

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y
FARMACEUTICAS



“ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO ELECTROQUÍMICO DE NITROFURANOS EN ELECTRODOS DE NANOESTRUCTURAS DE CARBONO Y DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA SU DETERMINACIÓN EN MUESTRAS DE ORIGEN ANIMAL.”

**Presentada a la Universidad de Chile
para optar al Grado de Doctor en Química**

Por:

PAOLA JOHANNA SALGADO FIGUEROA

Directores de Tesis

**Dr. Juan Arturo Squella Serrano
Dr. Alejandro Álvarez Lueje.**

**SANTIAGO- CHILE
2013
UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN RESIDENCIA

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Residencia presentada por la candidata:

PAOLA JOHANNA SALGADO FIGUEROA

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Residencia como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendido el día.....de de 2013.

Directores de Tesis:

Dr. Juan Arturo Squella Serrano

Dr. Alejandro Álvarez Lueje

Comisión Informante:

Dr. Marcelo Campos V. (Presidente)

Dra. María Inés Toral P.

Dr. Gustavo A. Rivas.

Dr. Mauricio Isaacs C.

DEDICATORIA

*Oye hermosa de mi sueños
llegaste a llenar mi vida,
el amor es tan distinto
Desde el día en que te ví...*

*Desde que te conocí...
y te tuve entre mis brazos
el amor es para tí!!...
Ahora tu eres mi vida*

Dedicado con amor a Mayra Xanat

AGRADECIMIENTOS.

Quiero dar las gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante este nuevo desafío. Agradecer hoy y siempre a mi familia por todo el esfuerzo y el apoyo brindado, por la alegría y fortaleza entregada siempre necesaria para continuar, ya que de no ser así, nada hubiese sido posible.

Agradecer a todas las personas que conforman el centro para el desarrollo de la química CEPEDQ, por su constante apoyo y comprensión. A las todas las integrantes del laboratorio de Bioelectroquímica que me recibieron con los brazos abiertos y me dieron la oportunidad de incorporarme dentro de su grupo de trabajo especialmente a Paola Jara, Paulina Cañete, Soledad Bollo y Claudia Yañez, las cuales me brindaron no sólo conocimiento sino que también una amistad sincera y un consejo siempre oportuno. Darle las gracias al Profesor J. Sturm del cual aprendí a que todas las cosas son “reparables” y que la búsqueda de la perfección es la que nos lleva al éxito, al Profesor Alejandro Álvarez por su paciencia y apoyo incondicional y muy especialmente al Profesor Arturo Squella por tener fe en mí y aceptarme como su estudiante de doctorado, por sus consejos y su amistad, por toda la ayuda, conocimiento y sabiduría que me brindó desinteresadamente.

Por último quiero agradecer a Javiera Parra quien siempre me alentó a seguir adelante, que en muchos momentos difíciles como “hija adoptiva” me brindó su apoyo y amistad,

con ella compartimos momentos felices y tristes, inolvidables todos. A Andrés Barriga por ser una persona particularmente amable, que siempre me brindó su total apoyo. A Carolina Jullian, por ser tan cariñosa y afable, por toda su ayuda, toda la paciencia y conocimientos entregados, por ser honesta y sincera conmigo y por sobre todo, por ser una gran amiga.

ÍNDICE

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE	V
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABLAS	XIX
ABREVIATURAS	XXI
SIGLAS EN INGLÉS	XXI
RESÚMEN	xxiii
SUMMARY	xxv
1.0 INTRODUCCIÓN	1
2.0 HIPÓTESIS	6
3.0 OBJETIVO	6
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
4.0 MATERIALES Y MÉTODOS	8
4.1 MATERIALES Y REACTIVOS	8
4.1.1 <i>Materiales</i>	8
4.1.3 <i>Reactivos</i>	10
4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	11
4.2.1 <i>Preparación de buffer Britton-Robinson 0,1 M</i>	11

4.2.2	<i>Buffer Britton-Robinson-NaCl 0,1 M</i>	12
4.2.3	<i>Preparación de la suspensión acuosa de CNT</i>	12
4.2.4	<i>Preparación de la suspensión de CNT en dimetilformamida (DMF)</i>	12
4.2.5	<i>Preparación de la suspensión de CNT con Nafión al 2%</i>	13
4.2.6	<i>Pulido de la superficie de los electrodos de carbón vítreo</i>	13
4.2.7	<i>Modificación de la superficie de los electrodos de carbón vítreo</i>	14
4.2.8	<i>Disolución de ferricianuro 1,1 mM en KCl 0,1 M</i>	14
4.2.9	<i>Disolución de ferrocenometanol 1 mM en KCl 0,2 M</i>	15
4.2.10	<i>Disolución de DMF al 10, 30, 50 y 70%</i>	15
4.2.11	<i>Preparación de las disoluciones madre de nitrofuranos puros</i>	15
4.2.12	<i>Preparación de las disoluciones de trabajo</i>	15
4.2.13	<i>Disoluciones madre para HPLC</i>	16
	a) <i>Compuestos puros</i>	16
	b) <i>Metabolitos derivatizados y estándares internos</i>	16
	c) <i>Disolución de acetonitrilo/agua 70/30 %</i>	16
	d) <i>Ácido fórmico 0,1%</i>	17
	e) <i>Ácido fórmico 0,5%</i>	17
	f) <i>Ácido acético 0,025%</i>	17
	g) <i>Acetato de amonio 0,5 mM</i>	17
5.0	MÉTODOS	17
5.1	<i>Estudio de pH</i>	17

5.2 Electrodo de carbón vítreo modificado con CNT	18
5.3 Optimización del tiempo de acumulación (DPV).....	18
5.4 Optimización de la concentración de CNT en la suspensión y tiempo de acumulación (DPV).....	19
5.5 Voltamperometría lineal de barrido (LSV).....	20
5.5.1 Optimización de la concentración de CNT en la suspensión y del tiempo de acumulación utilizando LSV	20
5.5.2 Electrodo de carbón vítreo modificado con CNT suspendidos en Nafión al 2% (LSV)	20
5.5.3 Tiempo de acumulación de CNT/Nafión	21
5.5.4 Aplicación de potencial fijo	21
5.5.5 Estabilidad.....	21
5.5.6 Precisión electrodo modificado con CNT/DMF	22
5.5.7 Intervalo lineal	22
5.6 Electrodo modificado con CNT oxidados	23
5.6.1 Validación para LSV utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con CNT-COOH/DMF, sistema Estático	23
5.7 Sistema de inyección en flujo	24
5.7.1 Determinación del porcentaje óptimo de DMF en la disolución de activación	25
5.7.2 Optimización del tiempo de activación para SPE.....	25

5.7.3	Medición del área activa de CNF-SPE	26
5.7.4	Obtención de imágenes por medio de SECM	27
5.7.5	Obtención de imágenes por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM)	27
5.7.6	Validación para LSV, utilizando un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) y electrodos serigrafiados (SPE)	28
5.7.6.1	Intervalo lineal	28
5.7.6.2	Límite de detección	29
5.7.6.3	Precisión	29
5.8	Análisis de nitrofurantoína en muestras de orina	30
5.9	Análisis de nitrocompuestos en muestras de músculo de pollo (comercial y material de referencia de músculo de pollo)	30
5.9.1	Incubación	31
5.9.2	Extracción	31
5.9.3	Cuantificación de nitrocompuestos en músculo de pollo	32
5.10	Implementación de la metodología para el análisis de nitrofuranos mediante HPLC-MS	32
6.0	RESULTADOS Y DISCUSIONES	37
	PRIMERA PARTE: ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO MODIFICADOS CON CNT, EN SISTEMA ESTÁTICO	37
6.1	Estudio de pH	38

6.2 Modificación de electrodos de carbón vítreo con CNT	45
6.2.1 <i>Suspensión de CNT en medio acuoso y DMF</i>	<i>45</i>
6.2.2 <i>Suspensión de CNT en Nafión.....</i>	<i>51</i>
6.3 Aplicación de un potencial fijo durante la acumulación versus sistema abierto. .	52
.....	52
6.4 Estabilidad	54
6.5 Electrodo modificado con CNT suspendidos en DMF: validación del sistema	
Estático.....	56
6.5.1 <i>Precisión del método.....</i>	<i>56</i>
6.5.2 <i>Estimación del intervalo lineal</i>	<i>57</i>
6.6 Modificación de electrodos con CNT-COOH en medio DMF: validación del	
sistema estático	59
6.6.1 <i>Intervalo lineal.....</i>	<i>59</i>
6.6.2 <i>Límite de detección</i>	<i>60</i>
6.6.3 <i>Precisión</i>	<i>62</i>
SEGUNDA PARTE: ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE NANOTUBOS Y	
NANOFIBRA DE CARBONO, SISTEMA FIA.....	
6.7 Sistema de inyección en flujo.	64
6.7.1 <i>Pretratamiento de activación para SPE</i>	<i>65</i>
6.7.2 <i>Porcentaje óptimo de DMF en la disolución de activación.....</i>	<i>67</i>
6.7.3 <i>Optimización del tiempo de activación de los electrodos serigrafados</i>	<i>69</i>

6.7.4 Incremento del área electroactiva de los SPE	70
6.7.4.1 Cronoculombiometría	71
6.7.4.2 Obtención de imágenes SECM	73
6.7.4.3 Obtención de imágenes mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	78
6.8 Validación del método de análisis de nitrocompuestos mediante FIA-LSV y CNT-SPE.....	80
6.8.1 Electrodo serigrafiado de nanotubos de carbono (CNT- SPE).....	80
6.8.1.1 Intervalo lineal de trabajo.....	80
6.8.1.2 Límite de detección	82
6.8.1.3 Precisión.....	83
6.8.1.4 Exactitud	84
6.8.2 Electrodo serigrafiado de nanofibras de carbono (CNF-SPE).....	85
6.8.2.1 Intervalo lineal de trabajo.....	85
6.8.2.2 Límite de detección	88
6.8.2.3 Precisión.....	90
6.8.2.4 Exactitud	91
TERCERA PARTE: APLICACIÓN A MUESTRAS REALES	93
6.10 Análisis de muestras reales.....	94
6.10.1 Orina	94
6.10.2 Músculo de pollo comercial.....	95

6.10.2.1 Incubación y extracción	95
6.10.3 Matriz de músculo de pollo certificada.....	97
6.11 Implementación de metodología de análisis de nitrocompuestos por HPLC-MS	98
7.0 CONCLUSIONES.....	112
8.0 REFERENCIAS	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura I- 1 . Estructura de los nitrocompuestos en estudio. Se destaca en verde el anillo 5-nitrofurano.2

Figura 1. Configuración utilizada para una inyección directa en la fuente de ionización. La imagen circular muestra un acercamiento de la fuente de ionización, en la cual se aprecia el nebulizador.33

Figura 2. Configuración utilizada en la optimización de los parámetros instrumentales utilizando una bomba de jeringa para la inyección.....36

Figura 3. (a) Voltamperogramas de furazolidona $1,0 \times 10^{-4}$ M a diferentes pH. (b) i_p en función del pH y E_p en función del pH, utilizando DPV y electrodo de carbón vítreo. Barrido de potencial desde $E_i = 0$ mV hasta $E_f = -1000$ mV.....39

Figura 4. (a) Voltamperogramas de i y E versus pH para furaltadona $1,0 \times 10^{-4}$ M. (b) i_p vs pH y E_p vs pH, utilizando DPV y electrodo de carbón vítreo. Barrido de potencial desde $E_i = 0$ mV hasta $E_f = -1000$ mV.....41

Figura 5. (a) Voltamperogramas de nitrofurantoina $1,0 \times 10^{-4}$ M. (b) i_p y E_p en función del pH, utilizando DPV y electrodo de carbón vítreo. Barrido de potencial desde $E_i = 0$ mV hasta $E_f = -900$ mV.....42

Figura 6. . (a) Voltamperogramas de nitrofurazona $1,0 \times 10^{-4}$ M. (b) i_p y E_p en función del pH, utilizando en todos los casos DPV y electrodo de carbón vítreo. Barrido de potencial desde $E_i = 0$ mV hasta $E_f = -900$ mV.....44

Figura 7. Etapas secuenciales utilizadas en la modificación de los electrodos de carbón vítreo con suspensión de CNT..**45**

Figura 8. Comportamiento de la corriente i_p con respecto a la variación del tiempo de acumulación medida por medio de DPV. Nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %. Electrodo modificado con CNT concentración de CNT de 1 mg/mL suspendido en agua (a) y DMF (b).....**47**

Figura 9. Comportamiento de i_p con respecto al tiempo de acumulación y a la variación de la concentración de CNT presentes en la suspensión utilizada en la modificación del electrodo de carbón vítreo, medida utilizando DPV y electrodo modificado con CNT. (a) Suspensión preparada en medio acuoso. (b) Suspensión de CNT preparados en DMF.. **48**

Figura 10. Comportamiento de i_p respecto al incremento del tiempo de acumulación y de la concentración de CNT presente en la suspensión. Concentración nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M preparada en una disolución de buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % v/v. Velocidad de agitación durante la acumulación de 350 rpm, aplicación de LSV. **50**

Figura 11. (a) Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M por LSV utilizando electrodo modificado con CNT suspendidos en Nafión al 2%. Réplicas para un mismo electrodo (electrodo 4) y con un electrodo diferente (electrodo 1). (b) Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M a diferentes tiempos de acumulación. Medio buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %, pH 2,00, $E_i = 0$ mV $E_f = -600$ mV. **52**

Figura 12. (a) Voltamperogramas obtenidos al aplicar un potencial fijo de -50 mV en una disolución de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M mediante LSV utilizando electrodo

modificado con CNT suspendidos con Nafión. (b) Comparación entre los voltamperogramas obtenidos aplicando un potencial fijo de -50 mV y en circuito abierto.53

Figura 13. (a) Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M obtenidos por LSV, desde 0 hasta 225 minutos de reposo aplicando 5 minutos como tiempo de acumulación. Comportamiento de i_p respecto al tiempo. (b) Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M obtenidos por LSV cada cinco minutos. Comportamiento de i_p respecto al número de mediciones por LSV. Medio Buffer Britton-Robinson/DMF pH 2,00; velocidad de agitación durante la acumulación de 300 rpm, electrodo de carbón vítreo modificado con CNT 3 mg/mL suspendido en DMF.55

Figura 14. Voltamperogramas (LSV) para nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M utilizando electrodo modificado con CNT suspendidos en DMF, velocidad de agitación 300 rpm, tiempo de acumulación 5 min. DER obtenido de 4,1%.56

Figura 15. Estimación del intervalo lineal e intervalo lineal de trabajo de Nitrofurantoína, determinado utilizando LSV para electrodo de carbón vítreo modificado con CNT (a) suspendidos en Nafión y (b) suspendidos en DMF. Medio buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % pH 2,00.58

Figura 16. Estimación del intervalo lineal e intervalo lineal de trabajo de nitrofurantoína, obtenido utilizando electrodo modificado con CNT oxidados suspendidos en DMF (concentración de la suspensión de nanotubos 3mg/mL), medio Buffer Britton-Robinson/DMF 70/30%, pH 2,00.60

Figura 17. Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M por LSV y electrodo modificado con CNT-COOH 3,0 mg/mL en DMF, 7 réplicas en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30%, pH 2,00; tiempo de acumulación 5 min, agitación 300 rpm....**62**

Figura 18. (a) celda de reacción en la cual se inserta el electrodo SPE. (b) Loop de 2 mL, (c) electrodos serigrafiados de nanoestructuras de carbono y (d) Descripción de un electrodo serigrafiado (trabajo, referencia, auxiliar).....**65**

Figura 19. Comparación entre los voltamperogramas obtenidos para nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M mediante LSV y sistema FIA, tiempo de acumulación de 180 s para: (a) CNT-SPE, sin activar (A) y activado (B); (b) CNF-SPE, sin activar (A) y activado (B). Medio buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %. pH 2,00**66**

Figura 20. Corriente ip de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M por FIA-LSV utilizando electrodos serigrafiados de CNF, activados con disoluciones de distintos porcentajes de DMF. **68**

Figura 21. Corriente ip de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M por FIA-LSV utilizando CNF-SPE activados, a distintos periodos de inmersión del electrodo en la disolución de buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %.**70**

Figura 22. (a) Voltamperogramas cíclicos de ferricianuro de potasio 1,1 mM en KCl 0,1 M, pH 3,00 obtenidos para un electrodo de nanofibra de carbono (—) activado y (—) sin activar (b) respuesta cronocoulombimétrica para la reducción de ferricianuro de potasio 1,1 mM en KCl 0,1 M, pH 3,00 obtenidos con electrodos CNF-SPE (----) activados y (—) sin activación. **72**

Figura 23. . Gráficos de Anson obtenidos a partir de los resultados obtenidos por cronocoulombimetría: (a) CNF-SPE sin activación y (b) CNF-SPE activado..... **73**

Figura 24. (a) celda comercial convencional para SECM elaborada en teflón, (b) celda exclusiva para electrodos serigrafiados desarrollada en material acrílico. **74**

Figura 25. (a) Voltamperometría cíclica de FcMeOH 1,1 mM en KCl 0,2 M. (b) Curva de aproximación realizada en el eje z. **75**

Figura 26. Imagen SECM de CNF-SPE (a) superficie sin activación y (b) superficie activada del electrodo..... **76**

Figura 27. Imagen SECM de la superficie activada del electrodo serigrafiado de nanofibra de carbono. Los valores de corriente corresponden a corrientes normalizadas.
..... **77**

Figura 28. Imágenes SEM para CNF-SPE obtenidas utilizando un voltaje de aceleración de 5 KV. Imágenes (a) y (c) muestran la superficie de los electrodos sin activar y las imágenes (b) y (d) muestran la morfología de la superficie de los electrodos serigrafiados de nanofibra de carbono sometidos al proceso de activación..... **79**

Figura 29. Intervalo lineal de trabajo para nitrofurantoína establecido utilizando FIA-LSV-CNT-SPE..... **81**

Figura 30. Curva de calibración de nitrofurantoína utilizando LSV y electrodo serigrafiado de CNF, tiempo de acumulación 180 s, buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M.
..... **86**

Figura 31. Curva de calibración de nitrofurazona determinado por FIA y LSV, utilizando electrodo serigrafiado de CNF. Tiempo de acumulación 180 s. **87**

Figura 32. Curva de calibración de furaltadona determinado por FIA y LSV, utilizando electrodo serigrafiado de CNF. Tiempo de acumulación 180 s. **87**

Figura 33. Curva de calibración de furazolidona determinado por FIA y LSV, utilizando electrodo serigrafiado de CNF. Tiempo de acumulación 180 s. **88**

Figura 34. Gráfico de calibrado utilizando el método de adición de estándar obtenido mediante FIA-LSV-CNF-SPE, para la determinación de nitrofurantoína en muestras de orina.....**95**

Figura 35. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 239,0 correspondiente a nitrofurantoína, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 126,0; 168,0 y 98,0 seleccionando al ión 126,0 como ión de cuantificación y al ión 168,0 como ión de confirmación.....**104**

Figura 36. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 226,0 correspondiente a furazolidona, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 113,0; 95,1 y 138,9 seleccionando al ión 113,0 como ión de cuantificación y al ión 95,1 como ión de confirmación.....**105**

Figura 37. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 199,0 correspondiente a nitrofurazona, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 181,9; 156,0 y 136,0 seleccionando al ión 181,9 como ión de cuantificación y al ión 156,0 como ión de confirmación.....**106**

Figura 38. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 325,0 correspondiente a furaltadona, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 252,0; 281,0 y 127,1 seleccionando al ión 252,0 como ión de cuantificación y al ión 281,0 como ión de confirmación.....**107**

Figura 39. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 249,0 correspondiente a 2NP-AHD, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 134,0; 104,0 y 108,0 seleccionando al ión 134,0 como ión de cuantificación y al ión 104,0 como ión de confirmación.....**108**

Figura 40. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 335,0 correspondiente a 2NP-AMAZ, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 291,1; 262,1 y 127,1 seleccionando al ión 291,1 como ión de cuantificación y al ión 262,1 como ión de confirmación.....**108**

Figura 41. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 236,0 correspondiente a 2NP-AOZ, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 134,0; 104,0 y 102,1 seleccionando al ión 134,0 como ión de cuantificación y al ión 104,0 como ión de confirmación.....**109**

Figura 42. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 209,0 correspondiente a 2NP-SCA, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 166,0; 192,0 y 134,0 seleccionando al ión 166,0 como ión de cuantificación y al ión 192,0 como ión de confirmación.....**109**

Figura 43. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 107,0 correspondiente a AOZ-D4, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 63,1; 46,2 y 114,0 seleccionando al ión 63,1 como ión de cuantificación y al ión 46,2 como ión de confirmación.....**110**

Figura 44. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 207,0 correspondiente a AMOZ-D5, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 132,1; 115,1 y 86,1 seleccionando al ión 132,1 como ión de cuantificación y al ión 115,1 como ión de confirmación.....**111**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Precisión establecida como repetibilidad y reproducibilidad para nitrofurantoína mediante DPV y electrodos modificados con CNT suspendidos en medio acuoso. Datos de ip y de Ep obtenidos para nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M, tiempo de acumulación 1 min, velocidad de agitación durante la acumulación de 250 rpm.....46

Tabla N° 2. Resumen de resultados obtenidos en la determinación del LD utilizando LSV y electrodo modificado con CNT-COOH en DMF.61

Tabla N° 3. Resumen de resultados obtenidos en la determinación del LD utilizando FIA-LSV-CNT-SPE.....82

Tabla N° 4. Resultados obtenidos para la repetibilidad y para la exactitud, obtenidas utilizando FIA-LSV-CNT-SPE, Tiempo de acumulación 180 se y buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00.....	85
Tabla N° 5. Límites de detección del método (LD) y límites de cuantificación (LC) encontrados para nitrofurantoína, nitrofurazona, furaltadona y furazolidona.....	89
Tabla N° 6. Reproducibilidad expresada como coeficiente de variación para nitrofurantoína, nitrofurazona, furaltadona y furazolidona.....	91
Tabla N° 7. Exactitud expresada como porcentaje de recuperación para nitrofurantoína, nitrofurazona, furaltadona y furazolidona.....	92
Tabla N° 8. Porcentajes de recuperación obtenidos para muestras de musculo de pollo analizadas mediante FIA-LSV-CNF-SPE.....	97
Tabla N° 9. Porcentajes de recuperación obtenidos para el material de referencia LGC7206 (matriz certificada) analizadas mediante FIA-LSV-CNF-SPE.....	98
Tabla N° 10. Masas obtenidas para cada uno de los analitos en modo de ionización positiva y negativa. Se muestra ión precursor y fragmentos característicos para cada uno de los nitrocompuestos.....	99

ABREVIATURAS

FcMeOH	Ferrocenometanol
UME	Ultramicro electrodo
Ep	Potencial de pico
ip	Corriente de pico
DE	Desviación Estándar
DER	Desviación Estándar Relativa

SIGLAS EN INGLÉS

CNF	<i>Carbon nanofibers</i> - Nanofibras de carbono.
CNT	<i>Carbon nanotubes</i> - Nanotubos de carbono.
DPV	<i>Differential Pulse Voltammetry</i> - Voltamperometría de pulso diferencial
FIA	<i>Flow injection analysis</i> - Análisis de inyección de flujo
HMDE	<i>Hanging mercury drop electrode</i> .
LSV	<i>Linear sweep voltammetry</i> - Voltamperometría lineal de barrido
2-NP-AMOZ	<i>5-(Morpholinomethyl)-3-(2-nitrobenzylidenamine)-2-oxazolidinone</i>
2-NP-AOZ	<i>3-(2-Nitrobenzylidenamine)-2-oxazolidinone</i>
2-NP-SCA	<i>4-(2-Nitrobenzylidene)semicarbazide</i>
SECM	<i>Scanning electrochemical microscopy</i> - Microscopía electroquímica de barrido

SEM *Scanning electron microscopy*- Microscopia electrónica de barrido

SPE *Screen printed electrode*- Electroodos serigrafiados.

AOZ-d4 *3-Aminooxazolidin-2-one-d₄*

AMOZ-d5 *3-Amino-5-morpholinomethyl-2-oxazolidinone-d₅*

2-NP-AHD *1-(2-Nitrobenzylidenamine)-2,4-imidazolidinedione*

RESÚMEN

El uso de antibacterianos de tipo nitrofurano en animales que serán utilizados como productos de consumo humano en cualquiera de sus etapas, se encuentra prohibido a nivel mundial. Debido a esto se hace necesario realizar el análisis de estos nitrocompuestos en los diversos alimentos de origen animal; HPLC-MS es la metodología aceptada como oficial por la FDA. Al respecto, en esta Tesis se desarrolla una técnica electroanalítica para el análisis de nitrocompuestos en muestras de origen animal y/o biológicas, como músculo de pollo y orina, utilizando nanoestructuras de carbono como electrodo de trabajo. Para tal efecto se estudió el comportamiento de la corriente debida a la reducción del grupo nitro a hidroxilamina vía 4 electrones. De acuerdo a este estudio se establecieron los potenciales óptimos de reducción para realizar el análisis voltamperométrico. Se realizó un estudio de la respuesta de la corriente de pico utilizando voltametría lineal de barrido y electrodo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono y nanotubos de carbono oxidados, preparando la suspensión en distintos disolventes (agua, DMF, Nafión) y con diferentes concentraciones de nanotubos. Posteriormente y con la finalidad de mejorar la reproducibilidad y el límite de detección, se implementó el uso de un sistema FIA en conjunto con el uso de voltametría lineal de barrido y electrodos serigrafados de nanotubos de carbono y nanofibras de carbono. Se desarrolló un pretratamiento de activación de los electrodos serigrafados, que permitió aumentar la rugosidad y el área electroactiva 19 veces, lo que fue corroborado por estudios de cronocoulombimetría e

imágenes obtenidas con Microscopía de barrido electrónico (SEM) y Microscopía de barrido electroquímico (SECM). Esto pretratamiento permitió alcanzar límites de detección inferiores a $3 \times 10^{-8} \text{M}$ para cada uno de los nitrocompuestos en estudio.

SUMMARY

Nitrofurans antibiotics for animals that will be used for human consumption in any of its stages have been prohibited worldwide. As result of that regulation nitro compounds in various foodstuffs of animal origin should be analyzed. HPLC-MS is the official accepted methodology by the FDA. The aim of this thesis is to develop an electroanalytical method for determination of nitro compounds in biological and/or animal origin samples, such as chicken muscle and urine by using carbon nanostructures as a working electrode. For this purpose we studied the behavior of the current due to the reduction of the nitro group to hydroxylamine via to four electrons. According to this study the optimal reduction potentials were established for the voltammetric analysis. The response of the peak current (i_p) by using Linear sweep Voltammetry (LSV) on a Glassy Carbon Electrode (GCE) modified with carbon nanotubes and oxidized carbon nanotubes was studied. Different solvents (water, DMF, Nafion) as well as also different concentrations of nanotubes on suspension were prepared. Subsequently trying to improve the reproducibility and the detection limit a Flow Injection Analysis (FIA) system was implemented in conjunction with the use of linear sweep voltammetry on carbon nanotubes and carbon nanofibers electrodes. Activation pretreatment for screen printed electrodes was developed and applied before to the LSV analysis allowing to increases the electroactive area 19 folds and the surface roughness, these facts was corroborated by using Chronocoulometry and images obtained by Scanning Electron

Microscopy (SEM) and Scanning Electrochemical Microscopy (SECM). Consequently low detection limits (below to $3 \times 10^{-8} \text{M}$) were obtained to every studied nitrofurans.

1.0 INTRODUCCIÓN

Los nitrofuranos son fármacos antibacterianos y/o antiprotozoarios de amplio espectro, en cuya estructura química (Fig. I-1) se encuentra el característico anillo 5-nitrofurano. Los representantes clásicos de este tipo de fármacos son: nitrofurazona, furazolidona, furaltadona y nitrofurantoína. Este tipo de compuestos son especialmente indicados en el tratamiento de infecciones gastrointestinales y urinarias en medicina humana y veterinaria. La Unión Europea considerando, la protección de la salud pública, la evaluación científica de la seguridad de las sustancias y que debido a los avances científicos y técnicos, es posible detectar la presencia de residuos de medicamentos veterinarios en los productos alimenticios a niveles cada vez más bajos, determinó que era necesario establecer límites máximos de residuos farmacológicamente activos que se utilicen en los medicamentos veterinarios. Apoyados en el reglamento 2377/90 anexo IV se establecieron los límites máximos de residuos para sustancias autorizadas y además se estableció un conjunto de sustancias, dentro de las cuales se encuentran los nitrocompuestos, como sustancias prohibidas para ser administradas a animales productores de alimentos, debido a que estos y sus metabolitos tienen efecto carcinogénico y mutagénico¹⁻⁵.

En la actualidad existen diversas técnicas que permiten realizar la cuantificación de nitrocompuestos presentes en las más diversas matrices, que van desde vegetales, miel, orina, suero y tejidos, entre otras. Estas técnicas son frecuentemente basadas en HPLC-UV y HPLC-MS, así como también de tipo biológicos, como ELISA⁶⁻⁹

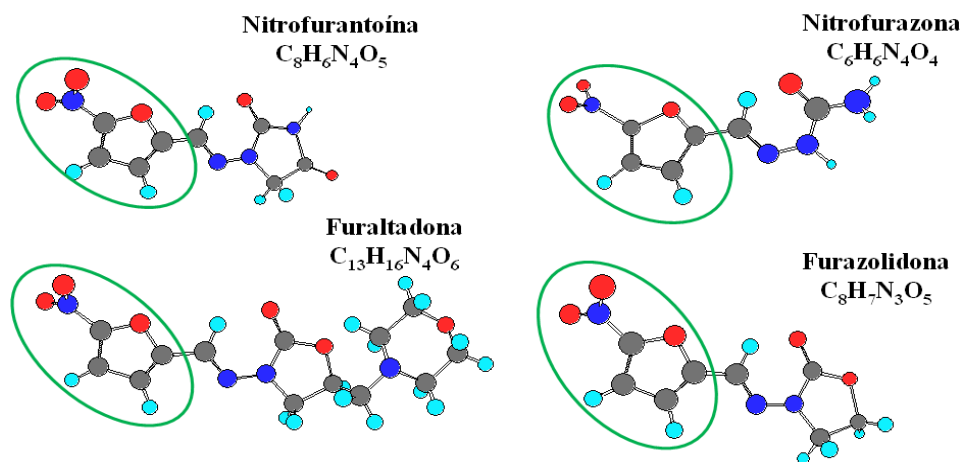


Figura I- 1 . Estructura de los nitrocompuestos en estudio. Se destaca en verde el anillo 5-nitrofurano.

Estas técnicas en su mayoría poseen una elevada sensibilidad, reproducibilidad y bajos límites de detección, pero generalmente requieren de un costoso equipamiento y una gran inversión en disponibilidad de tiempo para poder realizar los largos procedimientos de preparación de muestra. Otros son simplemente específicos (como ELISA) y sólo se pueden aplicar a un cierto tipo de matriz. En cuanto a técnicas electroquímicas, se han descrito metodologías en diferentes matrices complejas, como orina, suero humano y tejidos, en las que se ha utilizado HMDE como electrodo de trabajo. En estos días, es un gran desafío para los electroanalíticos desarrollar técnicas en las cuales los residuos resultantes sean más amigables con el medioambiente, sin perder

sensibilidad, reproducibilidad y en lo posible obtener una disminución en los límites de detección.

