

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



Código de campo cambiado

**“ESTRATEGIAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA  
DETERMINACIÓN ESPECTROFLUORIMÉTRICA DE  
QUINOLONAS Y TETRACICLINAS DE USO VETERINARIO”**

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

**Por:**

**María Gabriela Arriagada García.**

Director de Tesis

Profesora María Inés Toral Ponce

Co-Director de Tesis

Dr. Pablo Richter Duk

**SANTIAGO - CHILE**

2020

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE DOCTORADO**

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

**MARÍA GABRIELA ARRIAGADA GARCÍA.**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Doctora en Química, en el examen de Defensa de Tesis rendida el día.....de ..... de 2020.

**Director de Tesis:**

Prof. María Inés Toral P. \_\_\_\_\_

**Co-Director de Tesis:**

Dr. Pablo Richter Duk \_\_\_\_\_

**Comisión Informante:**

Dra. Inés Ahumada. (Presidente) \_\_\_\_\_

Dra. Ady Giordano. \_\_\_\_\_

Dra. Soledad Bollo. \_\_\_\_\_

Dr. Waldo Quiroz. \_\_\_\_\_

## DEDICATORIA

*Dedicado a mis madres, su amor y apoyo incondicional guían mis pasos; a mis amigos que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme y acompañarme en este proceso.*

«Nada en la vida es para ser temido, es sólo para ser comprendido. Ahora es el momento de entender más, de modo que podamos temer menos»  
**Marie Curie**

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mis madres, mi gran apoyo durante toda mi vida que siempre estuvieron y siguen estando ahí para sostener ante una caída.

La profe Meme que gracias a su acogida, paciencia, dedicación, ejemplo y apoyo recibido durante largo tiempo, he logrado disfrutar en el desarrollo de mi labor como investigadora.

Durante el desarrollo del presente trabajo de investigación muchas fueron las personas que influyeron de las más diversas formas en el proceso de esta investigación, a cada una de ellas, las cuales siempre recuerdo, quiero expresar mi más profundo agradecimiento por el apoyo que me han otorgado.

A todos los “profes” que entregaron sus conocimientos y permitieron convertirme en la persona ante todo que soy y la investigadora que se formó les agradezco por su tiempo, pasión y dedicación.

A mi director, Pablo Richter que fue un gran apoyo en esta última etapa del proceso. Al igual que la comisión evaluadora conformado por Soledad Bollo, Inés Ahumada, Ady Giordano y Waldo Quiroz) quienes fueron los que me guiaron, permitieron continuar, desarrollar con sus evaluaciones y correcciones, este trabajo de investigación doctoral. Gracias por su apoyo.

Finalmente, a CONICYT por otorgarme la beca Nacional de Doctorado en Chile, beca de Gastos Operacionales N° 21140655 y FONDECYT 1140716/1130398 por el financiamiento a esta investigación.

## ÍNDICE DE MATERIAS

### Contenido

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS .....	ii
ÍNDICE DE MATERIAS .....	<a href="#">iii</a> <del>iv</del>
ÍNDICE DE TABLAS .....	<a href="#">vi</a> <del>vii</del>
ÍNDICE DE FIGURAS .....	<a href="#">ix</a> <del>xiii</del>
LISTA DE ABREVIACIONES .....	<a href="#">xiii</a> <del>xiv</del>
RESUMEN. ....	<a href="#">xiv</a> <del>xv</del>
ABSTRACT.....	<a href="#">xvii</a> <del>xvi</del>
INTRODUCCIÓN .....	<a href="#">21</a> <del>20</del>
1.1. Antecedentes Generales. ....	<a href="#">21</a> <del>20</del>
1.2. Quinolonas, fluoroquinolonas y tetraciclinas. ....	<a href="#">23</a> <del>22</del>
1.2.1 Quinolonas y fluoroquinolonas. ....	<a href="#">23</a> <del>22</del>
1.2.2 Tetraciclinas.....	<a href="#">25</a> <del>24</del>
1.3. Preparación de muestra.....	<a href="#">27</a> <del>26</del>
1.4. Fases Sorbentes.....	31
1.5. Hipótesis.....	32
1.6. Objetivo General .....	<a href="#">33</a> <del>32</del>
1.7. Objetivos Específicos.....	<a href="#">33</a> <del>32</del>
PARTE EXPERIMENTAL.....	33
2.1. Reactivos.....	33
2.2. Materiales.....	<a href="#">35</a> <del>34</del>
2.3. Equipos, Instrumentos y <i>Softwares</i> .....	35
2.4. Procedimientos experimentales.....	<a href="#">36</a> <del>35</del>
2.4.1. Preparación de soluciones.....	<a href="#">36</a> <del>35</del>

