

UCH-FC  
Q. Ambiental  
G 129  
C. 1



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

**“MÉTODO DE “SCREENING” MEDIANTE PARAFAC PARA LA  
DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS UTILIZANDO  
EXTRACCIÓN POR SORCIÓN EN DISCO ROTATORIO.”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial  
de los requisitos para optar al Título de:

**Químico Ambiental**

**Patricia Isabel Gaete Labra**

Director de Seminario de Título: Prof. Titular María Inés Toral Ponce.

Profesor Patrocinante: Dr. Pablo Richter Duk.

Julio de 2015

Santiago – Chile



### INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la candidata:

**PATRICIA ISABEL GAETE LABRA**

“MÉTODO DE “SCREENING” MEDIANTE PARAFAC PARA LA DETERMINACIÓN DE QUINOLONAS UTILIZANDO EXTRACCIÓN POR SORCIÓN EN DISCO ROTATORIO.”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Químico Ambiental

#### **COMISIÓN DE EVALUACIÓN**

*Prof. Titular M<sup>o</sup> Inés Toral Ponce.*

**Director Seminario de Título**

*Dr. Pablo Richter Duk.*

**Profesor Patrocinante**

*Dr. Paul Jara Vergara.*

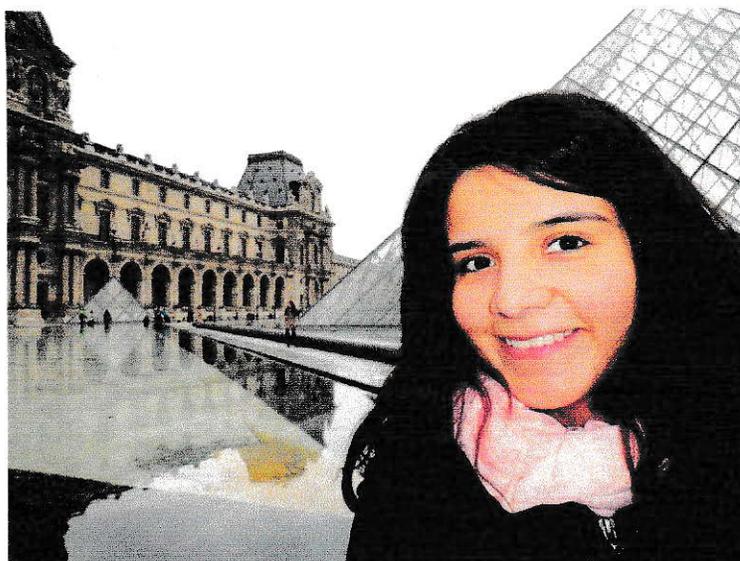
**Presidente**

*M. Sc. Inés Ahumada Torres.*

**Corrector**

Se muestran tres firmas manuscritas en negro y una en azul, cada una sobre una línea horizontal. A la derecha de las firmas se encuentra un sello circular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, con el texto "BIBLIOTECA CENTRAL" en el centro.

Santiago de Chile, Julio de 2015.



Patricia Isabel Gaete Labra nació en Santiago de Chile el 23 de Diciembre de 1990. Su enseñanza media la realizó en el colegio Santísima Trinidad terminando sus estudios secundarios el año 2008, al año siguiente ingresó a la Facultad de Química de la Universidad de Chile a la carrera de Química Ambiental. Su unidad de investigación la realizó en el año 2013, en el Laboratorio de Química Analítica de la misma facultad, al año siguiente se graduó como Licenciada en Ciencias Ambientales y comenzó la realización de su Seminario de Título en el mismo laboratorio.

Dedicado a mi mamá por su constante apoyo en cada paso de  
mi vida, por tener la palabra precisa en el momento adecuado  
y por el amor incondicional que me entrega día a día.

Eres el pilar más importante en mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

Durante el proceso de realización de este seminario de título y durante toda la carrera me gustaría agradecer a las personas que siempre han estado conmigo.

En primer lugar agradecer a mi mamá, Adriana Labra, por su apoyo incondicional y su constante preocupación a lo largo de mi carrera y de mi vida, por ser la mamá que es y dar todo para llegar a ser quien soy, por cumplir un rol tan importante como mamá y papá. A mi Tía Alicia que es mi segunda mamá, por enseñarme que la vida hay que afrontarla con una sonrisa y una felicidad constante. A mi pololo Pablo por su preocupación y apoyo constante durante los años que llevamos juntos, por estar conmigo en los buenos y malos momentos. Muchas gracias por ser como eres y por entregarme tu amor a diario.

A la profesora María Inés Toral por su apoyo y dedicación, tanto en mi unidad de investigación como en el seminario de título, por estar siempre presente en el momento indicado para darme su apoyo y consejo. Al profesor Pablo Richter por su disposición y consejos durante todo el desarrollo de este trabajo.

Agradecer a las personas del laboratorio de química analítica, que son un grupo increíble, no pude haber elegido un mejor lugar donde realizar mi seminario, por el constante apoyo y disponibilidad para ayudar cuando lo necesité. En especial a Gabriela y a Diego, mis compañeritos de oficina, por ser como son. Les agradezco cada momento vivido en la oficina, las risas, los enojos, los consejos, las dormidas, por tener la disposición cada vez que decía tengo una pregunta! Gracias por compartir los buenos y malos momentos de esta etapa de mi vida.

A mis amigas de la universidad que fueron un gran apoyo a lo largo de toda la carrera, por estar siempre presentes y tener una preocupación constante del desarrollo de mi seminario de título.

En general a todas las personas que en algún momento de este proceso estuvieron a mi lado, dándome su apoyo.

Por último agradecer al proyecto FONDECYT 1140716 por el financiamiento de este seminario de título.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes generales.....	1
1.1.1 Contaminantes emergentes.....	1
1.1.1.1 Antibióticos.....	2
1.2 Antecedentes específicos.....	3
1.2.1 Quinolonas.....	3
1.2.1.1 Características estructurales.....	3
1.2.1.2 Mecanismo de acción.....	4
1.2.1.3 Ácido Oxolínico (OXO).....	6
1.2.1.4 Flumequina (FLU).....	7
1.2.1.5 Enrofloxacin (ENRO).....	8
1.2.1.6 Ciprofloxacino (CIP).....	9
1.2.2 Extracción de analitos en solución mediante sorción en fase sólida.....	10
1.2.2.1 Sorción en disco rotatorio (RDSE).....	10
1.2.2.2 Proceso de sorción del analito.....	12
1.2.3 Espectrofotometría de fluorescencia.....	14
1.2.4 Calibración multivariada.....	16
1.2.5 Análisis Factorial Paralelo (PARAFAC).....	18
1.2.6 Parámetros analíticos.....	20
1.2.6.1 Linealidad.....	20
1.2.6.2 Sensibilidad.....	20
1.2.6.3 Desviación estándar de los blancos.....	20
1.2.6.4 Precisión (DER).....	20
1.2.6.5 Límite de detección (LD).....	21
1.2.6.6 Límite de cuantificación (LC).....	22
1.2.6.7 Exactitud.....	22
1.3 Hipótesis.....	23
1.4 Objetivo General.....	23

1.5	Objetivos específicos.....	23
II.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	24
2.1	Materiales.....	24
2.1.1	Fungibles.....	24
2.1.2	Aparatos e instrumentos.....	24
2.1.3	Reactivos.....	25
2.1.4	Solución “Stock” de antibióticos.....	25
2.2	Métodos.....	26
2.2.1	Diseño del soporte para fluorimetría.....	26
2.2.2	Selección de la longitud de onda de excitación y el “slit” de emisión y el “slit” de excitación.....	26
2.2.3	Estudio de la influencia del medio extractante.....	27
2.2.4	Variación de tiempo de extracción.....	27
2.2.5	Estudio de temperatura.....	28
2.2.6	Estudio de fuerza iónica.....	28
2.2.7	Curvas de calibración de OXO y FLU.....	28
2.2.8	Muestras de agua en MeOH a pH 2.....	29
2.2.9	Análisis Factorial Paralelo (PARAFAC).....	29
III.	RESULTADOS.....	30
3.1	Elaboración del soporte.....	30
3.2	Selección de las variables de fluorescencia de FLU y OXO en membranas de nylon utilizadas en soluciones metanólicas.....	31
3.2.1	Selección de la longitud de onda de excitación.....	31
3.2.2	Selección de “slit” de excitación y “slit” de emisión.....	33
3.2.3	Efecto del tiempo de extracción de OXO y FLU en una solución de MeOH extraídos en una membrana de nylon.....	35
3.2.4	Influencia del medio extractante.....	36
3.2.5	Estudio del efecto de la temperatura en la extracción.....	37
3.2.6	Estudio del efecto de la fuerza iónica de la solución.....	37
3.2.7	Muestras en agua en MeOH a pH 2.....	38

3.2.8	Análisis Factorial Paralelo (PARAFAC).....	39
3.2.8.1	Agua destilada en MeOH a pH 2.....	40
3.2.8.2	Agua potable en MeOH a pH 2.....	49
3.2.9	Muestras de agua de CIP y ENRO.....	54
3.2.9.1	Agua destilada en MeOH a pH 2.....	54
3.2.9.2	Agua potable en MeOH a pH 2.....	55
IV.	CONCLUSIONES.....	58
V.	REFERENCIAS.....	61
VI.	ANEXO.....	64

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Resumen de condiciones óptimas tanto químicas como de fluorescencia. ....	37
<b>Tabla 2.</b> Concentraciones utilizadas en la preparación de soluciones en agua destilada y potable, fortificadas con FLU y OXO simultáneamente. ....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema del movimiento de contaminantes emergentes en el agua. ....	2
<b>Figura 2.</b> Estructura de las quinolonas con radicales cambiables y propiedades modificables (Rubio, 2011). ....	4
<b>Figura 3.</b> Modelo propuesto de la interacción de las quinolonas (Leyva, 2008). ....	5
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la interacción entre la fluoroquinolona con la enzima ADN-girasa y el ADN (Leyva, 2008). ....	5
<b>Figura 5.</b> Estructura química de OXO. ....	6
<b>Figura 6.</b> Estructura química de FLU. ....	7
<b>Figura 7.</b> Estructura química de enrofloxacin. ....	8
<b>Figura 8.</b> Estructura química de ciprofloxacina. ....	9
<b>Figura 9.</b> Disco rotatorio con membrana de nylon. ....	11
<b>Figura 10.</b> Esquema de la estructura de nylon (Escandar y col., 2004). ....	12
<b>Figura 11.</b> Cambio de la capa estacionaria de acuerdo a la variación de la velocidad de agitación (D. Pino, 2014). ....	12
<b>Figura 12.</b> Diagrama de energía de Jablonski. ....	15
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática de la operación PARAFAC, que construye una matriz de datos de tres vías con las diferentes matrices de datos, y luego se descompone la matriz en “loadings” (espectros de fluorescencia de excitación y de emisión en función de la longitud de onda, correspondientes a las matrices B y C). También se producen “Scores”, que contiene información relativa a las concentraciones de constituyentes (Escandar y colo, 2014). ....	19
<b>Figura 14.</b> Soporte fabricado para la realización de este trabajo. ....	26
<b>Figura 15.</b> Soporte utilizado para las lecturas en fluorescencia a) soporte solo, b) soporte con disco de teflón y c) soporte con disco de teflón y membrana de Nylon. ....	30
<b>Figura 16.</b> Espectros de fluorescencia de FLU y OXO en solución de MeOH. ....	31
<b>Figura 17.</b> Espectros de emisión a distintas longitudes de onda de excitación evaluadas a a) 220 nm, b) 250 nm, c) 260 nm, d) 270 nm, e) 280 nm y f) 300 nm. ....	32
<b>Figura 18.</b> Espectros de los distintos “slit” de excitación-emisión estudiados a) 2.5-2.5 nm, b) 2.5-10 nm, c) 2.5-20 nm, d) 5-5 nm, e) 5-10 nm y f) 10-10 nm. ....	34
<b>Figura 19.</b> Estudio del tiempo de extracción de OXO, concentración $6 \times 10^{-8}$ mol L <sup>-1</sup> . ....	35

<b>Figura 20.</b> Estudio del tiempo de extracción de FLU, concentración $6 \times 10^{-8}$ mol L <sup>-1</sup> ...	36
<b>Figura 21.</b> Espectros de fluorescencia del estudio del medio a) MeOH, b) MeOH + HCl. .....	36
<b>Figura 22.</b> Espectros de fluorescencia de a) FLU y b) OXO, en muestras de agua destilada. ....	38
<b>Figura 23.</b> Espectros de fluorescencia de a) FLU y b) OXO, en muestras de agua potable. ....	38
<b>Figura 24.</b> Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación- emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con solución de agua destilada, MeOH y pH 2, a) con “Rayleigh” y b) llevándolo a 0. ....	40
<b>Figura 25.</b> Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación- emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con muestras de agua destilada en MeOH y pH 2, con las distintas calibraciones de la tabla 2 a) Exp1, b) Exp2, c) Exp3, d) Exp4, e) Exp5 y f) Exp6. ....	41
<b>Figura 26.</b> Espectros de emisión y excitación correspondientes a la muestra Test en agua destilada con MeOH a pH 2. ....	43
<b>Figura 27.</b> Espectros de fluorescencia de FLU y OXO en muestras de agua destilada con MeOH a pH 2. ....	43
<b>Figura 28.</b> Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación- emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con agua destilada con MeOH a pH 2 con concentraciones de 5 ppb de FLU y 5 ppb de OXO a) medición normal, b) rango acotado y sus respectivos gráficos de contorno c) medición normal y d) rango acotado. ....	45
<b>Figura 29.</b> Espectros de emisión y excitación correspondientes a la muestra Test en agua destilada en MeOH a pH 2, con el rango acotado. ....	46
<b>Figura 30.</b> Predicciones pseudo-univariadas para a) FLU como componente 1 y b) OXO como componente 2. ....	47
<b>Figura 31.</b> Predicciones pseudo-univariadas para a) FLU como componente 2 y b) OXO como componente 1. ....	48
<b>Figura 32.</b> Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación- emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con agua potable en MeOH a pH 2, con concentraciones de 5 ppb de FLU y 5 ppb de OXO a) medición normal, b) rango acotado y sus respectivos gráficos de contorno c) medición normal y d) rango acotado. ....	50

<b>Figura 33.</b> Espectros de emisión y excitación correspondientes a la muestra Test en agua potable en MeOH a pH 2, con el rango acotado. ....	51
<b>Figura 34.</b> Predicciones pseudo-univariadas para a) FLU como componente 1 y b) OXO como componente 2. ....	52
<b>Figura 35.</b> Predicciones pseudo-univariadas para a) FLU como componente 2 y b) OXO como componente 1. ....	52
<b>Figura 36.</b> Espectros de fluorescencia de a) CIP y b) ENRO, en muestras de agua destilada en MeOH a pH 2. ....	54
<b>Figura 37.</b> Espectros de fluorescencia a) ENRO y CIP; b) FLU, OXO, CIP y ENRO en muestras de agua destilada en MeOH a pH 2. ....	55
<b>Figura 38.</b> Espectros de fluorescencia de a) CIP y b) ENRO, en muestras de agua potable en MeOH a pH 2. ....	55
<b>Figura 39.</b> Espectros de fluorescencia de a) CIP y ENRO; b) FLU, OXO, ENRO y CIP en muestras de agua potable en MeOH a pH 2. ....	56
<b>Figura 40.</b> Espectros de fluorescencia de FLU, OXO, ENRO, CIP y OTC en muestras de agua destilada. ....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>CE</b>	contaminantes emergentes
<b>MeOH</b>	metanol
<b>FLU</b>	flumequina
<b>OXO</b>	ácido oxolínico
<b>CIP</b>	ciprofloxacina
<b>ENRO</b>	enrofloxacina
<b>OTC</b>	oxitetraciclina
<b>HCl</b>	ácido clorhídrico
<b>RDSE</b>	extracción por sorción en disco rotatorio
<b>PARAFAC</b>	análisis factorial paralelo
<b>FEEM</b>	matrices de fluorescencia de excitación-emisión

## RESUMEN

Existe una creciente preocupación por los llamados contaminantes emergentes (CE), dentro de los que se encuentran antibióticos de uso veterinario o humano; productos de cuidado personal, etc, que se han detectado en diferentes compartimientos ambientales, sin conocer los riesgos para la salud y el medio ambiente. Dentro de los posibles productos presentes en RILES de la industria farmacéutica veterinaria, se encuentran los antibióticos sintéticos ácido oxolínico (OXO) y flumequina (FLU), pertenecientes al grupo de las quinolonas, que en Chile son utilizados principalmente por la industria salmonera.

A fin de contribuir a la cuantificación de las concentraciones de estos antibióticos en solución, en este seminario se propuso estudiar las condiciones necesarias para desarrollar un método “screening” que sea sensible, rápido y aplicable al análisis de aguas residuales.

Para ello los antibióticos se extrajeron de las soluciones por sorción en un disco de teflón giratorio (15 mm de diámetro), con una membrana de nylon unida a una de sus caras. Las condiciones de extracción óptimas fueron en medio mixto MeOH/HCl como solvente, 30 min de extracción, velocidad de rotación de 1500 rpm y adición de 15  $\mu$ L de HCl. Para el análisis se utilizó métodos espectrofluorimétricos, donde las variables espectrales seleccionadas fueron; “slit” de excitación-emisión de 2,5 y 10 nm, respectivamente y longitud de onda de excitación a 270,0 nm.

Luego de la optimización del método, se obtuvo extractos con FLU y OXO en MeOH a pH 2 a partir de muestras de agua destilada y potable utilizando una membrana

de nylon. La membrana de nylon que contiene el analito fue medida directamente por espectrofluorimetría, variando las longitudes de onda de excitación entre 240 - 310 nm cada 2 nm, y las longitudes de onda de emisión entre 287 - 440 nm cada 2 nm. Esto permitió obtener las matrices de fluorescencia de excitación-emisión (FEEM), las que fueron procesadas por análisis factorial paralelo (PARAFAC), sin la necesidad de una etapa de desorción.

Dado que los espectros de fluorescencia de FLU y OXO tienen una misma forma, no fue posible su determinación ni cuantificación, por lo que se compararon con otras dos quinolonas (enrofloxacin (ENRO) y ciprofloxacina (CIP)), obteniéndose resultados similares.

Estos resultados preliminares podrían dar las bases para el desarrollo de un método de "Screening" que permita identificar el contenido global de estas quinolonas en una muestra de agua, pudiendo realizarse incluso en presencia de otros productos farmacéuticos utilizados en la acuicultura como oxitetraciclina (OTC).

