

UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DOCTORADO EN QUÍMICA



**“SISTEMA ELECTROQUÍMICO DE FLUJO PARA LA
PRECONCENTRACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ALGUNOS
NITRO-COMPUESTOS DE INTERÉS FARMACÉUTICO”**

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

Por:

CAMILA ELIZABETH GUTIERREZ RODRIGUEZ

Directores de Tesis

DR. JUAN ARTURO SQUELLA

DR. PABLO RICHTER

**SANTIAGO- CHILE
2016**

**UNIVERSIDAD DE CHILE
PROGRAMA DE DOCTORADO EN QUÍMICA**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis presentada por el candidato:

CAMILA ELIZABETH GUTIERREZ RODRIGUEZ

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctor en Química, en el examen de defensa de Tesis rendida el día 28 de Noviembre del 2016.

Directores de Tesis:

Dr. Juan Arturo Squella

Dr. Pablo Richter

Comisión Informante:

Dra. Soledad Bollo (Presidente)

Dr. Carlos Peña

Dra. Else Lemp

Dr. Mauricio Isaac

III. DEDICATORIA

Quiero agradecer a todos los que estuvieron conmigo en este camino de casi 5 años, los cuales me apoyaron en cada momento, y nunca me dejaron caer.

En especial a mi madre Elisa; que por ella soy lo que soy hoy día, gracias por tus consejos, por todo lo que diste por mí, por tu tiempo y paciencia, por tus ganas y energías que siempre me has brindado, pero por sobre todo por el amor que pones en cada cosa que haces por mí.

Quiero agradecer a Gustavo que me alentó muchas veces para seguir adelante, que siempre me ha dedicado palabras de admiración y de amor.

Y a mi hermano Sebastián, que espero enormemente algún día tener tu sabiduría y tu conocimiento, tu paciencia y dedicación a cada cosa que haces, te admiro enormemente hermano.

Y también por los que nunca me han dejado de alumbrar desde el cielo, a mi papá y a la matriarca de la familia mi abuela Rebeca. Gracias familia Gutiérrez por confiar en mí, por decirme día a día que soy capaz de ser mejor, por tener unas mujeres increíbles a la cuales admiro enormemente, son mi inspiración.

También este trabajo está dedicado a mis amigas que hice en el extranjero, y que hoy desde la distancia, nuestra amistad perdura y perdurará por siempre; Anna, Jesica, Eliza y Tay, doy gracias a la vida por haberlas conocido y por haber sido mi familia por casi 9 meses.

A mis amigos; de la universidad, del colegio, de la vida, gracias por siempre estar, y por ser mi red para nunca bajar los brazos; Elías, Rodrigo, Néctor, Catalina, María Paz, Rommina, Valentina, Andrea, Carla, Claudia, Karla y Paola, en especial a mi gran amiga María Jesús que siempre ha estado presente en mi vida, en mis logros y en mis derrotas.

Y finalmente quiero dedicar esta tesis a lo que siempre fue una vía de escape cuando las cosas no funcionaban bien y el estrés se apoderaba de uno, a mi querida natación; a la selección de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, pero por sobre todo a nuestro entrenador; el profesor Alfredo Grassau, que siempre me recibió con una sonrisa y mucho ánimo, que me hizo olvidar el estrés y los malos momentos, que siempre confió en mí, y sobre todo a mis amigos Paula y Mario que jamás han dejado de creer en mí.

IV. AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos van en especial a mis directores de tesis Dr. Pablo Richter y Dr. Juan Arturo Squella, por la preocupación y dedicación que tuvieron conmigo para el desarrollo de esta tesis. A la comisión asignada, que me apoyaron y aconsejaron en todo momento. También a la beca Conicyt 21120565, la cual hizo posible el financiamiento para el desarrollo óptimo de este trabajo. A los proyectos Fondecyt asociados 1130160 y 1100085. También a la Dra. Mira Petrovic, y a toda la gente que compartí en ICRA, Gerona, Cataluña-España. Y finalmente, a los profesores y compañeros de Ciprex, que hicieron agradable cada día de trabajo en el laboratorio, compartiendo risas y hermosos momentos.

V. TABLA DE CONTENIDOS

	Página
I. PORTADA	i
II. INFORME DE APROBACIÓN	ii
III. DEDICATORIA	iii, iv
IV. AGRADECIMIENTOS	v
V. TABLA CONTENIDOS	vi, vii
VI. INDICE ILUSTRACIONES	viii-xv
VII. INDICE TABLAS	xvi-xvii
VIII. RESUMEN	xix-xx
IX. ABSTRACT	xxi-xxii
1. INTRODUCCIÓN	23-39
2. HIPÓTESIS	40
3. OBJETIVOS	41, 42
4. METODOLOGÍA	
4.1. REACTIVOS	43
4.2. EQUIPAMIENTO	43-45
4.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	
4.3.1. MÉTODO ELECTROANALÍTICO	45-56
4.3.2. MÉTODO UHPLC-MS	56-64
4.3.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO FIA-SPE-CNF Y UHPLC-QqLIT	65-68

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. MÉTODO ELECTROANALÍTICO

5.1.1. CARACTERIZACIÓN DE NFD Y NMD MEDIANTE TÉCNICAS ELECTROQUÍMICA EN UN SISTEMA BATCH 69-84

5.1.2. CARACTERIZACIÓN DE NFD Y NMD USANDO UN SISTEMA DE FLUJO CONTINUO ACOPLADO A ELECTRODOS SERIGRAFIADOS DE NANOFIBRAS DE CARBONO (FIA-SPE-CNF) 85-100

5.1.3. APLICACIÓN DEL MÉTODO VOLTAMÉTRICO FIA-SPE-CNF SOBRE MUESTRAS REALES QUE CONTIENEN NFD Y NMD. 100-118

5.2. MÉTODO ANALÍTICO

5.2.1. ESTUDIO DE LOS ANTAGONISTAS DE CANALES DE CALCIO MEDIANTE EL MÉTODO DE UHPLC-QqLIT APLICADOS EN MUESTRAS DE AGUAS REALES. 119-135

5.3. COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS ELECTROANALÍTICOS Y CROMATOGRÁFICOS. 136-138

6. CONCLUSIONES 139-140

7. BIBLIOGRAFÍA 141-147

VI. ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

	Página
FIGURA 1: Estructuras de los antagonistas de calcio.	24
FIGURA 2: Ilustración de una lámina de electrodo serigrafiado.	32
FIGURA 3: Voltamogramas comparativos obtenidos en sistema FIA, usando diferentes electrodos de trabajo de SPE. Caudal=1,5mL/min, tiempo deposición = 80s, potencial de preconcentración = 800mV, pH 2, concentración de nifuroxazida 1 µg/mL, v_B 200 mVs ⁻¹ .	34
FIGURA 4: Voltametría cíclica a pH 2 Britton-Robinson 0,1 M, con 0,1 mM de nitrendipino después de la acumulación por 4 minutos a circuito abierto sobre electrodo de trabajo de carbón vítreo modificado con nanotubos de carbono de multi-pared. Primer barrido (línea continua) y segundo barrido (línea punteada).	37
FIGURA 5: Línea continua: Voltametría cíclica de nifedipino 2×10^{-4} M en buffer Britton-Robinson pH 1,5. v_B 100 mVs ⁻¹ . Línea punteada: representa la corriente residual.	38
FIGURA 6: (A) Potenciostato DropSens utilizado para el estudio electroquímico. (B) Bomba Metrohm 715 Dosimat utilizado para el sistema FIA acoplado a las celdas de	44

acrílico específicas para la utilización de SPE.

- FIGURA 7: Implementación de celda de acrílico específica para utilizar SPE en sistema batch. 46
- FIGURA 8: Celda de acrílico específica para utilizar el sistema FIA-SPE. 49
- FIGURA 9: Implementación del sistema de extracción en fase sólida utilizando *catridge* Oasis-HLB con sistema Baker. 63
- FIGURA 10: Voltametría cíclica hacia potenciales negativos $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$ NFD en $0,1 \text{M}$ de buffer BR-NaCl/pH2, v_B 100 mVs^{-1} . (A) Primer ciclo, (B) segundo ciclo. 70
- FIGURA 11: Voltamograma cíclico hacia potenciales positivos de $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$ de NFD a $0,1 \text{ M}$ buffer BR-NaCl/pH 2, v_B 100 mVs^{-1} . (—) Primer ciclo, (—) segundo ciclo. 71
- FIGURA 12: Voltamograma cíclico hacia potenciales negativos de $1,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ de NMD a $0,1 \text{ M}$ buffer BR-NaCl/pH 2, v_B 100 mVs^{-1} . (A) Primer ciclo, (B) segundo ciclo. 72
- FIGURA 13: Voltamograma cíclico hacia potenciales positivos de $1,0 \times 10^{-4} \text{M}$ de NMD a $0,1 \text{ M}$ buffer BR-NaCl/pH 2, v_B 100 mVs^{-1} . (—) Primer ciclo, (—) segundo ciclo. 73
- FIGURA 14: Voltamograma de barrido lineal de $4 \times 10^{-6} \text{M}$ de (A) NFD (—) y NMD (—) por separado y (B) NMD Y 74

NFD (—) en una misma solución de concentración de 4×10^{-6} M, blanco (—). En 0,1M buffer BR-NaCl/pH 2, v_B 100 mVs^{-1} .

- FIGURA 15: Comparación de las técnicas de DPV (—) y LSV (—) 76
para una solución de (A) 1×10^{-4} M de NFD y (B) 1×10^{-5} M de NMD en 0,1M de buffer BR-NaCl/pH 2, v_B 100 mV s^{-1} . Figura inserta para (A) y (B) es un zoom de la técnica de DPV para NFD y NMD. Condiciones voltamétricas: para DPV $t_{eq}=5\text{s}$, $E_i=0,0\text{V}$, $E_f=-1,0\text{V}$, $E_{step}=0,005\text{V}$, $E_{pulsio}= 0,01\text{V}$, $t_{pulsio}=10,0\text{ms}$, $v_B=0,1\text{V/s}$. Para LSV $t_{eq}=5\text{s}$, $E_i=0,0\text{V}$, $E_f=-1,0\text{V}$, $v_B=0,1\text{V/s}$.
- FIGURA 16: Voltamogramas de barrido lineal utilizando dos tipos 78
de electrodos serigrafados: (—) CNT y (—) CNF. (A) 1×10^{-4} M de NFD y (B) 1×10^{-5} M de NMD, ambas soluciones en 0,1M de buffer BR/NaCl pH 2, v_B 100 mVs^{-1} .
- FIGURA 17: Barrido lineal de proceso de reducción del grupo nitro 80
a hidroxilamina de NFD 1×10^{-4} M a diferentes pHs en 0,1M buffer BR-NaCl, v_B 100 mVs^{-1} .
- FIGURA 18: (A) Gráfico de E_p y (B) de i_p en función del pH, a una 81
concentración de $1,0 \times 10^{-4}$ M de NFD.
- FIGURA 19: Gráfico de i_p en función del tiempo de adsorción/ 82

preconcentración utilizando una concentración de $3 \times 10^{-6} \text{M}$ de NFD. Condiciones: 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} .

- FIGURA 20: (A) Voltamograma de barrido lineal de NFD a diferentes concentraciones en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} . (B) Gráfico de corriente de pico en función de la concentración de NFD. Intervalo de concentración de NFD 0,37-9,28 mg/L. 84
- FIGURA 21: Voltamograma de barrido lineal de $1,013 \times 10^{-5} \text{M}$ de NFD en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} . SPE-CNF sin activación (—). SPE-CNF con activación (—). 86
- FIGURA 22: Imágenes SEM para el área electroactiva de los SPE obtenidas por microscopia electrónica de barrido FEI, modelo Inspect F-50. (A) SPE-CNF sin activación, nuevo y sin uso, (B) SPE-CNF con activación, nuevo y sin uso. 87
- FIGURA 23: Voltamograma de barrido lineal utilizando una solución de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ de NFD en 0,1 M de buffer BR-NaCl/pH 3, 100 mVs^{-1} . (—) SPE-CNF con activación y con solo una medida, (—) SPE-CNF con activación y con más de 45 medidas. 88

- FIGURA 24: Imágenes SEM para el área electroactiva de los SPE 90
obtenidas por microscopia electrónica de barrido FEI,
modelo Inspect F-50 (A) SPE-NFC activado-
sumergido en una solución de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ de NFD, (B)
aumento de la imagen A. (C) SPE-NFC activado-
usado aproximadamente en 45 medidas, (D)
aumento de la imagen C.
- FIGURA 25: Voltamograma de barrido lineal a 3506 $\mu\text{g/L}$ de NFD 92
en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} , con
diferentes volúmenes de muestra.
- FIGURA 26: Gráfico corriente de pico en función del tamaño de 93,94
muestra de NFD en diferentes concentraciones (A)
3608 $\mu\text{g/L}$, (B) 3484 $\mu\text{g/L}$, (C) 2130 $\mu\text{g/L}$, (D) 348,34
 $\mu\text{g/L}$, (E) 34, 83 $\mu\text{g/L}$.
- FIGURA 27: Gráficos de corriente en función de la concentración 96,97
de NFD y NMD utilizando diferentes volúmenes de
muestra: (A) y (F) 0,5 mL de muestra, (B) y (G) 1 mL
de muestra, (C) y (J) 3 mL de muestra, (D) y (I) 6 mL
de muestra, (E) y (J) 6 mL de muestra. Figura Inserta
se muestra el LSV para cada volumen de muestra y
cada anlito correspondiente.
- FIGURA 28: Gráfico de IDL en función del volumen de muestra 100

utilizando sistema FIA-SPE para (•) NFD y (•) NMD.

- FIGURA 29: Voltamograma de barrido lineal de una tableta comercial simulada de(A) NFD y (B) NMD en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs⁻¹. 101
- FIGURA 30: Voltamograma de barrido lineal de una tableta comercial de (A) 20 mg NFD de Laboratorio Chile y (B) 30 mg NMD de Instituto Sanitas, en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs⁻¹. 103
- FIGURA 31: Voltamogramas de barrido lineal de soluciones de adición estándar utilizando muestras de orina para (A) NFD y (B) NMD. (—) adición estándar 0, (—) adición estándar 1, (—) adición estándar 2. Todas las soluciones con 0,1M de buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs⁻¹. 105
- FIGURA 32: Voltamogramas de barrido lineal de muestras de orina a diferentes tiempos después de ingerir 20 mg de NFD de Laboratorio Chile dopadas con 25 µg/L. Figura inserta: voltamograma de barrido lineal completo;(—) muestra de orina con 25 µg/L a tiempo 0, (—) muestra de orina con 25 µg/L a tiempo 2 horas, (—) muestra de orina con 25 µg/L a tiempo 6 horas. Todas en 0,1M de buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 108

	100 mVs ⁻¹ .	
FIGURA 33:	Voltamograma de barrido lineal de 25 µg/L de NMD en agua de afluyente (—) y buffer BR-NaCl/pH 3 (—) ambos voltamogramas con v_B 100 mVs ⁻¹ . Figura inserta: voltamograma de barrido lineal completo.	113
FIGURA 34:	Espectro UV-VIS para una solución de 50 µg/L de NMD en agua mili-Q.	115
FIGURA 35:	Cromatogramas de 50 µg/L de NMD en agua mili-Q: (A) sin el proceso de ELLD, (B) con el proceso de ELLD, (C) comparación de cromatograma: (—) sin el proceso de ELLD. (—) y con el proceso de ELLD.	117
FIGURA 36:	Cromatogramas superpuestos: solución dopada con 50 µg/L de NMD en agua de afluyente (—) y agua de afluyente sin dopar (—) ambos con el proceso previo de ELLD.	118
FIGURA 37:	Cromatograma de los 6 analitos en estudio usando una solución multi-estándar de los analitos a 25 µg/L en ionización positiva.	123
FIGURA 38:	Cromatograma de solución de 25 µg/L multi-estándar de los 6 antagonistas de canales de calcio usando diferentes fases móviles acuosas: A) 0,1% ácido fórmico (B1), B) 10 mM formiato de amonio pH 3 (B2),	125

C) 10 mM acetato de amonio pH 3,5 (B3), D) 10 mM acetato de amonio pH 5 (B4).

FIGURA 39: Gráficos de área de pico en función de la concentración de los antagonistas de canales de calcio: (A) AMD, (B) FLD, (C) ISR, (D) NMD, (E) NFD, (F) NTR con ambas fases móviles acuosas (—) 0,1% ácido fórmico (B1), (—) acetato de amonio pH5 (B4).

128

VII. ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1: Propiedades químicas y dosis diaria indicada de los compuestos nitro-derivados de las 1,4-dihidropiridina.	25
TABLA 2: Preparación de soluciones de adición estándar para la aplicación del método FIA-SPE-CNF en muestras de orina.	53
TABLA 3: Parámetros de espectrometría de masa QqLIT de los analitos usados en este estudio.	60
TABLA 4: Parámetros electroquímicos para la reducción del grupo nitro que contiene NFD y NMD.	75
TABLA 5: Parámetros analíticos de NFD en una metodología batch utilizando SPE-CNF, 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3, sobre el proceso de reducción irreversible del grupo nitro a derivado hidroxilamínico.	84
TABLA 6: Parámetros analíticos instrumentales de NFD y NMD en función del volumen de muestra usando sistema FIA-SPE-CNF.	99
TABLA 7: Parámetros de recuperación del método FIA/SPE-CNF, de acuerdo al análisis de una tableta simulada de 20 mg de NFD y 30 mg de NMD.	102

TABLA 8:	Análisis de tabletas comerciales de 20 mg de NFD del Laboratorio Chile y 30 mg de NMD del Instituto Sanitas.	103
TABLA 9:	Valores de porcentajes de recuperación y efecto matriz utilizando muestras de orina dopadas con NFD y NMD.	106
TABLA 10:	Valores de las concentraciones encontradas y % recuperación de las muestras de orina de un paciente con ingesta de 20 mg de NFD de Laboratorio Chile tomadas a diferentes tiempos.	109
TABLA 11:	Comparación del rendimiento de diferentes electrodos modificados con utilizando diferentes técnicas para el análisis de NFD.	111
TABLA 12:	Propiedades físicas y químicas de antagonistas de canales de calcio en estudio, pertenecientes a la familia de 1,4-dihidropiridina	120-121
TABLA 13:	Parámetros analíticos instrumentales de los 6 antagonistas de canales de calcio en estudio, utilizando dos fases móviles acuosas diferentes: 0,1% ácido fórmico (B1), 10 mM de acetato de amonio pH 5 (B4).	126-127
TABLA 14:	Valores de %EM y %Re para los 6 nitro compuestos en estudio en muestras reales de agua extraídas de la	130

	depuradora Quart.	
TABLA 15:	Comparación del %Re informado para diferentes métodos analíticos en la determinación de Amlodipino en muestras de agua.	132
TABLA 16:	Cuantificación de los seis antagonistas de canales de calcio en estudio en muestras de agua residuales de la planta de depuración Quart.	133
TABLA 17:	Comparación de diferentes métodos analíticos para la extracción y determinación de fármacos de la familia de las 1,4-dihidropiridinas en matrices de agua real y plasma humano.	135
TABLA 18:	Comparación de los límites de detección de NFD utilizando los diferentes métodos electroanalíticos expuestos en este trabajo.	136
TABLA 19:	Comparación de los límites de detección de NFD, tiempo del tratamiento de la muestra y el valor de equipo entre la técnica electroanalítica por sistema FIA y cromatografía líquida.	138

VIII. RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un método voltamétrico de flujo continuo (FIA) con electrodos serigrafiados de nanofibras de carbono (SPE-CNF) para la determinación de dos nitro-compuestos de la familia de las 1,4-dihidropirinas que son nifedipino (NFD) y nimodipino (NMD). Se utilizó un electrolito soporte de 0,1 M buffer Britton-Robinson/NaCl (BR-NaCl) pH 3, donde se realizó el estudio de los procesos de reducción y oxidación. Estas drogas contienen un grupo nitro en su estructura en donde uno de los procesos redox, es la reducción del grupo nitro a derivado hidroxilamínico con una alta respuesta en corriente debido a una transferencia de $4H^+$ y $4e^-$, por lo que la técnica de voltametría de barrido lineal (LSV) es adecuada para seguir analíticamente este proceso, ya que presenta una muy buena correlación entre la concentración y la corriente del proceso.

La ventaja de utilizar un sistema de flujo continuo, es que se puede ir variando el volumen de muestra, para que la adsorción del analito en la superficie del electrodo aumente considerablemente. Esto demostró que al ir aumentando el volumen de muestra, aumenta el tiempo de interacción del analito sobre las nanofibras de carbono del electrodo serigrafiado, concentrando una mayor cantidad y aumentando la sensibilidad de la determinación, donde las mismas nanofibras de carbono son las que hacen de un sistema de microextracción en

fase sólida. Es así que para 11 mL de muestra se obtiene un límite de detección instrumental de 2,79 µg/L para NFD.

Este método voltamétrico se aplicó en diferentes tipos de muestras reales tales como: farmacéuticas, orina y aguas residuales, donde se obtuvieron altos % de recuperación y desviación estándar relativa menor al 5%.

A su vez, se compararon los parámetros analíticos de este método electroquímico con los obtenidos a través de un método cromatográfico para esta familia de fármacos. Se utilizó la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa (UHPLC-QqLIT), utilizando previamente un método de extracción en fase sólida (EFS) utilizando *catridge* Oasis-HLB. Al comparar ambas técnicas se observa que los límites de detección son mayores en dos orden de magnitud para el método electroquímico.

Sin embargo este método provee límite de detecciones muchos más bajos que los reportados por otros métodos electroquímicos, siendo a la vez, un método más económico, más rápido, con menos procedimientos en el pretratamiento de las muestras, y además se utiliza menos solvente que los métodos cromatográficos, como lo es UHPLC-QqLIT.

IX. ABSTRACT

In this work, a continuous flow injection analysis (FIA) with screen printed electrodes of carbon nanofibers (SPE-CNF) was developed for the determination of two nitro-compounds of the family of 1,4-dihydropyridins which are nifedipine (NFD) and nimodipine (NMD). A support electrolyte of 0.1 M buffer Britton-Robinson/NaCl (BR-NaCl) pH 3 was used, where the reduction and oxidation processes were studied. These drugs contain a nitro group in their structure where one of the redox processes is the reduction of the nitro group to hydroxylamine derivative with a high current response due to a transfer of 4H^+ and 4e^- , so the linear sweep voltammetry technique (LSV) is suitable to follow this process analytically, since it presents a very good correlation between the concentration and the current of the process.

The advantage of using a continuous flow system is that the sample volume can be varied so that the adsorption of the analyte on the surface of the electrode increases considerably. This demonstrated that as the sample volume increases, the time of interaction of the analyte on the carbon nanofibers of the electrode increases, concentrating a larger quantity and increasing the sensitivity of the determination, where the same nanofibres of carbon are the ones that make of a solid phase microextraction system. Thus, for a sample of 11 mL, a detection of limit of $2.79 \mu\text{g/L}$ for NFD is obtained.

This voltammetric method was applied in different types of real samples such as: pharmaceutical, urine and aqueous matrices, where analytical parameters of

low of %matrix effect, high of %recovery and the relative standard deviations of lower than 5% were obtained.

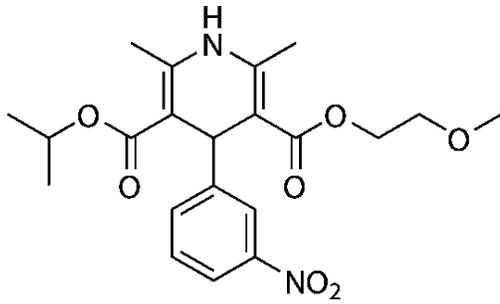
In turn, the analytical parameters of this electrochemical method were compared with those obtained through a chromatographic method for this family of drugs. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-QqLIT) was used, previously using a extraction phase solid method with cartridge Oasis-HLB. When comparing both techniques it is observed that the detection limits are two degrees of magnitude higher for the electrochemical method. However, to be an electrochemical method in this work, much lower values are reached than previously reported, being a cheaper, faster method, with less procedures in pretreatment of the samples, and also uses less solvent than the chromatographic methods, such as UHPLC-QqLIT.

1. INTRODUCCIÓN

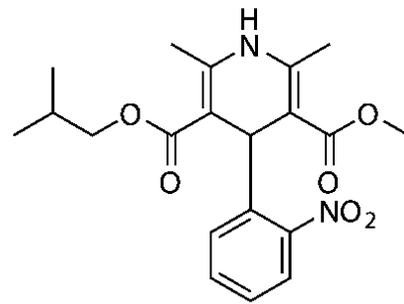
Las drogas antagonistas de canales de calcio son medicamentos que actúan mediante el bloqueo de la corriente de calcio hacia el interior de la célula y afectan particularmente a las células donde la entrada de calcio es relativamente más importante. El principal uso de esta droga es en el tratamiento de la angina de pecho y la hipertensión, algunos se utilizan también en arritmias cardíacas⁽¹⁾. Un grupo de drogas antagonistas del calcio lo constituyen las 1,4-dihidropiridinas.

Dentro de la familia de las 1,4-dihidropiridinas, existen cuatro compuestos que son los más usados: nimodipino, nisoldipino, nitrendipino y nifedipino. Todos estos compuestos son nitro-derivados como se puede ver en sus estructuras químicas presentadas en la figura 1.

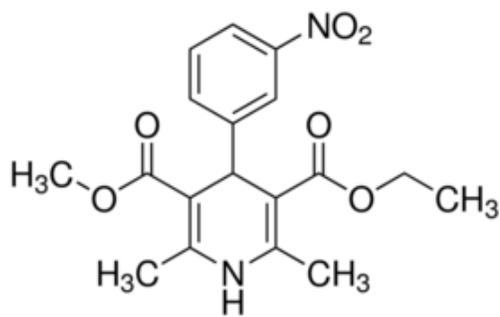
Algunas de las propiedades químicas⁽²⁾ de los compuestos considerados se observan en la tabla 1. Este tipo de antagonistas de canales de calcio, contienen en su estructura un anillo dihidropiridínico, lo cual hace que su pKa sea muy similar al de este tipo de grupo funcional (aproximadamente pKa 5.16), considerados como ácidos débiles, de baja polaridad y solubilidad en agua.



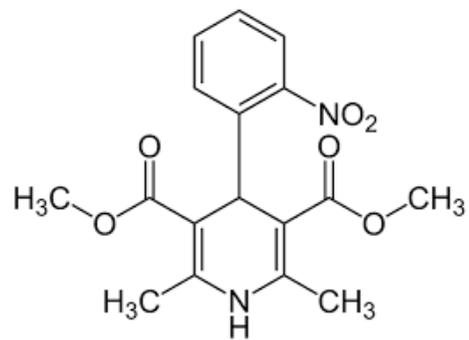
MW: 418.44
NIMODIPINO



MW: 348,41
NISOLDIPINO



MW: 360.36
NITRENDIPINO



MW: 346.34
NIFEDIPINO

Figura 1. Estructuras de algunos antagonistas de calcio.

Tabla 1. Propiedades químicas y dosis diaria indicada de los compuestos nitro-derivados de las 1,4-dihidropiridina.