2.4.2.	Conducta espectral de los analitos por espectrofotometría UV-visible y espectrofluorimetría.....	36
2.4.3.	Acondicionamiento de las fases sorbentes.....	36
2.4.4	Estudio de fases sorbentes mediante la extracción de los analitos.....	37
2.4.5	Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la extracción con RDSE.	38
2.4.5.4	Efecto del volumen de solución de muestra sobre la extracción. ....	40
2.4.5.6	Efecto de la concentración del amortiguador Mc Ilvaine – EDTA sobre la extracción.	40
2.4.5.7	Efecto de la temperatura sobre la extracción. ....	40
2.5	Linealidad del sistema para RDSE directo por espectrofluorimetría. ....	41
2.6	Validación para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche en RDSE por espectrofluorimetría. ....	41
2.6.2	Preparación de muestra.....	41
2.6.3	Protocolo de extracción.....	42
2.6.4	Linealidad del método.....	42
2.6.5	Selectividad.....	42
2.6.6	Límite de cuantificación y detección. ....	<a href="#">4243</a>
2.6.7	Precisión y exactitud. ....	43
2.7	Estrategia de elución para la determinación de EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.....	<a href="#">4344</a>
2.7.2	Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la elución. ....	44
2.8	Linealidad del sistema para elución RDSE por espectrofluorimetría. ....	<a href="#">4546</a>
2.9	Validación para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por elución de RDSE por espectrofluorimetría. ....	<a href="#">4546</a>
2.9.2	Linealidad del método para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por elución de RDSE por espectrofluorimetría.....	46
2.9.3	Selectividad del método para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por elución de RDSE por espectrofluorimetría.....	<a href="#">4647</a>
2.9.4	Límite de cuantificación y detección. ....	<a href="#">4647</a>
2.9.5	Precisión y exactitud. ....	<a href="#">4647</a>

<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>4748</b>
3.1 Estudio de la conducta espectral de los analitos por UV- visible.....	<b>4849</b>
3.2 Estudio de la conducta espectral de los analitos por espectrofluorimetría.....	<b>4950</b>
3.3 Estudio de fases sorbentes.....	<b>5152</b>
3.3.1 Octadecil C <sub>18</sub> .....	54
3.3.2 Oasis ®HLB.....	57
3.4 Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la extracción con RDSE. 60	
3.4.1 Efecto de pH.....	<b>6061</b>
3.4.2 Efecto de tiempo de extracción.....	<b>6263</b>
3.4.3 Efecto de velocidad de rotación.....	64
3.4.4 Efecto del volumen de solución de muestra en la extracción.....	65
3.4.5 Estudio de la concentración del amortiguador Mc Ilvaine – EDTA en la extracción. 66	
3.4.6 Efecto de la temperatura en la extracción.....	67
3.5 Validación para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por espectrofluorimetría.....	68
3.5.1 Linealidad del sistema para RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.....	68
3.5.2 Linealidad del método para RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.....	71
3.5.3 Selectividad del método.....	77
3.5.4 Precisión y exactitud.....	78
3.5.5 Aplicación del método.....	80
3.6 Estrategia de elución para la determinación de EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.....	81
3.6.1 Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la elución. <del>8283</del>	
3.7 Validación para la determinación simultánea de EFX y CFX en presencia de OTC por elución.....	87
3.7.1 Linealidad del sistema para elución por RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.....	88