## ABSTRACT

There is increasing concern about of emerging pollutants called EP, including antibiotics for veterinary use or human, as personal care products, that have been detected in different environmental compartments, without knowing the risks to health and the environment. Within the possible products released into RILES of the veterinary pharmaceutical industry in it is possible to find oxolinic acid (OXO) and flumequine (FLU), belonging to the group of quinolones. In Chile they are used principally for the salmon industry.

The antibiotics are extracting of the solution for sorption in a small rotating Teflon disc (diameter 15 mm) with a nylon membrane attached to one of its faces. The optimal extraction conditions was in mixed media MeOH / HCl as solvent, 30 min of extraction, rotation speed 1500 rpm and addition of 15  $\mu$ L of HCl. For the analysis was used espectrofluorometric methods, when the selected spectral variables were; "Slit" of excitation-emission 2.5 and 10 nm, respectively, and a excitation wavelength of 270.0 nm-

After the method optimization were obtained extracts containing FLU and OXO in MeOH at pH 2 from samples of distilled and drinking water using a nylon membrane. The nylon membrane containing the analyte was directly measured by spectrofluorimetry varying the excitation wavelength between 240-310 nm each 2 nm, and the emission wavelength between 287-440 nm each 2 nm, being obtained the matrix of fluorescence excitation-emission (FEEM), which were processed by applying parallel factor analysis (PARAFAC), without the need for a desorption step.

Since the spectra of FLU and OXO have the same form, it was not possible to determine or quantify, why were compared with other two quinolones; (enrofloxacin (ENRO) and ciprofloxacin (CIP)), with similar results.

These preliminary results could provide the basis for development provide the basis for developing a method of "screening" to identify the overall content of these quinolones in a water sample being able performed even in the presence of other pharmaceuticals products used in aquaculture as oxytetracycline (OTC).

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **1.1 Antecedentes Generales.**

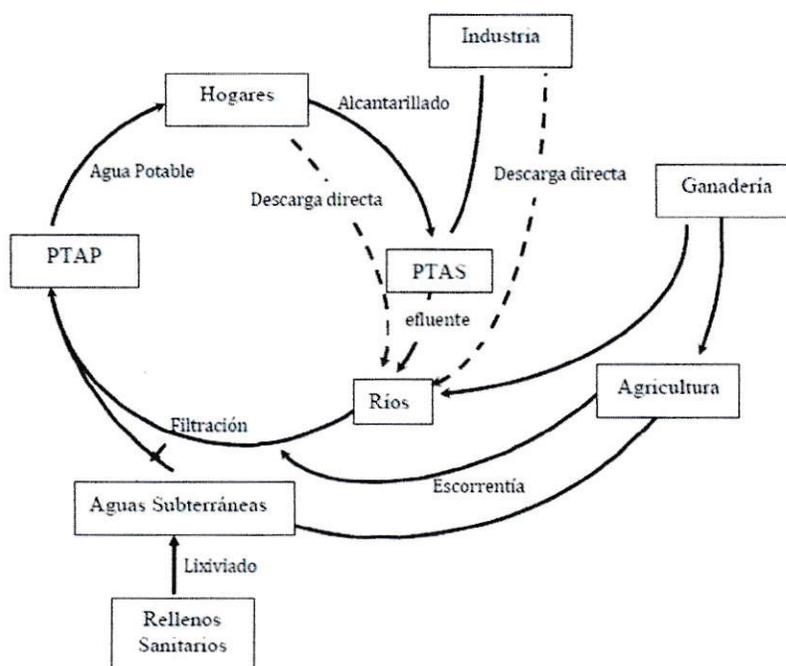
#### **1.1.1 Contaminantes emergentes.**

Durante años se ha investigado y estudiado los contaminantes que se encuentran regulados en la Norma Chilena (NCh) 409/2 (Instituto nacional de organización (INN), 2006). En estos estudios, se han desarrollado nuevos métodos cada vez más sensibles que han permitido detectar la presencia de otros contaminantes ambientales, denominados globalmente como contaminantes emergentes, que actualmente no se consideran significativos en términos de concentración y/o distribución (Gil y col, 2012). Por este motivo, no están incluidos aún en las normas de calidad de agua y se sabe relativamente poco de su impacto en los distintos compartimientos ambientales y en la salud humana, donde sus posibles efectos tóxicos, dependerán principalmente de la concentración en que se encuentren, y su persistencia (Hurtado-Sánchez y col, 2015). Sin embargo, debido a su elevada producción, consumo y continua introducción al medio ambiente, estos contaminantes no necesitan ser persistentes para causar efectos negativos (Barceló & López, 2007).

Existe una amplia variedad de contaminantes emergentes, dentro de los cuales se encuentran los producidos en industrias farmacéuticas que incluyen antibióticos, hormonas, analgésicos, tranquilizantes y aquellos procedentes de quimioterapia suministrados a pacientes con cáncer (Diego Pino, 2014). El estudio del comportamiento de estas sustancias al ingresar a las aguas superficiales, su impacto en

el ambiente y su posible incidencia en la salud ha recibido atención sólo en los últimos años.

En el medio ambiente, en general, los compuestos químicos presentes en aguas residuales sufren procesos de transformación bióticos y abióticos y/o eliminación, de acuerdo con su persistencia, transporte y destino final (Bletsou, y col, 2015) (Figura 1).



PTAP: Planta de Tratamiento de Agua Potable  
PTAS: Planta de Tratamiento de Aguas Servidas

**Figura 1.** Esquema del movimiento de contaminantes emergentes en el agua.

#### 1.1.1.1 Antibióticos.

De todos los contaminantes emergentes, los que probablemente suscitan una mayor preocupación y estudio en los últimos años son los fármacos y, en particular, los antibióticos (Barceló & López, 2007), provenientes no sólo de excreciones, donde una parte importante del fármaco es eliminado del cuerpo sin metabolizarse, sino que

proviene también de la disposición industrial inadecuada de los desechos de estos productos (Diego Pino, 2014). Los compuestos farmacéuticos se han detectado en efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, en aguas superficiales, agua de mar, agua subterránea, entre otras. (Giraldo y col., 2010).

Los posibles efectos de los antibióticos en cursos de agua incluyen: el desarrollo de resistencia a las bacterias acuáticas, toxicidad directa de la microflora y la microfauna y riesgos para la salud humana.

## **1.2 Antecedentes Específicos.**

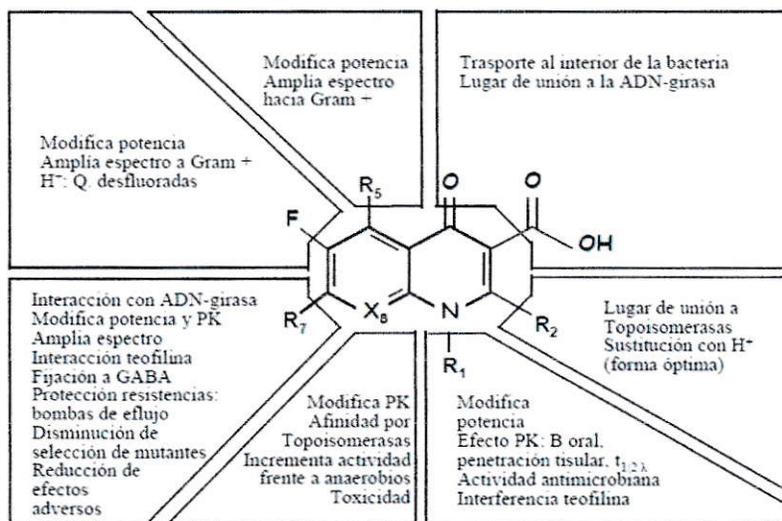
### **1.2.1 Quinolonas.**

#### 1.2.1.1 Características estructurales.

Las quinolonas son antibióticos sintéticos con actividad antibacteriana y constituyen uno de los principales grupos de fármacos tanto en la medicina humana como veterinaria (Gámiz-gracia y col, 2012). Dentro de las quinolonas utilizadas en ganadería se encuentran el ácido oxolínico, la flumequina, la enrofloxacin y la ciprofloxacina. Los dos primeros son además ampliamente utilizados en acuicultura.

Todas las quinolonas poseen estructuras bicíclicas heteroaromáticas, compuestas por un anillo piridona (con un ácido carboxílico en la posición 3 y un nitrógeno en la posición 1, el cual debe estar unido a una cadena lateral o cíclica  $R_1$ ) unido a un anillo aromático (Hassouan, 2006). Las diferencias estructurales radican tanto en el número y posición de los átomos de nitrógeno como en las cadenas laterales y la presencia de átomos de flúor en su molécula (Peña y col, 2004).

Dependiendo de los sustituyentes que tenga y de la presencia de flúor en la posición 6 (fluoroquinolonas) se modifican sus propiedades biológicas como se muestra en la Figura 2 (Rubio, 2011).



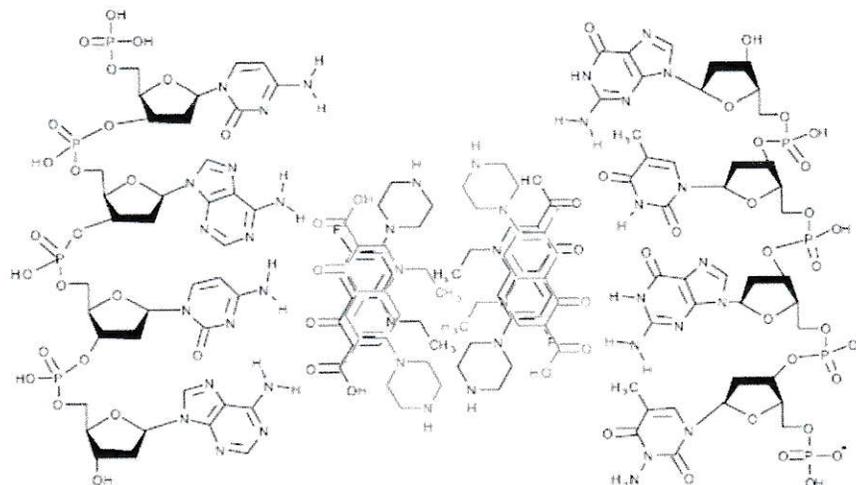
**Figura 2.** Estructura de las quinolonas con radicales cambiables y propiedades modificables (Rubio, 2011).

### 1.2.1.2 Mecanismo de acción.

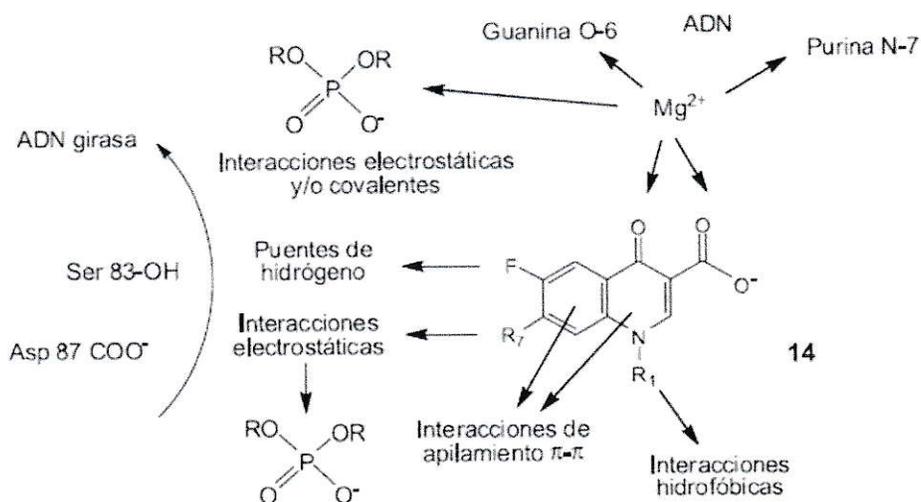
Las quinolonas entran en la célula bacteriana por difusión pasiva inhibiendo el crecimiento de bacterias al interior de la enzima ADN-girasa en organismos Gram-negativos y la Topoisomerasa IV en organismos Gram-positivos. Ambas enzimas son esenciales para la replicación y transcripción del ADN donde la inhibición de estas funciones conduce a su muerte celular (Samuelsen, 2006 y Leyva, 2008).

Las moléculas de quinolona, unidas a complejos tetraméricos (Figura 3), se acoplan a las hebras de ADN y a determinados puntos de las subunidades de la ADN-girasa (A y B) y estabilizan el complejo ternario de la girasa ADN-quinolona-ADN, impidiendo su reversión y poniendo en marcha una serie de procesos. Además existen

interacciones de apilamiento  $\pi$ - $\pi$  e interacciones hidrofóbicas entre los núcleos heterocíclicos de las quinolonas (Figura 4).



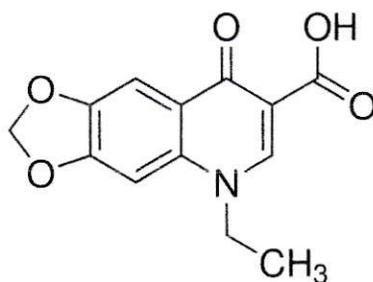
**Figura 3.** Modelo propuesto de la interacción de las quinolonas (Leyva, 2008).



**Figura 4.** Representación esquemática de la interacción entre la fluoroquinolona con la enzima ADN-girasa y el ADN (Leyva, 2008).

### 1.2.1.3 Ácido Oxolínico (OXO).

El OXO (Figura 5) es una quinolona de primera generación, cuyo blanco farmacológico principal es la enzima bacteriana ADN-girasa. Posee una actividad antibacteriana de amplio espectro y se usa principalmente como antimicrobiano para tratar infecciones de las vías urinarias (Cheng y col, 2013).

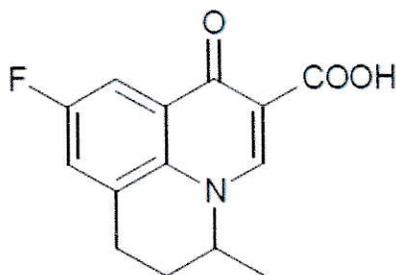


**Figura 5.** Estructura química de OXO.

Nombre IUPAC: Ácido 6,8-dioxolo-1-etil-4-oxo-3-quinolincarboxílico.

#### 1.2.1.4 Flumequina (FLU).

La FLU (Figura 6), es un antibiótico sistemático perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas (Rodrigues-silva y col, 2013). Es un derivado tricíclico con un átomo de flúor en la posición 6 lo que produce un incremento en su actividad antibacteriana frente a las bacterias Gram-negativas y Gram-positivas (Christodoulou y col, 2007).



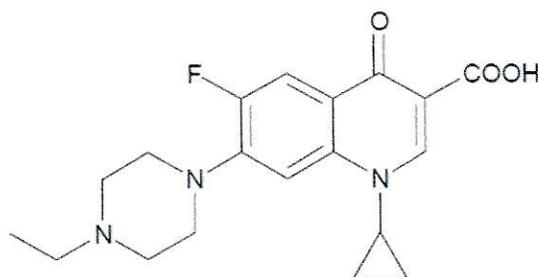
**Figura 6.** Estructura química de FLU.

Nombre IUPAC: Ácido 6-fluoro-10-metil-4-oxo-1-azatriciclo-3-carboxílico.

### 1.2.1.5 Enrofloxacin (ENRO).

La ENRO (Figura 7), es una quinolona de tercera generación, lo que hace que tenga un espectro antimicrobiano más amplio, mejorando así la actividad tanto contra bacterias Gram- negativas y Gram-positivas (aeróbicos), como también bacterias anaeróbicas y microbacterias (Hassouan, 2006). Fue desarrollada para el uso exclusivo en animales como terneros, cerdos, pollos, pavos, entre otros (Otero y col, 2001).

Pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, y la presencia de un ciclopropilo en la posición 1 mejora su actividad antibacteriana. Además, el volumen espacial del anillo en la posición 7 le confiere mayor potencia con respecto a quinolonas con sustituyentes lineales en esa posición (Rubio, 2011).

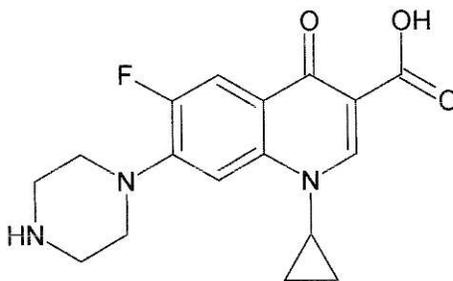


**Figura 7.** Estructura química de enrofloxacin.

Nombre IUPAC: Ácido 1-ciclopropil -7-(4-etil-1-piperazinil)-6-fluoro-4-oxo-1,4-dihidro-3-quinolincarboxílico.

### 1.2.1.6 Ciprofloxacino (CIP).

La CIP (Figura 8) es el principal derivado de ENRO, generado por la pérdida de un grupo N-etilo de ENRO. Corresponde a una quinolona de segunda generación que posee un amplio espectro y es uno de los antibióticos clínicos más ampliamente utilizados en el mundo (Xu y col, 2015).



**Figura 8.** Estructura química de ciprofloxacina.

Nombre IUPAC: Ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-3-quinolioncarboxílico.

### **1.2.2 Extracción de analitos en solución mediante sorción en fase sólida.**

La evolución de las técnicas de microextracción por sorción en fases poliméricas se inició en 1989 con el desarrollo de la microextracción en fase sólida (SPME). Desde entonces, se han desarrollado nuevas técnicas con el propósito de maximizar la eficiencia de extracción mediante el aumento de su volumen o la relación de superficie a volumen de la fase. Actualmente, existe un creciente interés en el desarrollo de nuevas estrategias analíticas, basadas en la extracción del analito por sorción en fase sólida. Dentro de las que se destacan, el método de extracción sobre barras magnéticas (SBSE) y la extracción en fase sólida (SPE) mediante cartuchos (Giordano y col, 2011).

#### **1.2.2.1 Sorción en disco rotatorio (RDSE).**

Recientemente se ha desarrollado una técnica analítica más simple, rápida y de bajo costo, llamada extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE), que permite extraer los analitos mediante retención en una fase sólida polimérica por contacto con la solución donde se encuentra el analito. (Cañas y col, 2014).

La configuración de RDSE consiste en un disco de teflón que en su interior tiene una pequeña barra de agitación magnética. En una sus caras se adhiere la fase sólida que actuará como sorbente del analito (Figura 9). Este disco será accionado mediante agitadores magnéticos.