Propiedades	Nimodipino	Nisoldipino	Nitrendipino	Nifedipino
Constante de disociación (pKa)	5,41	5,32	5,43	~5,17
Solubilidad en agua (mg/L) a 25°	1,20	0,57	1,42	1,77
Dosis diaria en cápsula (mg)	60	40	40	60

Las 1,4-dihidropiridinas han sido determinadas mediante diversas técnicas analíticas. Los métodos reportados en literatura incluyen espectrofotometría y técnicas de separación como cromatografía líquida, específicamente HPLC⁽³⁻⁶⁾. Existen estudios a través de espectrofotometría en los que se demuestra la fotodegradación de nisoldipino⁽⁷⁾, así también a través de la misma técnica se ha demostrado que nifedipino, es fototóxico para la piel humana^(8,9). Además, mediante cromatografía gaseosa y técnicas espectroscópicas UV, se ha estudiado la estabilidad de nisoldipino^(10,11), nifedipino y otros derivados de 1,4-dihidropiridina en disolventes orgánicos y en complejos de inclusión con β -ciclodextrina.

Por su parte, HPLC-DAD se ha aplicado para seguir la degradación hidrolítica de nitrendipino y nisoldipino⁽¹²⁾ en formas farmacéuticas, donde la hidrólisis de cada fármaco se llevó a cabo en etanol / tampón Britton-Robinson a diferentes pH, almacenado en viales de color ámbar a temperatura controlada de 40, 60 y 80 ° C. También se ha informado la determinación en formas farmacéuticas de nifedipino por cromatografía de alto rendimiento de capa fina (HPTLC)⁽¹³⁾, donde la fase móvil utilizada fue una solución de cloroformo, acetato de etilo y ciclohexano (19:2:2 v/v/v).

Este tipo de drogas al ponerse en contacto con el medio acuoso (aguas residuales o superficiales específicamente) pasan considerarse como contaminantes lo cual ha sido de alta preocupación desde 1985⁽¹⁴⁾. Las vías principales llegada o aparición de productos farmacéuticos en el medio ambiente son a través de la excreción humana, la eliminación de los productos no utilizados y por el uso agrícola⁽¹⁵⁾. Una amplia gama de productos farmacéuticos se han detectado en aguas superficiales y subterráneas, asociado con la eliminación de las aguas residuales, es por eso que desde esta perspectiva los antagonistas de canales de calcio también se pueden llegar a transformar en contaminantes emergentes.

El término de contaminantes emergentes se utiliza para referirse a compuestos que no han sido considerados como contaminantes primarios; como compuestos orgánicos y metales pesados. Estos se consideran ya que tienen

importancia en el agua por su distribución y/o su concentración, los cuales están siendo más ampliamente detectados, teniendo un potencial de causa conocida o sospecha de efectos adversos para la salud humana o problemas medio ambientales. Recién desde el 2004⁽¹⁶⁾, se implementaron técnicas analíticas para detectar sus microconcentraciones, y a su vez, están siendo observados en el medio ambiente acuoso. Un ejemplo es la detección del metaldehído⁽¹⁷⁾, donde realizaron recientemente un análisis crítico de la evolución de este contaminante emergente.

Así, la característica más importante de estos contaminantes es que no necesitan ser persistentes en el medio ambiente para causar efectos negativos, ya que su alta transformación y tasa de retiro puede ser compensada con su introducción continúa al medio ambiente.

Los contaminantes emergentes se pueden clasificar según sus propiedades químicas y físicas en pesticidas, productos farmacéuticos, productos veterinarios, de cuidado personal, plastificantes y aditivos industriales, entre otros^(18,19).

En este escenario, al querer detectar fármacos, considerados como contaminantes emergentes, en muestras reales de aguas residuales o superficiales, se requiere un método de mayor sensibilidad, para disminuir el límite de detección y cuantificación, ya que las concentraciones pueden ser muy pequeñas en este tipo de matriz. Existen tres etapas fundamentales en este tipo

de análisis, primero es la extracción de la muestra, la preconcentración y finalmente la detección del analito en estudio. Uno de los métodos que existen para realizar este tipo de análisis, es el sistema secuencial analítico, donde mayoritariamente utilizan métodos convencionales. Este método propone utilizar las tres etapas por separado, donde mayoritariamente se destaca la preconcentración y la detección del analito.

Para la preconcentración se han utilizado varios métodos de microextracción desarrollados para la concentración/separación de contaminantes emergentes⁽²⁰⁻²³⁾ lo que permite simplificar el procedimiento de extracción, ahorrar tiempo y trabajo, así como reducir considerablemente la cantidad de disolvente orgánico utilizado. La microextracción en fase sólida (MFS) es un método simple y conveniente⁽²⁴⁾. La determinación de residuos farmacéuticos en aguas superficiales y aguas residuales usando MFS con HPLC o GC se han informado anteriormente^(25, 26). Se han descrito diversos sorbentes para su uso⁽²⁷⁾ en MFS como polidimetilsiloxano (PDMS) (para analitos de baja polaridad), polidimetilsiloxano-divinilbenceno (PDMS-DVB) (para analitos semi-polares) y poliacrilato (PA) (para analitos polares). La fase polimérica de PDMS se usa preferentemente para el análisis de compuestos apolares, aunque también se ha descrito su uso para compuestos polares⁽²⁸⁾. La evolución de MFS en el último tiempo ha sido notable y para mejorar la capacidad de esta técnica se han propuesto diferentes polímeros y de espesor variable⁽²⁹⁾.

De este modo, existen registros de métodos convencionales donde utilizan la MFS para determinar una variedad de fármacos en muestras de agua residuales como superficiales, este método ha resultado ser exitoso, por los bajos límites de detección que se han logrado en matrices medioambientales acuosas y reconocidos por la química analítica como uno de los mejores diseños para poder determinar este tipo de muestras.

Estos métodos son basados en el uso de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masa, con el objetivo de incrementar la eficiencia de las muestras, minimizar la manipulación de las muestras, disminuir el uso de solventes y aumentar la sensibilidad y selectividad de los métodos, alcanzado concentraciones del orden de los sub-ppt donde se identifican una gran variedad de compuestos simultáneamente.

Entre las cromatografías líquidas, la más usada hoy en día, es la cromatografía líquida de ultra-alta presión (UHPLC)⁽³⁰⁾, que usa cortas columnas, empaquetadas con partículas de tamaño pequeño (sub-2- μm), y utilizando presiones altas^(31,32). Por estas razones la UHPLC es considerada como la más rápida y versátil de las cromatografías convencionales. Además de presentar facilidades para la resolución de los picos y reduciendo también los efectos de la matriz.

En relación a la espectrometría de masa (MS), que es usada como un método acoplado a UHPLC, existen varios tipos de combinaciones de analizadores;

como el de cuádruplo con tiempo de vuelo (quadrupole-time-of-flight: QqTOF) y cuádruplo con trampa iónica lineal (quadrupole-linear ion trap: QqLIT), donde ambas configuraciones ofrecen ventajas respecto del triple cuádruplo (QqQ), siendo más sensibles⁽³³⁾, se puede monitorear a la vez muchas transiciones en un solo tiempo de retención de ventana⁽³⁴⁾. QqTOF es el más simple de los instrumentos que se utilizan en la actualidad, puede reconocer pequeñas diferencias entre las masas iónicas, teniendo una alta reproducibilidad. QqLIT tiene aplicaciones simultáneas entre la corriente directa (DC) y trampa de iones de radio frecuencia (RF) que se consigue por un tiempo en el que se produce la separación de iones, que se pueden combinar en un solo experimento a través de la función Dependiente de Adquisición de Información (IDA)⁽³⁵⁾.

Otro tipo de sistema para realizar el análisis de fármacos es uno que une las tres etapas (extracción, preconcentración y detección del analito) en un solo paso, utilizando un sistema electroquímico específico, descrito a continuación.

La determinación electroquímica ofrece ventajas adicionales como un menor límite de cuantificación, la posibilidad de usar muestras pequeñas y el uso de instrumental menos costoso. También puede ser usada para la cuantificación de diferentes analitos debido a la variedad de materiales y procesos que pueden ser usados para la detección⁽³⁶⁾. Por otro lado la detección electroquímica es fácilmente acoplable a un sistema de flujo continuo, el cual ofrece ventajas adicionales de rapidez, bajo consumo de muestras y reactivos,

y mejoramiento en las propiedades analíticas: sensibilidad, frecuencia de muestreo, precisión y exactitud⁽³⁷⁾, y por lo cual se ha demostrado que la electroquímica/hidrodinámica es un buen sistema de monitoreo tanto en HPLC como en FIA⁽³⁸⁾.

Además, con el objetivo de miniaturizar una celda electroquímica se han desarrollado los electrodos serigrafiados de carbono o llamados screen printed electrodes en inglés (SPE) los cuales son compatibles con el sistema de flujo continuo (FIA-SPE).

Los electrodos serigrafiados (SPE)⁽³⁹⁾ son sensores innovadores fabricados para el análisis electroquímico en las áreas medioambientales, clínicas o agroalimentaria. Son sistemas de bajo costo, desechables, diseñados para trabajar con microvolúmenes de muestra. Las dimensiones generales de las tiras son: 3,4 x 1,0 x 0,05 cm. Como se muestra en la figura 2, las tiras de un electrodo serigrafiado de carbono están “impresos” el electrodo de trabajo formado por nanotubos, nanofibras de carbono, o muchos otros materiales. El electrodo de referencia que es de Ag/AgCl y el contraelectrodo en algunos casos también es carbono o platino, según la fabricación.

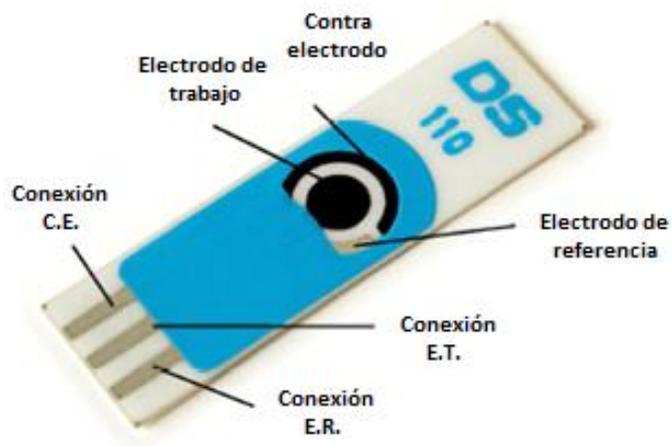


Figura 2. Ilustración de una lámina de electrodo serigrafiado.

Dentro de los SPE, los más usados como electrodos de trabajo son los fabricados con nanomateriales de carbono (NMCs). Los NMCs son materiales que poseen extraordinarias propiedades estructurales, físicas, químicas, eléctricas y mecánicas⁽⁴⁰⁾. Comúnmente se utilizan dos; nanotubos de carbono (NTCs) los cuales son láminas de grafito enrolladas sobre sí mismo y por otra parte las nanofibras de carbono (NFCs) son cilindros al igual que sus contrapartes los NTCs, con la diferencia que no se encuentran huecas. Desde el punto de vista electroquímico, estos NMCs mejoran la cinética de transferencia entre las especies electroactivas y el electrodo, provocando un aumento en la intensidad de corriente, comparado con un electrodo de carbono vítreo sin modificar. Poseen la posibilidad de renovar su superficie, formando capas

activas. Considerando una posición ventajosa en la evolución de sensores químicos y biosensores⁽⁴¹⁾.

La ventaja más notable que se tiene al utilizar el sistema FIA-SPE-NMC es que sobre la superficie del electrodo de trabajo se puede realizar en un solo paso la extracción, preconcentración y detección del analito, además del bajo costo que tiene este tipo de método. Sus características apuntan a la química moderna siendo un sistema automatizado; por tener un sistema en flujo continuo, miniaturizado; usando SPEs y finalmente simplificado; disminuyendo el tiempo de tratamiento de la muestra para un análisis más rápido siempre comparado con un método cromatográfico como lo es MFS-UHPLC-MS.

En literatura se reporta la comparación del material del electrodo de trabajo de los SPE, utilizados para la determinación de nifuroxazida⁽⁴²⁾, el cual tiene el mismo proceso de reducción que los antagonistas de canales de calcio, donde su grupo nitro se reduce al derivado de hidroxilamínico. Se comparan tres tipos de electrodo; SPE-carbono (SPCE), SPE-nanofibras de carbono (CNF-SPCE) y SPE-nanotubos de carbono (CNT-SPCE), donde la mejor respuesta la obtuvo los SPE-NFC, dando la más alta señal como lo muestra el estudio de voltametría lineal que realizaron los autores en la figura 3. Además, la correlación de la señal de pico de este proceso para este analito, también la obtiene los SPE-NFC, siendo una señal reproducible con un error menor a un 5%.

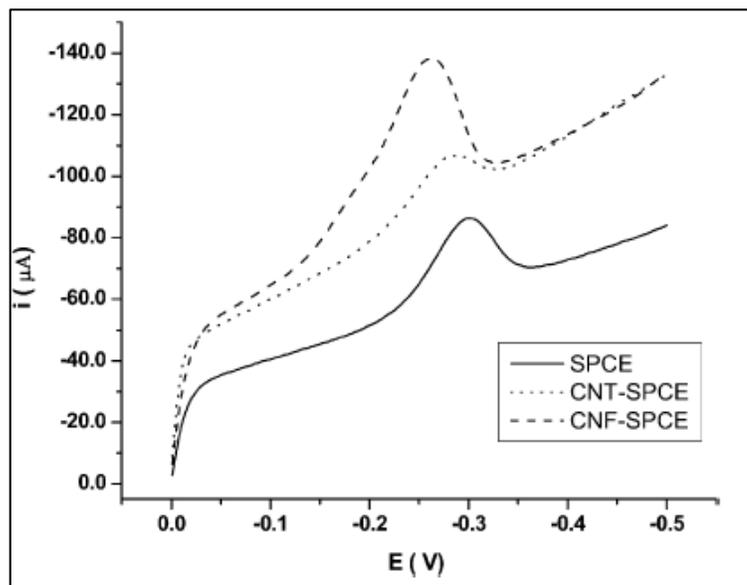


Figura 3. Voltamogramas comparativos en sistema FIA, usando diferentes electrodos de trabajo de SPE. Caudal = 1,5 mL/min, tiempo deposición = 80 s, potencial de preconcentración = 800 mV, pH 2, concentración de nifuroxazida 1 $\mu\text{g/mL}$, v_B 200 mV/s.

Existen diferentes trabajos donde se han reportado el estudio de nifedipino en muestras farmacéuticas y orina mediante métodos de espectrofotometría⁽⁴³⁾ basado en la reducción del grupo nitro y el grupo de la dihidropiridina. Por otro lado por métodos electroquímicos^(44,45), utilizando métodos de pretratamiento para estudiar la recuperación de esta droga en diferentes matrices. Sin embargo, existe un trabajo, en el cual se estudió muestras de orina de la nitrofurantoína⁽⁴⁶⁾, utilizando un sistema electroquímico con electrodos serigrafados de nanofibras de carbono acoplado a un sistema FIA, en el cual el

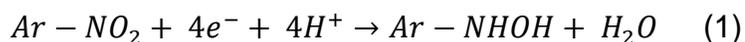
pretratamiento de las muestras de orina para su análisis, se resume en una adición estándar utilizando como matriz orina de personas sanas.

Es así que al estudiar las 1,4-dihidropiridinas electroquímicamente, se encuentran presentes dos grupos funcionales electroactivos que han sido estudiados y determinados por diferentes técnicas utilizando un sistema batch.

A través de estos estudios se han dilucidado los mecanismos redox, proponiendo métodos voltamétricos de pulso diferencial para la cuantificación de algunos de estos compuestos en preparaciones farmacéuticas o en fluidos biológicos^(47,48). También el nifedipino ha sido determinado en formas farmacéuticas⁽⁴⁹⁾ (tabletas y cápsulas) a través de polarografía de pulso diferencial.

Las propiedades electroactivas de este tipo de drogas es la reducción electroquímica del grupo nitro y la oxidación del anillo dihidropiridínico.

Se ha estudiado la reducción voltamétrica del grupo nitro de nitrendipino en electrodos de Hg, carbono vítreo y de pasta de carbono en soluciones hidroalcohólicas⁽⁵⁰⁻⁵²⁾. La reducción voltamétrica de nitrendipino en medio acuoso generalmente sigue el patrón de todos los nitro-aromáticos, produciendo un único pico de reducción irreversible de 4 electrones y 4 protones de acuerdo con la ecuación 1:



A través de voltametría cíclica es factible observar en el barrido inverso un proceso cuasi-reversible a dos electrones, dos protones atribuibles a la oxidación / reducción de la aril-hidroxilamina/aril-nitroso, de acuerdo con la ecuación 2:



Existen trabajos donde nitrendipino ha sido estudiado sobre electrodos de trabajo de carbono vítreo modificado con nanotubos de multi-pared ⁽⁵³⁾, en buffer Britton Robinson a pH 2. Este trabajo se observa en la figura 4, donde se muestra un voltamograma cíclico. En el primer barrido (línea continua), se observa un pico agudo grande, correspondiente a la reducción irreversible del grupo nitro (ec. 1). En el barrido de vuelta, se observa solamente un pico de oxidación. En el segundo barrido catódico, proceso reductivo, se observa otro pico de reducción, ambos se atribuye al par redox oxidación/reducción de los derivados de hidroxilamina/nitroso (ec. 2). En el tercer barrido (línea punteada), se observa que el primer pico de reducción del grupo nitro desaparece completamente, a pesar del medio homogéneo que contiene el compuesto. Esto se debe a que los sitios activos del electrodo quedan bloqueados, producto de la reacción de reducción inicial.

También se reporta en literatura⁽⁵⁴⁾, que el anillo dihidropiridínico presenta una oxidación irreversible, en potenciales más positivos que la oxidación de la aril-hidroxilamina, correspondiente a la ecuación 3:



La figura 5 muestra el voltamograma de oxidación del derivado dihidropiridínico, el cual se realizó utilizando electrodo de carbono vítreo a pH < 2,5 hacia barridos positivos, la aplicación existente también permitió detectar nifendipino en drogas que lo contenían.

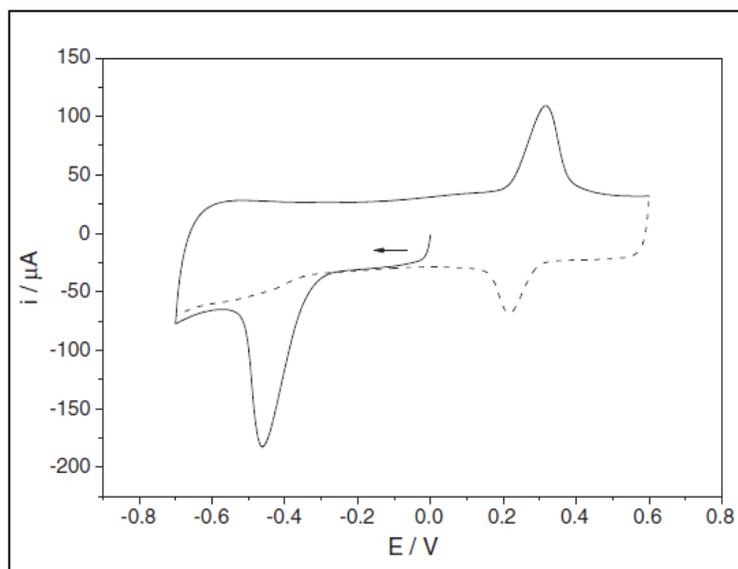


Figura 4. Voltametría cíclica a pH 2 Britton-Robinson 0,1M, con 0,1mM de nitrendipino después de la acumulación por 4 minutos a circuito abierto sobre electrodo de trabajo de carbono vítreo modificado con nanotubos de multipared. Primer barrido (línea continua) y segundo barrido (línea punteada).

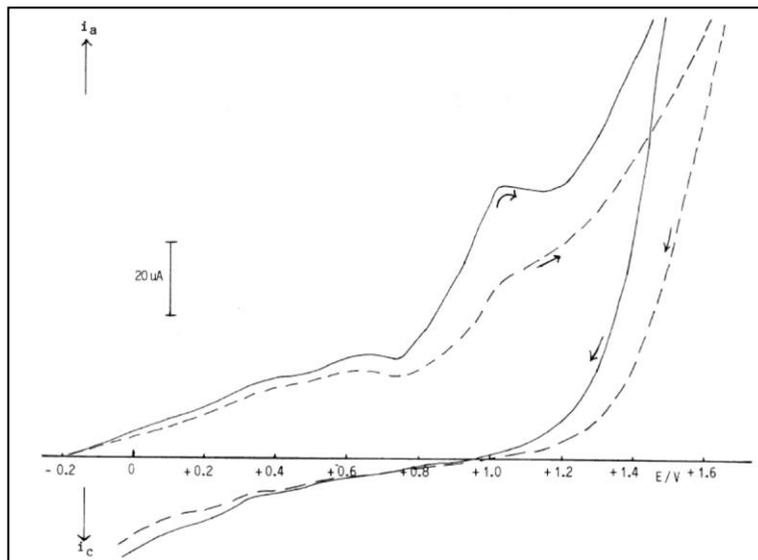


Figura 5. Línea continua: Voltametría cíclica de nifedipino 2×10^{-4} M en buffer Britton-Robinson pH 1,5. v_B 100 mV s^{-1} . Línea punteada: representa la corriente residual.

En literatura no existen reportes donde se utilicen electrodos SPE en un sistema FIA determinando antagonistas de canales de calcio en formas farmacéuticas y orina, es por eso que este trabajo tiene como primer objetivo implementar un sistema FIA-SPE-NMCs, el cual permitirá el estudio redox de los antagonistas de canales de calcio en este tipo de electrodos y establecer un nuevo método electroanalítico de determinación de estos compuestos que suministre una mayor facilidad de medición y una mayor frecuencia de análisis.

En este trabajo se escogieron dos de estos antagonistas de canales de calcio, para estudiar su comportamiento electroquímico sobre los SPE-CNF utilizando las técnicas de voltametría cíclica y barrido lineal, para detectar nifedipino

(NFD); el cual tiene el grupo nitro en posición orto y nimodipino (NMD); en posición meta. Y así observar sus diferencias, para luego aplicar este método en diferentes muestras reales; formas farmacéuticas, en orina y en aguas residuales de afluyente.

Por otro lado existen muchos trabajos donde aplican este tipo de método utilizando UHPLC-MS combinado con MFS para determinar una variedad de fármacos en matrices medio ambientales ^(53,54) en una sola inyección. Dentro de estos trabajos, existe un método ya reportado ^(55,56) en el Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA), localizado en Girona, Cataluña-España, donde realizan un método que determinan 81 compuestos sobre matrices medioambientales, dentro de ellos algunos antagonistas de canales de calcio. En este trabajo uno de los objetivos es implementar este método con este tipo de drogas correspondientes a las 1,4-dihidropiridinas, para poder comparar los límites de detección entre un método analítico convencional y uno electroquímico acoplado a un sistema de flujo continuo, para poder así lograr igualar o bajar estos valores utilizando el sistema FIA-SPE-CNF previamente descrito.

2. HIPÓTESIS

Una metodología electroanalítica basada en un sistema FIA acoplado con electrodos serigrafiados de nanomateriales de carbono permitirá determinar antagonistas de canales de calcio en formas farmacéuticas y orina, de manera más eficiente a lo actualmente reportado, y además, el comportamiento de estos electrodos como un sistema de extracción en fase sólida hará factible la extensión de la metodología a matrices acuosas como aguas residuales o superficiales donde se requiere mayor sensibilidad.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Implementar un método electroquímico utilizando electrodos serigrafados de nanomateriales de carbono en un sistema de flujo para detectar antagonistas de canales de calcio en formas farmacéuticas y orina y optimizar un sistema de extracción en fase sólida en línea, utilizando las mismas nanofibras de carbono del electrodo de trabajo, para determinar los analitos en matrices acuosas ambientales.

3.2. Objetivo específico

1. Estudiar el comportamiento voltamétrico de nifedipino (NFD) y nimodipino (NMD) en SPE-CNF en un sistema batch, analizando el comportamiento catódico, anódico a diferentes pHs.
2. Aplicar la detección voltamétrica a un sistema en flujo continuo de acuerdo a las características encontradas, además, optimizar este sistema de acuerdo a las propiedades del sistema FIA.
3. Aplicar el método voltamétrico en muestras farmacéuticas y muestras de orina.
4. Estudiar un método de preconcentración, para luego optimizarlo en el método voltamétrico para poder determinar NFD y NMD en matrices acuosas medioambientales.

5. Validar el método voltamétrico utilizando las mismas matrices acuosas medio ambientales en un sistema cromatográfico ya reportado.
6. Comparar los parámetros analíticos de la metodología utilizando la técnica de cromatografía líquida acoplada a espectroscopia de masa en matrices acuosas medioambientales.

4. METODOLOGÍA

4.1. Reactivos

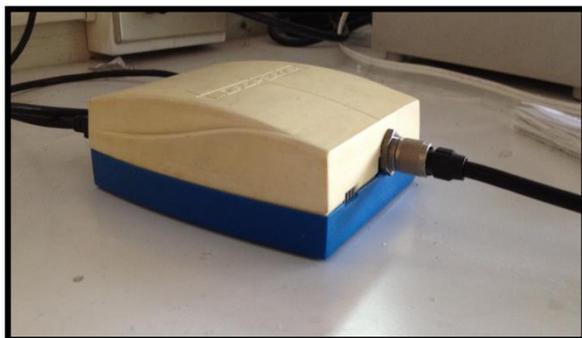
Nifedipino de Laboratorio Chile, Nimodipino de Sigma, Ácido acético de Merck, Ácido fosfórico de Merck, Ácido bórico de Merck, Cloruro de sodio de Winkler, Dimetilformamida de Merck, Agua Milli-Q, reactivos utilizados para el método electroquímico. Nifedipino, Nimodipino, Amlodipino, Felodipino, Isradipine, Nitrendipine, Amlodipine-d4, Nimodipino-d7; todas de European Pharmacopoeia. Metanol grado HPLC, acetonitrilo, water (Lichrosolv) de Merck. Hidróxido de Amonio y Na₂EDTA 0,1 mol/L de Panreac. Ácido fórmico 98% de Merck. Nitrógeno 99,9990% de pureza para el secado de Abelló Linde S.A. (España). Agua Milli-Q para el sistema de HPLC de Millipore Ibérica S.A. (España), reactivos utilizados para el método analítico.

4.2. Equipamiento

El equipamiento utilizado en el Centro de Investigación de Procesos Redox de la Universidad de Chile es:

Potenciostato Dropsens, electrodo serigrafiado de nanotubos y nanofibras de carbono de Dropsens, celda de flujo y celda batch ambas de acrílico, Bomba Metrohm 715 Dosimat, Balanza analítica Precisa 40SM-200A.

(A)



(B)



Figura 6. (A) Potenciostato Dropsens utilizado para el estudio electroquímico. (B) Bomba Metrohm 715 Dosimat utilizado para el sistema FIA acoplado a las celdas de acrílico específicas para la utilización de SPE.

El equipamiento utilizado en el Instituto Catalán de Investigación del Agua, Gerona, España es:

Catridge usados para la extracción en fase sólida son Oasis HLB (60 mg, 3 mL) de Waters Corporation (Milford, MA, U.S.A.). Filtros de fibra de vidrio de 1 μm y filtros de membrana de nylon de 0,45 μm , ambos de Whatman (U.K). Separación cromatográfica se llevó a cabo con un sistema de Waters Acqquity Ultra-PerfomanceTM liquid chromatograph system, equipado con sistema de dos bombas binarias (Milford, MA, USA) usando una columna Acquity HSS T₃ (50 mm x 2,1 mm i.d., tamaño de partícula 1,8 μm) también

de Waters Corporation. El instrumento de UHPLC está acoplado a espectroscopia de masa de 5500 QTRAP lineal de cuádruplo triple híbrido con trampa iónica (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) con una fuente de ion espray turbo.