Con esta perspectiva, los nanomateriales como los nanotubos y nanofibras de carbono, han sido centro de gran interés desde su descubrimiento en 1991 por Iijima, debido a sus excelentes propiedades electroquímicas. Este tipo de estructuras han sido utilizadas como microelectrodos o adsorbidas en la superficie de otros electrodos, como carbón vítreo; modificando la superficie activa y mejorando sus propiedades conductoras. Por otra parte, la capacidad de alterar químicamente las nanoestructuras que son utilizadas para modificar los electrodos, ha proporcionado una poderosa vía para optimizar su funcionamiento, concediendo poderosas rutas para conseguir selectividad, concentración de especies, mejorar las propiedades electrocatalíticas y limitar las interferencias en una muestra compleja, tal como en la aplicación a muestras biológicas.

Actualmente se ha logrado depositar sobre una pequeña superficie cerámica distintos materiales en forma de tinta, que pueden actuar como electrodo de trabajo y cuya selección está directamente relacionada con las necesidades del área de investigación. A este tipo de arreglo de electrodos (ya que se encuentran impresos todos los electrodos necesarios en una pequeña superficie de la lámina cerámica), se les denomina electrodos serigrafiados (SPE). Algunos de los materiales que han sido utilizados como electrodo de trabajo son los nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, grafeno, oro, etc.. En general los electrodos de trabajo y de referencia/auxiliar se encuentran posicionados en forma opuesta (frente a frente), para evitar la caída de

potencial. La forma de los SPE se puede establecer de acuerdo a las necesidades requeridas para el análisis, siendo las más comunes el diseño de disco, anillo y banda. El hecho de que este electrodo sea desechable hace que crezca el interés en la posibilidad de aplicarlos en los análisis de muestras de tipo biológica, como por ejemplo muestras de sangre y orina. Sin embargo, a pesar de todas las grandes virtudes y versatilidad de los electrodos serigrafados que han hecho su utilización cada día más común y con diversas aplicaciones de excelentes resultados¹⁰⁻³³, nos encontramos con la desventaja de fabricación de los electrodos, ya que hasta el momento sólo se pueden serigrafar los electrodos en materiales rígidos y planos como cerámica o plástico, ya que aún permanece la incompatibilidad con sustratos no planares o flexibles³⁴.

Algunos investigadores han descrito procedimientos con los cuales se busca incrementar la sensibilidad de los electrodos serigrafados, principalmente los que utilizan nanotubos de carbono como electrodo de trabajo. Estos pretratamientos se enfocan básicamente en la eliminación de contaminantes presentes en la tinta utilizada para la impresión del electrodo de trabajo en el material cerámico, consistiendo en un primer paso, en el lavado del electrodo con elevadas concentraciones de NaOH como tratamiento químico y un segundo paso en el cual se incluye una anodización en disolución diluida de NaOH, utilizado como tratamiento electroquímico³⁵. En esta Tesis se realiza un pretratamiento que consiste en la simple inmersión del electrodo en una disolución de buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %, con el cual se consigue la eliminación de los constituyentes contaminantes de la tinta utilizada en la fabricación de

los electrodos, así como también favorecer el incremento de la rugosidad y el área electroactiva del electrodo de trabajo, tanto aquéllos de nanofibras así como nanotubos de carbono.

De acuerdo al estado del arte, sabemos que no se ha reportado hasta el momento el análisis de nitrofurantoina, nitrofurazona, furazolidona o furaltadona mediante LSV utilizando CNT-SPE o CNF-SPE unido a un sistema de inyección de flujo FIA. Sin embargo la unión del sistema FIA a un sistema de detección electroquímico representa una poderosa herramienta analítica para la determinación de bajas concentraciones de muchos analitos. Por otra parte, si a todas las propiedades electroquímicas conocidas de los nanotubos o nanofibras de carbono, que ya se encuentran plasmadas en los electrodos serigrafiados, le sumamos las ventajas de un sistema FIA, podemos potenciar el análisis electroquímico de los nitrocompuestos otorgando automatización y rapidez, así como también una alta sensibilidad, bajos límites de detección y bajo costo, tema que será desarrollado en el esta Tesis.

2.0 HIPÓTESIS:

La excelente respuesta electroquímica producida por la reducción del grupo nitro, asociada a las propiedades de las nanoestructuras de los nanotubos de carbono (CNT) y nanofibras de carbono (CNF) como interfases electrónicas, permitirá el desarrollo de nuevas metodologías analíticas que involucran la detección de fármacos, específicamente nitrofuranos, en distintas matrices de tejido animal (pollo, cerdo, pescado), a una velocidad y costo notablemente menor a las técnicas convencionales, sin perder o sacrificar la sensibilidad requerida.

3.0 OBJETIVO:

Desarrollar técnicas electroanalíticas usando como sensor electrodos modificados con nanoestructuras como CNT y CNF, de tal forma que permita implementar metodologías modernas, novedosas y principalmente de bajo costo, con pre-tratamientos de muestra relativamente cortos, con la finalidad de realizar la identificación y cuantificación de distintos fármacos de tipo nitrofurano, provenientes de productos de origen animal, tales como pollos, cerdos y/o pescados.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Estudiar el comportamiento electroquímico de fármacos nitrofuranos, como por ejemplo: nitrofurazona, furazolidona, furaltadona y nitrofurantoína.

Desarrollar, construir y/o modificar un electrodo con nanotubos o CNF, de tal forma que permita realizar la cuantificación de nitrofuranos de uso veterinario, en diferentes matrices de origen animal.

Realizar la caracterización electroquímica del electrodo modificado y compararlo con los electrodos serigrafiados.

Optimizar los parámetros de operación del electrodo modificado, tales como pH, sensibilidad, reproducibilidad.

Realizar el análisis de los nitrofuranos en muestras sintéticas.

Implementar la metodología para la extracción de nitrofuranos en muestras reales y realizar el posterior análisis de los compuestos de interés, utilizando el método desarrollado.

Desarrollar la metodología de preparación de muestra y de extracción de nitrofuranos, para su posterior análisis mediante el uso de HPLC-MS/MS con la finalidad comparar ambas metodologías (HPLC-MS/MS y electrodo de CNT o CNF)

4.0 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Materiales y reactivos

4.1.1 Materiales

- Barras magnéticas.
- Botellas de vidrio de 1 L con tapa rosca.
- Celda de acrílico adecuada para SPE y SECM.
- Celda de acrílico para sistema SPE-FIA.
- Celda de flujo wall-jet para sistemas FIA, DropSens[®].
- Celda recubierta para sistema estático (Protegida de la luz).
- Columna Symmetryshield RP18 150×2,1 mm, 3,5 μm.
- Electrodo auxiliar (Pt).
- Electrodo de carbón vítreo. CHI 104, CH Instruments, Inc.
- Electrodo de referencia (Ag/AgCl).
- Electrodos serigrafiados de nanofibra de carbono, CNF-SPE, DropSens[®].
- Electrodos serigrafiados de nanotubos de carbono multipared. CNT-SPE, DropSens[®].
- Espátula pequeña.
- Jeringa 50 μL, microliter 705, Hamilton para HPLC.
- Matraces aforados de 10 y 25, 500 y 1000 mL.
- Pipetas de volumen variable de 1000 μL, 200 μL, 100 μL.
- Paño para pulido de electrodos, Buehtler.

- Software Dropview[®].
- Tubos de centrífuga de polipropileno de 50 mL con tapa rosca.
- Tubos de centrífuga de 50 mL de vidrio con cuello esmerilado.
- Tubos Eppendorf de 2 mL con fondo plano.
- Tubos Eppendorf de 1 mL.
- Ultramicroelectrodo, fibra de carbono de 10 μm .

4.1.2 Equipos

- Agitador magnético.
- Balanza Precisa 40SM-200A.
- Baño de ultrasonido Branson 2510.
- Baño termorregulado con agitación Julabo SW22.
- Analizador voltamperométrico BAS CV-100W.
- Bipotenciostato / galvanostato $\mu\text{Stat}400$.
- Bomba peristáltica.
- CHI 760C Electrochemical Workstation.
- HPLC-MS-MS, Agilent HP-1100/ESI-IT Bruker Daltonic ESQUIRE-4000.
- Microscopio de barrido electroquímico SECM, CH Instruments.
- Microscopio electrónico de barrido Zeiss EVO MA 10.
- pHmetro. PMX 3000
- Procesadora de alimentos Moulinex.

-Vortex Heidolph REAX 2000

4.1.3 Reactivos

-Acetato de amonio p.a., Merck

-Acetonitrilo, grado HPLC, Merck

-Ácido acético glacial p.a., Merck.

-Ácido bórico p.a., Merck

-Ácido fórmico p.a., Merck

-Ácido fosfórico p.a., Merck

-Agua desionizada grado Milli-Q.

-Alúmina de 0,05 y 0,3 μm .

-AMAZ-d5, Sigma Aldrich.

-AOZ-d4, Sigma Aldrich.

-Cloruro de potasio, p.a., Merck

-Cloruro de sodio p.a., Merck.

-Dimetilformamida (DMF) p.a., Merck.

-Disolución saturada de NaOH.

-Ferricianuro de potasio, p.a., Merck.

-Ferrocenometanol (98%), Sigma Aldrich.

-Furaltadona, Sigma Aldrich.

-Furazolidona, Sigma Aldrich.

-Metanol grado HPLC, Merck.

-Músculo de pollo.

-Músculo de pollo certificado “Chicken Raw-Reference Material LGC7206, “UKAS®
reference materials.

-Nafión, Sigma Aldrich.

-Nanotubos de carbono multipared (CNT), Dropsens®.

-NP-AMAZ, Sigma Aldrich.

-Nitrofurantoína, Sigma Aldrich.

-Nitrofurazona, Sigma Aldrich.

-2NP-SCA, Sigma Aldrich.

-2NP-AOZ, Sigma Aldrich.

-2NP-AHD, Sigma Aldrich.

4.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

4.2.1 Preparación de buffer Britton-Robinson 0,1 M

Se pesó 6,18 g de ácido bórico y se disolvió con 300 mL de agua desionizada, sobre esta disolución se agregó 5,71 mL de ácido acético glacial y 6,74 mL de ácido fosfórico. Se agregó aproximadamente unos 600 mL adicionales de agua desionizada y se sonicó durante 10 minutos hasta la disolución total. Se aforó a 1 L con agua Milli-Q. El buffer tuvo un pH resultante igual a 2,00.

4.2.2 Buffer Britton-Robinson-NaCl 0,1 M

Se pesó 6,18 g de ácido bórico y 5,85 g de NaCl, se disolvió completamente con 300 mL de agua desionizada, sobre esta disolución se agregó 5,71 mL de ácido acético glacial y 6,74 mL de ácido fosfórico. Se agregó aproximadamente unos 600 mL adicionales de agua desionizada y se sonicó durante 10 minutos hasta la disolución total. Se aforó a 1 L con agua. El buffer tuvo una acidez resultante equivalente a pH 2,00.

4.2.3 Preparación de la suspensión acuosa de CNT

En un tubo Eppendorf de fondo plano se preparó una suspensión de nanotubos de carbono de multipared (abreviada de ahora en adelante como CNT), en medio acuoso, utilizando una concentración de 1 mg de CNT por mL de agua. Para tal efecto se pesó 0,58 mg de CNT y se adicionó 580 μ L de agua Milli-Q. Se sonicó en 3 intervalos de 5 minutos cada uno para permitir la dispersión y suspensión completa de los nanotubos. Como ayuda para suspender los nanotubos se utilizó una espátula plana pequeña, arrastrando los nanotubos hacia la pared del tubo Eppendorf, tratando de separar los posibles grumos que pudieran formarse.

4.2.4 Preparación de la suspensión de CNT en dimetilformamida (DMF)

En un tubo Eppendorf de fondo plano se preparó una suspensión de CNT en DMF, utilizando una concentración de 1 mg de CNT por mL de DMF. Para tal efecto se pesó 0,49 mg y se adicionó 490 μ L de DMF. Se sonicó por un total de 15 minutos en 3 intervalos de 5 minutos cada uno para poder agitar y dispersar completamente la

suspensión, con la ayuda de una espátula plana pequeña. De la misma forma se prepararon las siguientes suspensiones de CNT: 1,04; 2,26; 3,04 y 3,94 mg/mL. Para tal efecto se pesó las siguientes cantidades de CNT: 0,52; 1,13; 1,52 y 1,97 mg y se adicionó 0,5 mL de DMF a cada una de ellas.

4.2.5 Preparación de la suspensión de CNT con Nafión al 2%.

En un tubo Eppendorf de fondo plano se preparó una suspensión en Nafión al 2% en etanol, utilizando una concentración de 3 mg de CNT por mL de disolución. Para tal efecto se pesó 1,56 mg de nanotubos y se adicionó 520 μ L disolución de Nafión al 2% en etanol. Se sonicó por un total de 15 minutos en tres intervalos de 5 minutos para permitir la dispersión y suspensión completa de los nanotubos, utilizando una espátula plana pequeña.

4.2.6 Pulido de la superficie de los electrodos de carbón vítreo

El pulido de los electrodos se realizó utilizando dos paños de pulido adheridos a la superficie lisa de una cápsula de Petri. Se depositó en uno de ellos una pequeña porción de alúmina de 0,05 μ m y en el otro una pequeña porción de alúmina 0,3 μ m, se procedió al pulido de la superficie activa del electrodo, mediante movimientos circulares constantes y homogéneos en forma de 8. Se comenzó el pulido del electrodo de carbón vítreo utilizando primero el paño con la alúmina de mayor tamaño de partícula y

finalmente la alúmina fina (0,05 μ m), enjuagando suavemente con agua desionizada después de cada proceso de pulido.

4.2.7 Modificación de la superficie de los electrodos de carbón vítreo

Para realizar la modificación de los electrodos de carbón vítreo se debe realizar previamente el pulido de los electrodos, de acuerdo al procedimiento descrito en el punto anterior.

Después del pulido, los electrodos fueron lavados cuidadosamente y secados en la estufa a 50 °C por 5 min. Una vez secos se depositó una alícuota de 5 μ L de la suspensión de CNT correspondiente sobre la parte activa del electrodo. Cuidadosamente se secó en estufa a 50 °C por un periodo de 5 min. Una vez formado la película en los electrodos, se tapó cada uno de ellos con un cono de polipropileno.

4.2.8 Disolución de ferricianuro 1,1 mM en KCl 0,1 M.

Se pesó 18,73 mg de ferricianuro de potasio y 0,3767 g de KCl, se disolvieron juntos en una porción de agua Milli-Q y posteriormente se aforó a 50 mL.

4.2.9 Disolución de ferrocenometanol 1 mM en KCl 0,2 M.

Se pesó 0,93 mg de ferrocenometanol (FcMeOH) y 74,55 mg de KCl, se disolvió con una pequeña porción de agua desionizada y se aforó a 5 mL.

4.2.10 Disolución de DMF al 10, 30, 50 y 70%.

Se adicionó sobre matraces de 25 mL las siguientes cantidades de DMF puro: 2,5; 7,5; 12,5 y 17,5 mL y se aforó con disolución buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M, para obtener las siguientes concentraciones en porcentaje de DMF: 10, 30, 50 y 70%, respectivamente

4.2.11 Preparación de las disoluciones madre de nitrofuranos puros

Se pesó 2,25 mg de furazolidona, 2,38 mg de nitrofurantoína, 1,98 mg de nitrofurazona y 3,61 mg de furaltadona. Cada una de ellas se aforó a 10 mL con DMF, para obtener una concentración de $1,0 \times 10^{-3}$ M.

4.2.12 Preparación de las disoluciones de trabajo

Todas las disoluciones de trabajo se prepararon a partir de diluciones consecutivas de la disolución madre, aforando con buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % o aforando con buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M, según corresponda.

4.2.13 Disoluciones madre para HPLC.

a) Compuestos puros

Se pesó 2,47 mg de nitrofurantoína; 2,06 mg de furazolidona y 2,01 mg de nitrofurazona y se aforó cada una de ellas a 20 mL con disolución de acetonitrilo/agua 70/30 %. En el caso de furaltadona se pesó 2,59 mg y se aforó a 25 mL con la misma disolución, resultando concentraciones de 123,5 mg/L, 103,0 mg/L, 100,5 mg/L y 129,5 mg/L, respectivamente.

b) Metabolitos derivatizados y estándares internos

Se pesó 130 µg de NP-AMAZ y se disolvió en 1 mL de disolución de acetonitrilo/agua 70/30 %, resultando una concentración de 130 mg/L; se pesó 170 µg de 2NP-SCA y se adicionó 1,3 mL de disolución de acetonitrilo/agua 70/30 %, obteniendo una concentración de 131 mg/L. Para 2NP-AOZ se pesó 180 µg y se adicionó 1 mL de la disolución de acetonitrilo/agua para obtener una concentración de 180 mg/L; en el caso de 2NP-AHD se pesó 230 µg y se adicionó 500 µL de acetonitrilo/agua 70/30 % resultando una concentración de 460 mg/L. Para los estándares internos se pesó 290 µg de AOZ-d4 y 140 µg de AMAZ-d5, adicionando 1000 µL de la disolución de acetonitrilo/agua, obteniendo concentraciones de 290 mg/L y 140 mg/L, respectivamente.

c) Disolución de acetonitrilo/agua 70/30 %

Se tomó una alícuota de 30 mL de agua y se aforó a 100 mL con acetonitrilo.

d) Ácido fórmico 0,1%.

Se tomó una alícuota de 0,5 mL de ácido fórmico y se aforó con agua Milli-Q a 500 mL.

e) Ácido fórmico 0,5%.

Se tomó una alícuota de 2,5 mL de ácido fórmico y se aforó con agua Milli-Q a 500 mL.

f) Ácido acético 0,025%.

Se tomó una alícuota de 125 μ L de ácido acético y se aforó con agua Milli-Q a 500 mL.

g) Acetato de amonio 0,5 mM

Se pesó 20,8 mg de acetato de amonio y se depositó en un vaso precipitado que contenía 250 mL de agua, se agitó vigorosamente hasta la completa disolución y se aforó con agua Milli-Q a 500 mL.

5.0 MÉTODOS

5.1 Estudio de pH

Utilizando una disolución de concentración $1,0 \times 10^{-4}$ M de cada analito y mediante el uso del sistema BAS-100 y electrodo de carbón vítreo, se realizó el estudio del comportamiento electroquímico frente al pH, modificándolo con una disolución saturada de hidróxido de sodio; de forma que el volumen final de la disolución en estudio no se

viera afectado. Se realizó la medición de la corriente y del potencial de reducción de cada uno de los nitrocompuestos con cada variación de pH, comenzando en el pH 2,00 proporcionado por el buffer y aumentándolo media unidad en cada oportunidad, hasta alcanzar pH 12,00. Los valores de E_p e i_p en cada valor de pH y para cada nitrocompuesto en estudio fueron tabulados y graficados.

5.2 Electrodo de carbón vítreo modificado con CNT

Se modificó el electrodo de carbón vítreo utilizando una concentración de 1 mg/mL de CNT en medio acuoso, de acuerdo al protocolo descrito anteriormente en el punto 2.2.7. Utilizando una disolución de nitrofurantoína de concentración $1,0 \times 10^{-4}$ M, mediante el uso del sistema BAS-100 y el electrodo de carbón vítreo modificado se realizó la medición de la corriente de reducción del grupo nitro mediante DPV. Se utilizó una velocidad de agitación constante durante el período de acumulación de 250 rpm. Las mediciones se realizaron a pH 2,00, utilizando un tiempo de acumulación equivalente a 1 min definido *a priori*, sólo como referencia para realizar el estudio del comportamiento electroquímico que posteriormente fue optimizado.

5.3 Optimización del tiempo de acumulación (DPV)

Utilizando DPV en el sistema BAS-100 se realizó la medición de la corriente y del potencial de reducción de una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M, a pH 2,00. Para

tal efecto, usando un electrodo modificado con CNT de una concentración de suspensión de 1 mg/mL en medio acuoso y otro en DMF, se obtuvieron los voltamperogramas con diferentes tiempos de acumulación desde 1 min hasta 5 min para el electrodo modificado con CNT/acuoso y de 1 min hasta 4 min para el electrodo modificado con CNT en suspensión en DMF.

5.4 Optimización de la concentración de CNT en la suspensión y tiempo de acumulación (DPV)

Se modificaron electrodos de carbón vítreo utilizando distintas concentraciones de CNT en suspensión, preparadas en medio acuoso y en DMF. Posteriormente se realizó la medición de la corriente y el potencial de reducción utilizando los electrodos modificados con las distintas concentraciones de nanotubos mediante DPV. Las concentraciones de las suspensiones de los CNT en medio acuoso fueron de 2 a 4 mg/mL. Simultáneamente al estudio de concentración de CNT se estudió el comportamiento electroquímico, al aplicar distintos tiempos de acumulación desde 1 a 4 min en cada una de las concentraciones de las suspensiones y para ambos medios de la suspensión.

5.5 Voltamperometría lineal de barrido (LSV)

Se obtuvieron los voltamperogramas mediante el uso de la técnica de LSV, para una disolución de nitrofurantoína de concentración $1,0 \times 10^{-4}$ M pH 2,00, utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con CNT suspendidos en DMF.

5.5.1 Optimización de la concentración de CNT en la suspensión y del tiempo de acumulación utilizando LSV

Se prepararon suspensiones de distintas concentraciones de CNT en DMF (desde 1 a 4 mg/mL). Se realizó la medición de la corriente y del potencial de reducción para una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M, mediante LSV utilizando el sistema BAS-100 y los electrodos modificados con CNT. Con cada electrodo modificado y cada una de las concentraciones en estudio se realizaron mediciones aplicando tiempos crecientes de acumulación, comenzando desde 0,5 a 5 min. Con las siguientes condiciones experimentales: potencial inicial E (mV) = 0, potencial final E (mV) = -800, velocidad de barrido (mV/s) = 100, sensibilidad (A/V) = $1,0 \times 10^{-4}$.

5.5.2 Electrodo de carbón vítreo modificado con CNT suspendidos en Nafión al 2% (LSV)

Se realizó la medición de la corriente y del potencial de reducción de una disolución de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M a pH 2,00; mediante LSV en un sistema BAS-100, utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con CNT en una concentración de la

suspensión de 3 mg de CNT/mL de Nafión al 2%. Se empleó un tiempo de acumulación de 5 min. Se utilizó una velocidad de agitación de la disolución durante el proceso de acumulación de 250 rpm.

5.5.3 Tiempo de acumulación de CNT/Nafión

Se realizó el estudio del tiempo de acumulación por medio de LSV, utilizando un electrodo modificado con CNT suspendidos en Nafión (3 mg/mL). Se utilizó una disolución de nitrofurantoína con una concentración de $5,0 \times 10^{-6}$ M para realizar el estudio. Las mediciones de corriente se realizaron utilizando diferentes tiempos de acumulación, partiendo desde 0,5 hasta 8,0 min.

5.5.4 Aplicación de potencial fijo

Se realizó una medición voltamperométrica, aplicando un potencial fijo de -50 mV durante el proceso de acumulación. Esto se llevó a cabo utilizando una disolución de nitrofurantoína de concentración $5,0 \times 10^{-6}$ M y realizando la medición de la corriente utilizando voltamperometría cíclica y el correspondiente electrodo modificado con CNT suspendidos en Nafión al 2% (3 mg/mL).

5.5.5 Estabilidad

Para realizar el estudio de estabilidad de los nitrocompuestos se utilizó una disolución de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M, pH 2,00. Utilizando LSV se obtuvieron los

voltamperogramas correspondientes a las señales de la corriente de reducción de los nitrocompuestos cada 30 min, partiendo desde tiempo cero hasta 225 min. Adicionalmente se realizaron 12 mediciones consecutivas de una disolución de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M, utilizando electrodo modificado con CNT suspendidos de DMF (3 mg/mL), mediante LSV y aplicando un tiempo de acumulación de 5 min.

5.5.6 Precisión electrodo modificado con CNT/DMF

El estudio de repetibilidad se realizó analizando un set de 7 disoluciones de nitrofurantoína de una concentración de $5,0 \times 10^{-6}$ M, utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con CNT suspendidos de DMF (3 mg/mL), mediante LSV en un sistema BAS-100 y expresada como coeficiente de variación.

5.5.7 Intervalo lineal

Se realizó el estudio de la variación de la respuesta de la corriente respecto a la concentración de nitrofurantoína, para estimar el intervalo lineal. Para tal efecto se utilizó un electrodo modificado con CNT suspendidos en Nafión al 2% y un electrodo modificado con CNT suspendidos en DMF, ambos con 3 mg de nanotubos por mL de disolvente. Los voltamperogramas fueron obtenidos utilizando LSV en el sistema BAS-100. Se graficó i_p frente a la concentración molar de nitrofurantoína.

5.6 Electrodo modificado con CNT oxidados

Se estudió la respuesta de la corriente de reducción de la nitrofurantoína (concentración de $5,0 \times 10^{-6}$ M), utilizando un electrodo de carbón vítreo modificado con CNT oxidados suspendidos en DMF 3 mg/mL. Se utilizó LSV en el sistema BAS-100 y una velocidad de agitación durante el proceso de acumulación de 350 rpm.

5.6.1 Validación para LSV utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con CNT-COOH/DMF, sistema Estático

Se realizó la validación del método determinando los siguientes parámetros: intervalo lineal, repetibilidad y límite de detección. Las condiciones de operación utilizadas fueron las siguientes: potencial inicial $E_i = 0$ mV, potencial final $E_f = -600$ mV, velocidad de agitación de la disolución durante la acumulación 350 rpm. En la determinación del límite de detección se utilizaron nueve réplicas de una disolución de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-8}$ M, con las cuales se obtuvieron los voltamperogramas correspondientes al aplicar LSV, empleando el electrodo de carbón vítreo modificado con CNT oxidados. Para el caso de la determinación de la repetibilidad se utilizaron 7 réplicas de una disolución de nitrofurantoína de concentración de $5,0 \times 10^{-8}$ M y se analizaron en las condiciones descritas anteriormente. El intervalo lineal se determinó estudiando la respuesta de disoluciones de nitrofurantoína con concentraciones desde $5,0 \times 10^{-8}$ M a $6,0 \times 10^{-7}$ M, mediante el uso de LSV y electrodo modificado con CNT-COOH.

5.7 Sistema de inyección en flujo

Se implementó un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) para la determinación de los nitrocompuestos, utilizando LSV y electrodos serigrafiados. Se acopló la técnica FIA al sistema CHI, por medio del cual se realizaron las mediciones electroquímicas (LSV) necesarias para estudiar la respuesta de corriente del analito de interés. Se utilizaron las condiciones analíticas establecidas anteriormente durante el análisis de nitrofurantoína, mediante el uso de electrodo de carbón vítreo modificado con CNT oxidados y LSV. Las condiciones instrumentales generales se detallan a continuación: potencial de inicio: 0 V, final: -0,45 V; velocidad de barrido: 0,2 V/s, sensibilidad: $1,0 \times 10^{-5}$ A/V, tiempo de acumulación 180 s, electrodos serigrafiados (CNF-SPE) de nanofibra de carbono y de CNT (CNT-SPE).

El diseño de los electrodos serigrafiados permite disponer de los tres electrodos en una misma tira cerámica de pequeñas dimensiones ($33 \times 10 \times 0,5$ mm), el electrodo de trabajo corresponde a nanotubos de carbono de multipared (abreviada de ahora en adelante como CNT-SPE) o nanofibras de carbono (abreviada de ahora en adelante como CNF-SPE), el electrodo auxiliar es de carbono y el electrodo de referencia en este caso es de plata. Se utilizaron dos “loops” de 2 mL cada uno para formar el circuito de inyección de muestra, los cuales fueron construidos en el laboratorio, utilizando una manguera de Tygón de 0,7 mm de diámetro interno, obteniendo una capacidad de volumen final de inyección de 4 mL. Se utilizó buffer Britton/Robinson-NaCl 0,1 M como disolución transportadora, que se mantuvo durante todo el proceso de análisis con una corriente de

nitrógeno para obtener atmósfera libre de oxígeno. Cada disolución fue burbujeada con una corriente de nitrógeno previo al análisis.

5.7.1 Determinación del porcentaje óptimo de DMF en la disolución de activación

Se utilizaron las distintas disoluciones de activación (concentración variable de DMF), preparadas como se indica en el punto 2.2.4, se activaron 5 electrodos serigrafiados de nanofibra de carbono, un electrodo por cada disolución, partiendo con concentraciones de DMF desde 10 % hasta 100 %, pasando por 30, 50 y 70 % de DMF. Además se utilizó un electrodo serigrafiado sin activar para la obtención del voltamperograma correspondiente. Utilizando la técnica FIA-LSV se realizó la medición de una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M empleando todos los electrodos, tanto los pretratados como los sin pretratar. Se graficó i_p versus porcentaje de DMF para obtener la concentración óptima de DMF en la disolución de activación.

5.7.2 Optimización del tiempo de activación para SPE

Para la optimización del tiempo durante el cual el electrodo debe ser sumergido en la disolución activadora, los electrodos serigrafiados de nanofibra de carbono fueron sumergidos por 5, 10, 15, 30 y 60 min en la disolución buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %, posteriormente utilizados para realizar el análisis de una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M mediante LSV y sistema de inyección en flujo. Se registraron

los valores de i_p y se graficaron frente al tiempo de activación de los electrodos serigrafados de CNF.

5.7.3 Medición del área activa de CNF-SPE

Utilizando una disolución de ferricianuro de potasio 1,1 mM en KCl 0,1 M ajustada a pH 3,00 y mediante cronocoulombimetría, se estableció el área activa del electrodo serigrafado³⁶⁻³⁷. El área activa se determinó tanto para el electrodo de CNF sin activación como para el electrodo activado, el cual fue sometido previamente a un tratamiento de activación utilizando buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %. Se graficó la respuesta de carga total Q_t *versus* el tiempo, donde la pendiente se relaciona con el área del electrodo (Ecuación 1), de acuerdo a la siguiente expresión:

Ecuación 1

$$Q_t = \frac{2nFACD_0^{1/2}}{\pi^{1/2}} t^{1/2} + Q_{dl} + nFA\Gamma_0$$

Despejando del valor de la pendiente el área del electrodo, se obtiene por consiguiente el área activa en el electrodo serigrafado de CNF, que en este caso corresponde a un electrodo comercial de marca Dropsens®.

5.7.4 Obtención de imágenes por medio de SECM

Una vez que todos los electrodos se encuentran conectados y en contacto con la disolución de ferrocenometanol (FcMeOH) 1,1 mM en KCl 0,2 M, se registró un voltamperograma cíclico de la oxidación del ferrocenometanol utilizando el ultramicroelectrodo (UME) de 10 μm posicionado en las cercanías del electrodo sustrato (CNF-SPE).

