de muestra

Cuando se recibe una muestra para analizar en un laboratorio de rutina, el paso que involucra mayor tiempo del analista es la preparación de la misma, y por ende está asociada al 66% de la incertidumbre total del análisis; por este motivo es que se han realizado múltiples estudios relacionados a este tema. (Ramos, 2012)

El objetivo general de la preparación de muestra, es obtener un extracto que contenga a los compuestos de interés, el cual debe estar lo más depurado posible de compuestos co-extraídos que interfieran en el análisis o detección.

También las necesidades actuales de los analistas, han hecho que sus métodos de preparación de muestra sean cada vez mejores, es decir: con el mayor número de analitos de interés, recobros cercanos al 100%, selectivos, precisos, robustos, de bajo costo, alta velocidad, de fácil manejo y seguros para el usuario y el medio ambiente. Esto por el incremento notorio de contaminantes en matrices con las cuales los seres humanos estamos en contacto: agua, aire, suelo, biota y alimentos.

El análisis de los contaminantes orgánicos, los que en la actualidad generalmente se encuentra a nivel de trazas (componente de interés menor a 0.01 % del total de matriz), efectúan la concentración de los analitos por diferentes procedimientos (evaporación o extracción), para que los equipos utilizados en los análisis puedan detectar a los mismos.

Las etapas generales del proceso de preparación de muestra, son 1. disolución de la muestra, 2. extracción o aislamiento, 3. remoción de interferencias (“*clean-up*”) y 4. enriquecimiento de las trazas o la concentración de los analitos. Salta a la vista que un factor importante a considerar, cuando se va a preparar la muestra son las propiedades del analito; las que principalmente tenemos que tener en cuenta son la solubilidad, estabilidad, propiedades ácido-base, volatilidad e hidrofobicidad.

Dadas las tendencias actuales en el modo de preparar una muestra: miniaturización, amigables con el ambiente, rapidez, menos laboriosidad, mayor precisión, altos recobros, y posibilidad de automatizar; la extracción de los analitos se realiza actualmente en dos formas: en modo diferido (*off-line*) y en línea (*on-line*).

El modo *off-line* es cuando la preparación de la muestra y el análisis se realiza por separado. Cuando la extracción es *on-line* está conectada directamente al análisis, en su mayoría de casos a un cromatógrafo.

1.4.2. Técnicas de extracción

1.4.2.1. Objetivo de la extracción

El principal objetivo de la extracción es separar selectivamente el producto de una reacción, o bien eliminar las impurezas que lo acompañan en la mezcla de reacción, gracias a sus

diferencias de solubilidad, o propiedades específicas del analito en el disolvente o adsorbente de extracción elegido.

En este trabajo se utilizó como técnica preparativa la Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), una técnica que hace uso de adsorbentes. Esta técnica de extracción es parecida a la extracción en fase sólida (EFS), por lo que a continuación se describen ambas técnicas, sus principios, fundamentos, así como los factores a optimizar, características, ventajas y desventajas de las mismas.

1.4.2.2. Extracción en fase sólida (EFS)

La EFS tuvo sus inicios con el grupo de investigadores de la US Public Health Service (Cincinnati, EU), éstos usaban un tubo de acero relleno con carbón granulado para la retención de compuestos presentes en muestras de agua de lluvia y superficial. En este trabajo se logró demostrar la presencia de contaminantes provenientes del petróleo en concentraciones de ppm (Braus et. al., 1951); pero no fue sino hasta la década de 1990 que tuvo su mayor crecimiento, cuando investigadores y proveedores realizaron grandes avances en la fabricación y búsqueda de nuevos materiales para la separación de mezclas de diferentes compuestos tanto orgánicos como inorgánicos. (Liska, 2000)

Los fundamentos de esta técnica de extracción son los mismos que operan en la cromatografía de líquidos de alta resolución, por ejemplo los mecanismos de retención, entre éstos se pueden tener retención física, iónica, hidrofóbica y por afinidad (Hennion, 1999). Los adsorbentes utilizados son de carácter hidrófobo (fase reversa), hidrófilos (fase normal), iónicos, mixtos o de exclusión. Se utiliza para la separación selectiva de los analitos en una muestra líquida, comúnmente mediante el uso de cartuchos de extracción mostrados en la **figura 1.2**.

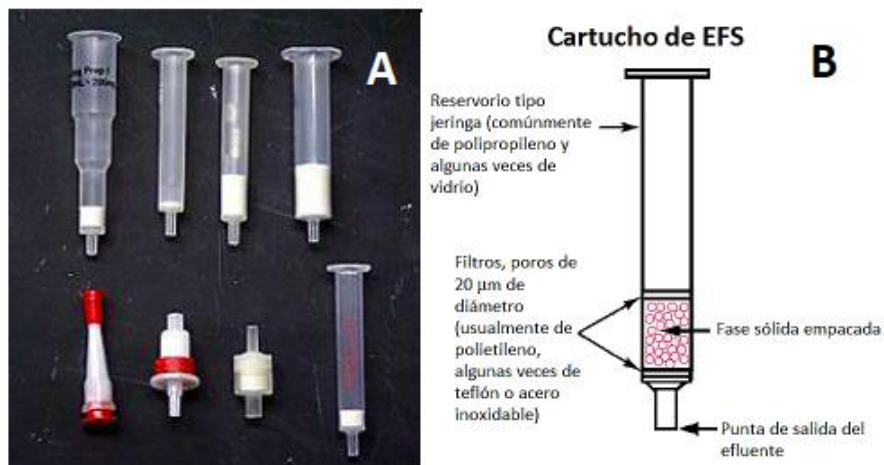


Figura 1.2. (A) Cartuchos comerciales para la extracción en fase sólida. (B) Esquema general de los componentes de un cartucho de EFS (Sigma Aldrich, 1998).

El proceso de extracción en fase sólida consiste principalmente en cinco pasos, estos son:

1. Elección del cartucho de extracción: La selección del tamaño del cartucho, el tipo de fase sólida empacada, así como la cantidad depende de la naturaleza de la muestra, el volumen de la muestra, el nivel de contaminación y el disolvente de la muestra. Los proveedores de este tipo de materia en sus manuales manejan tablas, para que el cliente realice la mejor compra. En la **tabla 1.5** se puede observar recomendaciones generales para hacer la elección del cartucho de EFS.

Tabla 1.5. Recomendaciones generales para la elección de cartuchos de EFS (Sigma-Aldrich Co., 1998)

Elección del tamaño del cartucho de extracción	
Si el tamaño de la muestra es:	El cartucho recomendado será:
Menos de un 1 mL	1 mL
1 mL a 250 mL	3 mL
1 mL a 250 mL (velocidad de extracción rápida)	6 mL
10 mL a 250 mL (alta capacidad de retención)	12, 20 ó 60 mL
250 mL a 1 L	12, 20 ó 60 mL

Elección del diámetro de poros de los filtros (frits)	
Si el tamaño de la muestra es:	El cartucho recomendado será:
Menos de 100 mL	20 μm
De 100 mL a 1 L	47 μm
Mayor a 1 L	90 μm

Elección del contenido del adsorbente empacado	
Tipo de separación:	Cantidad de adsorbente recomendada
Fase reversa, fase normal, adsorción	La masa de los compuestos a extraer no debe ser mayor al 5% del contenido de fase sólida, por ejemplo: a 100 mg de fase sólida no se le deben cargar más de 5 mg de los compuestos a extraer
Intercambio iónico	La capacidad de las resinas de intercambio iónico debe ser evaluado para cada ensayo

Elección del tipo de adsorbente		
Si la muestra es	Carga del analito	Fase recomendada
Acuosa	Polar	Intercambio iónico
	Neutra	Fase reversa
Disolvente orgánico	Polar	Evaporar a sequedad. Reconstituir con disolvente acuoso y aplicar EFS de intercambio iónico.
	Neutro	Evaporar a sequedad y reconstituir con el disolvente adecuado para aplicar EFS en fase normal.

En el caso particular de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), se utilizan adsorbentes de fase reversa como las sílices enlazadas y fases poliméricas, dentro de los adsorbentes más utilizados se encuentra la C18 que permite una buena retención de los analitos y una eficiente recuperación de los mismos.

2. Acondicionamiento del cartucho: Una vez empacado el cartucho, se suele pasar una secuencia de disolventes de diferente fuerza eluente para dejar en óptimas condiciones el cartucho que recibirá a la muestra. De esta forma, se hace pasar cierto volumen de un disolvente de fuerza eluente alta para retirar del cartucho impurezas que estén retenidas en la fase y puedan ser recuperadas junto con los analitos de interés. Después se aplica un disolvente de fuerza eluente baja, regularmente igual al de la muestra, para permitir que la muestra se distribuya homogéneamente sobre el adsorbente durante la extracción.

3. Carga de la muestra a través del cartucho de extracción: La muestra se hace pasar por el cartucho a flujo constante. Para los cartuchos de intercambio iónico, se recomienda un flujo menor a 2 mL/min, para una fase normal, reversa, o de adsorción se recomienda un flujo menor a 5 mL/min.

4. Lavado del cartucho: Después de cargar la muestra, es posible aplicar al cartucho disolventes de fuerza eluente creciente, que permitan la salida de interferentes presentes en la muestra que son retenidos con una fuerza menor en el cartucho sin provocar la elución de los analitos de interés. Los disolventes empleados en la EFS, son los que se utilizan comúnmente en la cromatografía de líquidos de alta eficiencia y la fuerza eluente de los disolventes varían de la misma forma que se comportan para una cromatografía en fase reversa y normal. Por ejemplo, en fase reversa, la fuerza de elución aumenta al aumentar la proporción del disolvente menos polar.

En el caso particular de la EFS en fase reversa, los disolventes de limpieza suelen ser agua y mezclas de agua con diferentes disolventes orgánico miscibles con el agua, como lo son el metanol, isopropanol y acetonitrilo.

5. Elución de los analitos de interés (recuperación): Finalmente, se aplica al cartucho un disolvente de fuerza eluyente fuerte, más fuerte que los utilizados en los lavados, logrando recuperar así los analitos de interés, dejando en el cartucho interferentes provenientes de la muestra que son retenidos con mayor fuerza en el adsorbente.

En la **figura 1.3** se puede observar un esquema donde se ilustra el proceso general de la extracción en fase sólida (EFS)

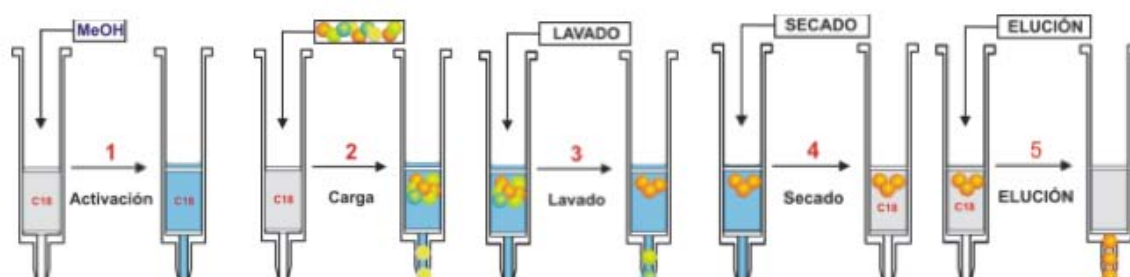


Figura 1.3. Proceso general en extracción en fase sólida, EFS. (Cromlab, 2014)

1.4.2.2.1 Parámetros que afectan a la EFS en fase reversa

Al pensar en la EFS como un proceso cromatográfico, existen varios parámetros que se deben tener en cuenta para tener un proceso con altos recobros, entre los más importantes están el volumen de fuga y el factor de recuperación o recobro. La EFS es una cromatografía de líquidos simple y para comprender mejor sus principios se deben relacionar sus parámetros con los cromatográficos, los cuales a continuación se describen:

-Factor de retención (k'_w): Es una medida de la hidrofobicidad de los analitos, la cual influye en la retención que éstos tendrán en los adsorbentes de tipo fase reversa. Se pueden medir utilizando cromatografía de líquidos de alta eficiencia con una fase móvil compuesta solo de agua pura. En la mayoría de los casos, sobre todo con compuestos no polares, no es tan fácil medirlo experimentalmente con estas condiciones por lo que se suelen hacer extrapolaciones de las curvas de $\log k = f(\% \text{ MeOH en mezclas con agua})$, a este valor extrapolado en agua pura se le conoce como k'_w (Hennion et. al, 1999). Este valor ayuda a poder predecir teóricamente el volumen máximo de muestra que se puede cargar a un

cartucho. Se sabe que el k_w' guarda una relación lineal con el cociente de reparto octanol/agua (K_{ow}).

-Volumen de retención (V_r): Nos indica el volumen de disolvente necesario, para recuperar del cartucho el 50 % de los analitos retenidos. Este valor se puede predecir con el valor de k_w' , a partir de la siguiente ecuación

$$V_r = V_0 (1 + k_w')$$

Donde:

V_r es el volumen de retención

k_w' es el factor de retención en agua pura

V_0 es el volumen muerto, es un parámetro que depende de la porosidad del adsorbente (ϵ) y del volumen geométrico de la columna (V_c). La relación es la siguiente, $V_0 = \epsilon V_c$

Para la sílice C18 se considera que la porosidad está entre 0.67 y 0.70, siendo la densidad promedio de la C18 0.6 g/mL, con estos datos se ha determinado que la sílice C18 tiene un V_0 de 0.12 mL por cada 100 mg del adsorbente.

-Volumen de fuga (V_b del inglés *breakthrough volumen*): De los parámetros más importantes a conocer. Se define como el volumen necesario de disolvente para obtener el 1 % de la cantidad de analito retenida en el cartucho o precolumna. De esta forma, cuando el eluyente aplicado al cartucho, comienza a eluir el analito del mismo, V_b nos indica el volumen máximo de muestra que podemos aplicar al cartucho sin que comiencen a fugarse los analitos del cartucho.

El volumen de fuga, se puede predecir con la siguiente ecuación

$$V_b = V_r - 2.3 \sigma_v$$

Donde:

σ_v es la dispersión estándar del volumen del pico cromatográfico. Este valor puede calcularse a través de la siguiente ecuación.

$$\sigma_v = \frac{v_0}{\sqrt{N}} (1 + k_w')$$

Dónde:

N es el número de platos teóricos que tiene el cartucho, se han realizado mediciones y se ha determinado un número de 20 platos teóricos por cada 500 mg de C18.

1.4.2.2.2. Ventajas y limitaciones de la EFS

Dentro de las principales ventajas que presenta esta técnica de preparación de muestra, respecto a las técnicas clásicas son: menor riesgo a la ruptura de materiales, menor consumo de disolventes de extracción; por ende la generación de residuos es menor, permite la separación selectiva de los analitos de estudio, se requiere menor cantidad de muestra y las manipulaciones realizadas por el analista son sencillas de efectuar.

Dentro de sus principales limitaciones es que no se puede aplicar para muestras sólidas o líquidas que sean muy viscosas, los compuestos con elevados K_{ow} tienden a presentar bajos recobros. Esto se debe a que los compuestos tienden a adherirse a las paredes del recipiente que contiene a la muestra y al trasvasar la muestra al cartucho se tienen pérdidas considerables. Sin embargo, esto se puede subsanar agregando a la muestra diferentes sustancias como tensioactivos y disolventes orgánicos miscibles en agua para mejorar la solubilidad de los analitos en la muestra acuosa.

La EFS en una técnica que se aplica de manera frecuente en análisis *on-line*, en la **sección 1.5** se pueden observar las publicaciones de los últimos años donde se hace uso de esta modalidad de extracción y análisis.

1.4.2.3. Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)

La DMFS es una técnica que desde sus inicios en 1990 ha sido muy utilizada en la separación de una gran variedad de fármacos, pesticidas y otros compuestos de diversos tipos de muestras sólidas o semisólidas, ya sean vegetales o animales.

La técnica es muy parecida a la EFS, la diferencia es que existe un paso adicional a la activación del soporte; el adsorbente se combina con la matriz y se homogeniza en un

mortero de ágata; los adsorbentes que se utilizan frecuentemente son los que se utilizan para la EFS; las proporciones utilizadas generalmente son de 1:4 matriz animal:adsorbente y en matrices vegetales 1:2 (Steven, 2007) . La función de realizar este triturado es romper las cadenas lipídicas de las matrices, es decir el adsorbente sirve como abrasivo, disgregante y dispersante, de aquí el nombre de la técnica

Una vez teniendo la mezcla homogenizada se traspasa a un cartucho de EFS, formando una columna de carácter cromatográfico único donde los componentes de la muestra son a su vez fraccionados por eluentes apropiados. Ya empacado el adsorbente con la matriz se realiza el mismo procedimiento que la extracción en fase sólida. Un diagrama general del procedimiento se muestra en la **figura 1.4**.

Es importante mencionar que se usan diferentes tipos de adsorbentes que se pueden dispersar con la muestra, entre los principales se tienen:

- Adsorbentes en fase reversa (sílices enlazadas C18 y C8): Son adsorbentes de tipo lipofílico que favorecen la ruptura de membranas celulares y solubilizar los compuestos orgánicos poco polares, favoreciendo así la extracción y separación de los componentes de la muestra.

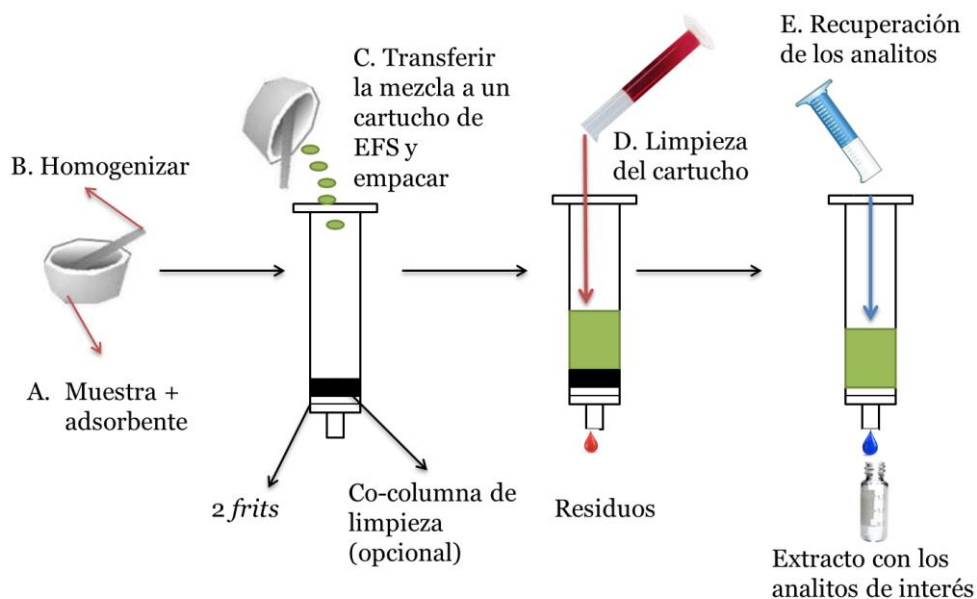


Figura 1.4. Proceso general en la dispersión de matriz en fase sólida (DMFS).

- Materiales que no tienen propiedades de retención (tierras de diatomeas y arenas): Se utiliza frecuentemente para la extracción de analitos polares, su principal ventaja es que se puede utilizar agua caliente para la extracción, sin embargo los volúmenes de extracto son elevados, siendo ésta su principal desventaja.
- Materiales altamente selectivos (polímeros molecularmente impresos e inmunoabsorbentes): Actúan como las enzimas y anticuerpos, reteniendo a un solo tipo de compuesto o familia de compuestos. Como ventaja presentan la selectividad, pero esto a la vez puede verse como desventaja, no sirve para análisis multi-residuos, además del costo elevado comparado con los adsorbentes habituales.
- Nanopartículas (nanotubos de carbono): Debido a la estructura y elevada área superficial, se consideran buena opción para la retención de diferentes compuestos, su ventaja es la selectividad y que se pueden usar para análisis multi-residuos.

En general los mecanismos de retención aún no son muy entendidos por la comunidad científica, dado el primer paso aún no se ha podido automatizar completamente (Chable, 2012).

1.4.2.3.1. Parámetros que afectan a la DMFS

Al tratarse de una técnica similar a la extracción en fase sólida, los parámetros que el analista debe tener en cuenta son los mismos que ya se describieron con anterioridad. Sin embargo, existen otros factores que son críticos en el desarrollo de métodos basados en la técnica, estos son el tiempo de fortificación de la muestra es importante dejar que las interacciones matriz analito ocurran, teniendo esto en cuenta se recomienda dejar un tiempo de 15 min a 2 horas (Kristenson et.al, 2007). La relación adsorbente:muestra es otro parámetro importante a considerar, la adición de sustancias que mejoren la extracción, entre las sustancias que más se suelen usar con este fin son ácidos, bases, agentes quelatantes y surfactantes, el material de fabricación del mortero, éste debe ser inerte, deben evitarse materiales porosos ya que se generan pérdidas considerables en los recobros.

1.4.2.3.2. Ventajas y limitaciones de la DMFS

Como se puede inferir entre las principales ventajas que presenta la Dispersión de Matriz en Fase Sólida respecto a las técnicas clásicas de extracción se encuentran la pequeña cantidad de muestra que se requiere, que es un proceso rápido, que no requiere una instrumentación especial ni costosa, que se obtienen recuperaciones eficientes de los analitos de estudio, que es una técnica versátil y se puede miniaturizar.

Dado el primer paso, la homogenización de la matriz con el adsorbente, aún no se ha podido automatizar completamente, siendo ésta la limitante más importante de la DMFS.

De esta forma la DMFS es una técnica idónea para ser aplicada en la extracción de los AINE en diversas matrices (sólidas, semi-sólidas o viscosas). Debido al carácter poco polar que presentan los AINE, presentarán una buena retención en adsorbentes como la C18. Sin embargo dado el grupo funcional ácido presente, tienen cierta polaridad, lo que hará que la retención no sea tan fuerte, traduciéndose en análisis con uso de pequeñas cantidades de disolventes, lo que puede permitir una miniaturización de la técnica, obteniendo extractos con poco disolvente, evitando así la necesidad de evaporar y reconstituir.

1.4.2.4. Nuevos adsorbentes

Dada la complejidad de las mezclas de analitos en las matrices biológicas, han surgido investigaciones buscando nuevos adsorbentes, los más reportados en la literatura han sido: las nanopartículas de carbono, los inmunoadsorbentes (IA) y los polímeros molecularmente impresos (MIP's).

Los MIP's poseen propiedades de reconocimiento molecular selectivo debido a que los sitios de reconocimiento dentro de la matriz del polímero son complementarios al analito en la forma y posición de los grupos funcionales. Algunos de estos polímeros tienen altas selectividades y constantes de afinidad elevadas, comparables con los sistemas de reconocimiento que ocurren naturalmente tales como anticuerpos monoclonales o receptores, los cuales los hacen especialmente adecuados como constituyentes en sensores químicos (biomiméticos) para la química analítica (Beltrán et. al., 2010)

El reconocimiento molecular entre un receptor (anfitrión) y un sustrato (invitado) en una matriz conteniendo moléculas relacionadas estructuralmente requiere discriminación y enlazamiento; esto puede ocurrir solamente si los sitios enlazantes del anfitrión y las moléculas invitadas se complementan unas con otras en tamaño, forma, y funcionalidad química. Los sistemas biológicos, tales como enzima-sustrato, anticuerpo-antígeno, y sistemas de hormona-receptor, demuestran propiedades de reconocimiento molecular que se han desarrollado por selección natural (inmunoadsorbentes).

Estos materiales se han utilizado ampliamente en la EFS y DMFS, cabe mencionar que las investigaciones para nuevos materiales siguen latentes (Muñoz et. al., 2011).

1.5. Aplicaciones de las técnicas para el aislamiento y cuantificación de AINE en diversas matrices.

En esta sección se muestran a modo de resumen, las últimas investigaciones relacionadas con el tema de extracción y análisis de los AINE en diversas matrices. En esta sección las tablas se encuentran separadas por matriz, es decir, en muestras ambientales, muestras biológicas, en alimentos y muestras biológicas tipo vegetal, que fue lo que se usó en este trabajo. Así mismo se presentan las condiciones del análisis efectuado (columnas, gradientes, fases móviles, etc), la técnica y método empleado para la extracción de los analitos, así como algunos parámetros de desempeño como lo son límites de detección, cuantificación y/o recobros.

En la **tabla 1.6** se pueden observar los artículos publicados referentes a las muestras acuosas y sedimentos que se han estudiado más ampliamente con los AINE.

Tabla 1.6. Inicio. Trabajos recientes que realizan análisis de AINE en muestras ambientales								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras ambientales								
Suelos y sedimentos	- Diclofenaco -Ácido Acetilsalicílico -Ibuprofeno (multiresiduos de 32 fármacos)	PLE/ EFS 20 g	NH ₄ OH 0.1 M/ MeOH (1:1 V/V) 1500 psi, 5 ciclos, 5 min, 80 °C Acondicionamiento: 5 mL de heptano + 5 mL de acetato de etilo + 5 mL de MeOH + 2x 5mL H ₂ O (pH 7) Lavado: 5 mL de heptano Elución: MAX: 1 mL de acetato de etilo + 2 mL MeOH + 2 mL 2 % ác. Acético/MeOH HLB: 3 mL de acetato de etilo + 4 mL MeOH Evaporación hasta 5 mL y se redisolvió: 30 mL buffer + 25 mL EDTA (pH 7) Reconstitución con 0.2 mL de fase móvil antes de SPE.	LC-MS/MS Fase reversa (XTerra MS-C18, 2.1 x100 mm, 3.5 µm). 13 °C Fase móvil: Gradiente pH= 4	Diferido	60 % (Ác. Acetilsalicílico), 108 % (diclofenaco) y 121 % (ibuprofeno)	LC: 0.3-7.1 ng/g	Pérez- Carrera et al., 2010
Lodos de aguas residuales	-Ketoprofeno -Ibuprofeno -Naproxeno -Ibuprofeno	PHWE / HF-LPME 0.5 g	NaOH 0.01 M, 100 bar, 5 ciclos, 5 min, 120 °C. V _{extracto} = 90 mL ajustado a pH 1.5 y llevado a 100 mL. Disolvente orgánico: DHE Disolvente aceptor: (NH ₄) ₂ CO ₃ 0.1 M (pH 9.5)	Polipropileno HF: Accurel Q3/2 (600 µm D.I., 200 µm espesor de la pared, 0.2 µm de tamaño de poro, V _{interior} = 25 µL) LC-ESI-MS	Diferido	Factor de enriquecimiento: 947-1213 veces	LC: 1.5-12.2 ng/g	Saleh, 2011
Aguas residuales	-Ketoprofeno -Ibuprofeno -Naproxeno -Ibuprofeno	HF-LPME	pH ajustado 1.5-1.9 Disolvente orgánico: DHE Disolvente aceptor: (NH ₄) ₂ CO ₃ 0.1 M (pH 9.5)	Flujo de la muestra: 100 mL/min. Polipropileno HF: Celgard Q3/2 (600 µm D.I., 200 µm espesor de la pared, 0.2 µm de tamaño de poro, V _{interior} = 25 µL). LC-ESI-MS ODS-2 hypersil (5 µm, 100 x 2.1mm) Precolumna C8 Fase móvil: Isocrático 65 % MeOH 35 % agua. pH 4	Diferido	94 %	LD: 10 µg/L LC: 33 µg/L	Larsson, 2009
Agua de río, aguas subterráneas y agua de grifo	-Diclofenaco -Ketoprofeno -Ibuprofeno -Indometacina -Naproxeno -Flurbiprofeno -Piroxicam	EFS 300 mL de muestra (pH 2.6)	Acondicionamiento: 6 mL MeOH + 6 mL H ₂ O + 3 mL HCl (pH = 2) Elución: 3x 0.5 mL MeOH Cartucho C18	Eluato + buffer de boratos (pH 8, 27.5 mM, 10 % CAN 1:9 v:v) MEEKC Columna C18. pH = 5 Fase móvil. Isocrático. 15 % ACN-85 % agua	On-line	Factor de enriquecimiento: 250	LD: 0.03 to 0.3 µg/L	Kuo, 2010

Tabla 1.6. (Continuación)								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras ambientales								
Aguas residuales	-Ibuprofeno -Ketoprofeno -Naproxeno -Diclofenaco	EFS 1 L de muestra filtrado (pH 2.6)	Acondicionamiento: 1.5 mL MeOH + 1.5 HCl (pH = 2.6) Elución: 3x 0.5 mL MeOH Strata X (60 mg/3 mL) EFS antes de derivatización Reconstitución: 0.5 mL H ₂ O + 0.1 mL tolueno	GC-MS Columna polar Gas acarreador: He Programa de temperatura	Diferido	Recobros: > 84 %	LD: 2-6 ng/L LC: 21 ng/L	Wu, 2008
Agua residual de grifo y agua superficial	-Ibuprofeno -Ketoprofeno -Naproxeno y enantiómeros	EFS / EFS 500 mL de muestra (filtrada y centrifugada) pH 2.5 (H ₂ SO ₄ 1 M).	Acondicionamiento: 3 mL ACN + 3 mL H ₂ O (pH 2.5, H ₂ SO ₄ 1 M) Lavados: 2x 10 mL H ₂ O Acondicionamiento: 1 mL de acetato de etilo + 1 mL MeOH + 1 mL H ₂ O (pH 9.5, NaOH 1M) Lavados: 2x 1 mL H ₂ O (pH 9.5) Elución: 1 mL de acetato de etilo Oasis HLB (60 mg, 3 mL) Se evaporó hasta 300 µL, derivatización + segunda EFS. 3 mL de solución acuosa derivatizada Oasis HLB (10 mg, 1 mL)	GC-MS/MS HP5-MS 30 m x 0.25 mm i.d. x 0.25 mm Gas acarreador: He 0.8 mL/min Programa de temperatura	Diferido	-	LC: 0.2-3.3 ng/L	Hashim, 2011
Agua de grifo, agua residual y agua de estanque	-Ibuprofeno -Naproxeno -Diclofenaco	MISPE	Acondicionamiento: ACN + MeOH + 10 mM fosfato de amonio pH 3. Lavados: 1 mL ACN / H ₂ O (4:6, v:v) + 1 mL toluene / heptano (4:6, v:v) Elución: 2x 0.9 mL ácido acético en acetona / MeOH (2:8, v:v) Cartucho MISPE: Supel MIP AINES 825 mg/3 mL) Reconstitución: 0.15 mL MeOH/H ₂ O (2:8, v:v)	LC-MS/MS: LC-UV Fase móvil: Gradiente pH = 3.0 230 nm XDB-C8 (150 mm x 2.1 mm, 3.5 µm)	Diferido	84 – 116 %	LC: 3.5 – 8 ng/L	Zorita, 2008
Agua de grifo	-Ácido acetilsalicílico -Ketoprofeno y sus metabolitos	EFS 1 L de muestra filtrado	Acondicionamiento: 6 mL MeOH + 6 mL de H ₂ O. Lavados: 5 % MeOH / H ₂ O Elución: 2 mL MeOH Cartucho Oasis HLB (500 mg, 6 mL) Reconstitución: 1 mL MeOH / H ₂ O (1:9, v:v)	UHPLC-UV Columna C18 50 mm x 2 mm 20 °C. Gradiente de elución. pH = 4, 227 nm	Diferido	75.2 – 90.2 %	LD: 0.36-0.40 µg/mL LC: 0.42–0.62 µg/mL	Baranowska, 2010