4.3. Procedimiento experimental.

4.3.1. Método Electroanalítico.

Cabe destacar que todas las soluciones han sido sometidas bajo una atmósfera inerte de N_2 (g) para eliminar el oxígeno presente.

I) Selección de analitos.

Nifedipino (NFD): $C_{17}H_{18}N_2O_6$, grupo nitro en posición orto. MM: 346,36 g/mol (Fig. 1).

Nimodipino (NMD): $C_{21}H_{26}N_2O_7$, grupo nitro en posición meta. MM: 418,44 g/mol (Fig. 1).

II) Preparación de soluciones estándar.

Se prepararon soluciones estándares utilizando como solvente etanol P.A. donde se determinó la masa para NFD y NMD necesaria para 1×10^{-3} M en 5 mL de solución, luego se toman alícuotas respectivas para preparar soluciones en 0,1 M buffer Britton-Robinson-NaCl (BR-NaCl) para los estudios siguientes.

III) Sistema batch.

a) Celda electroquímica.

Mediante el uso de estándares se realizó el estudio para la obtención de un método voltamétrico usando SPE-CNF para la determinación y cuantificación de NFD y NMD mediante sus propiedades electroactivas. En este método se utilizó una celda de acrílico, la cual es específica para este tipo de electrodos con un volumen de 9,5 mL, la implementación se observa en la figura 7. Al tener la solución ya en la celda, se burbujea primero con N_2 (g) durante unos 15 min aproximadamente, luego se sumerge el electrodo, siempre sobre una atmósfera inerte, durante este proceso siempre se está agitando la solución que está contenida en la celda y se deja de agitar para realizar la medición voltamétrica.

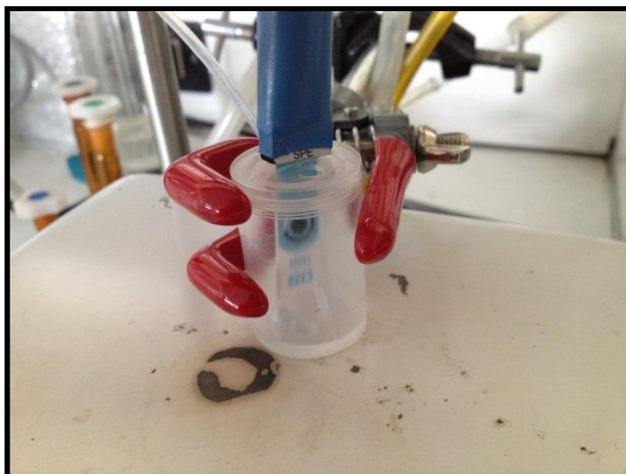


Figura 7. Implementación de celda de acrílico específica para utilizar SPE en sistema batch.

b) Estudios de variables voltamétricas.

Se optimizaron las variables más críticas del sistema voltamétrico, analizando el comportamiento catódico, anódico (desde -1 a 1 V) para ambos analitos, se determinaron los procesos redox, realizando voltametría cíclica, y a su vez, se realizó la comparación del comportamiento por voltametría de barrido lineal (LSV) y voltametría de pulso diferencial (DPV). Además, se realizó una comparación del nanomaterial del electrodo de trabajo, comparando el comportamiento de la señal de reducción del grupo nitro para ambos analitos.

El estudio de pH se llevó a cabo dentro de un rango de 2 a 10 donde se estudió por LSV el comportamiento del proceso de reducción del grupo nitro, esto se realizó utilizando 0,1 M buffer BR-NaCl donde se fue ajustando el pH con NaOH y H₃PO₄. Utilizando siempre una concentración de NFD de 10⁻⁴ M.

Finalmente se realizó el estudio de tiempo de acumulación, donde se sumerge el SPE-CNF en una solución de NFD 1x10⁻⁴M por diferentes tiempos y se estudia como la señal de reducción del grupo nitro cambia su corriente y su potencial de reducción.

c) Estudio de parámetros analíticos en sistema batch.

Se realizó un curva de calibrado solamente para NFD, basándonos en el comportamiento electroquímico similar que tienen ambos fármacos en estudio. Se observó el comportamiento de la corriente de pico, en función de diferentes

concentraciones dentro de un rango de trabajo de 0,37-9,28 mg/L, donde se determinaron los parámetros analíticos (sensibilidad, límite de detección y cuantificación, exactitud y precisión). Las ecuaciones utilizadas se encuentran descritas en el punto 6.3.3.

IV) Sistema FIA.

a) Funcionamiento sistema de flujo continuo.

Se diseñó e implementó un sistema de flujo continuo con un caudal de 1,52 mL/min usando un electrolito de 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3, en el cual se inyectaron los estándares correspondientes. Se estudiaron las mejores condiciones de detección; tiempo de estabilización del sistema; volumen de inyección de muestra; caudal; etc. En este tipo de sistema de flujo continuo, el electrodo esta sobre una celda de acrílico específica para un sistema FIA, figura 8, en donde el flujo llega directamente a la superficie del electrodo, y luego es eliminado por otra manguera que va succionando el flujo que llega a la superficie del electrodo, siempre se mantiene un volumen constante de solución sobre su superficie. El flujo es impulsado mediante una bomba el cual es burbujeado previamente con N₂ (g) manteniendo siempre una atmósfera inerte en el sistema. La solución de NFD y NMD que es inyectada en el sistema también previamente burbujeada, ambas soluciones siempre diluidas en el electrolito soporte.

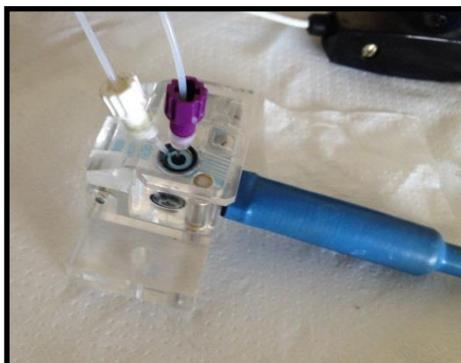


Figura 8. Celda de acrílico específica para utilizar el sistema FIA-SPE.

b) Modificación de la superficie del electrodo.

En literatura existe un método reportado⁽⁵⁷⁾ el cual se aplica para los SPE-CNF en un sistema FIA. Consiste en sumergir el electrodo previamente, en una solución de 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3 con DMF, en una razón de 70:30 por 15 minutos, para aumentar la rugosidad de la superficie, lo que aumenta los sitios activos del electrodo y por lo tanto aumenta el área activa. Después del tiempo determinado se lava con abundante agua Milli-Q, y se introducen en la celda correspondiente para ser utilizados. Tener cuidado de no mojar los conectores del SPE-CNF.

c) Estudio del tiempo de acumulación y volumen de muestra.

Con el fin de observar la correlación de intensidad de corriente en función del volumen de muestra, se realizó un estudio de tiempo de acumulación de los antagonistas de canales de calcio adsorbidos por los SPE-CNF. La muestra es inyectada al sistema FIA, y es arrastrada por el electrolito hacia la superficie del electrodo, la cual se hace pasar por un tiempo determinado para que pase toda la muestra por el sistema, por lo que a medida que se va aumentando el volumen de muestra, se aumenta el tiempo de interacción del analito con la superficie del electrodo. Este método se realiza mediante LSV y se va observando la señal de corriente de reducción del grupo nitro.

d) Parámetros analíticos en sistema FIA.

Se determinaron los parámetros analíticos instrumentales (sensibilidad, límites de detección y cuantificación, repetibilidad y reproducibilidad). Ver la sección 4.3.3.

Las mismas condiciones optimizadas del método FIA para la determinación de NFD se aplicaron también en la determinación de los parámetros analíticos de NMD. Para determinar estos parámetros, se realizó una curva de calibrado para cada droga utilizando diferentes volúmenes de muestra. Para todas las curvas de calibrado cada concentración se midió tres veces consecutivamente.

e) Aplicación del método en muestras farmacéuticas.

Luego de optimizar y validar la metodología, esta se aplicó en formas farmacéuticas para determinar NFD y NMD en este tipo de matriz. En la aplicación en formas farmacéuticas, primero se simuló una tableta comercial de NFD de 20 mg y de NMD de 30 mg. Cabe destacar que el procedimiento para cada droga se realizó por separado. Se masaron tres tabletas comerciales, por separado, se registró su masa, y se tomó el promedio de este valor, el cual se multiplicó por tres para que la masa de los excipientes tuvieran un menor error de medida. Los excipientes utilizados fueron lactosa (45%), celulosa microcristalina (25%), estereato de magnesio (1%), hidroxipropilmetilcelulosa (10%), polietilenglicol (3%), dióxido de titanio (1%). Finalmente se masaron 60 mg de NFD estándar y 90 mg para NMD estándar, los cuales se diluyeron junto con los excipientes en 50 mL de etanol, se agitó y luego se puso en un baño de ultrasonido por 15 min, donde después se dejó decantar por 30 min, se tomaron 3,6 μ L de esta solución y se llevaron a 25 mL de 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3. La solución resultante se inyectó en el sistema FIA, utilizando SPE-CNF, donde se registró el voltamograma de barrido lineal. Esto, nos permitió definir la recuperación y la selectividad del sistema. Luego de este procedimiento se realizó la valoración del sistema FIA por el método de análisis compuesto, donde se masaron 10 comprimidos comerciales de Laboratorio Chile para NFD y 10 comprimidos comerciales del Instituto Sanitas para NMD, de manera individual. Luego los 10 comprimidos de cada fármaco, son molidos en un

mortero, para luego medir la masa promedio de las 10 tabletas molidas. El valor promedio es multiplicado por tres para finalmente ser masado y diluido en 50 mL de etanol. Se agita la solución y luego se coloca sobre un baño de ultrasonido por 15 min, se deja decantar por 30 min, finalmente se toma una alícuota de 3,6 μ L, la cual se disuelve en 25 mL de 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3, la solución resultante es inyectada en el sistema FIA, utilizando SPE-CNF, donde se registró el voltamograma lineal. Finalmente obteniendo la cantidad de NFD y NMD que contienen estas tabletas comerciales.

f) Aplicación del método en muestras de orina.

Se tomó una muestra de orina de un paciente sano (sin uso de estos dos analitos), la cual antes de ser utilizada para realizar las soluciones fortificadas con NFD y NMD, son filtradas con cartuchos de 0,45 μ m, luego la orina se utiliza para ser estudiada en el sistema electroquímico.

Para los análisis de ambos nitrocompuestos se prepararon dos soluciones estándares de 25 mg/L de NFD y NMD, primero una aforada con orina (solución I), y otra solución aforada en 0,1 M de buffer BR-NaCl/pH 3 (solución II), a partir de soluciones madres de NFD y NMD en etanol. Luego se preparan las soluciones bajo la metodología de adición estándar, ver tabla 2. Los resultados se realizaron por separado para cada droga.

Tabla 2. Preparación de soluciones de adición estándar para la aplicación del método FIA-SPE-CNF en muestras de orina.

Solución estándar	Volumen total de solución (mL)	Alícuota solución I (µL)	Alícuota solución II (µL)	Concentración final (µg/L)
0	25	25	0	25
1	25	25	75	100
2	25	25	275	300

Luego se utiliza un volumen de muestra de 11 mL para ser inyectadas en el sistema FIA-SPE-CNF, utilizando la técnica de voltametría lineal se detecta la corriente de pico del proceso de reducción de los grupos nitros de ambos analitos a derivado hidroxilamínico, para determinar el % de recuperación de cada uno de ellos.

Se tomaron varias muestras de orina de un paciente tratado con una dosis única de 20 mg de NFD de laboratorio Chile, con las cuales se realizó un estudio de liberación del fármaco en función del tiempo. Se tomaron 3 muestras de orina en diferentes tiempos; a tiempo cero, contando desde que se tomó la

droga; luego a tiempo 2 horas; y finalmente a tiempo de 6 horas. A cada muestra de orina, se le aplicó la misma técnica de adición estándar mencionada anteriormente. Estas muestras fortificadas con NFD se inyectaron en el sistema FIA-SPE-CNF para medir la corriente de pico del proceso de reducción del grupo nitro, con lo cual se determinó la concentración liberada de la droga en la orina del paciente.

g) Aplicación del método FIA-SPE-CNF en muestras reales de agua.

Se tomó una muestra de agua de afluyente extraída de la planta de tratamiento de La Farfana, ubicada en la comuna de Maipú, en Santiago de Chile. Primero la muestra de agua es filtrada a través de filtros de jeringa de 0,45 μm . Luego el filtrado se dividió en dos muestras de agua de 25 mL cada una, donde una de ellas es dopada con 25 $\mu\text{g/L}$ de NMD. La solución es dopada con NMD es inyectada al sistema Fia-SPE-CNF. Esto se realizó tres veces consecutivas.

Para validar este método se analizó la misma muestra de agua real utilizando un método cromatográfico convencional reportado en bibliografía⁽⁵⁸⁾. Este método consiste en realizar primero una extracción líquido-líquido dispersivo (ELLD) utilizando líquidos iónicos para luego inyectar la muestra en HPLC-DAD. Se utilizan dos tipos de líquidos iónicos para ser usados como solventes de extracción, sin embargo actúan de manera específica: 1-butil-3-metilimidazolio de hexafluorofosfato ([BMIM][PF₆]), el cual funciona como disolvente de extracción y el 1-butil-3-metilimidazolio de tetrafluoroborato ([BMIM][BF₄]) el

cual tiene la función de cambiar la polaridad del medio acuoso. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes: se utilizó como gradiente; fase móvil acuosa 0,1% de ácido fórmico y fase móvil orgánica MeOH, ambas en una razón de 30/70 la cual se utilizó de manera isocrática, la fase estacionaria utilizada fue una columna C18, el tiempo de análisis fue de 10 minutos. Se realiza una curva de calibrado con concentraciones conocidas de NMD, sin realizar el proceso de ELLD, así se determina el punto más bajo que es detectable la concentración, a partir desde ese punto se realiza el proceso de ELLD para observar cuánto aumenta la señal en el cromatograma y determinar el factor de enriquecimiento. El rango lineal de la curva de calibrado fue entre 1-200 mg/L de NMD. Para el método de ELLD se utiliza una solución de 15 mL dopada con 50 µg/L de NMD (que corresponde a una concentración de 1mg/L en la curva de calibrado), añadiéndole 300 µL ([BMIM][PF₆]) y 200 µL ([BMIM][BF₄]) de líquido iónico, luego se lleva a un vortex por 30 segundos, se centrifuga por 5 minutos a 4000 rpm, se separa la fase acuosa de la fase orgánica (que contiene el analito en estudio), y de esta última fase quedan 90 µL para finalmente inyectarlo en el HPLC-DAD utilizando un volumen de 20 µL (cabe destacar que cada muestra se inyecta tres veces). Se realiza exactamente lo mismo utilizando la matriz del agua de afluyente extraída de la planta de tratamiento La Farfana. Con este procedimiento es validado el método voltamétrico.

4.3.2. Método UHPLC-MS.

I) Selección de analitos.

La selección de los analitos estudiados en este método, fueron escogidos debido a la utilización en España de acuerdo a la farmacopea europea ^(59,60). Todos los compuestos seleccionados son antagonistas de canales de calcio y pertenecen a la familia de las 1,4-dihidropiridinas, sin embargo no todas son nitrocompuestos.

Amlodipino-besilato (AMD): $C_{26}H_{31}ClN_2O_8S$; MM 567,05 g/mol (72,11% amlodipine).

Felodipino (FLD): $C_{18}H_{19}Cl_2NO_4$; MM 384,259 g/mol

Isradipino (ISR): $C_{19}H_{21}N_3O_5$; MM 371,387 g/mol

Nifedipino (NFD): $C_{17}H_{18}N_2O_6$; MM 346,36 g/mol.

Nimodipino (NMD): $C_{21}H_{26}N_2O_7$; MM 418,44 g/mol.

Nitrendipino (NTR): $C_{18}H_{20}N_2O_6$; MM 360,361 g/mol.

Amlodipino-d4 (AMD-d4): $C_{20}H_{21}D_4ClN_2O_5$; MM 412,9 g/mol.

Nimodipino-d7 (NMD-d7): $C_{21}H_{19}D_7N_2O_7$; MM 425,48 g/mol.

II) Preparación de estándares.

Se preparan soluciones patrones, donde se calcula la masa necesaria para cada analito en una solución de 1000 mg/L en 10 mL de MeOH. Luego se toman alícuotas para hacer disoluciones estándares donde el solvente que se utilizó es de 5% de MeOH y 95% de H₂O-HPLC en 1 mL de solución. Para la curva de calibrado se utiliza una solución multiestándar, y además se hacen soluciones de enriquecimiento de la muestra en el proceso de extracción de los analitos.

a) Curva de calibrado.

La curva de calibrado se realiza con soluciones multiestándares de concentraciones entre 0,05-400 µg/L, para el estudio de diferentes fases móviles. La cuantificación de las muestras a analizar por UHPLC-MS se hizo dentro de un rango de trabajo entre 0,1-100 µg/L.

b) Preparación de soluciones estándares para enriquecimiento de muestra.

Dos soluciones son fortificadas para la optimización y validación del proceso de extracción; en las muestras estándares diluidas con MeOH:H₂O en una razón de 5:95 y las muestras de agua de depuradora; primero se realiza un procedimiento de pretratamiento para extraer y preconcentrar la muestra donde se agrega al principio de este proceso las drogas, para finalmente reconstituir la

muestra con MeOH:H₂O en una razón de 5:95, a partir de una solución multiestándar de 0,1mg/L, se añade una alícuota de 100 y 500 µL a 100 mL de solución para obtener una solución final de 1 y 50 µg/L en 1 mL luego de la extracción y reconstitución de muestra.

c) Preparación de soluciones estándares para muestras con estándar interno.

El método del estándar interno⁽⁶¹⁾ se utiliza para compensar los errores causados por la pérdida del analito durante el pretratamiento y el análisis de la muestra, suponiendo que el estándar interno sufrirá una pérdida similar. Es por eso que el estándar interno es una sustancia química que se añade en concentraciones conocidas a las muestras y a los blancos, además debe comportarse de una manera similar a las especies químicas del interés del estudio, ya que los efectos de la preparación de la muestra deben ser lo más similar posible a la señal del estándar interno y el analito en la muestra. La relación entre las dos señales (estándar interno/analito) se utiliza para obtener la concentración de analito de la curva de calibración.

Para estos estudios se utilizan comúnmente los mismos analitos en estudio, pero estos deben estar deuterados para que se mantengan estables bajo diversas condiciones (pH, solvente, temperatura, luz). Lo correcto es usar un compuesto deuterado por cada analito en estudio, pero como estos analitos corresponden a la misma familia, y tienen propiedades químicas y físicas muy

similares, solamente se utilizarán dos: Amlodipino-d4 (AMD-d4) y Nimodipino-d7 (NMD-d7).

III) Optimización de MS-QqLIT.

Las señales analíticas que originan los analitos dependen de los siguientes parámetros: MS (declustering potential (DP), energía de colisión (CE), potencial de colisión de salida de la celda (CXP). Estos fueron optimizados por infusión directa de soluciones estándares individuales de concentración de 25 µg/L. Para las diferentes cuantificaciones, se monitorearon múltiples reacciones (MRM: multiple reaction monitoring), de donde se seleccionaron dos transiciones para cada uno de los 6 fármacos, los valores se encuentran resumidos en la tabla 3, donde se anotó la transición más óptima (SRM: selected reaction monitoring). El tiempo de escáner que se utilizó fue de 0,25 segundos, con una ventana de detección de MRM de 20 segundos. Los ajustes para la fuente dependen de los parámetros determinados por el análisis del flujo de inyección que son los siguientes: gas de cortina (CUR): 30 V; colisión del gas nitrógeno (CAD), nivel medio; temperatura de fuente (TEM): 650°C; voltaje del spray iónico: 5500 V; gas fuente iónica GS1 y GS2: 60 Y 50 V; y la entrada de potencial (EP): 10 V. Todos los datos son recopilados y procesados usando software Analyst 1.5.1.

Tabla 3. Parámetros de espectrometría de masa QqLIT de los analitos usados en este estudio.

Analitos	MRM1	CE1	MRM2	CE2	Razón MRM
AMD	409 > 238	17	409 > 294	17	2,70 ± 0,27
FLD	384 > 338	19	384 > 352	17	1,33 ± 0,15
ISR	372 > 312	15	372 > 340	15	1,53 ± 0,17
NFD	347 > 254	27	347 > 315	13	3,03 ± 0,15
NMD	420 > 301	35	420 > 343	13	0,38 ± 0,02
NTR	361 > 315	17	361 > 329	19	0,41 ± 0,03

IV) Optimización cromatográfica para la separación y cuantificación de los analitos por UHPLC-MS.

Mediante el uso de estándares de los analitos, se realizaron estudios con diferentes condiciones cromatográficas como flujo y mezclas de fase móvil, con el fin de encontrar la separación cromatográfica más adecuada para la determinación de los distintos analitos. Se utilizaron 4 fases móviles acuosas diferentes; solvente (B1) 0,1% ácido fórmico, solvente (B2) 10 mM formiato de amonio pH 3 ajustado con ácido fórmico, solvente (B3) 10 mM con acetato de amonio pH 3,5 ajustado con ácido acético, y solvente (B4) 10 mM acetato de amonio pH 5 ajustado con ácido acético, y como fase móvil orgánica siempre se utilizó MeOH. Se probaron diferentes tipos de gradientes con diferentes tiempos

de análisis. La gradiente con que siempre se comenzó fue con 5% MeOH y 95% fase acuosa. El estudio de tiempo de análisis fluctuó entre los 7 a los 4 minutos, respectivamente. Además, también se estudió la modificación de la curva de gradiente, en donde a mayor pendiente es más intenso el cambio de porcentaje de fase móvil, y a menos pendiente el cambio de gradiente es más progresivo en el tiempo, y a su vez, se realizó un estudio de cambiar la velocidad de flujo del sistema UHPLC. Se describen los estudios de cromatografía en la sección de Resultados y Discusión.

V) Descripción del lugar de recolección de las muestras de agua, y descripción de los diferentes puntos de la depuradora.

Las muestras reales de agua se obtuvieron de la depuradora Quart localizada en la ciudad de Gerona, Cataluña-España, teniendo una población de 97.227 habitantes en el 2014. Se recolectaron de 4 puntos diferentes de la planta Quart, el primer punto fue de afluente; donde el agua llega directamente a la planta sin ser tratada, solamente se hace pasar por un filtro para retener residuos sólidos grandes. Segundo punto de afluente compuesto; donde se toman muestras en 24 horas del agua que llega a la planta, al contrario del afluente que solamente es a una hora determinada, el tercer punto es efluente compuesto; aquí el agua ya está procesada y depurada lista para salir pero se toma una muestra de 24 horas, y el último punto es de efluente que se toma una muestra de agua en una hora específica.

VI) Procedimiento del pretratamiento de las muestras para la extracción en fase sólida.

El trabajo de Meritxell y colaboradores⁽⁶²⁾, describen un tipo de pretratamiento para 81 fármacos, en los cuales se encuentran algunos de estos analitos. Dada la alta eficiencia para estos analitos, se siguió el mismo procedimiento en este trabajo. Este pretratamiento consiste en:

- a. Las muestras de agua de depuradora se toman con botellas ámbar de politereftalato de etileno, luego son filtradas mediante filtros de fibras de vidrio de 1 μm , seguido por filtros de membranas de nylon de 0,45 μm .
- b. Luego se toman 100 mL de cada punto de la depuradora por triplicado, y a cada muestra se le agrega 1,5 mL de una solución de 0,1 M de Na_2EDTA .
- c. Se debe agregar a cada muestra el estándar interno que corresponde a una alícuota de 500 μL de una solución de 0,1 mg/L de AMD-d4.
- d. Solo para las muestras escogidas para realizar el estudio de recuperación, se agrega una solución multiestándar de 0,1 mg/L correspondiente a una alícuota de 500 y 100 μL para 100 mL de muestra, para obtener una concentración final de 50 y 1 $\mu\text{g/L}$.
- e. Previamente a la filtración de las muestras, se deben condicionar los *catridge* Oasis-HLB, descritos anteriormente. Primero se hacen pasar 5 mL de MeOH, luego 5 mL de H_2O -HPLC, y finalmente se debe cortar el

flujo de tal manera que la fase sólida quede húmeda. Todo este proceso se realiza por gravedad sin aplicar vacío en el baker.

- f. Las muestras son pasadas a través de los *catridge* Oasis-HLB acondicionados previamente, utilizando vacío, se deben dejar con un flujo constante y bajo. La implementación de este sistema se muestra en la figura 9.

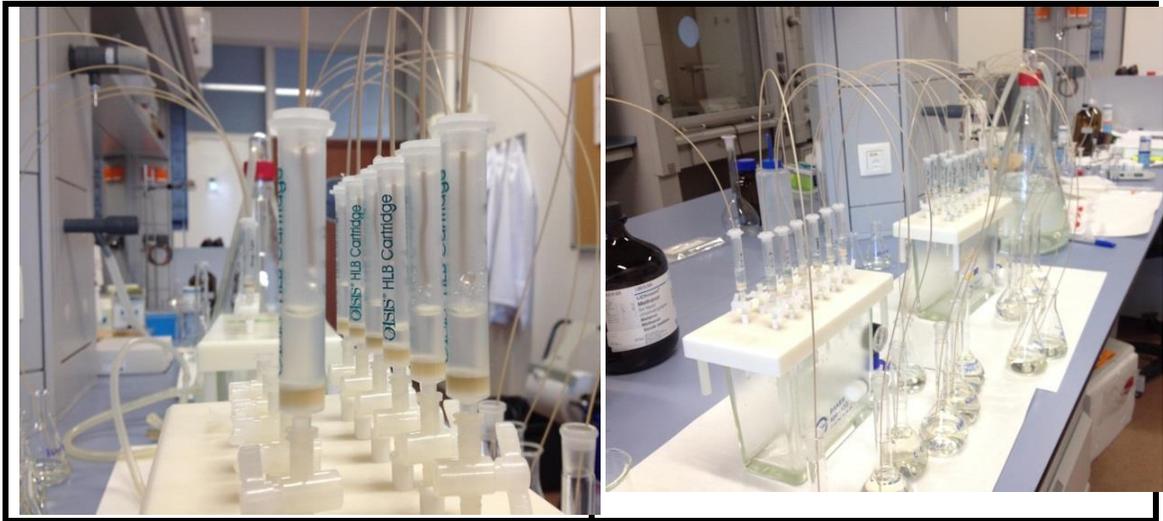


Figura 9. Implementación del sistema de extracción en fase sólida utilizando *catridge* Oasis-HLB con sistema Baker.

- g. Cuando ya ha pasado toda la muestra de agua, se limpia con 5 mL de H₂O-HPLC, para luego dejar secar al vacío la fase sólida.
- h. Para la elución de los analitos, se añaden 6 mL de MeOH, sin haber vacío, y se recolecta la solución en un vial de vidrio de 10 mL.
- i. Cuando ya se tiene toda la solución eluída, el MeOH se evapora con gas N₂, luego se reconstituye la muestra con una solución de MeOH/H₂O-

HPLC en una razón de 10:90 v/v, agregando solamente 1 mL, para finalmente colocarlo en un vial ámbar de volumen 2 mL especiales para el sistema de inyección cromatográfica.