Se obtuvo una curva de aproximación alejando el UME de la superficie del sustrato unos 50 μm , obteniendo con esto la corriente estacionaria. El desplazamiento del electrodo hacia el sustrato se produce hasta que el valor de la corriente es equivalente al 125 % del valor de la corriente estacionaria. Esta es la posición adecuada para obtener la imagen electroquímica de la superficie del sustrato (CNF-SPE).

Se realizó un barrido en el sentido del eje y, utilizando un área de barrido de 200 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ para cada uno de los electrodos serigrafados, es decir activado y sin activar, a una velocidad de barrido de 30 $\mu\text{m/s}$.

5.7.5 Obtención de imágenes por medio de microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se obtuvieron las imágenes de microscopía electrónica utilizando un microscopio Zeiss EVO MA 10, asociado a los detectores de electrones secundarios y retrodispersos. Se utilizó un voltaje de aceleración de 5 KV y una magnificación de 400 nm cm^{-1} y 800 nm cm^{-1} , tanto para los electrodos sin activar como para los activados.

5.7.6 Validación para LSV, utilizando un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) y electrodos serigrafiados (SPE)

Intervalo lineal, límite de detección, repetibilidad y exactitud fueron los parámetros que se establecieron en la validación metodológica para el análisis de los nitrocompuestos por medio del sistema FIA y LSV, utilizando el electrodo serigrafiado de nanofibra de carbono (CNF-SPE), aplicado a los cuatro analitos en estudio. Adicionalmente se determinaron los mismos parámetros de validación anteriores para la metodología de análisis de nitrofurantoína, por medio del sistema FIA y LSV con electrodo serigrafiado de nanotubos de carbono (CNT-SPE).

5.7.6.1 Intervalo lineal

Se utilizó un CNF-SPE y LSV asociado al sistema de inyección en flujo (FIA-CNF-SPE), para determinar el intervalo lineal y el intervalo lineal de trabajo para los analitos en estudio (nitrofurantoína, furazolidona, nitrofurazona y furaltadona). Se utilizó como disolución transportadora buffer Britton Robinson NaCl 0,1 M, pH 2,00. En el caso de nitrofurantoína se determinó también el intervalo lineal de trabajo, utilizando un electrodo serigrafiado de CNT y LSV asociado al sistema de inyección en flujo (FIA-CNT-SPE).

5.7.6.2 Límite de detección

Establecido el intervalo lineal se analizó un set de 7 disoluciones de la misma concentración para cada uno de los analitos, ubicada en el nivel bajo de la curva de calibración, que fue establecido a partir del intervalo lineal de trabajo determinado previamente. El cálculo se realizó de acuerdo a la siguiente relación:

Ecuación 2

$$LD = t_{((n-1), 0,99)} \times DE$$

Se obtuvieron los voltamperogramas aplicando LSV utilizando el sistema FIA y CNF-SPE para los cuatro analitos en estudio y utilizando el electrodo serigrafiado de CNT sólo para nitrofurantoína.

5.7.6.3 Precisión

Se estudió la repetibilidad del método analizando un mínimo de 7 réplicas de una concentración conocida de cada uno de los analitos, en un nivel medio del intervalo lineal de trabajo, mediante el uso del sistema FIA-CNF-SPE y LSV como técnica electroquímica. Adicionalmente utilizando FIA-CNT-SPE, se calculó la repetibilidad para nitrofurantoína. La precisión se expresó como porcentaje de coeficiente de variación, de acuerdo a la siguiente relación:

Ecuación 3

$$CV = \frac{s}{x} \times 100$$

Donde:

s = es la desviación estándar de la mediciones y

x = media aritmética de las mediciones.

5.8 Análisis de nitrofurantoína en muestras de orina

Una alícuota de 250 μL de una disolución $1,0 \times 10^{-3}$ M de nitrofurantoína se aforó a 25 mL con muestra de orina, obteniendo una muestra fortificada con una concentración de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M. Después de la preparación de esta muestra fortificada se tomó una alícuota de 500 μL y se aforó a 25 mL con disolución de buffer Britton-Robinson/NaCl 0,1 M para ser considerada como adición cero (con una concentración fortificada conocida de $2,0 \times 10^{-7}$ M). Otras dos alícuotas de 500 μL de muestra fueron fortificadas con 0,4 y 0,6 mL de una disolución $1,0 \times 10^{-5}$ M de nitrofurantoína y aforadas con disolución buffer Britton Robinson/NaCl 0,1 M a 25 mL.

La cuantificación de nitrofurantoína se realizó a través del método de adición estándar inmediatamente a través del sistema FIA-CNF-SPE.

5.9 Análisis de nitrocompuestos en muestras de músculo de pollo (comercial y material de referencia de músculo de pollo)

Se adquirió en un centro distribuidor de pollos frescos, ubicado en el “mercado central” de la ciudad de Santiago, el corte de pollo conocido como “trutro”. Una vez en el laboratorio utilizando un cuchillo de cocina se procedió manualmente a quitar toda la

piel, grasa, cartílago y hueso presente en las piezas de pollo. Se picó la carne de pollo en trozos pequeños, posteriormente mediante un procesador de alimentos se trituró hasta la obtención de una pasta. Se guardó en bolsas Ziploc[®] y se congeló hasta su análisis. El material de referencia proporcionado por “UKAS[®] reference materials” ya se encontraba molido y congelado, por lo que no tuvo tratamiento previo.

5.9.1 Incubación

El blanco y las muestras fortificadas de músculo de pollo se sometieron a un proceso de incubación, el cual consiste en mantenerlas a una temperatura de 37 °C en un baño termorregulado y con agitación durante toda la noche.

5.9.2 Extracción

Una vez incubadas, las muestras fueron estabilizadas a temperatura ambiente y posteriormente extraídas de acuerdo al siguiente procedimiento: se agregó 4 mL de acetato de etilo, se agitó en vórtex por dos min y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min y se separó la fase sólida, transfiriendo la fase orgánica a un tubo de centrifuga de vidrio; esta etapa repitió dos veces más. Las tres fracciones recolectadas fueron evaporadas a 40 °C en un bloque de temperatura controlada bajo un flujo de nitrógeno. El residuo fue reconstituido con 1 mL de buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00 y posteriormente lavado con 3 mL de hexano, agitando en vórtex por 2 min y descartando

la fase de hexano ($\times 3$). La muestra fue aforada a 5 mL con buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00 y transferida a una botella ámbar.

5.9.3 Cuantificación de nitrocompuestos en músculo de pollo

Debido a la complejidad de la matriz, la cuantificación de los nitrocompuestos se realizó aplicando el método de adición de estándar. En tres matraces volumétricos de 25 mL se agregó una alícuota de 100 μL de muestra en cada uno. A los siguientes matraces se agregó una cantidad creciente y conocida de cada uno de los analitos en estudio, se aforaron con buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00 y se mezcló bien. Cada una de estas disoluciones, es decir, adición cero y dos muestras adicionadas con concentraciones conocidas fueron analizadas utilizando LSV y el CNF-SPE (previamente activado), asociados a un sistema de inyección en flujo.

5.10 Implementación de la metodología para el análisis de nitrofuranos mediante HPLC-MS

Para identificar el ión molecular y los fragmentos respectivos que se obtienen de cada uno de los analitos, se realizó la fragmentación en forma independiente para cada uno de los nitrocompuestos y sus metabolitos, con las concentraciones indicadas en 2.2.13 a y b. La inyección de los analitos fue realizada en forma directa a la fuente de ionización, por medio de una bomba de jeringa sin pasar por el sistema de HPLC, tal como se muestra en la Figura 1.

Se analizó en ambos modos de ionización, positivo y negativo, a nitrofurantoína, furazolidona, nitrofurazona y furaltadona y sus respectivos metabolitos (2NP-SCA, 2NP-AMAZ, 2NP-AOZ, 2NP-AHD), para establecer los iones moleculares y los fragmentos característicos correspondientes a cada uno de los compuestos en estudio. Posteriormente se procedió a realizar el análisis de los nitrofuranos y metabolitos, pero esta vez utilizando el sistema completo (HPLC-MS). Para tal efecto se utilizó la columna Symmetry Shield RP18 150×2,1 mm 3,5 μ m, aplicando distintas fases móviles, así como ensayando con diferentes gradientes descritas en la literatura³⁸⁻⁴⁸



Figura 1. Configuración utilizada para una inyección directa en la fuente de ionización. La imagen circular muestra un acercamiento de la fuente de ionización, en la cual se aprecia el nebulizador.

Las condiciones instrumentales generales para HPLC-MS fueron las siguientes:

Cromatógrafo Agilent HP-1100 /ESI-IT Bruker Daltonic, Modelo ESQUIRE-4000, modo de ionización: positivo y negativo ESI, Flujo del gas de secado: 10 L/min, Nebulizador: 35 psig, Temperatura del gas de secado: 350 °C, V_{cap} : 5000 V.

Las fases móviles y las gradientes utilizadas fueron las siguientes:

Método 1:

Fase A: ácido fórmico

0,1 % V/V

Fase B: acetonitrilo

Gradiente

%B	t (min)
22	0
99	6
99	9
22	11

Método 2:

Fase A: ácido fórmico

0,1 % V/V

Fase B: acetonitrilo

Gradiente

%B	t (min)
10	0
10	0,5
35	3,0
35	8,0
100	9,0
100	12,0
10	13,0
10	22,0

Método 3:

Fase A: ácido acético

0,025 % V/V

Fase B: acetonitrilo

Gradiente

%B	t (min)
10	0
10	0,5
35	3,0
35	8,0
100	9,0
100	12,0
10	13,0
10	22,0

Método 4:

Fase A: ácido fórmico
0,5 % V/V

Fase B: acetonitrilo

Gradiente

%B	t (min)
20	0
70	20

Método 5:

Fase A: acetato de amonio
0,5 mM

Fase B: metanol

Gradiente

%B	t (min)
10	0
10	0,5
35	3,0
35	8,0
100	9,0
100	12,0
10	13,0
10	22,0

Método 6:

Fase A: acetato de amonio
0,5 mM

Fase B: metanol

Gradiente

%B	t (min)
50	0
50	15

Seleccionadas las condiciones analíticas que se aplicarán para realizar el análisis de los nitrofuranos y sus metabolitos mediante el uso de HPLC-MS, se procedió a optimizar los parámetros instrumentales, utilizando disoluciones de concentración aproximada a 1 mg/L de cada analito, obtenidas a partir de diluciones de las disoluciones madres preparadas de acuerdo a lo descrito en 2.2.13 a y b. Esta operación se realizó mediante la inyección del analito en forma continua al sistema, a través de una conexión T, en la cual se mezclan los fluidos provenientes del sistema HPLC (fase móvil y el analito), tal como se muestra en la Figura 2. Los parámetros óptimos son seleccionados

automáticamente por el instrumento, de acuerdo a la máxima intensidad de la señal obtenida para cada uno de los analitos en forma individual.

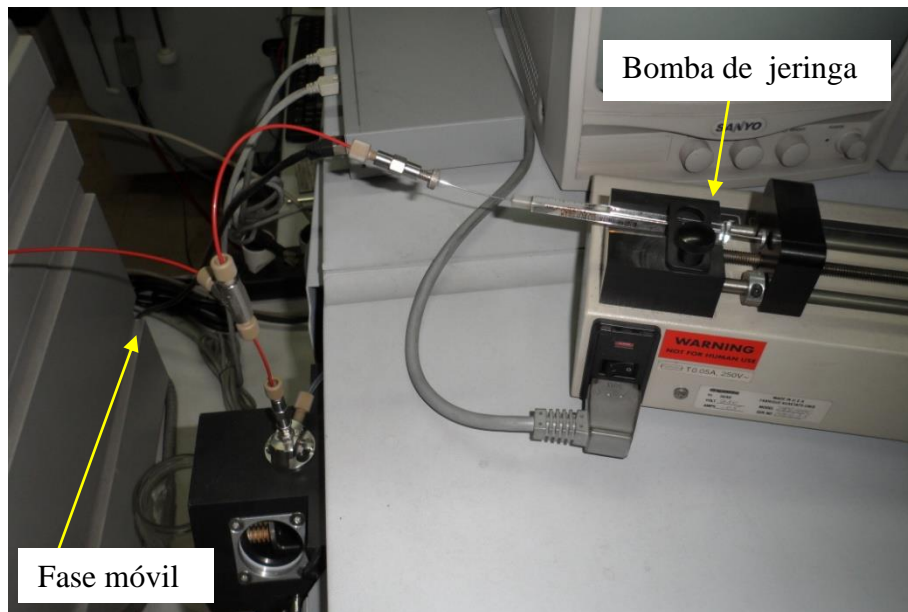


Figura 2. Configuración utilizada en la optimización de los parámetros instrumentales utilizando una bomba de jeringa para la inyección.

6.0 RESULTADOS Y DISCUSIONES

**PRIMERA PARTE: ELECTRODOS DE CARBÓN VÍTREO MODIFICADOS
CON CNT, EN SISTEMA ESTÁTICO.**

6.1 Estudio de pH

Se realizó el estudio del comportamiento de la corriente de reducción de los nitrocompuestos frente a la variación del pH. Para tal efecto se utilizó una superficie electródica conocida, como es el caso del electrodo de carbón vítreo. El análisis se realizó en un sistema por lotes, utilizando aproximadamente 10 mL de disolución de cada uno de los nitrocompuestos. Se aplicó DPV desde un potencial inicial de 0 mV hasta un potencial final de -1100 mV. Los resultados obtenidos del estudio del comportamiento de la corriente de reducción frente al pH fueron graficados, obteniendo las gráficas tridimensionales para i_p y E_p vs pH y de dos dimensiones para i_p vs pH y E_p vs pH, para cada uno de los nitrocompuestos.

Para furazolidona (Figura 3), se observó que la corriente de reducción generó una única señal, bien definida, que corresponde al pico generado por la reducción del grupo nitro vía cuatro electrones, para formar hidroxilamina. Esta única señal aparece desde pH 2,00 hasta pH 8,00; posterior a eso se observa la división de la señal formando dos picos. A valores de pH > 8,00; se observó la formación de un precipitado amarillo. La corriente de pico presenta sus máximos a pH 2,00 y a pH 6,00; con variaciones muy pequeñas entre ellas pero que al sobrepasar pH 8,00 comienza a disminuir notoriamente en intensidad. Se observó un comportamiento de tendencia lineal del potencial de pico frente al pH, desplazándose hacia potenciales más negativos en el intervalo de pH de 2,00 a 8,00. A pH más elevado se observa un comportamiento independiente del

potencial frente al pH, que asociado a la disminución notoria de la corriente i_p indicaría un cambio en la reacción y que podría ser atribuida a la precipitación del compuesto en la disolución.

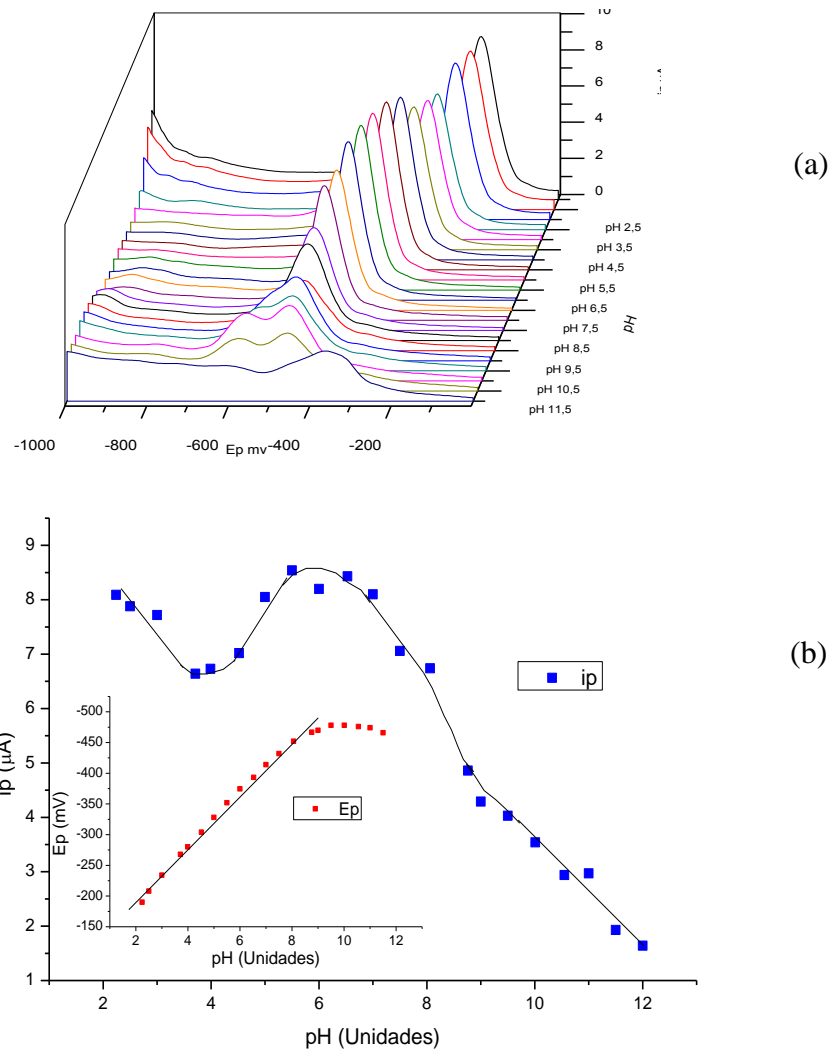


Figura 3. (a) Voltamperogramas de furazolidona $1,0 \times 10^{-4}$ M a diferentes pH. (b) i_p en función del pH y E_p en función del pH, utilizando DPV y electrodo de carbón vítreo. Barrido de potencial desde $E_i = 0$ mV hasta $E_f = -1000$ mV.

Un comportamiento similar al de furazolidona se observó para el resto de los nitrocompuestos en estudio. Todos presentan una única señal correspondiente a los cuatro electrones involucrados en la reacción de reducción del grupo nitro a hidroxilamina. En el caso de furaltadona (Figura 4), esta señal se encuentra ubicada inicialmente a -190 mV (pH 2,00), desplazándose hacia potenciales más negativos a medida que se incrementa el pH. El desplazamiento del potencial tiene un comportamiento de tendencia lineal hasta pH 10,50

La señal correspondiente a la reducción de nitrofurantoína se encuentra a un potencial de -188 mV a pH 2,00 (Figura 5). Se observó que la intensidad de la corriente obtenida utilizando un electrodo de carbón vítreo y DPV, varía desde aproximadamente $9,3$ hasta $11,4$ μ A entre pH 2,00 y 9,00; sin embargo a pH más alcalino la corriente disminuye notoriamente, hasta llegar a la deformación de la señal, dificultando la asignación correcta al valor de i_p .

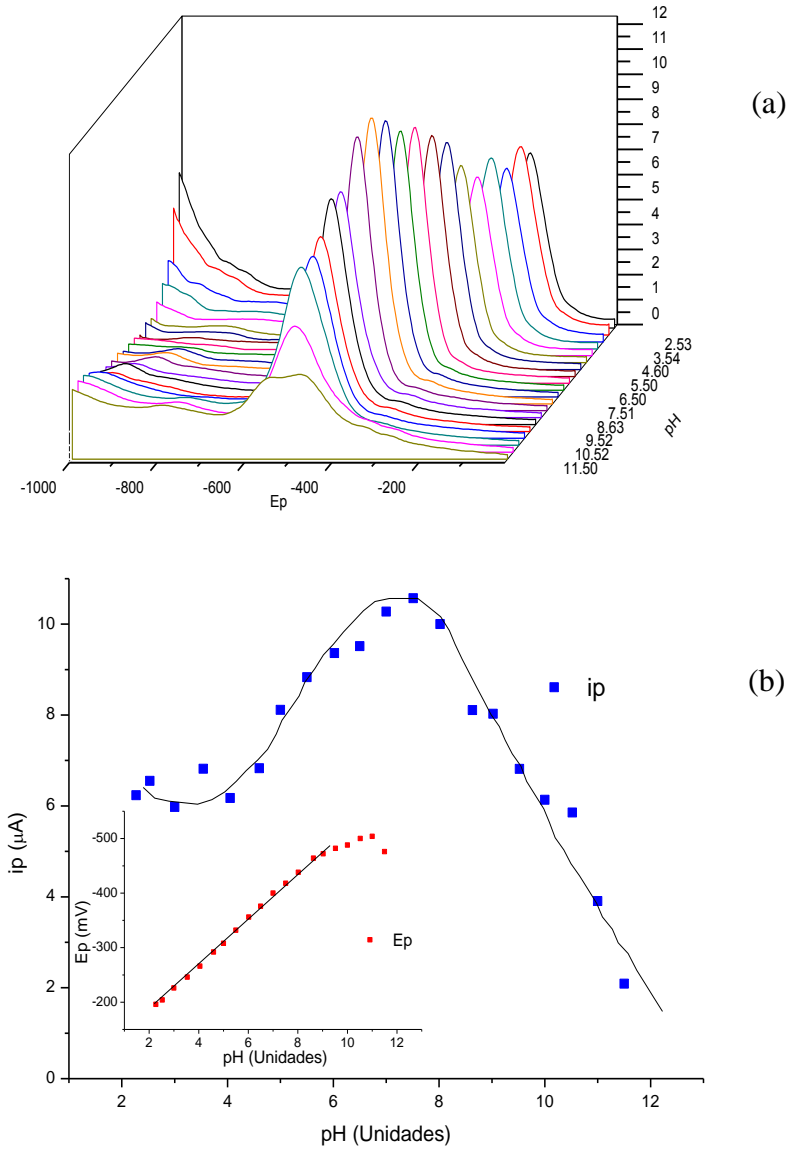


Figura 4. (a) Voltamperogramas de furaltadona $1,0 \times 10^{-4}$ M.a diferentes pH (b) i_p y E_p en función del pH, utilizando DPV y electrodo de carbón vítreo. Barrido de potencial desde $E_i = 0$ mV hasta $E_f = -1000$ mV.

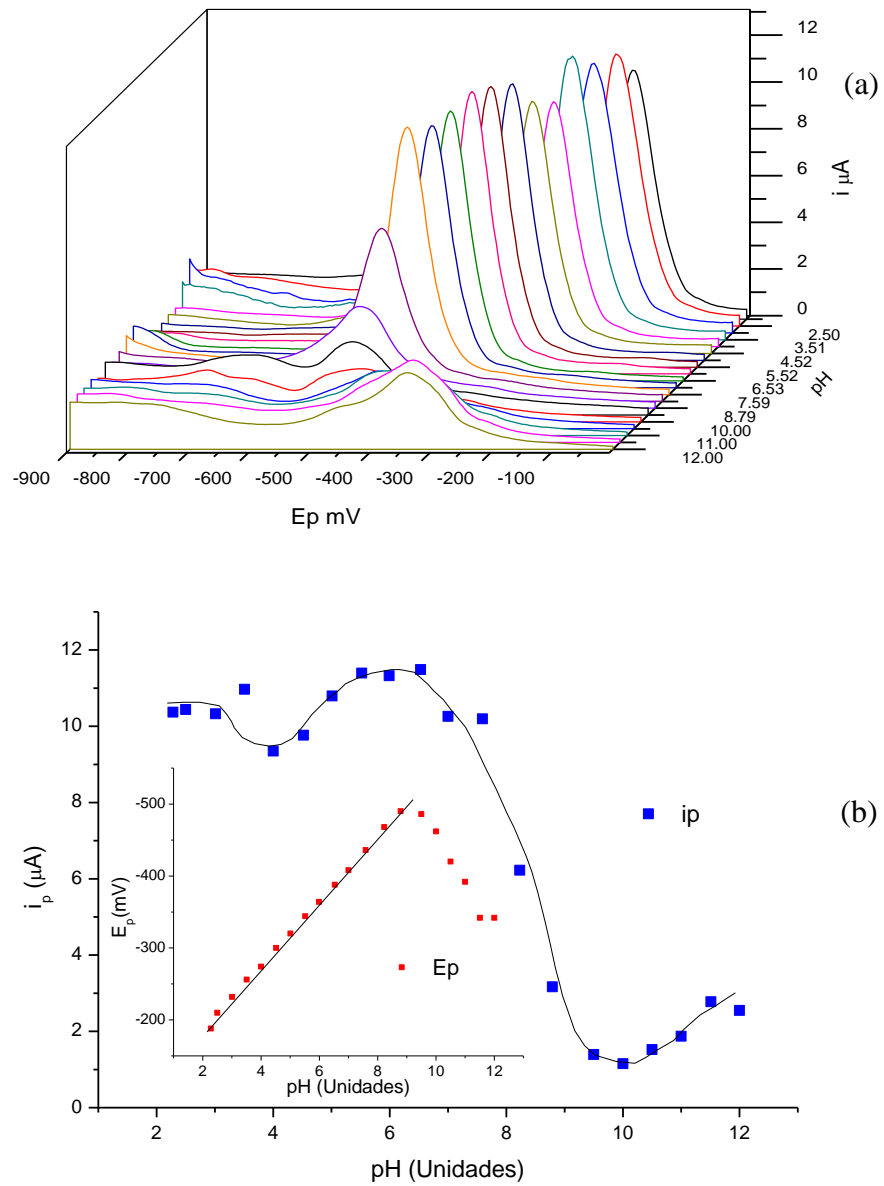


Figura 5. (a) Voltamperogramas de nitrofurantoina $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$. (b) i_p y E_p en función del pH, utilizando DPV y electrodo de carbón vítreo. Barrido de potencial desde $E_i = 0 \text{ mV}$ hasta $E_f = -900 \text{ mV}$.

La gráfica de E_p frente al pH muestra que el comportamiento del potencial de pico consta de dos tendencias lineales principales, cuyo punto de inflexión se encuentra a pH 9,00 y como en los casos anteriores se observa un desplazamiento del potencial de pico hacia valores más negativos.

De acuerdo a los voltamperogramas obtenidos mediante DPV y electrodo de carbón vítreo, en el caso de nitrofurazona (Figura 6) la señal de reducción se observó inicialmente a un potencial de -220 mV a pH 2,00; manteniendo la intensidad de la corriente más o menos estable dentro de un valor de 5 μ A desde pH 2,00 hasta pH 7,00. Posteriormente, a pH más alcalinos, se observa el desdoblamiento de la señal en dos picos, a -400 y -700 mV. De manera análoga a los nitrocompuestos anteriormente descritos, se observa que existe una tendencia lineal de desplazamiento del potencial hacia valores más negativos a medida que se aumenta el pH para nitrofurazona, manteniéndose hasta pH 7,00. Posterior a este valor de pH el comportamiento del potencial se vuelve independiente del pH.

Todas las mediciones realizadas para el estudio de pH y para cada uno de los nitrocompuestos, fueron obtenidas utilizando duplicado de análisis con un coeficiente de variación entre réplicas menores a 3,0 %.

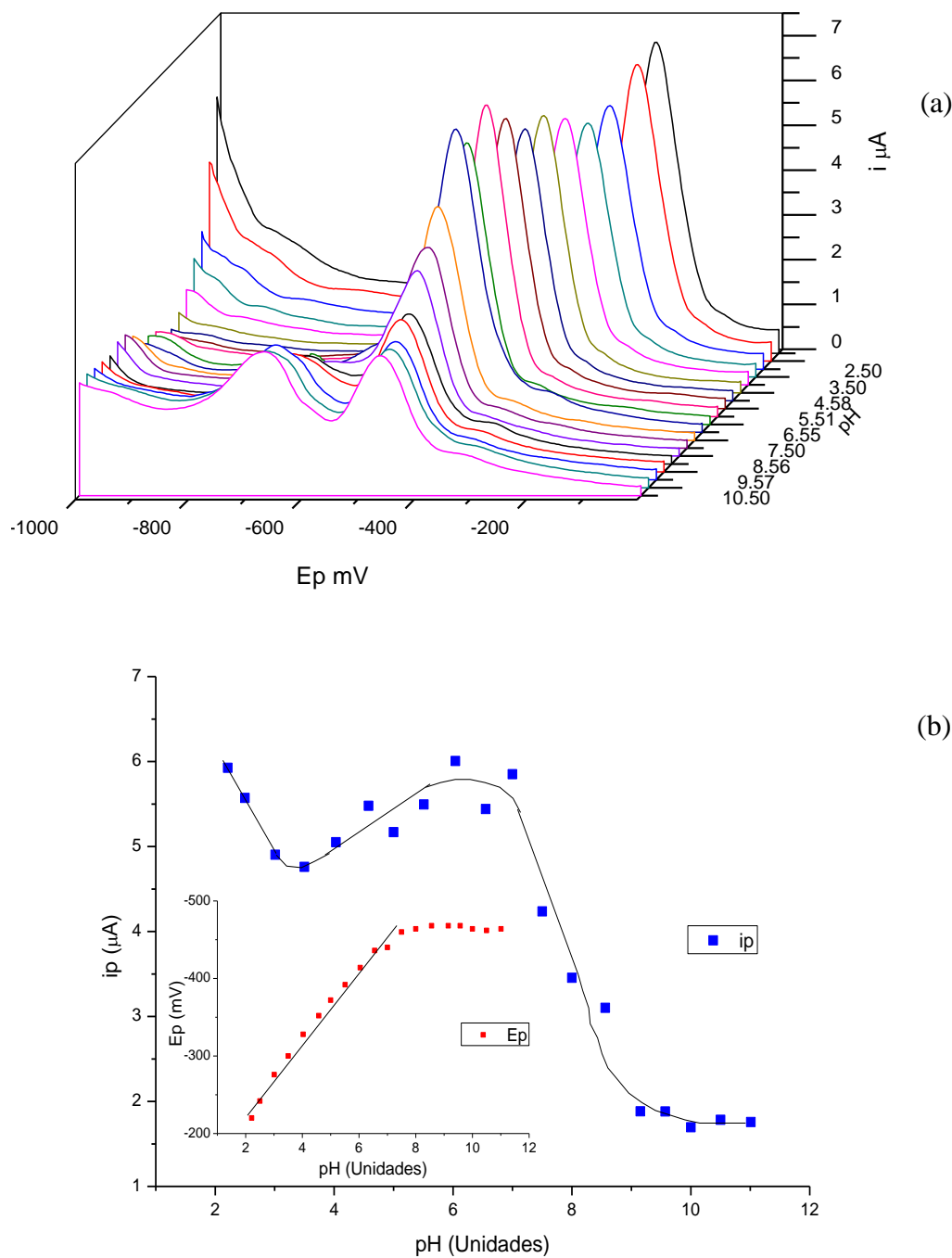


Figura 6. (a) Voltamperogramas de nitrofurazona $1,0 \times 10^{-4}$ M. (b) i_p y E_p en función del pH, utilizando en todos los casos DPV y electrodo de carbón vítreo. Barrido de potencial desde $E_i = 0$ mV hasta $E_f = -900$ mV.