**Figura 9.** Disco rotatorio con membrana de nylon.

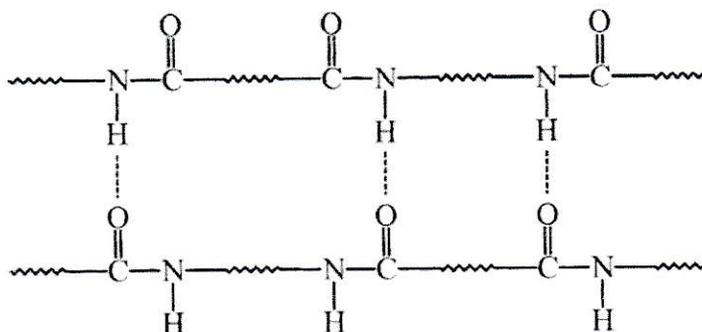
Dentro de las ventajas de esta técnica se encuentran:

- la arquitectura del dispositivo permite una conveniente proporción superficie área-volumen,
- las extracciones son realizadas a partir de pequeñas cantidades de muestras acuosas,
- el régimen de recirculación previene el colapso de la fase en muestras complejas,
- debido que la fase de extracción está en contacto solo con la muestra líquida y no con el recipiente que contiene la solución, es posible una agitación a altas velocidades,
- la fase sorbente es fácilmente reemplazable (Cañas y col, 2014).

Estas características la hacen útil para analizar muestras complejas reduciendo los tiempos de análisis, disminuyendo las etapas preparativas, utilizando menor cantidad de disolvente en pre-tratamientos y simplificando el procesamiento de las muestras (Cañas & Richter, 2012).

La selección de la fase sólida depende de su afinidad química con el analito. Dentro de las fases sorbentes utilizadas comúnmente se encuentran: OASIS® HLB, Octadecil C18, PDMS y Membrana de NYLON. La membrana de nylon, polímero artificial del grupo de las poliamidas (Figura 10), se caracteriza por ser hidrofílica,

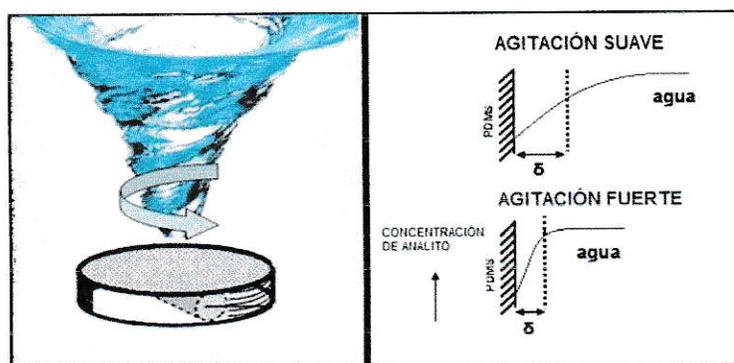
mecánicamente resistente, térmicamente estable hasta 50 °C, compatible con una amplia gama de disolventes, tanto acuosos como orgánicos (Escanda y col, 2004).



**Figura 10.** Esquema de la estructura de nylon (Escandar y col., 2004).

#### 1.2.2.2 Proceso de sorción del analito.

Durante la agitación se produce una capa estacionaria sobre la fase sorbente por donde circula el analito mediante difusión (D. Pino, 2014). Un factor importante es la velocidad de agitación, ya que al aumentar la velocidad disminuye el espesor de la capa estacionaria, facilitando la transferencia de masas desde el seno de la solución a la fase sorbente (Figura 11). Esto aumenta considerablemente la cantidad de analito retenido en la fase en un menor tiempo.



**Figura 11.** Cambio de la capa estacionaria de acuerdo a la variación de la velocidad de agitación.

El tiempo de equilibrio ( $t_e$ ) del analito entre la solución y la fase sorbente se expresa mediante la ecuación 1.

$$t_e = \frac{3 \times \delta \times Kd \times Pt}{D} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde;  $\delta$  = espesor de la capa estacionaria.

$Kd$  = coeficiente de distribución del analito entre la fase y la solución de la muestra.

$Pt$  = espesor de la fase.

$D$  = coeficiente de difusión de la solución.

Así mismo la velocidad de transferencia de masa está en estrecha relación con la capa estacionaria, ya que un menor espesor de ésta conllevará a un aumento en la velocidad de agitación, como lo muestra la ecuación 2.

$$\frac{dn}{dt} = \left( \frac{D \times A}{\delta} \right) \times C \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde;  $D$  al igual que en la ecuación 1 corresponde al coeficiente de difusión de la solución.

$\delta$  = espesor de la capa estacionaria.

$n$  = número de moles.

$A$  = área de la fase.

En consecuencia, aumentando la velocidad de rotación, se reduce la capa de agua estacionaria, facilitando la extracción y por consiguiente el tiempo de equilibrio disminuye.

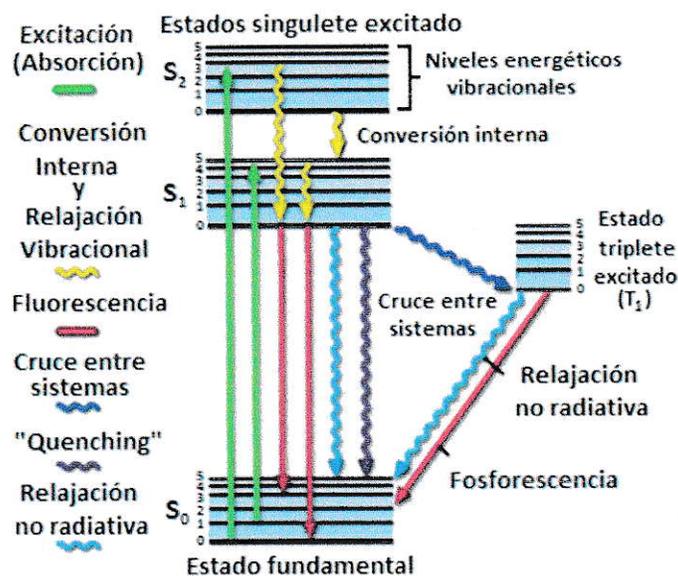


### 1.2.3 Espectrofotometría de fluorescencia.

Esta técnica se caracteriza por la excitación de una molécula mediante la absorción de fotones y su posterior relajación, cuyo espectro de emisión permite el análisis molecular cualitativo y cuantitativo (Skoog y col, 2001). Las transiciones electrónicas producidas en el proceso de absorción no conllevan a un cambio de espín, lo que hace que la fluorescencia tenga una vida media muy corta ( $<10^{-5}$ s) (Skoog y col, 2001).

Un aspecto importante es su sensibilidad, alcanzándose límites de detección que suelen ser de uno o tres órdenes de magnitud inferiores a los encontrados en la espectrofotometría de absorción.

El primer paso en el proceso de fluorescencia es la excitación de la molécula mediante la absorción de un fotón de dos bandas de radiación,  $\lambda_1$  centrada en la longitud de onda de la transición  $S_0 \rightarrow S_1$  y  $\lambda_2$  de mayor energía correspondiente a la transición  $S_0 \rightarrow S_2$ , (Figura 12). La excitación directa a un estado triplete no se muestra, debido a que esta transición no tiene lugar de manera significativa.



**Figura 12.** Diagrama de energía de Jablonski.

$S_0$  corresponde al estado (singlete) fundamental de energía potencial de una molécula a temperatura ambiente con sus correspondientes niveles de energía vibracional (1, 2, 3, 4 y 5). Los estados electrónicos excitados,  $S_1$ ,  $S_2$  y  $T_1$  corresponden a estados singletes (S) y triplete (T) respectivamente. La excitación directa desde el estado fundamental implicaría un cambio en el espín del electrón, evento que tiene una muy baja probabilidad de suceder, por lo que recibe el nombre de transición prohibida (Skoog y col, 2001).

La absorción es rápida ( $10^{-15}$  a  $10^{-14}$  s), lo que indica que la emisión fluorescente tiene lugar a una velocidad significativamente más lenta ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  s). Por otra parte, la Fosforescencia que corresponde a la transición electrónica desde un estado triplete excitado al singlete fundamental, es mucho más lenta ( $10^{-4}$  y 10 s ó más).

La emisión de un fotón ya sea por fluorescencia o por fosforescencia se conoce como proceso de relajación radiativo, a diferencia de otros mecanismos de

desactivación, que comprenden procesos no radiativos (conversión interna). La transición energéticamente más favorecida hacia el estado fundamental es aquella que minimiza la vida media del estado excitado. Por ello, si la desactivación por fluorescencia es más rápida que los procesos no radiantes, se observará tal emisión (Skoog y col, 2001).

La absorción de luz UV genera usualmente una transición electrónica del tipo  $n \rightarrow \pi^*$  o  $\pi \rightarrow \pi^*$ , dependiendo de cuál de ellas sea la de menor energía. La fluorescencia se observará con mayor frecuencia en compuestos con dobles enlaces ( $C=C$  o  $C=O$ ) altamente conjugados porque las transiciones del tipo  $\pi \rightarrow \pi^*$  requieren baja energía y se ven favorecidas (presentan intensidad de fluorescencia mayor) debido a que tienen un tiempo de vida media más que hace menos probable otros procesos de desactivación (Seguin, 2013).

El rendimiento cuántico de la fluorescencia disminuye al aumentar la temperatura, ya que se acrecienta la frecuencia de las colisiones, aumentando también la probabilidad de desactivación por conversión interna.

#### **1.2.4 Calibración multivariada.**

La principal aplicación de la calibración multivariada es la resolución de mezclas complejas y su cuantificación sin la necesidad de una separación química o física de cada constituyente, es decir, lograr la separación virtual, a través de un computador y un algoritmo.

Este método relaciona las concentraciones de diversos analitos presentes en una muestra con las respuestas obtenidas con la técnica analítica, es decir, considera muchas

señales diferentes en contraste con la calibración univariada que trabaja con una única respuesta para cada muestra. El tipo de calibración depende de los datos con que se trabaja (Olivieri & Escandar, 2000).

Los datos de calibración multivariada pueden ser de primer o segundo orden. Como primer orden se encuentran los espectros generados por una excitación y todo el rango de emisión, produciéndose un vector, que son los datos multivariantes más simples. Otra característica de este tipo de calibración es que para resolver mezclas se requiere una calibración previa de posibles interferentes que se encuentren en la muestra.

Por otro lado la calibración multivariada de segundo orden agrega una segunda dimensión a los datos de primer orden, de forma químicamente explicativa y lo suficientemente importante para permitir una separación de señales. Una ventaja del método es que no requiere incluir los potenciales interferentes en la calibración y por tanto se puede analizar muestras complejas con conjuntos de calibración de pocas muestras. Dentro de los datos de segundo orden se encuentran, datos cromatográficos con detección espectral y matrices de fluorescencia de excitación-emisión (FEEM) (Olivieri & Escandar, 2000). Estas últimas se obtienen a partir de la variación sistemática de las longitudes de onda de excitación y de emisión, lo que mejora la capacidad de resolución de los espectros de fluorescencia superpuestos.

Últimamente este tipo de obtención de datos se ha utilizado para la detección de una amplia gama de analitos (Elcoroaristizabal y col, 2015).

A pesar que no todos los compuestos emiten fluorescencia, las muestras complejas pueden contener varios componentes fluorescentes, cuyas señales FEEM

pueden superponerse de manera significativa. Esto llevó al empleo de procesamientos quimiométricos avanzados para la resolución de las señales de analitos individuales (Olivieri & Escandar, 2000).

### **1.2.5 Análisis Factorial Paralelo (PARAFAC)**

El análisis factorial paralelo (PARAFAC) es el algoritmo de segundo orden más utilizado para descomponer FEEM, debido a la estructura trilineal de los datos (Elcoroaristizabal y col, 2015).

Al realizar mediciones de FEEM, se obtiene por cada muestra una tabla de datos, que forman un cubo, llamado arreglo de tres vías, donde este algoritmo asume que es una matriz de tres dimensiones y la descompone en tres matrices. Estas tres matrices son; espectro de emisión puro, espectro de excitación puro y la diferencia entre concentraciones que tiene que ver con la abundancia relativa. El producto de estas matrices debe generar un cubo lo más parecido al inicial y debe tener un significado físico, minimizando el residuo. Este algoritmo se basa en una minimización de mínimos cuadrados y permite medir concentraciones relativas de componentes de la mezcla, en presencia de cualquier número de constituyentes no calibrados o interferentes (Escandar y col, 2004).

La matriz se considera que es trilineal cuando el número de componentes trilineales ( $N$ ) necesarios para describir los datos a través de la Ecuación 3, es pequeño, y es idealmente igual al número de componentes químicos que producen señales medibles.

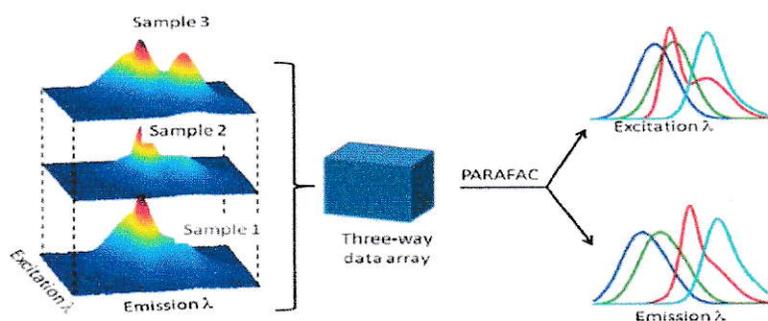
$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde;  $a_{in}$  = concentración relativa (conocido como “score”) de un constituyente dado  $n$  en la muestra  $i$ -ésima

$b_{jn}$  y  $c_{kn}$  = intensidades en los dos modos fundamentales  $j$  y  $k$ , respectivamente (conocidos como “loadings”)

$e_{ijk}$  = error relativo.

En general, los “loadings” se normalizan a unidad de longitud, y se recogen en las matrices  $B$  y  $C$ , de tamaño  $J \times N$  y  $K \times N$ , respectivamente y los “scores” se recogen en una matriz de puntuación  $A$  (Escandar y col, 2014) (Figura 13).



**Figura 13.** Representación esquemática de la operación PARAFAC, que construye una matriz de datos de tres vías con las diferentes matrices de datos, y luego se descompone la matriz en “loadings” (espectros de fluorescencia de excitación y de emisión en función de la longitud de onda, correspondientes a las matrices  $B$  y  $C$ ). También se producen “Scores”, que contiene información relativa a las concentraciones de constituyentes (Escandar y colo, 2014).

## 1.2.6 Parámetros analíticos.

### 1.2.6.1 Linealidad.

Es la capacidad de un método analítico para obtener resultados proporcionales a la concentración de analito. Para evaluarla se construye una curva de calibración utilizando UD (unidades de derivada), en función de las concentraciones. Se aplica regresión lineal utilizando el método de mínimos cuadrados. Con ello, se obtiene el coeficiente de correlación, el cual provee una medida de cómo dos variables aleatorias están asociadas. Entre más cercano sea  $R^2$  a 1, mayor es el ajuste de los datos experimentales.

### 1.2.6.2 Sensibilidad.

Capacidad de un método analítico para discriminar entre concentraciones semejantes del analito en la muestra o capacidad para poder detectar o determinar pequeñas concentraciones del analito en la muestra. Se determina como la pendiente de la curva de calibración.

### 1.2.6.3 Desviación estándar de los blancos.

Mide la variabilidad, que consiste en la cantidad promedio en que cada uno de los valores individuales varía respecto a la medida del conjunto de datos. A mayor desviación estándar, mayor es la variabilidad.

### 1.2.6.4 Precisión (DER).

Grado de concordancia entre datos que se han obtenido a partir de mediciones replicadas en condiciones específicas e indica la medida del error aleatorio, o indeterminado, de un análisis.

Las dos medidas de precisión más comunes son repetibilidad y reproducibilidad. La repetibilidad se relaciona con la proximidad de las mediciones para una misma especie, sin variar las condiciones de medición, en un mismo día. La reproducibilidad, en cambio, se refiere a la variabilidad de los resultados cuando se miden muestras en diferentes días con distintos operadores o equipos. Generalmente en Química Analítica la repetibilidad se expresa como desviación estándar relativa (DER), relacionando el grado de concordancia entre los datos obtenidos en una serie de mediciones. Se obtiene a partir de la ecuación 4

$$DER = \left(\frac{\sigma}{p}\right) * 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde;  $\sigma$  = desviación estándar de la muestra.

$p$  = promedio de la muestra.

#### 1.2.6.5 Límite de detección (LD).

Es la mínima concentración o mínima masa de analito que se puede detectar para un nivel de confianza dado. Depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal.

Al aproximarse al LD la señal analítica y su desviación estándar se aproximan a la señal del blanco y a su desviación estándar.

$$\text{Límite de detección (LD)} = 3,3 \frac{\sigma}{S} \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde;  $\sigma$  = desviación estándar del blanco.

$S$  = pendiente de la curva de calibración.

#### 1.2.6.6 Límite de cuantificación (LC).

Corresponde a la concentración más baja de analito presente en una muestra que se puede determinar con una precisión aceptable, en las condiciones experimentales de trabajo.

$$\text{Límite de cuantificación (LC)} = 10 \frac{\sigma}{S} \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde;  $\sigma$  = desviación estándar del blanco.

S = pendiente de la curva de calibración.

#### 1.2.6.7 Exactitud.

Es la cercanía entre un valor real y el resultado de una medición. Mientras más cercano sean estos valores más exacto será el método.

El criterio utilizado para evaluar la exactitud es el porcentaje de recuperación.

$$\% \text{ de recuperación} = \left( \frac{X_i}{X_0} \right) * 100 \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde;  $X_i$  = valor experimental.

$X_0$  = valor de referencia.

### 1.3 Hipótesis.

Mediante un sistema optimizado de extracción por sorción en disco rotatorio (RDSE) sería posible la extracción y determinación de OXO y FLU en la fase sólida mediante espectrofluorimetría obteniendo las matrices de excitación-emisión (FEEM) que podrían ser descompuestas mediante Análisis Factorial Paralelo (PARAFAC).

### 1.4 Objetivo General.

Desarrollar e implementar un método analítico para la determinación de OXO y FLU, mediante el uso de RDSE para la extracción de estos antibióticos y su determinación directa en el disco, mediante espectrofluorimetría para luego ser analizados mediante PARAFAC.