Tabla 1.6. (Continuación)								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras ambientales								
Agua de grifo, agua de río y agua residual	-Diclofenaco	MISPE 3 mL de muestra	Acondicionamiento: 5 mL MeOH + 5 mL H ₂ O Lavados: 2 mL ACN / H ₂ O (4:6, v:v) Elución: 2 mL ácido acético / MeOH (1:9, v:v) Cartucho MISPE: 35 mg Reconstitución: 1 mL MeOH	FR-HPLC-DAD 272 nm+ SHIMADZU C18(250 mm x 4.6 mm i.d. 5 µm) Fase móvil isocrático 60 % MeOH- 40% ACN pH= 4.0 LC- MS/MS	Diferido	> 95 %	LD: 10 µg/L LD: 5 ng/L	Dai, 2011
Composta y sedimentos	-Diclofenaco -Ibuprofeno -Ketoprofeno -Naproxeno -Ácido acetilsalicílico Análisis multiresiduos	UAE / EFS 2 g muestra.	5 mL MeOH + 2 mL MeOH + 2 mL acetona (en cada paso de la extracción: ultrasonicado y centrifugación) <i>EFS Clean-Up</i> Extracto evaporado hasta 0.2 mL y reconstituido a 250 mL (pH 2). Cartucho Oasis HLB (60 mg). Evaporado a 150 µL MeOH	HPLC-DAD; HPLC fluorescencia C18. 50 mm x 2 mm 20 °C. Fase móvil. Gradiente	Diferido	41.3 - 115 %	LD: 0.40 – 355 µg/g LC: 0.45 – 531 µg/g	Martin, 2010
Sedimentos de ríos y lagos	-Diclofenaco -Ibuprofeno -Ketoprofeno -Naproxeno	MAE / EFS 5 g de sedimento (seca, molida y tamizada a un tamaño de partícula de 0.2 mm).	40 mL (MeOH/acetona) 1200 W, 170 °C, 40 min Acondicionamiento: 3 mL hexano + 3 mL acetona + 2x 3 mL MeOH + 2X 3 mL 1 % MeOH / H ₂ O (pH menor a 3) Elución: acetato de etilo Disuelto en 3 mL MeOH y llevado a un volumen de 500 mL H ₂ O (pH menor a 3). Cartucho Strata X (60 mg, 3 mL). Evaporado a 0.5 mL en toluene. SFE antes de derivatizar	GC-MS ZB-5. Columna capilar Gas acarreador: He Flujo: 37 cm/s Programa de temperatura	Diferido	> 80 %, excepto diclofenaco	LD: 0.1 – 0.25 µg/g	Antonic, 2007
Suelos, sedimentos y lodos	-Diclofenaco -Flunixinina -Ibuprofeno -Ketoprofeno -Ácido mefenámico -Naproxeno -Ácido niflúmico -Fenilbutazona -Ácido acetil salicílico Análisis multiresiduos	MAE / EFS (Automatizado EFS) 1 g de muestra seco y congelado (2 mm de tamaño de partícula)	10 mL MeOH / H ₂ O (3:2, v:v) 500 W, 6 min Acondicionamiento: 1 mL de acetato de etilo + 1 mL H ₂ O Elución: acetato de etilo. Extractos de MAE evaporados hasta 200 µL + 10 mL H ₂ O (pH 7). Derivatización <i>in-situ</i> en EFS. Cartucho Oasis HLB (60 mg)	GC-MS DB-5 sílice fundida (30mx0.25mm ID, 0.25 µm). Gas acarreador: Helio Programa de temperatura	<i>On-line</i>	91 – 101 %	LD: 0.8 – 5.1 ng/Kg	Azzouz, 2012

Tabla 1.6. (Continuación)								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras ambientales								
Agua de ríos Y aguas residuales	-Diclofenaco -Piroxicam -Naproxeno -Indometacina Análisis de multiresiduos	SPME-LC-DAD 3 mL de muestra (pH 3)	Acondicionamiento: fase móvil 30 min. Extracción: Inmersión directa 44 min y desorción térmica estática. ACN/KH ₂ PO ₄ 0.025 M buffer (pH 3) (5:5, v:v), 5 min. Fibra de PDMS/DVB (60 µm de espesor)	LC-DAD RP-Amida C16 (150mmx4.6mm, 5 µm) pH= 3 Fase móvil: Gradiente	On-line	71.6 – 122.8 % (agua de río); 83 – 140 % (agua residual)	LD: 1.0 – 4.0 µg/L LC: 5.0 - 10 µg/L	Gil García, 2009
Agua residual y agua subterránea	-Ibuprofeno -Fenilbutazona -Naproxeno -Indometacina Análisis multiresiduos	SPME 4 mL muestra + 1 g de NaCl (pH 2)	Extracción: Inmersión directa durante 30 min Fibra de poliacrilato (85 µm de espesor): Carbowax-DVB (65 µm de espesor)	GC-MS Columna: HP-5 MS(30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 µm) Modo Splitless Flujo Helio. Programa de temperatura	Diferido	70 %	LD: 0.2 – 50 µg/L LC: 0.5 – 123 µg/L	Moeder, 2000
Agua superficial	-Ketoprofeno -Fenbufeno -Ibuprofeno	En tubo SPME (automatizado) 5 mL de muestra (filtrada, pH 6)	Acondicionamiento y lavado: Solución acarreadora (acetato de sodio 0.01 M, pH 6) Desorción: Fase móvil, 6 min.	Columna monolítica: poli(VP-co-EDMA). Monolítica-LC-MS pH= 5 Fase móvil. Isocrático 65 % MeOH – 35 % Agua	On-line	88.2 -112.5 %	LC: 0.65 – 1.87 ng/mL	Yu, 2012
Agua residuales	-Naproxeno -Diclofenaco -Ketoprofeno -Ibuprofeno Metabolitos	HF-LPME 50 mL de muestra	La fibra hueca es polipropileno 280 µm x 20 cm de largo y 0.3 mm de diámetro. Se adiciona 1 mL de dietileter y se deja en contacto la fibra 1 min en agitación 660 rpm. Desorción en 2 mL de ACN	LC-MS (Q-TOF) (4.6 X 150 mm x 5 µm, 7 % carbono) Precolumna: C18 Fase móvil: Isocrática pH 4 (ácido acético y acetato de amonio) 100 % MeOH.	Diferido	-	LD: 89.3, 7.1, 35.8 y 16.8 ppb LC: 197.4, 23.6, 119.2 y 55.9 ppb	Larsson E, 2009

Como se puede observar en la **tabla 1.6**, la técnica de extracción que ha sido más utilizada para el manejo de muestras líquidas es la EFS, esto por lo que ya se mencionó es una técnica económica comparada con las técnicas clásicas de extracción, requiere poca manipulación además de presentar en la mayoría de los artículos límites de detección bajos, así como recobros aceptables. Además también se observa que esta técnica (EFS) es la que en los últimos años, por el número de publicaciones tiende más a utilizarse en sistemas automatizados y/o *on-line*.

Dentro de las técnicas que hacen uso de adsorbente, también se ha utilizado de forma amplia la microextracción en fase sólida, SPME por sus siglas en inglés. Esta técnica aprovecha la volatilidad de los analitos y su afinidad por dicho adsorbente para lograr la extracción de los analitos, como se puede ver en las últimas publicaciones dicha técnica suele ser automatizada y en algunos caso se utiliza en modo *on-line*.

Cabe destacar que las microtécnicas de reciente aplicación, como lo es la microextracción en fase líquida (LPME, por su siglas en inglés) también se están utilizando para la extracción de AINE es matrices ambientales, el cual logra la miniaturización de las nuevas metodologías analíticas propuestas, además de ser mucho más amigables con el ambiente, económicas y que requieren poca muestra.

En cuanto a las técnicas que se han utilizado para la extracción de dichos analitos en las matrices sólidas ambientales, como suelen ser los sedimentos, se encuentra la extracción asistida por microondas, por sonicación e inclusive el uso de la microextracción líquida haciendo uso de fibras huecas. Sin embargo independientemente de la técnica empleada, es muy notorio que la mayoría de las metodologías aquí presentadas requirieron adicionar un paso de *clean-up* con el objetivo de obtener extractos con menos interferentes, lo que se traduce en un mayor número de pasos, aumentando el costo del análisis y disminuyendo la reproducibilidad del método.

En la **tabla 1.7** se puede apreciar una recopilación de referencias clasificada con los mismos rubros que en la tabla anterior, pero acotada a muestras biológicas, excluyendo las muestras vegetales y los alimentos, las cuales se presentan en tablas posteriores.

Tabla 1.7. Inicio. Trabajos recientes que realizan análisis de AINE en muestras biológicas								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas								
Plasma de bovino	-Firocoxibe -Piroxicam -Propilfenazona -Ramifenazona	ELL 5 mL plasma + 0.5 mL HCl 1 M	5 mL ACN + 2 g NaCl + 5 mL hexano. Reconstituido: 0.2 mL H ₂ O:ACN (9:1, v:v)	LC-MS Columna C18 (3.0 mm x 50 mm), 55 °C Fase móvil: 90:10 ACN:Agua pH= 4.7	Diferido	93-102 %	1.14 – 2.31 ng/mL	Dowling, 2010
Plasma humano	Meloxicam	ELL 0.5 mL plasma	ELL convencional usando poco disolvente y muestra. 0.1 mL HCl 5 M + 6 mL dietil éter. Reconstitución: 0.5 mL fase móvil.	FR-HPLC-UV Columna C18 (5µm, 150mmx4.6 mm) 355 nm, 30 °C Fase móvil: 60:40 Acetonitrilo:agua, pH= 3.5	Diferido	77.2 – 86.7 %	LC: 10.0 ng/mL	Bae, 2007
Sangre, fluido cerebral	-Ibuprofeno -Naproxeno Análisis multiresiduo	ELL 0.5 mL muestra	ELL convencional usando poco disolvente y muestra. 0.5 mL (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.5 M + 0.25 mL HCl 3M + 7 mL CH ₂ Cl ₂ . Se reconstituyó en: 2x 0.1 mL ACN + 2 mL hexano. Se evaporó y reconstituyó en 50 µL MeOH	GC- FID Confirmación: GC-MS Columna RTX-5 (30.0 mm x 0.32 mm, 0.25 µm) Gas acarreador: He, 1.2 mL/min Programa de temperatura	Diferido	84-96 %	LD: 41-145 ng/mL LC: 51 – 213 ng/mL	Engelhart, 2007
Plasma humano	Etodolaco	ELL en un paso Miniaturizado 20 µL plasma	1.5 mL acetato de butilo. Reconstituido: 1.5 mL ACN:H ₂ O 1:1 v:v	LC-MS/MS Columna C18 (50 mm x 2.0 mm, 3 µm) , 35 °C, pH 2.5. Fase móvil. Isocrático 65 % ACN-35 % Agua	Diferido	90 %	LD: 0.09 mg/mL LC: 0.1 mg/mL	Lee, 2008
Plasma humano	Aceclofenaco	ELL 0.5 mL plasma.	ELL convencional usando poco disolvente y muestra. 50 µL HClO ₄ 3.5 % + 4 mL acetato de etilo. Reconstituido en 0.1 mL de fase móvil	FR-HPLC-UV Columna C18 (250mm x 4.6mm, 5 µm) Fase móvil. Isocrático. 74 %-26 % ACN-Agua, pH= 5.75	Diferido	70 %	LD: 0.10 µg/mL LC: 0.5 µg/mL	Ojha, 2009
Plasma de rata	Ketorolaco	ELL 0.2 mL de plasma	0.8 mL CAN. Reconstituido en 0.1 mL H ₂ O : CAN (1:1, v:v)	UPLC-MS-MS C8 column (50 mm x 2.1mm, 1.7 µm), 40 °C. Fase móvil. 80 %-20 %, ACN-agua, pH=3	Diferido	93.5 %	LD: 2.5 ng/mL LC: 5 ng/mL	Radwan, 2010
Plasma humano	-Felbinaco -Naproxeno	ELL 10 µL muestra	90 µL THF Centrifugado y filtrado.	FR-HPLC-UV FR-HPLC-MS, µ-HPLC Columna: Wakopak Fluofix-II 120E (150°x4.6mm, 5 µm) 40 °C. Fase móvil. Isocrático. 70:20:10 MeOH:Agua:ACN	Diferido	75.32 – 99.5 %	-	Sakaguchi, 2011

Tabla 1.7. (Continuación)								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas								
Suero humano	-Ácido mefenámico -Ácido tolfenámico	ELL	Acetato de etilo Reconstituido en medio alcalino, en solución metanólica de terbio.	Fluorescencia. Columna C8 Fase móvil: 90:10 MeOH/agua, pH alcalino	Diferido	101 % (ácido mefenámico) y 98 % (ácido tolfenámico)	LD: 2.5 mol/L LC: 10 mol/L	Ioannou, 1998
Sangre, plasma y eritrocitos	-Ácido salicílico -Naproxeno -Diclofenaco	ELL 0.5 mL muestra.	HCl 3 M + CH ₂ Cl ₂ . Reconstituido en 50 µL de fase móvil.	FR-HPLC-UV, FR-HPLC-MS µ-HPLC	Diferido	75.32 – 99.58 %	Sólo se tuvo acceso al abstract.	Sultan, 2005
Suero, plasma y tejido	-Diclofenaco -Naproxeno -Ibuprofeno -Indometacina	ELL 20 µL suero/plasma 0.5 g de tejido	MeOH + centrifugado con acetato de amonio + MeOH centrifugación	FR-HPLC-UV 230 nm Columna XDB-C18, 5 µm, 250 mm x 4.6 mm pH= 3.0 Fase móvil Isocrático 85:15:5 (MeOH:ACN:agua)	Diferido	75-81 %	LD: 10 mg/L	Ioffe, 2002
Plasma de rata	Flurbiprofeno	CPE 0.2 mL plasma	50 µL MeOH + 1 mL Genapol X-080 + 0.2 mL HCl 2 M T = 50 °C, centrifugación. Proteína hidrofóbicas y surfactantes fueron removidas con 0.2 mL de ACN en centrifugación.	HPLC-UV Columna C18 (4.6mm x 250mm, 10 µm) Fase móvil. Isocrático. 60:40, ACN:agua, pH= 3.0	Diferido	84.5 %	LC: 0.1 µg/mL	Han, 2008
Orina	-Flurbiprofeno -Naproxeno -Ketoprofeno -Indometacina	IL-DLLME 10 mL orina	DLLME en jeringa (un paso) 280 µL BmimPF ₆ 720 µL MeOH	HPLC-UV Columna: C18 Fase móvil. Gradiente, 35 °C, 267 nm	Diferido	Factor de enriquecimiento: 144 – 156 veces. Recobro: 62 %	LD: 8.3 – 32 ng/mL LC: 11.8 – 50 ng/mL	Cruz-Vera, 2009
Plasma humano	Nimesulida	HF-LPME 0.2 mL plasma	Disolvente donador: 5 mL HCl 10 mM Disolvente orgánico: DHE Disolvente aceptor: NaOH 20 mM pH 9.5 Polipropileno HF: Accurel Q3/2 (600 µm D.I., 200 µm espesor de la pared, 0.2 µm tamaño de poro).	HPLC-UV Columna C18 Fase móvil. Isocrático. 65:5:30, ACN:MeOH:Agua	Diferido	Factor de enriquecimiento: 144– 156 veces Recobro: 41.2 %	LC: 50 ng/mL	Yang, 2011
Orina	-Indometacina -Naproxeno -Flurbiprofeno -Ketoprofeno -Fenbubeno -Tolmetin	SM-LLME 20 mL orina	Ajustado a pH 3 (HCl) SLM: 1-octanol Disolvente aceptor: 50 µL NaOH 10 mM (pH 12) Membrana PTFE (100 µm espesor, 10 µm tamaño de poro, V _{interior} = 50 µL	HPLC – UV Columna: C8 (4.6mm x 250mm, 10 µm) Fase móvil. Gradiente. pH básico	Diferido	Factor de enriquecimiento: 35 – 72.5 veces Recobros: 41-57 %	LD: 50 ng/mL	Riaño, 2012

Tabla 1.7. (Continuación)								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas								
Plasma humano	Enantiómeros del ketoprofeno	EFS	Desconjugación de proteínas: 0.36 g de (NH ₄) ₂ SO ₄ , centrifugado y acidificado con 3 mL H ₂ SO ₄ 0.1 M Acondicionamiento: 1 mL MeOH + 1 mL 0.1 M de buffer de fosfatos (pH 7.4) Lavados: 2x 750 µL MeOH / 0.1 M de buffer de acetatos pH 7.4 (2:8, v:v) Elución: 2x 500 µL 75 % MeOH/ 0.05 M de buffer de acetatos pH 7.4. Cartucho C18 (100 mg/mL) No evaporación ni reconstitución	HPLC-UV Columna: Chirex 500 (quiral) Fase móvil. Isocrático. 55:45, metanol:agua. pH 6.0. 35 °C. Detección 210 nm	Diferido	85 %	LD: 0.2 µg/mL LC: 0.4 µg/mL	Boisvert, 1997
Orina	-Metotrexato -Indometacina	EFS 1 mL orina	Acondicionamiento: 2x 3 mL MeOH + 3 mL acetato de etilo 0.1 M pH 4 Lavados: 2x 1 mL solución buffer de acetatos 0.1 M pH 4 Elución: 2x 500 µL MeOH 0.3 mL buffer de acetatos 0.1 M pH 4. Cartucho C18 (100 mg/mL).	Derivatización-LC-DAD Detección 400 nm Columna SB-C8, 5 µm, 4mmx4.6mm Fase móvil: 60:40 MeOH:agua, pH = 4.0, 25 °C.	Diferido	93 %	LD: 0.03 µg/mL LC: 1.5 µg/mL	Michail, 2011
Orina	-Ibuprofeno análisis multiresiduos	EFS 1 mL orina (pH 3 + Ácido fórmico).	Acondicionamiento: 5 mL MeOH + DCM (1:1, v:v) + 5 mL 30 % MeOH/H ₂ O Lavados: 3 mL 30 % MeOH/H ₂ O Elución: 2 mL MeOH + DCM (1:1, v:v) Cartucho C18 (100 mg/mL) Reconstitución: 0.3 mL MeOH, EFS antes derivatización	LC-ESI-MS-MS Columna: C18 (100 x2.1mm, 3 µm). Precolumna. C18 (4 x 2 mm). 20 °C Fase móvil. Gradiente, pH 5	On-line	> 90 %	LD: 8 – 28 nM LC: 13.3 -95.5 nM	Kretchmer, 2011
Plasma de bovino	-Carprofeno -Diclofenaco -Ibuprofeno -Ketoprofeno -Ácido mefenámico -Fenilbutazona	EFS 5 mL muestra + 0.5 mL HCl 1 M + 5 mL ACN + 15 mL AA 10 mM (pH 3).	Acondicionamiento: 3 mL n-hexano/éter dietílico (5:5, v:v) + 3 mL MeOH + 5 mL AA Lavados: 3 mL MeOH/H ₂ O (1:9, v:v) Elución: 2x 1.5 mL n-hexano/éter dietílico/éter/ACN/MeOH (45:45:7:3, v:v) Cartucho: Isolute Evolute ABN (100 mg, 10 mL) Reconstituido: 150 µL H ₂ O/CAN (9:1, v:v)	LC-MS/MS Columna: C18 (4.6mm x 250mm, 10 µm) Fase móvil. Gradiente.	Diferido	76-90 %	LD: 0.58 – 1.80 ng/mL	Dowling, 2011
Orina	-Ácido salicílico -Ketoprofeno y metabolitos	EFS 1 mL muestra (pH 2, HCl 1 M, centrifugación. El sobrenadante se diluyó 10 veces (pH 7)	Acondicionamiento: 6 mL MeOH + 6 mL H ₂ O pH 7 Lavados: 5 % MeOH / H ₂ O Elución: 2 mL MeOH Cartucho Oasis HLB (500 mg, 6 mL) Reconstituido: 1 mL MeOH / H ₂ O (1:9, v:v)	UHPLC-UV Columna monolítica C18 (50 x 2 mm) Fase móvil. Gradiente pH 3.0	Diferido	78.1 – 99.6 %	LD: 0.36 –0.40 µg/mL LC: 0.69-1.40 µg/mL	Baranowska, 2010

Tabla 1.7. (Continuación)								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas								
Plasma de caballo y perro	Firocoxibe	EFS 1 mL plasma + 2.0 mL H ₂ O	Acondicionamiento: 2 mL ACN Lavados: 5 % ACN / H ₂ O Elución: 2 mL ACN Cartucho: Oasis HLB (60 mg, 3 mL) Reconstituido: 0.25 mL 40 % ACN/H ₂ O	FR-HPLC-UV Columna: ODS-3 (150mm x 4.6 mm, 5 µm) Fase móvil: 45:55, ACN:Agua, pH 3.0 Detección 290 nm	Diferido	88 – 103 %	LD: 25 ng/mL LC: 50 ng/mL	Kvaternick, 2007
Orina	Ibuprofeno	EFS / Pre- columna 10 mL orina (azida de sodio 1 % m/v, centrifugación) + 10 mL H ₂ O; pH 2	Acondicionamiento: 3 mL MTBE + 3 mL MeOH Lavados: 3 mL solución de acetatos 50 mM + 4 mL MeOH Elución: 4 mL MTBE / MeOH / TFA (89:10:1) Cartucho: Oasis MAX (150 mg, 6 mL). Reconstituido: 0.4 mL ACN/H ₂ O (3:7, v:v)	Pre-columna: Aquasil C18 HPLC – RMN (mejora la señal 90 veces) Columna: Zorbax (2.1 mm x 50 mm, 1.8 µm)	On-line	98 %	LD: 1.5 µg/L	Djokovic, 2008
Plasma	Enantiómeros del flurbiprofeno	EFS Automatizado 1.5 mL plasma	Acondicionamiento: 1 mL MeOH + 1 mL 50 mM de buffer de fosfatos (pH 7.4) Lavados: 1 mL 50 mM de buffer de fosfatos (pH 7.4) + 1 mL MeOH Elución: 1 mL 2 % ácido acético / MeOH Cartucho de extracción Oasis MAX (30 mg/mL) Reconstituido en 1.0 mL MeOH	Electroforesis capilar no acuosa - UV 220 nm	Diferido	98-99 %	LC: 0.2 µg/mL	Rousseau, 2008
Plasma	-Tenoxicam -Ácido salicílico -Ketrorolaco -Piroxicam -Naproxeno -Flurbiprofeno -DiclofenacO	EFS 2 mL plasma	Acondicionamiento: 2 mL MeOH Lavados: 2 mL H ₂ O Elución: 1 mL MeOH Cartuchos Oasis HLB (70 mg, 1 mL) Reconstituido en 500 µL fase móvil	FR-HPLC-UV; µ- HPLC-UV Detección 255 nm Columna C18 (150mmx4.6mm, 5 µm) Fase móvil. Gradiente. pH 4	Diferido	76 -90 %	LD: 5-7.6 µg/mL LC: 7.0 – 10.1 µg/mL	Sultan , 2005
Saliva	-Ketoprofeno -Fenbufeno -Indometacina	Ultracentrifuga- ción / EFS 1 mL saliva	Ultracentrifugación: Microcon 3000 nominal molecular weight limit. Acondicionamiento: 1 mL MeOH + 1 mL H ₂ O Lavados: 1 mL H ₂ O Elución: 0.1 mL MeOH Cartucho C18 (4 mg) Reconstituido: 20 µL H ₂ O	LVSS / MEKC (large-volume stacking with polarity switching) (micellar electrokinetic capillary chromatography) Columna capilar: Silica fundida (60.2 cm x 375 µm, 75 µm) pH 9, -20 kV	Diferido	Factor de sensibilidad 500 veces	LD: 1 µg/ L	Almeda, 2008

Tabla 1.7. (Continuación)								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas								
Sangre y orina de humano	-Diclofenaco -Ibuprofeno -Ketoprofeno -Ácido nefenámico -Ácido niflúmico -Fenilbutazona -Ácido acetil salicílico	EFS Automatizado 5 mL muestra (pH 7)	Acondicionamiento: 1 mL acetato de etilo + 1 mL H ₂ O Elución: Acetato de etilo 350 W, 3 min Cartucho Oasis HLB (60 mg) Extractos eva [®] porados hasta 35 µL. EFS-MAE derivatización <i>in-situ</i>	GC-MS Columna: DB-5 (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) Gas acarreador: Helio 1 mL/min. Split (1:20) Programa de temperatura	<i>On-line</i>	85 -102 %	LD: 0.2 – 1.3 ng/L (orina) LD: 0.8 – 5.6 ng/L (sangre)	Azzous, 2012
Plasma y orina de caballo y perro	Firocoxibe	EFS Automatizado 0.2 mL muestra + 0.4 mL 5 % ácido acético / H ₂ O	Acondicionamiento: 1 mL MeOH + 1 mL H ₂ O Lavados: 1 mL 5 % Ácido acético + 1 mL MeOH / H ₂ O (25:75, v:v) Elución: 2x 0.5 mL ACN BIOMEK 2000 Laboratoy Automated Workstation Oasis HLB 96 well SPE Reconstituido: 200 µL en fase móvil	LC-MS/MS Columna: Fenil hexil (Luna [®]) Fase móvil. Isocrática, 45:55 ACN:agua pH 4.7 30 °C	Diferido	93 %	LC: 1 ng/mL (plasma) y 5 ng/mL (orina)	Letendre, 2007
Plasma humano	-Acetaminofén -Aspirina -Ketoprofeno -Indometacina -Fenoprofeno -Flurbiprofeno -Diclofenaco -Fenilbutazona -Ibuprofeno -ácido mefenámico	EFS 0.5 mL plasma + 30 µL ácido fosfórico + 0.5 mL H ₂ O	Acondicionamiento: 0.1 mL ACN/ 0.1 mL H ₂ O Lavados: 60 µL H ₂ O Elución: 10 mM de formiato de amonio (pH 3.3) / ACN (4:6, v:v)	Precolumna Oasis HLB (30 µm) Capilar-LC-MS Columna. Silice fundida (150mm x 0.53mm) Fase móvil. 40:60 (ACN:Agua) pH 3.25 Tiempo de análisis: 15 min	<i>On-line</i>	56.7 – 96.9 %	LD: 1 -75 ng/mL LC: 2.5 – 100 ng/mL	Suenami, 2007
Suero y orina	-Ketoprofeno -Ibuprofeno -Indometacina -Aspirina Multi residuos	EFS	Acondicionamiento: H ₂ O + MeOH Lavados: H ₂ O Elución: 75 % MeOH Cartucho C18 (500 mg)	Electroforesis capilar MEKC Tiempo de análisis 10 min pH 9.0, 20 kV, 20 °C	<i>On-line</i>	71.1 -109.7 5	LD: 0.88 -1.71 µg/mL LC: 0.50 – 2.5 µg/mL	Mardones, 2001
Orina	-Ibuprofeno -Phenazona -Naproxeno -Indometacina Multiresiduo	SPME 4 mL muestra + 1 g NaCl (pH 2)	Extracción inmersión directa durante 30 min Fibra de poliacrilato (85 µm de espesor);	GC-MS Columna: Carbowax – DVB (65 µm de espesor) Splitless (1 min). Programa de temperatura	Diferido	85.6 – 91.2 %	LD: 0.2 – 5.0 µg/ L LC: 0.54 – 8.6 µg/ L	Moeder, 2000
Plasma humano	-Ketoprofeno -Fenbufeno -Ibuprofeno	In-tube SPME Automatizado 5 mL de plasma diluido en ACN, pH 6.	Acondicionamiento y lavado: Solución de acetatos 0.01 M pH 6. Desorción con fase móvil, 5 min	Monolítica-LC-MS Columna monolítica: Poli(VP-co-EDMA). 50 mm x 2.1mm, 1.7 µm), 40 °C. Fase móvil. Gradiente	<i>On-line</i>	88.2 -112.5 %	LC: 6.7-15.9 ng/mL	Yu, 2012

En la **tabla 1.7** se observa que el estudio de este tipo de analitos en matrices biológicas va en aumento, sin embargo, se nota que la mayoría de las muestras se tratan de fluidos biológicos, el análisis de AINE en muestras biológicas sólidas no se ha reportado con mucha frecuencia, esto se puede deber a la dificultad en la matriz y por ende la disposición de pocas metodologías de extracción y análisis. De cualquier forma se sigue apreciando que la técnica que se utiliza con mayor frecuencia es la EFS, por las razones ya mencionadas con anterioridad, donde se observa que los adsorbentes usados por excelencia en la mayoría de los casos, son las sílices enlazadas (C18), y los disolventes son de fuerza eluente elevada, pensando en un carácter de fase reversa.

Comparando los análisis de AINE realizados con uso de extracción con disolventes, se observa que los artículos que realizaron EFS, no requieren evaporar a cierto volumen, y su posterior reconstitución con algún disolvente, lo que hace que las técnicas de extracción que hacen uso de adsorbente tomen mayor preferencia por los analistas.

Así mismo es importante recalcar que la técnica que se utiliza con mayor frecuencia para la cuantificación de AINE es la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, ya que como se pudo ver en las tablas anteriores, no se requiere derivatizar los analitos como se haría para un análisis mediante cromatografía de gases. Dada la polaridad de los analitos, el tipo de cromatografía de líquidos que se suele utilizar es la cromatografía en fase reversa, utilizando columnas analíticas C18 en la mayoría de los análisis. También se observa que en dichos análisis se tiene controlada la acidez, como ya se describió con anterioridad el pH preferente para tener dichos analitos en su forma molecular es a valor de pH ácido.

Dado que el proyecto del presente trabajo, consistió en la determinación de AINE en alimentos como lo son diferentes tipos de lechuga y otros vegetales de hojas (matriz sólida), en la **tabla 1.8** se muestran los artículos publicados en los últimos años sobre extracción y determinación de éstos analitos en matrices alimenticias, excluyendo de dicha tabla las matrices vegetales, ya que éstas se presentan la **tabla 1.9**.