6.2 Modificación de electrodos de carbón vítreo con CNT

6.2.1 Suspensión de CNT en medio acuoso y DMF

Se inició la modificación de los electrodos de carbón vítreo utilizando CNT de multipared (CNT) suspendidos en agua, utilizando una concentración arbitraria de 1 mg de nanotubos por mL de disolvente. De esta suspensión se depositó 5 μL sobre el electrodo y se procedió, según el procedimiento descrito en el punto 2.2.7.

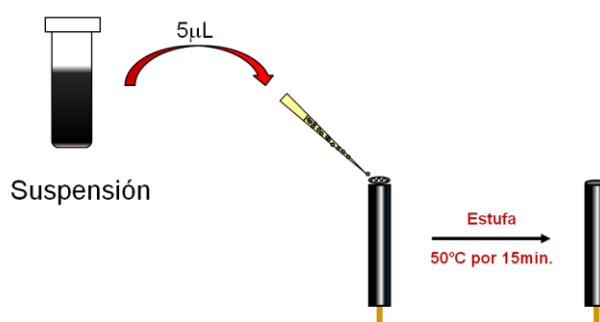


Figura 7. Etapas secuenciales utilizadas en la modificación de los electrodos de carbón vítreo con suspensión de CNT.

Se ensayó el desempeño de estos electrodos de carbón vítreo modificados con CNT, utilizando para tal efecto una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M. mediante DPV y un único electrodo modificado con CNT, se aplicó un tiempo de acumulación de 1.0 min y se midió 7 réplicas para una misma disolución de nitrofurantoína registrando los valores correspondientes de i_p y E_p (desde réplica 1 a réplica 7). Se obtuvo una desviación estándar relativa de 5,7 % (Repetibilidad). Posteriormente se realizó la

medición de una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M por DPV utilizando 7 electrodos diferentes modificados con CNT, se registró los correspondientes 7 valores de i_p y E_p (desde electrodo 1 a electrodo 7). Para este caso se obtuvo un valor de desviación estándar relativa de un 15,1 % (Reproducibilidad). Los resultados se resumen en la Tabla N° 1.

Tabla N° 1. Precisión establecida como repetibilidad y reproducibilidad para nitrofurantoína mediante DPV y electrodos modificados con CNT suspendidos en medio acuoso. Datos de i_p y de E_p obtenidos para nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M, tiempo de acumulación 1 min, velocidad de agitación durante la acumulación de 250 rpm.

Repetibilidad			Reproducibilidad		
ID	E_p (mV)	i_p (μ A)	ID	E_p (mV)	i_p (μ A)
Réplica 1	-184	7,77	Electrodo 1	-184	6,84
Réplica 2	-184	7,68	Electrodo 2	-188	7,11
Réplica 3	-184	7,71	Electrodo 3	-192	7,49
Réplica 4	-184	7,52	Electrodo 4	-192	6,05
Réplica 5	-180	7,23	Electrodo 5	-192	7,11
Réplica 6	-180	6,87	Electrodo 6	-188	8,97
Réplica 7	-180	6,76	Electrodo 7	-188	9,17
Promedio	-182	7,36	Promedio	-189	7,53
DE	2,14	0,42	DE	3,02	1,14
DER	1,17	5,65	DER	1,60	15,1

La alta desviación estándar relativa obtenida se puede explicar debido a que la suspensión de los CNT preparada en medio acuoso no es estable en el tiempo, decantando fácilmente, además de observarse que la película formada se desprendía fácilmente del electrodo de carbón vítreo.

Posteriormente se estudió el comportamiento de la corriente de pico respecto al tiempo de acumulación, obteniendo los voltamperogramas para nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M utilizando DPV y electrodo de carbón vítreo modificado con CNT suspendidos en medio acuoso, con una concentración de la suspensión de 1,0 mg/mL. Consecutivamente se realizó el mismo estudio, pero en esta oportunidad utilizando electrodos modificados con CNT suspendidos en DMF. Se graficó i_p con respecto al tiempo de acumulación para ambos casos.

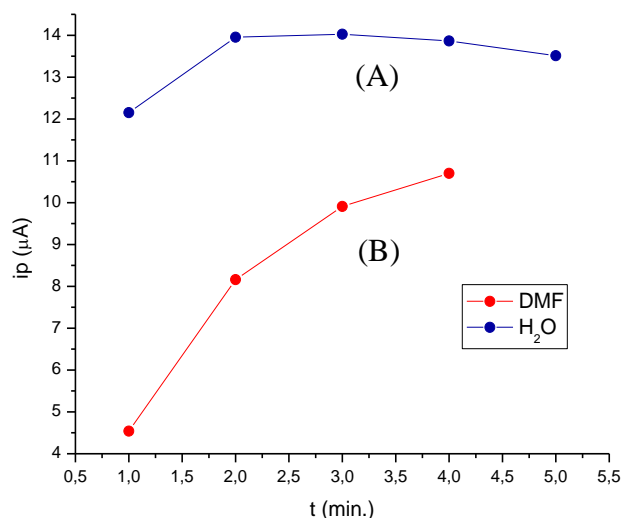


Figura 8. Comportamiento de la corriente i_p con respecto a la variación del tiempo de acumulación medida por medio de DPV. Nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %. Electrodo modificado con CNT concentración de CNT de 1 mg/mL suspendido en agua (a) y DMF (b).

De la Figura 8 se observa que la corriente de pico aumenta para la suspensión preparada en DMF a medida que se aumenta el tiempo de acumulación, no así para el caso de la suspensión preparada en medio acuoso.

Establecido el comportamiento de la intensidad de la corriente de pico frente al tiempo de acumulación, se estudió su comportamiento respecto a la concentración de nanotubos presentes en la suspensión, tanto de aquella preparada en medio acuoso como en DMF. Para tal efecto se modificaron los electrodos de carbón vítreo con diferentes concentraciones de CNT, suspendidos tanto en agua como en DMF. Se prepararon suspensiones que van desde 2,0 hasta 4,0 mg de CNT por mL de disolvente, para posteriormente modificar los electrodos correspondientes.

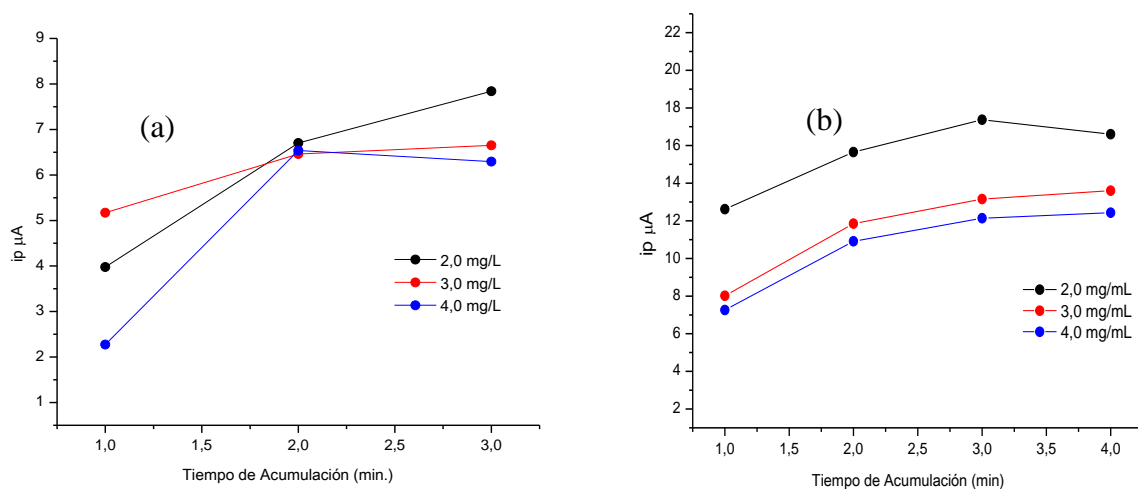


Figura 9. Comportamiento de i_p con respecto al tiempo de acumulación y a la variación de la concentración de CNT presentes en la suspensión utilizada en la modificación del electrodo de carbón vítreo, medida utilizando DPV y electrodo modificado con CNT. (a) Suspensión preparada en medio acuoso. (b) Suspensión de CNT preparados en DMF.

Los resultados obtenidos al utilizar los electrodos modificados con una suspensión de CNT preparada en DMF, muestran que al aumentar el tiempo de acumulación del analito en el electrodo aumenta la intensidad de la respuesta (ip), sin embargo se produce la disminución de la señal a medida que se aumenta la concentración de CNT. Este comportamiento se observa para los electrodos modificados con suspensión en medio acuoso y en medio DMF, utilizando DPV sobre una disolución de nitrofurantoína de concentración $1,0 \times 10^{-4}$ M preparada en buffer Britton-Robinson /DMF 70/30 %.

Debido a que los resultados obtenidos hasta ahora, utilizando la técnica de DPV, presentan una baja respuesta de la corriente para una concentración relativamente elevada de nitrocompuesto ($1,0 \times 10^{-4}$ M), lo que implica una baja sensibilidad del método, es necesario recurrir a la utilización de otras técnicas voltamperométricas como la LSV, ya que es de nuestro interés obtener la mayor respuesta de la corriente frente a la menor concentración posible de nitrocompuesto.

Para la modificación de los electrodos se seleccionó la suspensión de los CNT preparada en DMF, ya que presenta una dispersión de nanotubos más homogénea que aquella preparada en disolución acuosa, además de una mayor estabilidad en el tiempo.

Utilizando una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4}$ M se realizó el estudio de la respuesta de la corriente de reducción del grupo nitro, frente a la variación de la concentración de nanotubos en la suspensión, así como también la respuesta al aumentar

el tiempo de acumulación. Se aplicó LSV y electrodo de carbón vítreo modificado con CNT suspendidos en DMF.

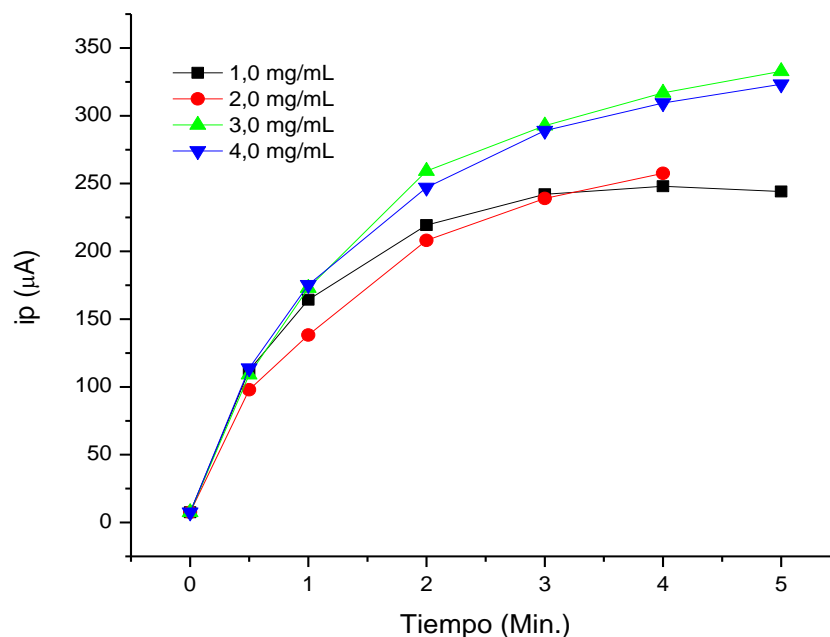


Figura 10. Comportamiento de i_p respecto al incremento del tiempo de acumulación y de la concentración de CNT presente en la suspensión. Concentración nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ preparada en una disolución de buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % v/v. Velocidad de agitación durante la acumulación de 350 rpm, aplicación de LSV.

El cambio de técnica electroquímica favoreció la intensidad de la respuesta, ya que aumentó considerablemente respecto a la obtenida mediante DPV. Se observa en la Figura 10 que a medida que aumenta el tiempo de acumulación, la intensidad de la corriente aumenta hasta llegar finalmente a un *plateau*. Es en este *plateau*, el valor que se seleccionará como el tiempo de acumulación apropiado para experimentos posteriores.

Para el caso del comportamiento de la señal, respecto al aumento de la concentración de CNT en la suspensión, se observó que la corriente de reducción

aumenta al incrementar la concentración de nanotubos, sin embargo a una concentración de 4 mg/mL se obtienen resultados similares a los obtenidos con 3 mg/mL por lo que se seleccionó esta última como la concentración óptima de CNT presentes en la suspensión preparada en DMF.

6.2.2 Suspensión de CNT en Nafión

Se utilizó Nafión al 2 % en etanol como disolvente alternativo para la preparación de la suspensión de los CNT con una concentración de 3,0 mg/mL, de acuerdo a los resultados obtenidos para DMF. Se estudió la respuesta de la corriente de reducción (ip) por LSV, utilizando electrodos modificados con CNT suspendidos en Nafión. Para tal efecto se utilizó una disolución de nitrofurantoína de concentración $5,0 \times 10^{-6}$ M disuelta en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 pH 2,00; una agitación durante la acumulación de 250 rpm y un tiempo de acumulación de 5,0 min. Se realizó la medición por triplicado de la disolución de nitrofurantoína, utilizando un mismo electrodo y posteriormente se realizó la medición de la respuesta pero utilizando un electrodo diferente. Se estudió además el comportamiento de la respuesta (ip), frente al incremento del tiempo de acumulación (Figura 11).

Al comparar los resultados de DER obtenidos a partir de los valores de ip de nitrofurantoína obtenidos por LSV utilizando electrodos modificados con CNT suspendidos en Nafión frente a los resultados de DER obtenidos anteriormente utilizando electrodos modificados con CNT suspendidos en DMF, se observa que la

DER aumenta para aquellos electrodos preparados con la suspensión de CNT en Nafión. Adicionalmente se observa en los voltamperogramas un aumento en el ruido en la línea base (Figura 11a), así como también un aumento en el tiempo de acumulación para alcanzar el *plateau* (Figura 11b).

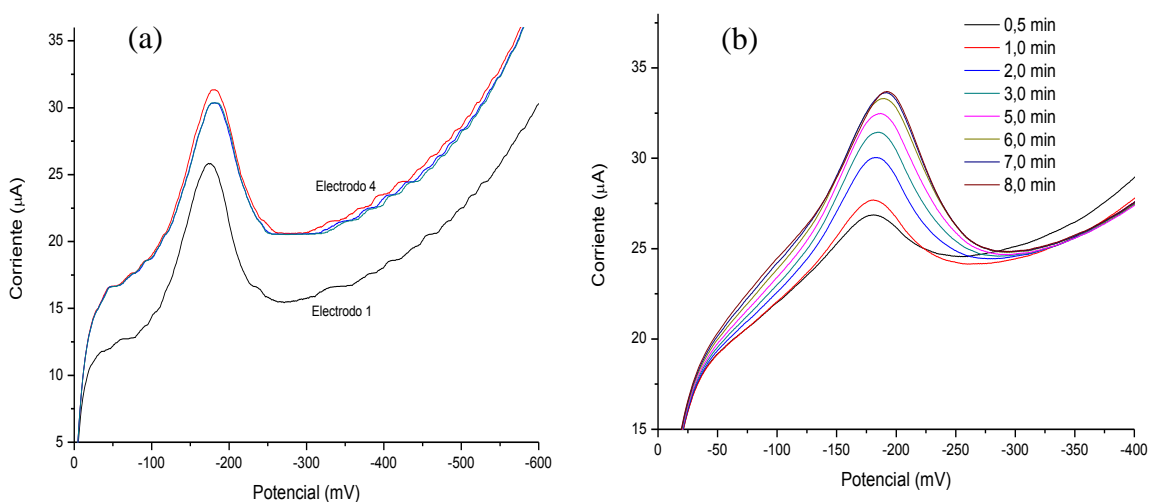


Figura 11. (a) Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M por LSV utilizando electrodo modificado con CNT suspendidos en Nafión al 2%. Réplicas para un mismo electrodo (electrodo 4) y con un electrodo diferente (electrodo 1). (b) Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M a diferentes tiempos de acumulación. Medio buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %, pH 2,00, $E_i = 0$ mV $E_f = -600$ mV.

6.3 Aplicación de un potencial fijo durante la acumulación *versus* sistema abierto.

Se estudió el comportamiento de la respuesta de la corriente de reducción del grupo nitro presente en la nitrofurantoína, al aplicar un potencial fijo durante el período de acumulación. Por medio de este procedimiento se desea disminuir la corriente de fondo y evitar que otra especie pueda ser adsorbida en la superficie del electrodo

modificado con CNT, adicionalmente se busca mejorar la reproducibilidad de las mediciones.

Se utilizó una disolución de nitrofurantoína de concentración de $5,0 \times 10^{-6}$ M, buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %, pH 2,00; aplicando LSV y electrodo modificado con CNT suspendidos en Nafión al 2% en etanol. Se utilizó un tiempo de acumulación de 5,0 min agitando a una velocidad de 300 rpm, durante los cuales se aplicó un potencial fijo de -50 mV. De los resultados obtenidos se establece que la aplicación de un potencial fijo durante el período de acumulación permite mejorar la línea base de los voltamperogramas, sin embargo aumenta el coeficiente de variación lo que se traduce en una disminución de la precisión de las mediciones (Figura 12a). Por otra parte, se observa que la intensidad de la corriente de pico obtenida utilizando circuito abierto es mayor a la corriente obtenida al aplicar un potencial fijo de 50 mV (Figura 12b).

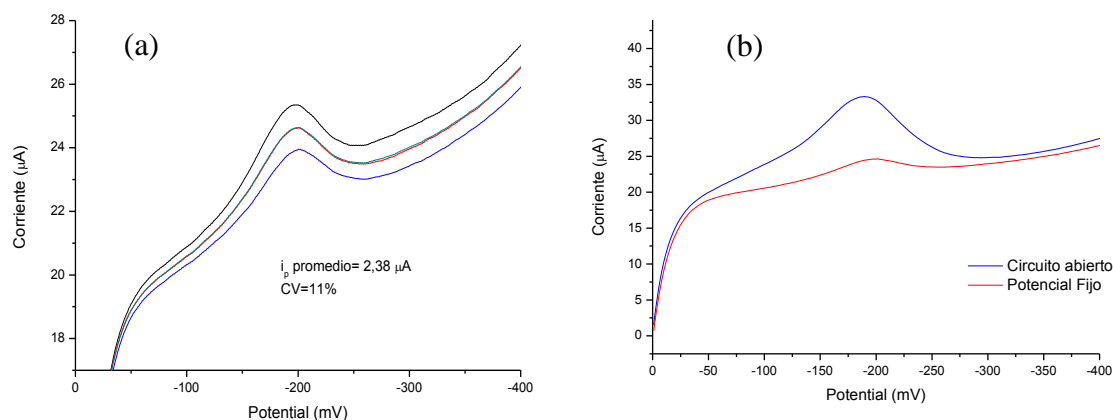


Figura 12. (a) Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M obtenidos al aplicar un potencial fijo de -50 mV por LSV utilizando electrodo modificado con CNT suspendidos con Nafión. (b) Comparación entre los voltamperogramas obtenidos aplicando un potencial fijo de -50 mV y en circuito abierto.

6.4 Estabilidad

Se realizó el estudio de la estabilidad de los nitrocompuestos a la exposición de la luz, utilizando como compuesto representativo de ellos la nitrofurantoína. Para esto se utilizó una disolución de concentración $5,0 \times 10^{-6}$ M disuelta en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 pH 2,00; que fue transferida a una celda transparente sin protección de la luz. Se utilizó LSV con electrodo modificado con CNT suspendidos en DMF (3 mg/mL) esperando 30 min entre cada medición, comenzando desde 0 a 225 min, aplicando un tiempo de acumulación de 5 min y una velocidad de agitación de 300 rpm. De la misma manera se realizaron mediciones de LSV de una nueva disolución de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M en forma secuencial, es decir, se hizo una medición inmediatamente después de finalizada la anterior. Los voltamperogramas obtenidos se resumen en la Figura 13.

De los resultados obtenidos se observa que en ambos casos la intensidad de la corriente disminuye a medida que la disolución se mantiene por más tiempo expuesta a la luz. Esto es indicativo de que los nitrocompuestos son fotosensibles y deben ser manipulados para su medición en celdas electroquímicas protegidas de la luz, así como también que las disoluciones deben ser preparadas en matraces del tipo ámbar o revestidos con papel aluminio.

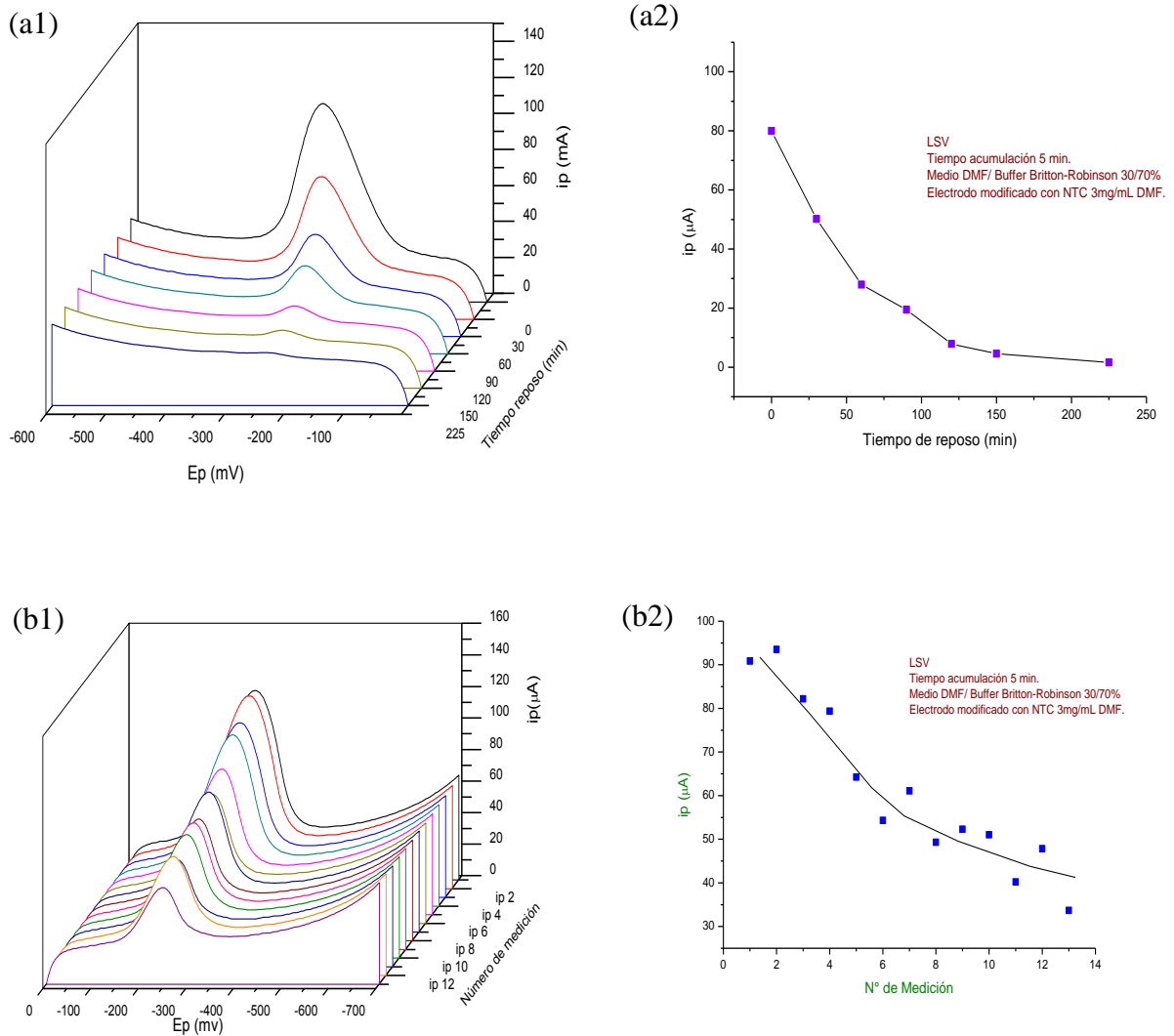


Figura 13. (a) Voltamperogramas de nitrofurantóina $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ obtenidos por LSV, desde 0 hasta 225 minutos de reposo aplicando 5 minutos como tiempo de acumulación. Comportamiento de i_p respecto al tiempo. (b) Voltamperogramas de nitrofurantóina $5,0 \times 10^{-6} \text{ M}$ obtenidos por LSV cada cinco minutos. Comportamiento de i_p respecto al número de mediciones por LSV. Medio Buffer Britton-Robinson/DMF pH 2,00; velocidad de agitación durante la acumulación de 300 rpm, electrodo de carbón vítreo modificado con CNT 3 mg/mL suspendido en DMF.

6.5 Electrodo modificado con CNT suspendidos en DMF: validación del sistema Estático.

6.5.1 Precisión del método

Para realizar el estudio de reproducibilidad de las mediciones, expresada como repetibilidad se utilizó LSV y electrodo de carbón vítreo modificado con CNT suspendidos en DMF, utilizando una concentración de la suspensión de 3,0 mg/mL. El tiempo de acumulación establecido fue de 5,0 min y se utilizó una velocidad de agitación durante la acumulación de aproximadamente 300 rpm (agitador magnético externo). Para el estudio se empleó una disolución de nitrofurantoína de $5,0 \times 10^{-6}$ M disuelta en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % pH 2,00.

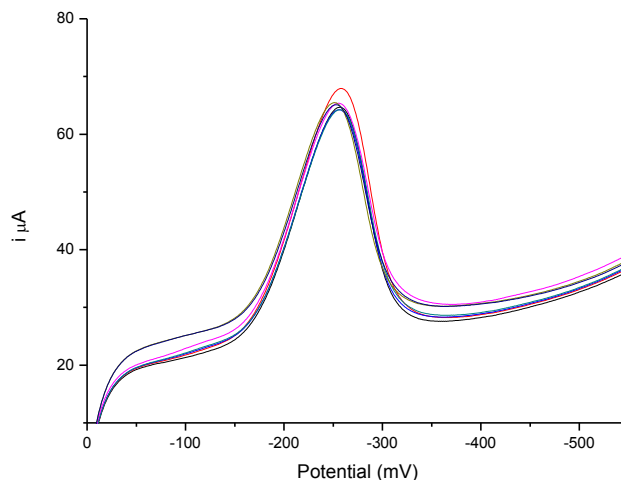


Figura 14. Voltamperogramas (LSV) para nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M utilizando electrodo modificado con CNT suspendidos en DMF, velocidad de agitación 300 rpm, tiempo de acumulación 5 min. DER obtenido de 4,1%.

La repetibilidad fue expresada como coeficiente de variación, utilizando la desviación estándar aplicada a siete réplicas de una misma concentración de nitrofurantoína, obteniéndose un valor de 4,1 %. Los voltamperogramas de cada una de las soluciones se presentan en la Figura 14.

6.5.2 Estimación del intervalo lineal

Se realizó un estudio de concentración, de tal forma de establecer el intervalo lineal para la respuesta de corriente de reducción del grupo nitro presente en la nitrofurantoína. De este modo se analizaron distintas concentraciones de nitrofurantoína en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % pH 2,00; partiendo desde $5,0 \times 10^{-8}$ M hasta $1,0 \times 10^{-4}$ M aplicando LSV y electrodo de carbón vítreo modificado con CNT suspendidos en Nafión, así como también suspendidos en DMF, ambos en una concentración de 3,0 mg/mL. Se utilizó un tiempo de acumulación de 5,0 min y una velocidad de agitación durante la acumulación de 300 rpm. Las condiciones utilizadas fueron aquéllas resultantes de las optimizaciones realizadas anteriormente. Los valores de corriente fueron graficados *versus* la concentración. En las Figuras 15a y 15b se muestra la respuesta (ip) frente a la concentración, obtenidas al aplicar LSV usando electrodo modificado con CNT suspendidos en Nafión 3,0 mg/mL y en las Figuras 15c y 15d se presenta el comportamiento para la corriente de pico obtenida con electrodo modificado con CNT suspendidos en DMF.

En el caso de los datos obtenidos con los electrodos modificados con CNT suspendidos en Nafión al 2% en etanol, se observa que la linealidad se pierde a partir de

la concentración de $5,0 \times 10^{-5}$ M, sin embargo se obtiene un amplio intervalo lineal del cual se podrá establecer el intervalo de trabajo.

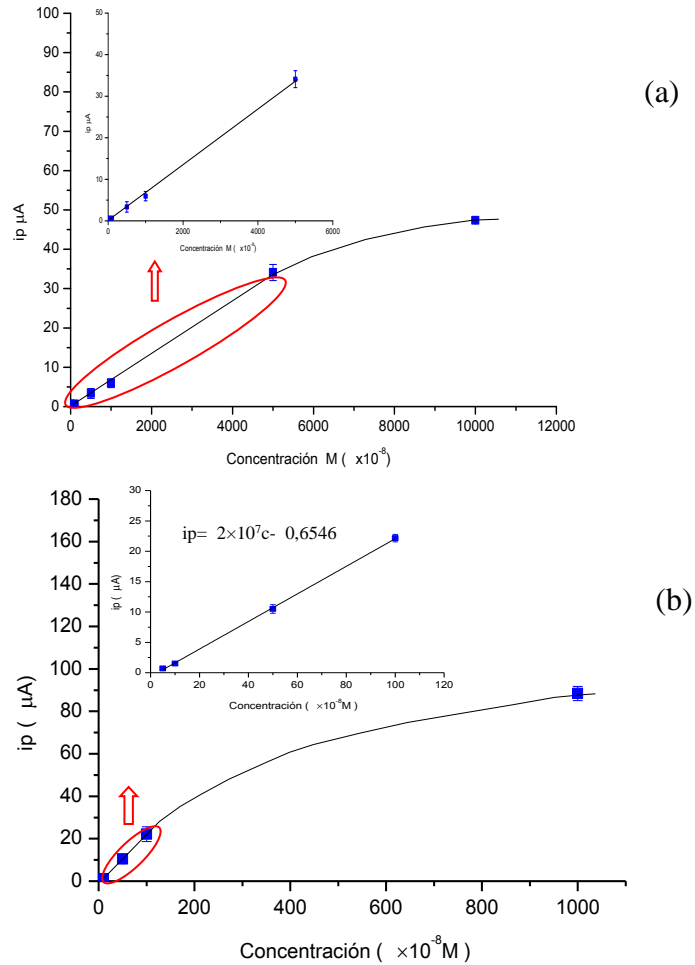


Figura 15. Estimación del intervalo lineal e intervalo lineal de trabajo de Nitrofurantoína, determinado utilizando LSV para electrodo de carbón vítreo modificado con CNT (a) suspendidos en Nafión y (b) suspendidos en DMF. Medio buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % pH 2,00.

En el caso de los resultados obtenidos utilizando los electrodos modificados con CNT suspendidos en DMF, se observa la pérdida de la linealidad a partir de una concentración

de $1,0 \times 10^{-6}$ M de nitrofurantoína, lo que indica una mayor sensibilidad a bajas concentraciones. Se obtiene un intervalo lineal desde $5,0 \times 10^{-8}$ M hasta $1,0 \times 10^{-6}$ M, dentro del cual se establecerá el intervalo lineal de trabajo.