- j. A todas las muestras se le agrega el estándar interno, que es una solución de 0,1 mg/L de AMD-d4 y NMD-d7 correspondiente a una alícuota de 100 μ L para 1 mL de la muestra reconstituida.
- k. Se prepara la curva de calibrado con muestra de agua de la depuradora del punto más limpio (efluente), dentro de un rango de concentración de 0,1-100 μ g/L.
- l. Finalmente se inyectan las muestras en UHPLC-MS, desde la más limpia a la más sucia.

4.3.3. Validación del método FIA-SPE-CNF y UHPLC-QqLIT.

I) Curva de calibrado.

La curva de calibración es obtenida a partir de la señal de corriente, medida de los estándares preparados en los distintos niveles de concentración, al graficar la concentración de cada analito versus el área resultante, se determinó la ecuación de la recta (ec. 4), donde m es el valor de la pendiente y b el valor del intercepto.

$$y = mx + b(4)$$

II) Sensibilidad.

La sensibilidad del método corresponde a la pendiente de la ecuación de la curva de calibrado, la cual se puede calcular teóricamente como se muestra en la ecuación 5.

$$m = \frac{\sum X_i Y_i - \left(\sum X_i \sum \frac{Y_i}{n} \right)}{\sum X_i^2 - \left(\frac{(\sum X_i)^2}{n} \right)} (5)$$

III) Precisión.

Para evaluar la precisión a nivel de replicabilidad, se aplicó el método de extracción a una misma solución de concentración conocida, extrayendo diez alícuotas consecutivamente, lo que corresponde a un valor de concentración

entre 2 y 10 veces el límite de cuantificación, en las mismas condiciones en un corto intervalo de tiempo. La precisión es expresada como la desviación estándar relativa (RSD) y calculada según la ecuación 6, donde S = desviación estándar de la serie de mediciones de las muestras, x = concentración media de las muestras.

$$\% RDS = \left(\frac{S}{\bar{X}} \right) \times 100 \quad (6)$$

IV) Exactitud.

La exactitud del método fue determinada a partir de la recuperación, al aplicar el método de extracción a tres muestras reales (farmacéuticas y orina, es decir se aplicó solamente para el método FIA-SPE-CNF) a una concentración conocida, que corresponde a un valor de concentración entre 2 a 10 veces el límite de cuantificación del método para cada analito. La recuperación fue calculada según la ecuación 7. Donde C_s es la concentración de la muestra fortificada, C concentración en la muestras no fortificada y C_a concentración agregada.

$$\% \text{Recuperación} = \frac{(C_s - C)}{C_a} \times 100 \quad (7)$$

V) Límite de detección (LD).

Para cada método analítico correspondiente (electroanalítico y cromatográfico), se prepararon diez muestras de concentración diluida conocida (donde la concentración escogida es la señal más baja que se puede observar). La señal analítica correspondiente al límite de detección se calculó según la ecuación 8, este valor fue interpolado en la curva de calibrado para obtener la concentración del límite de detección. Donde S_m es la desviación estándar de las diez muestras fortificadas, Y_{LD} la señal analítica correspondiente al límite de detección.

$$Y_{LD} = 3 \times S_m \text{ (8)}$$

VI) Límite de cuantificación (LC).

Se calcula igual al LD, pero la señal analítica correspondiente al S_m es multiplicada por un factor de 10, como se muestra en la ecuación 9. Donde Y_{LC} es la señal analítica correspondiente al límite de cuantificación.

$$Y_{LC} = 10 \times S_m \text{ (9)}$$

VII) Porcentaje de recuperación (%Re) y efecto matriz (%EM) para las muestras de agua de depuradora utilizadas para el sistema UHPLC-QqLIT.

Estos parámetros han sido calculados mediante la metodología reportada ⁽⁶³⁾, la cual consiste en realizar diferentes soluciones donde una solución multiestándar

es agregada antes y después del pretratamiento para luego ser comparada con la señal de una solución hecha con las fases móviles correspondientes. Se preparan 4 muestras; S1; solución de multiestándar con concentración de 25 µg/L en MeOH:H₂O 5:95, S2; extracto de agua de depuradora obtenida usando MFS enriquecida con 0,25 µg/L para 100 mL de muestra obteniendo una concentración final de 25 µg/L en 1 mL de solución, S3; extracto obtenido directamente de una muestra de agua de depuradora, S4; extracto obtenido de las muestras de depuradora donde se le agrega 25 µg/L de una solución multiestándar al final del proceso de MFS para 1 mL de solución. Donde las fórmulas a usar son:

$$ME(\%) = \frac{Ax_{S2} - Ax_{S3}}{Ax_{S1}} \times 100 \quad (10)$$

$$Re(\%) = \frac{Ax_{S4} - Ax_{S3}}{Ax_{S2}} \times 100 \quad (11)$$

Donde $Ax_{S1}, Ax_{S2}, Ax_{S3}, Ax_{S4}$, corresponden a la abundancia obtenida para los 6 analitos en estudio para las muestras de S1, S2, S3 y S4 respectivamente.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

5.1. Método Electroanalítico.

5.1.1. Caracterización de NFD y NMD mediante técnicas electroquímicas en un sistema batch.

I) Voltametría cíclica NFD.

Con el fin de evaluar los procesos de reducción y oxidación de NFD se estudió el comportamiento voltamétrico de este analito.

En la figura 10 se observa dos voltamogramas cíclicos utilizando SPE-CNF de $1,0 \times 10^{-4}$ M de NFD en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 2 a 100 mVs^{-1} a partir de potencial de circuito abierto hacia potenciales negativos con un total de dos ciclos, en donde se observan varios procesos de reducción y oxidación para NFD.

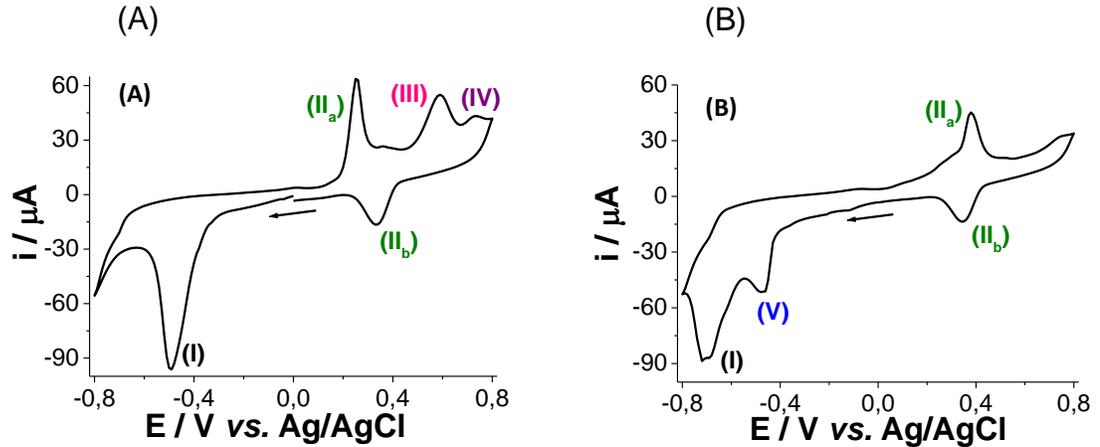
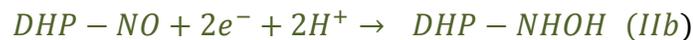
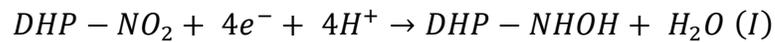


Figura 10. Voltametría cíclica hacia potenciales negativos 1.0×10^{-4} M NFD en 0,1M de buffer BR-NaCl/pH2, v_B 100 mVs^{-1} . (A) Primer ciclo, (B) segundo ciclo.

Luego se realizó en iguales condiciones anteriores, un voltamograma cíclico empezando hacia potenciales positivos, como se observa en la figura 11.

Al realizar los voltamogramas hacia potenciales negativos y positivos se observan varios picos de reducción y oxidación, los cuales se atribuyen a los siguientes procesos⁽⁶⁴⁾:



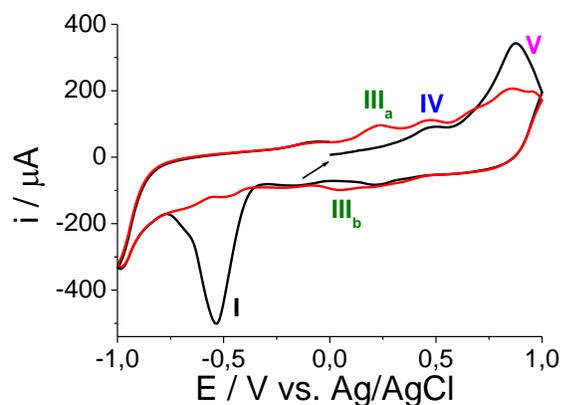


Figura 11. Voltamograma cíclico hacia potenciales positivos de $1,0 \times 10^{-4}$ M de NFD a 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 2, $v_B 100 \text{ mVs}^{-1}$. (—) Primer ciclo, (—) segundo ciclo.

En la figura 10.A se observa que el primer proceso de reducción irreversible que se observa hacia potenciales negativos se atribuye a la reducción del grupo nitro de NFD a un derivado de hidroxilamínico. Al observar el segundo ciclo (figura 10.B) se observa una disminución drástica con respecto a la intensidad de corriente del proceso de reducción irreversible, esto se debe a que este proceso es un proceso de adsorción que ocurre en la superficie del electrodo de trabajo, resultado que concuerda con la literatura⁽⁶⁵⁾.

Por lo tanto, para fines cuantitativos se escoge la señal del primer pico de reducción, para seguir estudiando el comportamiento de NFD en el sistema batch.

II) Voltametría cíclica NMD.

También se realizó el estudio voltamétrico para NMD. Donde se observan sus voltamogramas correspondientes en la figura 12, empezando hacia potenciales negativos.

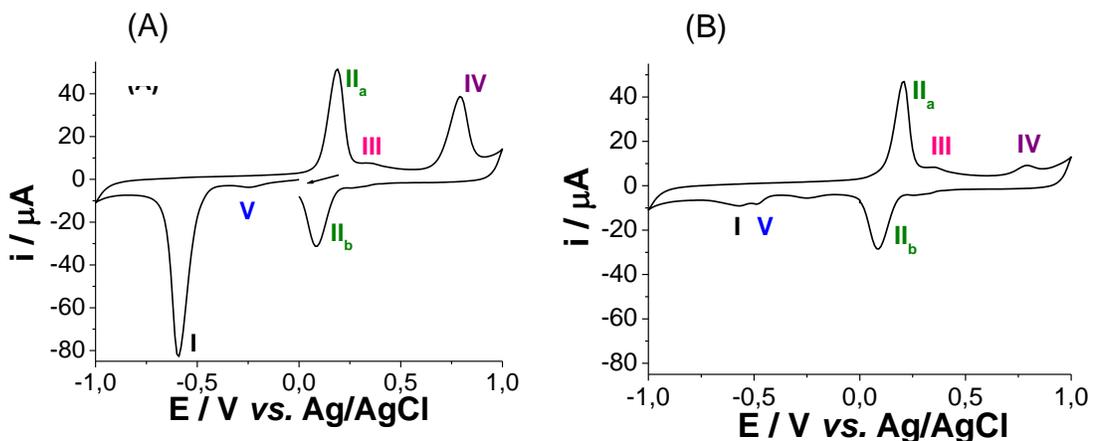


Figura 12. Voltamograma cíclico hacia potenciales negativos de $1,0 \times 10^{-4}$ M de NMD a 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 2, v_B 100 mVs^{-1} . (A) Primer ciclo, (B) segundo ciclo.

Y, a su vez, se realizó un voltamograma empezando hacia potenciales positivos, como se observa en la figura 13. Al observar los procesos de NMD (figura 13), se observan que corresponden a los mismos procesos mostrados anteriormente, por lo que las reacciones se atribuyen de la misma manera.

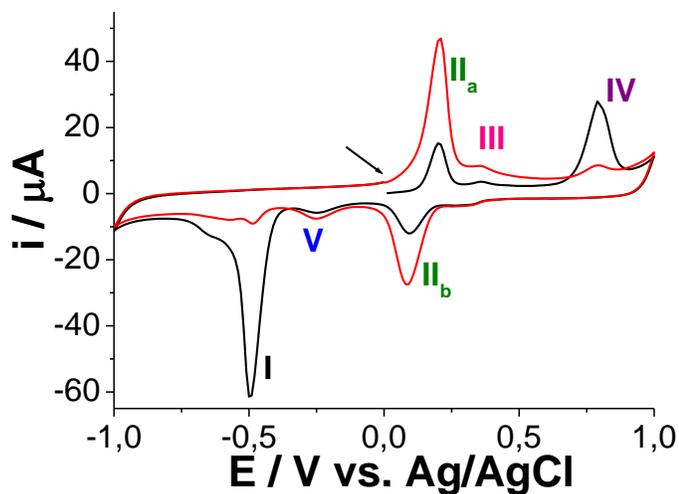


Figura 13. Voltamograma cíclico hacia potenciales positivos de $1,0 \times 10^{-4}$ M de NMD a 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 2, $v_B 100 \text{ mVs}^{-1}$. (—) Primer ciclo, (—) segundo ciclo.

Se observa una pequeña diferencia del potencial de reducción del grupo nitro para estos dos compuestos; NFD es de -0,63 V y para NMD de -0,61 V. Sin embargo, se esperaba obtener una diferencia mucho mayor entre los potenciales de reducción de este proceso, ya que el grupo nitro en NFD está en posición orto y para NMD en posición meta.

Por esta razón se realizó una comparación de esta señal específica utilizando la técnica de voltametría de barrido lineal con ambas drogas en soluciones separadas de igual concentración y se observó el potencial de reducción para sus grupos nitro, figura 14.A. También se realizó otro voltamograma lineal sobre

una solución conteniendo la misma concentración de NFD y NMD, figura 14.B, donde se observa que el potencial de pico es de -0,63 V, pero a su vez, la corriente de pico teniendo ambos procesos en una misma solución es igual a la suma de ambos procesos por separados, así también si se comparan las cargas, cumpliéndose la misma situación. Los parámetros electroquímicos para cada nitrocompuesto se observan en la tabla 4.

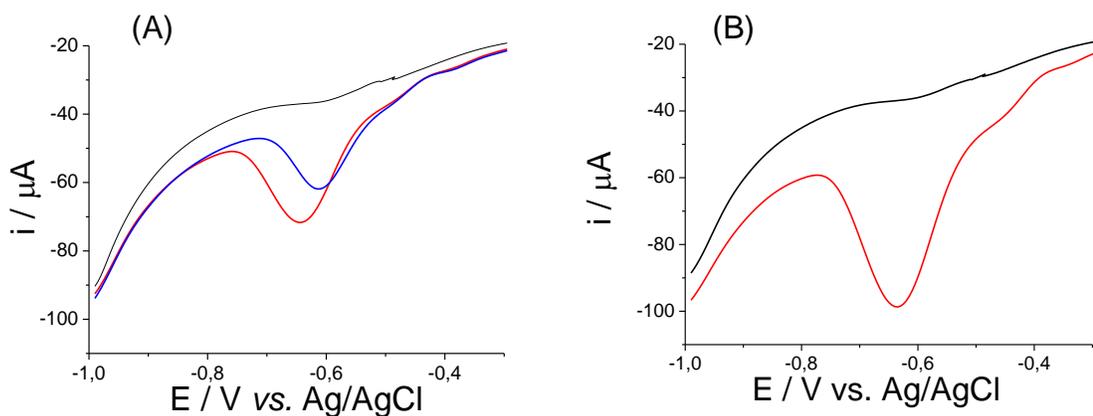


Figura 14. Voltamograma de barrido lineal de $4 \times 10^{-6} \text{M}$ de (A) NFD (—) y NMD (—) y (B) NMD y NFD (—) en una misma solución de concentración de $4 \times 10^{-6} \text{M}$, blanco (—). En 0,1M buffer BR-NaCl/pH 2, v_B 100 mVs^{-1} .

Tabla 4. Parámetros electroquímicos para la reducción del grupo nitro que contiene NFD y NMD.

Parámetro	Solución de NMD $4 \times 10^{-6}M$	Solución de NFD $4 \times 10^{-6}M$	Solución con NMD y NFD $4 \times 10^{-6}M$
E_p / V	$-0,610 \pm 0,003$	$-0,630 \pm 0,008$	$-0,630 \pm 0,003$
$I_p / \mu A$	$22,8 \pm 0,6$	$30,6 \pm 0,3$	$51,9 \pm 0,6$
$Q / \mu C$	509 ± 13	754 ± 16	1496 ± 13

n = 3

Con esta diferencia no podríamos esperar una separación total de estos nitrocompuestos, pero podríamos tener una idea de la existencia de este tipo de fármacos en matrices acuosas reales.

IV) Caracterización de NFD y NMD mediante técnicas de voltametría lineal.

Se realizaron técnicas de voltametría lineal para el primer pico de reducción-irreversible asociado a la reducción del grupo nitro a derivado hidroxilamínico, este proceso se escogió debido a la mayor intensidad de corriente que se observó en los voltamogramas cíclicos, debido a que es un proceso de transferencia de $4e^-$ y $4H^+$, en comparación con los demás procesos oxidativos y reductivos.

Se hizo una comparación utilizando voltametría de pulso diferencial (DPV) y voltametría de barrido lineal (LSV), utilizando soluciones de NFD y NMD en igual condiciones. Ambos voltamogramas lineales se observan a continuación, en la figura 15, donde se describen las condiciones de cada técnica.

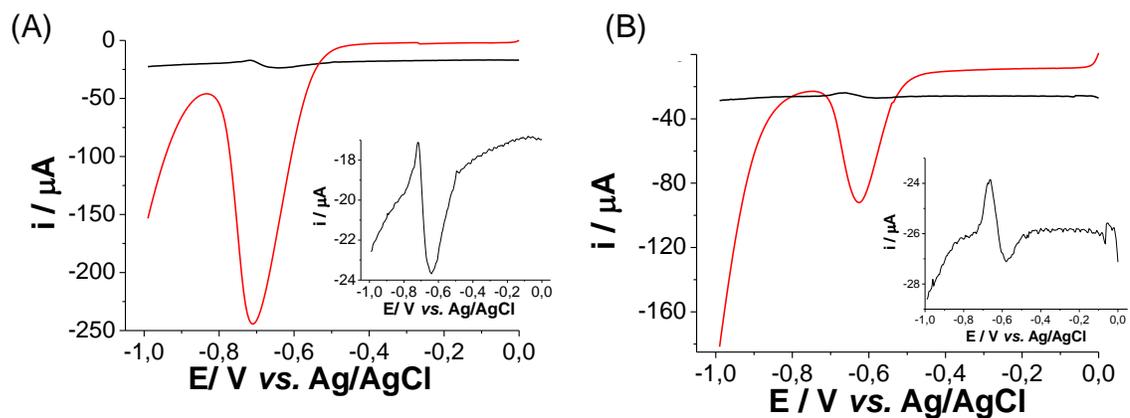


Figura 15. Comparación de las técnicas de DPV (—) y LSV (—) para una solución de (A) $1 \times 10^{-4} M$ de NFD y (B) $1 \times 10^{-5} M$ de NMD en 0,1M de buffer BR-NaCl/pH 2, $v_B 100 \text{ mV s}^{-1}$. Figura inserta para (A) y (B) es un zoom de la técnica de DPV para NFD y NMD. Condiciones voltamétricas: para DPV $t_{eq}=5s$, $E_i=0,0V$, $E_f=-1,0V$, $E_{step}=0,005V$, $E_{pulso}= 0,01V$, $t_{pulso}=10,0ms$, $v_B=0,1V/s$. Para LSV $t_{eq}=5s$, $E_i=0,0V$, $E_f=-1,0V$, $v_B=0,1V/s$.

Si bien en general, DPV es una técnica más sensible que LSV, la figura 15, indica que en las condiciones aplicadas de cada técnica para el proceso de reducción del grupo nitro, LSV resultó considerablemente más sensible que DPV. Una posible explicación se puede deber a la alta corriente capacitiva que se observa en el inserto de la figura 15, lo que puede afectar en mayor proporción a DPV que a LSV, dado que se basa en las diferencias de las mediciones de corriente realizadas en cada uno de los pulsos aplicados.

V) Comparación de dos tipos de electrodos serigrafiados de nanofibras de carbono y de nanotubos de carbono, utilizando la técnica de voltametría de barrido lineal.

Se desarrolló un estudio donde se comparan dos tipos de electrodos serigrafiados de diferentes nanomateriales de carbono; nanotubos de carbono (CNT) y nanofibras de carbono (CNF). En la figura 16, se observan dos voltamogramas de barrido lineal de ambos nitro-compuestos, haciendo el proceso de reducción del grupo nitro a derivado hidroxilamínico, utilizando ambos tipos de SPEs. En la figura 16.A (correspondiente a una solución de NFD) como en la figura 16.B (correspondiente a una solución de NMD), se observa que el proceso de reducción de sus grupos nitro no varía considerablemente al cambiar el material del electrodo de trabajo.

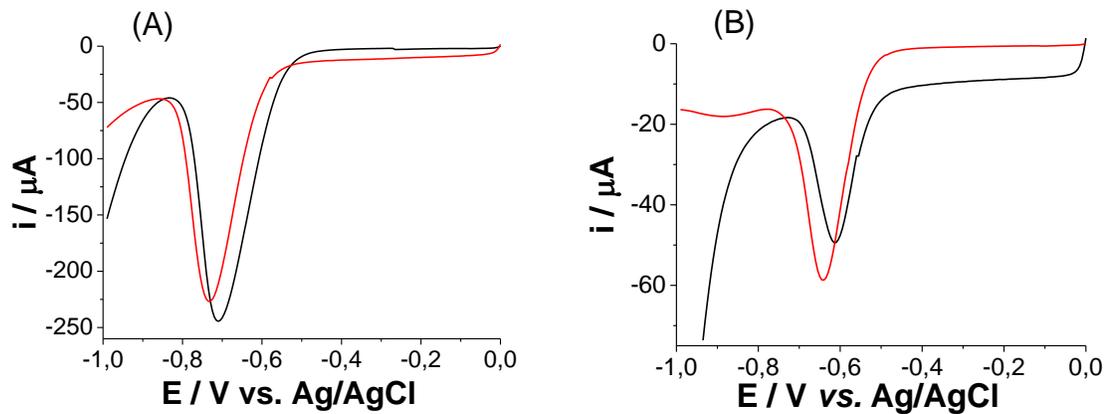


Figura 16. Voltamogramas de barrido lineal utilizando dos tipos de electrodos serigrafados: (—) CNT y (—) CNF. (A) 1×10^{-4} M de NFD y (B) 1×10^{-5} M de NMD, ambas soluciones en 0,1 M de buffer BR-NaCl/pH 2, v_B 100 mVs^{-1} .

Por lo tanto con estos resultados, determinamos que ambos NMCs se comportan de igual manera realizando el proceso de adsorción del nitro-compuesto correspondiente. Siendo la única diferencia entre ellos el costo que tienen. Es por eso que se escoge trabajar con los SPE-CNFs ya que son más baratos que los de CNTs.

VI) Estudio de pH.

Se trabajó dentro de un intervalo de 2-10 de pH siempre utilizando una solución con 0,1M de buffer BR/NaCl. Como se dijo anteriormente, se trabajará solamente con el proceso de reducción del grupo nitro a derivado hidroxilamínico, debido que es el proceso que posee la más alta señal en relación al área-corriente, además, como se observó que ambos nitro-compuestos poseen los mismos procesos, se hará este estudio solamente con NFD tanto para la sección VI, VII y VIII. En la figura 17, se observa el voltamograma de barrido lineal variando el pH de la solución con una concentración fija de NFD.

Al ir aumentando el pH de la solución, el potencial de reducción de este proceso se va desplazando hacia potenciales más negativos. Con esta información se realizaron dos gráficos, los cuales nos indican la tendencia que tiene el potencial y corriente de pico para este proceso.

En la figura 18.A se observa que el primer quiebre es a pH 4, lo que se podría asociar al valor de su pKa. Con este antecedente se escoge trabajar a pH 3, siendo el pH donde se encuentra el potencial de reducción menos negativo para este proceso. Además en literatura cuando se refieren a trabajos electroquímicos utilizando estos nitrocompuestos, la mayoría de ellos son entre pH 2 y 3, debido a la estabilidad que presenta esta droga sobre estos pHs, que se puede observar en la figura 18.B donde la corriente de pico es estable al

cambio de pH en la solución. Además, el proceso de reducción del grupo nitro requiere 4H^+ por lo que la solución debe estar protonada para generar una factible reducción.

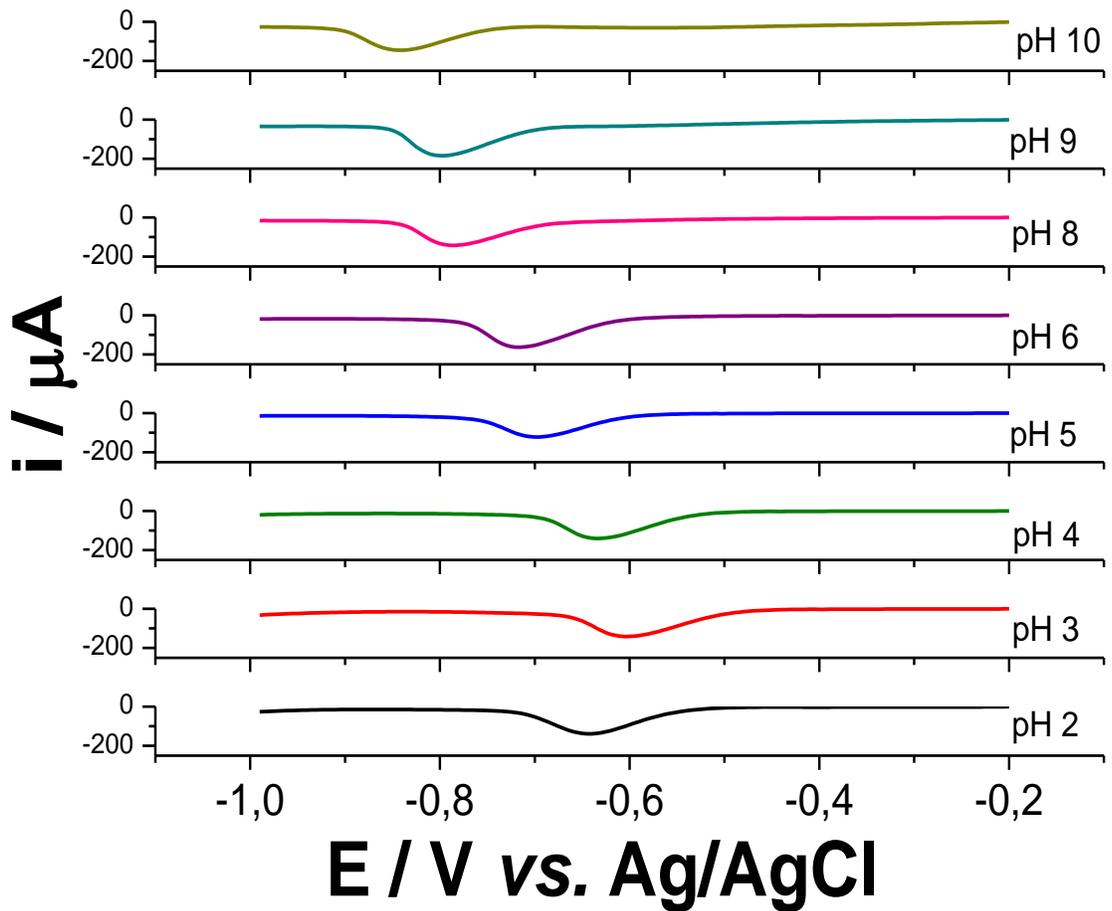


Figura 17. Voltamogramas de barrido lineal del proceso de reducción del grupo nitro a hidroxilamina de NFD 1×10^{-4} M a diferentes pHs en 0,1M buffer BR-NaCl,

$v_B 100 \text{ mVs}^{-1}$.