Tabla 1.8. Trabajos recientes que realizan la extracción de AINE en alimentos								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas. Alimentos								
Leche de bovino	Firocoxibe	ELL / EFS 5 mL de leche	Se precipitó la proteína ELL antes de EFS (Cartucho: Insolute Evolute ABN) Reconstituido a 150 mL H ₂ O: CAN (9:1, v:v) después EFS. 10 mL CAN 20 mL AA + 0.2 mL HCl 1 M (pH 3) Acondicionamiento: 3 mL MeOH + 3 mL AA Lavados: 2 mL MeOH / H ₂ O (1:9, v:v) Elución: 2x 2 mL n-hexano: éter dietílico (5:5, v:v)	FR-HPLC-MS/MS C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) Fase móvil isocrático 60 % ACN- 40% Agua pH= 4.0	diferido	83 %	LD: 0.05 ng/mL LC: 2.2 ng/mL	Dowling, 2009
Leche de bovino	-Carprofeno -Diclofenaco -Ibuprofeno -Ketoprofeno -Ácido mefenámico -Fenilbutazona -Flunixin	EFS 5 mL leche	Leche + 2x 5 mL ACN + 20 mL AA + 0.2 mL HCl (pH 3) Cartucho <i>Insolute Evolute</i> ABN (100 mg, 10 mL) Reconstituido en 150 mL H ₂ O / ACN (9:1, v:v) Acondicionamiento: 3 mL n-hexano / éter dietílico (5:5, v:v) + 3 mL MeOH + 5 mL AA Lavados: 3 mL MeOH / H ₂ O (1:9, v:v) Elución: 2x 1.5 mL n-hexano: éter dietílico/ ACN/ MeOH (45:45:7:3, v:v)	LC-MS/MS Columna C18 (5 µm, 250 mm x 4.6 mm) pH= 3.0 Fase móvil Isocrático 85:15 (MeOH:agua)	diferido	73 – 101 %	LD: 0.74 -55.76 ng/mL	Dowling, 2010
Alimento animal Hígado Leche y huevo Miel	-Carprofeno -Diclofenaco -Ketoprofeno -Meloxicam -Fenilbutazona Análisis multiresiduos (156)	ELL 10 g de muestra	muestra (hígado, leche y huevo) + 20 mL de ACN se agitó durante 15 min. Y se extrajo la fase orgánica El extracto se centrifugó durante 10 min, se evaporó a sequedad y se reconstituyó con 1 mL ACN/H ₂ O (25:75 v/v)	LC-MS (ESI) Columna: C18 (150 x 2.1 mm, 7.1 µm). Gradiente. Tiempo del análisis 12 min. pH 4.1 30 °C	diferido	83 – 95 %	LD: 0.05 –1.56 ng/mL LC: 1.0 – 3.21 ng/mL	Robert, 2012
Col	-Diclofenaco -Naproxeno	ELL-EFS 150 mg masa húmeda	Pretratamiento: Se lava con 2 L de agua desionizada y jabón, y luego con MeOH. Se determinó la humedad 65 %. Se tomaron 150 mg de muestra húmeda + 10 mL MeOH., se centrifugó El extracto se pasa a una columna HLB (150 mg, 6 cm ³) + 50 mL agua desionizada, se secaron los cartuchos con N ₂ . Lavados: MeOH:MTBE (10:90) Elución: 5 mL MeOH Se evapora hasta 100 µL	HPLC C18 FR (4.6 x 250 mm), 35 °C. Fase móvil: Gradiente. Detector: UV Detección 215 nm	diferido	75 % -80 %	LC: 0.1 – 1.0 mg/Kg	Dodgen, 2013

Tabla 1.8. (continuación)								
Matriz	AINE	Técnica de extracción y cantidad de muestra	Características de la extracción	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas. Alimentos								
Leche	-Ketoprofeno -Carprofeno -Naproxeno -Fenilbutazona -Oxofenilbutazona -Meloxicam -Diclofenaco	ELL 2 gramos	Muestra secado en centrífuga + 8 mL MeOH. Y se agitó en un vortex (10 min, 100 rpm), centrifugó (5 min, 14 000 °) 5 mL del sobrenadante se transfirió en 12 mL de un tubo de plástico, se evaporó a sequedad. Reconstituyó 0.5 mL (80:20) ácido acético:acetonitrilo El extracto se agitó en vortex y se centrifugó (5 min, 14 000 °) Se filtró el extracto (0.45 µm) y se transfirió a un automuestreador	HPLC-MS (ESI) C18 (150 mm x 2 mm ; 5 µm) Fase móvil (90:10 v/v) ácido acético:acetonitrilo. Gradiente	diferido	99.1, 99.6, 98, 97.9, 98.4, 101.7 %	LD: 1.29-62.98 ppb LC: 1.61-75.92 ppb	Dubreil-Chéneau, 2011
Tejido animal	-Naproxeno -Meloxicam -Ketoprofeno -Flunixin -Ácido niflúmico -Carprofeno -Etodolaco -Ácido mefenámico -Ácido tofenámico	ELL-EFS 2 g muestra	Muestra se centrifugó 60 min, después 5 mL ácido fórmico al 1% + 10 mL de Tris 0.1 M y 10 mL CaCl ₂ 0.2 M- Y se digirió con 400 µL de proteasa. Después de la digestión enzimática 15 mL de isopropanol y centrifugó 15 min a 20°. El sobrenadante se tomó y se añadió 10 mL H ₂ O + 3 mL Hexano y se realiza de nuevo la centrifugación. El sobrenadante de pasa a un cartucho C18 Acondicionado: 3 mL ACN + 3 mL agua Elución: 3 mL MeOH Se seca y es reconstituido con 0.4 mL de MeOH + 0.6 H ₂ O. Fue agitado y filtrado (0.2 µm).	LC-MS/MS Columna Phenomenex. (2.1 x 150 mm) Flujo: 0.2 µL/min Gradiente	diferido	-	LD: 0.4-2.5 ng/g LC: 0.5-2.2 ng/g	Chrusch, 2008
Hígado de vacuno, porcino y pollo	-Ácido acetilsalicílico -Paracetamol -Ácido tofenámico -Carprofeno -Ketoprofeno -Meloxicam -Fenilbutazona -Diclofenaco - Oxofenilbutazona Multiresiduos	ELL-EFS 2 gramos	Pretratamiento: Se homogeniza y licua 2 g muestra es secado en centrífuga. + 2 mL ACN + 0.1 mL de formiato de amonio + 3 mL agua. Se extrae la fase orgánica, y centrifugado (10 000 rpm, 10 min). EFS: C18, el eluato es reconstituido con 1 mL de agua destilado, filtrado con 0.2 µm	LC-MS/MS (ESI) UPLC BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7 µm). Fase móvil: Gradiente, ácido fórmico y acetonitrilo. Flujo: 0.5 mL/min	diferido	52 – 90 %	LD: 0.5 – 10 ng/g LC: 1-30 ng/g	Kang JeonWoo, 2014
Huevo y miel	-Ácido acetilsalicílico -Paracetamol -Diclofenaco -Ibuprofeno -Ketoprofeno -Naproxeno -Fenilbutazona	ELL-EFS 2 gramos	Muestra + 25 mL agua. Centrifugó con una mezcla ACH:agua (3:1) a 4500 rpm. Se filtra y se hace pasar por un cartucho EFS. Columna: Oasis HLB. Derivatización <i>In-situ</i> con fase móvil, AcOEt + trifenilfosfato	GC-MS Columna DB-5. Fase móvil: Helio 30 m x0.25 mm I.D, 0.25 Programa de temperatura	<i>On-line</i>	86 - 95 %	LD: 0.5-2.4 ng/Kg LC: 1.4-10.0 ng/Kg	Azzouz, 2015

Comparando el número de publicaciones reportadas para la extracción y determinación de AINE en muestras alimenticias, comparadas con el número de publicaciones de las matrices biológicas y ambientales, es mucho menor. Esto se debe a la poca disposición de metodologías necesarias para manipular una matriz compleja y heterogénea, como lo es un alimento sólido.

También es importante destacar que en la **tabla 1.8** la técnica de extracción más utilizada en los artículos aquí citados, es la extracción líquido-líquido, auxiliado de la EFS como un paso posterior de *clean-up*, lo que hace que el procedimiento completo de determinación tenga un mayor número de pasos, lo que se traduce en un análisis más costoso, más tardado, menos amigable con el ambiente por las cantidades de disolventes que son utilizados.

En este trabajo se realizó el aislamiento e identificación de seis AINE, como contaminantes emergentes, en algunas matrices vegetales haciendo uso de la Dispersión de Matriz en Fase en Sólida (DMFS), que como es notable el estudio de estos analitos se realiza con mayor frecuencia en tejidos animales, sin embargo dado el ritmo de vida actual de los seres humanos y los sistemas de tratamiento de agua actuales, hacen que este tipo de compuestos puedan estar presentes en otro tipo de matrices, como contaminantes emergentes. Además de aportar el estudio de un método de extracción por DMFS que en las matrices alimenticias no se ha aplicado para determinar AINE. Por estos motivos la contribución de este trabajo, aporta mucho al estudio de estos analitos a la Química Analítica, ya que se provee de un método simplificado que no utiliza grandes cantidades de muestra y volúmenes de disolventes, además de no requerir reacciones de derivatización para la detección de los mismos.

Finalmente en la **tabla 1.9** se observan algunas publicaciones en las que se hizo sólo uso de la DMFS para el análisis de diferentes analitos, como los pesticidas, fungicidas, etc., en matrices alimenticias de tipo vegetal. Es importante destacar que no se ha encontrado alguna publicación donde se realice la extracción de los AINE mediante esta técnica en matrices vegetales como las lechugas, por lo que la metodología aquí desarrollada es novedosa.

Tabla 1.9. Trabajos recientes para la extracción de diferentes analitos mediante DMFS.

Matriz	Analitos	Cantidad de muestra y pre-tratamiento	Características de la extracción (DMFS)	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas. Vegetales								
Fruta y vegetales	Carbamatos	200 g de fruta se homogenizó	0.5 g de muestra + 0.5 g de CX (X = 18, 8, ciano y amino). Columna de vidrio 100 x 9 mm 10 mL de CH ₂ Cl ₂ /ACN (60:40, v:v). Evaporado a 0.5 mL	LC-MSD C8 (1503 X 4.6 mm D.I., 3 μm) Precolumna: LiChrosorb RP-8 (103 X 4.6 mm, 5.3 μm) Gradiente	Diferido	62-103 %	-	Fernández, 2014
Plantas	Carbendazima	100 g molidos y se tomaron 5 g	Muestra + 8 g de silica gel acidificada (HCl 1M) Columna de polipropileno Elución MeOH/CH ₂ Cl ₂ (1:5, v:v). Evaporado a sequedad y reconstituido con fase móvil Clean-up: Supelcosil LC-8-DB, 150mm x 4.6mm i.d. and 5 μm	HPLC-DAD λ = 279 nm Alltima C18, 250mm x 4.6mm D.I. and 5 μm MeOH / H ₂ O (45:55, v:v)	Diferido	70 %	LD: 0.02 μg/g	Michel, 2004
Frutas y vegetales	Fungicidas	250 g de muestra homogenizado	0.5 g de fruta + 0.5 g de C18. Triturado en un agata durante 5 min. Cartucho de vidrio 100 mm x10 mm D.I. Elución: 10 mL acetato de etilo 1mL / min. Evaporado y reconstituido en 0.5 mL MeOH	LC-MS. C18 (150 mm x 6 mm, 5 μm). Precolumna: C18 ODS, 4 mm x 2 mm; Agilent Fase móvil: Metanol:agua + 5 mM de ácido fórmico. Flujo 0.8 mL/min. Gradiente: 20 % MeOH a 90 % MeOH 10 min.	Diferido	80 -102 %	LD: 2 - 20 μg/Kg	Suli, 2007
Lechuga y zanahoria	Éteres polibromados difenilos (PBDE's)	0.5 g y no reportan pretratamiento	Muestra + 0.5 g de C18 elución 10 mL DCM / Hexano, 75:25 v:v (PBDEO) y después con 30 mL de DCM (OH-PBDEO).	GC- MS split/splitless. Gas acarreador Helio. Columna: DB-5HT 15 m × 0.25 mm, 0.1 μm. Flujo: 1 mL/min Programa de temperatura	Diferido	95-105 %	LD: 0.02 – 0.33 ng/mL	Iparraguirre, 2014
Microalgas	Pesticidas	Se molieron en un Molino eléctrico y se almacenaron en refrigeración Las muestras congeladas se secaron en un horno durante 24 h a 50 °C 10 gramos	10 g de muestra + 20 mL acetona (100 ng/mL). La muestra se dejó secar al aire durante dos días en oscuridad. 1 g de algas + 4 g sulfato de sodio anhidro fueron homogenizados en un mortero de vidrio Columna de polipropileno: 1 frit abajo 0.4 g de GCB + 3.6 g de fluorisil + frit arriba y se comprime con el émbolo de la rejinga. Elución a gravedad con Hexano:acetato de etilo (6:4, v:v), se recogieron 14 mL y se evaporó hasta 0.5 mL	GC-MS split/splitless Columna: HP-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 μm). Programa de temperatura. Gas acarreador helio Flujo: 1.5 mL/min	Diferido	LD: 0.5 -2.9 ng/g	85 -105 %	García-Rodríguez, 2012

Tabla 1.9. (Continuación)								
Matriz	AINE	Cantidad de muestra y pre-tratamiento	Características de la extracción (DMFS)	Técnica de análisis y detección	En línea o diferido	Recobros	Límites de detección y cuantificación	Referencia
Muestras biológicas. Vegetales								
Vegetales (lechuga, naranja, limón, etc)	Pesticidas	200 g de muestra en un procesador de alimentos.	5 g de muestra + 1.5 g de sílice. Esta mezcla se introdujo a una columna de vidrio (100 mm x 9 mm). Elución 6 mL acetato de etilo, la elución se dejó gota a gota. Se evaporó a 0.5 mL	GC-ECD Splitless (200 °C) Columna DB-5 (30 mm x 0.25 mm x 0.25 µm) Programa de temperatura	diferido	95 – 101 %	LD: 0.012 – 0.024 mg/Kg	Torres, 1995

AA: Ácido ascórbico
 DCM: diclorometano
 FID: Detector de llama (por sus siglas en inglés)
 MTBE: metil terbutiléter
 TFA: ácido trifluoroacético
 LD: límite de detección
 FR: Fase reversa
 CG: Cromatografía de gases
 ELL: Extracción líquido-líquido
 DAD: Detector de arreglo de diodos
 MAE: Extracción asistida por microondas
 PLE: Extracción con líquidos presurizados
 SFE: Extracción con fluidos supercríticos

ACN: acetonitrilo
 DVB: divinilbenceno
 MEEKC: *microemulsion electrokinetic chromatography*
 PDMS/DVB: polidimetilsiloxano/polidivinilbenceno
 THF: Tetrahydrofurano
 LC: límite de cuantificación
 CL: Cromatografía de líquidos
 MS: Espectrometría de masas
 DLLME: Microextracción líquido-líquido dispersiva (por sus siglas de inglés)
 HF-LPME: Microextracción líquido con fibra hueca
 MIP: Polímero molecularmente impreso (por sus siglas en inglés)
 PHWE: Extracción con agua caliente presurizada (por sus siglas en inglés)
 SPME: Microextracción en fase sólida (por sus siglas en inglés)

Es importante hacer notar que a diferencia de la Extracción en Fase Sólida, la Dispersión de Matriz en Fase Sólida no es posible automatizarla y hacerla completamente *on-line*, ya que al requerir el paso de disgregar la muestra en el adsorbente y empacar la mezcla en un cartucho hace que la técnica al día de hoy sea aún un paso mecánico, sin embargo lo anterior no implica que la DMFS sea una técnica no reproducible y poco exhaustiva, al contrario si se realiza con el debido cuidado los porcentajes de recuperación aplicando DMFS son comparables con casi cualquier técnica que haga uso de adsorbentes.

El tratamiento que requiere la muestra haciendo uso de la DMFS comparado con los procedimientos de los análisis de la **tabla 1.8**, es menor el número de manipulaciones, además de no requerir pasos adicionales de *clean-up* en la mayoría de los casos, lo que hace que sea una técnica eficiente al realizar limpieza de interferentes *in-situ*. Sólo se debe tener en cuenta las variables que ya se discutieron en la sección de DMFS (**sección 1.4.2.3**), variables como: relación matriz:adsorbente, tiempo de exposición, carácter del adsorbente, fuerza eluente de los disolventes utilizados para los lavados y la recuperación, entre otros.

CAPÍTULO 2

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.1 Materiales y equipos

2.1.1. Disolventes y reactivos

- ✚ Disolventes grado cromatográfico J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA): metanol y acetonitrilo.
- ✚ Agua grado cromatográfico obtenida con un desionizador marca Millipore modelo Simplicity UV (Bedford, MA, USA).
- ✚ Estándares de fármacos antiinflamatorios no esteroideos, marca Sigma Aldrich (San Luis, Misuri, USA) con pureza mayor al 99 %: naproxeno, diclofenaco, fenilbutazona, ibuprofeno, ketoprofeno y flurbiprofeno.
- ✚ Ácido perclórico concentrado (70 % m/m y densidad = 1.668 g/mL) marca J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

2.1.2. Sistema cromatográfico

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución constituido por dos bombas isocráticas Lab Alliance Serie II.
- Válvula de inyección manual Rheodyne (Berkeley, CA, EUA) 7125i con rizo (*loop*) de 20 μ L.
- Detector espectrofotométrico UV de longitud de onda variable modelo 200 y marca Linear Instruments.
- Calentador de columnas Phenomenex TS-130 con temperatura fijada a 30 °C.
- La adquisición de datos y tratamiento de los mismo se realizó mediante el software Clarity versión 2.8.1.584.
- Jeringa cromatográfica marca Hamilton (Reno, NV, EUA) de 100 μ L.

- Columna de guarda de acero inoxidable de 20 x 2.0 mm de diámetro interno UPCHURCH SCIENTIFIC (Oak, WA, EUA), empacada en el laboratorio con sílice fase reversa, Nucleosil C18 Phenomenex (Torrance, CA, EUA) tamaño de partícula de 10 μm .
- Columna analítica de fase reversa HICHRON C-18 (150 x 4.6 mm, d.i., 5 μm), empacada con sílice fase reversa SPHERISORB ODS, tamaño de partícula 5 μm .
- Espectrofotómetro ThermoFisher (Madison, USA) modelo GENESYS 10S Vis.
- Celdas de cuarzo de 2 mL.

2.1.3. Sistema de extracción

- Microbalanza analítica Mettler Toledo, Ohio, EUA, modelo AG245.
- Balanza analítica con capacidad de 210 g y precisión 0.1 mg, OHAUS AP210S.
- Viales ámbar y transparentes con tapón de rosca de 1 mL y 40 mL
- Mortero de ágata de 30 mL con pistilo.
- Reservorios de polipropileno de 1 mL para EFS, VARIAN, EUA.
- Filtros para reservorio de 1 mL, Macherey-Nagel.
- Sílice C18 Supelco, marca Sigma y tamaño de partícula 40 μm .
- Matraz kitazato con tapón mono horadado con aguja de 5 mL, unida al sistema de vacío del edificio.
- Matraz aforado de 50 mL para la preparación de la disolución estándar de fármacos.
- Micropipetas Eppendorf de 1-20 μL , 25-250 μL y 250 a 1000 μL , con puntas Transferpette, (Wertheim Alemania).
- Material de vidrio común: Probetas de 10 y 100 mL, pipetas Pasteur, vasos de precipitados, matraz aforado de 10 mL, vidrio de reloj, espátula y etc.
- Procesador de alimentos marca Oster modelo 2609

2.1.4. Muestras vegetales

- ❖ Se utilizó la lechuga tipo orejona para la validación del sistema, la cual fue comprada en una tienda de autoservicio y se almacenó después de su procesamiento, bajo refrigeración a 4 °C en viales ámbar.
- ❖ Se usaron diferentes tipos de lechuga, entre ellas, la romana, la francesa, la orejona, la escarola, para evaluar el método y la calidad de los productos, las diferentes muestras fueron adquiridas de diferentes mercados de la Ciudad de México.
- ❖ Para evaluar la robustez del método se adquirieron otras muestras vegetales de hojas verdes, entre ellas: la espinaca, el germen de trigo, el apio, las acelgas, col blanca, perejil y epazote; todas ellas se compraron en diferentes supermercados de autoservicio en la Ciudad de México.

2.2. Preparación de disoluciones estándar de AINE

Todas las disoluciones fueron preparadas con metanol como disolvente y mantenidas en viales ámbar bajo refrigeración a 4 °C.

Se prepararon disoluciones individuales (disoluciones madre) de cada analito a una concentración de 100 mg/L.

También se preparó una disolución de mezcla de fármacos, para ello se pesaron 5 mg de cada uno de los AINE y se llevaron a un volumen de 50.0 mL, obteniendo una concentración de 100 mg/L para cada analito en la disolución estándar. Con esta última disolución se realizaron las diluciones correspondientes usadas para realizar la curva de calibración del sistema y el desarrollo del método de extracción de los analitos.

Se estudió la estabilidad de la disolución de la mezcla de fármacos, esto se realizó inyectando en el equipo cromatográfico 20 µL de una disolución de 2.5 mg/L preparada a partir de la disolución madre. La mezcla de los AINE resultó tener un tiempo de estabilidad de un mes, por lo que cada treinta días se preparaba una nueva disolución madre. El criterio utilizado para determinar la estabilidad de dicha disolución fue el perfil cromatográfico, es decir, el número y forma de los picos presentes, así como también el valor del área bajo la curva de cada pico, tomando como criterio una disminución en el 15 % del área del analito.

2.3. Experimentación

A modo de resumen, en la **figura 2.1** se presenta un esquema de los pasos que se siguieron para desarrollar la metodología analítica, su validación y su aplicación a diversas matrices tipo vegetal.

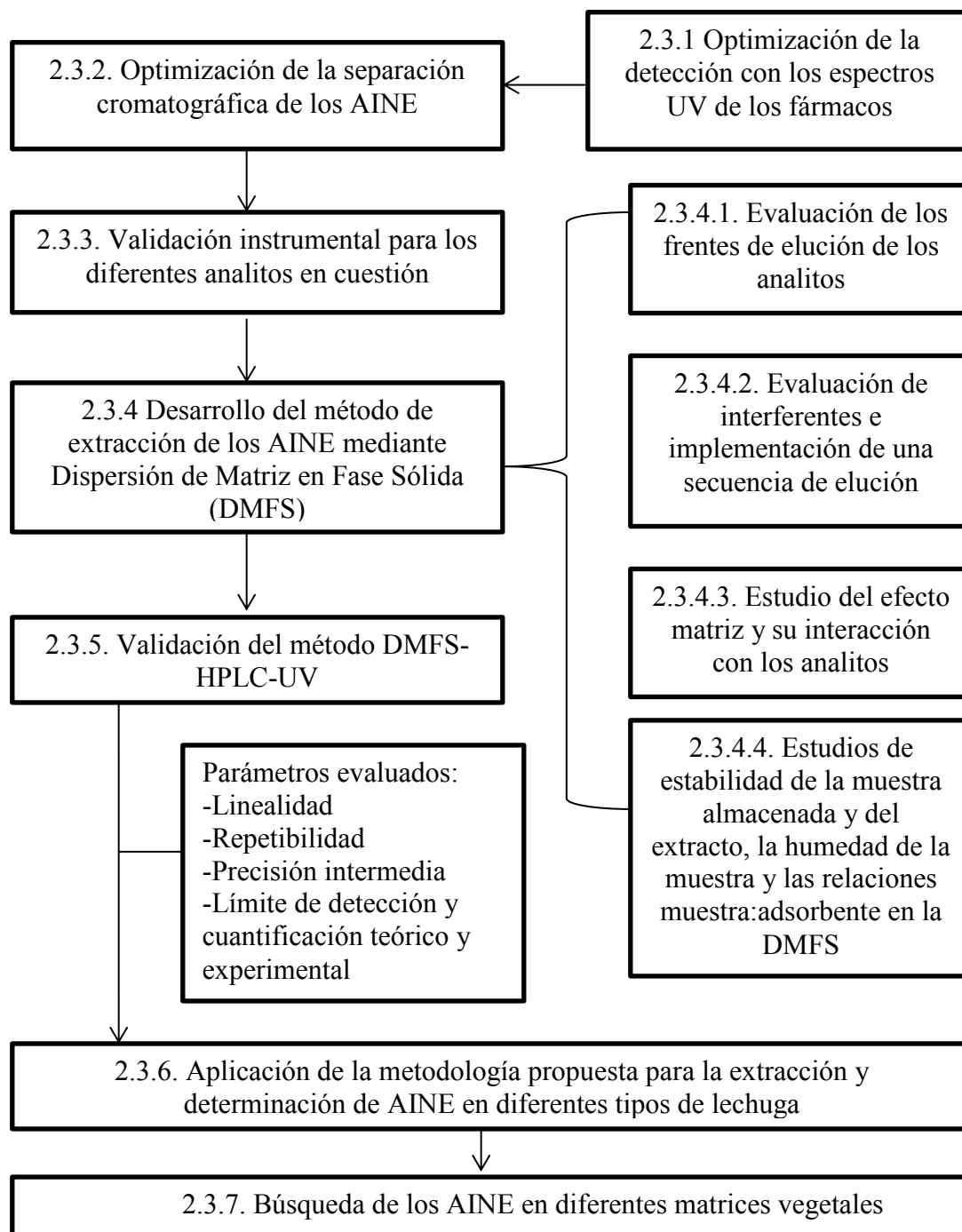


Figura 2.1. Esquema general de la metodología experimental para el desarrollo del método

2.3.1 Optimización de la detección con los espectros UV de los fármacos

Dado que el sistema de detección que se utilizó fue detector ultravioleta (UV), fue necesario conocer los espectros de absorción para determinar la longitud de onda máxima donde absorben los AINE, para así asegurar su mayor respuesta en el detector. Para ello se colocaron aproximadamente 2 mL de disolución de cada fármaco (100 mg/L) en diferentes celdas de cuarzo y se realizó el ajuste del equipo con un blanco de metanol grado HPLC

Después se realizó un barrido de 210 a 420 nm, midiendo cada 0.5 nm en el espectrofotómetro, para cada uno de los fármacos.

Una vez obtenido los espectros y analizado cada uno, se obtuvo el máximo de absorción para cada fármaco, el cual resultó ser cercano para los seis AINES, esta longitud de onda (215 nm) fue la que se utilizó para la detección de los analitos en el detector del cromatógrafo.

2.3.2. Optimización de la separación cromatográfica de los AINE

Para efectuar la optimización de la separación cromatográfica se midieron los tiempos de retención (t_r) en corridas isocráticas de cada uno de los analitos, inyectando 20 μ L de una mezcla de dichos fármacos con una concentración de 10.0 mg/L de cada uno, utilizando una columna analítica de fase reversa.

Para encontrar las condiciones óptimas de resolución de los analitos, se varió la fase móvil utilizando diferentes mezclas metanol (MeOH) / agua (H₂O): 60/40, 65/35, 70/30 y 75/25, cada una de las fases móviles se acidularon con ácido perclórico 0.1 M, de tal modo que se tenían fases móviles con un valor de pH de 2.5.

La medición del tiempo muerto se llevó a cabo con la inyección de 20 μ L de una disolución de una sal inerte no retenida en el sistema cromatográfico, como lo es el nitrato de sodio, a una concentración de 100 mg/L.

Con los tiempos de retención de los fármacos se obtuvieron los factores de capacidad (k') para cada uno de ellos en las diferentes proporciones de fase móvil. Los valores de k' se calcularon con la **ecuación 1**.

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0} \quad (\text{ecuación 1})$$

Donde k' es el factor de capacidad, t_r tiempo de retención y t_0 es el tiempo muerto, tanto el tiempo de retención y el tiempo muerto se obtienen del cromatograma. Una vez obtenidos los factores de capacidad de cada analito, se trazó la gráfica $\log k' = f(\% \text{ MeOH})$.

2.3.3. Validación instrumental para los diferentes analitos en cuestión

Los parámetros que se evaluaron para validar el sistema cromatográfico fueron: linealidad, repetibilidad, precisión intermedia, límites de detección, cuantificación, así como la especificidad del sistema. Se utilizó la guía de validación de métodos analíticos editada por el colegio nacional de químicos farmacéuticos biólogos de México A.C; la cual está basada principalmente en la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

Para evaluar la linealidad se inyectaron 20 μL de disoluciones de los analitos a seis diferentes concentraciones: 0.05 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 2.5 mg/L, 5.0 mg/L y 10.0 mg/L.

El estudio de linealidad se realizó por triplicado, obteniendo la variación en la respuesta del detector (área) en función de la concentración de cada uno de los analitos.

Después se realizó una prueba estadística, prueba de Cochran (ver **Anexo I**), para ver si los datos eran homocedásticos, y considerando que en el eje de las x no existe variación, mediante el ajuste de mínimos cuadrados se evaluó la linealidad del sistema con el coeficiente de correlación (r^2), donde se utilizó un criterio de aceptación cuando $r^2 \geq 0.99$ (USP 31).

Por otra parte se determinaron los límites de detección y cuantificación, tanto el experimental como el estadístico, para cada analito.

Para la determinación experimental del límite de detección se inyectó la disolución de concentración más baja, y se fueron realizando diluciones hasta que el “software” del equipo determinó que la relación señal/ruido era de 3; en esa condición, la concentración de la mezcla de fármacos inyectada fue el límite de detección. Lo anterior se realizó por

triplicado. Para el límite de cuantificación experimental se obtuvo cuando la señal/ruido del equipo era 10 veces. Los anteriores criterios basados en la USP 31 (1225).

Para obtener el límite de detección y cuantificación estadístico, se realizó con base en la curva de calibración ya descrita con anterioridad y utilizando las **ecuaciones 2 y 3**.

$$LD = \frac{3.3 Sb_0}{m} \quad \text{ecuación 2}$$

$$LC = \frac{10 Sb_0}{m} \quad \text{ecuación 3}$$

Donde LD es el límite de detección, LC el límite de cuantificación, Sb_0 la desviación estándar de la ordenada al origen y m la pendiente obtenida mediante el ajuste de regresión por mínimos cuadrados.

La repetibilidad se evaluó, calculando el coeficiente de variación (% CV) obtenido en los tiempos de retención de los analitos en cinco inyecciones de una disolución de la mezcla de fármacos a 5.0 mg/L.

Finalmente se evaluó la precisión intermedia del sistema en 3 días diferentes, ésta se obtuvo con la disolución de la mezcla de fármacos de 5.0 mg/L y calculando los coeficientes de variación.

Los coeficientes de variación se calcularon con la **ecuación 4**.

$$\%CV = \frac{\sigma}{x} \times 100 \quad \text{ecuación 4}$$

Donde % CV es el coeficiente de variación expresado en porcentaje, σ es la desviación estándar relativa y x el promedio de las medidas.

2.3.4. Desarrollo y optimización del método de extracción de los AINE mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)

2.3.4.1. Evaluación de los frentes de elución de los analitos

El desarrollo de la metodología de extracción comenzó con el estudio de retención y elución de los analitos fortificando el adsorbente correspondiente a 200 mg de sílice C18 (previamente activada, por cada gramo de C18 se hizo pasar 2 mL de metanol), con 25 µL de la mezcla de fármacos de 100.0 mg/L en un mortero de ágata, teniendo una concentración para cada fármaco de 12.5 ng/mg de adsorbente. Una vez fortificada la sílice se dejó secar durante 10 minutos y se homogenizó con ayuda del pistilo. Posteriormente, ésta se transfirió a un cartucho de extracción en fase sólida de 1 mL, una vez empacado todo el adsorbente, éste se compactó dando unos ligeros golpes al cartucho de extracción.

Es importante mencionar que previamente al empaque de la sílice fortificada al cartucho de extracción, se le colocó en la parte inferior del cartucho de polipropileno dos filtros (*frits*). La sílice fue previamente acondicionada un día antes para asegurar que estuviera seca, por cada gramo de sílice C18 se aplicaron 2 mL de metanol.

En el cartucho empacado con el adsorbente fortificado con los AINE se pasaron 2.0 mL de metanol puro, los cuales fueron recolectados en viales de color transparente cada 0.5 mL. Estos eluatos se inyectaron en el equipo cromatográfico. El procedimiento anterior se repitió cambiando la fuerza eluyente, es decir, al adsorbente fortificado y empacado se le aplicaron diferentes mezclas MeOH:H₂O, en las proporciones: 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:60; se efectuó por triplicado la elución de los AINE con fracciones de 0.5 x 4 mL de cada mezcla y se inyectaron las fracciones al cromatógrafo. De la misma forma que se hizo con metanol y sus mezclas hidrometanólicas, se realizó el estudio de retención y elución de los analitos con acetonitrilo.

Para cada inyección cromatográfica se evaluaron los recobros o porcentaje de recuperación de cada AINE, haciendo uso de la **ecuación 5**, donde se conoció el área de cada analito en la disolución estándar, preparando un vial con la concentración de los analitos esperadas en el extracto. Se realizaron las gráficas de recobro acumulado en función del volumen del eluyente, lo que representa el frente de elución para cada compuesto.

$$\% \text{ recobro} = \frac{\text{Área del analito de interés en el extracto}}{\text{Área del analito de interés en la disolución estándar}} \times 100$$

Ecuación 5

2.3.4.2. Evaluación de los interferentes e implementación de la secuencia de elución

Para poder determinar la secuencia de lavados y posterior recuperación de los analitos, se realizó la evaluación de los interferentes de la matriz, para ello se utilizó lechuga orejona.