### 1.5 Objetivos específicos.

- a) Elaborar un soporte para ser utilizado en el espectrofotómetro de fluorescencia.
- b) Determinar la longitud de onda de excitación adecuada para una mejor determinación de los antibióticos.
- c) Optimizar los “slit” de excitación y emisión.
- d) Determinar el extractante óptimo para la extracción de los antibióticos en estudio.
- e) Determinar el tiempo de agitación adecuado para una máxima extracción.
- f) Determinar la fuerza iónica adecuada para la extracción.
- g) Optimizar las variables que afectan el proceso de extracción con RDSE, para obtener una mayor eficiencia en el método.
- h) Separar espectralmente y cuantificar OXO y FLU mediante PARAFAC.
- i) Aplicar el método a muestras fortificadas de agua potable.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 Materiales.

#### 2.1.1 Fungibles

- Matraz de aforo de 10 mL.
- Matraz de aforo de 25 mL.
- Matraz de aforo de 50 mL
- Matraz de aforo de 1 L.
- Micropipeta 100-1000  $\mu$ L, Brand.
- Micropipeta 10-100  $\mu$ L, Brand.
- Micropipeta 1-10 mL, Brand.
- Espátulas.
- Cronómetro digital.
- Viales de 25 mL.
- Vasos de precipitado 100 mL.
- Placas Petri.
- Agitadores magnéticos HANNA HI.
- Celdas de policarbonato.
- Pipeta aforada 20 mL, Hirschmann EM.
- Membrana de nylon, diámetro 10 mm, tamaño de poro 0,2  $\mu$ m.

#### 2.1.2 Aparatos e instrumentos.

- Balanza Analítica, Sartorius GMBH, Gottinnhen tipo R-200D.
- Vortex Mixer KMC-1300V. Vision Scientific CO. HD.
- Espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2700.
- Agitador magnético, Bibby.
- Baño de ultrasonido, Branson 2210.

### 2.1.3 Reactivos.

- Metanol Merck p.a.
- Flumequina (FLU) Sigma-Aldrich p.a.
- Ácido Oxolínico (OXO) Sigma-Aldrich p.a.
- Enrofloxacin (ENRO) Sigma-Aldrich p.a.
- Ciprofloxacina (CIP) Sigma-Aldrich p.a.
- Hidróxido de sodio (NaOH) Merck p.a.
- Ácido Clorhídrico (HCL) Merck p.a.

### 2.1.4 Solución “Stock” de antibióticos.

Para las Soluciones “Stock” de FLU y OXO, se disolvió  $6,53 \pm 0,1$  mg con metanol en matraces de 25 mL, obteniendo concentraciones de  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> y  $1,0 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Para preparar las Soluciones “Stock” de trabajo de FLU y OXO, se midió distintos volúmenes (250 µL de FLU y 2500 µL de OXO) de la Solución “Stock”, lo que se diluyó en matraces de 25 mL para obtener una concentración de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> y  $1,0 \times 10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Las Soluciones “Stock” de CIP y ENRO, fueron de concentración  $3 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>. A partir de esta concentración se prepararon las Soluciones “Stock” de trabajo de estos antibióticos, tomando distintos volúmenes (827 µL de CIP y 899 µL de ENRO) de la Solución “Stock”, lo que se diluyó en matraces de 25 mL para obtener una concentración de  $1,0 \times 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup> para cada antibiótico.

Las soluciones obtenidas de los cuatro antibióticos se guardaron en viales de 20 mL.

## 2.2 Métodos.

### 2.2.1 Diseño del soporte para fluorimetría.

Se diseñó un soporte (Figura 14) para realizar una medición directa de la fase sorbente, de forma que ésta estuviera en  $45^\circ$  en relación con la entrada del haz de luz. En el soporte se hizo una perforación de tal manera que se pudiera introducir el disco de teflón con la fase de nylon adherida a una de sus caras y así poder llevar a cabo la medición. Para adherir la membrana de nylon al disco se utilizó cinta adhesiva doble faz.

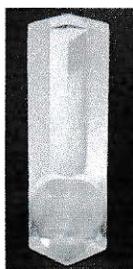


Figura 14. Soporte fabricado para la realización de este trabajo.

### 2.2.2 Selección de la longitud de onda de excitación y el “slit” de emisión y el “slit” de excitación.

Para este experimento se utilizó viales conteniendo el disco y 20 mL de soluciones  $4,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  y  $6,0 \times 10^{-8}$  de cada antibiótico por separado. Cada solución se agitó durante 30 min, luego se retiró el disco con la fase y se dejó reposar por 5 min en placas Petri. Luego se midió la fase directamente por espectrofluorimetría, realizando un barrido en el rango de longitud de onda de excitación de 220,0 nm a 800,0 nm con intervalos de 50,0 nm. Se repitió el barrido acotándolo entre 250,0 nm y 300,0 nm a intervalos de 10,0 nm. Una vez seleccionada la longitud de onda de excitación se

varió el “slit” de emisión y el “slit” de excitación, con las opciones que entrega el equipo (2,5 - 2,5; 2,5 – 10; 2,5 – 20; 5 – 5; 5 – 10; 10 – 10).

### **2.2.3 Estudio de la influencia del medio extractante.**

Se preparó una un set de concentraciones de  $1 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> y  $8 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> de ambos antibióticos en MeOH utilizando viales de 20 mL (cada concentración por triplicado). Para obtener una solución de medio ácido se añadió 15 µL de HCl 1 M, se agregó el disco con una fase, cada solución con una fase nueva, y se agitó durante 30 min. Pasado este tiempo se retiró el disco de la solución y se dejó reposar en una placa Petri por 5 min y se midió la fase directamente mediante espectrofluorimetría.

Es necesario destacar que se realizaron dos curvas por separado para cada antibiótico, una con todas las concentraciones en solución de MeOH y otra curva con todas las concentraciones en solución de MeOH + HCl.

Paralelo a la realización de cada curva se preparó un blanco para cada solución, que corresponde a una solución con las mismas características de cada curva pero sin agregar el antibiótico.

### **2.2.4 Variación de tiempo de extracción.**

Se preparó un set de 9 muestras tanto para FLU como para OXO, en diferentes viales de 20 mL, de una concentración  $6 \times 10^{-8}$  M en MeOH, a las que se le agregó un disco con una fase adherida en una de sus caras (en cada caso una fase nueva). Realizado esto, cada solución se agitó por un tiempo determinado entre 0 min y 40 min, con intervalos de 5 min. Pasado el tiempo requerido, cada disco fue extraído de la

solución y se colocó en placas Petri durante 5 min para que la fase se secase y luego se midió directamente por espectrofluorimetría.

### **2.2.5 Estudio de temperatura.**

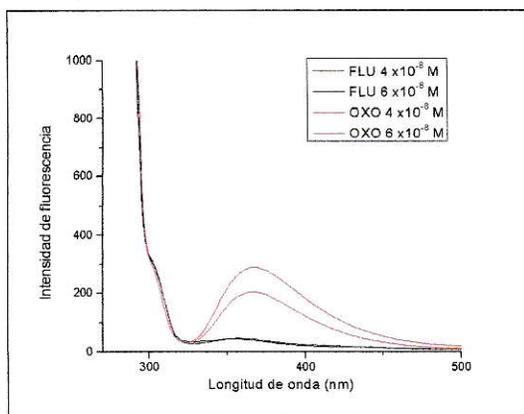
Se preparó la solución de concentración  $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  para FLU y para OXO, separadamente, en viales de 20 mL. Las temperaturas de utilizadas se variaron entre; temperatura ambiente (20 - 25 °C), 30°C, 50°C y 70°C. Cada muestra se agitó durante 30 min. Terminado ese tiempo se midió la fase directamente mediante espectrofluorimetría.

### **2.2.6 Estudio de fuerza iónica.**

Se realizó una curva de calibración utilizando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y KCl por separado, para OXO y FLU, respectivamente. Se probó agregando la sal sólida y en solución por separado. En ambos casos se utilizó concentraciones entre 0,1 y 0,6  $\text{mol L}^{-1}$  de cada sal.

### **2.2.7 Curvas de calibración de OXO y FLU.**

Se midió distintas alícuotas de las soluciones “stock” de trabajo, diluyéndolas en matraces de 25 mL con MeOH, con el fin de obtener concentraciones adecuadas (entre  $1,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  y  $8,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) para la realización de las respectivas curvas de calibración. Se colocaron en viales a los que se les agregó el disco con la fase adherida y se agitó por 30 min. Luego se retiró el disco y se dejó reposar en una placa Petri por 5 minutos y se midió la fase directamente por espectrofluorimetría.



**Figura 16.** Espectros de fluorescencia de FLU y OXO en solución de MeOH.

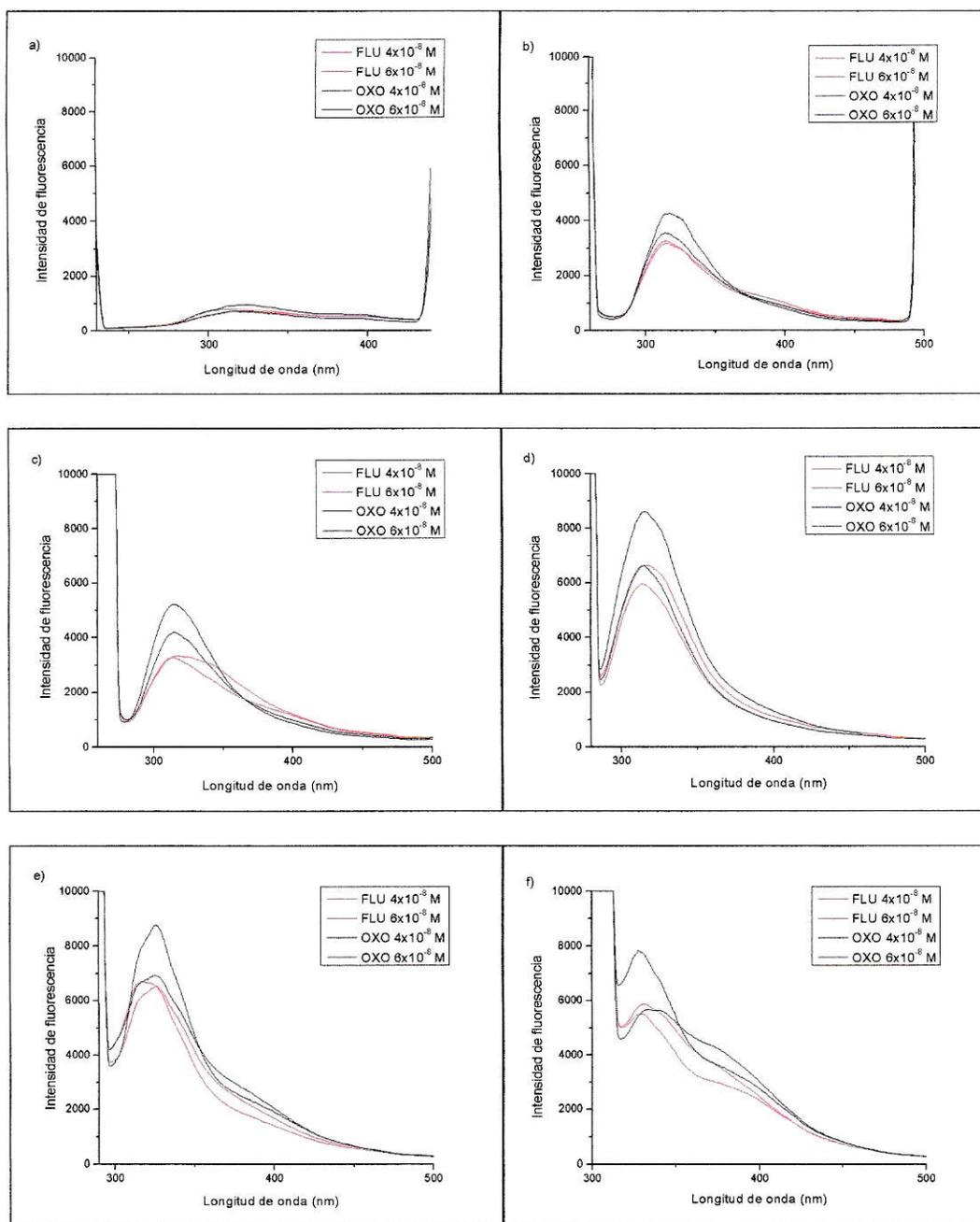
Se observa que OXO presenta una mayor intensidad de fluorescencia, donde el máximo se encuentra a 370,0 nm aproximadamente, mientras que FLU presenta un máximo de menor intensidad de fluorescencia cercano a 350,0 nm. Es por esto que se postula que es posible la determinación de ambos antibióticos mediante la extracción por disco rotatorio y su separación y determinación mediante PARAFAC.

### **3.2 Selección de las variables de fluorescencia de FLU y OXO en membranas de nylon utilizadas en soluciones metanólicas.**

Para determinar la longitud de onda de excitación y el “slit” de excitación-emisión se midió la membrana de nylon, conteniendo el analito, directamente por espectrofluorimetría.

#### **3.2.1 Selección de la longitud de onda de excitación.**

En la Figura 17 se muestran algunos espectros de emisión obtenidos luego de acotar el rango de longitud de onda de excitación entre 250,0 nm y 300,0 nm.



**Figura 17.** Espectros de emisión a distintas longitudes de onda de excitación evaluadas a a) 220 nm, b) 250 nm, c) 260 nm, d) 270 nm, e) 280 nm y f) 300 nm.

En primer lugar, se descartó la  $\lambda_{exc}$  220,0 nm (Figura 17a), ya que la intensidad de fluorescencia es muy baja, por lo que no se observan claramente los espectros de

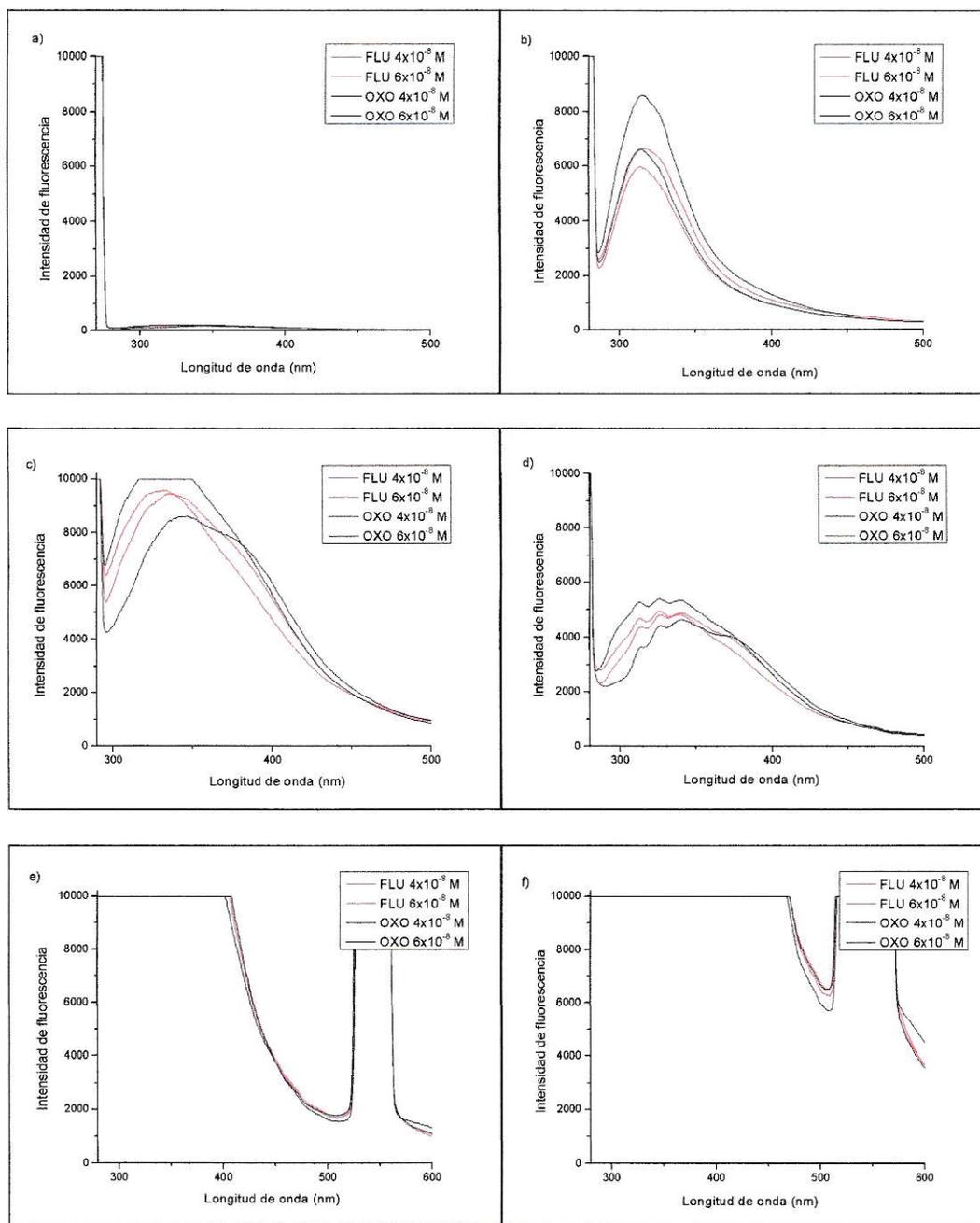
cada antibiótico. En cuanto a la  $\lambda_{exc}$  250,0 nm (Figura 17b) las dos concentraciones de FLU no se distinguen una de la otra, por lo que también fue descartado. Por otro lado en las  $\lambda_{exc}$  260,0 nm y 280,0 nm (Figura 17c y 17e) los espectros de FLU tienden a variar en su forma, haciendo difícil la detección de la concentración correspondiente. Por último la  $\lambda_{exc}$  300,0 nm las señales son muy cercanas a la banda de excitación.

Por todo lo anterior se seleccionó la  $\lambda_{exc}$  270,0 nm (Figura 7d), ya que a dicha longitud de onda de excitación se observa que ambos antibióticos tienen espectros bien definidos y con una mayor intensidad de fluorescencia.

### 3.2.2 Selección de “slit” de excitación y “slit” de emisión.

En relación al “slit” de emisión y “slit” de excitación (Figura 18), inmediatamente se descartó el “slit” 5-20 nm (Figura 18e) y “slit” 10-10 nm (Figura 18f), debido a que la intensidad de fluorescencia es mayor que la que muestra el equipo, es por eso que se observa una línea continua en la parte superior a la altura de IF = 10000. En segundo lugar se descartó el “slit” 2.5-2.5 nm (Figura 18a), ya que la señal obtenida es muy pequeña, por lo que no se alcanzan a distinguir las señales de FLU y OXO.