3.7.2	Linealidad del método para elución por RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.....	90
3.7.3	Selectividad del método para elución por RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.....	95
3.7.4	Precisión y exactitud método para elución por RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría. ....	96
3.7.5	Aplicación del método.....	97
	CONCLUSIONES.....	101
	BIBLIOGRAFÍA.....	104
	ANEXOS.....	109
6.1	Preparación de estándares y reactivos. ....	109
6.1.1	Analitos en estudio. ....	109
6.1.2	Ácido clorhídrico. ....	109
6.1.3	Hidróxido de sodio.....	109
6.1.4	Amortiguador McIlvaine-EDTA 0,3 M pH 4. ....	<a href="#">109110</a>
6.2	Estudio de fases sorbentes.....	110
6.2.1	Nylon.....	110
6.2.2	BIO-RAD AG® 2-X8. ....	113
6.2.3	Anion-SR poli-(estirenodivinilbenceno).....	<a href="#">114115</a>
1.1.1	SupelMIP® SPE-Fluoroquinolonas. ....	116
1.2	Fundamentos generales de las técnicas de Espectrofotometría UV-vis y Espectrofluorimetría.....	117
	APORTE CIENTÍFICO Y DIFUSIÓN.....	<a href="#">125126</a>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sustituyentes Fluoroquinolonas .....	24
Tabla 2. Sustituyentes de las tetraciclinas y sus respectivos pKa .....	26
Tabla 3. Máximos de absorbancia de los analitos. ....	<del>495</del> 1
Tabla 4. Longitudes de excitación seleccionadas. ....	<del>515</del> 2
Tabla 5. Parámetros analíticos de EFX, CFX y OTC en estándares medida directamente la fase.	
Tabla 6. Parámetros analíticos de EFX, CFX y OTC en muestra blanco medida directamente la fase.....	<del>767</del> 7
Tabla 7. Parámetros analíticos de EFX, CFX y OTC medida directamente la fase utilizando d-SPE. ....	<del>777</del> 8
Tabla 8. Límite de tolerancia de EFX, CFX y OTC frente a interferentes en muestra blanco. ...	<del>777</del> 9
Tabla 9. Precisión y exactitud de la medición directa de la fase Oasis HLB® con EFX por espectrofluorimetría. ....	<del>787</del> 9
Tabla 10. Precisión y exactitud de la medición directa de la fase Oasis HLB® con CFX por espectrofluorimetría. ....	<del>788</del> 0
Tabla 11. Precisión y exactitud de la medición directa de la fase Oasis HLB® con OTC por espectrofluorimetría. ....	<del>798</del> 0
Tabla 12. Porcentajes de recuperación de EFX, CFX y OTC en leche comercial. ....	<del>808</del> 1
Tabla 13. Parámetros analíticos de EFX, CFX estándares en elución RDSE. ....	<del>899</del> 0
Tabla 14. Parámetros analíticos de EFX, CFX en muestra blanco para elución RDSE. ....	<del>919</del> 2
Tabla 15. Parámetros analíticos de EFX, CFX en muestra blanco para elución RDSE. ....	<del>959</del> 6
Tabla 16. Límite de tolerancia de EFX, CFX y OTC frente a interferentes. ....	<del>959</del> 6
Tabla 17. Precisión y exactitud de la medición de la elución de EFX con fase Oasis HLB® por espectrofluorimetría. ....	<del>969</del> 7
Tabla 18. Precisión y exactitud de la medición de la elución de EFX con fase Oasis HLB® por espectrofluorimetría. ....	<del>979</del> 8
Tabla 19. Porcentajes de recuperación de EFX, CFX y OTC en leche comercial por elución RDSE. ....	<del>989</del> 9
Tabla 20. Puntaje eco-escala para los métodos RDSE propuestos.....	<del>991</del> 00
Tabla 21. Comparación del método propuesto RDSE con otras preparaciones de muestra. ..	<del>1004</del> 01
Tabla 22. Porcentajes de recuperación de a) OTC y b) EFX. Concentración 50 µg·L <sup>-1</sup> y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<del>1104</del> 11

Tabla 23. Extracción de EFX con acondicionamiento de la fase con solución ácida. ....[111412](#)

Tabla 24. Extracción de EFX con acondicionamiento de la fase con metanol. ....[112413](#)