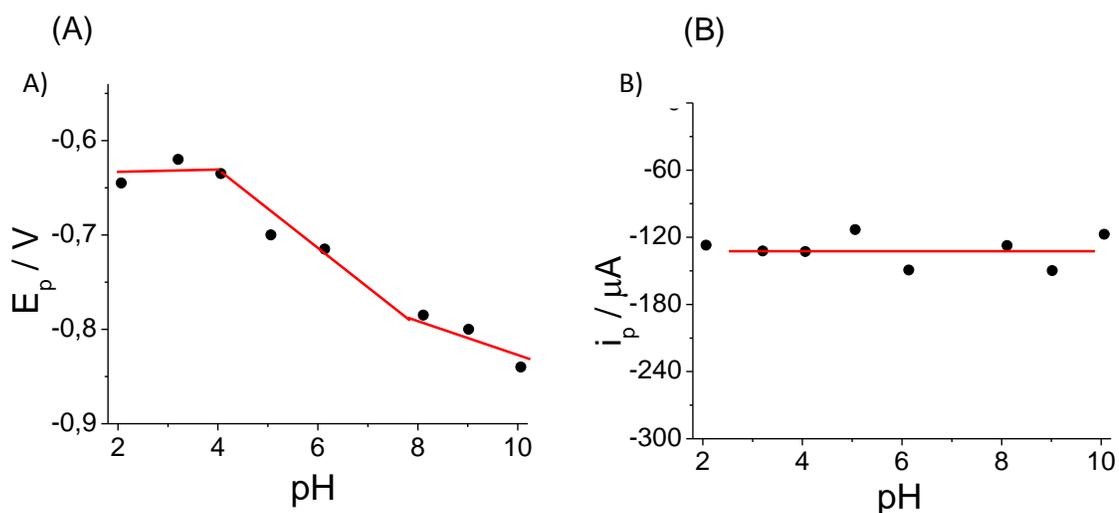


Figura 18. (A) Gráfico de E_p y (B) de i_p en función del pH, a una concentración de $1,0 \times 10^{-4}$ M de NFD.

VII) Tiempo de acumulación.

El tiempo de acumulación se estudió en el sistema batch mediante el tiempo de exposición del SPE-CNF en la solución que contiene una solución constante de NFD. El SPE-CNF se sumerge en la celda que ya contiene la solución con NFD (siempre sobre una atmósfera inerte), luego se agita y se mide el tiempo de acumulación respectivo. La figura 19, muestra la variación de la corriente de pico del proceso de reducción del grupo nitro al derivado hidroxilamínico en función del tiempo, utilizando siempre la misma concentración de NFD.

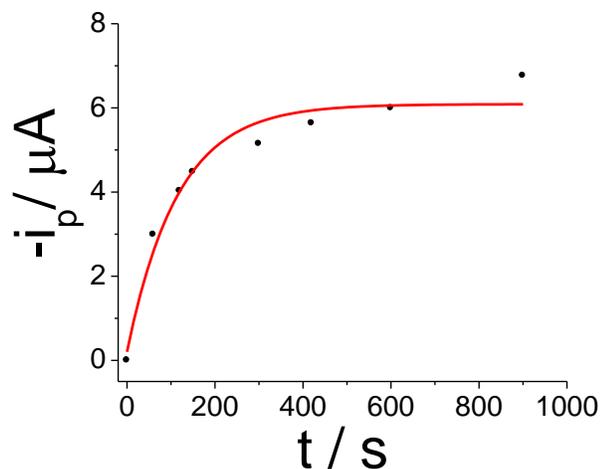


Figura 19. Gráfico de i_p en función del tiempo de adsorción/ preconcentración utilizando una concentración de $3,0 \times 10^{-6}$ M de NFD. En 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} .

En la figura 19 se observa que a medida que se va aumentando el tiempo de preconcentración, va aumentando también la intensidad de corriente de pico para el proceso señalado, sin embargo, aproximadamente a los 5 minutos este aumento comienza hacer constante, esto significa que no se puede adsorber más NFD sobre la superficie del electrodo. Por lo tanto el intervalo de tiempo óptimo para realizar una preconcentración de NFD sobre este tipo de electrodos utilizando un sistema batch es de 5 minutos para $3,0 \times 10^{-6}$ M de NFD.

VIII) Parámetros analíticos.

Sobre la base de estos estudios en modalidad batch, se realizó una curva de calibrado, para determinar los parámetros analíticos, utilizando 0,1 M de buffer BR-NaCl/pH 3, con un tiempo de acumulación de 5 minutos. Se trabajó mediante un intervalo de concentración de $1,0 \times 10^{-6}$ a $2,7 \times 10^{-5}$ M de NFD, equivalentes a 0,37-9,28 mg/L. En la figura 20.A se muestra los voltamogramas de barrido lineal para el proceso de reducción del grupo nitro, en donde se observa una correlación a medida que se va aumentando la concentración. En la figura 20.B se observa que la correlación existente entre la corriente de pico y la concentración es lineal ascendente.

A partir de estos resultados se obtuvieron los parámetros analíticos correspondientes para metodología batch, como se observan en la tabla 5.

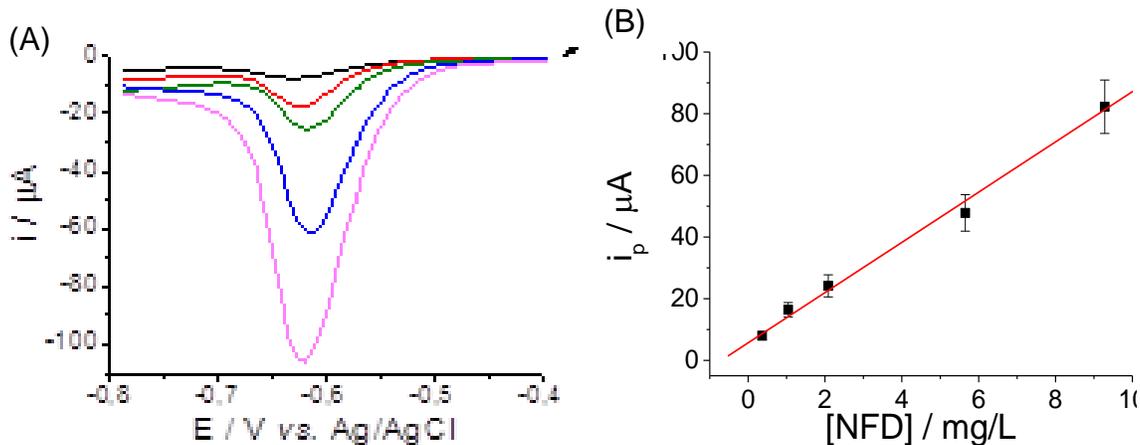


Figura 20. (A) Voltamograma de barrido lineal de NFD a diferentes concentraciones en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} . (B) Gráfico de corriente de pico en función de la concentración de NFD. Intervalo de concentración de NFD 0,37-9,28 mg/L.

Tabla 5. Parámetros analíticos de NFD en una metodología batch utilizando SPE-CNF, 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3, sobre el proceso de reducción irreversible del grupo nitro a derivado hidroxilamínico.

Sistema	LDI (mg/L)	LC (mg/L)	Intervalo	Sensibilidad	r
			lineal (mg/L)	(μA L/mg)	
Batch	0,07	0,25	0,25-9,28	8,03	0,997

n = 3

5.1.2. Caracterización de NFD y NMD usando un sistema de flujo continuo acoplado a electrodos serigrafiados de nanofibras de carbono (FIA-SPE-CNF)

I) Método de pretratamiento de los electrodos serigrafiados de nanofibras de carbono.

Con el fin de aumentar la sensibilidad en un sistema de flujo, se realizó un estudio para aumentar la intensidad de corriente específicamente del proceso de reducción del grupo nitro de NFD. En el laboratorio se implementó una técnica de modificación/acondicionamiento de los SPE⁽⁵⁷⁾, la ha sido reportada. Consiste en sumergirlos antes de ser usados, en una solución buffer/DMF en una razón de 70:30, por un tiempo de 15 minutos, luego estos son sacados y lavados con agua Milli-Q para poder usarlos en el sistema FIA. Realizando esta activación al SPE-CNF, como se observa en la figura 21, existe un notorio aumento del área de corriente en este proceso.

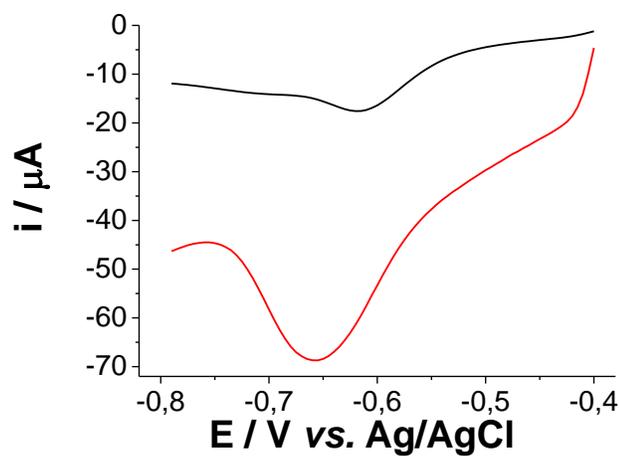


Figura 21. Voltamograma de barrido lineal de $1,0 \times 10^{-5}$ M de NFD en 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} . (—) con electrodo SPE-CNF sin activar. (—) con electrodo SPE-CNF activado.

Además, se realizaron imágenes de microscopía electrónica de barrido (SEM) para los SPE-CNF para comparar la superficie del electrodo antes y después de proceso de activación. En la figura 22.A, se observa el electrodo sin el proceso de activación, aquí la superficie es bastante regular, sin presentar una mayor rugosidad. Cuando al electrodo se le aplica el método de activación, figura 22.B, se observa un cambio en la superficie del electrodo aumentando la rugosidad. Esto indica, que la superficie del electrodo aumenta con este proceso de activación, por lo que hace que se aumenta el área activa del electrodo, por consecuencia, aumenta la corriente del proceso de reducción del grupo nitro, aumentando la sensibilidad del método.

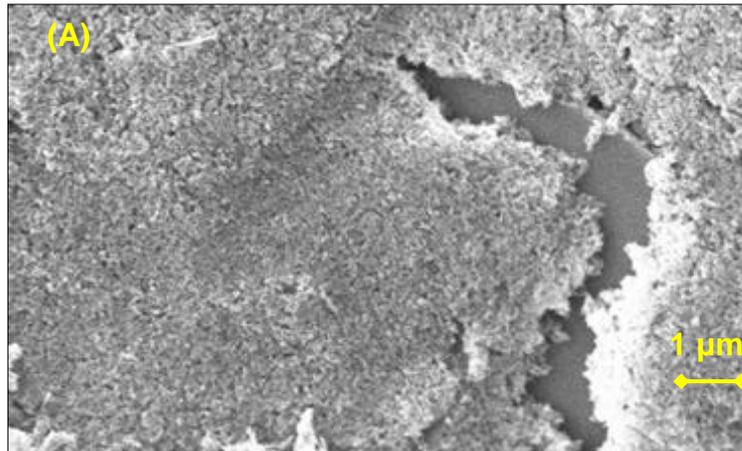


Figura 22. Imágenes SEM para el área electroactiva de los SPE obtenidas por microscopia electrónica de barrido. (A) SPE-CNF sin activación, nuevo y sin uso, (B) SPE-CNF con activación, nuevo y sin uso.

Además, se realizó una comparación de un SPE-CNF cuando se utiliza una vez, y varias veces (alrededor de medidas), con un volumen de muestra de 3 mL. En la figura 23, se muestra un voltamograma de barrido lineal, mostrando el proceso de reducción del grupo de NFD, la línea negra corresponde a un electrodo usado una vez realizándole la activación respectiva, y la línea roja corresponde a un electrodo después de alrededor de 45 barridos consecutivos. Se observa claramente, un disminución considerable en la corriente de pico para este proceso.

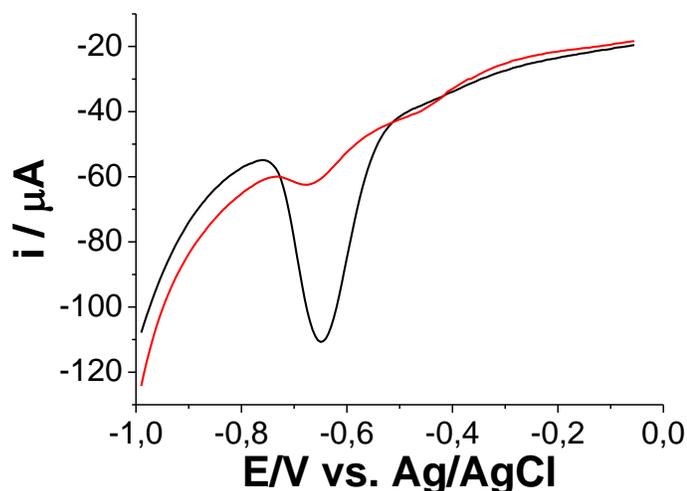


Figura 23. Voltamograma de barrido lineal utilizando una solución de $1 \times 10^{-5} \text{M}$ de NFD en 0,1 M de buffer BR-NaCl/pH 3, 100 mVs^{-1} . (—) SPE-CNF con activación y con solo una medida, (—) SPE-CNF con activación y con alrededor de 45 medidas.

Para poder determinar lo que ocurre sobre la superficie del electrodo, también se realizaron imágenes SEM utilizando SPE-CNF. En la figura 24, se muestran las imágenes SEM correspondientes. En la figura 24.A, se observa que la rugosidad de la superficie es menor que en la figura 24.B, esto puede indicar que se va perdiendo la sensibilidad de la superficie del electrodo ya que las nanofibras de carbono se encuentran muy dispersas dejando huecos en la superficie, y por tanto el electrodo deja de ser útil y el método no es reproducible.

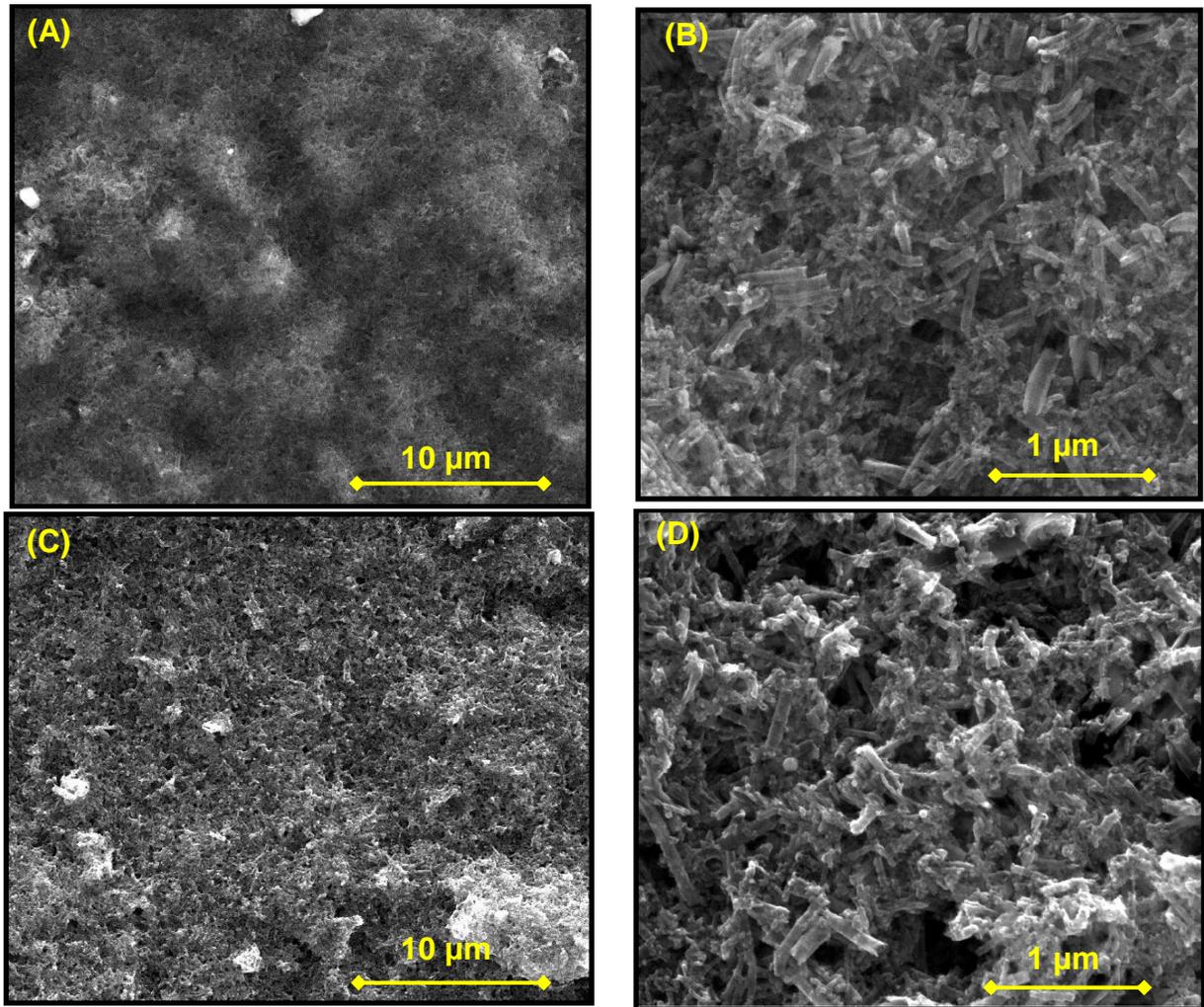


Figura 24. Imágenes SEM para el área electroactiva de los SPE obtenidas por microscopía electrónica de barrido. (A) SPE-NFC activado- sumergido en una solución de $1,0 \times 10^{-5}$ M de NFD, (B) aumento de la imagen A. (C) SPE-NFC activado-usado aproximadamente en 45 medidas, (D) aumento de la imagen C.

Con este estudio se verifica que al realizar esta activación al SPE-CNF, la superficie del electrodo aumenta la rugosidad, por lo cual aumenta la cantidad

de sitios activos en donde se adsorbe el analito, es por eso que la intensidad de corriente para el proceso de reducción aumenta 10 veces con el electrodo activado, consecuentemente con esto se aumenta la sensibilidad del método. Sin embargo, este tipo de electrodos tiene un tiempo de vida útil hasta aproximadamente 30 medidas consecutivas, y es sumamente importante ir comparando la intensidad de corriente del proceso en estudio utilizando una concentración alta y conocida del analito, para cerciorarse que la corriente se ha mantenido constante a medida que se va usando el SPE-CNF. En este caso siempre se fue chequeando con una solución de 400 µg/L de NFD, para observar que la corriente y potencial de pico no cambia.

II) Estudio del tiempo de adsorción variando el volumen de muestra y concentraciones de NFD.

Con el estudio anterior, se determina que se hará siempre activación al electrodo antes de ser usado para obtener una mayor sensibilidad en el método voltamétrico.

Se desarrolla primero un estudio en función del volumen de muestra con diferentes concentraciones de NFD utilizando el método FIA-SPE-CNF en 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3, para luego hacer varios voltamogramas de barrido lineal para observar la correlación de intensidad de corriente en función del volumen de muestra. A modo de ejemplo, la figura 25, muestra lo que va ocurriendo a medida que se va aumentando el volumen de muestra, de este método se

observa que la corriente de pico del proceso de reducción del grupo nitro de NFD, va aumentando. Este comportamiento se repitió a medida que se utilizaron concentraciones de NFD más pequeñas y volúmenes de muestra más grandes.

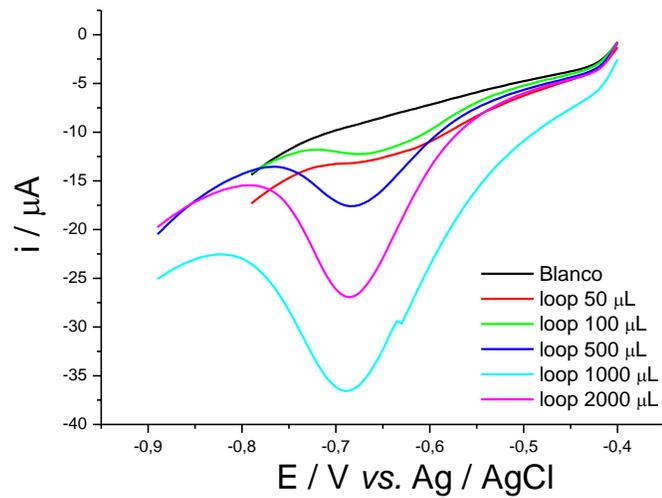
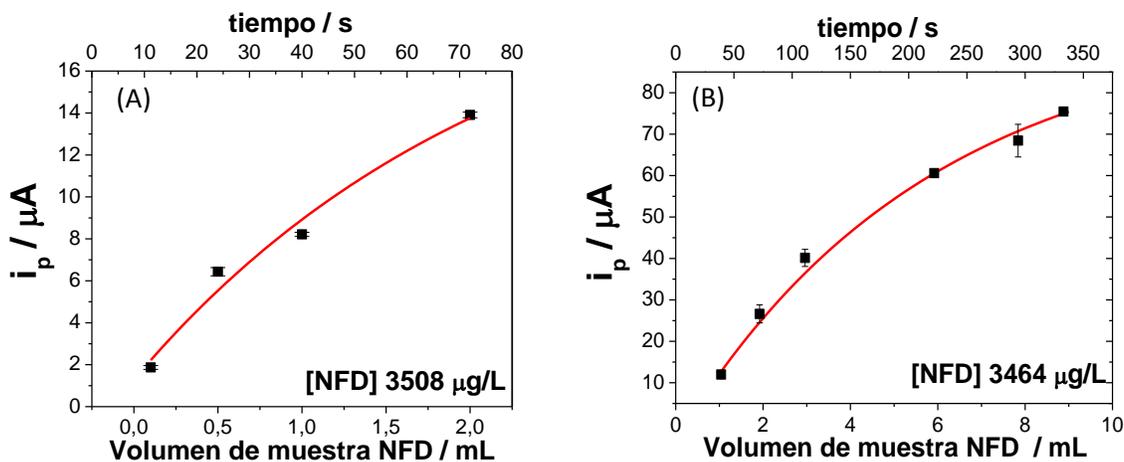


Figura 25. Voltamograma de barrido lineal a 3484 $\mu\text{g/L}$ de NFD en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} , con diferentes volúmenes de muestra.

Luego se grafica la corriente de pico del proceso de reducción del grupo nitro en función del volumen de muestra con diferentes concentraciones de NFD, como se observa en la figura 26. Este estudio se realizó solamente para NFD, porque como ya se ha dicho anteriormente, el comportamiento que tienen ambos nitrocompuestos es muy similar, por lo que se espera la misma tendencia utilizando NMD. Este estudio se hizo con el objetivo de ir aumentando el tiempo de adsorción sobre la superficie del electrodo. Al ir aumentando la cantidad de muestra (volumen de muestra) a una misma concentración se observa, por los gráficos mostrados en la figura 26, que la intensidad de corriente va aumentando a medida que aumenta el volumen de muestra. A su vez, se podría aumentar más el tamaño de muestra para poder obtener mejores parámetros analíticos que los mostrados en este trabajo, sin embargo, si se aumentaran estos volúmenes el sistema no sería tan eficiente en relación al tiempo de análisis.