En cuanto al “slit” 2.5-20 nm (Figura 18c) se descartó debido a que una concentración supera la máxima intensidad de fluorescencia que permite el equipo, por lo que a mayores concentraciones no sería posible su determinación y el “slit” 5-5 nm (Figura 18d) tiene presencia de ruido, por lo que también fue descartado, en estos dos últimos “slit” se observa un corrimiento hacia la izquierda en la señal de acuerdo a la concentración.



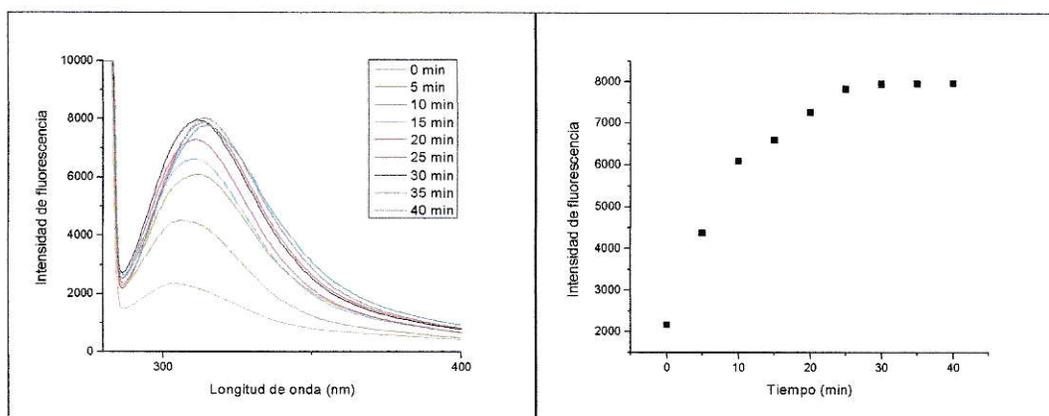
**Figura 18.** Espectros de los distintos “slit” de excitación-emisión estudiados a) 2.5-2.5 nm, b) 2.5-10 nm, c) 2.5-20 nm, d) 5-5 nm, e) 5-10 nm y f) 10-10 nm.

Debido a lo anterior y a que las señales de ambos antibióticos son bien definidas se seleccionó “slit” 2.5-10 (Figura 18b).

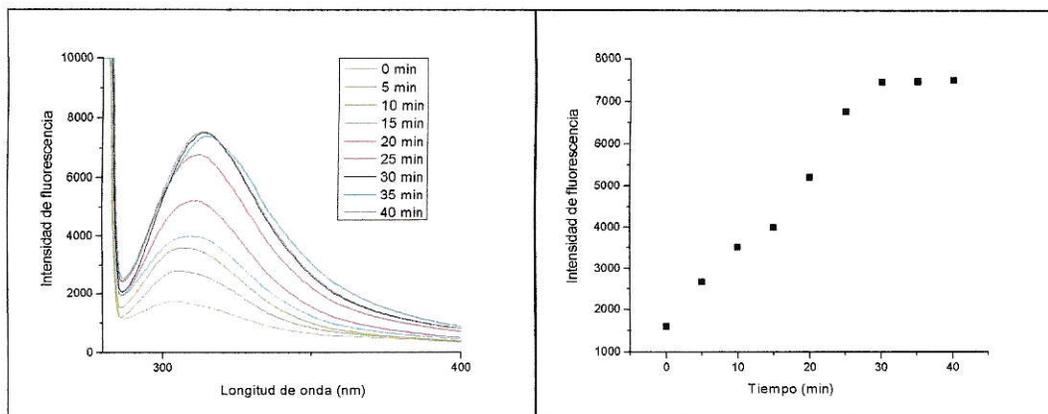
Al comparar los espectros de fluorescencia de cada antibiótico en solución (Figura 16) con los espectros obtenidos al medir la fase de nylon a la longitud de onda de excitación 270,0 nm y “slit” 2,5-10 nm (Figura 18b) se observa que en este último no hay una diferencia entre las señales de OXO y FLU, lo que si ocurre en los espectros en solución. Esto sugiere una posible interacción entre la membrana de nylon y cada antibiótico, provocando que la señal obtenida por fluorimetría sea similar para cada uno.

### 3.2.3 Efecto del tiempo de extracción de OXO y FLU en una solución de MeOH extraídos en una membrana de nylon.

En las Figuras 19 y 20 es posible apreciar que el tiempo de extracción tiene una estrecha relación con la concentración del antibiótico absorbida por la fase, mientras mayor es el tiempo, mayor es la cantidad sorbida. Entre los 25 min y 40 min se puede observar que no hay un aumento de la concentración sorbida y se llega a un equilibrio entre la solución madre y la fase sorbente (zona de equilibrio del sistema).



**Figura 19.** Estudio del tiempo de extracción de OXO, concentración  $6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

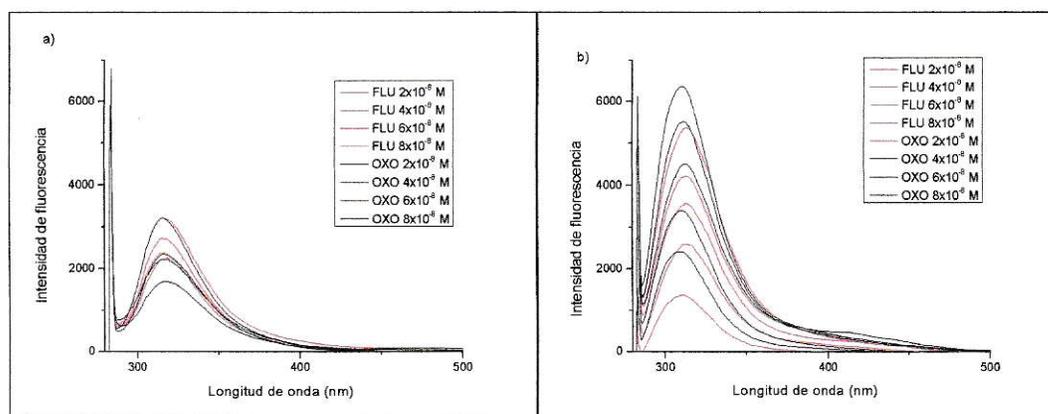


**Figura 20.** Estudio del tiempo de extracción de FLU, concentración  $6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

Se seleccionó 30 min de agitación para estudios posteriores, para así asegurar estar trabajando en la zona de equilibrio.

### 3.2.4 Influencia del medio extractante.

Los resultados de agregar HCl a la solución metanólica se presentan en los espectros de fluorescencia de la Figura 21, luego se restar el blanco correspondiente.



**Figura 21.** Espectros de fluorescencia del estudio del medio a) MeOH, b) MeOH + HCl.

Los espectros obtenidos con la extracción MeOH + HCl (Figura 21b), muestran una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con la utilización de solo MeOH (Figura 21a) en el cual la intensidad de fluorescencia alcanzada es baja y las señales no

presentan correlación en cuanto a la concentración. La principal diferencia entre ambos medios es que las especies a pH ácido se encuentran protonadas en el N del anillo

### 3.2.5 Estudio del efecto de la temperatura en la extracción.

Los resultados obtenidos indican que no existe un cambio significativo en la señal de los antibióticos absorbidos a 30 °C o a 50 °C.

### 3.2.6 Estudio del efecto de la fuerza iónica de la solución.

Se utilizaron dos sales ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y  $\text{KCl}$ ) para analizar el efecto de la fuerza iónica con los distintos antibióticos. Esto no se concretó, ya que las sales son insolubles en metanol (solvente utilizado en las soluciones).

Sobre la base de los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 1 las condiciones óptimas de trabajo.

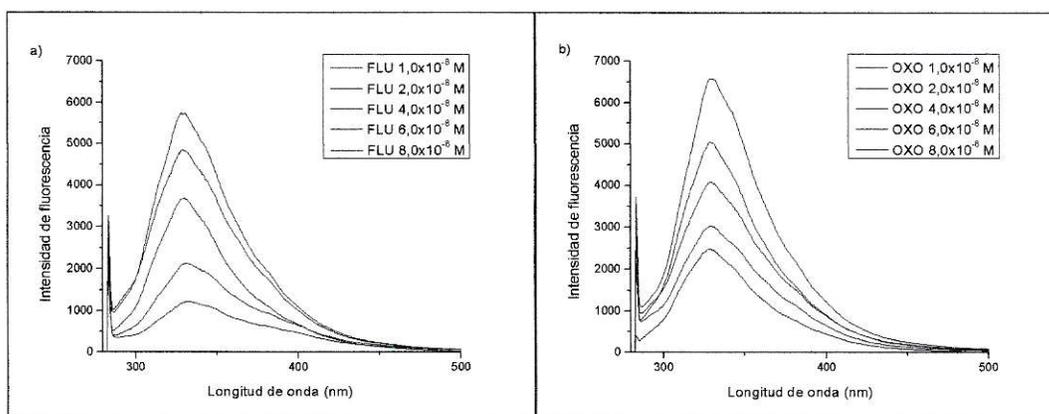
**Tabla 1.** Resumen de condiciones óptimas tanto químicas como de fluorescencia.

Variable	Valor óptimo
Longitud de onda de excitación (nm)	270,0
"slit" de excitación (nm)	2.5
"slit" de emisión (nm)	10
Tiempo de extracción (min)	30
Extractante	MeOH + HCl
Temperatura (°C)	~25

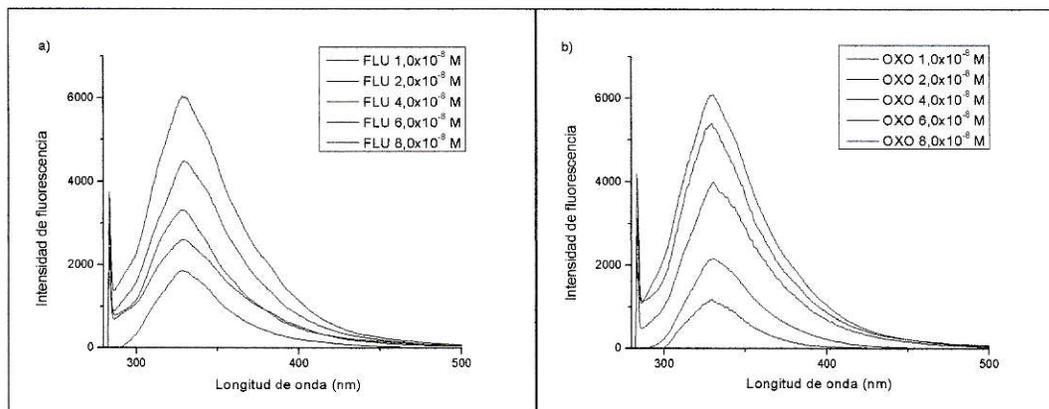
Una vez obtenidas las variables químicas e instrumentales óptimas de trabajo, se aplicó el método a muestras fortificadas de agua destilada y potable.

### 3.2.7 Muestras en agua en MeOH a pH 2.

Los experimentos con muestras en agua destilada y agua potable se realizaron a temperatura ambiente, en las condiciones optimizadas seleccionadas previamente. Para cada antibiótico se midió la fluorescencia por separado (Figura 22 y 23) y se observan leves diferencias en las intensidades obtenidas.



**Figura 22.** Espectros de fluorescencia de a) FLU y b) OXO, en muestras de agua destilada.



**Figura 23.** Espectros de fluorescencia de a) FLU y b) OXO, en muestras de agua potable.

A partir del método realizado se pudo determinar que ambos antibióticos son sorbidos por la fase de nylon, obteniéndose porcentajes de recuperación entre 60 % y 110 % para FLU, 90 % y 105 % para OXO.

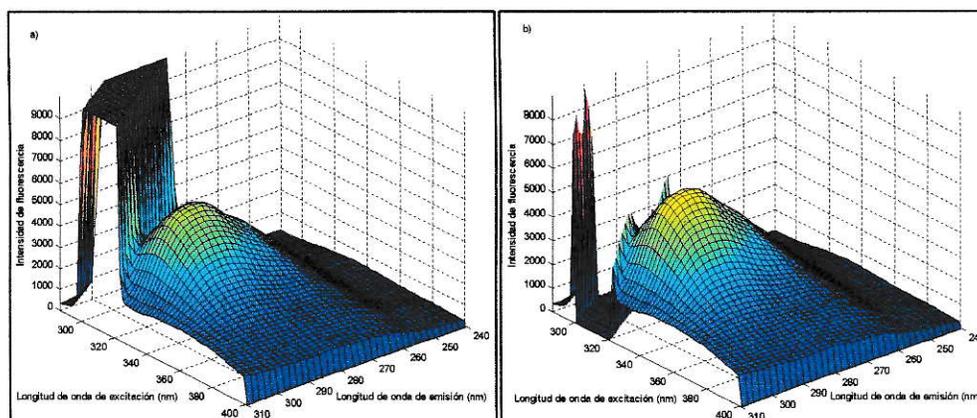
### 3.2.8 Análisis Factorial Paralelo (PARAFAC).

Inicialmente se calibra con un set de combinaciones de concentraciones de cada antibiótico (Tabla 2) en agua destilada en MeOH a pH 2. Esta calibración se utilizará para muestras que se quieran predecir tanto en agua destilada como en agua potable, en ambos casos en una mezcla en MeOH a pH 2 y fortificadas con OXO y FLU simultáneamente.

**Tabla 2.** Concentraciones utilizadas en la preparación de soluciones en agua destilada y potable, fortificadas con FLU y OXO simultáneamente.

Número de experimento	Concentración de FLU (ppb)	Concentración de OXO (ppb)
1	0	0
2	1,5	1,5
3	1,5	10
4	5	5
5	10	1,5
6	10	10

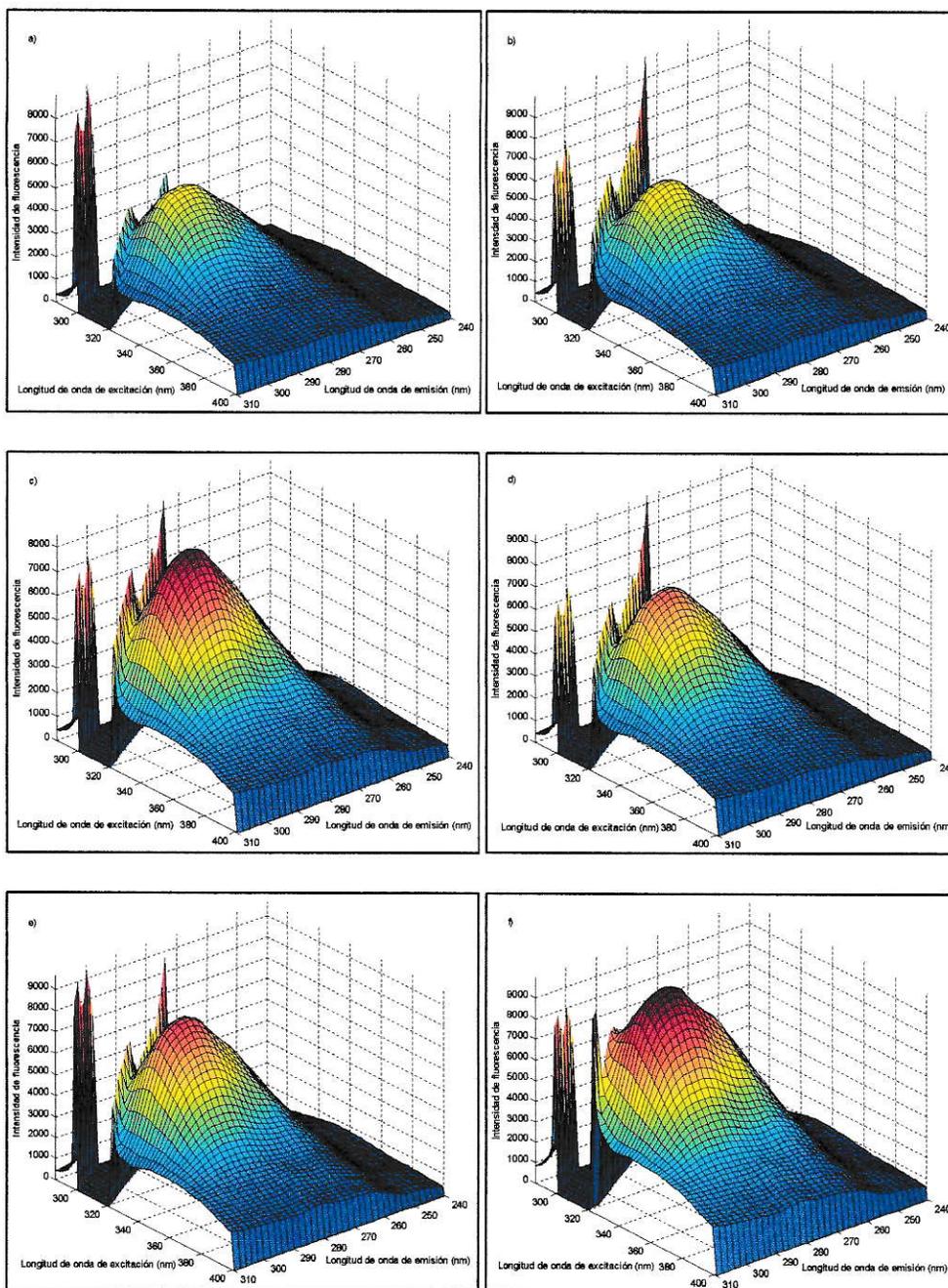
En las matrices de excitación y emisión obtenidas se encontró la presencia de la dispersión de “Rayleigh”, que corresponde a una señal de alta intensidad de fluorescencia que aparece 44 nanómetros antes de la intensidad de fluorescencia máxima del fármaco. Para poder trabajar sin la interferencia de éste, se sustituyeron los valores de la dispersión de “Rayleigh” por ceros o por los llamados valores perdidos, como lo muestra la Figura 24.



**Figura 24.** Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación-emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con solución de agua destilada, MeOH y pH 2, a) con “Rayleigh” y b) llevándolo a 0.