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de productos empleados para medicina veterinaria.....	21
Figura 2. Estructura de las Fluoroquinolonas. ....	24
Figura 3. Distribución de microespecies en función del pH.....	25
Figura 4. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), izquierda EFX y derecha su metabolito CFX. ....	25
Figura 5. Estructura de las Tetraciclinas. ....	26
Figura 6. Distribución de microespecies en función del pH de OTC.....	<a href="#">27</a> <a href="#">26</a>
Figura 7. Constante de Distribución en función del pH de OTC. ....	27
Figura 8. Configuraciones RDSE, izquierda disco plano y derecha disco con cavidad. ....	29
Figura 9. Efecto de la velocidad de rotación. ....	30
Figura 10. Esquema del método propuesto por RDSE directo para la determinación de EFX, CFX y OTC. ....	<a href="#">38</a> <a href="#">39</a>
Figura 11. Esquema del método propuesto por elución de RDSE para la determinación de EFX, CFX y OTC. ....	<a href="#">44</a> <a href="#">45</a>
Figura 12. Esquema general de metodología para la extracción de Fluoroquinolonas y tetraciclinas. ....	<a href="#">48</a> <a href="#">49</a>
Figura 13. Espectros de absorción de a) fluoroquinolonas, b) tetraciclina. Concentración de los analitos $3,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en metanol. ....	<a href="#">49</a> <a href="#">50</a>
Figura 14. Espectros de emisión de los analitos a diferentes longitudes de onda de excitación a) CFX, b) EFX y c) OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $slit_{exc-em}$ 10-10 nm.....	<a href="#">50</a> <a href="#">52</a>
Figura 15. Recuperación de las fases sorbentes a pH 4 de extracción para EFX, CFX y OTC. ..	<a href="#">52</a> <a href="#">54</a>
Figura 16. Recuperación de las fases sorbentes a diferentes pH 10 de extracción para EFX, CFX y OTC.....	<a href="#">53</a> <a href="#">54</a>
Figura 17. Espectros de emisión de los analitos medidos directamente en fase $C_{18}$ a diferentes longitudes de onda de excitación a) 245 nm y b) 365 nm. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $slit_{exc-em}$ 10-10 nm. ....	<a href="#">54</a> <a href="#">56</a>
Figura 18. Espectros de emisión de los analitos medidos directamente en fase $C_{18}$ a una longitud de onda de excitación de 279 nm. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $slit_{exc-em}$ 10-10 nm. ....	<a href="#">55</a> <a href="#">56</a>

Figura 19 a) Espectros de emisión de EFX medido directamente en fase $C_{18}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. b) Regresión lineal de la curva de calibración.....	<a href="#">5657</a>
Figura 20. Espectros de emisión de EFX medido directamente en fase $C_{18}$ con diferentes volúmenes de metanol. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm.....	<a href="#">5658</a>
Figura 21. Espectros de emisión de los analitos medido directamente en la fase a diferentes longitudes de onda de excitación a) 240 nm, b) 279 nm, c) 365 nm y d) 380 nm. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">5859</a>
Figura 22. Espectros de emisión de la fase medida directamente, con diferentes acondicionamientos. slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">5960</a>
Figura 23. Esquema del método propuesto por RDSE para la determinación de EFX, CFX y OTC. ....	<a href="#">6061</a>
Figura 24. Espectros de emisión de representantes de los analitos $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ medida directamente la fase a diferentes pH a) EFX y b) OTC y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">6162</a>
Figura 25. Estructuras posibles a pH 4 de a) Oasis HLB, b) Oxitetraciclina y c) Enrofloxacino y d) Ciprofloxacino. ....	<a href="#">6263</a>
Figura 26. Efecto del tiempo de extracción para EFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">6364</a>
Figura 27. Efecto de la velocidad de rotación para EFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">6465</a>
Figura 28. Efecto del volumen de muestra para EFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">6566</a>
Figura 29. Efecto de la concentración de buffer para EFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">6667</a>
Figura 30. Efecto de la temperatura para EFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">6768</a>
Figura 31. Proceso de extracción de EFX, CFX y OTC.....	<a href="#">6869</a>
Figura 32. a) Espectros de emisión de EFX medida directamente la fase. b) Regresión lineal de la curva de calibración y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">6970</a>
Figura 33. a) Espectros de emisión de CFX medida directamente la fase. b) Regresión lineal de la curva de calibración y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">6970</a>
Figura 34. a) Espectros de emisión de OTC medida directamente la fase. b) Regresión lineal de la curva de calibración y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">7071</a>
Figura 35. Diferentes concentraciones de caseína tratadas con ácido tricloroacético. ....	<a href="#">7273</a>