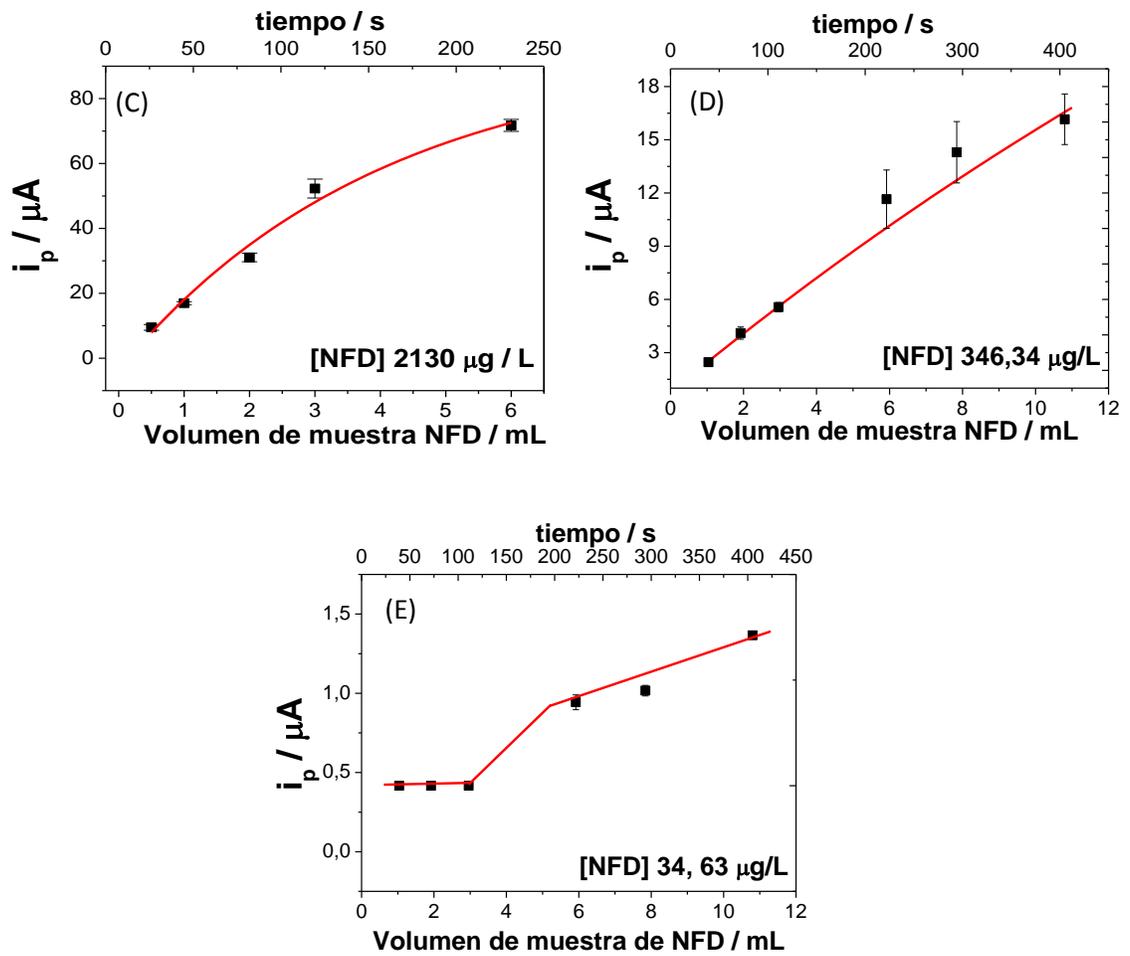
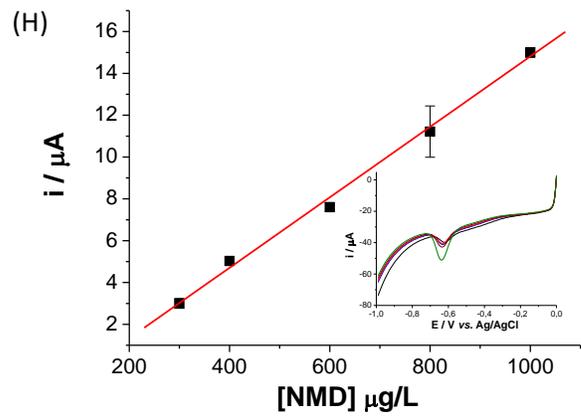
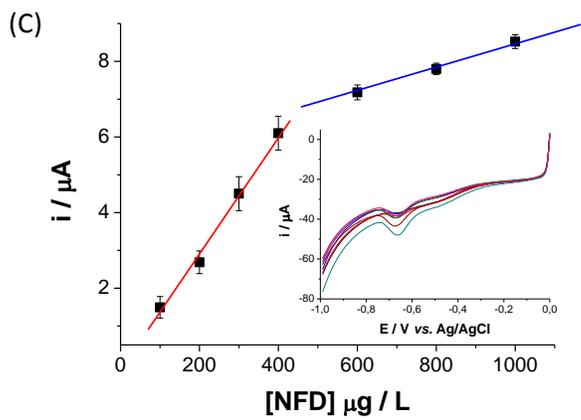
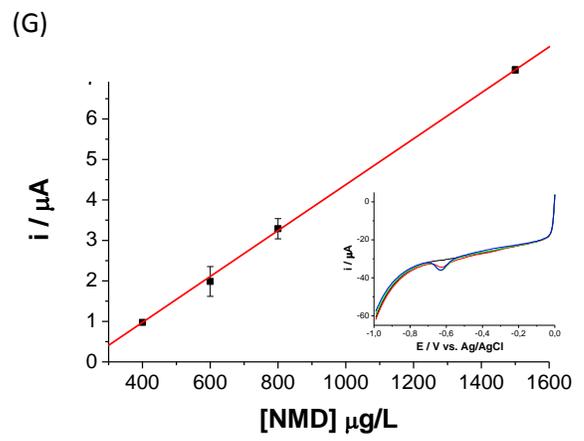
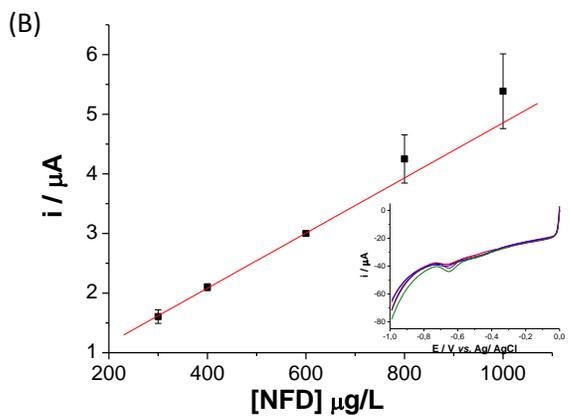
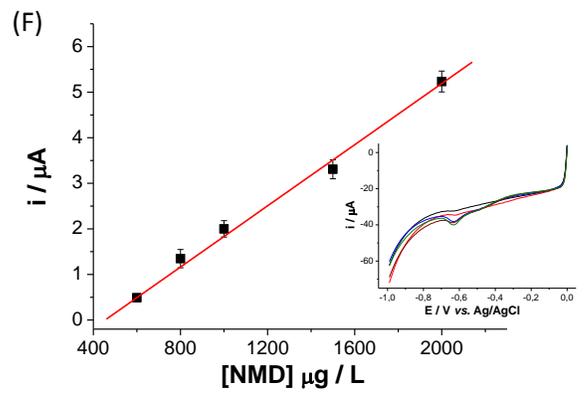
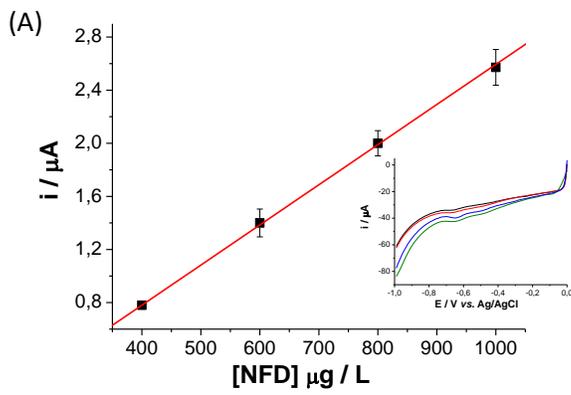


Figura 26. Gráfico corriente de pico en función del tamaño de muestra de NFD en diferentes concentraciones (A) 3608 $\mu g / L$, (B) 3484 $\mu g / L$, (C) 2130 $\mu g / L$, (D) 348,34 $\mu g / L$, (E) 34,83 $\mu g / L$.

III) Parámetros analíticos

Se realizaron diferentes curvas de calibrado utilizando volúmenes de muestra de 500 μL , y de 1,3, 6 y 11 mL para NFD y NMD utilizando el sistema FIA-SPE-CNF, siempre los electrodos con el proceso de activación, en 0,1M BR-NaCl/pH 3. En la figura 27 se muestra la curva de calibrado y en la figura inserta se observa el voltamograma lineal para cada volumen de muestra desarrollado.

En esta figura se observa que todos los gráficos, tienen una correlación lineal con la concentración, excepto para cuando se utilizan 3 mL de volumen de muestra de NFD (figura 27.C), donde probablemente ocurrió un error analítico, pero para fines más prácticos solamente se consideró la linealidad de las concentraciones más bajas para este experimento.



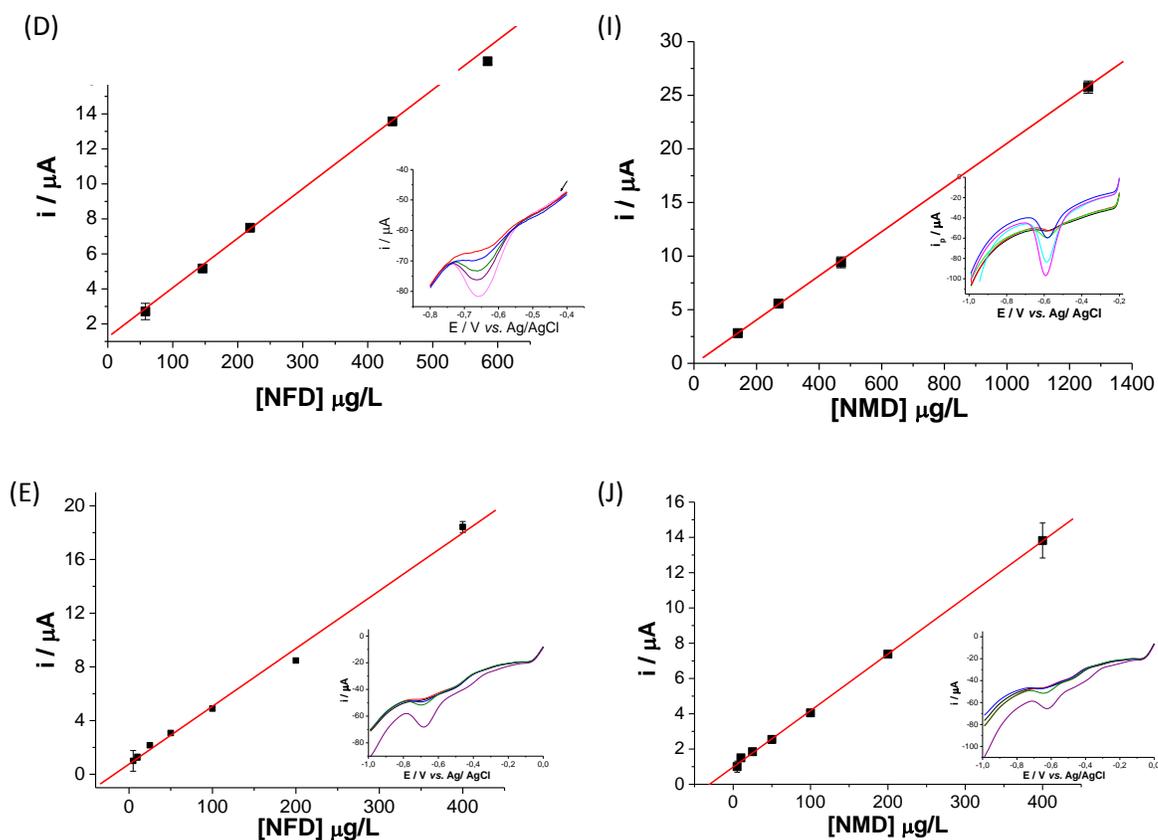


Figura 27. Gráficos de corriente en función de la concentración de NFD y NMD utilizando diferentes volúmenes de muestra: (A) y (F) 0,5 mL de muestra, (B) y (G) 1 mL de muestra, (C) y (J) 3 mL de muestra, (D) y (I) 6 mL de muestra, (E) y (J) 6 mL de muestra. Figura Inserta se muestra el LSV para cada volumen de muestra y cada anlito correspondiente.

Con estos resultados se obtuvieron los parámetros analíticos correspondientes para NFD y NMD utilizando diferentes volúmenes de muestra. En la tabla 6 se observa la diferencia que hay entre ellos y como varía el límite de detección en función de la corriente de pico correspondiente al proceso de reducción del grupo nitro a hidroxilamina utilizando 0,1M de buffer BR-NaCl/pH 3.

Se observa que a medida que va aumentando el volumen de muestra tanto para NFD y NMD, el método va adquiriendo mayor sensibilidad y más bajos límites de detección, esto ha de esperarse ya que a medida que se aumenta el volumen de muestra en el sistema FIA-SPE-CNF, se va aumentando el tiempo de exposición de la superficie del electrodo con ambos analitos y por ende existe mayor tiempo de adsorción.

Sin embargo, en la figura 28, donde se grafica el LDI en función del volumen de muestra, se observa que la tendencia de la curva es hacerse constante a medida que va aumentando el volumen de muestra. Esto se puede atribuir a que el electrodo de trabajo de nanofibras de carbono puede adsorber una cantidad específica del analito en su superficie, y aunque aumente aún más el volumen de muestra el compuesto está tan diluido que no alcanza a interactuar con la superficie del electrodo, llegando a tener límites de detecciones constantes.

Tabla 6. Parámetros analíticos instrumentales de NFD y NMD en función del volumen de muestra usando sistema FIA-SPE-CNF.

Volumen de muestra mL	Analito	Sensibilidad $\mu\text{A L} / \mu\text{g}$	r	Intervalo lineal $\mu\text{g/L}$	LDI $\mu\text{g/L}$	LC $\mu\text{g/L}$
0,5	NFD	0,003	0,999	366-1000	109,7	365,7
	NMD	0,003	0,999	237-2000	71,2	237,3
1	NFD	0,005	0,999	148-1000	44,3	147,7
	NMD	0,006	0,999	124-1500	37,1	123,7
3	NFD	0,02	0,998	50-400	14,9	49,7
	NMD	0,02	0,999	65-1000	19,6	65,3
6	NFD	26	0,999	26-585	7,9	26,3
	NMD	18	0,997	50-1260	15,0	50,0
11	NFD	43	0,999	9-400	2,8	9,3
	NMD	32	0,999	12-400	3,5	11,7

*LDI: Límite de detección instrumental.

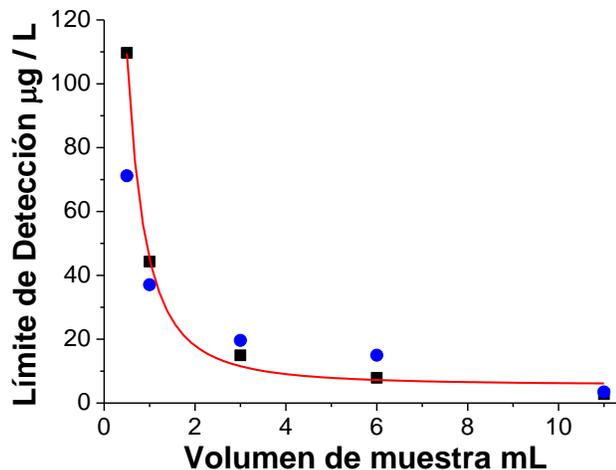


Figura 28. Gráfico de LDI en función del volumen de muestra utilizando sistema FIA-SPE para (●) NFD y (■) NMD.

5.1.3. Aplicación del método voltamétrico FIA-SPE-CNF sobre muestras reales que contienen NFD y NMD.

I) Aplicación sobre muestras farmacéuticas.

Primero se determinaron muestras farmacéuticas comerciales de NFD y NMD. El procedimiento experimental se encuentra descrito en la sección 4.3.1.IV.e. Este estudio se realizó utilizando un volumen de muestra de 6 mL, a este volumen se obtuvieron buenos resultados descritos a continuación, por lo que no se tuvo la necesidad de aumentar el volumen de muestra para aumentar la sensibilidad del método.

Para esto se desarrolla una simulación de la tableta comercial basada en una formulación comercial de 20 mg de NFD del laboratorio Chile y 30 mg NMD del Instituto Sanitas, utilizando los excipientes informados en los comprimidos comerciales. Se analizó mediante la técnica de voltametría de barrido lineal, siempre registrando el proceso de reducción de los grupos nitro, los voltamogramas correspondientes los cuales se observan en la figura 29, la medida se realizó por triplicado utilizando la misma solución.

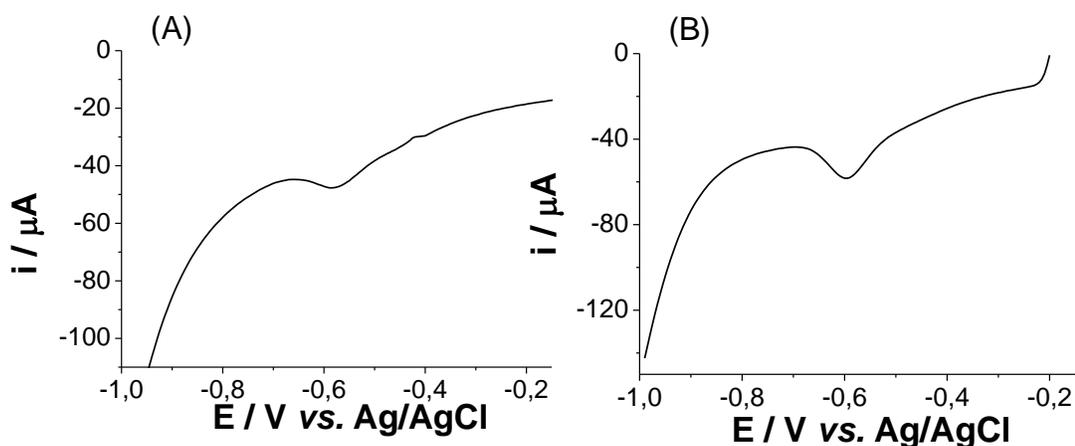


Figura 29. Voltamograma de barrido lineal de una tableta comercial simulada de (A) NFD y (B) NMD en 0,1M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} .

Obteniendo la intensidad de corriente de pico, introduciendo este valor en la ecuación de la recta de la curva de calibrado para NFD y NMD de 6 mL de volumen de muestra, se obtiene la masa real determinada, luego se calcula el porcentaje de recuperación del método FIA-SPE-CNF. Los valores se reportan en la tabla 7.

Tabla 7. Parámetros de recuperación del método FIA/SPE-CNF, de acuerdo al análisis de una tableta simulada de 20 mg de NFD y 30 mg de NMD.

Analito	Masa del nitro compuesto añadido (mg)	Masa de analito	RDS (%)	Recuperación (%)
		detectada con el sistema FIA/SPE-CNF (mg)		
NFD	20,24	19,02	0,36	93,97
NMD	30,10	31,00	0,04	102,99

Con estos resultados se da cuenta que los excipientes no interfieren la señal de reducción de los grupos nitro de ambas drogas debido que los porcentajes de recuperación están sobre el 90%, y sus valores son conocidos. Por lo que se procede a determinar el contenido nominal que contienen las tabletas comerciales para NFD y NMD, para esto se utilizaron dos tipos de tabletas: una de 20 mg de NFD del Laboratorio Chile y 30 mg de NMD del Instituto Sanitas. Las medidas se realizaron por triplicado, el voltamograma se observa en la figura 30.

Además, obteniendo la intensidad de corriente de pico, se calculó la cantidad de fármaco en las tabletas comerciales para ambos nitrocompuestos. Los valores se reportan en la tabla 8.

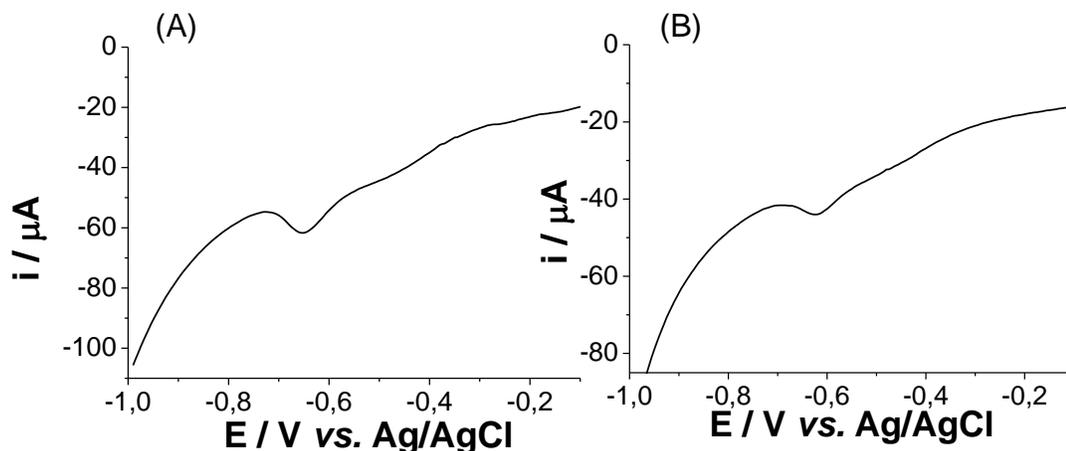


Figura 30. Voltamograma de barrido lineal de una tableta comercial de (A) 20 mg NFD de Laboratorio Chile y (B) 30 mg NMD de Instituto Sanitas, en 0,1 M buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs⁻¹.

Tabla 8. Análisis de tabletas comerciales de 20 mg de NFD del Laboratorio Chile y 30 mg de NMD del Instituto Sanitas.

Analito	Contenido nominal (mg)	Contenido encontrado con el sistema FIA/SPE-CNF (mg)
NFD	20	19,78 ± 0,08
NMD	30	31,00 ± 0,01

n = 3

Utilizando el método FIA-SPE-CNF se determinó el contenido nominal para NFD y NMD contenidos en formulaciones comerciales, estos valores se consideran adecuados analíticamente, ya que se determinan alrededor del 100% de la cantidad nominal que reporta la formulación de la droga. Por lo que se puede concluir finalmente que este sistema voltamétrico es un método cualitativo y cuantitativo para determinar NFD y NMD utilizando tabletas comerciales.

II) Aplicación sobre muestras de orina.

Aquí se utiliza un volumen de muestra de 11 mL, ya que precisa una mayor sensibilidad utilizando esta matriz real.

Primero la aplicación de método FIA-SPE-CNF se realiza utilizando muestras de orina humana dopadas con ambos nitrocompuestos. En la sección 4.3.1.IV.f, se encuentra la descripción del método empleado en este objetivo. En la figura 31, se observan los voltamogramas de barrido lineal para cada droga, donde se observa que la corriente de pico va aumentando a medida que se va aumentando la concentración del nitrocompuesto en las soluciones de adición estándar. A su vez en la tabla 9 se pueden observar los porcentajes de recuperación utilizando muestras de orina dopadas con NFD y NMD. Estos valores se obtuvieron midiendo el área de pico de la señal de reducción del grupo nitro a hidroxilamina, para luego calcular la concentración que

corresponde utilizando la curva de calibrado con 11 mL de muestra para cada nitrocompuesto.

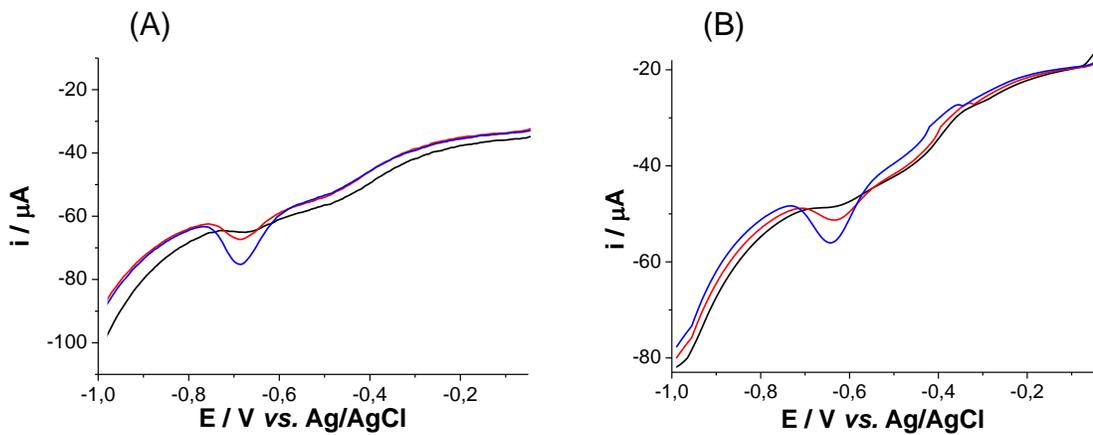


Figura 31. Voltamogramas de barrido lineal de soluciones de adición estándar utilizando muestras de orina para (A) NFD y (B) NMD. (—) adición estándar 0, (—) adición estándar 1, (—) adición estándar 2. Todas las soluciones con 0,1M de buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} .

Los valores de la tabla 9, indican que el método FIA-SPE-CNF posee una recuperación mayor a un 95% para NFD y NMD utilizando una matriz de orina en donde se ha dopado con los analitos correspondientes.

Tabla 9. Valores de porcentajes de recuperación y efecto matriz utilizando muestras de orina dopadas con NFD y NMD.

Analito	Adición estándar	Concentración	Concentración	%RDS	%Re
		experimental en muestras de orina dopadas ($\mu\text{g}/\text{L}$)	encontrada en muestras de orina dopadas ($\mu\text{g}/\text{L}$)		
NFD	0	25	21,5	1	90
	1	100	106,52	2	107
	2	300	306,73	1	102
NMD	0	25	23,14	8	96
	1	100	113,16	3	114
	2	300	294,62	4	98

n = 3

Una vez obtenidos estos resultados se aplicó el método voltamétrico FIA-SPE-CNF en muestras de orina de un paciente que ha consumido 20 mg de NFD de Laboratorio Chile. Se prepararon las muestras de acuerdo al procedimiento indicado en la sección 4.3.1.IV.f. Se tomaron muestras de orina en diferentes tiempos después de haber sido ingerida la droga, y se fueron inyectando al sistema FIA, donde por voltametría de barrido lineal se midió la corriente de pico del proceso de reducción del grupo nitro, ver figura 32. La concentración de estándar que se añadió a cada muestra de orina fue de 25 $\mu\text{g/L}$ (técnica de adición de estándar), y el volumen de muestra inyectada fue de 11 mL. Luego la corriente de pico se interpoló en la curva de calibrado correspondiente para calcular la concentración de analito en la muestra.

En la tabla 10, se observa los valores obtenidos para cada muestra de orina analizada en diferentes tiempos. Al graficar la corriente de pico del proceso de reducción del grupo nitro de NFD, se puede observar que este tiene su máximo de liberación en las dos horas, y a medida que va aumentando el tiempo la concentración liberada ha bajado considerablemente. Además los valores de concentración encontrados concuerdan con la concentración añadida en la solución estándar de 25 $\mu\text{g/L}$, ya que cuando se analiza a tiempo cero, la concentración encontrada es de 25,29 $\mu\text{g/L}$, por lo que quiere decir que el efecto matriz es bajo, y la recuperación es cercana al 100%.

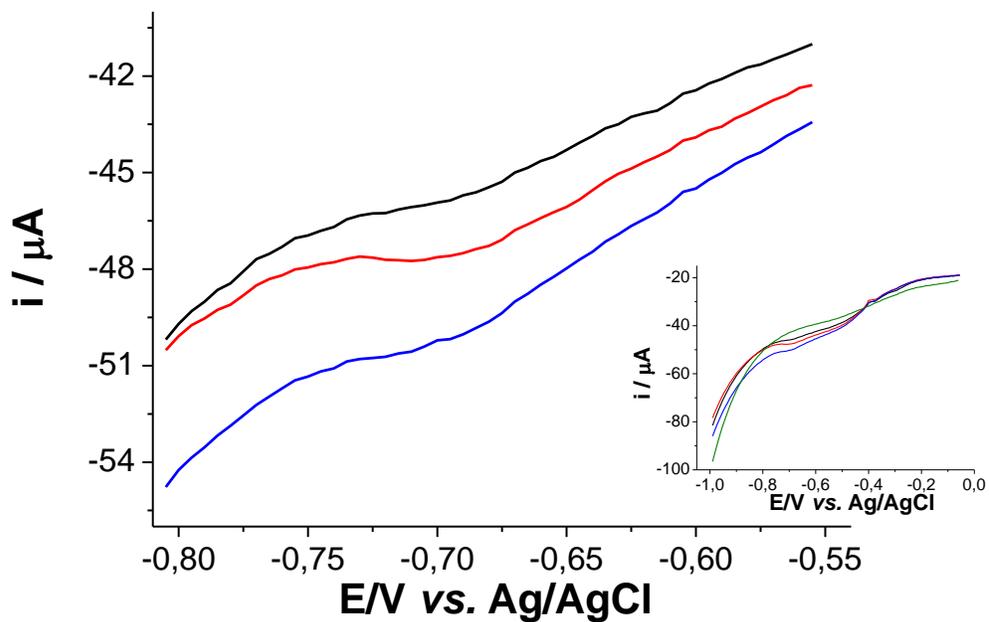


Figura 32. Voltamogramas de barrido lineal de muestras de orina a diferentes tiempos después de ingerir 20 mg de NFD de Laboratorio Chile dopadas con 25 $\mu\text{g/L}$. Figura inserta: voltamograma de barrido lineal completo; (—) muestra de orina con 25 $\mu\text{g/L}$ a tiempo 0, (—) muestra de orina con 25 $\mu\text{g/L}$ a tiempo 2 horas, (—) muestra de orina con 25 $\mu\text{g/L}$ a tiempo 6 horas. Todas en 0,1M de buffer BR-NaCl/pH 3, v_B 100 mVs^{-1} .

Tabla 10. Valores de las concentraciones encontradas y % recuperación de las muestras de orina de un paciente con ingesta de 20 mg de NFD de Laboratorio Chile tomadas a diferentes tiempos.