### 3.2.8.1 Agua destilada en MeOH a pH 2.

En primer lugar se trabajó con muestras de agua destilada en MeOH a pH 2, fortificadas con OXO y FLU. Se realizaron las mediciones por separado de cada mezcla de los antibióticos. Una vez obtenidos los FEEM se sustituyeron los valores de la dispersión de “Rayleigh” por ceros en todas las matrices y luego se pasaron a PARAFAC para obtener los gráficos tridimensionales (Figura 25).



**Figura 25.** Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación-emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con muestras de agua destilada en MeOH y pH 2, con las distintas calibraciones de la tabla 2 a) Exp1, b) Exp2, c) Exp3, d) Exp4, e) Exp5 y f) Exp6.

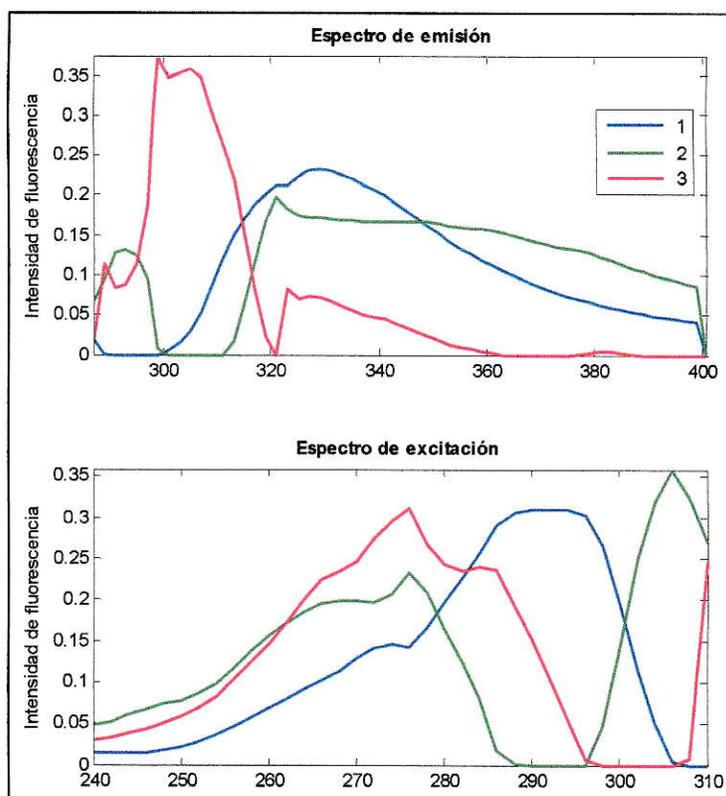
Para predecir la concentración y dar cuenta de los espectros, se seleccionó la cantidad de componentes. Al haber dos antibióticos en la muestra es necesario que la cantidad de componentes sea mayor a dos, ya que pudiese existir la presencia de algún interferente, por lo que se predijo la muestra con tres componentes.

Para verificar si el modelo está dando resultados correctos, es necesario poner atención en tres parámetros que caracterizan la confianza en el ajuste al modelo:

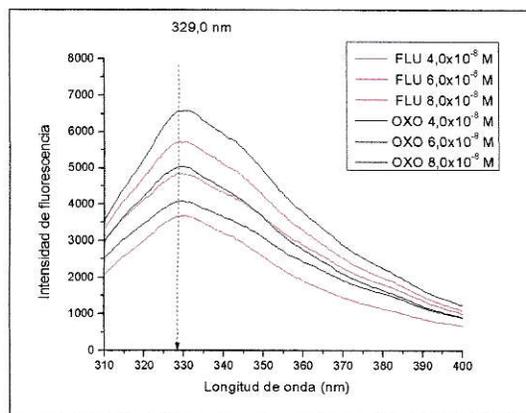
- los espectros de emisión y de excitación.
- la consistencia del núcleo y el residuo asociado.
- la concentración determinada por el programa.

Para la verificación se seleccionó la muestra de agua destilada en MeOH a pH 2, fortificadas con 5 ppb de OXO y 5 ppb de FLU (Exp. 4, Figura 25d).

**a) Espectros de emisión y excitación:** Los espectros de emisión y excitación (Figura 26) obtenidos presentan tres posibles componentes en la muestra, donde 1 y 2 (azul y verde) deberían corresponder a FLU u OXO, y el componente 3 podría ser una señal arrojada por la membrana de nylon.



**Figura 26.** Espectros de emisión y excitación correspondientes a la muestra Test en agua destilada con MeOH a pH 2.



**Figura 27.** Espectros de fluorescencia de FLU y OXO en muestras de agua destilada con MeOH a pH 2.

Si comparamos los espectros de emisión obtenidos por PARAFAC (Figura 26) con los espectros de emisión de cada antibiótico obtenidos separadamente en la membrana de nylon (Figura 27), donde el máximo corresponde a 329,0 nm, se observa un leve parecido con el componente 1 (color azul, Figura 26), pero en relación al componente 2 (color verde, Figura 26) no se observa ninguno parecido.

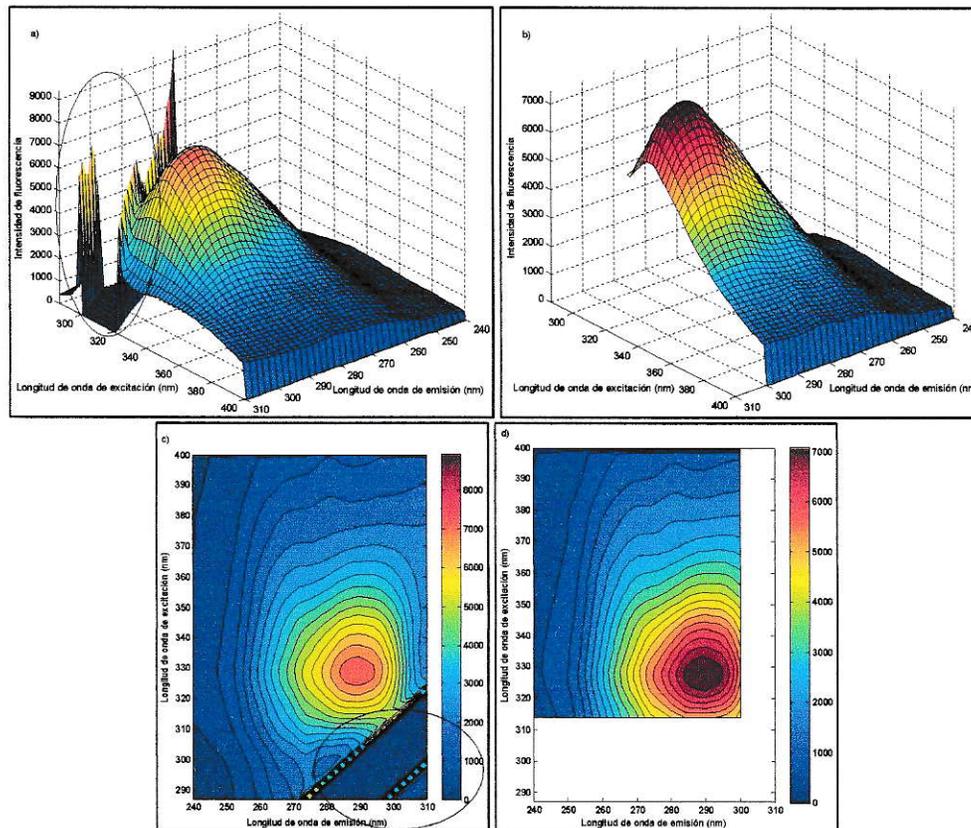
En la Figura 27 es posible observar que ambos antibióticos tienen espectros similares, por lo que el máximo corresponde a una misma longitud de onda para los dos antibióticos. Se observa una leve diferencia en las intensidades de fluorescencia de cada antibiótico, donde el que presenta una mayor intensidad en dos de las tres concentraciones es OXO, con la mayor concentración  $8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  alcanzando intensidades de fluorescencia de 6500, en comparación a FLU que en esa misma concentración alcanza intensidades de 5500. Por otro lado se puede observar que en ambos antibióticos se presenta una intensidad de fluorescencia similar correspondiente a la concentración  $6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ .

**b) Consistencia del núcleo y residuo asociado:** Al realizar la predicción en PARAFAC con tres componentes se obtuvo una consistencia del núcleo de 0,627 y un residuo asociado de  $6,6 \times 10^2$ .

En cuanto a la consistencia del núcleo, se observa que es muy baja. Para un buen trabajo ésta debe ser mayor de 50 e idealmente cercano a 100. Por otro lado el residuo es muy grande, y mientras menor sea el residuo mejor es la predicción.

Como los espectros no coinciden y los residuos son altos no se predijo las concentraciones de cada antibiótico.

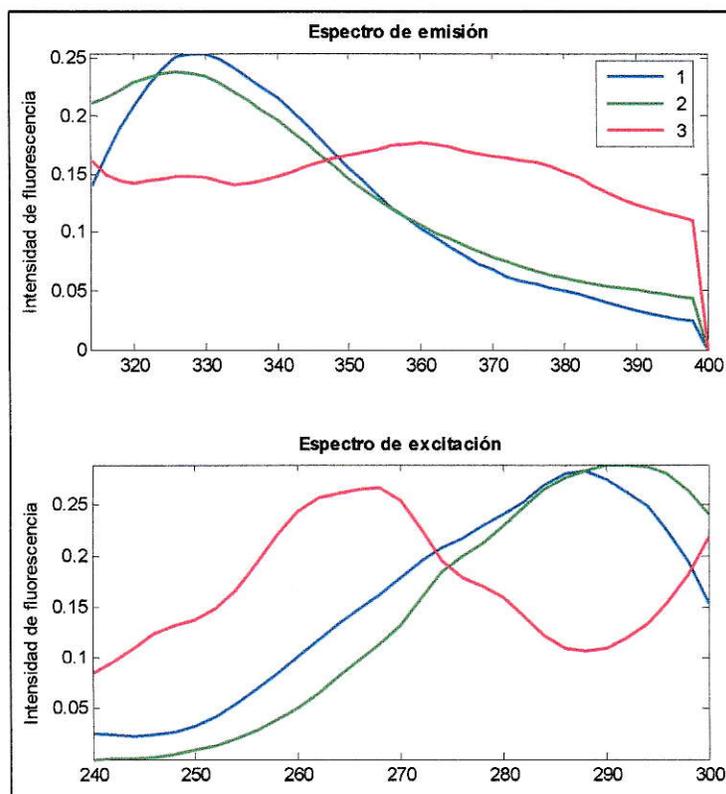
En el análisis realizado anteriormente se utilizó matrices completas, es decir, incluyendo la dispersión “Rayleigh” de cada medición, y aunque se eliminó sustituyendo los valores de esta dispersión por ceros, puede que aun así este interfiriendo. Es por esto que se acotó el rango del espectro (Figura 28). Entre 314,0 y 400,0 nm cada 2 nm para la excitación y 240,0 y 300,0 nm cada 2 nm para la emisión.



**Figura 28.** Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación-emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con agua destilada con MeOH a pH 2 con concentraciones de 5 ppb de FLU y 5 ppb de OXO a) medición normal, b) rango acotado y sus respectivos gráficos de contorno c) medición normal y d) rango acotado.

Una vez acotado el rango y suponiendo que los analitos corresponden a 2 componentes y un interferente, se realizó la predicción con tres componentes.

**a) Espectros de emisión y excitación:** En los espectros de emisión y excitación (Figura 29) se pueden asociar preliminarmente los componentes 1 y 2 (azul y verde, respectivamente) a los antibióticos en cuestión, ya que tienden a tener la misma forma (Figura 27), con una máximo en 329,0 nm en el espectro de emisión.

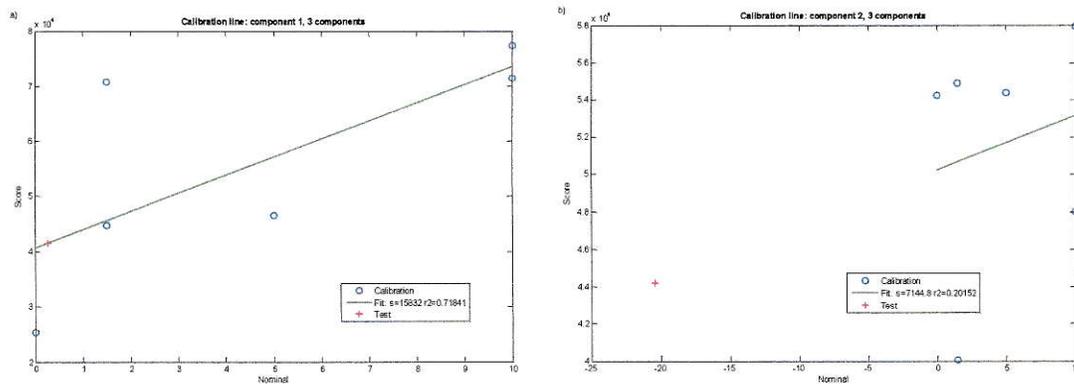


**Figura 29.** Espectros de emisión y excitación correspondientes a la muestra Test en agua destilada en MeOH a pH 2, con el rango acotado.

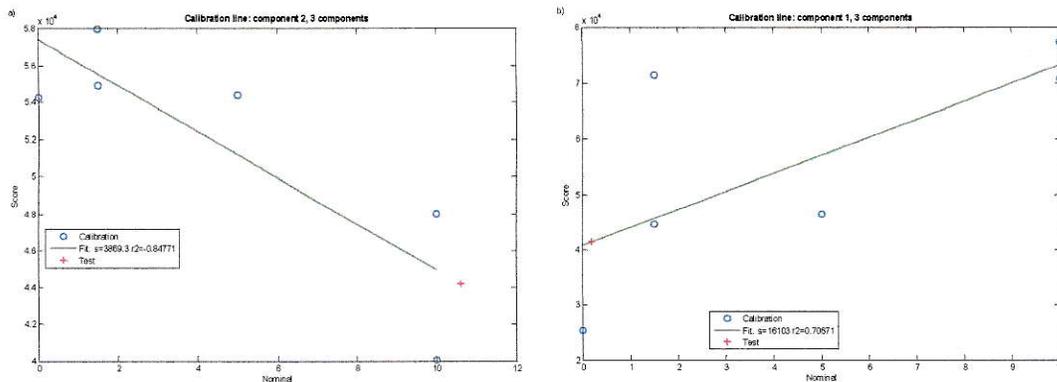
b) **Consistencia del núcleo y residuo asociado.** De la predicción realizada se obtuvo una consistencia del núcleo de -3,170, que al compararla con la predicción anterior se observa una disminución de ésta, alcanzando niveles negativos, mientras que el residuo obtenido fue de 65, siendo menor que el anterior.

Como en este caso coinciden los espectros y hay un residuo bajo, se procedió a predecir las concentraciones de cada antibiótico, probando cada uno como un componente distinto (1 o 2). Si bien existe un tercer componente no se probaron en éste porque los antibióticos deben corresponder netamente a los dos primeros, de acuerdo al espectro.

Las Figuras 30 y 31 corresponden a las predicciones univariadas obtenidas.



**Figura 30.** Predicciones pseudo-univariadas para a) FLU como componente 1 y b) OXO como componente 2.



**Figura 31.** Predicciones pseudo-univariadas para a) FLU como componente 2 y b) OXO como componente 1.

Las concentraciones asociadas a las predicciones son: 0,270 ppb para FLU (componente 1), -20,39 ppb para OXO (componente 2), y 10,63 ppb para FLU (componente 2), 0,198 ppb para OXO (componente 1).

En la primera suposición (FLU comp 1 y OXO comp 2) al mirar los gráficos se puede ver que para FLU está relativamente bien, ya que la concentración predicha se encuentra dentro de la curva, pero muy lejana de 5 ppb. En cuanto a OXO la concentración predicha esta por fuera de la curva, siendo negativa, por lo que se encuentra aún más alejada de la real.

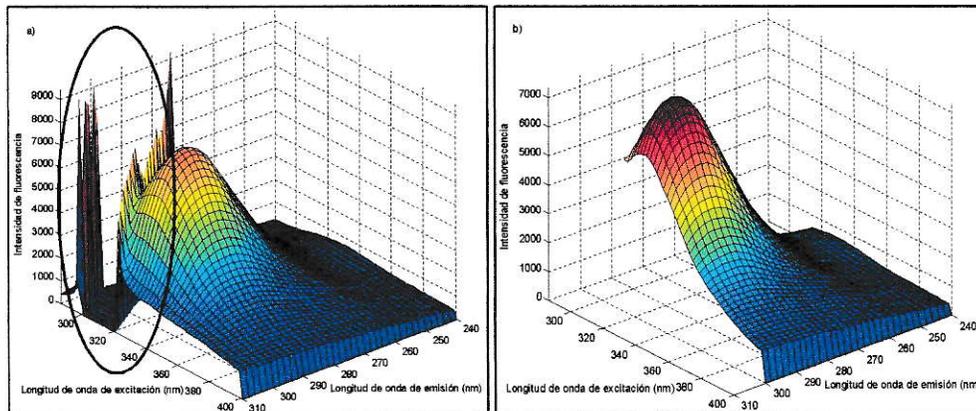
En la segunda suposición da una regresión negativa para FLU, por lo que se descarta inmediatamente (estando también fuera de la curva) y para OXO la concentración obtenida es muy inferior a la real.

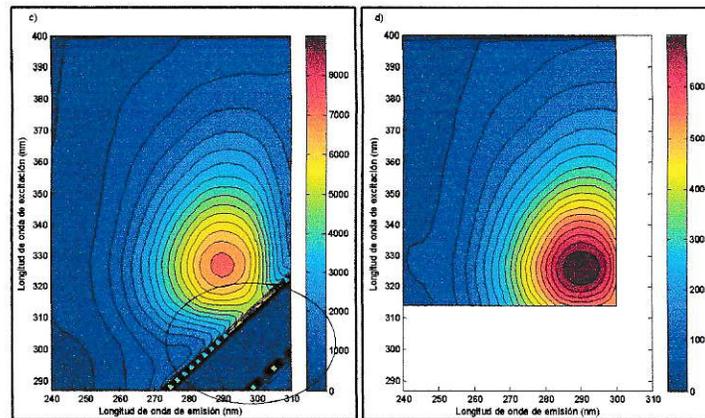
Según lo anterior ambos antibióticos actúan como componente 1, lo que no es posible, ya que cada uno de ellos debería corresponder a un componente distinto.