El pre-tratamiento que se le realizó a la lechuga orejona fue picarla en su totalidad en pequeños trozos y mediante un procesador de alimentos se trituraron todos los pequeños pedazos hasta obtener una pasta homogénea del vegetal. De la pasta anterior de lechuga se pesaron 200 mg del vegetal con 200 mg de la sílice C18 previamente activada (relación 1:1). Mediante un pistilo se trituró la muestra hasta obtener una pasta homogénea, ésta se transfirió a un cartucho de 1 mL de polipropileno y se empacó. Una vez empacado y compactado el cartucho se le pasó 1 mL de metanol y el extracto se recuperó en un vial, este extracto se inyectó al cromatógrafo de líquidos obteniendo así un cromatograma de la matriz sin fortificar (blanco).

Analizando el cromatograma del extracto de la lechuga orejona y observando los interferentes de la matriz, se decidió implementar un secuencia de elución que incluyera lavados para poder removerlos. Esta secuencia se implementó considerando el pKa de los analitos, la afinidad hacia la sílice, así como del volumen de fuga de los mismos determinados anteriormente con los frentes de elución de los AINE.

Se realizó con otros 200 mg de la misma lechuga y 200 mg de adsorbente el proceso ya descrito con anterioridad (DMFS); la diferencia estuvo en que antes de hacer pasar el mililitro de metanol en donde se recuperan los analitos, se fueron aplicando previamente una secuencia de lavados con diferentes mezclas hidrometanólicas de fuerza eluyente débil, las cuales se enlistan a continuación, junto con el eluyente de desorción de los AINE (metanol puro):

1. Cuatro mililitros de agua desionizada acidificada con ácido perclórico (pH 2.5).
2. Dos mililitros de una mezcla metanol / agua 10/90.
3. Un mililitro de una mezcla metanol / agua 30/70
4. Medio mililitro de una mezcla metanol / agua 40/60
5. Un mililitro de metanol

Es importante mencionar que los lavados número 1 y 2 se hicieron con ayuda del vacío, mientras que los lavados 3, 4 y la recuperación de los analitos (5) se realizaron por gravedad. La razón que los primeros dos lavados se realizaron con vacío, es la cantidad de volumen que se le hizo pasar al cartucho de extracción, y el último con la fuerza de la gravedad, para promover sólo la desorción de los analitos debido a la fuerza eluyente de la mezcla.

El extracto obtenido con la secuencia de elución anterior, se inyectó en el equipo cromatográfico, logrando así comparar los cromatogramas del blanco de la matriz con los lavados y sin los lavados que se habían efectuado previamente al disolvente de elución de los analitos.

En función de lo anterior y considerando los volúmenes de fuga de los AINE, se realizó una modificación al volumen de recuperación de los analitos que hasta el momento se había aplicado. Entonces, se decidió desorberlos con 0.5 mL de metanol puro en lugar de 1 mL.

Una vez fijadas las condiciones de lavado de interferencias de la matriz y recuperación de los AINE, se realizaron extracciones por triplicados con la secuencia de elución ya descrita, para evaluar reproducibilidad en los recobros de los compuestos de interés. La reproducibilidad se evaluó con los coeficientes de variación.

2.3.4.3. Estudio del efecto matriz y su interacción con los analitos

Una vez determinada la secuencia de lavados y recuperación de los AINE, se prosiguió a evaluar la interacción que pudiera existir de los analitos con la matriz, es decir el efecto matriz, para ello se colocó en un mortero de ágata 200 mg de la misma lechuga orejona, y se fortificó con 25 μ L de la disolución estándar de la mezcla de fármacos de concentración 100 mg/L, teniendo una concentración de 12.5 ng/mg de muestra para cada fármaco. A la lechuga fortificada, se le adicionó al mortero ágata 200 mg de adsorbente C18, y con ayuda del pistilo la muestra se disgregó y homogenizó hasta la obtención de una pasta, esta pasta se transfirió al cartucho de extracción y se empacó. En seguida se continuó con la secuencia de elución ya descrita, inyectando al cromatógrafo y midiendo el porcentaje de

recuperación para cada analito, como se describió en la **ecuación 5**. Esto se realizó por quintuplicado, evaluando la repetibilidad del método con el coeficiente de variación.

2.3.4.4. Estudios acerca de la estabilidad de la muestra almacenada y del extracto, la humedad de la muestra y las relaciones muestra:adsorbente en la DMFS

Se hizo un estudio de estabilidad de la muestra almacenada en donde cada semana se preparó un blanco de la lechuga sin fortificar siguiendo el proceso ya descrito, para así determinar si al transcurrir el tiempo del que se pretrató la muestra, existía un cambio en los componentes de la matriz.

También se realizó un estudio de estabilidad de los extractos, sin fortificación de la muestra. Se realizó la Dispersión de Matriz en Fase Sólida, como ya se ha mencionado con anterioridad, se inyectó el extracto de un vial inmediatamente terminado el proceso de extracción, estas extracciones fueron efectuadas por triplicado. Al día siguiente se inyectaron los mismos tres extractos. Con este experimento se determinó que los extractos deberían ser inyectados inmediatamente al terminar la extracción, ya que había modificación en el perfil cromatográfico del blanco de la matriz.

También se realizó un estudio para determinar si la matriz debía utilizarse con o sin humedad; este experimento se realizó por quintuplicado y consistió en pesar 200 mg de un molido de la lechuga orejona y colocado en un portaobjetos limpio y seco, hasta evaporar la humedad en una cámara cerrada durante un día, pesando por diferencias la masa del vegetal al día siguiente, esto se realizó durante tres días hasta masa constante. Con la masa seca de un portaobjetos se decidió hacer la Dispersión de Matriz en Fase Sólida, colocando dicha masa en un mortero de ágata y 200 mg de C18. De igual manera se efectuó la DMFS con la masa húmeda y se compararon resultados. Sin embargo, dada las diferentes consistencias observadas al homogenizar la lechuga húmeda con el adsorbente, también se realizó un estudio del tiempo de secado de la matriz, se pesó los 200 mg de la lechuga orejona, con los 200 mg del adsorbente, se dejó secar a la intemperie durante 15, 20, 30, 60 y 120 minutos antes de homogenizar con el pistilo, realizando finalmente el proceso de extracción

Se probaron relaciones de adsorbente:matriz 1:1, 2:1 y 4:1, con un tiempo de secado de 30 minutos. En la sección de resultados se discute más detalladamente las observaciones realizadas, con dichas relaciones; la relación adsorbente:matriz que se utilizó para todos los experimentos subsecuentes fue de 1:1. Con cada diferente relación se realizó la DMFS por triplicado.

2.3.5. Validación del método por Dispersión de Matriz en Fase Sólida y HPLC-UV

Una vez optimizada las condiciones de la metodología de extracción, se procedió a validar el protocolo completo de extracción y análisis. En primera instancia se evaluó la linealidad del método, para ello experimentalmente se fortificaron 200 mg de la lechuga orejona, con diferentes volúmenes de la disolución estándar de fármacos de 10 mg/L, en la **tabla 2.1** se pueden observar los niveles de concentración utilizados para el estudio de la linealidad.

Para la validación del método se preparó una disolución de 20 mg/L a partir de la de 100 mg/L, y con esta disolución se prepararon los primeros dos niveles de concentración para la curva de calibración. Se decidió utilizar este intervalo de concentraciones ya que en un artículo (Dodgen, 2013) que realizan el análisis de diclofenaco y naproxeno en col, obtuvieron un límite de concentración de 1.0 mg/Kg, por lo que se partió de la premisa de que en dado caso de existir este tipo de compuestos en las lechugas podrían estar en una concentración similar, dada la similitud entre las matrices.

La linealidad del método de extracción y análisis, así como la recuperación de los analitos del mismo, fue evaluada con las gráficas de la cantidad recuperada en el análisis en función de la cantidad adicionada de los analitos en los distintos niveles de concentración.

Se inyectó 20 µL de cada extracto obtenido con cada nivel de concentración en el cromatógrafo de líquidos, logrando tener una curva de calibración al día. Se realizó por triplicado la curva de calibración en tres diferentes días. De la misma forma que se realizó en la validación instrumental, se verificó la homocedasticidad de los datos, y posteriormente se realizó el análisis por ajuste de mínimos cuadrados, evaluando la linealidad con el coeficiente de determinación (r^2). Se utilizaron los mismos criterios de

aceptación mencionados en la sección de la validación del sistema, así como el uso de la mismas guía de validación de métodos analíticos.

Tabla 2.1. Niveles de concentración utilizadas para la evaluación de la linealidad del método

Nivel de concentración	Volumen adicionado (µL)	Cantidad adicionada de la mezcla de fármacos	Concentración fortificada (ng/mg)
1	2.5 µL de 20.0 mg/L	50 ng	0.25
2	25.0 µL de 20.0 mg/L	200 ng	2.5
3	10.0 µL de 100.0 mg/L	100 ng	5.0
4	25.0 µL de 100.0 mg/L	2500 ng	12.5
5	50.0 µL de 100.0 mg/L	5000 ng	25.0
6	100.0 µL de 100.0 mg/L	10 000 ng	50.0

Para evaluar la repetibilidad y la precisión intermedia del método, DMFS-HPLC-UV, se efectuaron en un día tres extracciones con muestra fortificada en el nivel de concentración 4 y se inyectaron los extractos obtenidos por separado, esto se realizó durante cinco días diferentes. Evaluando los recobros obtenidos para cada analito y el coeficiente de variación en un ensayo intra-día e inter-día.

Se determinaron los límites de detección y cuantificación experimentales y los teóricos. Para la determinación experimental del límite de detección y cuantificación, se realizó la metodología completa ya descrita con anterioridad, sólo que se fue disminuyendo el volumen de alícuota con el que se fortificó la matriz en factores de dilución de dos, esto se hizo hasta que el software del equipo midiera una relación señal:ruido de tres. Para el límite de cuantificación se midió la relación señal:ruido cuando tenía un valor de 10.

Finalmente para el límite de detección y cuantificación estadístico, se obtuvieron de la misma manera que la validación del instrumento, es decir, con ayuda del análisis de regresión de mínimos cuadrados y usando las **ecuaciones 2 y 3**, mencionadas con anterioridad.

2.3.6. Aplicación de la metodología propuesta para la extracción y determinación de AINE en diferentes tipos de lechuga

Teniendo una vez montada la metodología de extracción por DMFS y análisis por HPLC-UV de AINE en lechuga orejona, se verificó el método con diferentes tipos de lechuga, entre las que se probaron estuvieron: romana, italiana, francesa y escarola. En la **figura 2.2** se pueden observar imágenes de los diferentes tipos de lechugas utilizadas para la verificación de la metodología.



(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 2.2. Diferentes tipos de lechugas utilizadas frecuentemente por la población mexicana. (a) lechuga romana. (b) lechuga italiana. (c) lechuga francesa y (d) lechuga escarola.

La selección de las diferentes lechugas para la verificación de la metodología fue en función de la accesibilidad y uso común en la dieta de la población mexicana. Es importante mencionar que no se realizó un lavado de los vegetales adquiridos.

Para evaluar el protocolo completo se realizó el método de extracción por la Dispersión de Matriz en Fase Sólida por triplicado para cada lechuga con adición y sin adición de estándares. Los extractos se inyectaron en el equipo HPLC, obteniendo para cada lechuga dos cromatogramas: la matriz sin fortificar (blanco) y la matriz fortificada.

Para aplicar la metodología desarrollada para la determinación de AINE, se realizó una recolecta de 20 diferentes lechugas, sin importar el tipo, en lugares de venta comunes y de variadas ubicaciones en la Ciudad de México y zona conurbada. Entre los lugares en los que se adquirió el vegetal estuvieron los siguientes:

1. Central de Abasto
2. Mercado de Sonora
3. Mercado de la Merced
4. Mercado de las plantas en Cuemanco
5. Mercado del centro de Xochimilco
6. Mercado de Jamaica
7. Mercado Niños Héroes ubicado en Cuatitlán Izcalli
8. Mercado de San Juan
9. Mercado de las antigüedades (La Lagunilla)
10. Mercado la Ciudadela.
11. Mercado de Medellín
12. Mercado de la Noria, Xochimilco
13. Mercado del centro Coyoacán
14. Recauderías simples de algunas delegaciones del Distrito Federal como Tlalpan, Coyoacán, Tláhuac, Álvaro Obregon, Cuauhtémoc y Azcapotzalco.

En la **tabla 2.2** se relaciona los números de los lugares de procedencia de las lechugas con el tipo de la misma.

Tabla 2.2. Tipo y procedencia de las diferentes lechugas para la evaluación de la aplicabilidad del método

Tipo de lechuga	Procedencia
Romana	2, 5, 8, 9, 13 y 14
Italiana	1, 4 y 11
Francesa	3, 6, 7, 12
Escarola	10

Una vez recolectada las muestras, éstas se trataron de la misma manera que se trató la lechuga orejona que se utilizó para la validación, sólo que no se le adicionaron los fármacos, ya que el objetivo de estos experimentos fue poder determinar si estos analitos se encontraban en estas muestras.

2.3.7. Búsqueda de los AINE en otras muestras vegetales de tipo hoja

Se aplicó la metodología desarrollada y validada, DMFS-HPLC-UV con las lechugas a diferentes vegetales de tipo hoja y similares que se compraron en tiendas de autoservicio de la Ciudad de México. Los vegetales: espinacas, germen de trigo, col blanca, epazote, apio, cilantro, acelga y perejil, se probaron con la metodología propuesta y así se logró tener un criterio de robustez del método, teniendo que un estudio formal de robustez implicaría pequeños cambios a la metodología y que estadísticamente se obtengan respuestas significativamente equivalentes.

De la misma forma se evaluó el método completo con cápsulas pulverizadas de la microalga *Spirulina* (suplemento alimenticio), una matriz diferente a las ya mencionadas, pero que comparten la similitud de estar cargadas de pigmentos y que el crecimiento de la misma se da en contacto con agua.

Para cada vegetal se le realizó el mismo tratamiento de muestra que a las lechugas, una vez obtenido los diferentes extractos, éstos se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos logrando evaluar así los posibles interferentes de cada matriz. Paralelamente a la evaluación de los interferentes de las diferentes matrices, se realizó con los mismos vegetales el procedimiento de extracción con las matrices adicionadas con la disolución estándar de fármacos, y de la misma forma se procedió a inyectar los extractos en el equipo de análisis, con el fin de evaluar la co-elución (efecto matriz) que pudieran tener los AINE con diferentes componentes de matrices vegetales además de la lechuga.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Optimización de la detección con los espectros UV de los fármacos

Como ya se mencionó con anterioridad, el detector utilizado con el equipo cromatográfico fue un espectrofotométrico UV de onda variable, por lo que fue importante conocer la longitud de onda en las que los AINE tienen su máxima respuesta, ya que el límite de detección y cuantificación serán afectados por la selección de la longitud de onda de trabajo. En la **figura 3.1** se pueden observar los espectros UV obtenidos para los seis AINE.

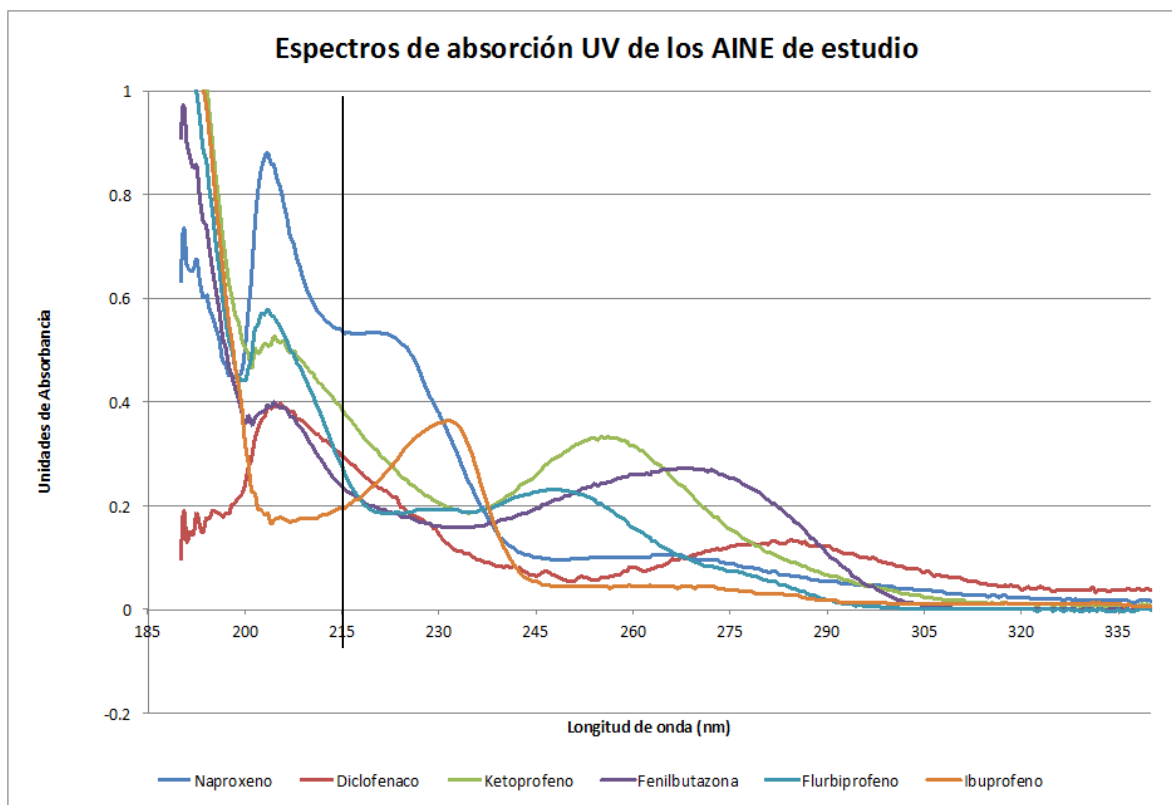


Figura 3.1. Espectros UV para los analitos de estudio. Medidas a una concentración de 5.0 mg/L

En la figura anterior se observa que de los seis AINE en estudio, cinco de ellos: ketoprofeno, flurbiprofeno, fenilbutazona, diclofenaco y naproxeno tienen dos máximos de

absorción, el valor de longitud de onda del primer máximo presenta valores cercanos entre sí para los cinco AINE ya mencionados, sin embargo para el ibuprofeno sólo se puede observar un máximo de absorción (232 nm) y éste se encuentra entre los dos máximos de los otros cinco fármacos, donde su absorptividad no es muy favorable, por lo que la longitud de trabajo se tuvo que seleccionar en función de la respuesta aceptable que tuvieran todos los compuestos hacia el detector, lo anterior a longitudes de onda bajas. Se escogió una longitud de trabajo para el detector espectrofotométrico de 215 nm, ya que en esta longitud de onda se encuentra muy cerca del primer máximo para el naproxeno, ketoprofeno, flurbiprofeno, fenilbutazona y diclofenaco, y al mismo tiempo aseguramos que exista respuesta del ibuprofeno, ya que como se puede observar en los espectros de absorción a dicho valor de longitud de onda el ibuprofeno comienza a tener una respuesta ascendente.

Cabe mencionar que no se seleccionó una longitud de trabajo mayor a 245 nm, porque no todos los analitos tienen respuesta a dichos valores de longitud de onda, o la respuesta es mucho menor que en 215 nm y entre 220 y 254 nm, la respuesta es máxima para el ibuprofeno pero de la misma forma la absorción de los otros cinco AINE es inferior que a 215 nm. Finalmente no se seleccionó por debajo de 215 nm, ya que la mayoría de los compuestos orgánicos absorben en dichas regiones, y así podíamos asegurar un poco más la selectividad del detector hacia los analitos y no hacia los posibles contaminantes que pudiera contener la matriz, además de esta razón, la longitud de onda del ibuprofeno se encuentra en un mínimo, aunque la respuesta no sea muy diferente de 210 nm.

3.2. Optimización de la separación cromatográfica de los AINE

Como ya se ha discutido la polaridad de estos fármacos va de intermedia a baja, por lo que la columna de análisis se seleccionó de tal forma que los analitos tengan cierta afinidad por la fase estacionaria, pero que dicha afinidad no sea tan alta, para así evitar tener tiempos de análisis muy largos. La columna que se decidió utilizar para la separación de los AINE de estudio, fue una con fase estacionaria C18 (no polar) con una fase móvil polar, es decir en modo cromatografía en fase reversa, esto también con el fin de tener una buena resolución entre los analitos de la mezcla de fármacos.

Igualmente se consideró que el pH en la separación tenía un papel importante dado que se trataba de compuestos con funcionalidad de ácido carboxílico y/o ácido enólico. El pKa aproximado que presentan los seis fármacos de estudio es de 4.0, por lo que se decidió controlar el pH con un ácido nivelador en la fase móvil, este ácido fue el ácido perclórico, se adicionó de tal forma que el pH de la fase móvil fuera de 2.5, con esto se aseguró que el 99.9 % de cada uno de los analitos se encontraran en su forma molecular y no la ionizada, y así asegurar que existan interacciones con la fase estacionaria..

La optimización de la separación cromatográfica para el análisis de los compuestos de estudio se basó en los resultados de la variación del factor de capacidad k' , el cual se calculó con el tiempo muerto (t_m) y el tiempo de retención (t_r) de los analitos con las diferentes composiciones de la fase móvil que se presentan en la **tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Logaritmo del factor de capacidad de los AINE en estudio utilizando diferentes proporciones de metanol / agua en la fase móvil, $t_m = 1.28$ min.

AINE	Porcentaje de MeOH en la mezcla MeOH / H ₂ O			
	60	65	70	75
	log k'			
Ketoprofeno	0.72	0.5	0.27	0.12
Naproxeno	0.81	0.59	0.36	0.2
Fenilbutazona	1.04	0.78	0.5	0.31
Flurbiprofeno	1.15	0.9	0.6	0.4
Diclofenaco	1.25	0.98	0.68	0.48
Ibuprofeno	1.31	1.05	0.74	0.53

Se obtuvieron los valores de log k' para los analitos en cada una de las fases móviles utilizadas. En la **figura 3.2** se presenta el gráfico de log $k' = f$ (% MeOH en fase móvil).

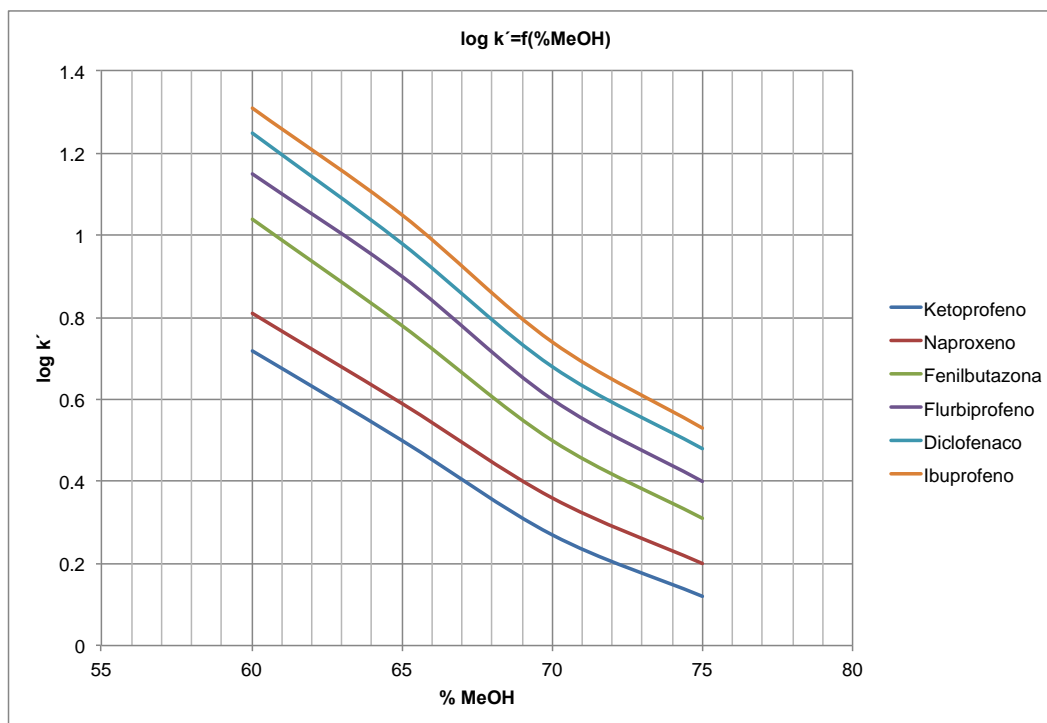


Figura 3.2. Variación del log del factor de capacidad (k') de los AINE de estudio

Se puede observar que las curvas entre los AINE son casi paralelas, lo que indica que la separación resulta posible con cualquiera de las fases móviles probadas. Por lo tanto, se realizó el análisis con una mezcla de 70 % metanol, aunque los $\log k'$ sean pequeños porque se obtiene una separación más rápida y se observó que la resolución no sería mucho mejor que con otras composiciones de la fase móvil.

Para corroborar la decisión, se calcularon algunos parámetros cromatográficos como lo son la selectividad (α), el número de platos teóricos (N) y la resolución entre dos picos (R_s), los resultados se encuentran sintetizados en la **tabla 3.2** y **3.3**. Las ecuaciones utilizadas para los cálculos se encuentran a continuación.

$$\text{(número platos teóricos)} \quad N = 5.545 \left(\frac{t_r}{W_{0.5}} \right)^2 \quad \text{ecuación 6}$$

$$\text{(Selectividad)} \quad \alpha = \frac{t_{r2} - t_m}{t_{r1} - t_m} = \frac{k_2}{k_1} \quad \text{ecuación 7}$$

$$\text{(Resolución entre dos picos)} \quad R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{0.5 (Wb_1 + Wb_2)} \quad \text{ecuación 8}$$

Tabla 3.2. Parámetros cromatográficos para 60 % y 65 % de MeOH en fase móvil. Dónde N fue calculado por columna

Analito	Porcentaje de MeOH en la mezcla MeOH / H ₂ O					
	60 %			65 %		
	N	α	Rs	N	α	Rs
Ketoprofeno	3267.90	1.13	3.6	4073.88	1.27	3.0
Naproxeno	4238.74			5070.02		
Fenilbutazona	5508.12	1.23	5.83	5921.44	1.31	3.99
Flurbiprofeno	6230.98			6421.11		
Diclofenaco	5876.23	1.14	3.18	6082.15	1.17	2.44
Ibuprofeno	6998.99			7341.39		

Tabla 3.3. Parámetros cromatográficos para 70 % y 75 % de MeOH en fase móvil. Dónde N fue calculado por columna

Analito	Porcentaje de MeOH en la mezcla MeOH / H ₂ O					
	70 %			75 %		
	N	α	Rs	N	α	Rs
Ketoprofeno	4990.5	1.23	2.03	5143.89	1.30	1.58
Naproxeno	5654.44			6089.23		
Fenilbutazona	6222.87	1.26	2.94	6589.02	1.29	2.09
Flurbiprofeno	6482.07			6513.07		
Diclofenaco	6141.41	1.14	1.9	6286.86	1.22	1.2
Ibuprofeno	7623.96			7983.71		

En la **tabla 3.2** y **3.3** se observa que los valores de la selectividad (α) son casi similares para 65 y 70 % de fase móvil, lo cual es lógico de esperar dado que la variación de su retención se refleja en curvas paralelas. El tener una selectividad entre picos mayor a 1.0 indica que se tiene una buena separación de los solutos.

En cuanto a los platos teóricos, para los seis AINE se tienen platos teóricos elevados, esto indica el número de equilibrios entre fase estacionaria y fase móvil, este valor se optimiza principalmente cambiando el empaque de la fase estacionaria o la

longitud de la columna, dado la poca practicidad para optimizar este parámetro, éste sólo se calculó para poder observar la magnitud de dicho valor.

Un parámetro importante a considerar es la resolución entre dos picos, observando la **figura 3.2** y la **tabla 3.2** y **3.3** se aprecia que los compuestos más retenidos, diclofenaco e ibuprofeno, son los que presentan mayor problema para la separación. Para los demás picos la resolución que se gana con 65 % y 70 % no es mucha, ya que para ambas fases móviles la resolución es mayor a 2.0, lo que indica que la separación es buena, sin embargo cuando se usa la mezcla con 75 % MeOH la resolución obtenida para dichos analitos no se considera aceptable. Cabe recalcar que la resolución entre dos picos no se maximiza, ya que implica un análisis más costoso y tardados, este valor se optimiza buscando tener 1.5 entre dos picos.

Con 65 % de MeOH se tiene la mejor resolución entre el ketoprofeno y el naproxeno de la mezcla de fármacos, pero el tiempo de análisis casi es el doble; mientras que la resolución entre los mismos dos picos con 70 % MeOH disminuye, pero no a al grado de afectar la separación y se gana tiempo, casi la mitad, para el análisis.

Por lo tanto se tomó la fase de 70 % MeOH / 30 % agua a un pH de 2.5 para el análisis de los seis AINE mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. Para finalizar este apartado en la **figura 3.3** se muestra un cromatograma obtenido con las condiciones óptimas para el análisis de los analitos.

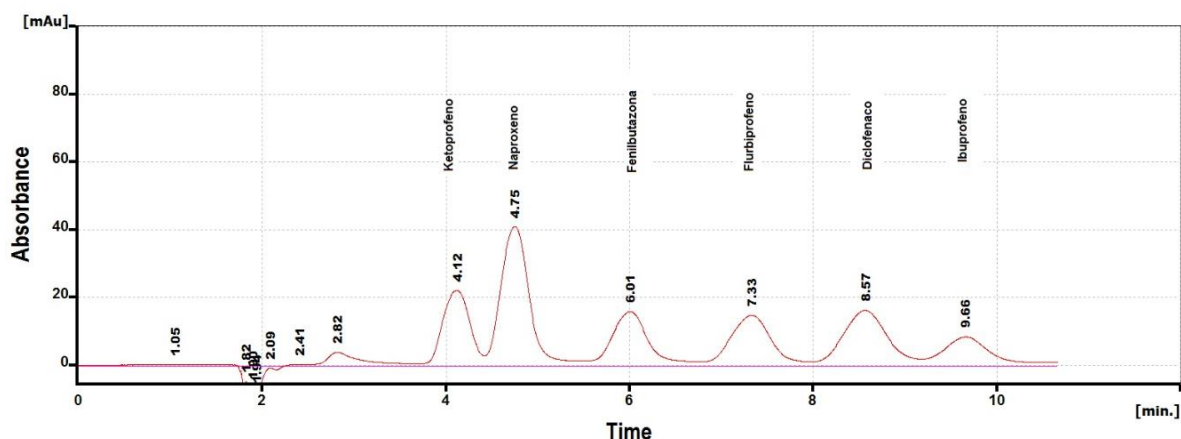


Figura 3.3. Cromatograma obtenido con la mezcla de fármacos a 1.0 mg/L. HPLC Series II Puma. Detector UV Linear Instruments. Columna: ODS 150 mm x 4.6 mm x 5µm. Fase móvil: 70% MeOH-30% Agua (pH = 2.5). Flujo: 1 mL/min Presión: 2700 psi. Longitud de onda: 215 nm. Temperatura 30 °C.

3.3. Validación instrumental para los diferentes analitos en cuestión

En primera instancia se muestran los resultados obtenidos del estudio de linealidad, para ello se muestran las curvas de calibración obtenidas para cada uno de los seis analitos, con su respectivas barras de error (**figura 3.4**).