Figura 36. Espectros de emisión de muestra blanco fortificada con EFX, con diferentes tratamientos de muestra. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">7374</a>
Figura 37. Esquema de tratamiento de muestra para EFX, CFX y OTC desde muestra blanco, según protocolo 2.6.2. ....	<a href="#">7375</a>
Figura 38. (a) Espectros de emisión de muestra blanco enriquecida con EFX medida directamente en fase b) Regresión lineal de la curva de calibración y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">7475</a>
Figura 39. (a) Espectros de emisión de muestra blanco enriquecida con CFX medida directamente en fase b) Regresión lineal de la curva de calibración y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">7576</a>
Figura 40. Espectros de emisión de muestra blanco enriquecida con OTC medida directamente en fase b) Regresión lineal de la curva de calibración y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">7576</a>
Figura 41. Porcentajes de recuperación de la elución de EFX, CFX y OTC con las fases sorbentes. ....	<a href="#">8182</a>
Figura 42. Solventes utilizados para la elución de EFX, CFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">8384</a>
Figura 43. Efecto del tiempo de elución para EFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">8485</a>
Figura 44. Efecto de la masa sorbente para EFX, CFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">8586</a>
Figura 45. Efecto del volumen de elución para EFX, CFX y OTC. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">8687</a>
Figura 46. Variables optimizadas para el proceso de elución de la fase Oasis HLB®. ....	<a href="#">8788</a>
Figura 47. a) Espectro de emisión clásico de elución de estándares con CFX en presencia de OTC. b) Regresión lineal de la curva de calibración y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">8889</a>
Figura 48. a) Espectro de emisión clásico de elución de estándares con EFX en presencia de OTC. b) Regresión lineal de la curva de calibración y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">8990</a>
Figura 49. Espectros de emisión clásico de elución en muestra blanco enriquecida con EFX y CFX en presencia de OTC. b) Regresión lineal de la curva de calibración EFX y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm y c) Regresión lineal de la curva de calibración CFX y slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">91</a>
Figura 50. Espectros de emisión de elución de a) primer orden b) segundo orden de derivada en muestra blanco enriquecida con EFX y CFX en presencia de OTC. ....	<a href="#">9394</a>
Figura 51. Espectro de primera derivada para EFX, CFX y OTC en metanol a diferentes concentraciones de analito. ....	<a href="#">9495</a>
Figura 15. Espectros de emisión de EFX y OTC medido directamente en fase nylon con su respectivo blanco. slit <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">113144</a>

Figura 52. Espectro de emisión de OTC medidos directamente en fase BIO-RAD AG® 2-X8. a) a diferentes longitudes de onda de excitación y b) OTC extraída con BIO-RAD AG® 2-X8. Concentraciones $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y <i>slit</i> <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">114415</a>
Figura 53. Espectros de emisión de los analitos medidos directamente en fase aniónica a diferentes longitudes de onda de excitación a) OTC, b) FLU, c) EFX y d) CIN. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 10 y <i>slit</i> <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">115447</a>
Figura 22. Espectros de emisión de los analitos medido directamente en la fase a diferentes longitudes de onda de excitación a) 245 nm, b) 250 nm, c) 279 nm y d) 365 nm. Concentración $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ y <i>slit</i> <sub>exc-em</sub> 10-10 nm. ....	<a href="#">117448</a>
Figura 10: a) Representación gráfica de un espectro clásico D0 y de espectros derivados de primer a cuarto orden, Dn (n=1, 2 ,3 ,4). b) espectro clásico y derivados de una mezcla de analitos. ....	<a href="#">122424</a>
Figura 11. Métodos de “zero-crossing”.....	<a href="#">123425</a>