### 3.2.8.2 Agua potable en MeOH a pH 2.

Las muestras de agua potable en el rango completo (entre 240,0 y 310,0 nm cada 2 nm para la excitación y la entre 287,0 y 400,0 nm cada 2 nm para la emisión), arrojaron resultados similares a los de agua destilada, con inconsistencias marcadas entre los espectros obtenidos por PARAFAC y los espectros de cada antibiótico por separado (ver Anexo).

Es por esto que se hizo un segundo estudio en esta muestra, en este caso se acoto el rango de excitación y de emisión, para dejar completamente fuera la dispersión de “Rayleigh” de cada medición (Figura 32), entre 314,0 y 400,0 nm cada 2 nm para la excitación y 240,0 y 300,0 nm cada 2 nm para la emisión.

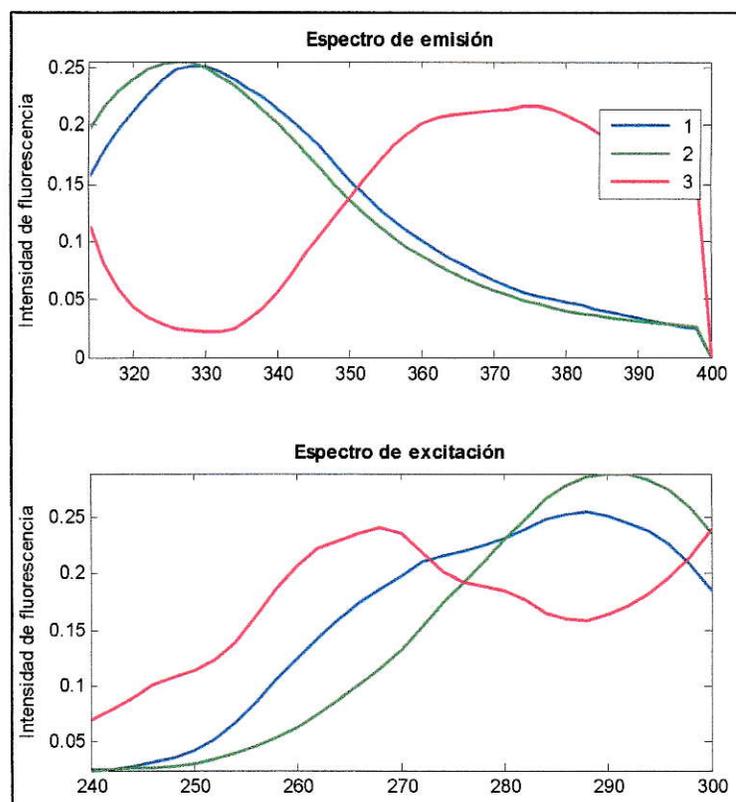




**Figura 32.** Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación-emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con agua potable en MeOH a pH 2, con concentraciones de 5 ppb de FLU y 5 ppb de OXO a) medición normal, b) rango acotado y sus respectivos gráficos de contorno c) medición normal y d) rango acotado.

Se realizó la predicción con 3 componentes obteniendo:

- a) Espectros de emisión y excitación:** Los espectros de emisión y de excitación (Figura 33) se pueden asociar preliminarmente los componentes 1 y 2 (azul y verde respectivamente) a los antibióticos en cuestión, ya que tienden a tener la misma forma de los espectro de cada antibiótico medidos anteriormente, con un máximo cercano a 329,0 nm en el espectro de emisión.

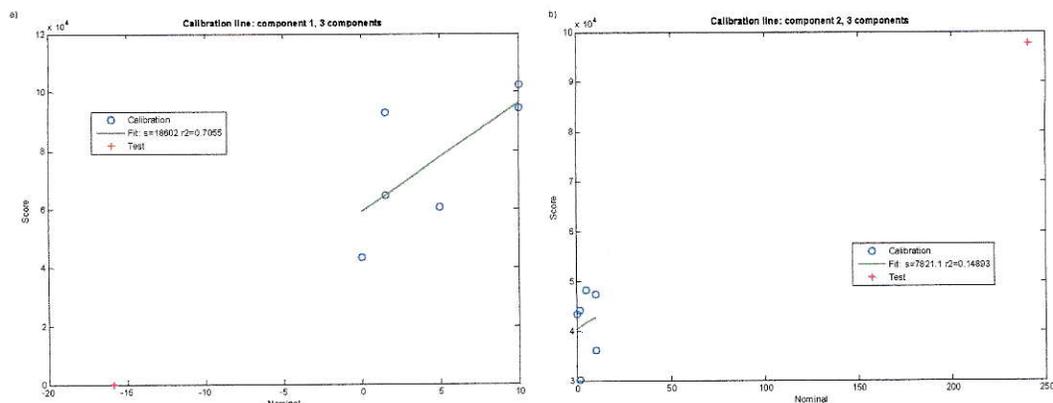


**Figura 33.** Espectros de emisión y excitación correspondientes a la muestra Test en agua potable en MeOH a pH 2, con el rango acotado.

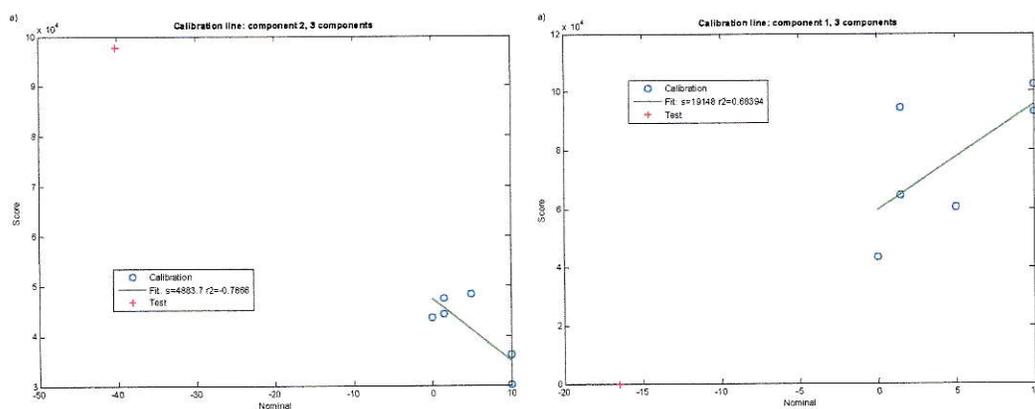
- b) Consistencia del núcleo y residuo asociado.** A partir de la predicción se obtuvo una consistencia del núcleo de -6,903 y un residuo de 73. Al comparar la consistencia del núcleo con la obtenida en la predicción con el rango completo (34,04) existe una disminución de ésta, alcanzando niveles negativos, en cuanto al residuo también existe una disminución.

Considerando que los espectros tienen cierta similitud y hay un residuo bajo, se predijo las concentraciones de cada antibiótico, se probó cada uno como un componente distinto (1 o 2). Si bien existe un tercer componente, éste se asocia a un posible interferente, que en este caso pudiese ser la membrana de nylon.

Las Figuras 34 y 35 corresponden a las predicciones univariadas obtenidas.



**Figura 34.** Predicciones pseudo-univariadas para a) FLU como componente 1 y b) OXO como componente 2.



**Figura 35.** Predicciones pseudo-univariadas para a) FLU como componente 2 y b) OXO como componente 1.

Las concentraciones asociadas a las predicciones son: 15,88 ppb para FLU (componente 1), 241,3 ppb para OXO (componente 2), y -30,35 ppb para FLU (componente 2), 16,53 ppb para OXO (componente 1).

En la primera predicción (FLU comp 1 y OXO comp 2) las concentraciones predichas están por fuera de la curva, siendo un valor negativo en el caso de FLU y muy

alto en el caso de OXO, alejándose ambos de la concentración real de cada antibiótico en la muestra.

En cuanto a la segunda predicción, ambas concentraciones también están fuera de la curva, obteniéndose concentraciones negativas para los dos antibióticos, lo que está muy lejos de la concentración real.

De acuerdo a las predicciones pseudo-univariadas ningún antibiótico correspondería a un componente. Por lo que el modelo no funcionó para la predicción en esta muestra.

Es necesario destacar que en este trabajo se presenta solo la predicción de una muestra de agua destilada y una de agua potable, ambas en MeOH a pH 2 y fortificadas con FLU y OXO, para dar a conocer lo obtenido, sin embargo se trabajó con un set completo de muestras, obteniendo resultados similares a éstos. Si bien los espectros de la predicción tienen cierta similitud con los que se tenían de cada antibiótico por separado, los otros parámetros en los que hay que tomar atención están muy lejos de lo considerado bueno para una separación y determinación óptima.

De acuerdo a lo realizado en PARAFAC la separación de FLU y OXO entre sí no es posible, debido a que los espectros de cada antibiótico tienen la misma tendencia, siendo muy similares entre sí, esto se puede observar en la Figura 27. Es por esto que este trabajo podría dar las bases para el desarrollo de un método de "Screening" para identificar estas quinolonas.

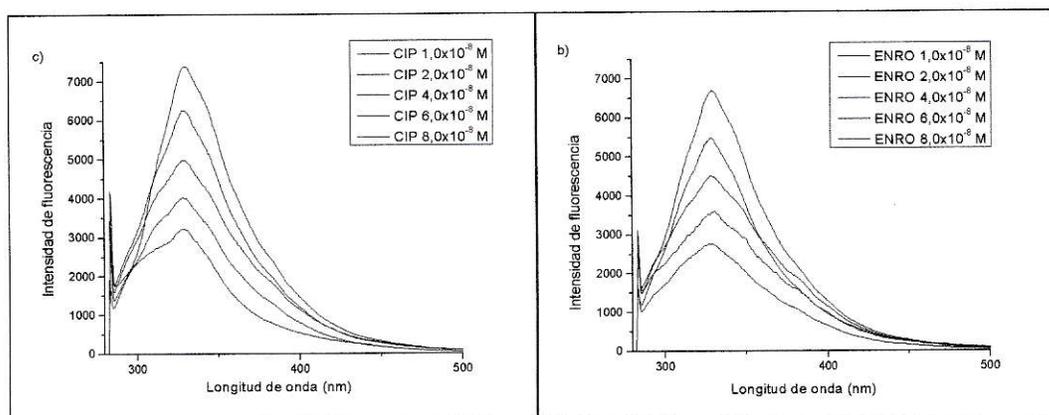
Para saber si puede servir como un método de "Screening" para quinolonas en general, se probó con otras dos quinolonas; CIP y ENRO, para ver si se comportaban de forma similar a FLU y OXO.

### 3.2.9 Muestras de agua de CIP y ENRO.

Se realizaron soluciones de agua (destilada o potable, según sea el caso) en MeOH a pH 2, como se muestra en el procedimiento 2.2.8, pero en este caso se fortificó con CIP o ENRO. Las curvas de cada antibiótico se realizaron por separado.

#### 3.2.9.1 Agua destilada en MeOH a pH 2.

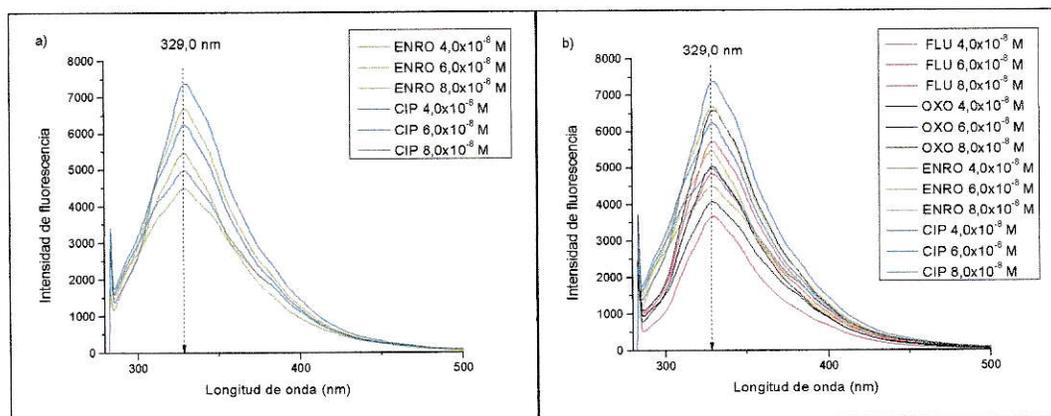
Los espectros de fluorescencia en agua destilada correspondientes a cada antibiótico (Figura 36) son similares por lo que se realizó una superposición de tres concentraciones de cada antibiótico ( $4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  y  $8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ), (Figura 37 a)



**Figura 36.** Espectros de fluorescencia de a) CIP y b) ENRO, en muestras de agua destilada en MeOH a pH 2.

Se observa que CIP presenta mayores intensidades de fluorescencia en los 3 casos. La Figura 37b muestra una superposición de las cuatro quinolonas estudiadas, donde el que presenta una mayor intensidad para las tres concentraciones es CIP con su mayor concentración  $8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  alcanzando intensidades de fluorescencia de 7390, mientras que el que presenta una menor intensidad de fluorescencia en las tres

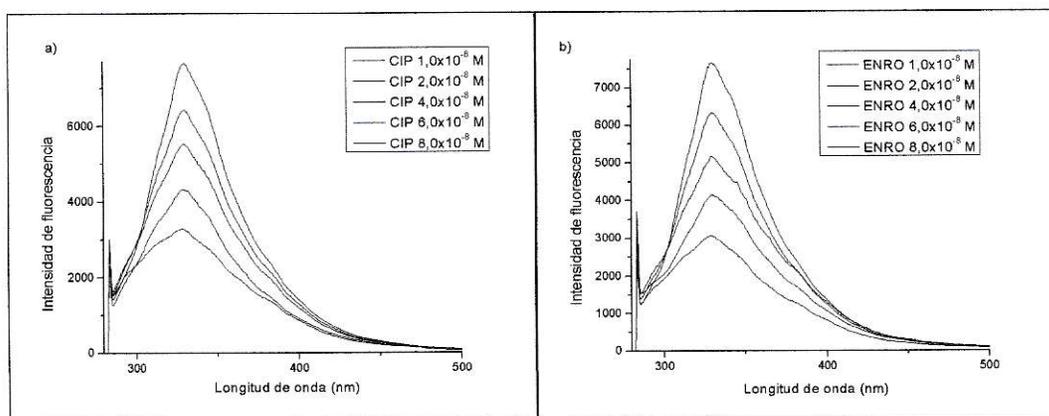
concentraciones es FLU, con su mayor concentración  $8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  alcanzando intensidades de fluorescencia de 3666.



**Figura 37.** Espectros de fluorescencia a) ENRO y CIP; b) FLU, OXO, CIP y ENRO en muestras de agua destilada en MeOH a pH 2.

### 3.2.9.2 Agua potable en MeOH a pH 2.

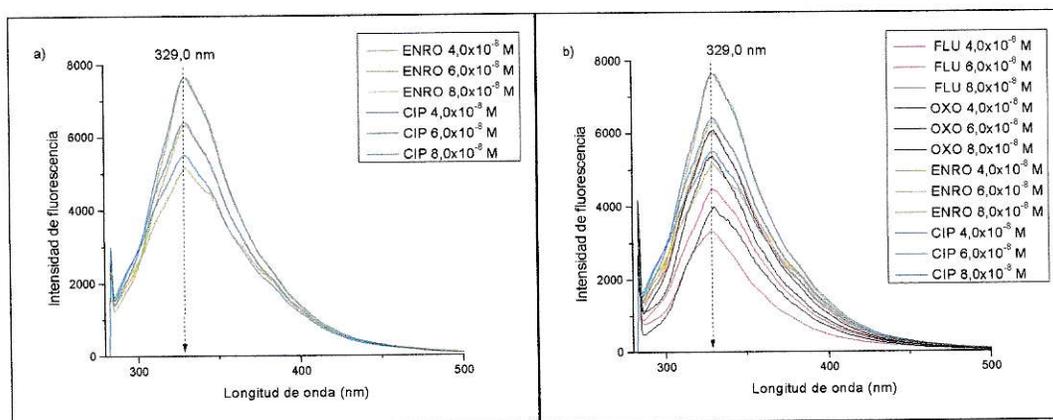
Los espectros de fluorescencia de CIP y ENRO en agua potable (Figura 38), donde se observa que la curvas de ambos antibióticos son similares..



**Figura 38.** Espectros de fluorescencia de a) CIP y b) ENRO, en muestras de agua potable en MeOH a pH 2.

La superposición de 3 concentraciones de cada uno (Figura 39a) se comparó con los espectros de FLU y OXO (Figura 39b). En la Figura 39a se observa que para ENRO

y CIP las dos concentraciones mayores ( $6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  y  $8 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ ) presentan una intensidad de fluorescencia similar, alcanzando valores cercanos a 6400 y 7600 respectivamente.



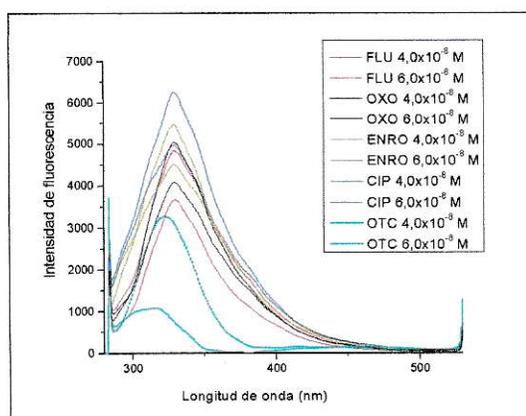
**Figura 39.** Espectros de fluorescencia de a) CIP y ENRO; b) FLU, OXO, ENRO y CIP en muestras de agua potable en MeOH a pH 2.

De acuerdo a los espectros obtenidos tanto en agua potable como en agua destilada, se observa que las cuatro quinolonas muestran la misma tendencia, con distintas intensidades de fluorescencia pero una forma similar. Esto indica que este método sirve de base para el desarrollo de un método de “Screening” para identificar quinolonas en general, extraídas por sorción en disco rotatorio utilizando membrana de nylon. Por lo que sería posible calibrar solo con uno de estos analitos para poder evaluar la presencia total de quinolonas presentes en una muestra.

Para comprobar que este método puede ser utilizado para identificar quinolonas en general, fue necesaria la medición de un antibiótico que no fuese quinolona, en las mismas condiciones anteriores. Se trabajó con oxitetraciclina (OTC), ( $4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  y  $6 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  en agua destilada). La comparación de espectros (Figura 40) obtenidos

muestra diferencias, ya que OTC tiene un corrimiento hacia la izquierda y su máximo es más bien curvo.

La mayor intensidad de fluorescencia de OTC en solución es cercana a la longitud de onda de excitación 350,0 nm, se utilizó 270,0 nm, ya que era necesaria la comparación con las quinolonas en las mismas condiciones.