Tiempo (h)	Concentración agregada de NFD ($\mu\text{g/L}$)	Concentración de NFD en muestra de orina ($\mu\text{g/L}$)	Concentración real de NFD liberada en orina ($\mu\text{g/L}$)	%RDS
0	25	25,29	>LD	2
2	25	47,41	22,41	10
6	25	34,51	9,51	1

n = 3

Con estos resultados, se puede observar que la liberación en la orina de NFD es muy bajo, con respecto a los 20 mg que contiene la tableta comercial ingestada. En literatura se reporta⁽⁶⁶⁾ que solo el 0,1% del total de NFD se libera sin metabolizar por la orina y dentro de un 60-80% se libera como droga metabolizada. En este mismo trabajo informan los metabolitos de NFD que se liberan en la orina, los cuales son: dihidronifedipino, ácido dihidronifedipinico y dihidronifedipinolactona. Además, se observa que la mayor concentración liberada se produce a las dos horas después de haber sido ingerido el medicamento, este resultado concuerda con la literatura⁽⁶⁷⁾, que dice que el tiempo de vida media de NFD en el cuerpo es alrededor de las dos horas.

Estos resultados han mostrado que el sistema FIA-SPE-CNF puede detectar pequeñas diferencias de concentraciones en muestras reales de orina, por lo que el efecto matriz es muy bajo. Y aunque este sistema no llegó a los límites de detección del orden de los ng/L como los métodos convencionales reportados, si se puede decir que este método sirve para determinar concentraciones de NFD liberadas en muestras reales de orina.

En la tabla 11 se muestran trabajos reportados que han utilizado sensores electroquímicos para la determinación de NFD. En contraste, se observa que los electrodos de SPE-CNF muestran un alto límite de detección comparados con algunos de estos trabajos reportados en esta tabla. Sin embargo esto no es un impedimento para determinar NFD en muestras reales, donde se obtienen resultados con bajos errores. Lo más importante de este método FIA-SPE-CNF es que la preparación del método se hace en un solo paso haciéndolo mucho más fácil comparado con los otros electrodos de nanomateriales reportados.

Tabla 11. Comparación del rendimiento de diferentes electrodos modificados utilizando diferentes técnicas para el análisis de NFD.

Electrodo modificado	Técnica electroquímica	LOD $\mu\text{g/L}$	% Re	Ref.
Pasta de carbono/nanotubos de carbono de multipared / β -ciclodextrina	Adsorción stripping/voltametría de pulso diferencial	5,12	100,15	[68]
Carbono vítreo/nanopartículas de Ag	Voltametría de pulso diferencial	249,36	98-103	[69]
Carbono vítreo modificado con film Polifurfural	Voltametría cíclica	1,73	101,7	[70]
Gota de Hg	Adsorción stripping/voltametría de onda cuadrada	0,42	96,26-99,49	[71]
Serigrafiado/nanofibras de carbono	Voltametría de barrido lineal	2,8	102	Este trabajo

III) Aplicación sobre muestras reales de agua.

Para las muestras reales de agua, se tomaron muestras de la planta de tratamiento La Farfana, las muestras de agua extraídas fueron de afluente. En la sección 4.3.1.IV.g, se encuentra la descripción del método empleado en este objetivo. El volumen de muestra para este análisis fue de 11 mL, donde se realizó en dos etapas. La primera fue preparar una solución dopada con 25 µg/L de NMD agua de afluente acidificando, la solución se acidificó con H₃PO₄ hasta pH 3, luego fue inyectada en el sistema FIA, para monitorear la señal de reducción del grupo nitro de NMD mediante la técnica de LSV. En segundo lugar, se preparó la misma solución de NMD pero en el electrolito soporte (0,1 M de buffer BR-NaCl/pH3) para observar si existe un efecto matriz en el agua de afluente, finalmente ambas señales de reducción son comparadas. El voltamograma lineal de ambas señales se observa en la figura 33.

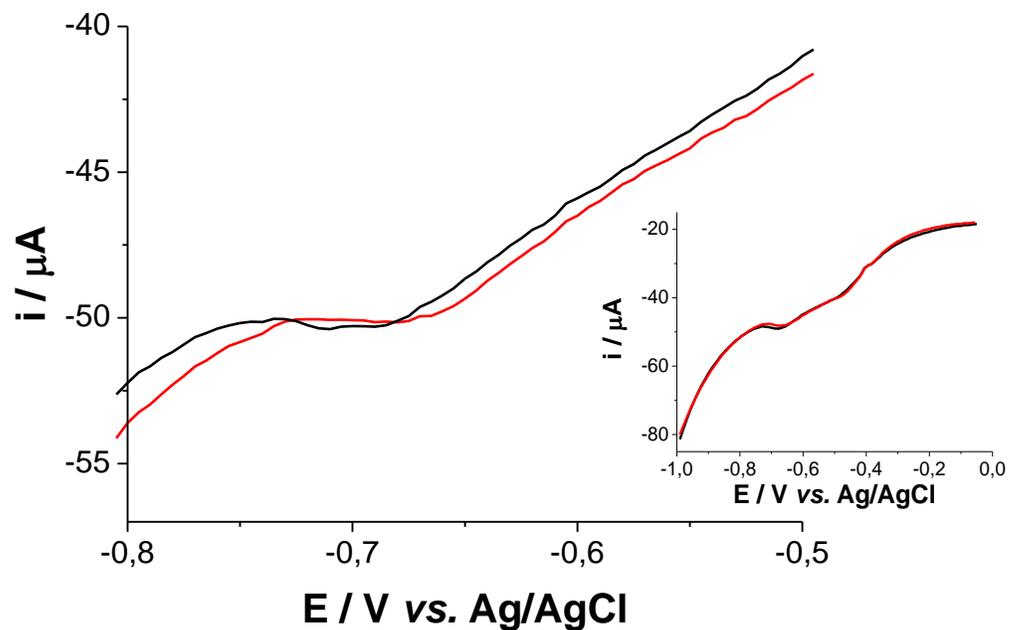


Figura 33. Voltamograma de barrido lineal de 25 µg/L de NMD en agua de afluente (—) y buffer BR-NaCl/pH 3 (—) ambos voltamogramas con v_B 100 mVs^{-1} . Figura inserta: voltamograma de barrido lineal completo.

En la figura 33 la señal de reducción del grupo nitro de NMD se observa para ambas matrices. El potencial del proceso de reducción se observa un poco desplazado hacia potenciales negativos para la solución de NMD con el electrolito soporte, sin embargo, el desplazamiento de ambas señales es indistinguible cuando se observa en el voltamograma lineal completo (figura inserta). Por lo que no existe efecto matriz del agua de afluente utilizando este sistema electroanalítico ya que no se ve una alteración de la señal de reducción

del grupo nitro de NMD; ni de potencial ni de corriente, al ser comparada con una solución estándar.

Por otro lado, se observa que la corriente del proceso de reducción del grupo nitro de NMD para el agua de afluente no es más grande en comparación con la solución estándar, esto podría indicar que no existe presencia de NMD en la muestra de agua de afluente. Es así que para validar este resultado se utilizó un método cromatográfico ya validado y reportado analizando la misma muestra de agua de afluente.

El método utilizado para la validación del método electroanalítico es la extracción líquida-líquida dispersiva (ELLD) utilizando HPLC-DAD. El método de ELLD/HPLC-DAD consiste en utilizar líquidos iónicos para separar el analito de la fase acuosa y así preconcentrarlo en la fase orgánica para ser detectado por HPLC-DAD, esto hace que se aumenta el área de la señal cromatográfica sin alterar el tiempo de retención del analito en estudio. El procedimiento para este método se encuentra descrito en la sección 2.3.1.4.g.

Lo primero que se realizó fue una solución estándar de 50 $\mu\text{g/L}$ de NMD en agua Milli-Q, donde se inyectó 20 μL en el HPLC-DAD para determinar el espectro UV-VIS, el cual se observa en la figura 34. La longitud de onda que indica su espectro de absorción para NMD es entre los 355-360 nm.

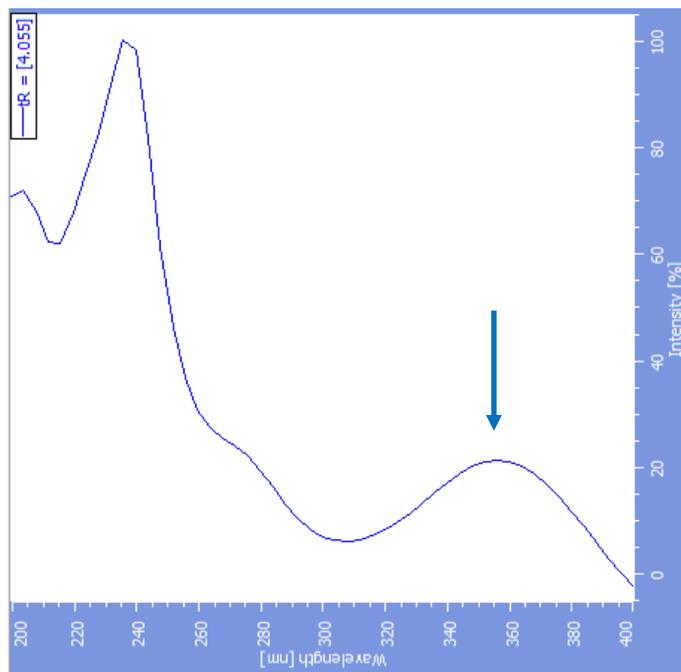


Figura 34. Espectro UV-VIS para una solución de 50 µg/L de NMD en agua mili-Q.

Luego de definir el espectro UV-VIS para NMD, se inyectaron dos soluciones de NMD, la primera sin realizarle el método de ELLD y otra realizándolo previamente antes de inyectar la solución, donde los cromatogramas se observan en la figura 35.

Se observa en la figura 35 un aumento notorio del área bajo la curva del cromatograma cuando se realiza el proceso de ELLD, donde el factor de enriquecimiento es de 85,27 veces para la señal correspondiente a NMD. Con estos resultados, entonces, se prosigue a realizar una solución de NMD de 50 µg/L aforada en agua de afluyente y otra sin NMD en la matriz, que será la solución blanco, que indicará si existe presencia de NMD, donde para ambas soluciones se le aplicó el proceso previo de ELLD. En la figura 36, se observa el cromatograma correspondiente.

Se observa que la señal de NMD en la matriz de agua de afluyente se mantiene constante, por lo que no existiría efecto matriz para este proceso, y cuando se observa la señal del blanco no se observa ninguna señal correspondiente a la presencia de NMD en el agua de afluyente, por lo que se atribuye que no existe NMD en esta matriz.

Este análisis valida que los resultados determinados con el método FIA-SPE-CNF desarrollado en esta tesis doctoral son aplicables a muestras reales de agua, ya que para ambos métodos los resultados obtenidos determinaron que no existía presencia de NMD en agua de afluyente extraída de la plata de tratamiento la Farfana ubicada en la comuna de Maipú, en la ciudad de Santiago de Chile.

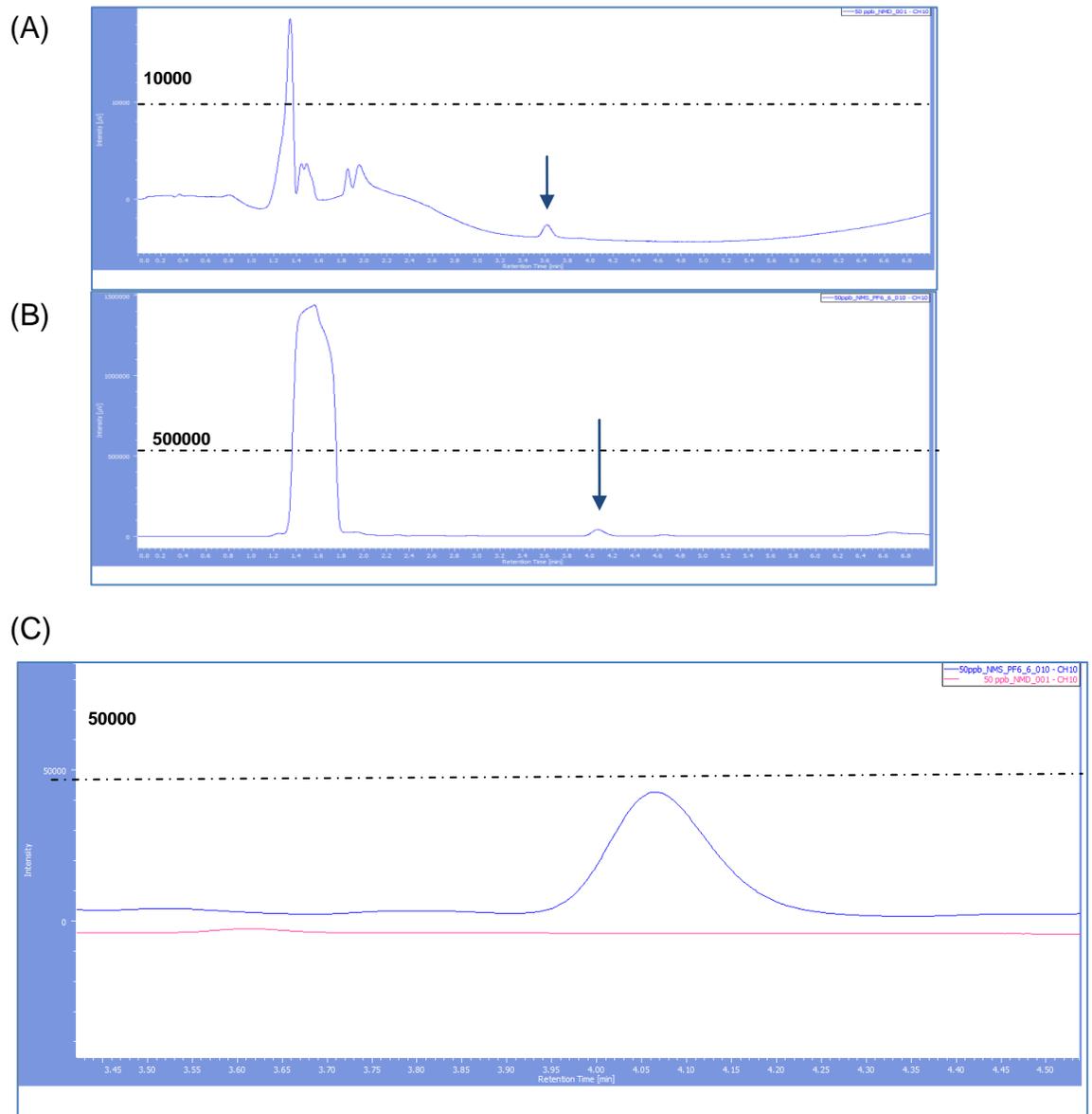


Figura 35. Cromatogramas de 50 µg/L de NMD en agua Milli-Q: (A) sin el proceso de ELLD, (B) con el proceso de ELLD, (C) comparación de cromatograma: (—) sin el proceso de ELLD. (—) y con el proceso de ELLD.

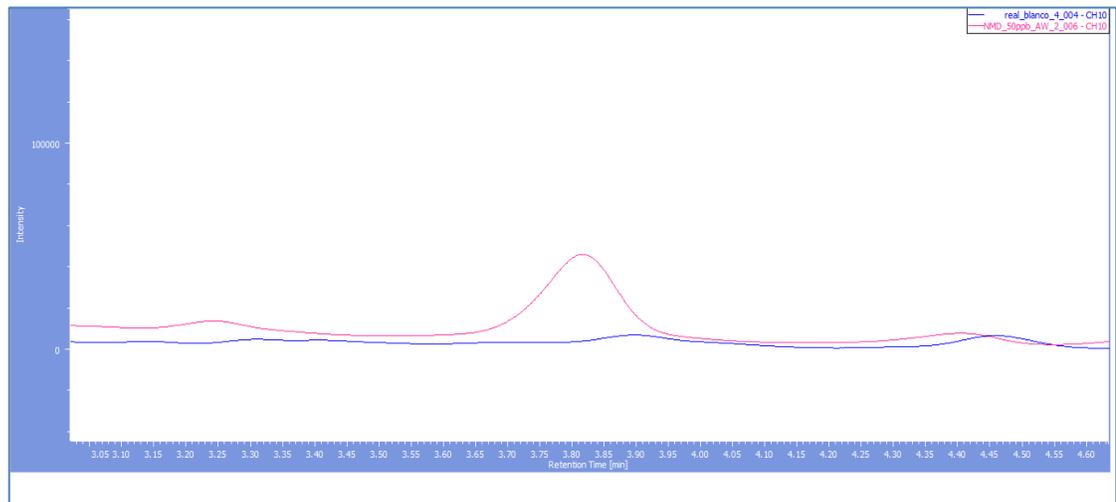


Figura 36. Cromatogramas superpuestos: solución dopada con 50 µg/L de NMD en agua de afluyente (—) y agua de afluyente sin dopar (—) ambos con el proceso previo de ELLD.

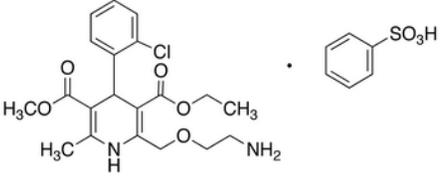
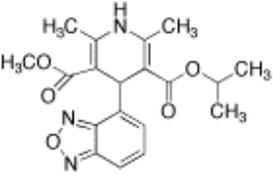
5.2. Método analítico.

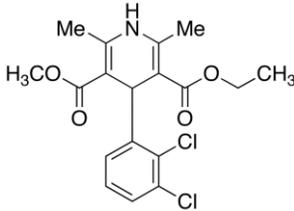
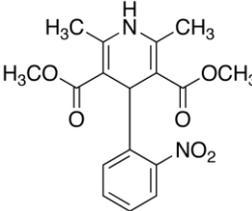
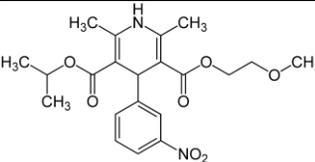
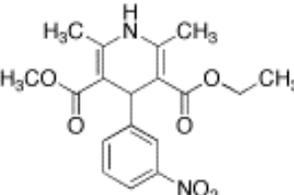
Con el fin de comparar los parámetros analíticos de la metodología FIA-SPE-CNF con un método cromatográfico, se utilizó la cromatografía líquida acoplada a espectroscopia (UHPLC-QqLIT). Este método se desarrolló en el Instituto Catalán de Investigación del Agua (ICRA, por sus siglas en catalán) localizado en Gerona-Cataluña, España. Este método que se implementa en el ICRA ya está validado y reportado, por lo que solamente se optimizó utilizando fármacos de la familia de las 1,4-dihidropiridinas. Todo el procedimiento experimental de este método analítico se encuentra en la sección de metodología experimental 4.3.2.

5.2.1. Estudio de los antagonistas de canales de calcio mediante el método de UHPLC-QqLIT aplicados en muestras de agua reales.

Al investigar sobre estas drogas, se escogieron algunas otras correspondientes a la misma familia de antagonistas de canales de calcio, teniendo en cuenta la altísima selectividad del UHPLC-MS. Basándose en la farmacopea europea⁽⁵⁹⁾ se estudiaron aparte de NFD y NMD, cuatro compuestos más de esta familia, que son Amlodipino (AMD), Felodipino (FLD), Isradipino (ISR) y Nitrendipino (NTR). En la tabla 12, se muestran sus estructuras químicas y sus propiedades físicas y químicas respectivamente. Para los estándares internos se utilizaron dos compuestos deuterados pertenecientes a esta misma familia: AMD-d4 y NMD-d7.

Tabla 12. Propiedades físicas y químicas de antagonistas de canales de calcio en estudio, pertenecientes a la familia de 1,4-dihidropiridina

Analito	Estructura Química	Masa Molecular	pKa	Solubilidad		
				en agua (mg/L) a 25°C	Vida media (h)	Dosis diaria (mg)
Amlodipino Besilato (AMD)		567,05 (72,11%AMD)	8,6	5,67	30-50	2,5-5
Isradipino (ISR)		371,39	5,07	0,5	3-9	5

Felodipino (FLD)		384,26	5,33	0,5	30-50	5-10
Nifedipino (NFD)		346,33	5,33	1,77	2	60
Nimodipino (NMD)		418,44	5,41	1,20	8-9	60
Nitrendipino (NTR)		360,31	5,43	1,42	2-7	40

Amlodipino- d4 (AMD-d4)		412,9	-	-	-	-
Nimodipino- d7 (NMD-d7)		425,48	-	-	-	-

I) Optimización del método cromatográfico.

Con las mismas condiciones cromatográficas utilizadas en ICRA⁽⁶²⁾, se puede observar en la figura 37, que las 6 drogas estudiadas co-eluyen. Es por eso que se debe optimizar la gradiente del HPLC y la fase móvil acuosa, la fase móvil orgánica se mantiene igual siendo MeOH.

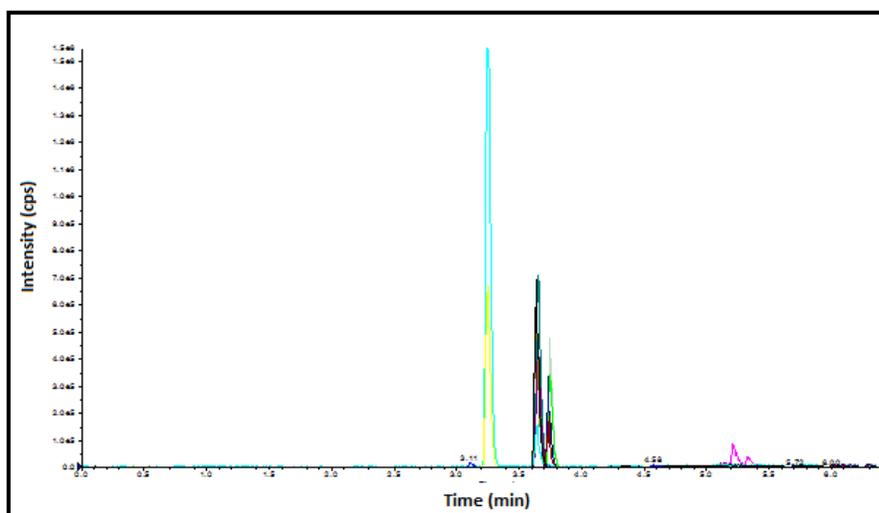


Figura 37. Cromatograma de los 6 analitos estudiados usando una solución multi-estándar de los analitos a 25 µg/L en ionización positiva.

La fase móvil acuosa es cambiada por 0,1% de ácido fórmico (**B1**), además en literatura se reporta un método que se incluyen varios de estos fármacos⁽⁷²⁾, donde se harán pruebas con las fases móviles acuosas mencionadas en literatura: 10 mM de formiato de amonio a pH 3 (**B2**), 10 mM de acetato de amonio pH 3,5 (**B3**) y finalmente 10 mM de acetato de amonio a pH 5 (**B4**). Además el tiempo de análisis es acortado siendo solo de 4 minutos. Al realizar los cromatogramas utilizando las diferentes fases móviles acuosas, se observan los cambios que existen en los picos de los analitos en estudio, en función del tiempo de retención y la resolución, sin embargo no varían notoriamente uno de otro, como se observa en la figura 38. Es por eso que se escogen dos fases móviles acuosas diferentes; B1 y B4, donde se construye una curva de calibrado para cada fármaco para la comparación de sus parámetros analíticos, estos valores se muestran en la tabla 13. Las curvas de calibrado correspondiente para cada analitos utilizando B1 y B4 como fase móvil acuosa se observa en la figura 39.

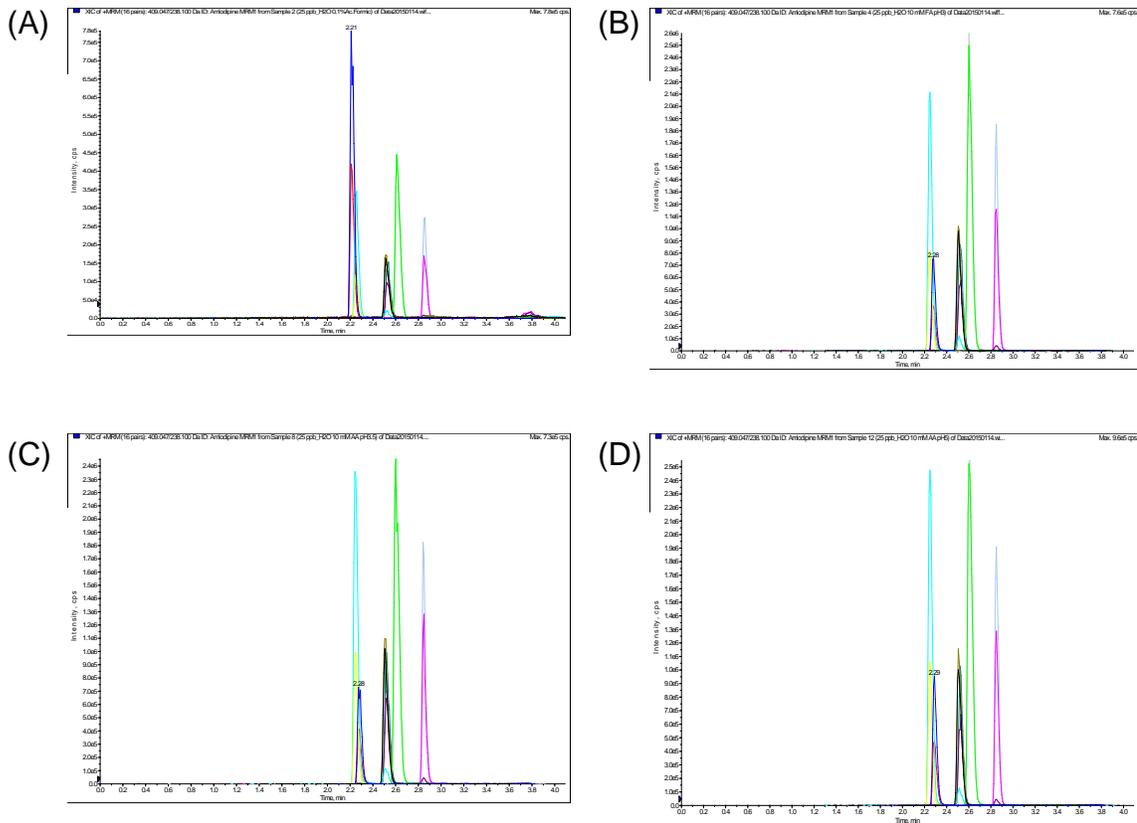


Figura 38. Cromatograma de solución de 25µg/L multi-estándar de los 6 antagonistas de canales de calcio usando diferentes fases móviles acuosas: **A)** 0,1% ácido fórmico (**B1**), **B)** 10 mM formiato de amonio pH 3 (**B2**), **C)** 10 mM acetato de amonio pH 3,5 (**B3**), **D)** 10 mM acetato de amonio pH 5 (**B4**).

Tabla 13. Parámetros analíticos instrumentales de los 6 antagonistas de canales de calcio en estudio, utilizando dos fases móviles acuosas diferentes: 0,1% ácido fórmico (B1), 10 mM de acetato de amonio pH 5 (B4).