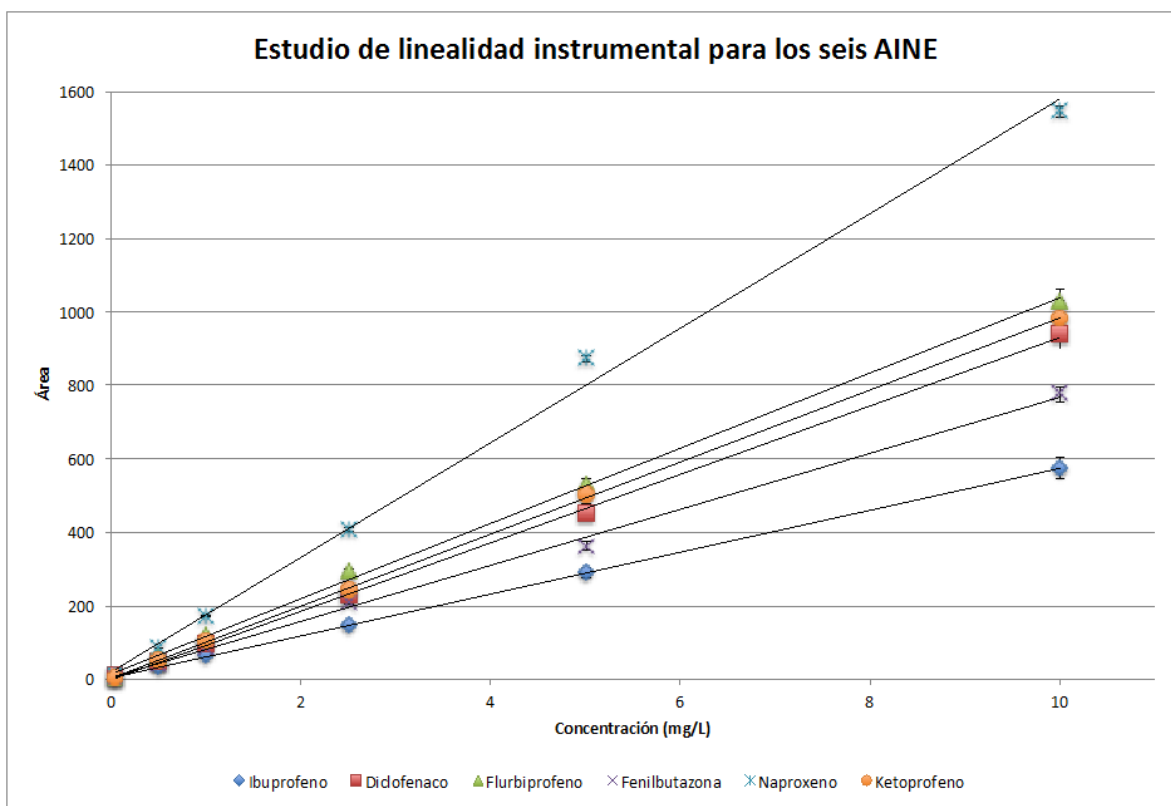


Figura 3.4. Curvas de calibración para los seis AINE obtenidas del estudio de la linealidad instrumental

Como se mencionó en la metodología, se realizó la prueba de Cochran para evaluar la homocedasticidad de los datos, se realizó este estadístico, ya que el algoritmo del cálculo es más sencillo que con otras pruebas como Bartlett, Fligner-Killen, además de que al tener muestras del mismo tamaño (n) la prueba de Cochran es viable.

La prueba de Cochran arrojó que para los seis AINE, las curvas contenían datos homocedásticos. Después se realizó el ajuste de regresión lineal por mínimos cuadrados; en la **tabla 3.4** se presenta las ecuaciones de calibración para cada AINE con su respectivo coeficiente de correlación (r^2).

Tabla 3.4. Estudio de linealidad del instrumento para los seis compuestos de interés

Analito	Ecuación de calibración	Coefficiente de correlación (r^2)
Ketoprofeno	$y = 98.093x + 2.3245$	0.99978
Naproxeno	$y = 155.96x + 19.51$	0.99598
Fenilbutazona	$y = 76.234x + 4.7443$	0.99796
Flurbiprofeno	$y = 102.37x + 14.123$	0.99903
Diclofenaco	$y = 93.157x - 1.7101$	0.99957
Ibuprofeno	$y = 57.018x + 3.5485$	0.99985

Como se pudo observar en las curvas de calibración la dispersión de los datos, ejemplificadas con barras de error, son similares a lo largo de toda la curva lo que nos confirma a simple inspección que efectivamente sobre el eje de las x la variación es mínima y la principal razón de cambio se debe a la respuesta del equipo, por tanto los datos son homocedásticos.

Sobre el coeficiente de correlación (r^2) para los seis analitos se encontró por arriba de 0.99, lo que indica que la respuesta del equipo es lineal en el intervalo de trabajo, en este caso de 0.05 mg/L a 10.0 mg/L.

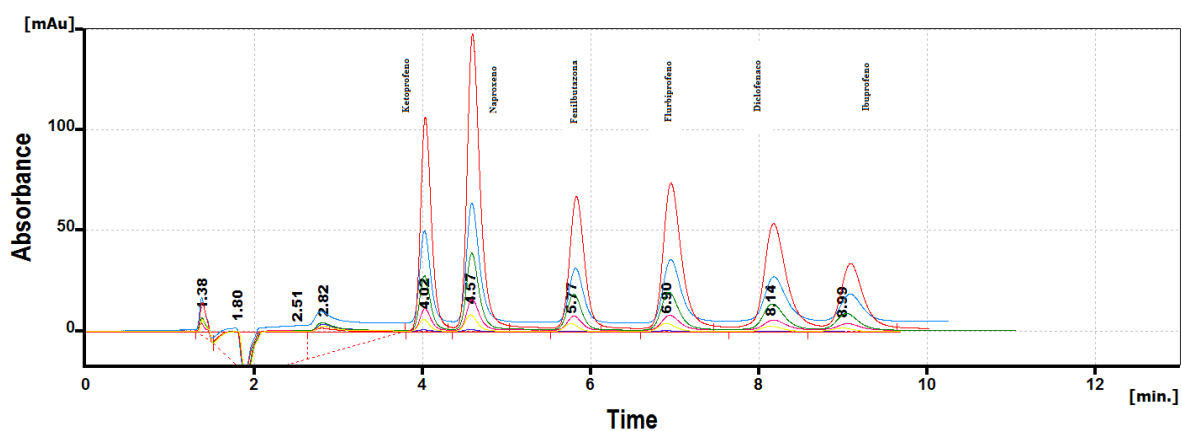


Figura 3.5. Cromatogramas a diferentes concentraciones, 0.05 (morado), 0.5 (amarillo), 1.0 (rosa), 2.5 (verde), 5.0 (azul) y 10.0 mg/L (rojo) para el estudio de la linealidad del equipo cromatografico.

Dentro de la validación se obtuvieron parámetros como el límite de detección, de cuantificación, la repetibilidad y la precisión intermedia. Los resultados obtenidos se recopilaron en la **tabla 3.5**.

Tabla 3.5. Resultados de los parámetros de validación instrumental para el análisis de AINE

Analito	Parámetros de validación		Límites experimentales		Límites estadísticos	
	Repetibilidad (% CV) n= 5*	Precisión inter-día (% CV) n= 3*	Límite de detección (LD) mg/L	Límite de cuantificación (LC) mg/L	Límite de detección (LD) mg/L	Límite de cuantificación (LC) mg/L
Ketoprofeno	0.537	0.950	0.006	0.020	0.011	0.034
Naproxeno	1.687	2.340	0.006	0.020	0.007	0.021
Fenilbutazona	1.987	2.241	0.012	0.041	0.015	0.044
Flurbiprofeno	2.276	2.689	0.012	0.041	0.011	0.033
Diclofenaco	1.103	1.097	0.012	0.041	0.012	0.036
Ibuprofeno	1.134	1.449	0.025	0.075	0.018	0.041

*Determinada para un nivel de concentración de 2.5 mg/L

Analizando los resultados de la **tabla 3.5** se puede observar que los coeficientes de variación de la repetibilidad y la precisión inter-día son buenos, ya que en la literatura (AEFI 2011) se reporta que un coeficiente de variación bueno es máximo del 5 % para un ensayo con disoluciones estándares, y para los seis analitos de estudio se tienen coeficientes de variación menores al 5 %. Es importante mencionar que el coeficiente de variación depende la dispersión de los datos respecto a la media poblacional, entre mayor sea el coeficiente de variación los datos presentan una mayor heterogeneidad.

Para los límites de detección y cuantificación experimentales, se obtuvieron valores relativamente bajos considerando la sensibilidad del detector de UV. En la literatura para estos compuestos se reportan límites de detección y cuantificación que van de 0.0060 a 0.0330 mg/L (Calderón-Preciado et al., 2011) para nivel de contaminantes emergentes, lo cual indica que los límites estadísticos y experimentales del LD y LC en este trabajo, se encuentran dentro de lo esperado según las publicaciones más actuales, lo que conlleva a que se tenga la certeza de poder discriminar la identificación de estos contaminantes en estos niveles de validación.

En la metodología, se describieron las ecuaciones utilizadas para el cálculo del límite de detección y cuantificación. Estas ecuaciones pueden ser utilizadas si se tiene la certeza de que los datos son homocedásticos y que la variación en el eje de las x es despreciable, dado que los datos obtenidos en la validación del método cumple con los requisitos anteriores, y además que el nivel más bajo del intervalo de trabajo en el que se verificó la linealidad de cada sistema se encuentran muy cerca del límite de cuantificación, lo que conlleva a que la incertidumbre asociada en la determinación de los límites de detección y cuantificación es mínima, es que se tiene la certeza de que se realizó una correcta elección de las ecuaciones para los cálculos de los límites de detección y cuantificación. Lo anterior se puede constatar al tener valores experimentales de dichos límites similares a los estadísticos, lo que nos confirma lo anteriormente descrito.

3.4. Desarrollo y optimización del método de extracción de los AINE mediante Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS)

3.4.1. Evaluación de los frentes de elución de los analitos

Dada la naturaleza de la matriz en la que se aplicó la metodología desarrollada, fue que se decidió utilizar una técnica como la Dispersión de Matriz en Fase sólida (DMFS) que permite trabajar con las muestras sólidas, además que se trata de una técnica robusta, eficiente, selectiva, económica y de sencilla manipulación.

Esta técnica presenta mucha similitud con la Extracción en Fase Sólida (EFS), sin embargo su principal diferencia es que la muestra se disgrega con el adsorbente, funcionando éste además de fase estacionaria como abrasivo de las paredes celulares de la matriz vegetal, formando una columna de carácter cromatográfico único dado que combina las propiedades del adsorbente con las de la matriz. Considerando que los principios de la cromatografía se pueden aplicar en la técnica de extracción; lo primero que se evaluó fue la afinidad de los analitos a dicho adsorbente y así mismo la recuperación de los fármacos. Para ello se utilizaron dos disolventes comunes en la cromatografía de líquidos en fase reversa: el acetonitrilo y el metanol.

Desafortunadamente cuando se probó el acetonitrilo se observaron extractos turbios, esto se debe a la baja solubilidad de los AINE en dicho disolvente, por tanto se descartó el acetonitrilo para efectuar los estudios de recuperación de los fármacos.

En la **figura 3.6** se observan los frentes de elución determinados para los seis AINE de estudio en una mezcla 30 % MeOH y 70 % agua. Esta mezcla es considerada de fuerza eluyente débil, dado que sólo permite la recuperación de los analitos en porcentajes bajos, menores al 50 %.

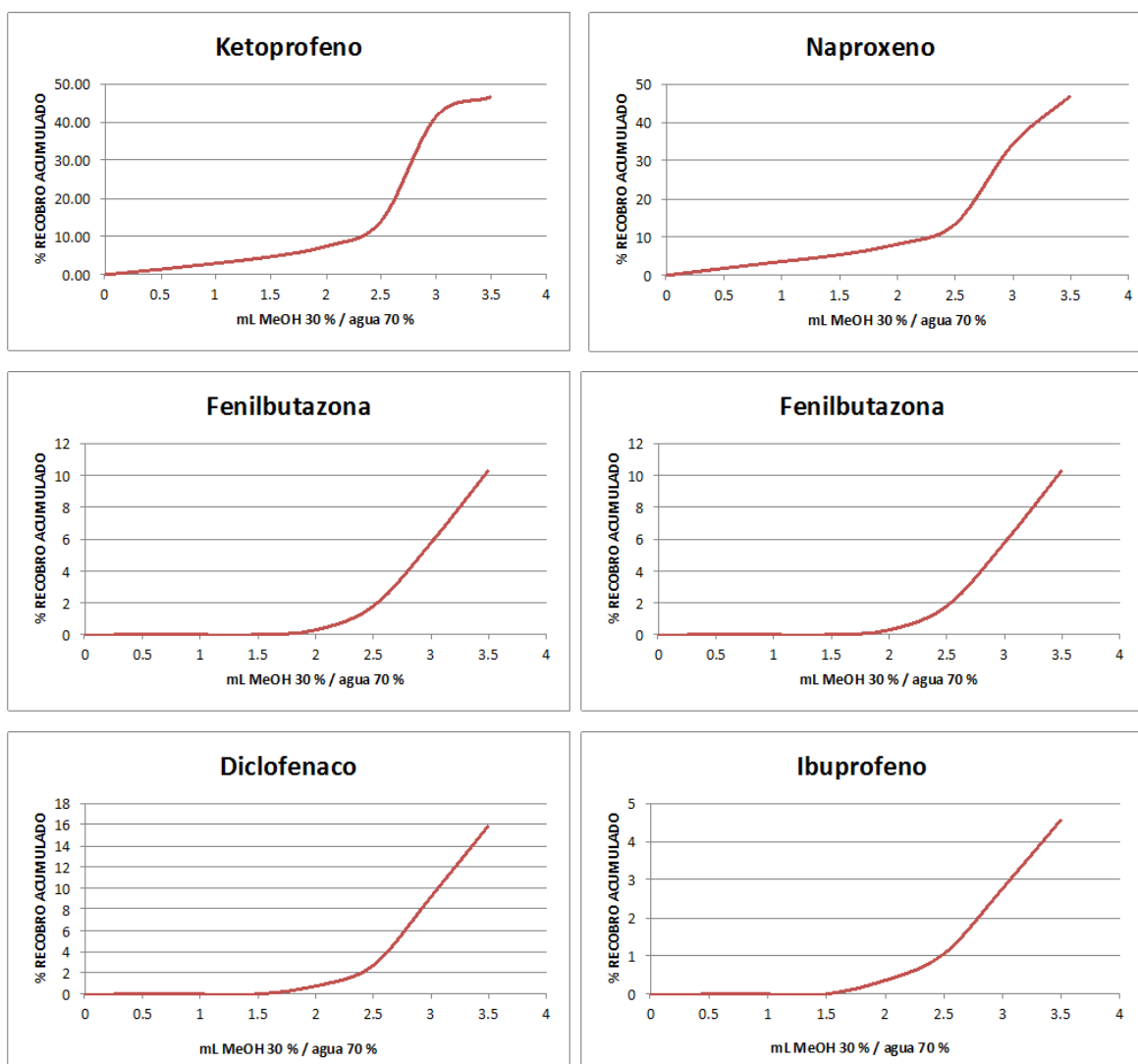


Figura 3.6. Elución para los seis AINE en cuestión utilizando una mezcla 30 % MeOH / Agua. Evaluados para una concentración de fortificación de 12.5 ng/mg de adsorbente

Se trazaron los frentes de elución de los analitos con diferentes proporciones de MeOH en diferentes mezclas acuosas con el fin de evaluar el volumen y concentración de disolvente en el cual los analitos son recuperados obteniendo recobros altos y de la misma forma se determinó qué cantidad de dicho disolvente podía aplicarse al cartucho como lavado, y sin presentar una pérdida importante de los fármacos (menor al 5 %).

Como se puede observar en las gráficas de la **figura 3.6** la fuerza eluente de la mezcla metanol / agua, no es lo suficientemente fuerte para eluir con buenos porcentajes de recuperación a los analitos, ya que el % de recobro más alto (aproximadamente 50 %) se alcanza con aproximadamente 3.5 mL de la mezcla y sólo para el ketoprofeno y el naproxeno, además el volumen en el que se logra dicha recuperación es muy alto, lo que se traduciría a tener en el extracto a los analitos muy diluidos, lo que requeriría de un paso de evaporación para poder estar cerca del límite de cuantificación instrumental. Por el contrario, las curvas muestran que el uso de 1 mL de este eluente podría servir para eliminar algunas interferencias sin desorber a los compuestos de interés, esto se sabe ya que el volumen de fuga de los analitos cuando se utiliza esta mezcla hidrometanólica es muy pequeño.

Por lo anteriormente dicho, se decidió evaluar la recuperación de los analitos con otros eluentes de fuerza mayor como lo fue una mezcla con agua y metanol al 40 % y 50 %.

En la **figura 3.7** se pueden apreciar los inicios de los frentes de elución hasta 2.5 mL obtenidos para los analitos con dichas mezclas. Como se puede analizar en la figura el porcentaje de recuperación aumenta al incrementar la fuerza eluente de la mezcla, sin embargo aun con dichas mezclas, 40 % y 50 % MeOH, no se alcanzaron recobros altos (mayores al 80 %) con volúmenes menores a 2 mL, ya que el alcanzar porcentajes de recuperación altos con dichas mezclas, implicaría un uso mayor de disolvente (mayor a 2 mL), lo cual se evitó ya que se quiso desarrollar un método con el menor uso de disolventes y reactivos, logrando así evitar evaporar los extractos.

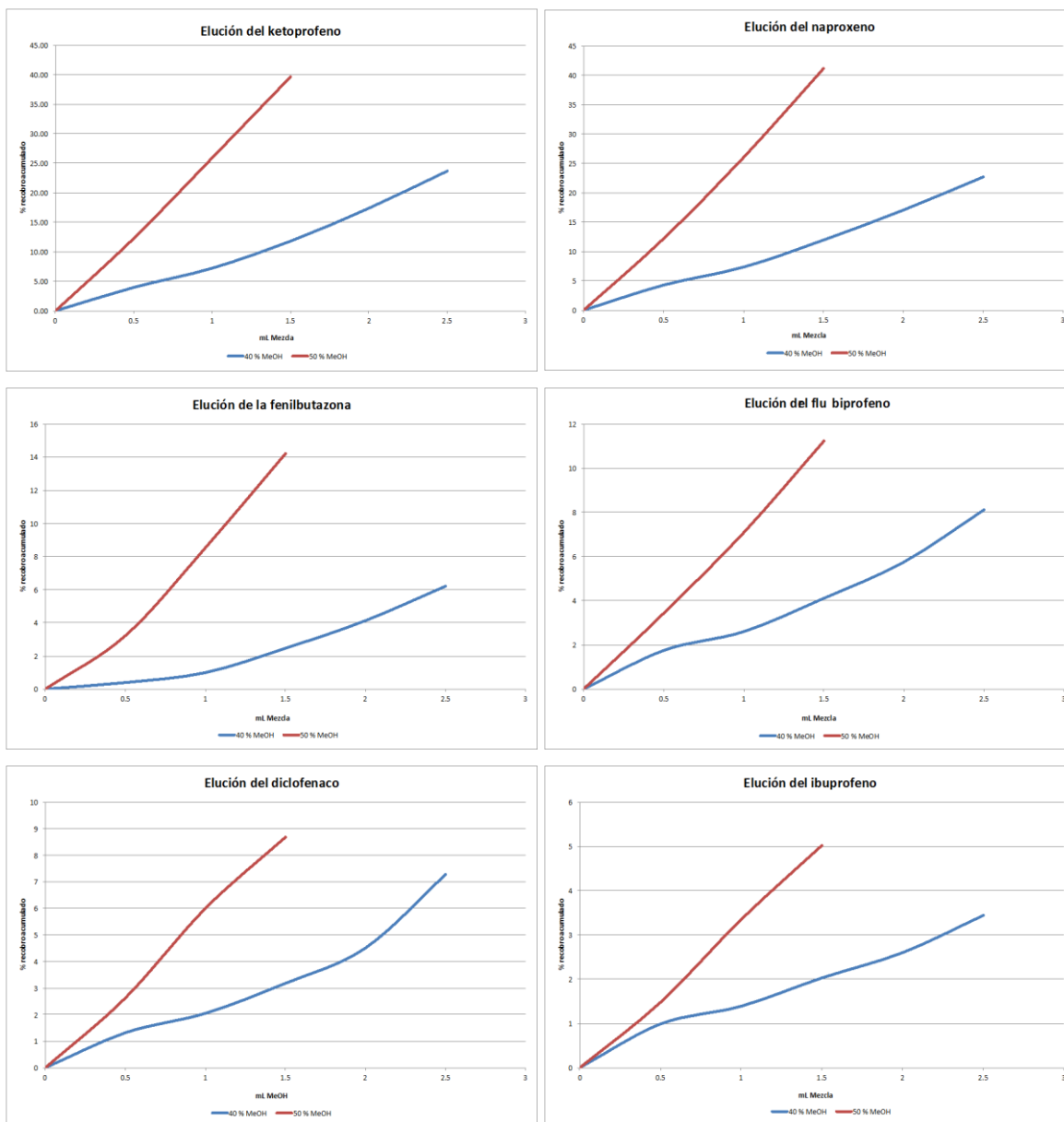


Figura 3.7. Elución de los analitos de estudio utilizando dos mezclas diferentes 40 % MeOH y 50 % MeOH. Evaluados para una concentración de 12.5 ng/mg de adsorbente

Es importante notar que cuando se utiliza una mezcla acuosa con 40 % metanol la fuga de los analitos es mínima aun aplicando volúmenes mayores, como lo es 1.0 mL, situación contraria cuando se hizo pasar la mezcla con 50 % MeOH, a dicho volumen la fuga de los analitos ya es considerable con ese volumen..

Por ejemplo; para la fenilbutazona aplicando un volumen de 1.0 mL de una mezcla 40 % MeOH y 60 % agua, la fuga de dicho analito es aproximadamente el 1.0 %, en

cambio, para el mismo fármaco y haciendo pasar por el cartucho el mismo volumen sólo que de una mezcla metanol / agua 50%/50%, la fuga de la fenilbutazona es del 8.5 %.

Como se puede apreciar la fuerza eluyente de la mezcla que se aplica en el cartucho de extracción es primordial, ya sea para efectuar un lavado de interferencias o para realizar la elución y recuperación de los analitos. Analizando los respectivos gráficos de las **figuras 3.6 y 3.7** se pudo deducir que en caso de emplear dichas proporciones (30, 40 y 50 % MeOH) para recuperar los fármacos, los volúmenes para obtener cerca del 80 % de recobro deben ser muy altos (mayores a 2 mL), que como ya se dijo es poco práctico.

Es por lo anterior que se probaron dos mezclas acuosas de mayor poder de elución, 60 % y 70 % metanol. En la **figura 3.8** se muestran los promedios de los frentes de elución obtenidos por triplicado para dichas mezclas de fase móvil, en ésta se observa que el porcentaje de recuperación de los AINE aumentó notablemente logrando alcanzar casi el 80 % para los seis fármacos cuando se utilizó la mezcla 70 % MeOH, para la mayoría de los AINE con 1.0 mL de la mezcla hidroorgánica al 70 % MeOH se obtienen recobros cercanos al 80 %.

También se puede observar que el ibuprofeno es el que presenta una mayor afinidad hacia la fase estacionaria dado que es el más lento en eluir, siendo el ketoprofeno y el naproxeno los que presentan una menor afinidad hacia la fase estacionaria, esto se ve en los volúmenes necesarios para eluir dichos compuestos. Para el ibuprofeno haciendo pasar 2.0 mL de la mezcla acuosa al 70 % de MeOH se logra recuperar el 45 %, mientras que con 1.0 mL de la misma mezcla se encuentran recobros del 80 % para el ketoprofeno y naproxeno. Esto es congruente con el orden de elución de los fármacos en la columna analítica del HPLC

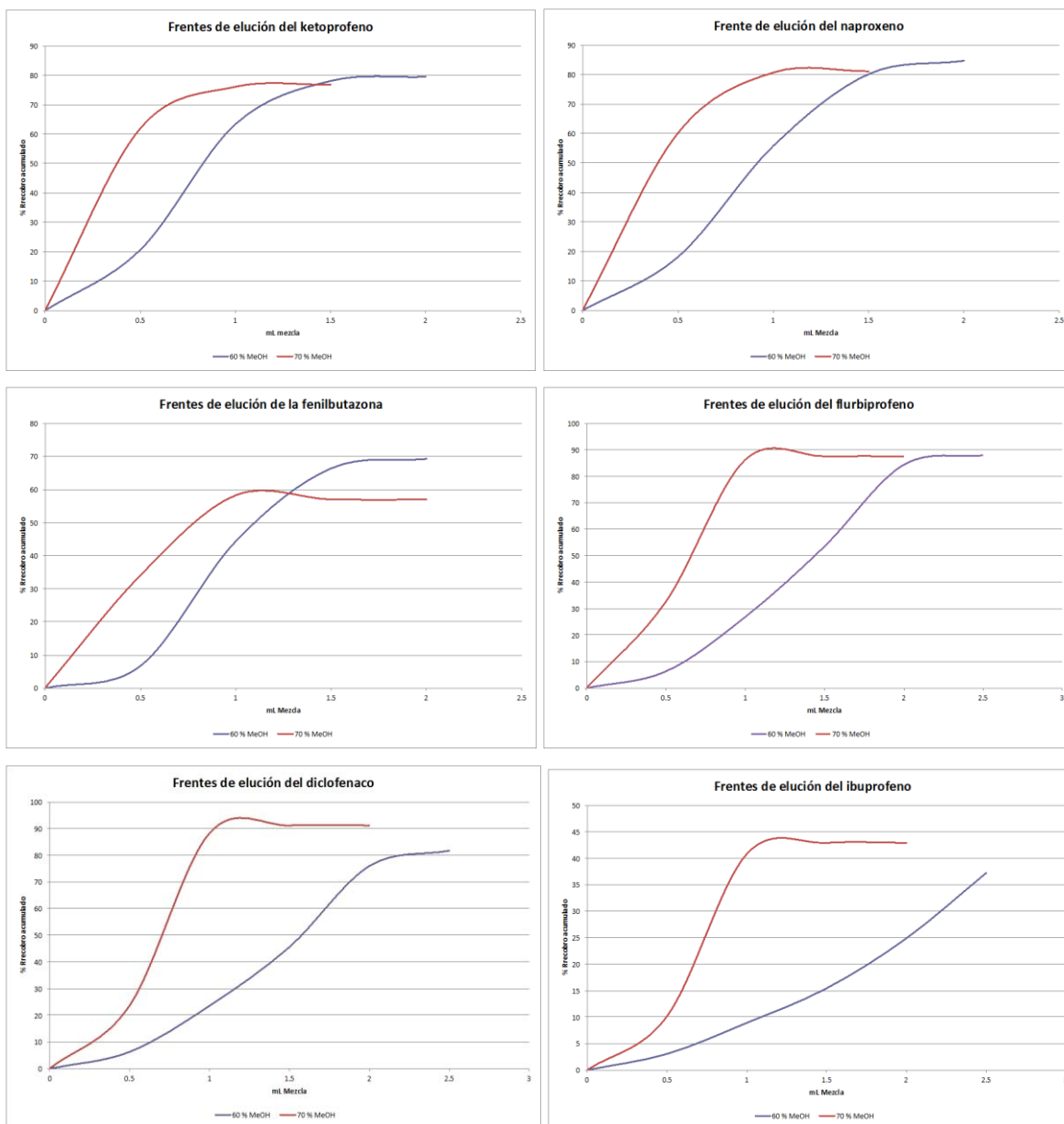


Figura 3.8. Frentes de elución de los analitos de estudio utilizando dos mezclas diferentes 60 % MeOH y 70 % MeOH. Evaluados para una concentración de 12.5 ng/mg de adsorbente

Finalmente, con el apoyo del estudio de los frentes de elución, se probó la metodología ya descrita con una mezcla acuosa 80 % MeOH y por separado utilizando solamente metanol para recuperar los analitos.

Para simplificar los resultados obtenidos, en la **tabla 3.6** se muestran los recobros calculados utilizando 0.5 mL de la mezcla acuosa con 80 % metanol y 100 % metanol.

Tabla 3.6. Recobros para los seis AINE. Utilizando sólo metanol y una mezcla metanol /agua 80 / 20

Analito	80 % metanol y 20 % agua		100 % metanol
	% R (0.5 mL)*	% R acumulado (1.0 mL)*	% R (0.5 mL)*
Ketoprofeno	74.8	75.8	81.3
Naproxeno	80.1	80.8	82.3
Fenilbutazona	75.1	76.1	81.6
Flurbiprofeno	79.4	84.1	86.3
Diclofenaco	78.0	86.4	80.6
Ibuprofeno	70.5	84.1	82.4

*Evaluados para una concentración de fortificación de 12.5 ng/mg de adsorbente

Es posible notar que los recobros obtenidos aplicando 1.0 mL de la mezcla con 80 % MeOH y los recobros con 0.5 mL aplicando metanol 100% son similares, además de ser recobros aceptables (mayores al 80 %) para un análisis a nivel de trazas.

A modo de resumen en la **figura 3.9** se presenta un gráfico de barras donde se comparan para todas las mezclas hidrometanólicas que se utilizaron en los estudios de retención de los analitos hacia el adsorbente el porcentaje de recuperación para un mililitro de fase móvil aplicado al cartucho de extracción. En dicho gráfico se observa notoriamente el papel de la fuerza eluyente de la fase móvil en el cartucho de extracción, a mayor porcentaje de disolvente orgánico mayor poder de elución (cromatografía en fase reversa), y por lo tanto los analitos tendrán una mayor afinidad hacia la fase móvil y tenderán a fugarse, caso contrario cuando se utilizan proporciones de mezclas con bajo poder de elución, los analitos tendrán mayor afinidad al adsorbente, lo que implica volúmenes de fuga pequeños, gran afinidad hacia el adsorbente lo que se traduce en altos volúmenes de disolvente en el caso de querer utilizar dichas proporciones para la recuperación de los fármacos.