6.6 Modificación de electrodos con CNT-COOH en medio DMF: validación del sistema estático

6.6.1 Intervalo lineal

Con la finalidad de mejorar la respuesta obtenida anteriormente con los electrodos modificados con CNT suspendidos en agua, DMF y Nafión al 2%, se utilizó CNT oxidados (CNT-COOH), para modificar los electrodos de carbón vítreo. En la Figura 16 se representa el estudio del comportamiento de la respuesta ip respecto a la concentración de nitrofurantoína, utilizando un electrodo modificado con CNT oxidados suspendidos en DMF (3 mg/mL), mediante LSV. Se estudió desde una concentración de $5,0 \times 10^{-8}$ M hasta una concentración de $6,0 \times 10^{-7}$ M de nitrofurantoína, considerando los intervalos obtenidos anteriormente, haciendo un barrido de potencial desde 0 mV hasta un potencial final de -600 mV, utilizando una velocidad de agitación de la disolución durante la acumulación de 300 rpm. Se obtuvo un comportamiento lineal como intervalo lineal de trabajo, con un coeficiente de correlación de 0,9998

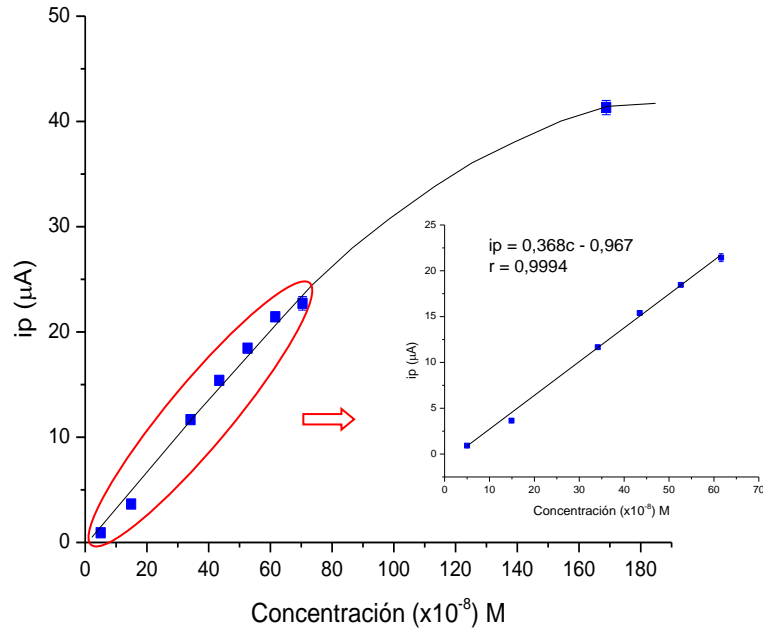


Figura 16. Estimación del intervalo lineal e intervalo lineal de trabajo de nitrofurantoína, obtenido utilizando electrodo modificado con CNT oxidados suspendidos en DMF (concentración de la suspensión de nanotubos 3mg/mL), medio Buffer Britton-Robinson/DMF 70/30%, pH 2,00.

6.6.2 Límite de detección

Para la estimación del límite de detección se trabajó en la parte baja del intervalo lineal obtenido, utilizando una concentración de nitrofurantoína de $5,0 \times 10^{-8}$ M. Los voltamperogramas fueron obtenidos aplicando LSV y electrodo modificado con CNT oxidados suspendidos en DMF (3 mg/mL). Se analizaron 9 disoluciones independientes de nitrofurantoína de una concentración de $5,0 \times 10^{-8}$ M y se obtuvieron los voltamperogramas registrando los valores de ip para cada medición, aplicando un tiempo de acumulación de 5 min y una velocidad de agitación durante la acumulación de 300 rpm. Los resultados obtenidos fueron tabulados en la Tabla N° 2.

Tabla N° 2. Resumen de resultados obtenidos en la determinación del LD utilizando LSV y electrodo modificado con CNT-COOH en DMF.

N° Réplica	ip (μA)	Concentración $\times 10^{-8}$ M
1	0,809	5,6
2	0,422	4,5
3	0,636	5,1
4	0,426	4,5
5	0,536	4,8
6	0,458	4,6
7	0,369	4,4
8	0,620	5,0
9	0,314	4,2
Promedio	0,510	4,7
DE	0,120	0,42

Considerando las 9 réplicas y un valor de $t_{((n-1), 0,99)}=2,896$ se realizó el cálculo del límite de detección, utilizando la siguiente expresión:

$$LD = t_{((n-1), 0,99)} \times DE$$

El límite de detección obtenido para nitrofurantóina utilizando el electrodo de carbón vítreo modificado con CNT oxidados fue $1,2 \times 10^{-8}$ M.

6.6.3 Precisión

Se estableció la precisión del método utilizando para ello 7 réplicas de una disolución de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %, pH 2,00. Se utilizó un tiempo de acumulación de 5 min y una velocidad de agitación de 300 rpm durante la acumulación, la técnica aplicada fue LSV y electrodo de carbón vítreo modificado con CNT oxidados (3,0 mg/L). La precisión fue establecida como repetibilidad y expresada como DER. El valor obtenido para la precisión fue de 3,3%. Los voltamperogramas obtenidos se representan en la Figura 17.

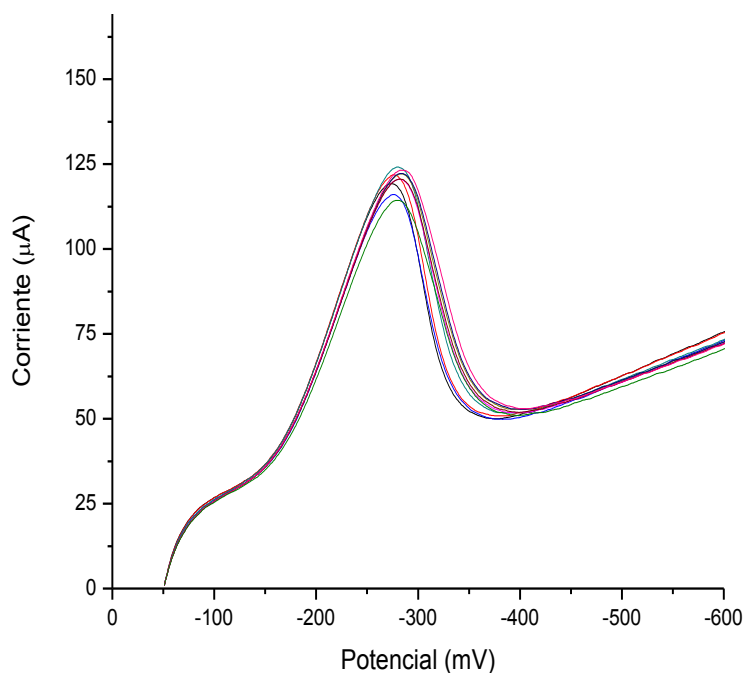


Figura 17. Voltamperogramas de nitrofurantoína $5,0 \times 10^{-6}$ M por LSV y electrodo modificado con CNT-COOH 3,0 mg/mL en DMF, 7 réplicas en buffer Britton-Robinson/DMF 70/30%, pH 2,00; tiempo de acumulación 5 min, agitación 300 rpm.

**SEGUNDA PARTE: ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE NANOTUBOS Y
NANOFIBRA DE CARBONO, SISTEMA FIA**

6.7 Sistema de inyección en flujo.

Se implementó el análisis de nitrocompuestos, que hasta ahora sólo había sido desarrollado en nuestro laboratorio en sistema estático, en un sistema de inyección en flujo. Además se incorporó la aplicación de electrodos serigrafiados de nanoestructuras de carbono, como son nanofibra y CNT.

Para poder utilizar los electrodos del tipo serigrafiados en un sistema FIA, se desarrolló en el laboratorio una celda en material acrílico de tal forma que permitiera el paso del flujo de la muestra y de la disolución transportadora sobre el electrodo, el cual es una lámina cerámica de $3,4 \times 1,0 \times 0,05$ cm en la que se incorporan los tres electrodos requeridos (trabajo, auxiliar y referencia), Figura 18. Adicionalmente se fabricaron dos circuitos de manguera de Tygón de 0,7 mm de diámetro (“loop”), los cuales individualmente contienen un volumen de 2,0 mL. Inicialmente se optimizó la respuesta de la corriente para nitrofurantoína utilizando un electrodo serigrafiado de CNT (CNT-SPE), mediante LSV y utilizando sólo uno de los dos loops, obteniendo así un tiempo de acumulación de 90 s. Se utilizó como disolución transportadora buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00; sin embargo la respuesta obtenida no fue lo suficientemente intensa como para poder alcanzar los niveles de detección brindados por los electrodos de carbón vítreo modificados con CNT. Debido a la baja respuesta encontrada se decidió aumentar el tiempo de acumulación añadiendo un segundo loop, proporcionando en conjunto un tiempo de acumulación de 180 s, lo que mejoró la intensidad de la respuesta

de la ip. Establecidos los parámetros de operación del sistema FIA se observó la respuesta de ip, utilizando un electrodo serigrafiado de CNF.

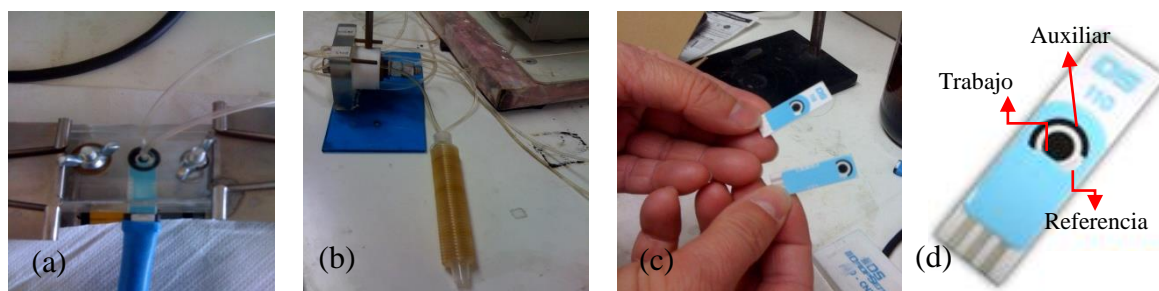


Figura 18. (a) celda de reacción en la cual se inserta el electrodo SPE. (b) Loop de 2 mL, (c) electrodos serigrafiados de nanoestructuras de carbono y (d) Descripción de un electrodo serigrafiado (trabajo, referencia, auxiliar).

6.7.1 Pretratamiento de activación para SPE

Durante el desarrollo del análisis se observó que la corriente de pico obtenida utilizando el CNT-SPE y CNF-SPE, aumentó al hacer pasar una disolución de buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % por el sistema FIA. Dada esta situación se decidió sumergir los electrodos serigrafiados en una disolución de buffer/DMF de la misma concentración por un corto periodo de tiempo, enjuagándolo posteriormente con agua desionizada, para después ser usado durante el análisis voltamperométrico. Se observó un incremento considerable en la intensidad de la corriente proveniente de la reducción del grupo nitro después de realizar este procedimiento. Debido al incremento observado en la respuesta de la corriente, se realizó un estudio del efecto producido por esta disolución en los electrodos serigrafiados, estimando el área electro activa incrementada, así como los

cambios en la morfología de la superficie de los electrodos, además del porcentaje óptimo de DMF en la disolución de activación y el tiempo de activación de los electrodos. Recientemente otros autores han utilizado DMF para obtener un incremento del área electroactiva de los electrodos serigrafiados⁵³. Los voltamperogramas obtenidos antes y después de la activación de los electrodos se muestran en la Figura 19.

Se realizó el tratamiento con la disolución de buffer Britton-Robinson/DMF para el electrodo de CNT y de CNF. En ambos casos se utilizó una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M, aplicando LSV y utilizando un tiempo de acumulación de 180 s. De los resultados obtenidos se observó que la mayor diferencia entre las respuestas de ip para nitrofurantoína, utilizando los electrodos activados y sin activar, se obtuvo al utilizar electrodo de CNF-SPE.

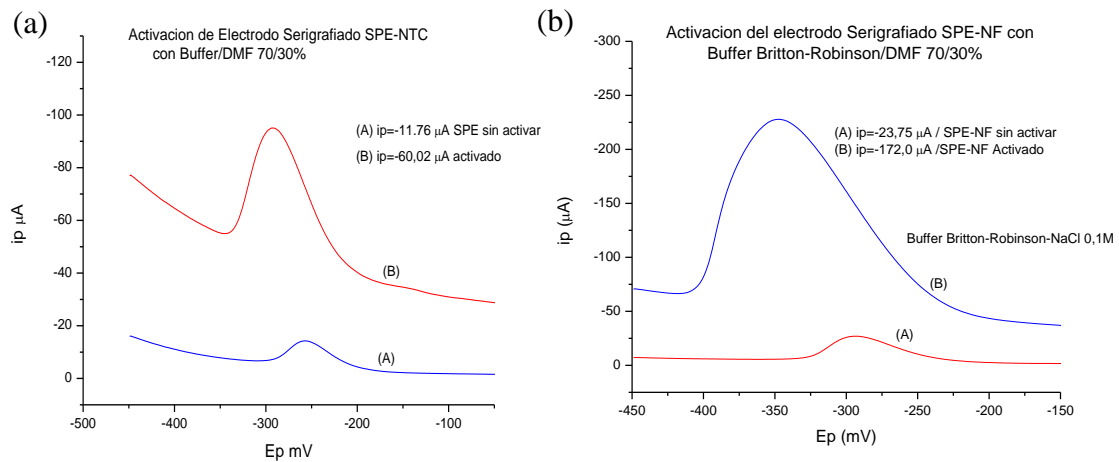


Figura 19. Comparación entre los voltamperogramas obtenidos para nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M mediante LSV y sistema FIA, tiempo de acumulación de 180 s para: (a) CNT-SPE, sin activar (A) y activado (B); (b) CNF-SPE, sin activar (A) y activado (B). Medio buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %. pH 2,00

6.7.2 Porcentaje óptimo de DMF en la disolución de activación

Las propiedades de poros de cualquier material relacionado con el grafito, incluyendo los CNT y nanofibras, son gobernadas principalmente por su textura. De acuerdo a la IUPAC los poros pequeños se pueden clasificar como microporos o nanoporos y corresponden a aquéllos con diámetro (ϕ) < 2 nm, mesoporos ($2 \text{ nm} < \phi < 50 \text{ nm}$) y macroporos ($\phi > 50 \text{ nm}$)⁴⁹. Tanto el carácter mesoporoso de la nanofibra de carbono así como el número de poros disponibles en ella, pueden afectar su conductividad eléctrica. La creación de poros en una superficie determinada, mediante la utilización de disolventes tales como DMF y tetrahidrofurano, es una propiedad que ha sido estudiada por diferentes autores⁵⁰⁻⁵². Bajo ciertas condiciones de temperatura, humedad y concentración se puede dirigir la creación de poros, incluyendo el tamaño y forma del poro. En el proceso de pretratamiento de nuestros electrodos serigrafiados, son sumergidos en una disolución de buffer Britton-Robinson/DMF (70/30 %) por un periodo definido de minutos. En este proceso se produce un aumento en la cantidad de poros presentes en el electrodo de nanofibra de carbono gracias a la presencia de la DMF, con el consiguiente aumento de la respuesta electroquímica. A este proceso se le llamará de ahora en adelante “activación”.

Los electrodos serigrafiados de CNF fueron activados con las siguientes disoluciones preparadas con una concentración de 10, 30, 50, 70 y 100 % de DMF. Una vez que los electrodos fueron activados se lavaron con agua Milli-Q y se retiró el exceso de agua. Utilizando una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M y mediante FIA-LSV

se registraron las corrientes de pico de cada señal obtenida con cada uno de los electrodos serigrafiados activados, incluyendo además un electrodo serigrafiado de CNF sin activar. Se graficó i_p vs porcentaje de DMF en la disolución de activación (Figura 20).

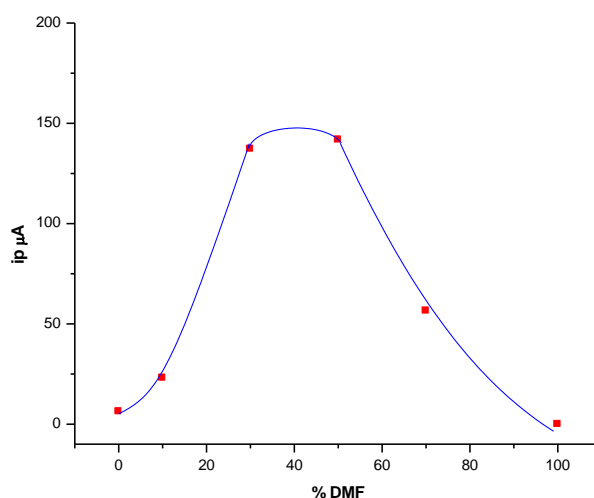


Figura 20. Corriente i_p de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M por FIA-LSV utilizando electrodos serigrafiados de CNF, activados con disoluciones de distintos porcentajes de DMF.

Se observó que se produce un incremento de la corriente de pico a medida que se aumenta la concentración de DMF en la disolución de activación. Se obtiene un máximo de corriente a una concentración de 40 % de DMF, posteriormente la corriente de pico comienza a disminuir hasta perderse completamente la señal, cuando se utiliza 100 % de DMF como disolución de activación. Queda en evidencia que la presencia de DMF en la disolución de activación ayuda al incremento del área activa del electrodo serigrafiado y a la formación de nuevos sitios de adsorción, ya que la respuesta electroquímica de la

nitrofurantoína aumenta considerablemente; sin embargo un exceso de DMF en la disolución de activación, mayor al 50 %, se transforma en un componente adverso, puesto que la corriente de reducción de la nitrofurantoína (i_p) disminuye, hasta perderse completamente.

De acuerdo a la Figura 20, se deduce que la concentración óptima de DMF en la disolución de activación es 40 %, sin embargo debido a que es evidente que la presencia de una elevada concentración de DMF en la disolución es perjudicial para la integridad del electrodo, además de que la intensidad de la corriente es también elevada, se seleccionó 30 % de DMF como concentración óptima en la disolución de activación, para aplicarla en el pretratamiento de los electrodos serigrafiados de CNF.

6.7.3 Optimización del tiempo de activación de los electrodos serigrafiados

Una vez establecido el porcentaje de DMF en la disolución activadora, se procedió a optimizar el tiempo durante el cual el electrodo debe ser sumergido en la disolución activadora. Los electrodos serigrafiados de CNF fueron sumergidos por 5, 10, 15, 30 y 60 min en la disolución de buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %, para que posteriormente cada uno de ellos sea utilizado para realizar el análisis de una disolución de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M, mediante LSV y sistema de inyección en flujo. Se registraron los valores de i_p y se graficó frente al tiempo de activación de los electrodos serigrafiados de CNF (Figura 21). De los resultados obtenidos se observa que a medida que aumenta el tiempo durante el cual los electrodos se encuentran sumergidos en la

disolución activadora, aumenta la respuesta de la corriente de reducción del grupo nitro; sin embargo, este incremento se produce hasta que el electrodo se ha sumergido durante 15 min en la disolución de activación. De aquí en adelante se obtienen valores de corrientes de pico con intensidades similares en magnitud, pero que disminuyen levemente en relación al aumento del tiempo de acumulación. Por tal motivo, se seleccionó 15 min como tiempo óptimo de activación de los electrodos serigrafados.

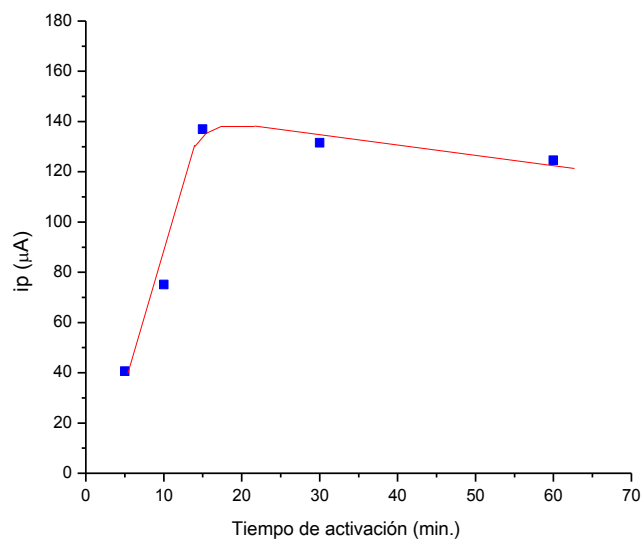


Figura 21. Corriente ip de nitrofurantoína $1,0 \times 10^{-5}$ M por FIA-LSV utilizando CNF-SPE activados, a distintos periodos de inmersión del electrodo en la disolución de buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %.

6.7.4 Incremento del área electroactiva de los SPE

El proceso de activación consiste en sumergir durante 15 min el electrodo en una disolución de buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %. Este procedimiento se utilizó para incrementar el área electroactiva del electrodo. Este aumento de área activa se debe al

aumento de los sitios de adsorción en la superficie del electrodo. En primera instancia se verificó el incremento del área electroactiva de los electrodos por medio de cronocoulombimetría, haciendo uso de un compuesto plenamente caracterizado como ferricianuro de potasio.

6.7.4.1 Cronocoulombimetría

La medición del área se realizó antes y después de la aplicación del procedimiento de activación. La selección de los potenciales de inicio y final aplicados en cronocoulombimetría fueron determinados mediante voltamperometría cíclica (Figura 22a). La respuesta cronocoulombimétrica (Q) frente al tiempo (t) para una disolución de ferricianuro de potasio 1,1 mM, utilizando un electrodo serigrafiado activado y sin activación se muestra en la Figura 22b. Aplicando la ecuación de Anson y graficando Q frente a $t^{1/2}$ se determinó el valor del área activa del electrodo serigrafiado, obteniéndose un valor de 0,4119 mm² para el área del electrodo sin activación *versus* un área de 7,6631 mm² para el electrodo activado. La razón “R” obtenida entre las áreas activas de ambos electrodos es de R=18,6. Esto es indicativo de que la disolución activadora del buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % tiene un efecto positivo en la generación de sitios de adsorción sobre el electrodo serigrafiado.

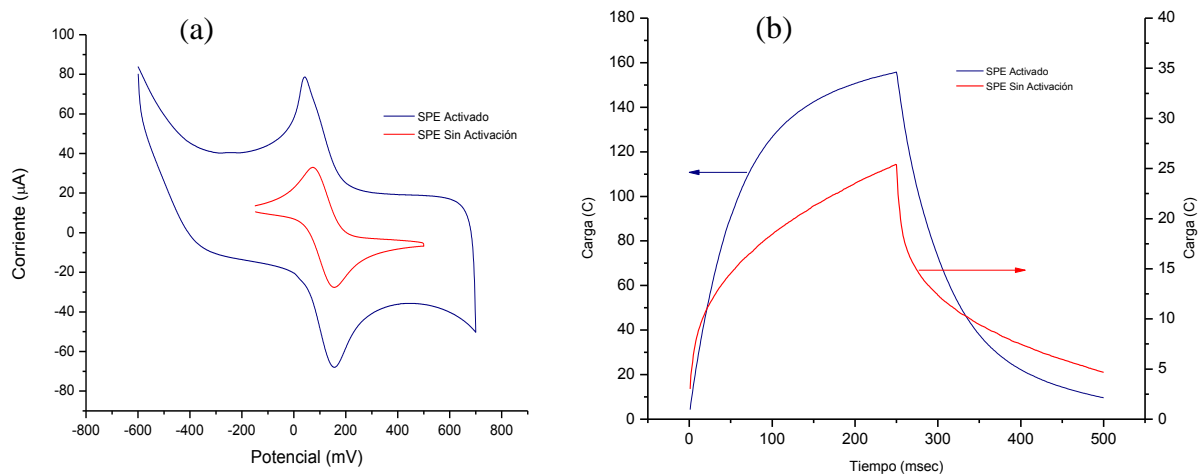


Figura 22. (a) Voltamperogramas cíclicos de ferricianuro de potasio 1,1 mM en KCl 0,1 M, pH 3,00 obtenidos para un electrodo de nanofibra de carbono (—) activado y (---) sin activar (b) respuesta cronocoulombimétrica para la reducción de ferricianuro de potasio 1,1 mM en KCl 0,1 M, pH 3,00 obtenidos con electrodos CNF-SPE (—) activados y (---) sin activación.

De acuerdo a los resultados obtenidos de las pendientes e interceptos de las rectas a partir del gráfico de Anson, se observa que nos enfrentamos a un proceso de adsorción de reactantes y productos, debido a que los valores de las pendientes así como los valores de los interceptos son diferentes, ya que se sabe que pendientes iguales y opuestas así como interceptos idénticos reflejan la no adsorción de reactantes o productos.

En ambas técnicas electroquímicas (voltamperometría cíclica y cronocoulombimétrica), se observa un incremento en la respuesta, tanto en corriente como en la carga. Esto se observa al realizar el análisis del mismo analito en el electrodo sin activación *versus* electrodo activado, lo que nos lleva a suponer *a priori* que existe la

generación de una nueva área activa (nuevos sitios de adsorción), en el electrodo serigrafiado (Figura 23).

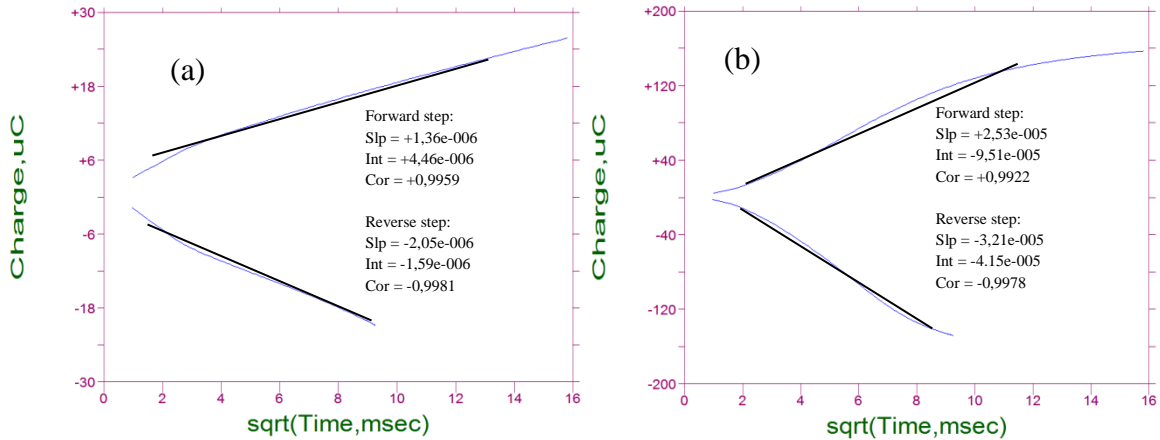


Figura 23. Gráficos de Anson obtenidos a partir de los resultados obtenidos por cronocoulombimetría: (a) CNF-SPE sin activación y (b) CNF-SPE activado.

6.7.4.2 Obtención de imágenes SECM

Para la obtención de las imágenes SECM se construyó una celda para ser utilizada con electrodos serigrafiados. Esta celda fue elaborada en material acrílico, la cual consta de dos partes, una base en la cual se ha hecho un corte de la profundidad y ancho del cuerpo del electrodo (lámina cerámica), la parte superior de la celda posee un orificio en el centro que deja expuesta el área del electrodo serigrafiado. Al juntar ambas partes se forma una celda de flujo que permite un volumen de aproximadamente $400 \mu\text{L}$, cuya base es el electrodo serigrafiado, tal como lo muestra la Figura 24, en la cual se inserta el ultra microelectrodo para la obtención de las imágenes.

Previamente a la obtención de las imágenes se realizó la activación de la mitad del electrodo serigrafiado, utilizando la disolución de activación (buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %) y la otra mitad permaneció sin activar. Este electrodo serigrafiado de nanofibras es el que será usado como electrodo sustrato y será situado en la base de la celda acrílica para poder obtener la imagen.

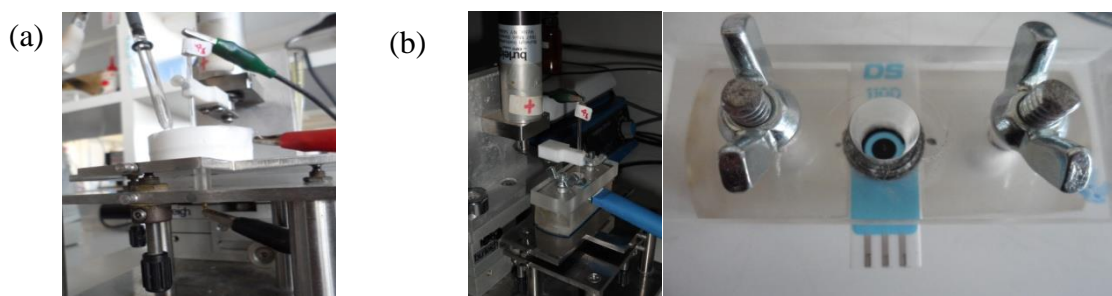


Figura 24. (a) celda comercial convencional para SECM elaborada en teflón, (b) celda exclusiva para electrodos serigrafiados desarrollada en material acrílico.

Utilizando una disolución de ferrocenometanol (FcMeOH) 1,1 mM en KCl 0,2 M como mediador redox, se probó la aptitud del ultramicroelectrodo (UME) para la obtención de imágenes. Esto se realizó aplicando la técnica de voltamperometría cíclica, como se muestra en la Figura 25a. La obtención de una curva en forma de S es indicativa de que el UME posee las condiciones apropiadas para hacer el barrido, esto se refiere a que la punta del electrodo mantenga su forma cónica y centrada. La voltamperometría cíclica nos entrega la información necesaria acerca de los potenciales de reducción y oxidación de FcMeOH, parámetros que nos serán útiles posteriormente para obtener la imagen.

Una vez que la celda y los electrodos estuvieron conectados (referencia, auxiliar, ultramicroelectrodo y sustrato), se obtuvo la curva de aproximación. Esto se realizó alejando el UME de la superficie del sustrato unos 50 μm , obteniendo con esto la corriente estacionaria (Figura 25b). El desplazamiento del electrodo hacia el sustrato se produce hasta que el valor de la corriente es equivalente al 125 % el valor de la corriente estacionaria. Esta es la posición adecuada para obtener la imagen electroquímica del sustrato (CNF-SPE).

La obtención de las imágenes se realizó barriendo en el sentido del eje y en ambos sentidos (de ida y de regreso), utilizando un área de barrido de 200 $\mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ a una velocidad de barrido de 30 $\mu\text{m/s}$, para cada uno de los estados del electrodo serigrafado, es decir, activado y sin activar.