## LISTA DE ABREVIACIONES

<b>EPX</b>	Enrofloxacino	<b>TCA</b>	<i>Trichloroacetic acid</i>
<b>CPX</b>	Ciprofloxacino		
<b>OTC</b>	Oxitetraciclina		
<b>DER</b>	Desviación estándar relativa		
<b>IF</b>	Intensidad de Fluorescencia		
<b>LC</b>	Límite de cuantificación		
<b>LD</b>	Límite de detección		
<b>S</b>	Sensibilidad		
<b>LMR</b>	Límite máximo residual		
<b>SBSE</b>	<i>Stir bar sorptive extraction</i>		
<b>SPME</b>	<i>Solid phase microextraction</i>		
<b>RDSE</b>	<i>Rotating disk sorptive extraction</i>		
<b>SPE</b>	<i>Solid phase extraction</i>		

**d-SPE**                      *Solid phase extraction dispersive*

**HLB®**                      *Hidrofilic lipofilic balanced*

## **RESUMEN.**

En primera instancia, se estudió la conducta espectral de cada uno de los analitos pertenecientes a las familias involucrados en la investigación. Para seleccionar la longitud de excitación de los analitos en estudio se realizó un barrido en UV- visible con la finalidad de obtener los máximos de cada uno. Se utilizan los máximos obtenidos con anterioridad para realizar el estudio de la conducta espectral de los analitos por espectrofluorimetría.

La longitud de onda de excitación para la determinación de los analitos midiendo la fase directa del sistema RDSE se seleccionó teniendo en consideración las longitudes de onda de excitación de los analitos y la señal intrínseca de cada una de las fases. Además, teniendo presente una diferencia con la banda de excitación, con mayor resolución a la banda de emisión de los analitos y mayor intensidad de fluorescencia, para favorecer sensibilidad al método. Se seleccionó la fase Oasis ®HLB, la que entregó un porcentaje de recuperación aceptable, mayor al 50%. Además de que presenta una banda definida y apta para cuantificar los analitos.

Se realizaron estudios de las variables químicas e hidrodinámicas para los analitos representantes de las familias de las fluoroquinolonas y tetraciclinas, EFX y OTC, respectivamente. Estos resultados entregaron condiciones óptimas de trabajo: pH 4, tiempo de extracción de 120 min y una velocidad de rotación de  $2.200 \pm 20$  rpm. Las variables espectrales óptimas seleccionadas fueron; longitud de onda de excitación de 380 nm y slit exc-em de 10-10 nm.

En la extracción de EFX, CFX y OTC, se utilizó buffer McIlvaine–EDTA 0,3M pH 4 con el objetivo de mantener el pH de trabajo óptimo, además de contrarrestar alguna posible interferencia de parte del calcio presente en la muestra de leche. Se realizó una curva de calibración obteniendo una correlación entre las concentraciones y la intensidad de fluorescencia, además de sus parámetros analíticos que se presentan en la Tabla 8.

La validación del método propuesto se realizó en muestras blanco con las variables químicas e hidrodinámicas optimizadas. Además del tratamiento a la muestra con 5 mL de ácido tricloroacético y centrifugación por 30 minutos. Se realizaron las curvas de calibración en muestra blanco fortificado con los analitos, lo que se muestra en la Tabla 9.

Al comparar las curvas de calibración y parámetros analíticos con las del sistema, no existe algún corrimiento o cambio de forma de la señal analítica. Además, cabe destacar que los máximos de cuantificación se mantuvieron en los analitos atribuyéndolo a que cualquier interferencia fue eliminada. Tanto el calcio que fue tratado con EDTA del Buffer Mc Ilvaine-EDTA y caseína con el tratamiento de muestra con ácido tricloroacético y centrifugación.

Se realizó la comparación con otra preparación de muestra, se utilizó el sistema de d-SPE donde la gran diferencia es no la utilización del dispositivo RDSE. Es decir, la fase queda depositada en el mismo vial pero no contenida en el dispositivo RDSE. Al comparar los resultados obtenidos de ambas preparaciones de muestra los límites obtenidos son del mismo orden no siendo alterados (Tabla 10), aunque el porcentaje de recuperación se ve favorecido en 10 % atribuido a una mayor recirculación de la muestra. Pese al aumento que existe en el porcentaje de recuperación se privilegia el dispositivo RDSE frente a la d-SPE por el manejo de la fase el que es crucial en la preparación de muestra previo a la medición instrumental. Además de que los límites obtenidos están dentro de métodos reportados [22].