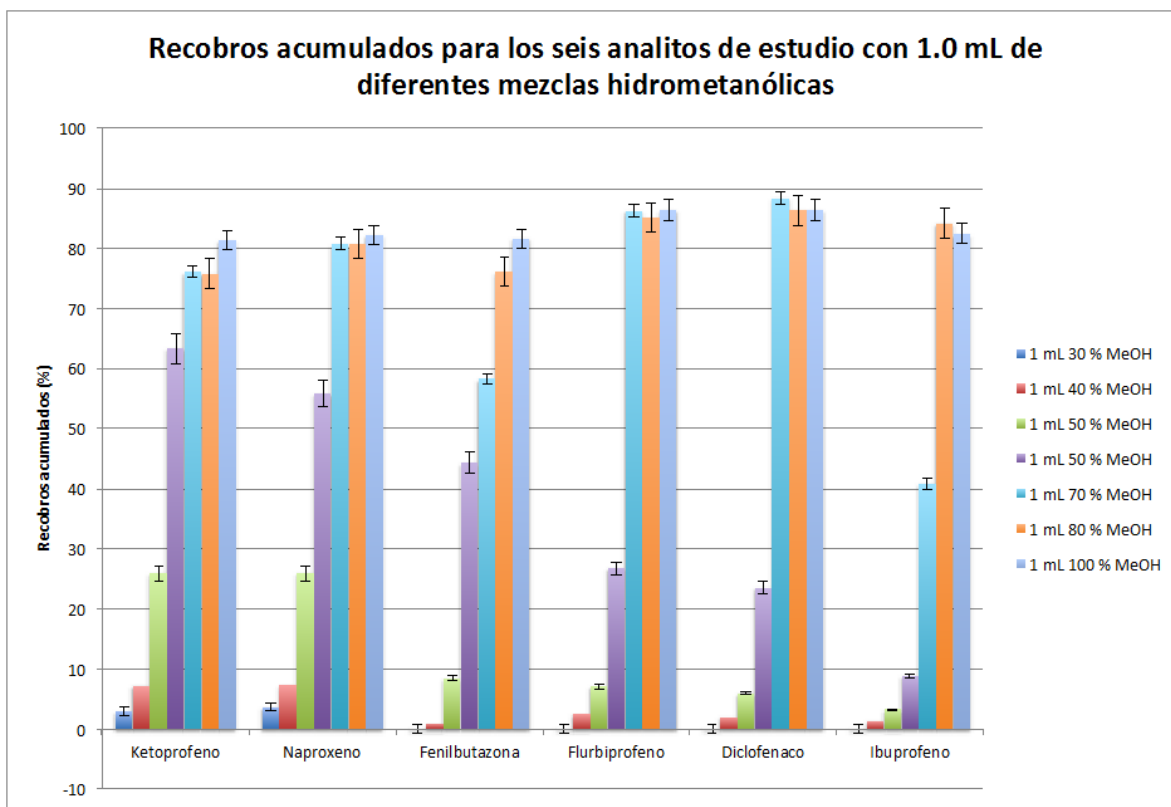


Figura 3.9. Gráfico de barras de los recobros acumulados obtenidos tras aplicar 1 mL de diferentes composiciones de eluente

Con todo lo analizado en este apartado se tomó la decisión de llevar a cabo la elución de los analitos con 0.5 mL de metanol puro, logrando así tener la mayor concentración de los fármacos en el menor volumen posible.

3.4.2. Evaluación de interferentes e implementación de la secuencia de elución

Se evaluó el blanco de la matriz, el cual consistió de lechuga orejona, para ello se aplicó la metodología descrita en la **sección 2.3.4.2**. En la **figura 3.10** se puede observar el cromatograma obtenido del extracto de la matriz que se realizó por la DMFS y aplicando 0.5 mL de metanol para lograr la desorción de los analitos en la columna de extracción. En el cromatograma se pueden observar algunas impurezas que pudieron haber afectado en la identificación de los analitos de interés, por esta razón, previo a la elución de los analitos del cartucho de DMFS, y con base en los resultados de las curvas de elución y teniendo como criterio que cualquier lavado aplicado al cartucho la fuga de los analitos no debía

sobrepasar el 5 %, con esto es que se implementó una serie de lavados que se cita a continuación, una vez empacado el adsorbente con la matriz:

1. Cuatro mililitros de agua desionizada acidificada con ácido perclórico (pH 2.5).
2. Dos mililitros de una mezcla metanol / agua 10/90.
3. Un mililitro de una mezcla metanol / agua 30/70
4. Medio mililitro de una mezcla metanol / agua 40/60
5. Medio mililitro de metanol

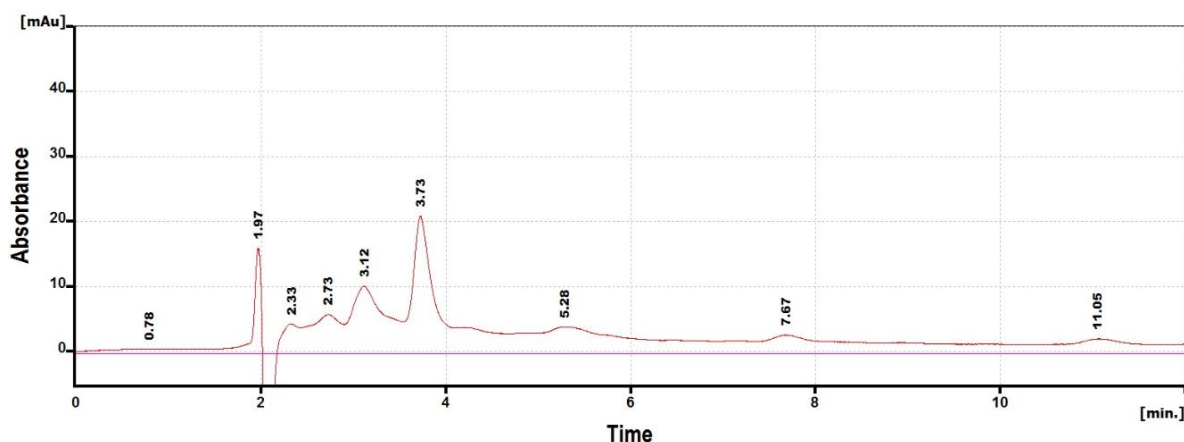


Figura 3.10. Perfil cromatográfico del extracto de la lechuga orejona sin aplicar secuencia de lavados

Para tener una visión más amplia de la matriz se encontró que los componentes de las lechugas puede variar en proporción dependiendo del tipo del que se trate, pero eso no incluye que la componentes en esta hortaliza sean los mismos. Las sustancias que componen esta matriz se encuentran 1 mg de hierro, 1.37 g de proteínas, 34.70 mg de calcio, 1.50 g de fibra, 220 mg de potasio, 3 mg de yodo, 0.23 mg de zinc, 1.40 g de carbohidratos, 8.70 mg de magnesio, 3 mg de sodio, 187 μg de vitamina A, 0.06 mg de vitamina B1, 0.07 mg de vitamina B2, 0.80 mg de vitamina B3, 0.11 μg de vitamina B5, 0.06 mg de vitamina B6, 1.90 μg . de vitamina B7, 33.60 μg de vitamina B9, 0.1 μg de vitamina B12, 13 mg de vitamina C, 0.60 mg. de vitamina E, 28 mg. de fósforo, 0 mg. de colesterol, 0.60 g de grasa, 1.36 g. de azúcar y 13 mg de purinas (URL: <http://alimentos.org.es/lechuga> consultada por última vez el día 12-marzo-2016).

El primer lavado con agua se aplicó con la finalidad de eliminar componentes altamente polares de la muestra y la degradación de carbohidratos que pudiera contener la matriz, ya que los azúcares y carbohidratos se hidrolizan en medios ácidos generando los monosacáridos correspondientes, los cuales son solubles en agua. Los lavados 2, 3 y 4 se seleccionaron para ir eliminando gradualmente interferencias como lo pueden ser las vitaminas liposolubles. Teniendo esta idea, los lavados para eliminar dichas interferencias tenían que ir aumentando su fuerza eluyente sin llegar a fugar los analitos, de esta forma se decidió lavar solo con 0.5 mL de la mezcla hidroorgánica al 40 % MeOH, considerando la información que proporcionaron los frentes de elución antes descritos. Esta secuencia nos aseguró un volumen efectivo de lavado, sin llegar a perder más del 5 % de los AINE.

Finalmente la recuperación de los fármacos de interés se realizó con 0.5 mL de metanol, por lo discutido en la sección anterior y el extracto obtenido se llevó al equipo de análisis. En la **figura 3.11** se aprecia el cromatograma obtenido tras aplicar dicha secuencia de lavados y se observa que es adecuada, ya que dentro del intervalo del tiempo de retención en el que se encuentran los AINE (4.0 – 10.0 min) no se observaron interferentes notables, por lo que la discriminación en la ausencia o presencia de dichos analitos se pudo llevar a cabo con dicha metodología DMFS-HPLC-UV.

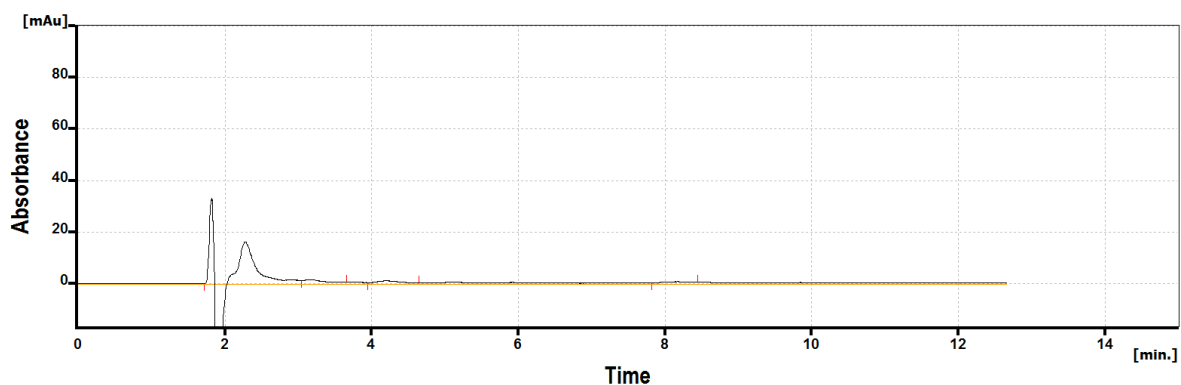


Figura 3.11. Cromatograma obtenido de la lechuga orejona tras aplicar la secuencia de lavados

3.4.3. Estudio del efecto matriz y su interacción con los analitos

Una vez determinada la secuencia de elución de los AINE en las muestras de lechuga, se prosiguió a evaluar la interacción que pudiera existir de los analitos con la matriz, es decir observar si el comportamiento que tienen los fármacos en la DMFS con los estándares y sólo el adsorbente, es el mismo comportamiento con la muestra. Se realizó la DMFS como se describió en la metodología (ver sección 2.3.4.3).

En la **figura 3.12** se puede observar el cromatograma obtenido del extracto de la lechuga orejona fortificada con los AINE, para un nivel de concentración 12.5 ng/mg de muestra para cada fármaco.

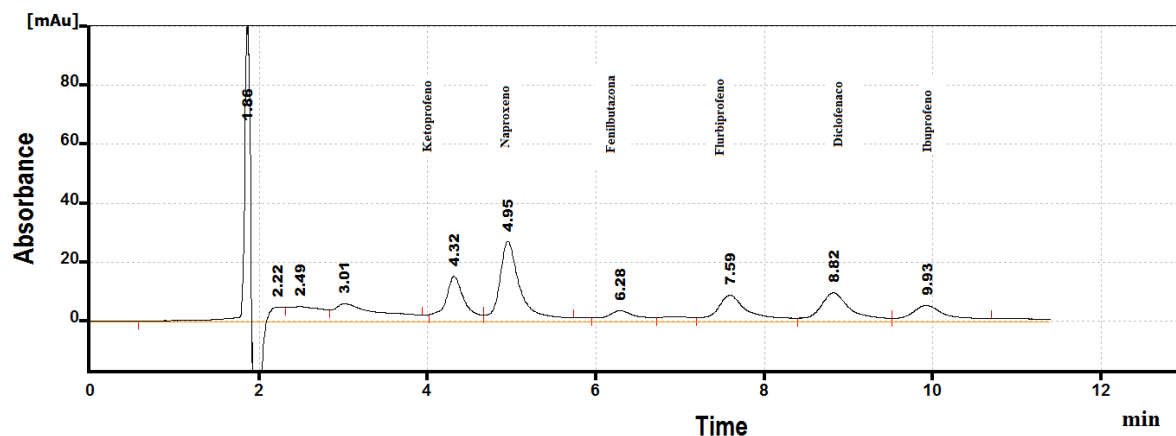


Figura 3.12. Cromatograma de un extracto obtenido tras adicionar la mezcla de fármacos (12.5 ng /mg) a la lechuga orejona

En la **tabla 3.7** se observan los recobros obtenidos para cada AINE con la muestra fortificada, así como sus coeficientes de variación obtenidos de un quintuplicado. En ésta se puede observar que los coeficientes de variación son bajos, considerando la complejidad de la matriz lo que indica que la metodología de preparación de muestra es repetible y viable para el aislamiento de los analitos de estudio. Además cabe resaltar que los recobros obtenidos en el ensayo con estándares fueron similares a los obtenidos con la matriz fortificada para cinco analitos: ketoprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, diclofenaco e ibuprofeno; lo que indica que no existe efecto matriz hacia estos fármacos, es decir la

metodología que se propuso permite la identificación de los AINE en esta matriz sin tener interferencias por la misma.

Tabla 3.6. Recobros y coeficientes de variación para los AINE de estudio a un nivel de concentración de 12.5 ng/mg.

Analito	Recobro (%)	% CV
Ketoprofeno	90	7.4
Naproxeno	86.3	1.2
Fenilbutazona	-	-
Flurbiprofeno	85.9	0.85
Diclofenaco	83.1	4.45
Ibuprofeno	82.8	7.9

Sin embargo, en el cromatograma del extracto con la muestra fortificada con estándares (**figura 3.12**) se observa que el pico asociado a la fenilbutazona, 6.28 min, se ve disminuido notoriamente comparado con el pico obtenido en el cromatograma de la disolución estándar (**figura 3.3**), esto se debe a que existe una interacción de la matriz con este analito en la muestra.

Se realizaron varios ensayos de DMFS con el objetivo de comparar los diferentes cromatogramas obtenidos del extracto de la lechuga orejona, como resultados se obtuvo que para el ketoprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, diclofenaco e ibuprofeno siempre se obtenían porcentajes de recuperación reproducibles; sin embargo, para la fenilbutazona se apreció una gran heterogeneidad en los resultados, para todos los ensayos realizados se obtuvieron recobros por debajo del 50 %, sólo que este porcentaje de recobro no era repetible, en algunos ensayos se obtenía el 45 %, otras veces 20 %, 35 % de recobros y en algunas ocasiones ausencia del pico cromatográfico asociado a este analito; por lo que investigando en la literatura se conoció que la fenilbutazona interaccionaba con la matriz y ésta se degradaba.

En la literatura (Kennet et al.,1986) se encontró que la fenilbutazona dentro de los AINE es de los compuestos menos estables por tratarse de un derivado de ácido enólico. Las dos principales reacciones de degradación que puede sufrir la fenilbutazona es una

reacción de hidrólisis y una reacción de oxidación. La oxidación de la fenilbutazona principalmente es fotocatalítica, pero su cinética de reacción es lenta, por lo que la oxidación de la misma en el tratamiento de la muestra no es factible ya que el proceso de extracción es rápido, además de que al inicio de la investigación se realizó un estudio de la estabilidad de la mezcla de fármacos y la descomposición de dicha mezcla se apreciaba después de un mes de elaborada la disolución.

La hidrólisis de la fenilbutazona da principalmente dos productos de degradación un alcohol y una cetona (Min Li 2012), en la **figura 3.13** se muestra un esquema de reacción, en la cual se pueden ver los principales metabolitos de este analito. Los compuestos enólicos pueden sufrir una hidrólisis espontánea seguida de auto-oxidaciones como lo es el caso de la fenilbutazona.

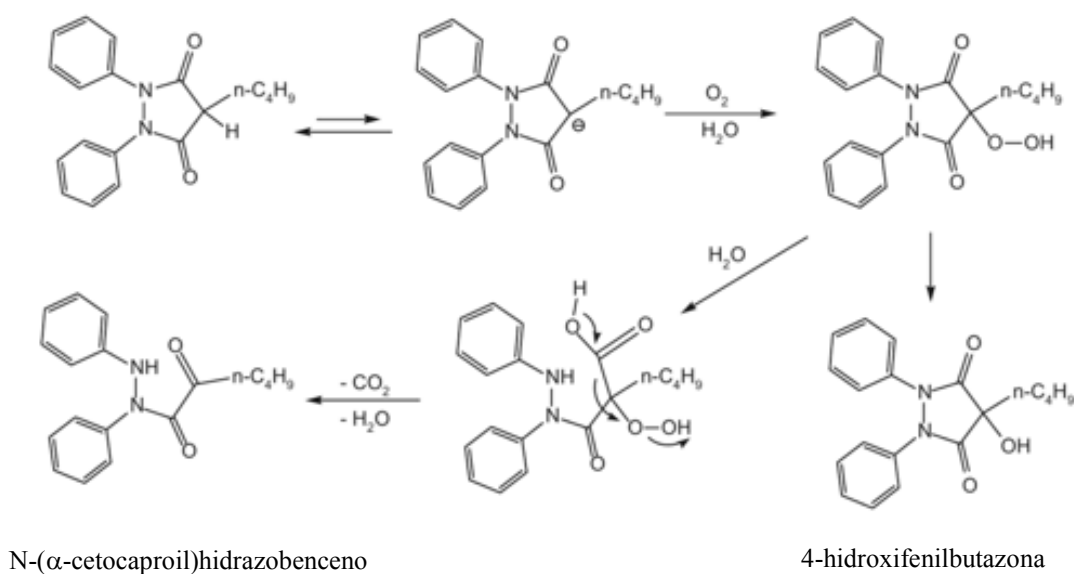


Figura 3.13. Esquema de reacción de los principales productos de degradación de la fenilbutazona

Los productos de degradación de la fenilbutazona son muy solubles en agua, sin embargo, la velocidad de la hidrólisis de este AINE se ve afectada por el pH, temperatura, y el medio o disolvente en el que se encuentre. Se ha reportado que la fenilbutazona en disolventes con alta constante dieléctrica, como lo es el agua la desprotonación es favorecida, favoreciendo el equilibrio enólico en lugar de la estructura ceto, terminando así de degradarse (Fabre et al., 1984). Así mismo el papel que juega la acidez en la degradación es que a pH ácidos la transformación se ve favorecida (Grippa et al., 2000),

siendo el pH más estable ligeramente básico, de hecho la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos reporta que las disoluciones de dicho fármaco se realizan a pH 7.9.

Con la información previamente mencionada, fue que se dedujo que con el agua ligeramente ácida que contiene la lechuga y el tiempo que se deja interaccionar una vez fortificada la matriz es suficiente para lograr la degradación de la fenilbutazona, de hecho la mayoría de las artículos reportados analizan e identifican los productos de degradación en lugar de la fenilbutazona, y aquellas publicaciones en donde se estudia este fármaco se evita el uso de adsorbentes como la sílice, o disolventes próticos.

Dadas las características estructurales tan diferentes de los productos de degradación de la fenilbutazona, la identificación de éstos mediante la metodología que hasta el momento se había planteado hubiera resultado difícil, ya que al tratarse de alcoholes y compuestos ceto-enólicos su solubilidad en agua es elevada, lo que indica que se debería de cambiar la metodología completa. Además de que las condiciones cromatográficas se hubieran tenido que cambiar totalmente, también siendo indispensable el uso de un gradiente y otra columna más selectiva, lo cual aumentaría el costo de la metodología, por un solo analito. Sin embargo en un posterior trabajo no se descarta el análisis de estos metabolitos con otro tipo de fármacos de polaridad similar como lo podría ser el acetaminofén.

Cabe mencionar que la degradación que sufre la fenilbutazona representa también el mecanismo de eliminación de ésta en el cuerpo humano. Una vez que se oxida, los compuestos se conjugan con el ácido glucorónico (ácido carboxílico similar a la glucosa pero que presenta un grupo carboxilo en el carbono número seis), lo cual hace que sea más hidrosoluble, eliminado así el fármaco por la orina, a este proceso se le conoce como glucoronidación.

Finalmente por todo lo anteriormente discutido se descartó que lechugas pudieran contener fenilbutazona, ya que en caso de existir el fármaco al momento de estar en contacto con esta matriz acuosa, la degradación del mismo sería inevitable.

3.4.4. Estudios de estabilidad de la muestra almacenada y del extracto, la humedad de la muestra y las relaciones muestra:adsorbente en la DMFS

En la optimización de las condiciones del método de extracción de los AINE por la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida, se realizó un estudio de estabilidad tanto de la matriz como de los extractos obtenidos al aplicar el método de extracción.

Durante cuatro meses, una vez a la semana se preparaba y se inyectaba un extracto del blanco de la matriz, como resultado se obtuvo que en los cromatogramas correspondientes no se observaron cambios significativos en el perfil del mismo, es decir no se observaron la presencia de picos nuevos, por lo que se dedujo que la matriz presentó elevada estabilidad. La lechuga molida y triturada fue resguardada en congelación y en viales ámbar, con esto se disminuyó la foto-oxidación de la lechuga, lo que explicaría el porque se pudo utilizar la misma matriz para toda la validación, ya que si existía una descomposición de la lechuga ésta no era perceptible para la detección usada.

Pero la situación fue diferente con los extractos de la matriz (blanco) almacenados durante 24 horas, se observó que sí había diferencia notoria en un extracto de la matriz sin adicionar la mezcla de fármacos inyectada en el momento en que se realizó la metodología de extracción, y el mismo extracto inyectado al día siguiente, los perfiles cromatográficos eran totalmente distintos, en el cromatograma que se obtuvo del extracto que se inyectó al día siguiente de realizada la metodología se observaron varios interferentes en el tiempo de retención de los analitos de estudio, que en un extracto recién obtenido no se observaban; por esta razón se inyectaron todos lo extractos en el mismo día en el que se obtenían y es recomendado que la metodología propuesta se aplique así.

Dada la observación experimental que se realizó al momento de dispersar la muestra en el adsorbente con ayuda del pistilo en el mortero de ágata, se apreció que éste se humedecía por el alto contenido de agua que contenía la lechuga, por lo que se realizó un experimento por quintuplicado donde se dejó secar en 200 mg de lechuga en un portaobjeto hasta masa constante (ver sección 2.3.4.4), y así realizar el método por DMFS en masa seca.

Los resultados que se obtuvieron fueron más que nada observaciones experimentales, ya que los cromatogramas obtenidos usando masa seca y húmeda no

diferían entre sí, se seguían obteniendo recobros parecidos con coeficientes de variación similares. Sin embargo, al utilizar la masa seca, se encontró que se perdía mucha biomasa por raspado del portaobjeto, ya que al no tratarse de una muestra homogénea se generaban conglomerados de matriz que eran muy difíciles de despegar. También una vez despegada la matriz y colocada en el mortero de ágata con el adsorbente, se tenían dos opciones: si se quería homogenizar el adsorbente con la matriz, ésta se tenía que triturar demasiado para destrozarse dicho grumos, porque de lo contrario al momento de realizar los lavados y la elución, al estar muy empacado, la aplicación de la secuencia de eluentes tardaba demasiado tiempo; la segunda opción era no disgregar dichos grumos pero la matriz realmente no se dispersaba con el adsorbente, logrando observar en el cartucho de extracción el adsorbente abajo y la muestra seca arriba, lo cual indica que no se estaba realizando adecuadamente la dispersión de la matriz. Por estas razones fue que se decidió preparar y pesar la muestra en masa húmeda, ya que al final fue más práctico y el perfil de cromatograma no se vio modificado.

Otro factor que se consideró importante para el desarrollo del método, fue el tiempo que se dejaba la muestra en contacto con el adsorbente antes de disgregar y empacar. Se observó que cuando la muestra se pesaba y se dispersaba inmediatamente se volvía una pasta viscosa por el contenido de agua, pero si se pesaba y transcurrido un tiempo se molía con ayuda del pistilo, la cantidad de agua era menor y se obtenía una pasta más sólida. Por lo anterior es que se decidió controlar dicho factor, ésta también podría ser la razón de los recobros tan variantes en la degradación de la fenilbutazona, si se homogenizaba inmediatamente se tenía más contenido de agua, lo que se traduce a una mayor degradación y por ende en menor recuperación. Para poder controlar dicho tiempo, una vez pesada la lechuga orejona se dejó 15, 20, 30, 60 y 120 minutos en contacto con el adsorbente antes de dispersar la matriz.

Los resultados obtenidos fueron importantes; cuando no se dejaba tiempo de secado o se dejaba 15 minutos a la intemperie y se preparaba inmediatamente la muestra, se obtenían perfiles cromatográficos ligeramente diferentes al ya presentado con anterioridad, en el caso de haber seleccionado dichos tiempos de secado para la metodología que se desarrolló, la identificación y/o cuantificación de los analitos a concentraciones muy bajas de los mismos hubiera sido difícil de realizar por la existencia de pequeños picos. Pero a

tiempos de 60 y 120 minutos se obtenía un grumo enorme de biomasa lo cual no era práctico por lo ya explicado con anterioridad. Estos resultados fueron determinantes para fijar un tiempo de espera o tiempo de secado a la intemperie, previo al disgregado de la muestra con el adsorbente. El tiempo que se utilizó para el fin de la metodología fue de 30 minutos, con este tiempo se aseguró que cierta cantidad de agua se evapore de la muestra arrastrando componentes que pudieran ser volátiles y pudieran interferir con la identificación de los AINE, pero dejando al mismo tiempo la suficientemente humedad para poder realizar una manipulación sencilla de la matriz y del empaçado.

Un factor que se considera importante en la Dispersión de Matriz en Fase Sólida es la relación adsorbente:matriz (Steven, 2007). Hasta el momento se había realizado todo el diseño de la metodología con una relación 1:1, aunque también se probaron las relaciones 2:1 y 4:1 para saber si había dependencia de esta relación, al estudiar los perfiles cromatográficos no se observaron cambios significativos en ellos, por lo que se decidió dejar la relación 1:1 y así tener una mayor cantidad de muestra, así se aseguró que en el pesado de la muestra una parte fuera biomasa con la parte acuosa de misma matriz.

3.5. Validación del método DMFS-HPLC-UV

Se evaluaron los mismos parámetros que en la validación instrumental: la linealidad para cada AINE, la repetibilidad, la precisión intermedia, el límite de detección y cuantificación experimental y el estadístico.

En la **figura 3.14** se encuentran las curvas de linealidad, $\text{área} = f(\text{ng/mg de muestra})$, para el ketoprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, diclofenaco e ibuprofeno. Al analizar cada curva se observa que las barras de error son muy pequeñas, y son de magnitud similar, lo que nos podría dar una idea de que se tratan de datos homocedásticos por simple inspección, de cualquier forma se realizó la prueba de Cochran para confirmar; la prueba arrojó que para los cinco analitos, las curvas están construidas con datos homocedásticos.

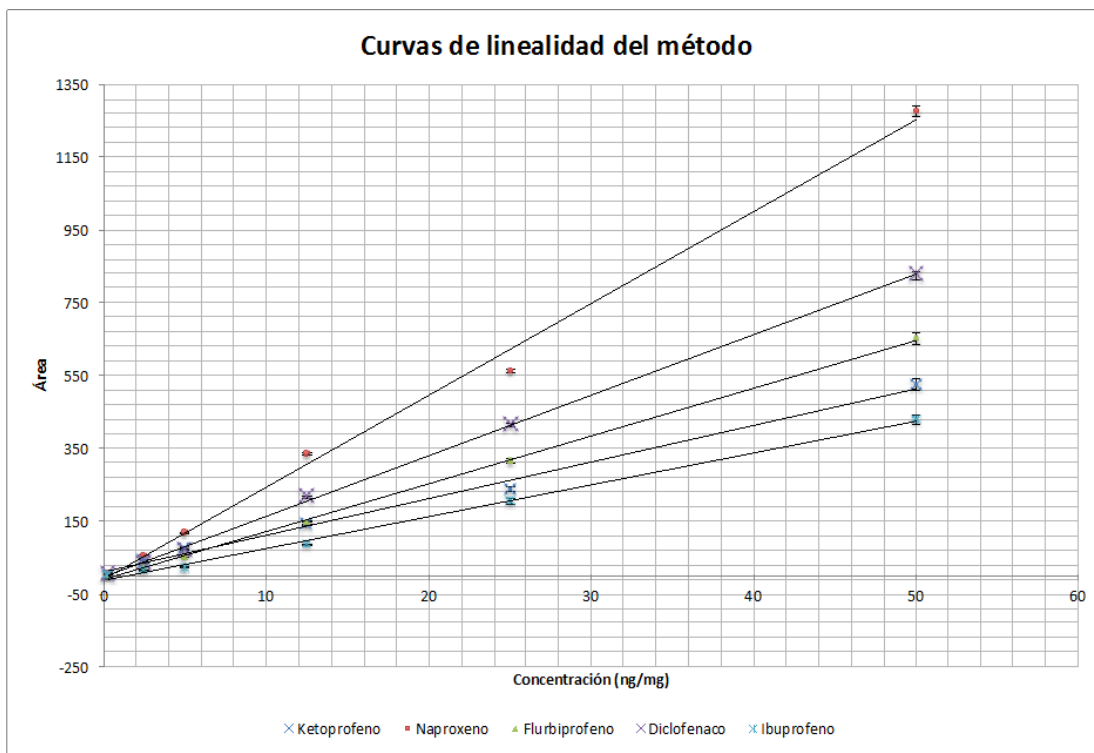


Figura 3.14. Curvas de calibración del ketoprofeno., naproxeno, flurbiprofeno, diclofenaco e ibuprofeno. En un intervalo de 0.25 a 50 ng /mg de muestra

En la **tabla 3.8** se encuentran sintetizados las ecuaciones de regresión y los coeficientes de determinación para cada analito, se puede notar que estos coeficientes son mayores a 0.99, lo que indica que la respuesta en el intervalo evaluado es lineal. Además de que la ordenada al origen es muy pequeña considerando la escala de la curva de calibración, esto nos confirma los estudios anteriormente realizados y discutidos que el efecto matriz es mínimo, y que en dado caso de tener ausencia de los analitos el método es capaz de discriminar esto.

Con los valores de la pendiente, la ordenada al origen y sus respectivas desviaciones estándar obtenidos mediante del análisis de regresión por mínimos cuadrados, se calcularon los límites de detección y cuantificación del método. En la **tabla 3.9** se encuentran los resultados de los parámetros de validación evaluados. Respecto a la repetibilidad y la precisión intermedia del método, medida con un ensayo intra-día e inter-día respectivamente. Los porcentajes del coeficiente de variación fueron menores al 5 %, lo que indica que el método es repetible y reproducible.

Tabla 3.8. Estudio de linealidad del método para los cinco compuestos de interés

Analito	Ecuación de calibración	Coefficiente de determinación (r²)
Ketoprofeno	$y = 10.049x + 10.577$	0.99385
Naproxeno	$y = 25.237x - 9.1294$	0.99587
Fenilbutazona	Sufre degradación	
Flurbiprofeno	$y = 13.124x - 10.045$	0.99917
Diclofenaco	$y = 16.632x - 3.1509$	0.99932
Ibuprofeno	$y = 8.7493x - 13.12$	0.99723

Tabla 3.9. Parámetros de la validación del método para los cinco AINE.

Analito	Parámetros de validación		Límites experimentales		Límite teóricos	
	Repetibilidad (% CV) n= 5*	Precisión inter-día (% CV) n= 3*	Límite de detección (LD) ng /mg	Límite de cuantificación (LC) ng /mg	Límite de detección (LD) ng /mg	Límite de cuantificación (LC) ng /mg
Ketoprofeno	2.26	2.47	0.062	0.206	0.023	0.070
Naproxeno	0.17	0.30	0.031	0.103	0.008	0.026
Fenilbutazona	-	-	-	-	-	-
Flurbiprofeno	0.57	0.92	0.062	0.206	0.017	0.052
Diclofenaco	2.53	2.17	0.062	0.206	0.014	0.041
Ibuprofeno	0.99	1.42	0.062	0.206	0.027	0.081

*Evaluados para una concentración de 12.5 ng/mg de adsorbente

De los límites de detección y cuantificación experimentales podemos decir que son niveles realmente bajos para un detector de UV, al no existir aún norma para este tipo de contaminantes las respectivas curvas se trazaron lo más cercano al límite de cuantificación instrumental, para así tener la mejor detección y poder así discriminar la presencia de estos fármacos en matrices vegetales. De la misma forma que se dijo en la validación instrumental los límites de detección experimentales estuvieron cercanos a los teóricos, esto se debe a que no existe realmente variación en el eje de las x, por lo que la pendiente y la ordenada al origen, así como sus respectivas desviaciones estándar están asociadas solamente a la variabilidad de la respuesta del equipo.