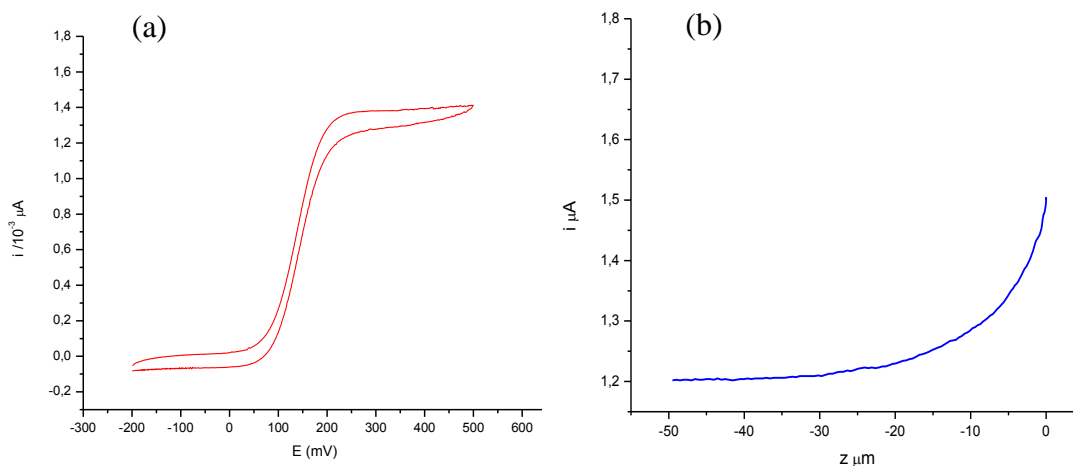


Figura 25. (a) Voltamperometría cíclica de FcMeOH 1,1 mM en KCl 0,2 M. (b) Curva de aproximación realizada en el eje z.

Con las imágenes obtenidas se demostró que el aumento del área activa del electrodo serigrafado de CNF es efectivo. Las zonas más claras muestran una intensidad de corriente normalizada menor, mientras que las zonas más oscuras representan las zonas de mayor intensidad de corriente normalizada. En el área escaneada que representa la zona no activada del electrodo, Figura 26a, se observa una homogeneidad de la superficie activa del electrodo, pero a la vez con una muy baja intensidad de corriente, que no resulta útil para nuestros fines. En la imagen que representa el área activada del electrodo, Figura 26 (b), se observa que la activación no es completamente homogénea, sin embargo la intensidad de la corriente es significativamente mayor que la obtenida con un electrodo sin activar.

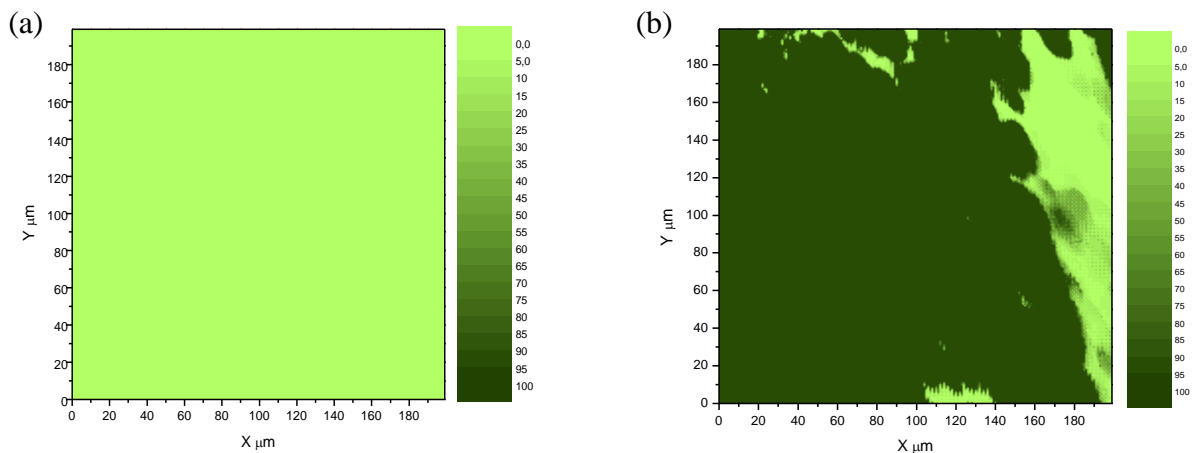


Figura 26. Imagen SECM de CNF-SPE (a) superficie sin activación y (b) superficie activada del electrodo.

Es importante trabajar con un electrodo en el cual se cuente con un área completamente homogénea, no obstante también es relevante disponer de un electrodo

que sea capaz de entregar una respuesta lo suficientemente intensa, lo que permite aumentar la sensibilidad del método y por lo tanto disminuir los límites de detección.

Se observa un aumento en la rugosidad de la superficie del electrodo serigrafiado de CNF, la cual se ve reflejada en el aumento de la corriente normalizada, tal como se muestra en la Figura 27.

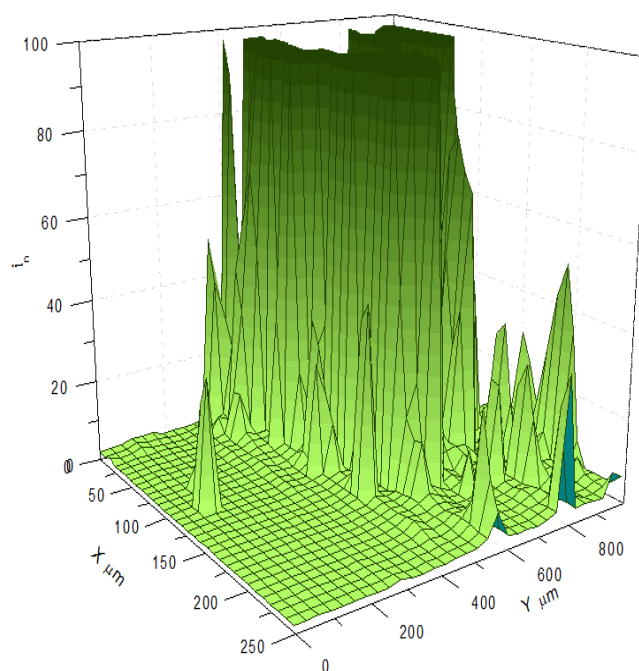


Figura 27. Imagen SECM de la superficie activada del electrodo serigrafiado de nanofibra de carbono. Los valores de corriente corresponden a corrientes normalizadas.

6.7.4.3 Obtención de imágenes mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)

La morfología de los electrodos serigrafiados activados y sin activar fue estudiada utilizando microscopía electrónica de barrido, mediante el microscopio Zeiss EVO MA 10, asociado a un detector de electrones secundarios. Uno de los electrodos serigrafiados fue sometido al tratamiento de activación utilizando, como ya se ha descrito anteriormente, una disolución de buffer Britton-Robinson/ DMF 70/30 %. Otro electrodo serigrafiado se analizó sin el tratamiento de activación. En ambos casos se obtuvieron las imágenes SEM, aplicando un voltaje de aceleración de 5 KV y una magnificación de 400 nm cm^{-1} y 800 nm cm^{-1} cada uno. En la Figura 28, la imagen A (escala de 400 nm cm^{-1}) muestra la superficie del electrodo serigrafiado de nanofibra de carbono sin activar, la cual se observa como una superficie aplanada y de relieve homogéneo. La morfología del electrodo serigrafiado de CNF activado se muestra en la Figura 28 B. En esta superficie se observa el levantamiento de las fibras desde la superficie, dando al electrodo una mayor rugosidad; lo que implica una mayor área expuesta en el electrodo, lo que facilita la adsorción de las moléculas de los nitrocompuestos en estudio.

El mismo efecto se puede observar al analizar cubriendo una mayor área del electrodo, utilizando una escala de 800 nm cm^{-1} , como se muestra en las imágenes C y D de la Figura 28.

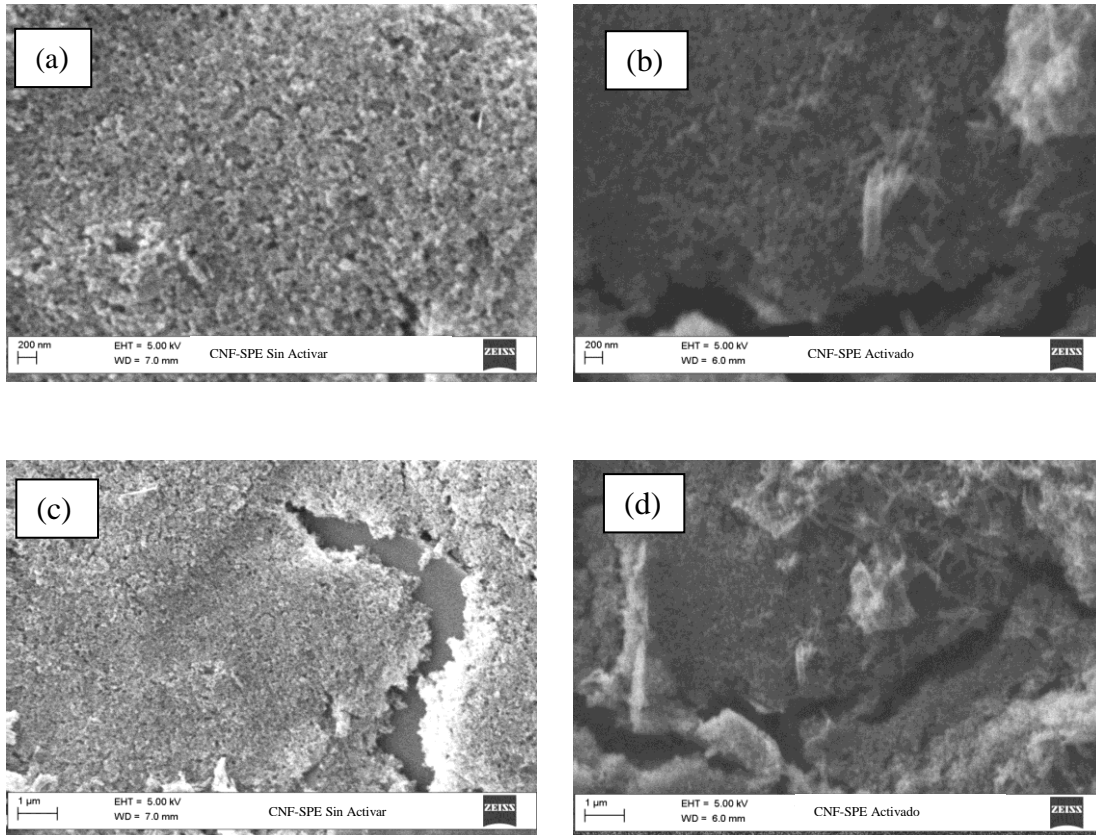


Figura 28. Imágenes SEM para CNF-SPE obtenidas utilizando un voltaje de aceleración de 5 KV. Imágenes (a) y (c) muestran la superficie de los electrodos sin activar y las imágenes (b) y (d) muestran la morfología de la superficie de los electrodos serigrafados de nanofibra de carbono sometidos al proceso de activación.

Asociando los resultados obtenidos de las imágenes SECM y SEM, obtenemos que el incremento de la corriente observado mediante microscopía electroquímica de barrido y atribuido al incremento del área activa del electrodo serigrafado de CNF, se debe también al aumento de la rugosidad del área activa del electrodo observado mediante microscopía electrónica de barrido, lo que correlaciona ambos resultados. El

aumento del área activa así como la rugosidad de la superficie implican el aumento del número de sitios de adsorción o la creación de nuevos poros en la superficie del electrodo después del tratamiento con la disolución de activación, lo que facilita la adsorción de los nitrocompuestos en la superficie activa del electrodo, aumentando la corriente de reducción así como la sensibilidad del método y consecuentemente disminuyendo su límite de detección.

6.8 Validación del método de análisis de nitrocompuestos mediante FIA-LSV y CNT-SPE

6.8.1 Electrodo serigrafiado de nanotubos de carbono (CNT- SPE)

Inicialmente se trabajó en establecer los parámetros de desempeño para el método de análisis de nitrocompuestos utilizando FIA-LSV-CNT-SPE, estableciendo el intervalo lineal de trabajo, límite de detección, precisión y exactitud. Sin embargo en este caso sólo se realizó el estudio para nitrofurantoína, ya que este analito fue seleccionado como compuesto representante del grupo de nitrocompuestos en estudio.

6.8.1.1 Intervalo lineal de trabajo

Utilizando el electrodo serigrafiado de CNT previamente activado y LSV unido al sistema FIA, se realizó el estudio del intervalo lineal de trabajo para nitrofurantoína. Se consideraron las condiciones utilizadas anteriormente en el sistema estático para la

determinación de nitrocompuestos mediante electrodos de carbón vítreo modificados con CNT, es decir, se mantuvo el medio buffer Britton-Robinson pH 2,00 pero adicionando NaCl en la misma concentración del buffer (0,1 M), tanto en la preparación de las soluciones así como para la disolución transportadora. Se burbujeó constantemente con nitrógeno la disolución transportadora y cada una de las disoluciones en estudio previo al análisis. Se utilizó un tiempo de acumulación de 180 s proporcionados por dos circuitos o “loops” de 2 mL cada uno. Se utilizaron disoluciones de nitrofurantoína de concentraciones de $4,0 \times 10^{-7} \text{ M}$ hasta $28 \times 10^{-7} \text{ M}$, para verificar la linealidad del intervalo de trabajo (basándose en los resultados previos de intervalo lineal obtenidos con los electrodos de carbón vítreo modificados con CNT), obteniéndose la gráfica mostrada en la Figura 29.

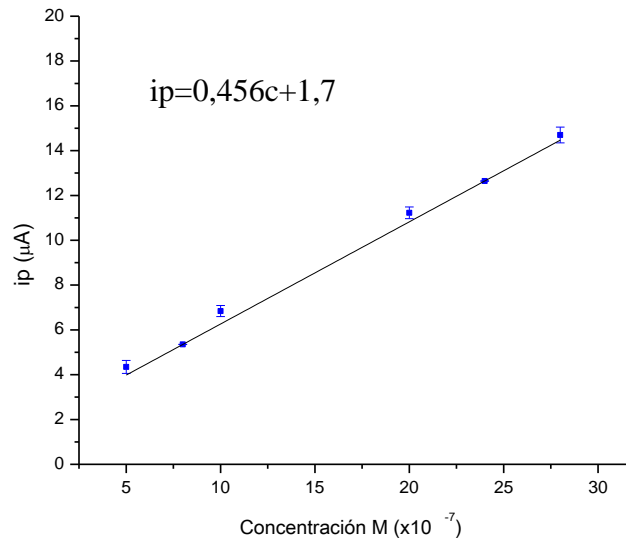


Figura 29. Curva de calibración para nitrofurantoína establecido utilizando FIA-LSV-CNT-SPE.

6.8.1.2 Límite de detección

Para establecer el límite de detección se prepararon 7 disoluciones de una concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ M de nitrofurantoína en buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00; perteneciente a la zona baja del intervalo lineal. Fueron analizadas utilizando LSV con electrodo serigrafiado de CNT (electrodo previamente activado utilizando buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 %), en conjunto con el sistema FIA, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente en la estimación del intervalo lineal de trabajo. Los resultados de corriente de pico y concentración obtenidos fueron registrados y utilizados en el cálculo del límite de detección de nitrofurantoína, los cuales se resumen en la Tabla N°3.

Tabla N° 3. Resumen de resultados obtenidos en la determinación del LD utilizando FIA-LSV-CNT-SPE.

N° Réplica	ip μA	Concentración M ($\times 10^{-7}$)
1	3,65	4,26
2	3,93	4,89
3	3,91	4,83
4	3,94	4,90
5	3,14	3,14
6	2,90	2,63
7	2,68	2,13
DE	0,535	1,17

Al considerar las 7 réplicas, el valor de $t_{((n-1), 0,99)}$ es equivalente a 3,143. Reemplazando este valor en la siguiente expresión se realizó el cálculo del límite de detección:

$$LD=t_{((n-1), 0,99)}\times DE$$

El límite de detección encontrado para nitrofurantoína utilizando electrodo serigrafiado de CNT en conjunto con LSV y sistema de inyección de flujo fue de $3,7\times 10^{-7} M$.

Al comparar los límites de detección obtenidos para nitrofurantoína utilizando electrodo de carbón vítreo modificado con CNT oxidados (descrito anteriormente en el punto 4.6.2) y el electrodo serigrafiado de CNT, observamos que se obtiene aproximadamente un límite de detección 10 veces menor en el sistema estático, utilizando electrodos modificados con CNT oxidados suspendidos en DMF, que utilizando electrodo serigrafiado de CNT y el sistema de inyección de flujo, lo que es desfavorable para nuestros fines.

6.8.1.3 Precisión

Se estableció la precisión del método expresándola como el coeficiente de variación obtenido a partir de la repetibilidad. Para tal efecto se prepararon 8 disoluciones de nitrofurantoína de una concentración de $16\times 10^{-7} M$ disueltas en buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M. Se realizó la medición de la corriente utilizando LSV y electrodo serigrafiado de CNT activado, asociado al sistema FIA. Se utilizó como tiempo de acumulación 180 s proporcionados por los dos circuitos de 2 mL cada uno,

buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M como disolución transportadora bajo corriente de nitrógeno constante. Los valores de las intensidades de corriente obtenidos se tabularon y se presentan a continuación en la Tabla N° 4.

6.8.1.4 Exactitud

Para el cálculo de la exactitud se utilizaron los resultados obtenidos en la estimación de la precisión para nitrofurantoína descrita anteriormente. Los experimentos se realizaron con LSV y electrodo serigrafiado de CNT previamente activado, asociado al sistema de inyección de flujo FIA. Se utilizaron las 8 disoluciones anteriores para calcular los porcentajes de recuperación. Posteriormente se calculó el promedio y se expresó la exactitud como porcentaje de recuperación. Los valores obtenidos se encuentran tabulados en la Tabla N° 4.

A partir de los resultados obtenidos para la precisión y exactitud, se observa que el método para la determinación de nitrofurantoína utilizando el electrodo serigrafiado de CNT es exacto, sin embargo se observa una precisión de un 7 %, expresado como coeficiente de variación, que es superior a los valores encontrados anteriormente.

Tabla N° 4. Resultados obtenidos para la repetibilidad y para la exactitud, obtenidas utilizando FIA-LSV-CNT-SPE, Tiempo de acumulación 180 se y buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00.

N° Réplica	ip μA	Concentración M × 10 ⁻⁶	% Recuperación
1	9,80	1,79	112,1
2	9,52	1,71	107,1
3	9,03	1,61	100,5
4	8,80	1,56	97,3
5	8,49	1,49	93,0
6	9,11	1,63	101,6
7	9,09	1,62	101,3
8	8,22	1,43	89,4
Promedio	9,02	1,60	100,3
DE	0,53	0,12	7,28
DER	5,89	7,26	7,26

6.8.2 Electrodo serigrafiado de nanofibras de carbono (CNF-SPE)

6.8.2.1 Intervalo lineal de trabajo

En la estimación del intervalo lineal de trabajo se consideraron los resultados obtenidos anteriormente, tanto para el electrodo de carbón vítreo modificado con CNT como para el electrodo serigrafiado de CNT. Para esto se estudió la respuesta de ip frente a la concentración de nitrofurantoína, nitrofurazona, furaltadona y furazolidona, utilizando LSV y el electrodo serigrafiado de CNF previamente sometido al procedimiento de activación. La disolución transportadora y cada una de las

disoluciones en estudio fueron burbujeadas con nitrógeno. Se utilizó 180 s como tiempo de acumulación, buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00 como disolución transportadora. Se realizó el estudio desde una concentración de $3,0 \times 10^{-8}$ M hasta $5,0 \times 10^{-7}$ M para nitrofurantoína, $1,0 \times 10^{-7}$ M hasta $6,0 \times 10^{-7}$ M para nitrofurazona, $1,0 \times 10^{-7}$ M hasta $5,0 \times 10^{-7}$ M para furaltadona y $5,0 \times 10^{-8}$ M hasta $8,0 \times 10^{-7}$ M para furazolidona. Los valores encontrados de i_p fueron graficados frente a la concentración para observar la tendencia lineal, así como para obtener el coeficiente de correlación como parámetro de linealidad, estableciendo los intervalos lineales de trabajo para cada uno de los analitos en estudio. En las Figuras 30, 31, 32 y 33 se muestra el intervalo lineal de trabajo obtenido para nitrofurantoína, nitrofurazona, furaltadona y furazolidona, respectivamente.

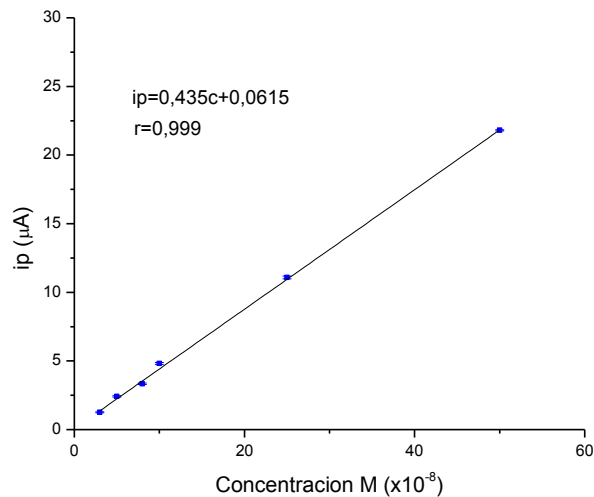


Figura 30. Curva de calibración de nitrofurantoína utilizando LSV y electrodo serigrafiado de CNF, tiempo de acumulación 180 s, buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M.

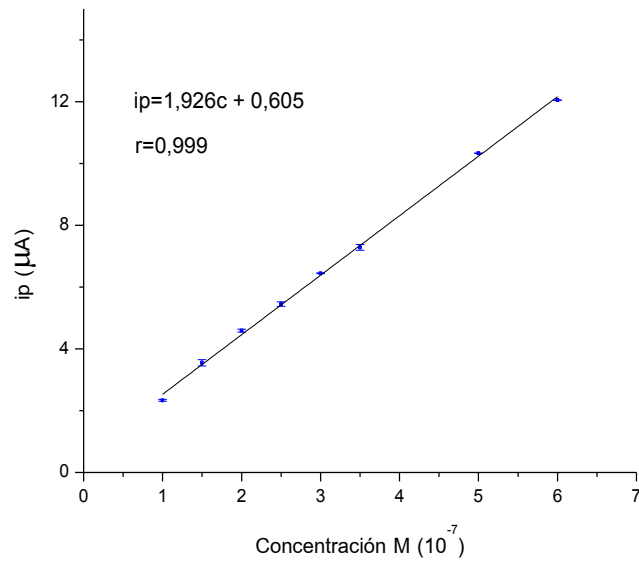


Figura 31. Curva de calibración de nitrofurazona determinado por FIA y LSV, utilizando electrodo serigrafiado de CNF. Tiempo de acumulación 180 s.

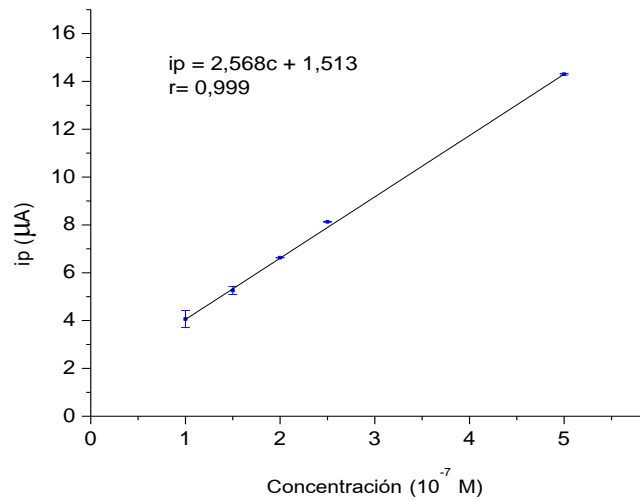


Figura 32. Curva de calibración de furaltadone determinado por FIA y LSV, utilizando electrodo serigrafiado de CNF. Tiempo de acumulación 180 s.

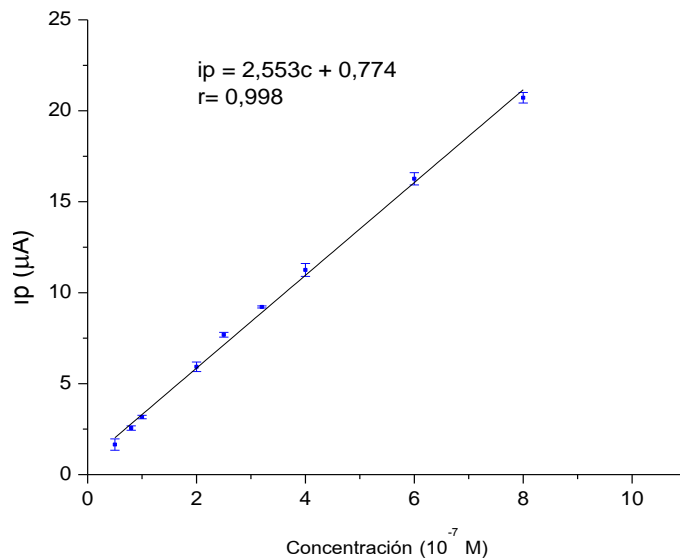


Figura 33. Curva de calibración de furazolidona determinado por FIA y LSV, utilizando electrodo serigrafiado de CNF. Tiempo de acumulación 180 s.

6.8.2.2 Límite de detección

El límite de detección fue determinado utilizando una disolución de concentración de $1,0 \times 10^{-7}$ M preparada 8 veces en buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00 para nitrofurantoína y preparada 7 veces para nitrofurazona, furaltadona y furazolidona. Estas disoluciones fueron analizadas utilizando LSV y electrodo serigrafiado de CNF, utilizando el sistema de inyección en flujo. Se utilizó 180 s como tiempo de acumulación y buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M como disolución transportadora. Durante el análisis se mantuvo un flujo de nitrógeno, tanto en la disolución transportadora como en las disoluciones en estudio previo al análisis.

Para el cálculo de los límites de detección se consideró un valor de $t_{((n-1), 0,99)}=2,998$ para 8 réplicas y un valor de $t_{((n-1), 0,99)}=3,143$ para 7 réplicas. Se utilizó la ecuación 2 para realizar el cálculo.

En la Tabla N° 5 se resumen los datos utilizados en el cálculo del límite de detección para cada uno de los analitos en estudio, utilizando sistema FIA con electrodo serigrafado de nanofibras de carbono (FIA-LSV- CNF-SPE).

La elevada reproducibilidad en el análisis fue esencial en la obtención de bajos límites de detección. Los límites de cuantificación (LC) fueron establecidos multiplicando el valor del límite de detección (LD) por un factor de 3.

Tabla N° 5. Límites de detección del método (LD) y límites de cuantificación (LC) encontrados para nitrofurantoína, nitrofurazona, furaltadona y furazolidona.

N° Réplica	Nitrofurantoína Conc. M $\times 10^{-8}$	Nitrofurazona Conc. M $\times 10^{-8}$	Furaltadona Conc. M $\times 10^{-8}$	Furazolidona Conc. M $\times 10^{-8}$
1	11,61	3,11	7,22	4,65
2	11,89	5,12	8,83	5,76
3	11,62	5,62	8,25	4,47
4	11,59	3,81	8,10	4,48
5	11,23	5,66	8,22	4,58
6	10,82	3,77	8,03	5,04
7	10,87	5,60	8,39	4,60
8	10,35	-	-	-
S	0,53	1,07	0,49	0,47
LD (M)	1,58	3,37	1,53	1,46
LC (M)	4,74	10,1	4,58	4,38

6.8.2.3 Precisión

En la determinación de la precisión se prepararon 8 réplicas de una disolución de concentración de $2,5 \times 10^{-7}$ M para nitrofurantoína, 7 réplicas de $2,5 \times 10^{-7}$ M para nitrofurazona, 7 réplicas de $3,5 \times 10^{-7}$ M para furaltadona y 7 réplicas de $3,0 \times 10^{-7}$ M para furazolidona, disueltas en buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00. El análisis electroquímico de los nitrocompuestos se llevó a cabo mediante LSV utilizando electrodo serigrafiado de CNF, el cual fue previamente sometido al proceso de activación. En el sistema FIA se usó como disolución transportadora buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00; la cual se mantuvo siempre bajo burbujeo de nitrógeno. Se mantuvo el tiempo de acumulación de 180 s proporcionados por los dos circuitos de 2 mL cada uno. Las disoluciones en estudio fueron desgasificadas previo al análisis utilizando burbujeo de nitrógeno. Se registró los valores de i_p y se calculó la desviación estándar de las mediciones, expresando la precisión como porcentaje de coeficiente de variación en función de la repetibilidad. De los resultados obtenidos se observa que en todos los casos el valor de la desviación estándar relativa es menor al 5 %, tal como se observa en la Tabla N° 6. Esto es indicativo que el método es reproducible para todos los analitos, requisito fundamental para aplicar un método analítico.

Tabla N° 6. Reproducibilidad expresada como coeficiente de variación para nitrofurantoína, nitrofurazona, furaltadona y furazolidona.

ID Réplica	Nitrofurantoína ip (µA)	Nitrofurazona ip (µA)	Furaltadona ip (µA)	Furazolidona ip (µA)
1	10,85	6,09	10,56	8,93
2	12,51	6,03	10,98	8,31
3	12,30	5,72	10,96	8,70
4	12,03	5,91	10,25	8,33
5	11,91	5,67	10,91	8,59
6	11,58	6,16	10,32	8,85
7	11,55	6,07	11,12	8,69
8	11,14	-	-	-
Promedio	11,73	5,95	10,73	8,63
DE	0,56	0,19	0,35	0,24
DER	4,81	3,21	3,25	2,75

6.8.2.4 Exactitud

A partir de los resultados obtenidos en la determinación de la precisión, obtenidos utilizando LSV y electrodo serigrafiado de CNF en conjunto con el sistema FIA, se realizó el cálculo de la exactitud. Para tal efecto se estableció el porcentaje de recuperación para cada una de las disoluciones de los nitrocompuestos en estudio. Los resultados se encuentran resumidos en la Tabla N° 7.

De los resultados obtenidos se observa que la metodología para la determinación de nitrocompuestos mediante el uso de LSV y electrodo serigrafiado de CNF es exacta y además precisa, mostrando un coeficiente de variación menor a un 5,0 % en todos los casos y un porcentaje de recuperación en general menor al 110 %, exceptuando nitrofurazona la cual exhibe un porcentaje de recuperación de 111 %.

Tabla N° 7. Exactitud expresada como porcentaje de recuperación para nitrofurantóina, nitrofurazona, furaltadona y furazolidona.

N° Réplica	% Recuperación			
	Nitrofurantóina	Nitrofurazona	Furaltadona	Furazolidona
1	99,1	113,9	102,9	106,5
2	114,4	112,7	107,6	98,4
3	112,5	106,2	107,4	103,5
4	110,0	110,2	99,3	98,6
5	108,9	105,2	106,8	102,1
6	105,8	115,4	100,1	105,4
7	105,6	113,4	109,2	103,4
8	101,8	-	-	-
Promedio	107,3	111,0	104,81	102,6
DE	5,19	3,95	3,96	3,11
DER	4,84	3,56	3,78	3,03

TERCERA PARTE: APLICACIÓN A MUESTRAS REALES

6.10 Análisis de muestras reales

6.10.1 Orina

Se trabajó con muestras de orina para realizar una aplicación directa sobre una muestra real, antes de ser aplicada a las matrices inicialmente propuestas. Para tal efecto se tomó una muestra de orina fresca de origen humano y se realizó una fortificación con nitrofurantoína.