Analito	Solvente	Tr (min)	Sensibilidad (A _p L / µg)	Intercepto (Área)	r	Repetibilidad (%RDS)			Repetibilidad de la curva de calibrado (%RDS)	Rango lineal (µg/L)
						n=3				
						0,1 (µg/L)	25 (µg/L)	100 (µg/L)		
AMD	B1	2,12	20142	-447225	0,9981	14	7	5	10	25-400
	B4	2,18	8148	-20647	0,9987	12	13	4	16	0,5-300
FLD	B1	2,72	3118,1	3125,7	0,9992	3	5	4	10	1-400
	B4	2,71	7832,7	7832,7	0,9989	9	6	3	2	0,1-400
ISR	B1	2,34	-4114,9	-4114,9	0,9999	20	7	6	19	0,5-400

	B4	2,30	95460	95460	0,9979	7	2	7	7	1-400
NFD	B1	2,05	2394,7	2394,7	0,9993	43	6	7	7	1-400
	B4	2,06	-9875	-9875	0,9994	18	2	3	5	0,5-400
NMD	B1	2,40	-12103	-12103	0,9993	21	7	4	13	0,1-400
	B4	2,37	-83011	-83011	0,9978	8	4	6	4	0,5-400
NTR	B1	2,32	3757,7	-10265	0,9989	11	4	5	14	0,5-400
	B4	2,28	4031,1	-49,126	0,9980	17	2	3	4	0,5-400

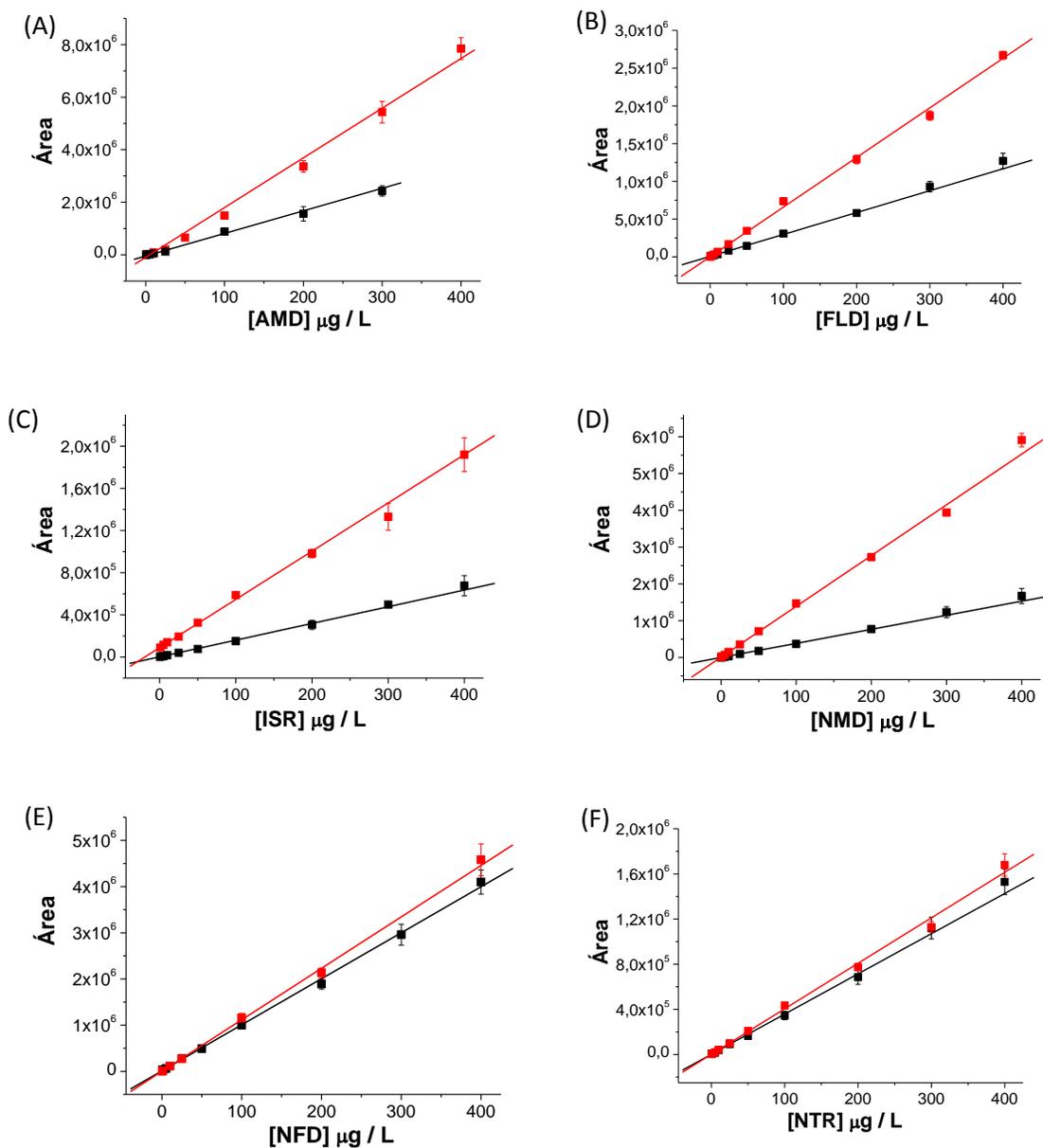


Figura 39. Gráficos de área de pico en función de la concentración de los antagonistas de canales de calcio: (A) AMD, (B) FLD, (C) ISR, (D) NMD, (E) NFD, (F) NTR con ambas fases móviles acuosas (—) 0,1% ácido fórmico (B1), (—) acetato de amonio pH5 (B4).

Como las diferencias entre una fase acuosa y otra no son significativamente grandes, como se observa en la tabla 13, se escoge trabajar con 0,1% de ácido

fórmico para cuantificar las muestras de agua real, debido a la facilidad que tiene en la preparación del solvente a diferencia de 10 mM de acetato de amonio pH 5.

II) Efecto matriz y recuperación.

Mediante el método señalado en la sección 2.3.3.VIII, se determinan los %EM y %Re, estos cálculos se hacen mediante una muestra de agua de afluyente extraída de la depuradora Quart. También se realiza una curva de calibrado utilizando esta matriz para determinar la repetibilidad del método (a 25 µg/L para las 5 drogas y 10 µg/L para los dos compuestos deuterados), límite de detección y el límite de cuantificación. En la tabla 14 se observan los valores de %EM y %Re. Para los %EM en algunos compuestos los valores se consideran altos, esto se puede deber a dos razones; por nuestro conocimiento, es la primera vez que se trabaja con este tipo de matriz, por lo que se puede haber cometido un error en el estudio, y por otra parte, y la más importante, pone en evidencia la importancia de desarrollar un estudio de efecto matriz para analizar este tipo de compuestos.

Tabla 14. Valores de %EM y %Re para los 6 nitro compuestos en estudio en muestras reales de agua extraídas de la depuradora Quart.

Analito	Repetibilidad (%RDS)				LDI (ng/L)	LD (ng/L)	LQ (ng/L)	EM (%)	Re (%)
	Afluyente		Efluente						
	Afluyente (24h)	compuesto (24h)	compuesto (24h)	Efluente					
AMD	14	2	4	18	21,43	14,61	48,71	19,4	60
FLD	3	9	7	9	140,06	18,11	60,36	26,8	50
ISR	9	10	2	7	17,03	27,84	92,81	44,00	76
NFD	8	3	12	3	37,07	7,79	25,97	53,6	60
NMD	15	9	8	11	3,17	10,83	36,109	41,0	63
NTR	12	5	6	6	245,54	15,98	53,25	27,6	94
AMD-d4	10	14	4	11	9,63	-	-	34,4	95
NMD-d7	4	9	10	11	29,89	-	-	41,6	91

Por otro lado, los valores para los %Re para este tipo de compuestos farmacéuticos no son tan altos como los que se podrían esperar al utilizar los *catridge* Oasis™ HLB⁽⁷³⁻⁷⁵⁾, donde los valores fluctúan entre un 50-95%, sin embargo si comparamos valores de %Re en otros trabajos, utilizando este tipo de EFS en muestras de agua residual, su porcentaje no es más alto que el reportado en este estudio, tabla 15. Esto se puede atribuir, a que los *catridge* Oasis™ HLB, funcionan relativamente bien para una gran gama de compuestos farmacéuticos, teniendo en cuenta la afinidad que se presenta con ellos. Además, debido al método de este trabajo es mucho más específico que los reportados en bibliografía, se esperarían que los %Re fueran más altos, corroborándolo con los resultados mostrados.

Tabla 15. Comparación del %Re informado para diferentes métodos analíticos en la determinación de amlodipino en muestras de agua.

Muestras de agua	Técnica	%Re	Ref.
Efluente	SPE(Oasis TM HLB)- LC-MS	51	[76]
Afluente	SPE(Oasis TM HLB)- UHPLC-MS	51	[77]
^a Efluente	SPE(Oasis TM HLB)- LC-MS	49	[78]
^b Efluente	SPE(Oasis TM HLB)- LC-MS	50	[78]
Afluente	SPE(Oasis TM HLB)- UHPLC-MS	60	Este trabajo

^{a y b} utilizan diferentes métodos de extracción, ajustando el pH de la muestra

III) Cuantificación de las muestras reales.

La cuantificación se realizó mediante el método de estándar interno, utilizando dos compuestos deuterados AMD-d4 y NMD-d7, siendo uno de ellos específicos para cada analito en estudio. En la tabla 16, se observa la cuantificación de las seis drogas encontradas en la planta Quart de los 4 puntos de muestreo. Se observa que la cuantificación para AMD en las muestras de agua residuales, utilizando AMD-d4 como estándar interno (IS) se detecta por

sobre el límite de detección en los 4 puntos de la planta. Así también ocurre, para la detección y cuantificación de FLD y NTR. Los demás compuestos no son detectados, o la concentración hallada fue menos al límite de detección, por lo que se interpreta que no existen residuos de ISR, NMD y NFD en aguas residuales en la depuradora Quart.

Tabla 16. Cuantificación de los seis antagonistas de canales de calcio en estudio en muestras de agua residuales de la planta de depuración Quart.

Analito	IS	Afluente		Efluente	
		compuesto (24h) (ng/L)	Afluente (ng/L)	compuesto 24h (ng/L)	Efluente (ng/L)
AMD	AMD-d4	39,44	64,91	35,49	168,13
FLD	AMD-d4	31,13	51,34	28,00	133,24
ISR	AMD-d4	<LD	<LD	ND	<LD
NFD	NMD-d7	<LD	<LD	<LD	<LD
NMD	NMD-d7	ND	ND	ND	ND
NTR	NMD-d7	<LD	330,73	145,03	23,09

ND: No detectado

<LD: Bajo el límite de detección

Para que este trabajo sea evaluado en el campo de la química analítica, además de la validación con muestras reales de agua, se deben comparar los parámetros analíticos con trabajos ya reportados. La tabla 17 muestra la comparación de los límites de detección y el %Re utilizando diferentes matrices basados en la cromatografía líquida y espectroscopía de masa. De acuerdo a la literatura es el primer trabajo que sólo estudio un grupo de medicamentos pertenecientes a la familia de las 1,4-dihidropiridinas. Sobre la base de estos resultados, podemos decir que este método tiene un buen límite de detección y los porcentajes de recuperación son mejores o similares a estos estudios reportados.

Tabla 17. Comparación de diferentes métodos analíticos para la extracción y determinación de fármacos de la familia de las 1,4-dihidropiridinas en matrices de agua real y plasma humano.

Analitos	Técnica	Matriz	LD(ng/L)	%Re	Referencias
AMD	SPE/LC/MS	SW	5	50	[78]
	SPE/LC/MS	WWE	10	75	[79]
	LC/MS	Plasma humano	170	57	[72]
	SPE/LC/MS	WWE	3	51	[76]
	SPE/LC/MS	WWI	39	51	[77]
	SPE/LC/MS	WWI	15	60	Este trabajo
NFD	SPE/LC/MS	SW	5	77	[78]
	LC/MS	Plasma humano	560	69	[72]
	SPE/LC/MS	WWI	100	75	[80]
	SPE/LC/MS	WWE	8	42	[76]
	SPE/LC/MS	WWI	8	60	Este trabajo
NMD	SPE/LC/MS	SW	5	84	[78]
	LC/MS	Plasma humano	210	66	[72]
	SPE/LC/MS	WWI	11	63	Este trabajo
FLD	LC/MS	Plasma humano	430	64	[72]
	SPE/LC/MS	WWI	18	50	Este trabajo
NTR	LC/MS	Plasma humano	170	67	[72]
	SPE/LC/MS	WWI	16	94	Este trabajo
ISR	LC/MS	Plasma humano	NR	66	[72]
	SPE/LC/MS	WWI	28	76	Este trabajo

*WWE: agua de efluente, WWI: agua de afluente, SW: agua superficial, NR: no reportado.

5.3. Comparación de los métodos electroanalíticos y cromatográficos.

Finalmente se comparan los límites de detección de las técnicas desarrolladas en esta tesis doctoral. En la tabla 18, se observa la comparación de los límites de detección de NFD de ambos métodos electroquímicos; se observa que al utilizar el sistema FIA se baja un orden de magnitud el LDI, aunque los volúmenes de muestra son muy parecidos. Esto se debe expresamente a que el analito llega directamente a la superficie del electrodo, y es por eso que se adsorbe mayor concentración, bajando notablemente los límites de detección. Además, el pretratamiento del electrodo hace que aumente el área activa, mejorando los parámetros analíticos reportados.

Tabla 18. Comparación de los límites de detección de NFD utilizando los diferentes métodos electroanalíticos expuestos en este trabajo.

Técnica	Volumen de muestra (mL)	LDI ($\mu\text{g/L}$)
Batch-SPE-CNF	9,5	74,0
FIA-SPE-CNF	11,0	2,8

Por otro lado, se comparan parámetros del método electroquímica FIA-SPE-CNF con el método cromatográfico de EFS-UHPLC-MS. En la tabla 19 se observa que el límite de detección para la detección de NFD tiene dos órdenes de magnitud de diferencia, siendo más grande para el sistema implementado en este trabajo. Aunque esta diferencia es muy grande para que el método FIA-SPE-CNF sea considerado como un método analítico para la determinación de fármacos en matrices acuosas medioambientales, al comparar los otros parámetros mostrados en esta tabla, se observa que el método electroanalítico presenta igualmente ventajas sobre el método cromatográfico reportado. El tiempo de pretratamiento de la muestra antes de ser inyectado, demora mucho menos (100% menos) que este método. Por otro lado el valor comercial del método desarrollado en esta tesis, es muy bajo comparado con lo que costaría un UHPLC-MS. Y por lo tanto, dependiendo del nivel de concentración que se quiere determinar el método FIA-SPE-CNF se puede usar sin problemas como un método analítico para la determinación de nitrocompuestos presentes en matrices reales. Y además este método electroanalítico no requiere de un sistema en línea para realizar la extracción y preconcentración de la muestra, ya que las mismas CNF hacen de sistema de EFS.

Tabla 19. Comparación de los límites de detección de NFD, tiempo del tratamiento de la muestra y el valor de equipo entre la técnica electroanalítica por sistema FIA y cromatografía líquida.

Técnica	Volumen de muestra (mL)	LDI ($\mu\text{g/L}$)	Tiempo estimativo del pretratamiento de la muestra hasta su inyección (min)	Valor estimativo del equipo (EUR)
FIA-SPE-CNF	11	2,80	15	1000
EFS-UHPLC-MS	100	0,037	150	29000

6. CONCLUSIONES

Este tipo de electrodo permite reflejar muy bien el comportamiento redox de este tipo de compuestos con sólo dos ciclos, obteniendo una "huella digital electroquímica".

La señal de reducción del grupo nitro con una alta razón señal/ruido permitió la implementación de un método cuantitativo para la detección de la droga en muestras farmacéuticas y en orina, lo que dada las características del electrodo permite su determinación a bajas concentraciones en sistemas de flujo utilizando pequeños volúmenes.

Al aumentar el volumen de muestra para ser inyectada en el sistema FIA-SPE-CNF, se demostró que este funciona como un método de microextracción en fase sólida, sin tener la necesidad de realizar un procedimiento externo para preconcentrar el analito en estudio. Esto se demostró con la disminución de los límites de detección al ir aumentando el volumen de la muestra, siendo explícitamente, las nanofibras de carbono del electrodo de trabajo que actuaron como método de microextracción en fase sólida.

El método FIA-SPE-CNF fue validado utilizando un sistema cromatográfico convencional donde se utilizó el método de microextracción líquido-líquido dispersivo acoplado a un HPLC-DAD. Donde se analizaron las mismas muestras de agua residual, con lo cual se determinó que no existía la presencia

de NMD en esta matriz medio ambiental extraída de la plana de tratamiento La Farfana, ubicada en Maipú, Santiago de Chile.

Al comparar los parámetros analíticos del sistema FIA-SPE-CNF con un sistema convencional cromatográfico altamente eficiente y selectivo como lo es el UHPLC-MS, se observó que el límite de detección del sistema voltamétrico está en dos órdenes de magnitud más grande.

El sistema FIA-SPE-CNF sirve como un método vanguardia o screening para saber si existe la presencia de estas drogas en matrices acuosas medio ambientales, para luego, si es necesario, recurrir a un método altamente sofisticado como lo son los métodos cromatográficos convencionales y poder cuantificar los analitos en estudio.

Este sensor electroquímico se aplicó para detectar NFD y NMD en diferentes matrices reales, el cual tuvo excelente reproducibilidad y bajo margen de error, corroborando las concentración que posee los fármacos comerciales y las muestras de orina real y además detectar la presencia de ellos en aguas residuales con un bajo límite de detección.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Ana B. Baranda, Rosa M. Jiménez, Rosa M. Alonso. *Journal of Chromatography A*, 1031 (2004) 275–280.
2. Dragica Zendelovska, Suzana Simeska, Olgica Sibinovska. *Journal of Chromatography B*. 839 (2006) 85-88.
3. Nancy A. Pizarro-Urzúa, Luis J. Nuñez-Vergara. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 175 (2005) 129–137.
4. Ana B. Baranda, Rosa M. Jiménez, Rosa M. Alonso. *Journal of Chromatography A*, 1031 (2004) 275–280.
5. Valentina D. Marinkovic, Danica Agbaba, Katarina Karljivic-Rajic, Sote Vladimirov, Jovan M. Nedeljkovic. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 32 (2003) 929-935.
6. Feng Qin, Yuanyuan Ma, Yiqi Wang, Lingyun Chen, Dong Wang, Famei Li. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46 (2008) 557–562
7. Michelitsch, J. Reiner, M. Schubert-Zsilavec, W. Likussar, *Pharmazie* 50 (1995) 548.
8. Z. Grunwald, *Drug Intell. Clin. Pharm.* 16 (1982) 492–495.
9. J. Alcalay, M. David, M. Sandbank, *Dermatologica* 175 (1987) 191–193.
10. J. Van Harten, M.T. Lodewijsk, J.W. Guyt-Schlten, P. Van Brummelen, D.D. Breimer, *Chromatogr. Biomed.-Appl.* 423 (1987) 327.
11. Ch. Huang, *Zhongguo Yiyeo, GongyeZazhi.* 27 (1996) 26.

12. Alvarez-Lueje, J. Sturm, J.A. Squella, L.J. Núñez-Vergara. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 28 (2002) 887–895.
13. Vandana B. Patravale, Vinod B. Nair, Subhash P. Gore. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23 (2000) 623–627
14. Richardson ML, Bowron JM. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol* 1985 (37) 1-12.
15. Poynton HC, Vulpe CD. Ecotoxicogenomics: emerging technologies for emerging contaminants. *J Am Water Resour. Assoc* 43 (2009) 83–95.
16. Daughton CG. Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environ Impact Assess* 24 (2004) 711–32
17. Richardson SD, Ternes TA. Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal Chem* 83 (2011) 4614–48.
18. Petrovic M., González S., Barceló D. *Trends in Analytical Chemistry* 22 (2003) 685-696.
19. Heberer T. Occurrence. *Toxicology Letters* 131 (2002) 5-17.
20. Heba Shaaban, Tadeusz Górecki. *Talanta* 100 (2012) 80–89.
21. Marinella Farréa, Lina Kantiania, Mira Petrovic, Sandra Péreza, Damià Barceló. *Journal of Chromatography A*, 1259 (2012) 86– 99.
22. T. Einsle, H. Paschke, K. Bruns, S. Schrader, P. Popp, M. Moeder, J. *Chromatogr. A* 1124 (2006) 196.
23. C. Postigo, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló, *Anal. Chem.* 80 (2008) 3123.

24. J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, Wiley, New York, 1997.
25. M.E. Torres Padrón, Z. Sosa Ferrera, J.J. Santana Rodríguez, *Biomed. Chromatogr.* 23 (2009) 1175.
26. E.A. Suchara, D. Budziak, E. Martendal, L.L.F. Costa, E. Carasek, *Anal. Chim. Acta* 613 (2008) 169.
27. Belardi R.P., Pawliszyn J. *Water Pollut Res J Can.* 24 (1989) 179–191.
28. Baltussen E., Sandra P., David F., Janssen H.G., Cramers C. C. *Anal. Chem.* 71 (1999) 5213-5216.
29. B.J. Gao, J. Wang, F.Q. An, Q. Liu. *Polymer* 49 (2008) 1230–1238.
30. *Ultra Performance LC by design*, Waters Corporation, USA, 2004.
31. L. da Silva, I. de Barros, F. Andrade. *Steroids*.106 (2016) 70.
32. T. Rizzetti, M. Kemmerich, M. Martins. *FoodChemistry*.196 (2016) 25.
33. R. L. Shaner, J. C. Allegood, H. Park, E. Wang, S. Kelly, C.A. Haynes, M. C. Sullards, A. H. Merrill, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 1692.
34. M. Gros, M. Petrovic, D. Barcelo, *Anal. Chem.* 81 (2009) 898.
35. M. J. M. Bueno, A. Aguera, M. D. Hernando, M. J. Gomez, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5995.
36. S. Suriyanarayanan, P.J. Cywinski, A.J. Moro, G.J. Mohr, W. Kutner. *Topics in Current Chemistry* 325 (2012) 165–266.
37. S.W. Chuang, J. Rick, T.C. Chou. *Biosensors and Bioelectronics* 24 (2009) 3170–3173.

- 38.K. Yoshimatsu, K. Reimhult, A. Krozer, K. Mosbach, K. Sode, L. Ye. *Analytica Chimica Acta* 584 (2007) 112–121.
39. <http://www.dropsens.com/inicio.html> (Catálogo General Dropsens, acceso Abril, 2012).
- 40.H. Xiong, Y. Zhao, P. Liu, X. Zhang, S. Wang. *Microchimica Acta* 168 (2010) 31-36.
- 41.X. Tang, Y. Wang, J. Xue, B. Zhou, J. Cao, S. Chen, M. Li, X. Wang, Y. Zhu, Y. Huang. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 107 (2015) 258-264.
- 42.J.D. Mozo, J. Carbajo, J. C. Sturm, L. J. Nuñez-Vergara, P. Salgado, J. A. Squella. *Electroanalysis* 24 (2012), 676-682.
- 43.A. El Jammal, J-C. Vire, G. J. Patriarcho. *Electroanalysis* 4 (1992), 57-64.
- 44.M. Baghaveri, M. Namadchian, H. Karimi, H. Beitollahi. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 697 (2013) 53.
- 45.R. Gaichore, A. Srivastava. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 188 (2013)1328.
- 46.P. Salgado-Figueroa, P. Jara-Ulloa, A. Alvarez-Lueje, J.A. Squella. *Electroanalysis* 25 (2013), 1-6.
- 47.Alvarez-Lueje, L. Naranjo, L.J. Nuñez-Vergara, J.A. Squella, *J.Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1998) 853.
- 48.D. Obendorf, G. Stubauer, *Analyst* 121 (1996) 351.

49. Christine Jeyaseelan, Ravin Jugade, Arun P. Joshi. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research 3 (2011) 253-255.
50. J.A. Squella, I. Lemus, S. Perna, L.J. Núñez-Vergara, Anal. Lett. 21 (1988) 2293.
51. P. Jara, P. Salgado, C. Yañez, L. J. Nuñez, J. A. Squella. Electroanalysis 24 (2012) 1751-1757.
52. Yañez, L.J. Núñez-Vergara, J.A. Squella, Electroanalysis 14 (2002) 559.
53. R. Moscoso, J. Carbajo, M. Lopez, L.J. Nuñez-Vergara J.A. Squella. Electrochemistry Communications 13 (2011) 217-220.
54. Z. Sentürk, S.A. Özkan, Y. Özkan. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 16 (1998) 801–807.
55. S.W. Chuang, J. Rick, T.C. Chou. Biosensors and Bioelectronics 24 (2009) 3170–3173.
56. K. Yoshimatsu, K. Reimhult, A. Krozer, K. Mosbach, K. Sode, L. Ye. Analytica Chimica Acta 584 (2007) 112–121.
57. P. Salgado-Figueroa, P. Jara-Ulloa, A. Alvarez-Lueje, L. Nuñez-Vergara, J. A. Squella. J. Electrochem. Soc. 160 (2013) 553.
58. C. Toledo, A. Alvarez. Talanta 134 (2015) 619.
59. www.edqm.eu (acceso Septiembre, 2014)
60. J. Simó Miñana, Aten. Primaria 44 (2012) 335.
61. Skoog, Douglas A (1998). Principios de Análisis Instrumental: Introducción, pp.18. Harcourt Brace.

62. M. Gross, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló. *Journal of Chromatography A*. 1248 (2012) 104.
63. M. Becerra-Herrera, L. Honda, P. Richter. *Journal of Chromatography A*. 1423 (2015) 96.
64. A. El Jammal, J-C. Vire, G. J. Patriarche. *Electroanalysis* 4 (1992), 57-64.
65. Qiang Zeng, Tianyan Wei, Min Wang, Xinjian Huang, Yishan Fang, Lishi Wang. *Electrochimica Acta* 186 (2015) 465–470.
66. H. Abou-Auda, T. Najjar, K. Al-Khamis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 22(2000) 241-249.
67. <http://www.drugs.com/ppa/nifedipine.html> (acceso Marzo, 2016).
68. Gaichore R, Srivastava. *Sensors and actuators B: chemical* 188 (2013) 1328-1337.
69. Baghayeri M, Namadchian M, Karimi-Maleh H, Beitollahi H. *Journal of electroanalytical chemistry* 697 (2013) 53-59.
70. Zong Q, Wei T, Wang M, Huang X, Fang Y, Wang L. *Electrochimica Acta* 186 (2015) 465-470.
71. Ozaltin N, Yardimci C, Süslü I. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 30 (2002) 573-582.
72. O. González, R.M. Alonso, N. Ferrerós, W. Weinmann, R. Zimmermann, S. Dresen. *Journal Chromatography B*. 879 (2011) 243.
73. R. Steen, P. Leonards, u. Brinkman, D. Barceló. *Environ. Toxicol. Chem.* 18 (1999) 1574.

74. W. Draper. *J. Agric. Food. Chem.* 49 (2001) 2746.
75. T. Benijts, R. Dams, W. Lamberr, A. De Leenheer. *J. Chromatogr A.* 1029 (2004) 153.
76. N. Ahmed, M. Pauzi, M. Ismail, S. Surif. *Journal Chromatography A.* 1217 (2010) 6791.
77. M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló. *J. Chromatogr. A.* 1248 (2012) 104.
78. R. Varga, I. Somogyvári, Z. Eke, K. Torkos. *Talanta.* 83 (2011) 1447.
79. M. Petrović, B. Škrbić, J. Živančev, L. Ferrando-Climent, D. Barcelo. *Science of the Total Environment.* 468-469 (2014) 415.
80. T. Ternes, M. Bonerz, T. Schmidt. *Journal Chromatography A.* 938 (2001) 175.