Por otra parte, un tipo de gráfico importante a estudiar es el de la **figura 3.15** que representa la concentración recuperada en función de la concentración añadida, donde se

puede corroborar que el método efectivamente presenta una respuesta lineal, ya que los coeficientes de correlación son mayores a 0.99. El valor de la pendiente multiplicado por cien, es el porcentaje de recuperación de los analitos, por ende para esta metodología los recobros para los cinco analitos se encuentran por arriba del 80 %, lo cual se considera aceptable para un análisis de trazas.

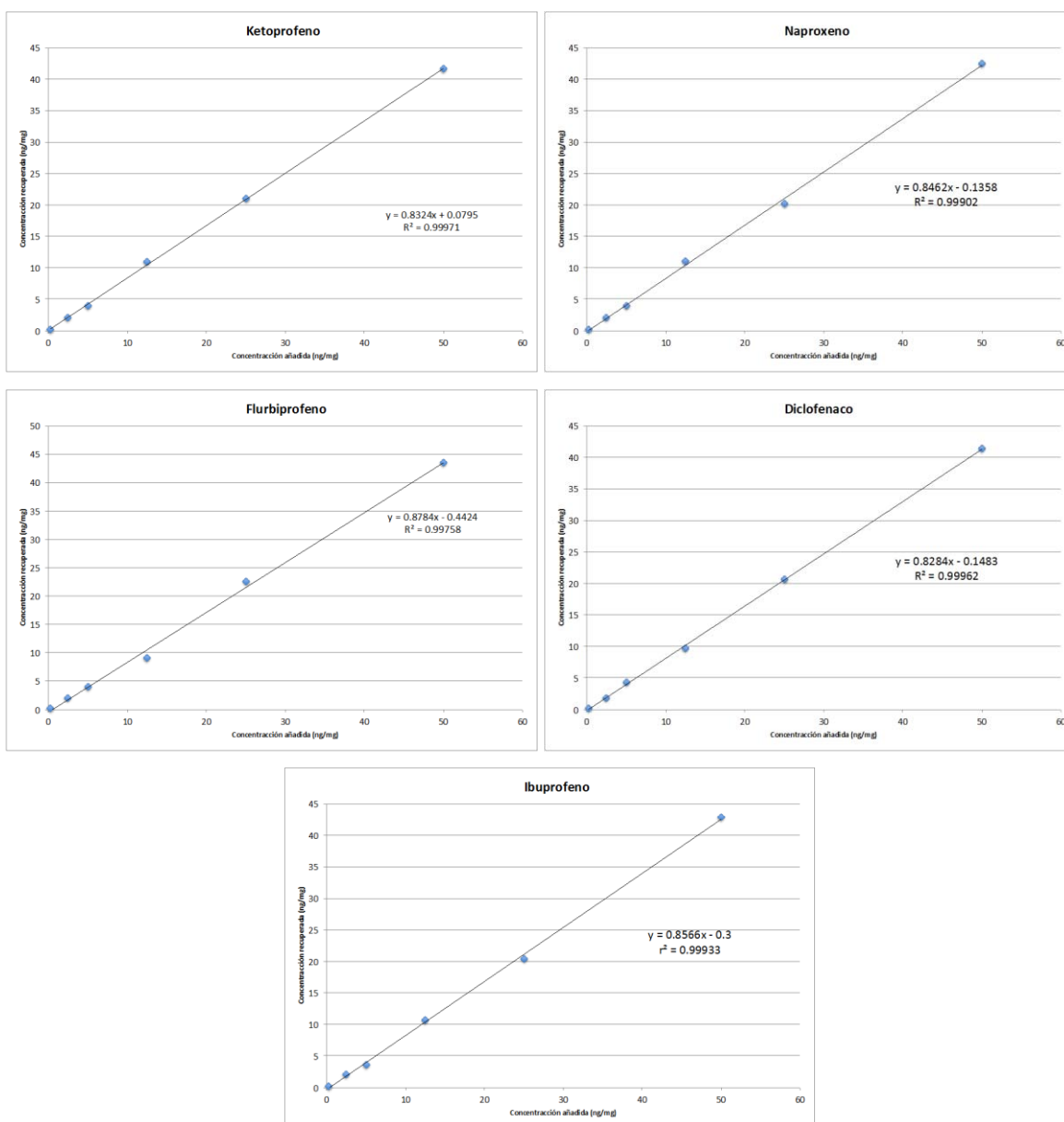


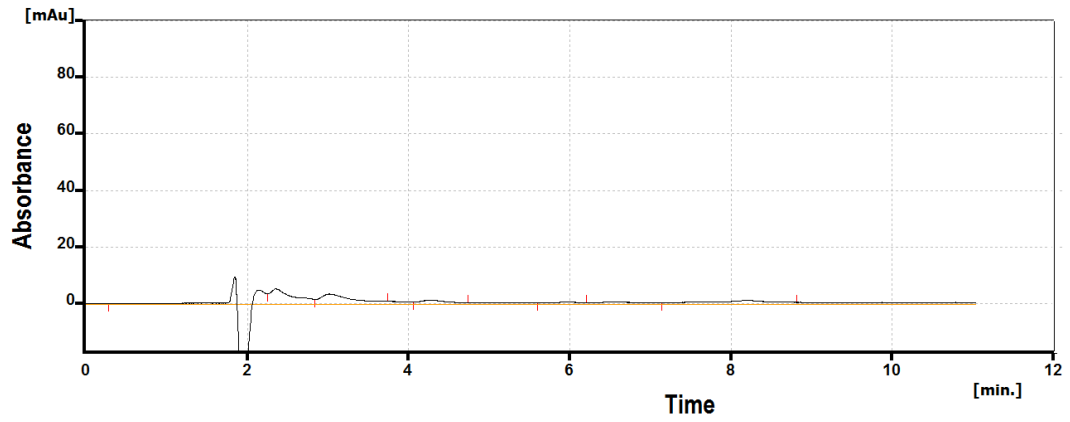
Figura 3.15. Gráfico de concentración recuperada en función de la concentración adicionada para los AINE de estudio

Como se pueden ver en los valores de la pendiente de cada gráfico de la figura anterior, los recobros obtenidos para el proceso total son similares a los obtenidos cuando se evaluó la elución de los analitos con 100 % metanol (**tabla 3.6**), esto nos indica que el porcentaje de recuperación no está en función del nivel de concentración.

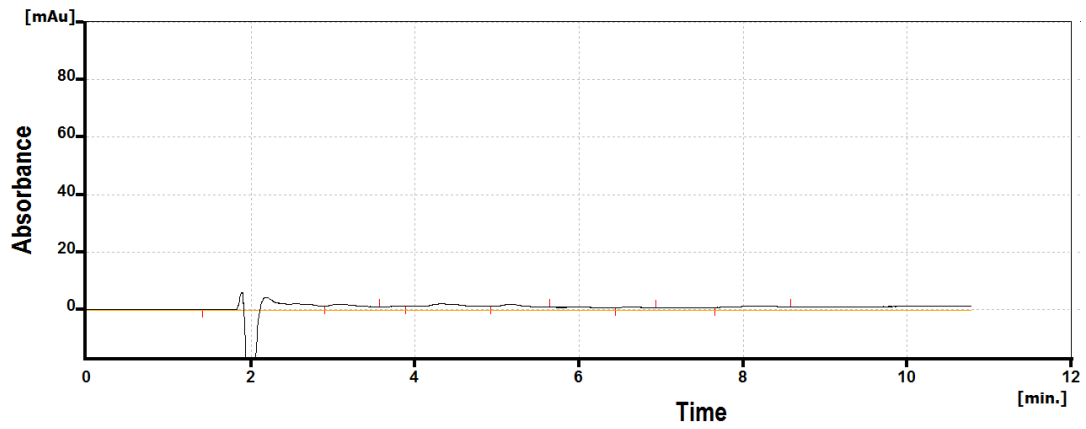
3.6. Aplicación de la metodología propuesta para la extracción y determinación de AINE en diferentes tipos de lechuga

Se evaluó la metodología propuesta en diferentes tipos de lechuga: la romana, la italiana, la francesa y la escarola. En la **figura 3.16** se muestran a modo de ejemplo los cromatogramas de los extractos obtenidos aplicando el método optimizado a diferentes lechugas sin adicionar la mezcla de fármacos.

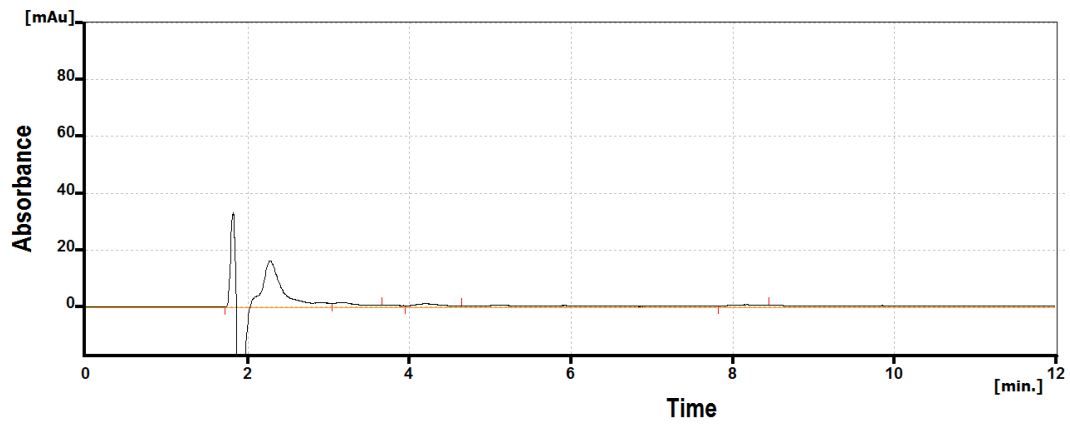
En los perfiles cromatográficos de los extractos provenientes de las diferentes lechugas, se observa que se obtenían extractos libres de interferentes, lo que indica que la metodología propuesta sirve para la identificación de los AINE en cualquier tipo de lechuga, siempre y cuando se encuentren por arriba del límite de detección.



(a)



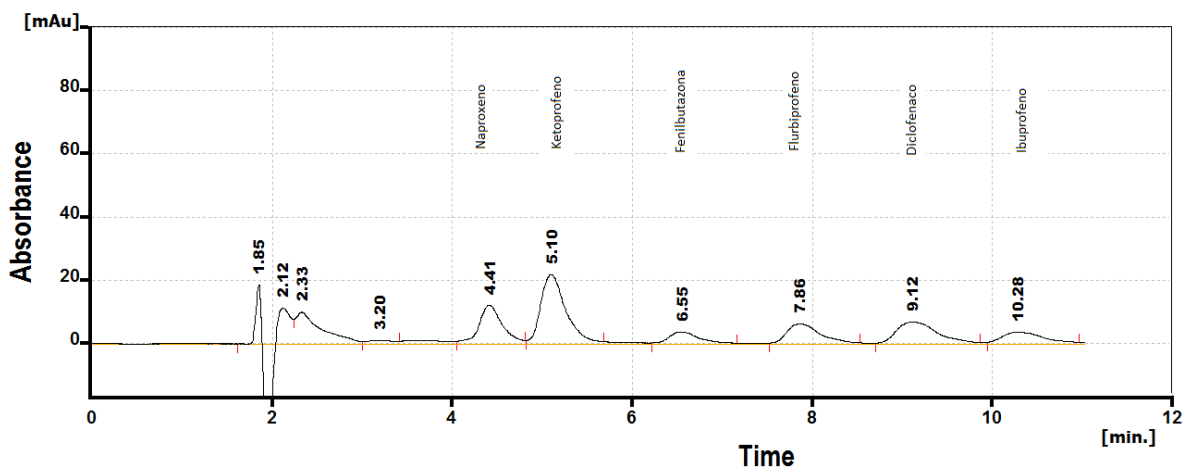
(b)



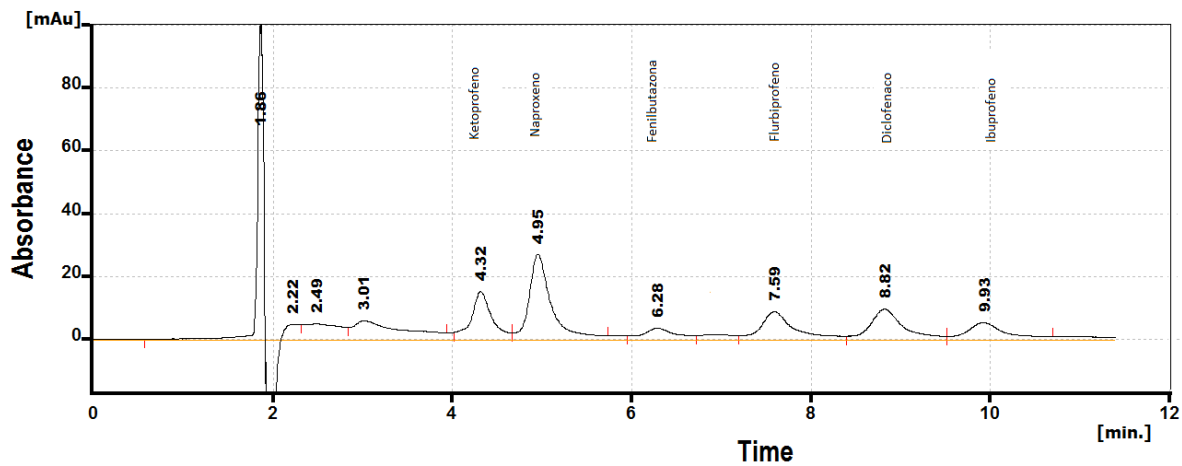
(c)

Figura 3.16. Cromatogramas de diferentes extractos lechugas sin adicionar. (a) francesa. (b) italiana (c) romana.

Después se fortificaron las lechugas con un nivel de concentración de 12.5 ng/mg de muestra con el fin de comparar si la interacción de los analitos con las diferentes lechugas era la misma que presentó la lechuga orejona (utilizada para el desarrollo del método). A manera de ejemplo se observan dos cromatogramas (**figura 3.17**), obtenidos de los extractos fortificados de la lechuga francesa e italiana, el comportamiento de la lechuga escarola y la romana fue similar.



(a)



(b)

Figura 3.17. Cromatogramas de dos diferentes lechugas adicionadas a un nivel de concentración de 12.5 ng/mg de muestra. (a) francesa. (b) italiana.

Se puede apreciar que el comportamiento de los analitos en estas lechugas es parecido, sin mostrar interferentes en los tiempos de retención de los compuestos de interés. Además se obtuvieron recobros similares al 80 % para el ketoprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, diclofenaco e ibuprofeno y se siguió observando disminución en el área o como se puede apreciar en la **figura 3.17-b** hasta la casi ausencia del pico de la fenilbutazona.

Finalmente se aplicó el método DMFS-HPLC-UV propuesto para identificar a los AINE en 20 lechugas provenientes de diferentes mercados populares de la Ciudad de México. Quedó en manifiesto que no se detectaron los cinco fármacos en cuestión en las diferentes lechugas, esto no implica que no estén presentes estos compuestos en las lechugas a concentraciones por debajo del límite de detección del método, probablemente usando un detector más sensible como lo es el del fluorescencia o uno de masas, se podrían detectar algunos fármacos, si se encontraran a concentraciones más bajas. Pero con estos resultados se puede tener la tranquilidad de que al ingerir cualquier lechuga de los mercados muestreados en este trabajo, éstas están libres a estos niveles de concentración de estos fármacos, lo cual si están a más bajas concentraciones que los delimitados en este trabajo no afectarían en el organismo, sin embargo se debe tener cuidado que con el ritmo de vida actual efectivamente este grupo de fármacos se sigan considerando como contaminantes emergentes y que no dentro de unos años ya sean detectables a mayores concentraciones, ya que en altas concentraciones algunos AINE si tienen efectos toxicológicos y en algunos caso embriotóxicos como es el caso del ketoprofeno (hoja médica de seguridad emitida por la Facultad de Medicina de la UNAM).

La dosis letal media (DL50) para este tipo de fármacos es muy elevada, aproximadamente es de 486 mg/Kg, el estudio realizado en este trabajo demuestra que por lo menos en lechugas se encuentra muy por debajo de la dosis letal, pero esto no es para relajarse si no para tomar precauciones y concientizar a la población sobre la ingesta desmedida de este tipo de medicamentos, así como mejores regulaciones para la disposición de este tipo de compuestos, ya que este grupo de fármacos están presentes en las aguas potables a concentraciones más apreciables.

3.7. Búsqueda de los AINE en diferentes matrices vegetales

Se aplicó la metodología en otras matrices tipo vegetal, semejantes a la lechuga dado que están constituidas por hojas, como una forma de evaluar la robustez del método. Las matrices que se evaluaron fueron: espinacas, germen de trigo, col blanca, epazote, apio, cilantro, acelga, perejil y además una alga comercializada en tabletas usadas como suplementos alimenticios con la microalga *Spirulina*.

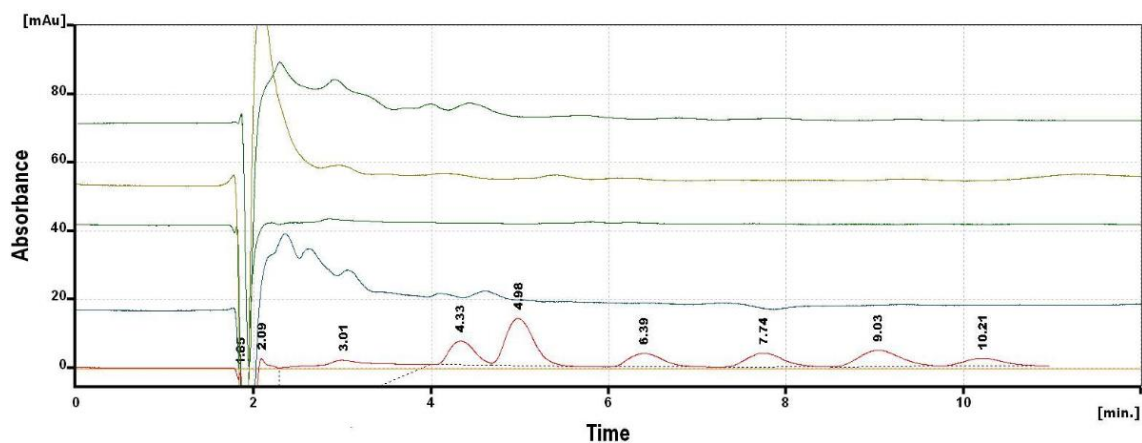


Figura 3.18. Cromatogramas de la inyección de la disolución estándar. Ketoprofeno (4.33 min), Naproxeno (4.98 min), Fenilbutazona (6.39 min), flurbiprofeno (7.74 min), diclofenaco (9.03 min) e Ibuprofeno (10.21 min) y los extractos de los blancos del apio, la col blanca, acelga y germen de trigo presentados en el cromatograma en orden ascendente respectivamente.

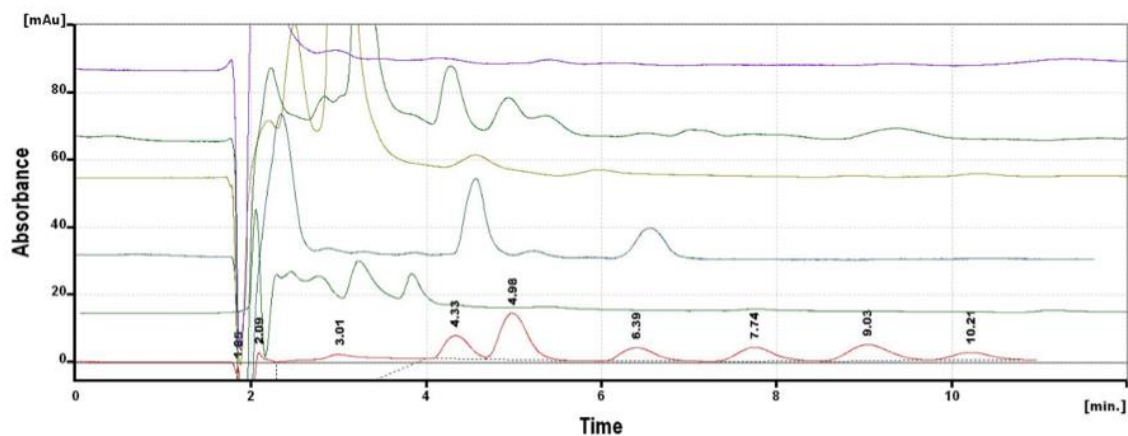


Figura 3.19. Cromatogramas de la inyección de la disolución estándar. Ketoprofeno (4.33 min), Naproxeno (4.98 min), Fenilbutazona (6.39 min), flurbiprofeno (7.74 min), diclofenaco (9.03 min) e Ibuprofeno (10.21 min) y los extractos de los blancos de la alga *Spirulina*, epazote, espinaca, cilantro y perejil presentados en el cromatograma en orden ascendente respectivamente.

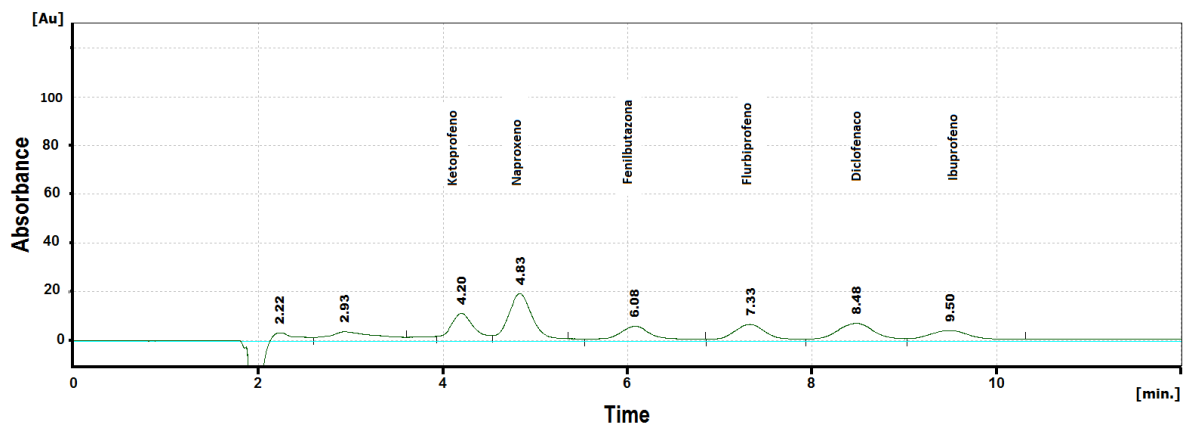
En las **figuras 3.18** y **3.19** se observan los cromatogramas obtenidos para estas muestras sin adicionar la mezcla de fármacos, con el fin de comparar los blancos de diferentes matrices con la disolución estándar de los fármacos es que se presentan en una misma figura.

Se puede observar que la metodología de extracción propuesta para las lechugas se puede aplicar a otras matrices como lo son: las acelgas, el apio, la col blanca y la alga *Spirulina* y también se podría utilizar con el germen de trigo y la espinaca teniendo en mente que existen interferentes que podrían afectar en análisis para niveles de concentración bajos. El epazote y el cilantro si presentaron interferencias cercanas a los tiempos de retención de los dos primeros analitos, por lo que se debe de optimizar otra secuencia de elución si se quisieran eliminarlas.

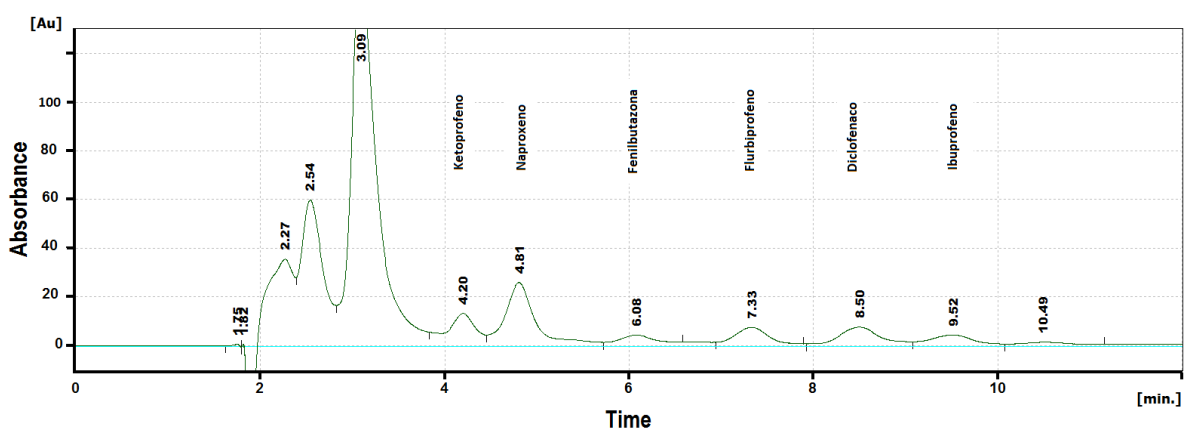
A modo de ejemplo en la **figura 3.20** se presentan dos cromatogramas de las muestras adicionadas; uno corresponde a una matriz en la cual si se puede utilizar el método **(a)** col blanca y el segundo cromatograma el de un extracto de espinaca **(b)** donde se puede aplicar la metodología de extracción, para niveles de concentración concentración altas (arriba de 5.0 ng/mg), ya que la matriz presenta interferentes que podrían afectar la cuantificación en concentraciones bajas de los analitos, principalmente para los analitos menos retenidos, ketoprofeno y naproxeno.

En cuanto al perfil del cromatograma para la col blanca se encuentra bien definido, lo que permitiría una buena cuantificación, en cambio para la espinaca el primer pico co-eluye con la matriz lo que afectaría la cuantificación, sin embargo es posible identificar a los demás AINE.

Con las figuras presentadas en esta sección se puede decir que la metodología propuesta es robusta, ya que al ser aplicada a otros vegetales tipo hoja, se obtuvieron resultados similares a las lechugas. Así mismo la metodología DMFS-HPLC-UV, sirvió para la extracción, e identificación de los analitos en una alga, *Spirulina*, la cual de manera similar a la lechuga es una matriz vegetal, presenta alta concentración en pigmentos verdes, y clorofilas.



(a)



(b)

Figura 3.20. Cromatograma de dos muestra vegetales adicionadas con la mezcla de fármacos a un nivel de 12.5 ng/mg. (a) col blanca. (b) espinaca.

CAPITULO 4

CONCLUSIONES

1. Con base en los objetivos se desarrolló una metodología analítica fiable y robusta para la extracción y análisis de cinco fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) de uso común en la población mexicana: ketoprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, diclofenaco e ibuprofeno.
2. Para la extracción de los analitos se utilizó la técnica de Dispersión de Matriz en Fase Sólida (DMFS), optimizando y validando el método DMFS-HPLC-UV de los mismos. Se obtuvieron parámetros de validación confiables de acuerdo con los criterios de aceptación de la USP 31.
3. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron bajos para un sistema de detección UV, estuvieron en el orden de ng/mg de muestra, que era el orden de magnitud esperado en el que se podrían encontrar en esta matriz los fármacos, lo que indica que el método propuesto permite la identificación de dichos AINE por arriba del límite de detección del método.
4. Se obtuvo una respuesta lineal de los fármacos de un intervalo de 0.25 a 50 ng/mg, obteniendo recobros superiores al 80 %, valor aceptable para un análisis a nivel de trazas.
5. Se aplicó la metodología desarrollada, DMFS-HPLC-UV, a diversos tipos de lechugas provenientes de los mercados más populares de la Ciudad de México, donde no se detectaron los AINE de interés en dichas matrices.
6. Se evaluó el método en otras matrices vegetales tipo hoja y similares, que tienen en común con la lechuga la presencia de pigmentos y clorofilas, se probó en: perejil, espinaca, germen de trigo, col blanca, epazote, apio, cilantro, acelgas y una alga que se comercializa en cápsulas la *Spirulina*. De las distintas matrices evaluadas se determinó que la metodología propuesta para la identificación y determinación de los cinco AINE se puede

aplicar además de lechugas en las acelgas, el apio, la col blanca y las cápsulas de la alga *Spirulina*; para las demás matrices se tendría que realiza un paso adicional de *clean-up*.

REFERENCIAS

- Almeda S., Arce L., Valcárcel M. Combination of solid-phase extraction and large-volume stacking with polarity switching in micellar electrokinetic capillary chromatography for the determination of traces of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in saliva. *Electrophoresis*, **2008**, 29, 3074-3080.
- Capriotti A. L., Cavaliere Ch., Giansanti P., Gubbiotti R. Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 2521-2532.
- Antonic J., Heath E. Determination of NSAIDs in river sediment samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, 387, 1337-1342
- Araujo L., Wild J., Villa N., Camargo N., Cubillan D., Prieto A. Determination of anti-inflammatory drugs in water samples, by *in situ* derivatization, solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1228, 6240, 6247.
- Arroyo D., Ortiz M. C., Sarabia L. A. Optimization of the derivatization reaction and the solid-phase microextraction conditions using a D-optimal design and three-way calibration in the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in bovine milk by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 4487-4497.
- Azzouz A., Ballesteros E. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. *Sci. Total Environ.*, **2011**, 419, 208-215.
- Azzouz A., Ballesteros E. Gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmacologically active substances in urine and blood samples by use of a continuous solid-phase extraction system and microwave-assisted derivatization. *J. Chromatogr. B*, **2012**, 891-892, 12-19.
- Azzouz A., Ballesteros E. Multiresidue method for the determination of pharmacologically active substances in egg and honey using a continuous solid-phase extraction system and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, **2015**, 178, 63-69.
- Azzouz A., Souhail B., Ballesteros E. Determination of residual pharmaceuticals in edible animal tissues by continuous solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, **2011**, 84, 820-828.
- Bae, J.-W.; Kim, M.-J.; Jang, C.-G.; Lee, S.-Y. Determination of meloxicam in human plasma using a HPLC method with UV detection and its application to a pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 859, 69-73.
- Baranowska I., Wilczek A. A rapid UHPLC method for the simultaneous determination of selected β -blockers, NSAIDs, and their metabolites in human urine and water samples. *J. Liq. Chromatogr. RT*. **2010**, 33, 1776-1790.

- Barceló D. Emerging pollutants in water analysis trace. *TrAC*, **2003**, Volume 22, 14-16.
- Beltrán A., Borrul F., Cormack P-A-G, Marcé R-M. Molecularly-imprinted polymers: useful sorbents for selective extractions. *TrAC*, **2010**, Vol. 29, No. 11.
- Boisvert J., Caillé, McGilveray G., Qureshi S. A. Quantification of ketoprofen enantiomers in human plasma based on solid phase extraction and enantioselective column chromatography. *J. Chromatogr. A*, **1997**, 690, 189-193.
- Braus H., Middleton, F. M. Walton, G. Organic chemical compounds in raw and filtered surface waters. *Analytical Chemistry* 23, **1951**, 1160.
- Buer JK. Origins and impact of the term NSAID. *Inflammopharmacology*, **2014**, 14, 5, 263-7.
- Buser H., Poiger T., Muller M. Occurrence and environmental behavior of the chiral pharmaceutical drug ibuprofen in surface waters and in wastewater. *Sci. Total Environ* , **1999**, 33, 15, 2529- 2535.
- Cárdenas S., Gallego M., Valcárcel M., Ventura R., Seguta J. A. Partially Automated Pretreatment Module For Routine Analyses For Seventeen Non-steroid antiinflammatory drugs in race horses using gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* **1996**, 68, 118-123.
- Cañedo F. Tesis para obtener el grado de maestro en ingeniería. Remoción de contaminantes emergentes en los sistemas de potabilización en México. México, UNAM, 2010.
- Casas-Ferreira A. M., Fernández-Laespada M. E., Pérez-Pavón J. L., Moreno-Cordero B. Headspace sampling with *in situ* carbodiimide-mediated derivatization for the determination of ibuprofen in water samples. *J. Chromatogr. A*. **2011**, 1218, 4856-4862.
- Castiglioni S., Bagnati R., Calamari D., Fanelli R., Zuccato E. October. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A*, **2005**, 1092, n. 2, pp. 206 215.
- Chable Cortéz A. I. Tesis: *Desarrollo de un método de extracción por MSPD en arroz fermentado en Monascus purpureus y fortificado con lovastatina*. **2012**, México, Yucatán.
- Chrusch J., Lee S., Fedeniuk R., Boison R. Determination of the performance characteristics of a new-multiresidue method for non-steroidal anti-inflammatory drugs, corticosteroids and anabolic steroids in foof animal tissues. *Food Addit. Contam*, **2008**, 25, 1482-1496.