Es importante resaltar que la muestra no tiene ningún tipo de tratamiento previo, que permita eliminar elementos interferentes inherentes de una muestra biológica, ya que la disminución de los pasos de pretratamiento de la muestra, nos permite minimizar el tiempo de preparación de muestra y disminuir los costos de análisis comparado con los métodos convencionales utilizados en el análisis de nitrofurantoína en orina.

Una curva de calibración externa no dio buenos resultados, obteniéndose desde un 60 a un 80 % de recuperación del analito en la muestra fortificada, atribuyendo este resultado a la diferencia de matriz existente entre estándares y muestras. Debido a estos resultados se optó por una metodología alternativa y más adecuada para una matriz compleja, tal como lo es una muestra de orina. Se realizó la cuantificación de nitrofurantoína mediante el método de adición estándar.

La preparación de cada una de estas muestras debió realizarse inmediatamente justo antes de ser analizadas a través del sistema FIA-LSV-CNF-SPE. La concentración encontrada fue de $1,97 \times 10^{-7}$ M, por lo que se obtuvo un porcentaje de recuperación del

analito de 98,74 % aplicado sobre 5 réplicas con una DER de 5,3%. La curva de calibración se muestra en la Figura 34.

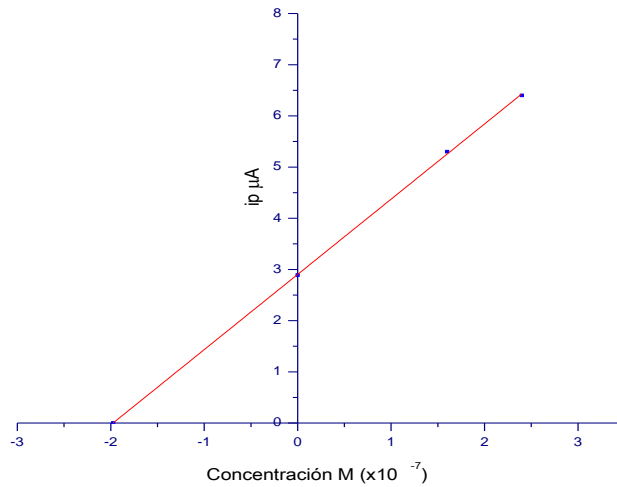


Figura 34. Gráfico de calibrado utilizando el método de adición de estándar obtenido mediante FIA-LSV-CNF-SPE, para la determinación de nitrofurantoína en muestras de orina.

6.10.2 Músculo de pollo comercial

6.10.2.1 Incubación y extracción

Las muestras de pollo que fueron preparadas de acuerdo al punto 3.8, se sacaron del congelador y se mantuvieron en el ambiente hasta alcanzar el equilibrio de temperatura. Posteriormente fueron homogenizadas individualmente y de éstas se pesó

una porción de 5 g en tubos de centrifuga de forma cónica. Se realizó la incubación, de las muestras previamente fortificadas y el blanco, para favorecer la integración de los nitrocompuestos en la matriz aparentando las condiciones de temperatura en la cual se encontrarían estos compuestos en el cuerpo de los pollos que hayan sido tratados con este tipo de fármacos (nitrocompuestos). Las muestras fueron fortificadas con una alícuota de 2,5 mL de una disolución madre de concentración $1,0 \times 10^{-3}$ M de cada uno de los analitos individualmente e incubadas en un baño termo regulado a 37 °C por toda la noche, agitando continuamente.

Debido a la complejidad de la muestra, la cuantificación de los nitrocompuestos se realizó aplicando la metodología de adición de estándar. Para esto se utilizaron 3 matraces volumétricos de 25 mL y se agregó una alícuota de 100 μ L de muestra en cada uno de ellos. A los siguientes matraces se agregó una cantidad creciente y conocida de cada uno de los analitos en estudio; se aforaron con buffer Britton-Robinson-NaCl 0,1 M pH 2,00 y se mezcló bien. Cada una de estas disoluciones, es decir, adición cero y dos muestras adicionadas con concentraciones conocidas fueron analizadas utilizando LSV y electrodo serigrafiado de CNF (previamente activado), asociados a un sistema de inyección de flujo. Se utilizó como disolución transportadora buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00 burbujeada con nitrógeno continuamente, un tiempo de acumulación de 180 s proporcionados por un circuito de dos “loops” de 2 mL cada uno. Cada muestra analizada fue previamente burbujeada con nitrógeno durante 5 min. La concentración corregida por el valor de blanco fue expresada como

contenido (μg) de nitrocompuesto por gramo de muestra y como porcentaje de recuperación, el coeficiente de variación de los resultados fue obtenido utilizando tres réplicas de análisis para cada uno de los analitos. Los datos son resumidos en la Tabla N° 8.

Tabla N° 8. Porcentajes de recuperación obtenidos para muestras de musculo de pollo analizadas mediante FIA-LSV-CNF-SPE.

Analito	Concentración adicionada ($\mu\text{g/g}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g/g}$)	Porcentaje de Recuperación	DER (%)
Nitrofurantoína	107,0	109,5	102,3	2,8
Furazolidona	106,7	103,7	97,2	5,2
Nitrofurazona	101,1	103,9	102,7	1,9
Furaltadona	101,1	104,5	103,3	1,8

6.10.3 Matriz de músculo de pollo certificada

La metodología desarrollada para el análisis de los nitrocompuestos, basada en LSV utilizando electrodo serigrafiado de CNF, asociado al sistema de inyección de flujo se aplicó sobre muestras de matriz certificada (músculo de pollo). Para tal efecto se pesó una porción de 2 g de muestra para utilizar con cada uno de los analitos en estudio (se utilizó un peso menor de muestra que en el caso anterior debido a la poca cantidad de matriz certificada existente), las cuales fueron fortificadas con 250 μL de una disolución de concentración $2,0 \times 10^{-3}$ M preparada para cada uno de los nitrocompuestos. Las

muestras fueron incubadas y extraídas de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente en el punto 4.10.2 y aforadas a 5 mL con buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00. Se analizó utilizando LSV y electrodo serigrafiado de CNF asociados al sistema FIA, se utilizó buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M pH 2,00 como disolución transportadora, la cual en todo momento se sometió a un flujo de nitrógeno. A cada muestra se aplicó un flujo de nitrógeno previo al análisis. Mediante el método de adición de estándar se realizó la cuantificación de los nitrocompuestos, obteniéndose los siguientes resultados tabulados en la Tabla N° 9. Los valores de las concentraciones se encuentran corregidas por el valor del blanco.

Tabla N° 9. Porcentajes de recuperación obtenidos para el material de referencia LGC7206 (matriz certificada) analizadas mediante FIA-LSV-CNF-SPE.

Analito	Concentración adicionada (µg/g de músculo)	Concentración encontrada (µg/g de músculo)	Porcentaje de Recuperación	DER (%)
Nitrofurantoína	5,75	5,52	96,0	1,4
Nitrofurazona	4,61	5,55	120,0	4,2
Furazolidona	5,50	5,95	108,0	6,1
Furaltadona	4,93	4,73	95,8	3,8

6.11 Implementación de metodología de análisis de nitrocompuestos por HPLC-MS

Utilizando disoluciones de cada analito (nitrofurantoína, furazolidona, nitrofurazona y furaltadona y sus respectivos metabolitos 2NP-SCA, 2NP-AMAZ, 2NP-

AOZ, 2NP-AHD), en concentraciones aproximadas a 100 mg/L, se realizó la inyección directa de los analitos en la fuente de ionización. Esta inyección se realizó mediante la utilización de una bomba de jeringa, la cual entrega el volumen a una velocidad establecida en forma constante. Mediante este procedimiento se logró conocer la masa del ión molecular y los fragmentos característicos correspondientes. Estos iones serán los que deberán ser buscados posteriormente en los espectros de masas (Tabla N°10). Las fragmentaciones se realizaron en modo de ionización con polaridad positiva y negativa, para evaluar cuál de ellos es el más eficiente, el que forma iones más estables, intensos y reproducibles.

Tabla N° 10. Masas obtenidas para cada uno de los analitos en modo de ionización positiva y negativa. Se muestra ión precursor y fragmentos característicos para cada uno de los nitrocompuestos.

	<i>Nitrofurantoina</i>	<i>Furazolidona</i>	<i>Nitrofurazona</i>	<i>Furaltadona</i>	<i>2-NP-AHD</i>	<i>2-NP-AMAZ</i>	<i>2-NP-AOZ</i>	<i>2-NP-SCA</i>	<i>AOZ-D4</i>	<i>AMAZ-D5</i>
Masa Isotópica	238.03	225.04	198.04	324.11		334.13	235.06	208.06	106.07	206.14
Masa Nominal	238	225	198	324	248	334	235	208	106	206
Masa Promedio	238.16	225.16	198.14	324.29		334.33	235.20	208.17	106.12	206.25
M/z (+)	239	226	199	325	249	335	236	209	107	207
M/z (-)	237	NSA	197	NSA	247	NSA	NSA	207	NSA	NSA
Fragmentación (+)	126.0	113.0	181.9	252.0	134.0	291.1	134.0	166.0	63.1	132.0
Ordenados por	168.0	95.1	156.0	281.0	104.0	262.1	104.0	192.0	46.2	115.0
Intensidades de	98.0	138,9	136.0	127.1	108.0	127.1	102.1	134.0	114.0	86.0
mayor a menor	95.0	137.0		253.0	136.0	156.1	92.0	92.0	45.0	102.0
Fragmentación (-)	152		150		99					
Ordenados por	194		124		204					
Intensidades de	123		167		175					
mayor a menor	120									

En el modo de fragmentación positivo se obtuvo los iones característicos para todos los compuestos, los cuales fueron seleccionados de mayor a menor de acuerdo a su intensidad. En el modo de ionización negativa sólo se obtuvo fragmentos para nitrofurantoína, nitrofurazona y 2-NP-AHD y ninguna señal para el resto de los analitos. Los resultados óptimos se obtuvieron con el procedimiento de ionización en modo de polaridad positiva, por lo que se seleccionó como condición para los experimentos futuros.

Después de haber establecido los iones precursores y los fragmentos característicos correspondientes a cada uno de los compuestos en estudio, se conectó nuevamente el HPLC con el espectrómetro de masas. En estas condiciones y para obtener las mejores condiciones analíticas se analizó dos mezclas, la primera compuesta por los metabolitos de cada analito en estudio, designada como mezcla 1 y una segunda mezcla preparada con los nitrocompuestos iniciales identificada como mezcla 2, aplicando las distintas metodologías descritas en el punto 2.6. Se utilizó las siguientes condiciones instrumentales iniciales:

Modo de ionización: ESI (Polaridad positiva)

Flujo del gas de secado (N₂): 10 L/min

Temperatura de gas de secado (N₂): 350 °C

Presión gas de nebulización (N₂): 35 psi

Voltaje de ionización: 5000 V.

Cada mezcla fue analizada en forma independiente, observando principalmente la resolución entre las señales; evaluando de esta forma la capacidad de separación de la columna así como también la efectividad en la fragmentación (producción de iones estables). Se comparó las áreas obtenidas para cada fragmento (los tres fragmentos principales perteneciente a cada uno de los iones precursores), priorizando como criterio que todos los analitos pudieran ser observados con la mejor sensibilidad. En este proceso se pudo observar que no todos los analitos eran fragmentados con la misma eficiencia y que su estabilidad dependió de la composición de la fase móvil utilizada, este efecto fue más notorio para los compuestos de la mezcla 2 (nitrofurantóina, nitrofurazona, furazolidona y furaltadona). Esto explica la razón por la cual el análisis de los nitrofuranos se realiza mediante los compuestos metabolizados, ya que estos tienen un comportamiento más estable debido a la derivatización aplicada previamente (cabe mencionar que estos metabolitos se encuentran comercialmente ya derivatizados). Los mejores resultados se obtuvieron al aplicar el método N° 6 (acetato de amonio 0,5 mM en metanol, separación isocrática de 15 min) para ambas mezclas.

La temperatura del gas de secado es un parámetro instrumental que afecta directamente a la fuente de ionización en el proceso de desolvatación del analito (en forma de *spray*), por lo que es importante encontrar experimentalmente el valor óptimo de temperatura, que permita aumentar la eficiencia en la producción de iones. Para realizar este proceso de optimización se analizó ambas mezclas de analitos (mezcla 1 y 2), utilizando las condiciones establecidas como óptimas tanto del HPLC como del

espectrómetro de masas. Las variaciones de temperatura aplicadas en la temperatura de secado fueron de 50 °C partiendo en 200 °C hasta 300 °C, se observó las áreas de los fragmentos obtenidos y se graficó las áreas de los fragmentos obtenidos *versus* temperatura de secado. El valor óptimo de temperatura de secado encontrado para la mezcla 1 fue de 300 °C y para la mezcla 2, de 200 °C.

Obtenidas las condiciones analíticas e instrumentales y con la finalidad de mejorar la sensibilidad (fragmentación), se optimizaron algunos parámetros (finos) del espectrómetro de masas. Esta operación se llevó a cabo desconectando la columna Symmetry Shield RP18 e instalando una conexión T que une el flujo de la fase móvil con el flujo de la muestra proveniente de la bomba de jeringa, tal como se muestra en la Figura 6. Utilizando esta configuración se asegura que la optimización de los parámetros se realice bajo condiciones de operación similares a las que se utilizaran posteriormente durante el análisis (se une el flujo de la fase móvil que proviene del HPLC con el analito). Esta optimización es realizada en forma automática por el espectrómetro, buscando la señal más intensa en función de los iones seleccionados por el operador e indicados en el programa.

Aplicados todos estos procedimientos antes mencionados, se asegura que las condiciones de operación instrumental y analíticas se encuentran optimizadas y el método de análisis puede ser aplicado sobre muestras reales, previa validación metodológica.

A continuación se propone una representación esquemática de la posible formación de los fragmentos para cada uno de los compuestos en estudio (Figuras 35 a 44).

En los espectros de masas se observa una gran cantidad de iones formados en la fragmentación, sin embargo nuestro interés es identificar a dos del total de iones, que corresponden a los más estables y por ende los más intensos, para asignarlos como los denominados iones de cuantificación y de confirmación.

En esta Tesis no se realizó un estudio del mecanismo de formación de los fragmentos, pero de acuerdo a la literatura encontrada y considerando las diferencias de masas producidas por la pérdida de algunas moléculas conocidas, como H₂O, CO₂, etc., se propone la estructura de las posibles especies que dan origen a los fragmentos encontrados.

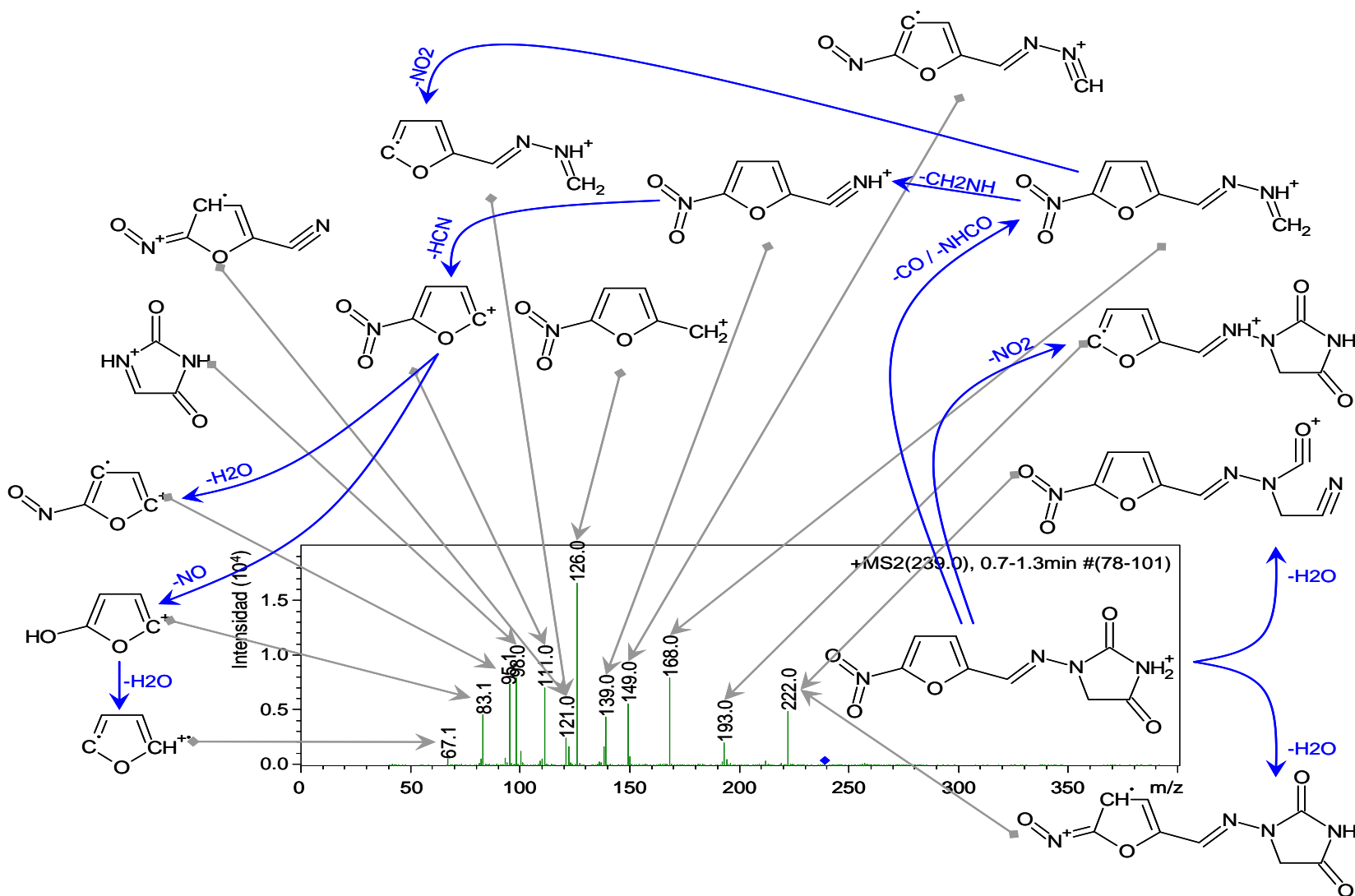


Figura 35. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 239,0 correspondiente a nitrofurantóina, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 126,0; 168,0 y 98,0 seleccionando al ión 126,0 como ión de cuantificación y al ión 168,0 como ión de confirmación.

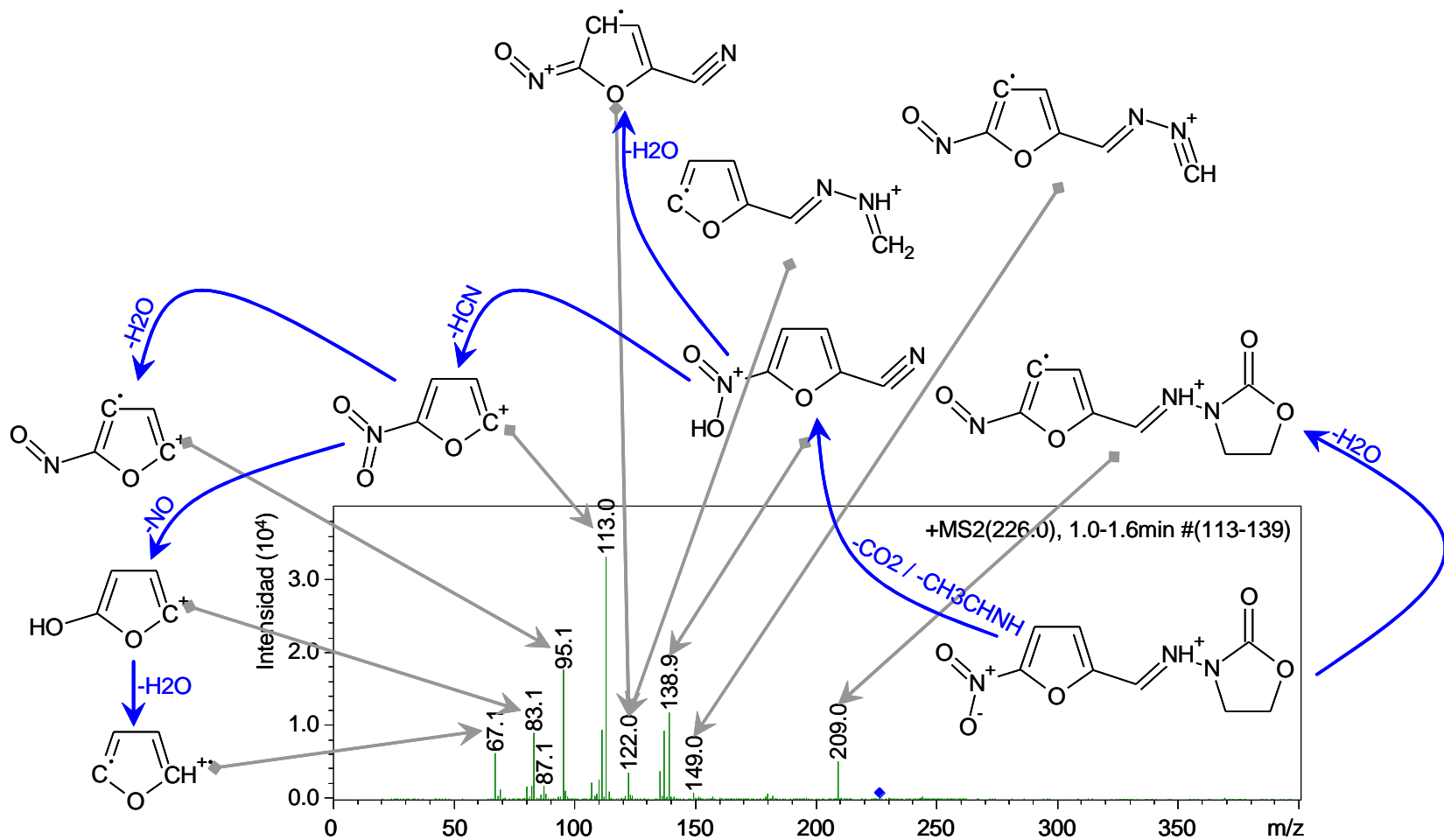


Figura 36. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 226,0 correspondiente a furazolidona, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 113,0; 95,1 y 138,9 seleccionando al ión 113,0 como ión de cuantificación y al ión 95,1 como ión de confirmación.

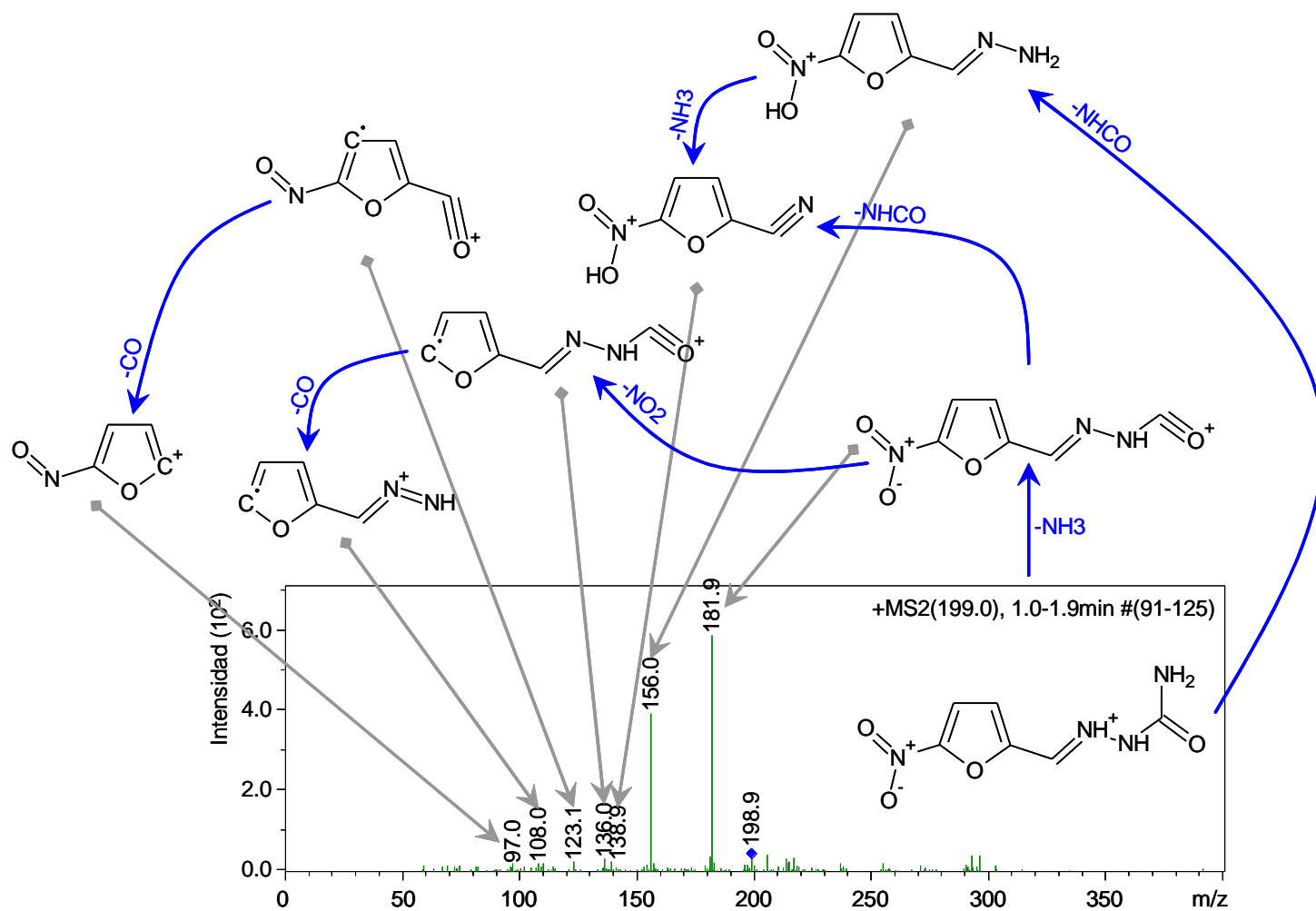


Figura 37. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 199,0 correspondiente a nitrofurazona, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 181,9; 156,0 y 136,0 seleccionando al ión 181,9 como ión de cuantificación y al ión 156,0 como ión de confirmación.

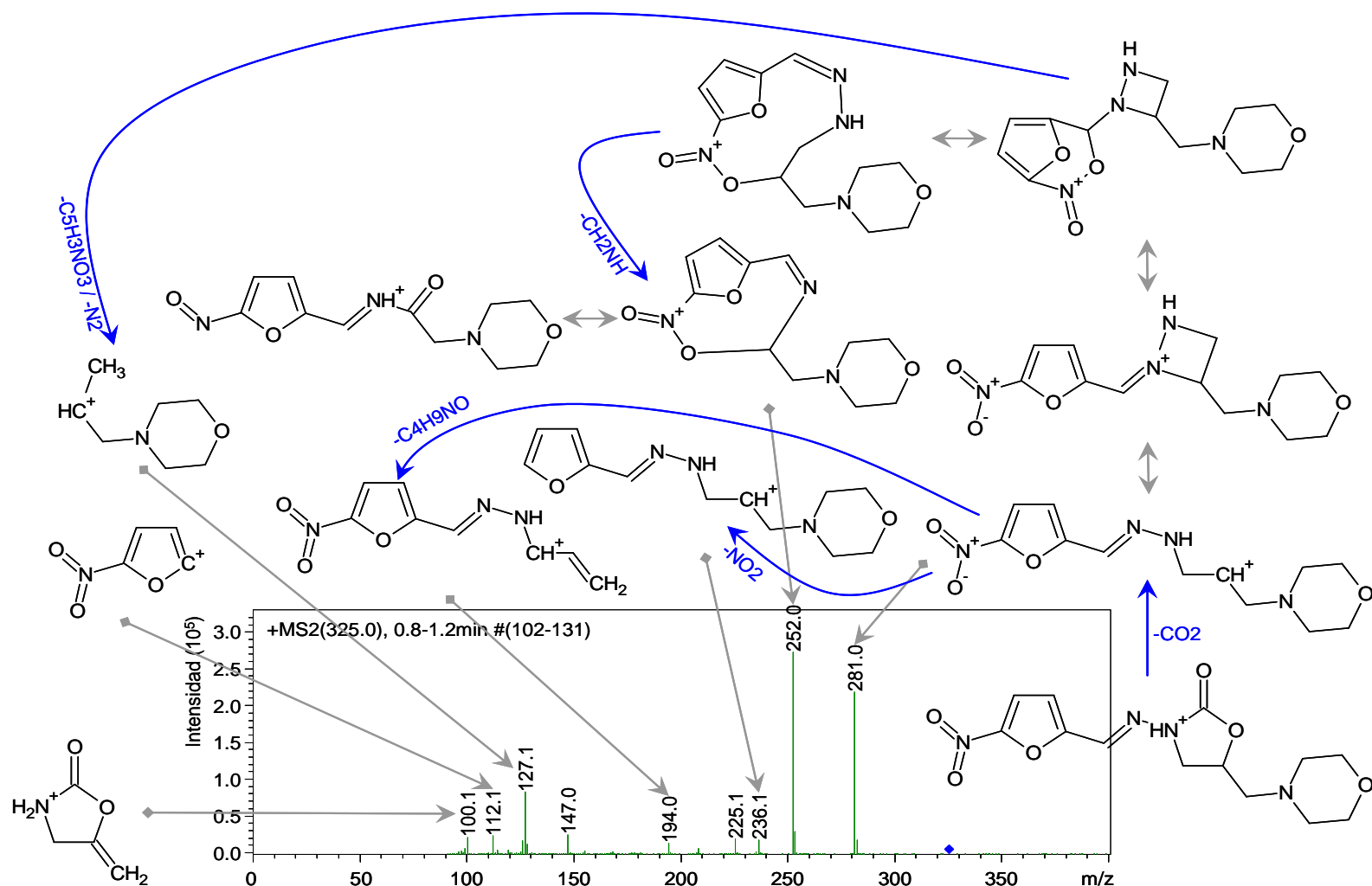


Figura 38. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 325,0 correspondiente a furaltadona, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 252,0; 281,0 y 127,1 seleccionando al ión 252,0 como ión de cuantificación y al ión 281,0 como ión de confirmación.