Para validar el método propuesto, se evaluó la cuantificación posterior a la extracción de los analitos en muestra blanco para tres niveles de concentración conocidos en un grupo de muestras para analizar durante un día y durante días consecutivos con los respectivos blancos de acuerdo al procedimiento 2.6.3. Se evaluó el grado de dispersión mediante la desviación estándar relativa y la exactitud mediante el porcentaje de recuperación, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 13,14 y 15; en los cuales se encontró que el método propuesto presenta buena precisión, con una DER<5% y porcentajes de recuperación entre 98,3% y 101,1% para la cuantificación de los analitos utilizando el método RDSE directo, con las condiciones optimizadas.

El método propuesto se aplicó en muestra de supermercado. Las concentraciones determinadas sobre la base de la adición estándar de los analitos en estudio se presentan en la Tabla 16. Las muestras fueron enriquecidas con el nivel medio de concentración correspondiente a 30  $\mu\text{gL}^{-1}$ .

De acuerdo a las recuperaciones obtenidas y presentadas en la Tabla 16 no se encuentra presencia de analitos en el lote de leches analizadas.

Por último, como una estrategia alternativa de determinación de los analitos se realizó la elución del dispositivo RDSE. Para llevar a cabo este procedimiento se optimizaron las variables involucradas, siendo óptimo el uso de 12,5 mL de metanol como solvente de elución por 15 minutos. Con las variables optimizadas se procedió a realizar las curvas de calibración para validar el protocolo y se logra determinar simultáneamente EFX y CFX en presencia de OTC derivando los espectros clásicos a segunda derivada privilegiando señal/ruido debido a que existe una diferencia mayor a 3 nm en su longitud de onda de emisión, además que oxitetraciclina no emite a la longitud de onda de excitación de 279 nm, como se muestra en las Figuras 49. Los parámetros analíticos se presentan en la tabla 17.

De los resultados obtenidos, espectralmente se observó una dependencia lineal entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de EFX y CFX, tendencia reflejada en el valor de  $R^2$  y R. Además, al comparar los valores LD y LC obtenidos (Tabla 17) con los de otros métodos reportados en literatura mediante extracción en fase sólida magnética y electroforesis capilar se encuentran entre 4 y 6 veces menores [37]. Con base a las observaciones y resultados anteriores, es posible indicar que los métodos desarrollados basados en la medición directa como en la elución del analito, son metodologías sensibles, de fácil desarrollo y simples; además con los valores obtenidos permitiría la determinación de EFX y CFX en muestras de leche.

### **ABSTRACT.**

In the first instance, the spectral behavior of each of the analytes belonging to the families involved in the research was studied. To select the excitation length of the analytes under study, a UV-visible scan was carried out in order to obtain the maximums of each one. The maxima obtained previously are used to study the spectral behavior of the analytes by spectrofluorimetry.

The excitation wavelength for the determination of the analytes by measuring the direct phase of the RDSE system was selected taking into consideration the excitation wavelengths of the analytes and the intrinsic signal of each of the phases. In addition, keeping in mind a difference with the excitation band, with greater resolution to the emission band of the analytes and greater fluorescence intensity, to favor sensitivity to the method. The Oasis ®HLB phase was selected, which delivered an acceptable recovery percentage, greater than 50%. In addition, it presents a defined and suitable band to quantify the analytes.

Studies of chemical and hydrodynamic variables were carried out for analytes representing the families of fluoroquinolones and tetracyclines, EFX and OTC, respectively. These results gave optimal working conditions: pH 4, extraction time of 120 min and a rotation speed of  $2,200 \pm 20$  rpm. The optimal spectral variables selected were; excitation wavelength of 380 nm and exc-em slit of 10-10 nm.

In the extraction of EFX, CFX and OTC, McIlvaine-EDTA 0.3M pH 4 buffer was used in order to maintain the optimum working pH, in addition to counteracting any possible interference from the calcium present in the milk sample. A calibration curve was made obtaining a correlation between the concentrations and the fluorescence intensity, in addition to its analytical parameters that are presented in Table 8.

The validation of the proposed method was carried out on blank samples with the chemical and hydrodynamic variables optimized. In addition to treating the sample with 5 mL of trichloroacetic acid and centrifugation for 30 minutes. The calibration curves were performed on a blank sample fortified with the analytes, which is shown in Table 9.