Costas G., Stamatios T., Tsantilo A. Octanol/water partitioning simulation by RP-HPLC for structurally diverse acidic drugs: Comparison of three columns in the presence and absence of n-octanol as the mobile phase additive. *J. Sep. Sci.* **2013**, 36, 3830-3836.

Cruz-Vera M., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M. One-step -syringe ionic liquid- based dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A* , **2009**, 1216, 6459-6465.

Calderón-Preciado, Jiménez-Cartagena C., Matamoros V, Bayona J.M. Screening of 47 organic microcontaminants in agricultural irrigation waters and their soil loading. *Water Res.* 45, **2011**, 221-231.

Castells Molina, Silvia; Castells, S.; Hernández Pérez, Margarita. *Farmacología en enfermería*. España, 2007, capítulo 14.

Dai C.-M., Zhou X.-F., Zhang Y.-L., Liu S.-G., Zhang J. Synthesis by precipitation polymerization of molecularly imprinted polymer for the selective extraction of diclofenac from water samples. *J. Hazard Mater.*, **2011**, 198, 175-181.

Daughton C.G., Emerging pollutants, and communicating the science of environmental chemistry and mass spectrometry: pharmaceuticals in the environment. *Journal of the American Society of Mass Spectrometry.* 12, **2011**, 10, 1067–1076.

Daughton Christian G. "Non-regulated water contaminants: emerging research". *Environmental Impact Assessment Review*, **2004**, 24, 711-732.

Djukovic D., Appiah-Amponsah E., Shanaiah N., Gowda G. A. N., Henry I., Everly M., Tobias B., Raftery D. Ibuprofen metabolite profiling using a combination of SPE/column-trapping and HPLC-micro-coil NMR. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2008**, 47, 328- 334.

Dodgen L.K., Parker J. Uptake and accumulation of four PPCP/EDCs in two leafy vegetables. *Environmental Pollution*, **2013**, 182, 150-156.

Dowling G., Gallo P., Regan,L. Confirmatory analysis of firocoxib in bovine milk by rapid resolution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877, 541-546.

Dowling G., Malone E. Analytical strategy for the confirmatory analysis of the non-steroidal anti-inflammatory drugs firocoxib, propyphenazone, ramifenazone and piroxicam in bovine plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2011, 56, 359-365.

Dowling G., Malone E., Harbison T., Martin S. Analytical strategy for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma and improved analytical strategy for the determination of authorized and non-authorized non-steroidal anti-inflammatory drugs in milk by LC-MS/MS. *Food Addit. Contam A.*, 2010, 27, 962-982.

Dubreil-Chéneau E., Pirotais Y., Bessiral M., Roudaut B., Verdon E. Development and validation of a confirmatory method for the determination of 12 non steroidal anti-inflammatory drugs in milk using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011, 1218, 6292-6301.

Engelhart D.A., Jenkins A.J. Comparison of drug concentrations in postmortem cerebrospinal fluid and blood specimens. *J Anal Toxicol.*, **2007**, 31, 581-587.

Eshaghi Z. Determination of widely used non-steroidal antiinflammatory drugs in water samples by in situ derivatization, continuous hollow fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography- flame ionization detector. *Anal. Chim. Acta.*, **2009**, 641, 83-88.

Fabre H, Hussam-Edinne N, Lerner D, Mandrou B. Autoxidation and hydrolysis kinetics of the sodium salt of phenylbutazone in aqueous solution. *J Pharm Sci.* **1984** Dec; 73(12), 1709.

Fernández M., Picó Y., Mañes J. Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 871, 43–56

Farré, M., Klöter, G., Petrovic, M., Alonso, M.C., López de Alda, M.J., Barceló, D. Identification of toxic compounds in wastewater treatment plants during a field experiment. *Anal. Chim. Acta.* **2002**, 456, n 1, pp 19-30.

Fent K., Weston and D. Caminada. 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 76:122-159.

Gallo P., Fabbrocino S., Dowling G., Salini M., Fiori M., Perretta G., Serpe L. Confirmatory analysis of non-steroidal antiinflammatory drugs in bovine milk by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*, **2010**, 1217, 2832-2839.

García-Rodríguez R., Cela-Torrijos R.A., Lorenzo-Ferreira A.M. Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry detection. *Food Chemistry*, **2012**, 135, 259–267

Gert-Jan de Maagd P., Jan Hendriks A., Willem Seinen y Dick T. H. M. pH dependent hydrophobicity of the cyanobacteria toxin microcystin-LR. *Wat. Res.* **1999**. 33, 3, 677-680.

Gil García M.D., Cañada F., Culzoni M.J., Vera-Candiotti L., Siano G.G., Goicoechea H.C.; Martínez Galera M. Chemometric tools improving the determination of antiinflammatory and antiepileptic drugs in river and wastewater by solid-phase microextraction and liquid chromatography diode array detection. *J. Chromatogr. A*, **2009**, 1216, 5489-5496.

González Pérez, R. *Test de provocación nasal con acetyl-salicilato de lisina: nuevo método diagnóstico en la intolerancia a anti-inflamatorios no esteroideos Universidad de La Laguna. ISBN 84-7756-624-0.*

Gripa E., Santini L., Castellano G., Gatto M. T., Leone M. G., Saso L. Simultaneous determination of hydrocortisone, dexamethasone, indomethacin, phenylbutazone and oxyphenbutazone in equine serum by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 738, **2000**, 17–25.

Gross M., Petrovic M., Barcelo D., Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography- tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta*, **2006**, 70. 4, 678–690.

Grueiro-Noche G., Fernández-Laespada M. E., Pérez-Pavón J. L., Moreno-Cordero B. In situ aqueous derivatization and determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs by salting-out-assisted liquid-liquid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J. of Chromatogr. A*. **2011**, 1218, 6240-6247.

Han F., Yin R., Shi X.-L., Jia Q., Liu H.-Z., Yao H.-M., Xu L., Li S.-M. Cloud point extraction-HPLC method for determination and pharmacokinetic study of flurbiprofen in rat plasma after oral and transdermal administration. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 868, 64- 69.

Hardman Joel G., Limbird Lee E., Goodman Gilman, A. Capítulo 27: Analgésicos-antipiréticos, antiinflamatorios y fármacos que se utilizan en el tratamiento de la gota. *Goodman & Gilman, las bases farmacológicas de la terapéutica*. (9 edición). **1996**, México, D. F.: Ed. McGraw-Hill Interamericana.

Hashim N. H., Khan S. J. Enantioselective analysis of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in wastewater and environmental water samples. *J. Chromatogr. A*, **2011**, 1218, 4746-4754.

Hashim N.H., Nghiem L.D., Stuetz R. M., Khan S.J. Enantiospecific fate of ibuprofen, ketoprofen and naproxen in a laboratory scale membrane bioreactor. *Water Res.* **2011**, 45, 6249-6258.

Hernando M.D., M. Mezcuá, A.R. Fernández-Alba and D. Barceló. Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments. *Talanta*. **2006**. 69, 334-342.

Herrera-Rivera Z., Oosterink E., Rietveld L., Schoutsen F., Stolker L. Influence of natural organic matter on the screening of pharmaceuticals in water by using liquid chromatography with full scan mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. **2011**, 700, 114-125.

Hoshina K., Horiyama S., Matsunaga H., Haginaka J. Simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in river water samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry using molecularly imprinted polymers as a pretreatment column. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 55, 916-922.

Hu R., Yang Z., Zhang L. Trace analysis of acidic pharmaceuticals residues in waters with isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry via methylation derivatization. *Talanta*, **2011**, 85, 1751-1759.

Hu T., Peng T., Li X.-J., Chen D.-D., Dai H.-H., Deng X.-J., Yue Z.-F., Wang G.-M., Shen J.-Z., Xia X., Ding S.-Y., Zhou Y.-N., Zhu A.-L., Jiang H.-Y. Simultaneous determination of thirty non-steroidal anti-inflammatory drug residues in swine muscle by ultra-high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1219, 104-113.

Hullman R. Tesis que para obtener el grado de maestro en Ciencias. Fate of pharmaceuticals in drinking water utilities. USA. pp. 35

Igualada C., Moragues F., Pitarch, J. Rapid method for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in animal tissue by liquid chromatography-mass spectrometry with ion-trap detector. *Anal. Chim. Acta*, **2007**, 586, 432-439.

Ioannou P.C., Rusakova N.V., Andrikopoulou D.A., Glynou K.M., Tzompanaki G.M. Spectrofluorimetric determination of anthranilic acid derivatives based on terbium sensitized fluorescence. *Analyst*. **1998**, 123, 2839-2843.

Ioffe V., Kalendarev T., Rubinstein I., Zupkovitz G. Reverse phase HPLC for polar lipids. Simple and selective HPLC procedures for analysis of phospholipid-based derivatives of valproic acid and various non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2002**, 30, 391-403.

Iparraguirrea,*, R. Rodilb, J.B. Quintanab, E. Bizkarguenagaa, A. Prietoa, O. Zuloagaa, R. Celab, L.A. Fernández. Matrix solid-phase dispersion of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated and methoxylated analogues in lettuce, carrot and soil. *J. Chromatogr. A*, **2014**, 1360, 57-65.

James S. Dawson, Alfonso Moreno González, Magali N. F. Taylor, Peter J. W. Reide, (2005). *Lo esencial en farmacología*. Publicado por Elsevier España; pág 55-56.

Jedziniak P., Szprengier-Juskiewicz T., Olejnik M., Zmudzki J. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta.*, **2010**, 672, 85-92.

Jiménez Cisneros, B. *La contaminación ambiental en México, causas, efectos y tecnología apropiada*. Limusa, **2001**, México, UNAM, pp. 82-100.

Jin Y.-X., Tang Y.-H., Zeng S. Analysis of flurbiprofen, ketoprofen and etodolac enantiomers by pre-column derivatization RPHPLC and application to drug-protein binding in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2008**, 46, 953-958.

Kosjek T., Heath E., Krbavcic A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environ. Int.*, **2005**, 31, 679-685.

Kretschmer, A.; Giera, M.; Wijtmans, M.; de Vries, L.; Lingeman, H.; Irth, H.; Niessen, W. M.A. Derivatization of carboxylic acids with 4-APEBA for detection by positive-ion LC-ESI-MS(/MS) applied for the analysis of prostanoids and NSAID in urine. *J. Chromatogr. B*, **2011**, 879, 1393-1401.

Kennet A. Connors, Gordon L. Amidon, Valentino J. Stella. *Chemical Stability of Pharmaceuticals. A handbook for Pharmacists*. John Wiley y Sons. USA, New York, segunda edición, **1986**, 665-670.

Kristenson M. Haverkate, Slooten E., Ramos C., Vreuls L., Brinkman U. Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatography mass spectrometric analysis. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 917. 1-2,11, 277-286.

Kuo Y.-L., Liu W.-L., Hsieh S.-H., Huang H.-Y. Analyses of non-steroidal anti-inflammatory drugs in environmental water samples with microemulsion electrokinetic chromatography. *Anal. Sci.*, **2010**, 26, 703-707.

Kvaternick V., Malinski T., Wortmann J., Fischer J. Quantitative HPLC-UV method for the determination of firocoxib from horse and dog plasma. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 854, 313-319.

Larsson N., Petersson E., Rylander M., Jönsson J. Å. Continuous flow hollow fiber liquid-phase microextraction and monitoring of NSAID pharmaceuticals in a sewage treatment plant effluent. *Anal. Methods*, **2009**, 1, 59-67.

Lee H.-S., Kang I.-M., Lee H.-W., Seo J.-H., Ryu J.-H., Choi S.-J., Lee M.-J., Jeong, S.-Y., Cho Y.-W., Lee K.-T. Development and validation of a high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of etodolac in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **2008**, 863, 158-162.

Letendre L., Kvaternick V., Tecele B., Fischer J. Automated liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the analysis of firocoxib in urine and plasma from horse and dog. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 853, 333-345.

Liska I. Fifty years of solid-phase extraction in waters analysis-Historical development and overview. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 885, 3-16.

Lourdes Ramos. Critical overview of selected contemporary simple preparation techniques. *J. Chromatogr. A*, **2012**, 1221, 84-98.

Luo Y.-B., Zheng H.-B., Wang J.-X, Gao Q., Yu Q.-W., Feng Y.-Q. An anionic exchange stir rod sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of non-steroidal antiinflammatory drugs in environmental aqueous samples. *Talanta*, **2011**, 86, 103-108.

Mardones C., Ríos A., Valcárcel M. Determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids by automatic online integration of solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, **2001**, 22, 484-490.

Hennion Marie-Clair. Solid-phase extraction: Method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. chromatogr. A*, **1999**, 856, 3-54.

Martín J., Santos J. L., Aparicio I., Alonso E. Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination. *J. Sep. Sci.*, **2010**, 33, 1760-1766.

McNair, Harold M. & Miller, James M. (1998). *Basic Gas Chromatography*. Canada: John Wiley & Sons, Inc.

Meyer M.R., Welter J., Weber A.A., Maurer H.H. Development, validation, and application of a fast and simple GC-MS method for determination of some therapeutic drugs relevant in emergency toxicology. *Ther. Drug Monit.*, **2011**, 33, 649-653.

Michail, K., Moneeb M.S. Determination of methotrexate and indomethacin in urine using SPE-LC-DAD after derivatization. *J. Pharm. Biomed Anal.*, **2011**, 55, 317-324.

Michel M., Buszewski B. Optimization of a matrix solid-phase dispersion method for the determination analysis of carbendazim residue in plant material. *J. Chromatogr. B*, 2004, 800, 309-314.

Min Li. *Organic Chemistry of Drug Degradation*. RCPublishing. United Kingdom, 2012. pp 86-87.

Moeder M., Schrader S., Winkler M., Popp P. Solid-phase microextraction- gas chromatography-mass spectrometry of biologically active substances in water samples. *J. Chromatogr. A*, **2000**, 873, 95-106

Muñoz Rodríguez D., Ávila Ortega A., Barrón Zambrano J.A. y Carrera Figueiras C. Materiales emergentes para su potencial aplicación en dispersión de matriz en fase sólida. *INVURNUS*, volumen 6, No 2, **2011** 22-30.

Ojha A., Rathod R., Padh H. Simultaneous HPLC-UV determination of rhein and aceclofenac in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877, 1145-1148.

P. Gert-Jande Maagd, et. al. Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons: aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and henry's law constants. *environmental toxicology and chemistry*, **1997**, 17, 2, 251-257.

Page P, Curtis J., Sutter M., Walker M., Hoffman B. *Farmacología integrada*. Elsevier, España, 1998, pp. 55.

Panusa A., Multari G., Incarnato G., Gagliardi L. High performance liquid chromatography analysis of anti-inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrometry detection in suspected counterfeit homeopathic medicinal products. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2007**, 43, 1221-1227.

Pawel W., Małgorzata Waszczuk-Jankowska, Michał Jan Markuszewski, Roman Kaliszan. The application of gradient reversed-phase high-performance liquid chromatography to the pK_a and log *k*_w determination of polyprotic analytes. *J. Chromatogr. A*, **2008**, 1214, 109-114.

Pérez-Carrera E.; Hansen M., León V.M., Björklund E., Krogh, K.A., Halling-Sørensen, B., González-Mazo E. Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LCMS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2010**, 398, 1173-1184.

Petrovic M, Diaz A, Ventura F y Barceló D . Occurrence and removal of estrogenic short chain ethoxy nonylphenolic compound and their halogenated derivatives during drinking water production. *Env. Sci. Technol.* **2003**, 27, 4442-4448.

Petrovic M., Gonzales S., Barcelo D. Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water. *TrAC*. **2013** v 22, n 10, pp. 685-696.

Radwan M.A., AlQuadeib B.T., Aloudah N.M., Aboul-Enein H.Y. Pharmacokinetics of ketorolac loaded to polyethylcyanoacrylate nanoparticles using UPLC MS/MS for its determination in rats. *Int. J. Pharm.*, **2010**, 397, 173-178.

Ramos L. Critical overview of selected contemporary simple preparation techniques. *J. Chromatogr. A*, 1221 (**2012**) 84-98.

Rathod R., Padh H. Simultaneous HPLC-UV determination of rhein and aceclofenac in human plasma. *J. Chromatogr. B*, **2009**, 877, 1145-1148.

Riaño S., Alcudia-León M.C., Lucena R., Cárdenas S, Valcárcel M. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine by the combination of stir membrane liquid-liquid-liquid microextraction and liquid chromatography. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, 403, 2583-2589.

Rigato H.M., Moreno R.A., Orpinelli E.Z., Borges B.C., Sverdloff C.E., Pedrazzoli J., Borges N.C. A simple high-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac in human plasma: application to a comparative bioavailability study. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.*, **2009**, 47, 132-140.

Robert C, Gillard N, Brasseur P, Pierret G. Rapid multi-residue and multi-class qualitative screening for veterinary drugs in foods of animal origin by UHPLC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **2013**, 30, 3, 443–457.

Rose M. J., Woolf E. J., Matuszewski B. K. Determination of celecoxib in human plasma by normal-phase high-performance liquid chromatography with column switching and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. B*, **2000**, 738, 377-385.

Rousseau A., Pedrini M., Chiap P., Iványi R., Crommen J. Fillet, Servais A.-C. Determination of flurbiprofen enantiomers in plasma using a single-isomer amino cyclodextrin derivative in nonaqueous capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2008, 29, 3641-3648.

Saleh A., Larsson E., Yamini Y., Jonsson J. A. Hollow fiber liquid phase microextraction as a preconcentration and clean-up step after pressurized hot water extraction for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge. *J. Chromatogr. A*. **2011**, 1218, 10, 1331-1339.

Sagrìstà E., Larsson E., Ezoddin M., Hidalgo M., Salvadó V., Jönsson J.Å. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in sewage sludge by direct hollow fiber supported liquid membrane extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. **2010**, 1217, 6153-6158.

Sakaguchi Y., Yoshida H., Hayama T., Yoshitake M., Itoyama M., Todoroki K., Yamaguchi M., Nohta H. Fluorous derivatization and fluorous-phase separation for fluorometric determination of naproxen and felbinac in human plasma. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, 55, 176-180.

Sarafraz-Yazdi A., Amiri A., Rounaghi G., Eshtiagh-Hosseini H. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by solid-phase microextraction based sol-gel technique using poly(ethylene glycol) grafted multi-walled carbon nanotubes coated fiber. *Anal. Chim. Acta*, **2012**, 720, 134-141.

Sebok Á., Vasanits-Zsigrai A., Palkó G., Záray G., Molnár-Perl I. Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry. *Talanta*, **2008**, 76, 642-650.

Shaaban H., Górecki T. High temperature-high efficiency liquid chromatography using sub-2 μm coupled columns for the analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs and veterinary antibiotics in environmental samples. *Anal. Chim. Acta*, **2011**, 702, 136-143.

Sim W.-J., Lee J.-W., Lee E.-S., Shin S.-K., Hwang S.-R., Oh J.-E. Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures. *Chemosphere*, **2011**, 82, 179-186.

Snyder L.R. and Kirkland J.J. *Introduction to moderns liquid chromatography*. John Wiley & Sons, Inc. USA, second edition, 1979.

Sole M., Lopez de Alda M.J., Castillo M., Porte C., Ladegaard-Pedersen, K. and Barceló, D. Estrogenicity determination in sewage treatment plants and surface waters from the Catalonian area (NE Spain). *Environ Sci Technol* 34, **2012**, 5076–5083.

Steven A. Barker. Matrix solid dispersion (MSPD) (review). *J. Biochem. Biophys. Methods*. 70, **2007**, 152-162.

Suenami K., Lim L., Takeuchi T., Sasajima Y., Sato K., Takekoshi Y., Kanno S. On-line sample extraction and enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs by pre-column in capillary liquid chromatography mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, **2007**, 846, 176-183.

Suli W., Yanjun X., Canping P., Shuren J., Fengmao L. Application of matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography–mass spectrometry to fungicide residue analysis in fruits and vegetables. *Anal Bioanal Chem*, **2007**, 387, 673–685.

Sultan M., Stecher G., Stöggel W.M., Bakry R., Zaborski P., Huck C.W., Kousy E., Bonn G. K. Sample pretreatment and determination of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical formulations and biological samples (blood, plasma, erythrocytes) by HPLC-UV-MS and micro-HPLC. *Curr Med Chem.*, **2005**, 12, 573-588.

Tettey-Amlalo R. N. O., Kanfer I. Rapid UPLC-MS/MS method for the determination of ketoprofen in human dermal microdialysis samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2009**, 50, 580-586.

Torres C.M., Picó Y., Mañes J. Analysis of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables by Matrix Solid Phase Dispersion (MSPD) and Different Gas Chromatography Element-Selective Detectors. *Chromatographia*, **1995**, 41, 11-12.

Wu C., Spongberg A L., Witter J. D. Use of solid phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry for simultaneous determination of various pharmaceuticals in surface water. *Int. J. Environ. An. Ch.*, **2008**, 88, 1033-1048.

Yang W.W., Zhang H.F., Jia, Y.R., Zhao T., Zhao Y.L., Tong L.J., Sun L.X. Hollow fiber liquid-phase microextraction for the determination of nimesulide in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Pharmazie*, **2011**, 66, 564-569.

Yu Q.-W., Wang X., Ma Q., Yuang B.-F., He H.-B., Feng Y.- Q. Automated analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs in human plasma and water samples by in-tube solid-phase microextraction coupled to liquid-chromatography-mass spectrometry base on a poly(4-vinylpyridine-co-ethylene dimethacrylate) monolith. *Anal. Methods*, **2012**, 4, 1538–1545.

Zorita S., Boyd B., Jönsson S., Yilmaz E., Svensson C., Mathiasson L., Bergström S. Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid-phase extraction. *Anal. Chim. Acta*, **2008**, 626, 147-154.

ANEXO I

Estadístico de Cochran

La prueba introducida por Cochran (1941) era considerablemente de más fácil cómputo que las otras pruebas en ese tiempo

Cuando todas las muestras son de igual tamaño, la hipótesis de igualdad de varianzas (homocedasticidad) se rechaza si $g > g_{\alpha, n, k}$; donde el valor de $g_{\alpha, n, k}$ se obtiene de la tabla de valores críticos para la prueba de Cochran (Walpole & Myers 1989).

$$g = \frac{\max\{s_i^2\}}{\sum_{i=1}^k s_i^2} \quad \text{Ecuación del estadístico de Cochran}$$

A continuación se muestra a modo de resumen un ejemplo del cálculo que se realizó para asegurar la homocedasticidad de los datos de las curvas de calibración tanto del sistema como del método, por simplicidad sólo se muestra un ejemplo, para todos los analitos y todas las curvas se realizó de la misma manera

Nivel de concentración (mg/mL)	Desviación estándar
0.05	1.92
0.5	1.72
1.0	1.26
2.5	1.24
5.0	1.88
10.0	1.50

Tabla I. Varianzas asociadas a diferentes niveles de concentración para el ketoprofeno en la validación del sistema

Las hipótesis planteadas fueron

Ho : Se tratan de datos homocedásticos

Hi : Existe diferencias en al menos una varianza, y se tratan de datos heterocedásticos

En primera instancia a partir de las desviaciones estándar se obtuvieron las varianzas, esto se hizo sacando el cuadrado de la desviación estándar para cada nivel de concentración, después estos valores se sumaron teniendo así el denominador del estadístico. Para el numerador se seleccionó la varianza más grande, finalmente se realizó el cociente.

$$g = \frac{\max \{s_i^2\}}{\sum_{i=1}^k s_i^2} = \frac{3.6864}{15.5544} = 0.2370$$

Para obtener el valor crítico de la prueba de Cochran se utiliza el estadístico ji-cuadrada, se seleccionó en primera instancia la confianza (95 %), es decir $\alpha = 0.05$ y cinco grados de libertad (n-1). Por ende el valor crítico revisando en la tabla II 11.070.

El valor de g (0.2370) es menor que $> g_{\alpha, n, k}$ (11.070), lo que implica que la serie de datos son de varianzas iguales, es decir homocedásticos.

g.d.l	0,001	0,005	0,01	0,02	0,025	0,03	0,04	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	λ	0,40	g.d.l
1	10,828	7,879	6,635	5,412	5,024	4,709	4,218	3,841	2,706	2,072	1,642	1,323	1,074	0,873	0,708	1	
2	13,816	10,597	9,210	7,824	7,378	7,013	6,438	5,991	4,605	3,794	3,219	2,773	2,408	2,100	1,833	2	
3	16,266	12,838	11,345	9,837	9,348	8,947	8,311	7,815	6,251	5,317	4,642	4,108	3,665	3,283	2,946	3	
4	18,467	14,860	13,277	11,668	11,143	10,712	10,026	9,488	7,779	6,745	5,989	5,385	4,878	4,438	4,045	4	
5	20,515	16,750	15,086	13,388	12,833	12,375	11,644	11,070	9,236	8,115	7,289	6,626	6,064	5,573	5,132	5	
6	22,458	18,548	16,812	15,033	14,449	13,968	13,198	12,592	10,645	9,446	8,558	7,841	7,231	6,695	6,211	6	
7	24,322	20,278	18,475	16,622	16,013	15,509	14,703	14,067	12,017	10,748	9,803	9,037	8,383	7,806	7,283	7	
8	26,124	21,955	20,090	18,168	17,535	17,010	16,171	15,507	13,362	12,027	11,030	10,219	9,524	8,909	8,351	8	
9	27,877	23,589	21,666	19,679	19,023	18,480	17,608	16,919	14,684	13,288	12,242	11,389	10,656	10,006	9,414	9	
10	29,588	25,188	23,209	21,161	20,483	19,922	19,021	18,307	15,987	14,534	13,442	12,549	11,781	11,097	10,473	10	
11	31,264	26,757	24,725	22,618	21,920	21,342	20,412	19,675	17,275	15,767	14,631	13,701	12,899	12,184	11,530	11	
12	32,909	28,300	26,217	24,054	23,337	22,742	21,785	21,026	18,549	16,989	15,812	14,845	14,011	13,266	12,584	12	
13	34,528	29,819	27,688	25,472	24,736	24,125	23,142	22,362	19,812	18,202	16,985	15,984	15,119	14,345	13,636	13	
14	36,123	31,319	29,141	26,873	26,119	25,493	24,485	23,685	21,064	19,406	18,151	17,117	16,222	15,421	14,685	14	
15	37,697	32,801	30,578	28,259	27,488	26,848	25,816	24,996	22,307	20,603	19,311	18,245	17,322	16,494	15,733	15	
16	39,252	34,267	32,000	29,633	28,845	28,191	27,136	26,296	23,542	21,793	20,465	19,369	18,418	17,565	16,780	16	
17	40,790	35,718	33,409	30,995	30,191	29,523	28,445	27,587	24,769	22,977	21,615	20,489	19,511	18,633	17,824	17	
18	42,312	37,156	34,805	32,346	31,526	30,845	29,745	28,869	25,989	24,155	22,760	21,605	20,601	19,699	18,868	18	
19	43,820	38,582	36,191	33,687	32,852	32,158	31,037	30,144	27,204	25,329	23,900	22,718	21,689	20,764	19,910	19	
20	45,315	39,997	37,566	35,020	34,170	33,462	32,321	31,410	28,412	26,498	25,038	23,828	22,775	21,826	20,951	20	
21	46,797	41,401	38,932	36,343	35,479	34,759	33,597	32,671	29,615	27,662	26,171	24,935	23,858	22,888	21,991	21	
22	48,268	42,796	40,289	37,659	36,781	36,049	34,867	33,924	30,813	28,822	27,301	26,039	24,939	23,947	23,031	22	
23	49,728	44,181	41,638	38,968	38,076	37,332	36,131	35,172	32,007	29,979	28,429	27,141	26,018	25,006	24,069	23	
24	51,179	45,559	42,980	40,270	39,364	38,609	37,389	36,415	33,196	31,132	29,553	28,241	27,096	26,063	25,106	24	
25	52,620	46,928	44,314	41,566	40,646	39,880	38,642	37,652	34,382	32,282	30,675	29,339	28,172	27,118	26,143	25	
26	54,052	48,290	45,642	42,856	41,923	41,146	39,889	38,885	35,563	33,429	31,795	30,435	29,246	28,173	27,179	26	
27	55,476	49,645	46,963	44,140	43,195	42,407	41,132	40,113	36,741	34,574	32,912	31,528	30,319	29,227	28,214	27	
28	56,892	50,993	48,278	45,419	44,461	43,662	42,370	41,337	37,916	35,715	34,027	32,620	31,391	30,279	29,249	28	
29	58,301	52,336	49,588	46,693	45,722	44,913	43,604	42,557	39,087	36,854	35,139	33,711	32,461	31,331	30,283	29	
30	59,703	53,672	50,892	47,962	46,979	46,160	44,834	43,773	40,256	37,990	36,250	34,800	33,530	32,382	31,316	30	
31	61,098	55,003	52,191	49,226	48,232	47,402	46,059	44,985	41,422	39,124	37,359	35,887	34,598	33,431	32,349	31	
32	62,487	56,328	53,486	50,487	49,480	48,641	47,282	46,194	42,585	40,256	38,466	36,973	35,665	34,480	33,381	32	
33	63,870	57,648	54,776	51,743	50,725	49,876	48,500	47,400	43,745	41,386	39,572	38,058	36,731	35,529	34,413	33	
34	65,247	58,964	56,061	52,995	51,966	51,107	49,716	48,602	44,903	42,514	40,676	39,141	37,795	36,576	35,444	34	
35	66,619	60,275	57,342	54,244	53,203	52,335	50,928	49,802	46,059	43,640	41,778	40,223	38,859	37,623	36,475	35	
40	73,402	66,766	63,691	60,436	59,342	58,428	56,946	55,758	51,805	49,244	47,269	45,616	44,165	42,848	41,622	40	
60	99,607	91,952	88,379	84,580	83,298	82,225	80,482	79,082	74,397	71,341	68,972	66,981	65,227	63,628	62,135	60	
80	124,839	116,321	112,329	108,069	106,629	105,422	103,459	101,879	96,578	93,106	90,405	88,130	86,120	84,284	82,566	80	
90	137,208	128,299	124,116	119,648	118,136	116,869	114,806	113,145	107,565	103,904	101,054	98,650	96,524	94,581	92,761	90	
100	149,449	140,169	135,807	131,142	129,561	128,237	126,079	124,342	118,498	114,659	111,667	109,141	106,906	104,862	102,946	100	
120	173,617	163,648	158,950	153,918	152,211	150,780	148,447	146,567	140,233	136,062	132,806	130,055	127,616	125,383	123,289	120	
140	197,451	186,847	181,840	176,471	174,648	173,118	170,624	168,613	161,827	157,352	153,854	150,894	148,269	145,863	143,604	140	

Tabla II. Estadístico ji-cuadrada