**Figura 40.** Espectros de fluorescencia de FLU, OXO, ENRO, CIP y OTC en muestras de agua destilada.

#### IV. CONCLUSIONES

- Una buena medición de la intensidad de fluorescencia de la membrana de nylon con los antibióticos sorbidos utilizando disco rotatorio se logró mediante la utilización de un soporte, donde se introdujo el disco con una membrana de nylon en una de sus caras, posicionando éste  $45^\circ$  en relación al haz de luz incidente.
- Las condiciones óptimas de extracción de OXO y FLU se lograron utilizando como solvente MeOH y como método de extracción RDSE con una membrana de nylon, la longitud de onda de excitación adecuada fue de 270,0 nm y un "slit" de excitación-emisión de 2,5-10 nm.
- Se logró una mejor extracción y se obtuvieron señales bien definidas de ambos antibióticos utilizando soluciones de MeOH con 15  $\mu\text{L}$  de HCl 1 M, para entregarles a los antibióticos el medio óptimo para que se encuentren protonados y así lograr una mayor afinidad con la fase sorbente.
- Al estudiar el tiempo de extracción se llegó a la zona de equilibrio entre 25 min y 40 min, seleccionando 30 min como el tiempo adecuado para maximizar la extracción de FLU y OXO en MeOH y continuar con los estudios posteriores.

- La variación de temperatura no alteró los espectros obtenidos de la medición de las soluciones de cada antibiótico en MeOH. En cuanto a la influencia de la fuerza iónica no se pudo probar debido a la insolubilidad de las sales en este solvente. Es por esto que se trabajó a temperatura ambiente y no se utilizó fuerza iónica.
- Si bien mediante PARAFAC fue posible la separación espectral de OXO y FLU utilizando el rango acotado entre 314,0 y 400,0 nm cada 2 nm para la excitación y 240,0 y 300,0 nm cada 2 nm para la emisión, tanto en agua destilada como en agua potable ambos casos en MeOH a pH 2, los espectros obtenidos no fueron bien definidos y la predicción de las concentraciones en ambos casos estaba muy lejana de las reales de cada muestra, en algunos casos obteniéndose concentraciones negativas.
- En las condiciones señaladas anteriormente los espectros de emisión de los dos antibióticos presentan una misma forma (Figura 27), por lo que su determinación y cuantificación mediante PARAFAC no fue posible, ya que no discrimina uno del otro. Es por esto que este trabajo podría dar las bases para el desarrollo de un método de "Screening" para identificar estas quinolonas.
- Se evaluó CIP y ENRO en las mismas condiciones que FLU y OXO, con el objeto de verificar si se comportan de igual manera. Se obtuvieron espectros de emisión donde las formas son similares en los cuatro casos, teniendo un máximo en 329,0 nm en agua destilada y potable (Figura 37 b y 39 b, respectivamente), lo que

corroborar que este método sirve como base para el desarrollo de un método de "Screening" para identificar quinolonas en general, extraídas por sorción en disco rotatorio y utilizando membrana de nylon.

- Al comparar los espectros de fluorescencia de las cuatro quinolonas estudiadas con OTC, se observa que hay una diferencia en los espectros de emisión, donde OTC presenta un máximo a 322,0 nm mientras que las quinolonas tienen un máximo a 329,0 nm, por lo que es posible proyectar la posibilidad de que con PARAFAC se pudiese determinar OTC en presencia de quinolonas.

## V. REFERENCIAS

Barceló, D., y López, M. J. 2007. Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. Universidad de Sevilla. pp 1–4.

Bletsou, A. A., Jeon, J., Hollender, J., Archontaki, E., & Thomaidis, N. S. 2015. Targeted and non-targeted liquid chromatography-mass spectrometric workflows for identification of transformation products of emerging pollutants in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 66, 32–44.

Cañas, A., & Richter, P. 2012. Solid-phase microextraction using octadecyl-bonded silica immobilized on the surface of a rotating disk: determination of hexachlorobenzene in water. *Analytica Chimica Acta*, 743, 75–9.

Cañas, A., Richter, P., & Escandar, G. M. 2014. Chemometrics-assisted excitation – emission fluorescence spectroscopy on nylon-attached rotating disks . Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences. *Analytica Chimica Acta*, 852, 105-111.

Cheng, G., Hao, H., Dai, M., Liu, Z., & Yuan, Z. 2013. Antibacterial action of quinolones : From target to network. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 66, 555–562.

Christodoulou, E., Samanidou, V. F., & Papadoyannis, I. N. 2007. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 859(2), 246–55.

Cortés, I., y Montalvo, S. 2010. Aguas: Calidad y Contaminación. Un enfoque químico ambiental. 1<sup>era</sup> edición. pp 19–21.

Elcoroaristizabal, S., Bro, R., Antonio, J., & Alonso, L. 2015. PARAFAC models of fluorescence data with scattering : A comparative study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 142, 124–130.

Escandar, G., González Gómez, D., Espinosa Mansilla, a, Muñoz de la Peña, a, & Goicoechea, H. . 2004. Determination of carbamazepine in serum and pharmaceutical preparations using immobilization on a nylon support and fluorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 506(2), 161–170.

Escandar, G. M., Goicoechea, H. C., & Mu, A. 2014. Second- and higher-order data generation and calibration : A tutorial. *Analytica Chimica Acta*, 806, 8–26.

Gámiz-Gracia, L., Cruces-Blanco, C., Lombardo-Agüí, M., & García-Campa, A. M. 2012. Determination of quinolones of veterinary use in bee products by ultra-high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry using a QuEChERS extraction procedure. *Talanta*, 93, 193–199.

Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. 2012. Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Lasallista*, 7(2), 52–73.

Giordano, A., Richter, P., & Ahumada, I. 2011. Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta*, 85(5), 2425–2429.

Giraldo, A. L., Peñuela, G., Torres-Palma, R., Pino, N. J., Palominos, R., & Mansilla, H. D. 2010. Degradation of the antibiotic oxolinic acid by photocatalysis with TiO<sub>2</sub> in suspension. *Water Research*, 44(18), 5158–67.

Hassouan, M. 2006. Tesis doctoral: Desarrollo de nueva metodología analítica para la determinación de quinolonas en alimentos de origen animal. Universidad de Granada. Departamento de Química Analítica. pp 26–33.

Hurtado-Sánchez, C., Lozano, V. A., Rodríguez-, M. I., Durán-Merás, I., & Escandar, G. M. 2015. Green analytical determination of emerging pollutants in environmental waters using excitation – emission photoinduced fluorescence data and multivariate calibration. *Talanta*, 134, 215–223.

Instituto nacional de organización (INN). Norma Chilena 409/1 2006.

Leyva, S. 2008. Fluoroquinolonas. Mecanismos de acción y resistencia, estructura, síntesis y reacciones fisicoquímicas importantes para propiedades medicinales. *Bol. Soc. Quím. Méx.*, 2(1), 1–13.

Olivieri, A. C., y Escandar, G. M. 2000. *Practical Three-Way Calibration*. 1<sup>era</sup> edición. pp. 27 – 42.

Otero, J. L., Mestorino, N., & Errecalde, J. O. 2001. Enrofloxacin una fluoroquinolona de uso exclusivo en veterinaria parte II: farmacocinética y toxicidad. *Analecta Veterinaria*, 21, 42–49.

Peña, A. M. De, Salinas, F., & Gómez, D. G. 2004. Partial least squares multicomponent fluorimetric determination of fluoroquinolones in human urine samples. *Talanta*, 62, 853–860.

Pino, D. 2014. Estudio cinético e hidrodinámico para el disco rotatorio con cavidad, mediante la determinación de hexaclorobenceno por cromatografía de gases. Unidad de

investigación de doctorado. Universidad de Chile. Laboratorio de Química Analítica. pp 2-4.

Rodrigues-Silva, C., Guedes, M., Rath, S., & Guimaraes, J. 2013. Degradation of flumequine by the Fenton and photo-Fenton processes: Evaluation of residual antimicrobial activity. *Science of the Total Environment*, 445-446, 337–346.

Rubio, S. 2011. Tesis Doctoral: Comportamiento farmacocinético de la marbofloxacin y de la enrofloxacin en llamas (“llama glama”). Universidad Complutense de Madrid. pp 8 – 13.

Samuelsen, O. B. 2006. Pharmacokinetics of quinolones in fish: A review, 255(5817), 55–75.

Seguin, A. K. 2013. Tesis: Extracción y determinación de ácido oxolínico y flumequina en músculo de salmón mediante espectrofotometría de fluorescencia. Universidad Tecnológica Metropolitana. Laboratorio de Química Analítica. Departemento de toxicología y farmacología. pp 4-8.

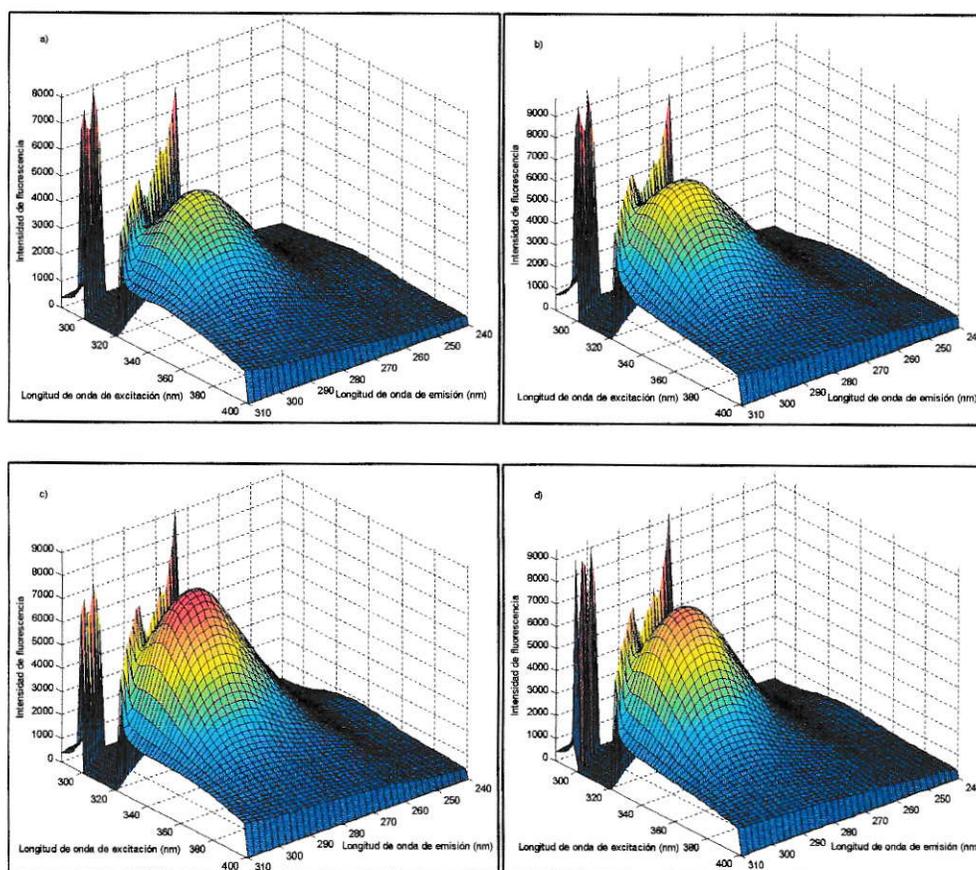
Skoog, D., Holler, F. J., & Nieman, T. 2001. *Principios De Análisis Instrumental* 5th Edición, pp. 219–241, 381–392.

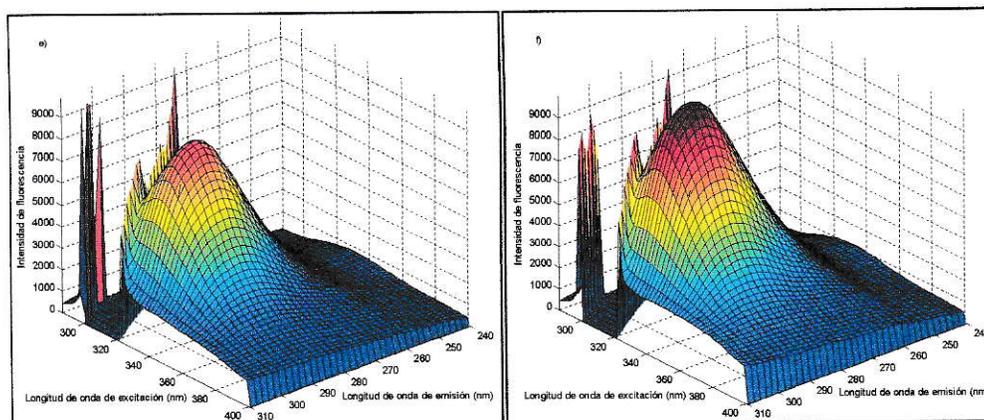
Xu, X., Liu, L., Jia, Z., & Shu, Y. 2015. Determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in foods of animal origin by capillary electrophoresis with field amplified sample stacking – sweeping technique. *Agricultural and food chemistry*, 176, 219–225.

## VI. ANEXO

A continuación se muestra el estudio realizado con PARAFAC para la muestra de agua potable en MeOH a pH 2 en el rango completo (entre 240,0 y 310,0 nm cada 2 nm para la excitación y la entre 287,0 y 400,0 nm cada 2 nm para la emisión).

Una vez obtenidos los FEEM se sustituyeron los valores de la dispersión de “Rayleigh” por ceros en todas las matrices y luego se pasaron a PARAFAC para obtener los gráficos tridimensionales (Figura 1a).



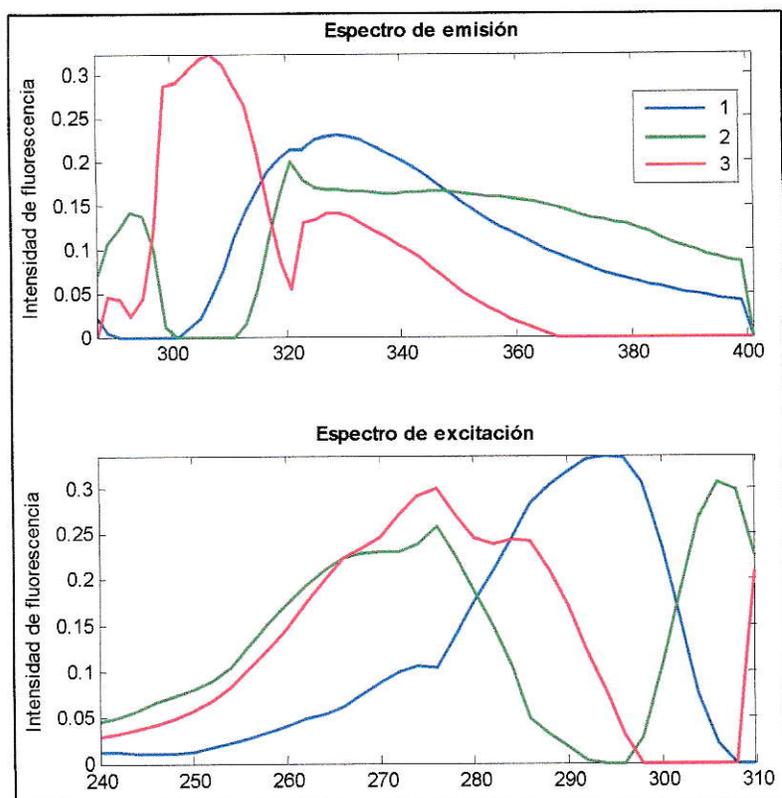


**Figura 1a:** Gráfico tridimensional para las matrices de fluorescencias de excitación-emisión (FEEM), correspondientes a las membranas de nylon tratadas con muestras de agua potable en MeOH y pH 2, con las distintas calibraciones de la tabla 2 a) Exp1, b) Exp2, c) Exp3, d) Exp4, e) Exp5 y f) Exp6.

Utilizando el set de calibración (Tabla 2), se predijo una muestra en agua potable en MeOH a pH 2 (de concentración conocida) que este dentro del rango de la calibración, al igual que en agua destilada se utilizó una muestra que contiene 5 ppb de OXO y 5 ppb de FLU.

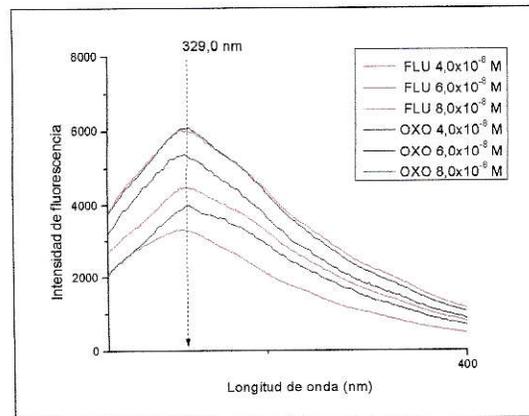
En primer lugar se seleccionó la cantidad de componentes, teniendo en cuenta que son dos los antibióticos en estudio y puede existir la presencia de algún interferente, por lo que se seleccionó tres componentes.

Como resultado de la predicción se obtuvo los espectros de emisión y de excitación, como se muestra en la Figura 2a. Existen tres posibles presencias en las muestras, componentes 1, 2 y 3. Donde los componentes 1 y 2 (azul y verde, respectivamente) deberían corresponder a los antibióticos estudiados, ya sea FLU u OXO y el componente 3 estar relacionado a la señal de algún interferente.



**Figura 2a:** Espectros de emisión y excitación correspondientes a la muestra Test en agua potable en MeOH a pH 2.

En la Figura 3a se muestra una superposición de los espectros de emisión de cada antibiótico realizados en agua potable en MeOH a pH 2. Al compararlos con los espectros de emisión obtenidos por PARAFAC (Figura 2a) no se observa ninguna similitud con algún componente, por lo que no es posible asociar ninguno de los dos antibióticos.



**Figura 3a:** Espectros de fluorescencia de FLU y OXO en muestras de agua potable con MeOH a pH 2.

En esta modelación por PARAFAC, la consistencia del núcleo obtenida fue 34,04 y el residuo fue  $6,8 \times 10^2$ . La consistencia del núcleo es muy baja, mientras que el residuo es muy grande y mientras menor sea el residuo mejor es la predicción.

Como los espectros obtenidos en la modelación no coinciden con ninguno de los antibióticos, la consistencia del núcleo muy baja y los residuos muy altos, no se predijo la concentración de FLU y OXO.