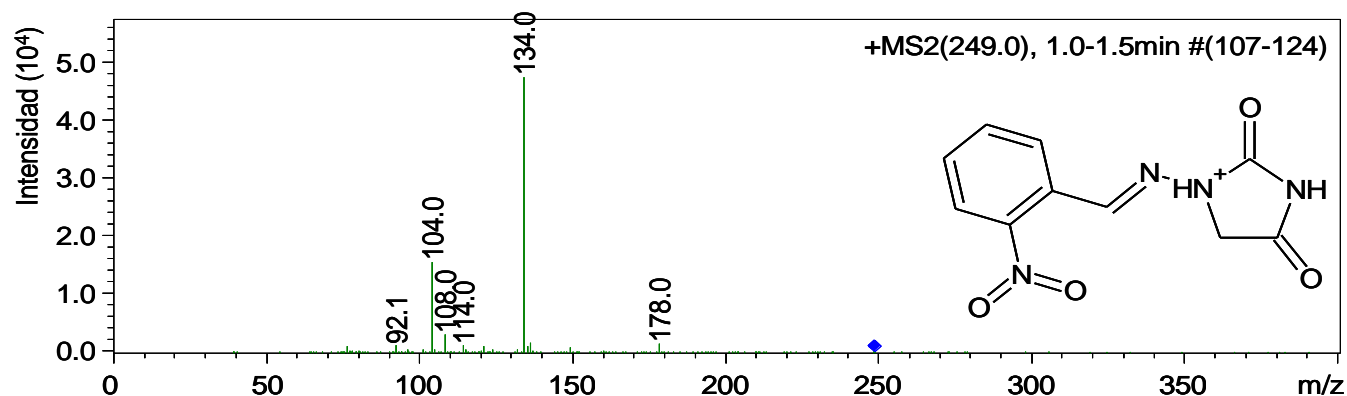


Figura 39. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 249,0 correspondiente a 2NP-AHD, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 134,0; 104,0 y 108,0 seleccionando al ión 134,0 como ión de cuantificación y al ión 104,0 como ión de confirmación.

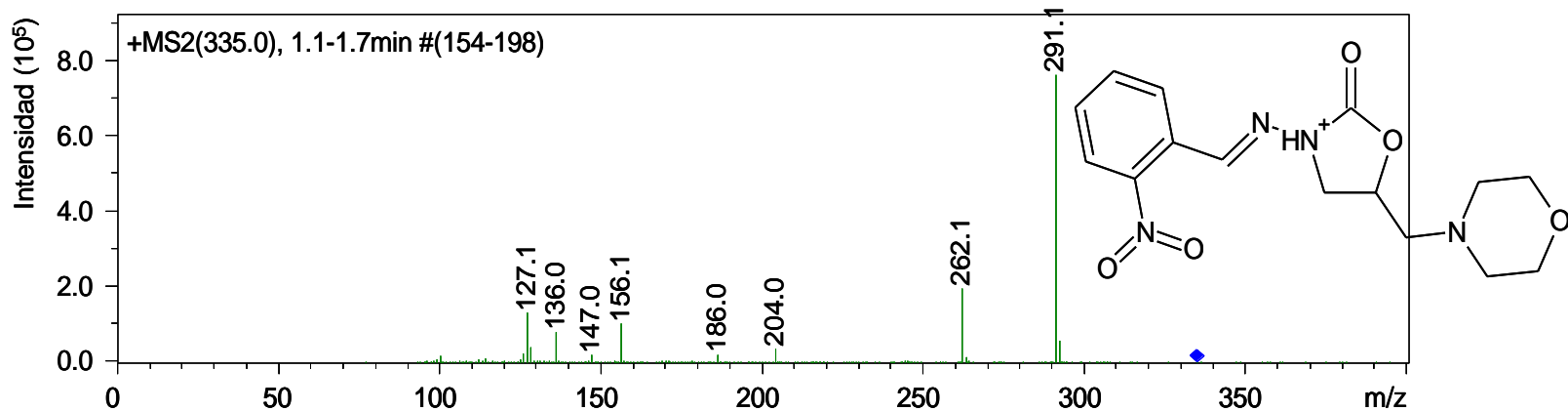


Figura 40. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 335,0 correspondiente a 2NP-AMOZ, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 291,1; 262,1 y 127,1 seleccionando al ión 291,1 como ión de cuantificación y al ión 262,1 como ión de confirmación.

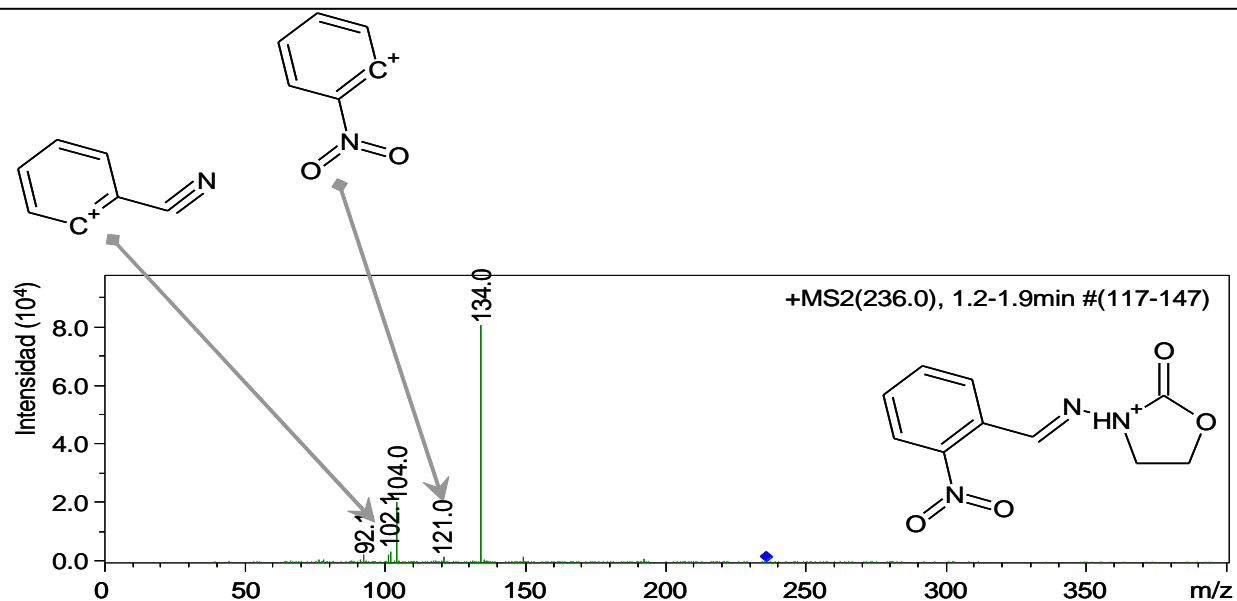


Figura 41. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 236,0 correspondiente a 2NP-AOZ, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 134,0; 104,0 y 102,1 seleccionando al ión 134,0 como ión de cuantificación y al ión 104,0 como ión de confirmación.

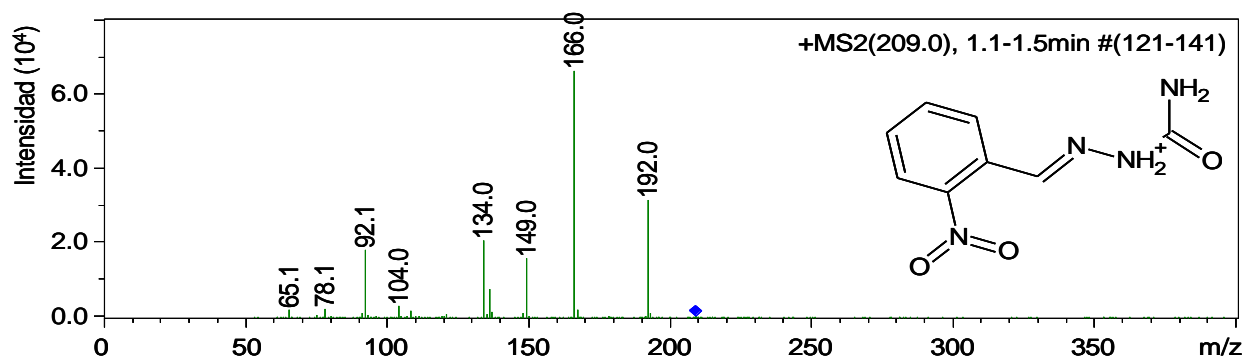


Figura 42. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 209,0 correspondiente a 2NP-SCA, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 166,0; 192,0 y 134,0 seleccionando al ión 166,0 como ión de cuantificación y al ión 192,0 como ión de confirmación.

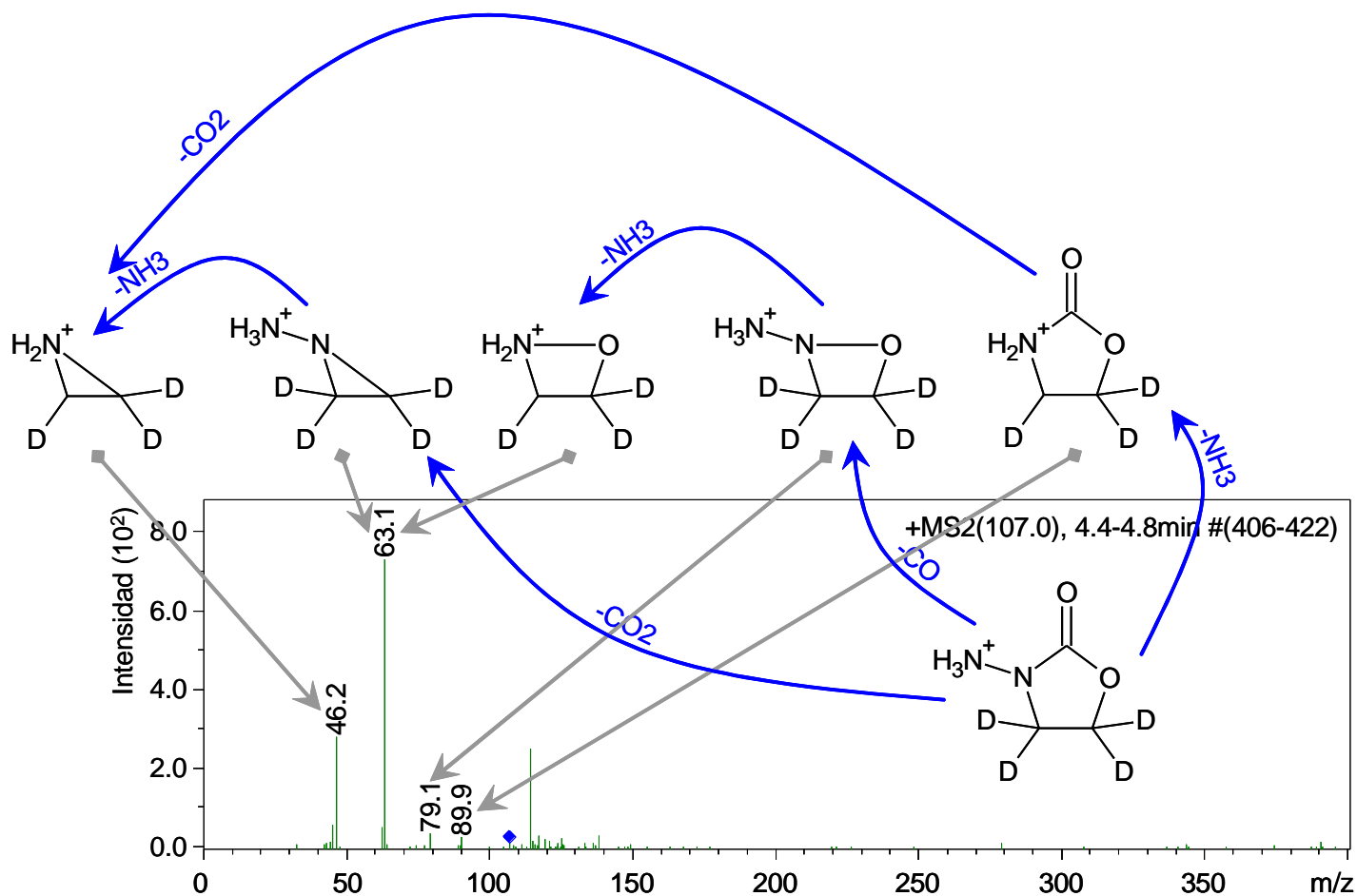


Figura 43. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 107,0 correspondiente a AOA-D4, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 63,1; 46,2 y 114,0 seleccionando al ión 63,1 como ión de cuantificación y al ión 46,2 como ión de confirmación.

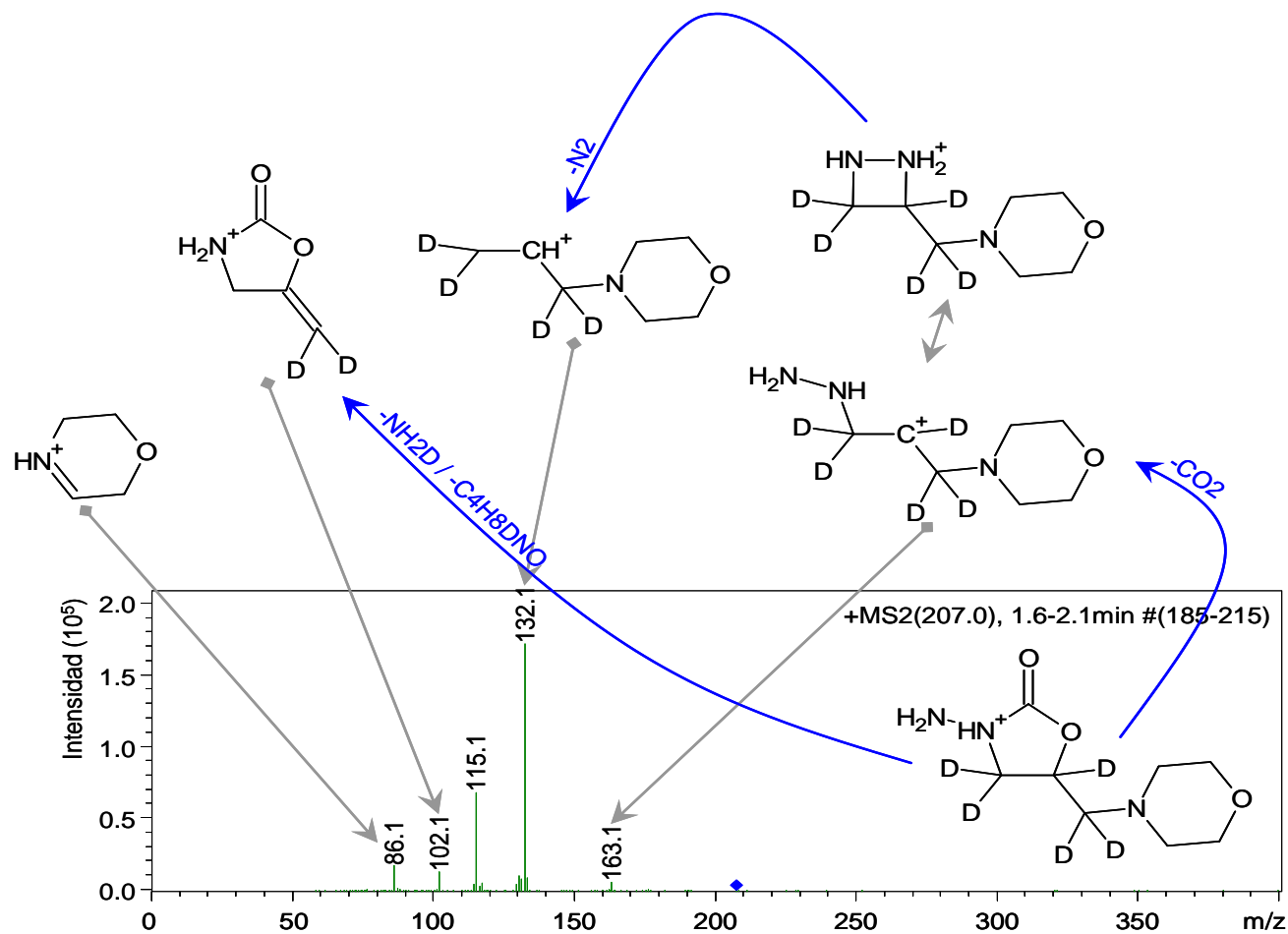


Figura 44. Espectro de masas obtenido al fragmentar el ión 207,0 correspondiente a AMOZ-D5, en modo de ionización positiva. Se observa los iones principales con m/z 132,1; 115,1 y 86,1 seleccionando al ión 132,1 como ión de cuantificación y al ión 115,1 como ión de confirmación.

7.0 CONCLUSIONES

El tiempo de acumulación es un factor importante para alcanzar los valores de sensibilidad deseados, ya que a medida que se aumenta el tiempo de acumulación aumenta la respuesta hasta finalmente llegar a un *plateau*.

El uso de un sistema de inyección de flujo en conjunto con electrodos serigrafiados, permitió obtener resultados equivalentes a los obtenidos con electrodo de carbón vítreo modificados con CNT oxidados pero con grandes ventajas, tales como: mayor rapidez para realizar el análisis, trabajar con un menor volumen de muestra y permitir el uso de electrodos de tipo serigrafiados minimizando el sistema de análisis.

La técnica electroquímica propuesta, en la que un electrodo serigrafiado de CNF se encuentra asociado a un sistema FIA, tiene la ventaja de ser una técnica que se desarrolla por primera vez en conjunto y que además cumple con los requisitos necesarios para ser aplicada como técnica de análisis de rutina. Tiene una buena precisión (expresada como repetibilidad), bajo límite de detección, bajo costo de análisis, rápido y sencillo de aplicar.

La técnica desarrollada para el análisis de nitrocompuestos, mediante el uso de FIA-LSV-CNF-SPE, tiene la capacidad de poder cuantificar cada uno de los analitos en su forma no metabolizada, a diferencia de HPLC-MS que demostró ser poco sensible a los nitrocompuestos en su forma no metabolizada, al ser poco estables durante la fragmentación.

La elevada sensibilidad y bajos límites de detección encontrados en la técnica de FIA-LSV-CNF-SPE nos indican que podría ser utilizada como una técnica de análisis preliminar a HPLC-MS (ya que ésta es la técnica oficial de análisis de confirmación de nitrocompuestos aceptada por la FDA), como una forma de abaratar costos de análisis.

La activación de los electrodos serigrafiados de CNF es un tratamiento sencillo, que consiste sólo en sumergir el electrodo en una disolución de buffer Britton-Robinson NaCl 0,1 M/DMF 70/30 % y que permite aumentar el área activa de estos en aproximadamente 19 veces y el valor de la corriente en un 625 %.

Mediante el pretratamiento de los electrodos con disolución buffer Britton-Robinson/DMF 70/30 % se modificó la morfología de la superficie de los electrodos serigrafiados (observado mediante SEM y SECM), favoreciendo el aumento de la rugosidad del material del electrodo de trabajo proporcionando una mayor cantidad de sitios de adsorción. Este hecho se relaciona directamente con el aumento en la respuesta de la corriente de reducción del grupo nitro, traduciéndose

en el incremento de la sensibilidad del método y en la disminución de los límites de detección de cada uno de los analitos.

La técnica desarrollada permite realizar el análisis de nitrocompuestos en matrices complejas, como músculo de pollo y orina.

Es posible cuantificar tanto niveles de alta como de baja concentración, requiriendo un número menor de pasos en el procedimiento de extracción del analito, permitiendo realizar el análisis en un tiempo menor al que normalmente se invertiría en una técnica de análisis convencional, como la HPLC.

8.0 REFERENCIAS

- [1] M. Vass, K. Hruska, M. Franek, “Nitrofurán Antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis”, *Veterinarni Medicina*.53, 469-500, (2008).
- [2] E. Vives, M. Ventriglia, D. Medvedovsky, R. Rothlin, *Farmacología II: “Nitroimidazoles y Nitrofuranos”*, [http://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/nitroimidazoles y nitrofuranos.pdf](http://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/nitroimidazoles-y-nitrofuranos.pdf).
- [3] M. Domínguez, E. García; M. Pastre, M. Videla; J. Barrandeguy, “Nitrofuranos en el apiario: Estudio de la dinámica y su permanencia en miel”, 1^{er}. Congreso de Apicultura del Mercosur., Punta del Este, Uruguay. 24-26 de junio, (2005).
- [4] SAG, Servicio Agrícola y Ganadero, “Resolución Exenta N° 1500 del 19 de mayo de 1998”, Chile, (1998).
- [5] CEE, “Reglamento (UE) N° 2377/90, Anexo IV”, *Diario Oficial de la Unión Europea*, N° L 224/1, (1990).
- [6] K. Honeychurch, J. Hart, D.C. Cowell, D. Arrigan, “Voltammetric studies of lead at calixarene modified screen-printed carbon electrodes and its trace determination in water by stripping voltammetry”, *Sensors and actuators B* 77, 642-652, (2001).

-
- [7] M. Takino, “Determination of Metabolites of Nitrofurantoin Antibacterial Drugs in Chicken Tissue by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry (LC-ESI-MS)”. Yokogawa Analytical System INC. Tokyo, Japan, (2003).
- [8] F. Ge, X. Zhang, Z. Zhang, X. Mei Zhang, “Simultaneous determination of maltose and glucose using a screen-printed electrode system”, *Biosensors and Bioelectronics* 13, 333-339, (1998).
- [9] P. Stege, G. Messina, G. Bianchi, R. Olsina, J. Raba, “Determination of arylsulphatase and phosphatase enzyme activities in soil using screen-printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes”, *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 2444–2452, (2009).
- [10] P. Fanjul-Bolado, D. Hernández-Santos, “Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes”, *Electrochimica Acta*, 53, 3635–3642, (2008).
- [11] F. Ghamouss, P. Tessier, M. Djouadi, M. Besland, M. Boujtita, “Examination of the electrochemical reactivity of screen printed carbon electrode treated by radio-frequency argon plasma”, *Electrochemistry Communications*, 9, 1798–1804, (2007).

-
- [12] D. Gornall, S. Collyer, S. Higson, “Investigations into the use of screen-printed carbon electrodes as templates for electrochemical sensors and sonochemically fabricated microelectrode arrays”, *Sensors and Actuators B*, 141, 581–591, (2009).
- [13] O. Domínguez-Renedo, M. Alonso-Lomillo, M. Arcos-Martínez, “Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications”, *Talanta*, 73, 202–219, (2007).
- [14] M. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M. Arcos-Martínez, “Screen-printed biosensors in microbiology; a review”, *Talanta*, 82, 1629–1636, (2010).
- [15] Q. Gao, W. Wang, Y. Ma, X. Yang, “Electrooxidative polymerization of phenothiazine derivatives on screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system”, *Talanta*, 62, 477–482, (2004).
- [16] G. Mohameda, T. Awad Ali, M. Shahat, A. Sabagh, M. Migahed, E. Khaled, “Potentiometric determination of cetylpyridinium chloride using a new type of screen-printed ion selective electrodes”, *Analytica Chimica Acta*, 673, 79–87, (2010).
- [17] P. Fanjul-Bolado, P. Queipo, P.J. Lamas-Ardisana, A. Costa-García, “Manufacture and evaluation of carbon nanotube modified screen-printed electrodes as electrochemical tools” *Talanta*, 74, 427–433, (2007).

-
- [18] S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, “Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead”, *Sensors and Actuators B*, 114, 460–465, (2006).
- [19] M. Aparecido, G. Trindade, M. Boldrin Zanoni, “Voltammetric sensing of the fuel dye marker Solvent Blue 14 by screen-printed electrodes”, *Sensors and Actuators*, B 138, 257–263, (2009).
- [20] F. Arduini, A. Amine, C. Majorani, “High performance electrochemical sensor based on modified screen-printed electrodes with cost-effective dispersion of nanostructured carbon black”, *Electrochemistry Communications*, 12, 346–350, (2010).
- [21] P. Lamas-Ardisana, P. Queipo, P. Fanjul-Bolado, A. Costa-García, “Multiwalled carbon nanotube modified screen-printed electrodes for the detection of p-aminophenol: Optimisation and application in alkaline phosphatase-based assays”, *Analytica Chimica Acta*, 615, 30–38, (2008).
- [22] S. Ledru, N. Ruillé, M. Boujtita, “One-step screen-printed electrode modified in its bulk with HRP based on direct electron transfer for hydrogen peroxide detection in flow injection mode”, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1591–1598, (2006).
- [23] M. Piano, S. Serban, N. Biddle, R. Pittson, G.A. Drago, J.P. Hart, “A flow injection system, comprising a biosensor based on a screen-printed carbon electrode containing

Meldola's Blue–Reinecke salt coated with glucose dehydrogenase, for the measurement of glucose”, *Analytical Biochemistry*, 396, 269–274, (2010).

[24] P. Fanjul-Bolado, P. Lamas-Ardisana, D. Hernández-Santos, A. Costa-García, “Electrochemical study and flow injection analysis of paracetamol in pharmaceutical formulations based on screen-printed electrodes and carbon nanotubes”, *Analytica Chimica Acta* 638, 133–138, (2009).

[25] P. Masawat, J. Mark Slater, “The determination of tetracycline residues in food using a disposable screen-printed gold electrode (SPGE)”, *Sensors and Actuators B* 124, 127–132, (2007).

[26] K. Honeychurch, J. Hart, P. Pritchard, S. Hawkins, N. Ratcliffe, “Development of an electrochemical assay for 2,6-dinitrotoluene, based on a screen-printed carbon electrode, and its potential application in bioanalysis, occupational and public health”, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 305-312, (2003).

[27] Q. Gao, X. Cui, F. Yang, Y. Ma, X. Yang, “Preparation of poly(thionine) modified screen-printed carbon electrode and its application to determine NADH in flow injection analysis system”, *Biosensors and Bioelectronics*, 19, 277-282, (2003).

-
- [28] M. Fernández-Baldo, G. Messina, M. Sanz, J. Raba, “Screen-printed immunosensor modified with carbon nanotubes in a continuous-flow system for the *Botrytis cinerea* determination in apple tissues”, *Talanta*, 79, 681–686, (2009).
- [29] B. Lee, W. Woo, M. Kim, “EMI Shielding Effectiveness of Carbon Nanofiber Filled Poly(vinyl alcohol) Coating Materials”, *Macromolecular Materials and Engineering*. 286, 114–118, (2001).
- [30] P. Li, T. Zhao, J. Zhou, Z. Sui, Y. Dai, W. Yuan, “Characterization of carbon nanofiber composites synthesized by shaping process”, *Carbon* 43, 2701–2710, (2005).
- [31] M. Bergamini, D. Santos, M. Valnice, B. Zanoni, “Screen-Printed Carbon Electrode Modified with Poly-L-histidine Applied to Gold (III) Determination”, *Journal of Brazilian Chemical Society*, 20, 100-106, (2009).
- [32] I. Kang, Y. Heung, J. Kim, J. Lee, “Introduction to Carbon Nanotube and Nanofiber Smart Materials”, *Composites: Part B*, 37,382–394, (2006).
- [33] J. Wang, Y. Lin, “Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications”, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 619-625, (2008).

- [34] M. Li, Y-T. Li, D-W. Li, Y. Long, “Recent developments and application of screen-printed electrodes in environmental assays-A review”, *Analytica Chimica Acta*, 734, 31-44, (2012).
- [35] H. Wei, J. Sun, Y. Xie, C. Lin, Y. Wang, W. Yin, G. Chen, “Enhanced electrochemical performance at screen-printed carbon electrodes by a new pretreating procedure”, *Analytica Chimica Acta*, 588, 297–303, (2007).
- [36] H. Lund, O. Hammerich, *Organic Electrochemistry*, Marcel Dekker Inc., New York, pág. 141, (2001).
- [37] A. Bott, W. Heineman, “Chronocoulometry”, *Current Separation*, 20, 121-126, (2004).
- [38] B. Wüst, C. Sauber, “Quantitation of Nitrofurán Metabolites in Shrimp and poultry by LC/MS/MS Using the Agilent LS/MSD Trap XCT”, Hewlett Packardstr. Waldron, Germany, Agilent Thecnologies Inc, (2004).
- [39] F. Mandel, B. Wüst, C. Sauber, “ High Resolution Quantitative Analysis of Nitrofurán Derivatives in poultry and Shrimp Using a New ESI-TOF”, Agilent Technologies GmbH, Waldbronn, Germany, (2004).
- [40] F. Liang, P. Hu, P. Li, “Analysis of Nitrofurán Metabolites in Tilapia Using Agilent 6419 Triple Quadrupole”, Agilent Technologies, Inc. Beijing, China, (2006).

-
- [41] “LC/MS Applications for Drug Residues in Foods”, General Description, Agilent Technologies, (2009).
- [42] L. Tribalat, O. Paisse, G. Dessalces, M. Florence, G. Loustalot, “Advantages of LC–MS–MS compared to LC–MS for the determination of nitrofurantoin residues in honey”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386, 2161–2168, (2006).
- [43] R. Stadler, P. Mottier, P. Guy, E. Gremaud, N. Varga, S. Lalljie, “Semicarbazide is a minor thermal decomposition product of azodicarbonamide used in the gaskets of certain food jars”, *Analyst*, 129, 276-281, (2004).
- [44] T. Delatour, E. Gremaud, P. Mottier, J. Richoz, F. Arce Vera, R. Stadler, “Preparation of Stable Isotope-Labeled 2-Nitrobenzaldehyde Derivatives of Four Metabolites of Nitrofurantoin Antibiotics and Their Comprehensive Characterization by UV, MS, and NMR Techniques”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6371-6379, (2003).
- [45] S-P. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, P. Guy, R. Stadler, P. Mottier, “Analysis of Matrix-Bound Nitrofurantoin Residues in Worldwide-Originated Honeys By Isotope Dilution High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5309-5315, (2004).

-
- [46] M. López, M. Feldlaufer, A. Williams, P. Chu, “Determination and Confirmation of Nitrofurans Residues in Honey Using LC-MS/MS”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1103-1108, (2007).
- [47] T. Chung-Wei, H. Chi-Hsin, W. Wei-Hsien, J. Chin, “Determination of nitrofurans residues in Tilapia Tissue by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Confirmation by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometric Detection”. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 56, 581-588. (2009).
- [48] T. Chung-Wei, T. Chuan-Ho, W. Wei-Hsien, “Quantitative Determination Of Four Nitrofurans And Corresponding Metabolites In The Fish Muscle By Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry”, *Journal of Food and Drug Analysis*, 18, 98-106, (2010).
- [49] M. Inagaki, “Pores in carbon materials-importance of their control”, *New Carbon Materials*, 24,193-222, (2009).
- [50] K. Gil-Tae, L. Jun-Seok, “Investigation of Pore Formation for Polystyrene Electrospun Fiber: Effect of Relative Humidity”, *Korean Journal of Chemical Engineering*, 22, 783-788, (2005).

[51] E. Astrova, T. Borovinskaya, J. Micromech, “Morphology of macro-pores formed by electrochemical etching of p-type Si”, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 14, 1022–1028, (2004).

[52] V. Bomko, A. Kobets, “Production of nano-pore track membranes based on PET films irradiated by Ar ions”, *Functional Materials* 14, 562-568, (2007).

[53] A. Washe, P. Lozano-Sanchez, D. Bejarano-Nosas, I. Katakis, “Facile and versatile approaches to enhancing electrochemical performance of screen printed electrodes”, *Electrochimica Acta*, 91, 166-172, (2013).