When comparing the calibration curves and analytical parameters with those of the system, there is no drift or change of shape of the analytical signal. In addition, it should be noted that the

maximum quantification was maintained in the analytes, attributing it to the fact that any interference was eliminated. Both calcium that was treated with EDTA from the Mc Ilvaine-EDTA Buffer and casein with the sample treatment with trichloroacetic acid and centrifugation.

The comparison was made with another sample preparation, the d-SPE system was used where the great difference is not the use of the RDSE device. That is, the phase remains deposited in the same vial but not contained in the RDSE device. When comparing the results obtained from both sample preparations, the limits obtained are of the same order and are not altered (Table 10), although the recovery percentage is favored by 10% attributed to a greater recirculation of the sample. Despite the increase in the recovery percentage, the RDSE device is favored over the d-SPE for the management of the phase, which is crucial in the preparation of the sample prior to the instrumental measurement. In addition, the limits obtained are within reported methods [22].

To validate the proposed method, the post-extraction quantification of the analytes in a blank sample was evaluated for three known concentration levels in a group of samples to be analyzed for one day and for consecutive days with the respective blanks according to procedure 2.6. 3. The degree of dispersion was evaluated by the relative standard deviation and the accuracy by the recovery percentage, the results obtained are summarized in Table 13, 14 and 15; in which it was found that the proposed method presents good precision, with a DER <5% and recovery percentages between 98.3% and 101.1% for the quantification of analytes using the direct RDSE method, with optimized conditions.

The proposed method was applied to a supermarket sample. The concentrations determined on the basis of the standard addition of the analytes under study are presented in Table 16. The samples were spiked with the mean concentration level corresponding to 30 µg/L-1.

According to the recoveries obtained and presented in Table 16, no analytes are present in the batch of milk analyzed.

Finally, as an alternative strategy to determine the analytes, the RDSE device elution was performed. To carry out this procedure, the variables involved were optimized, being optimal the use of 12.5 mL of methanol as elution solvent for 15 minutes. With the optimized variables, the calibration curves were carried out to validate the protocol and it was possible to simultaneously determine EFX and CFX in the presence of OTC, deriving the classic spectra to second derivative favoring signal / noise because there is a difference greater than 3 nm in its emission wavelength, in addition to the fact that oxytetracycline does not emit at the excitation wavelength of 279 nm, as shown in Figures 49. The analytical parameters are presented in table 17.

From the results obtained, a linear dependence was observed spectrally between the fluorescence intensity and the concentration of EFX and CFX, a trend reflected in the value of R<sup>2</sup> and R. In addition, when comparing the LD and LC values obtained (Table 17) with the of other methods reported in the literature using magnetic solid phase extraction and capillary electrophoresis are between 4 and 6 times lower [37]. Based on the previous observations and results, it is possible to indicate that the methods developed based on direct measurement and elution of the analyte are sensitive, easy to develop and simple methodologies; Furthermore, with the values obtained, it would allow the determination of EFX and CFX in milk samples.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes Generales.

Los medicamentos veterinarios son ampliamente utilizados para el tratamiento y prevención de enfermedades en ganado, gallinas, porcinos, conejos, peces, entre otros. Tal como se muestra en la Figura 1, una síntesis de los productos más utilizados en el área de estudio, donde antibióticos (49%), antiparasitarios (21%) y hormonas (15%) corresponden al 85% de los fármacos aplicados[1].

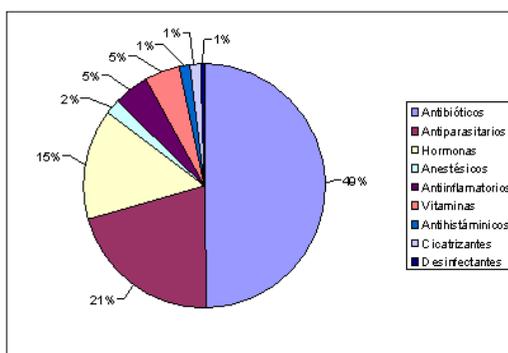


Figura 1. Tipos de productos empleados para medicina veterinaria.

Los agentes antibacterianos como las penicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas, quinolonas y macrólidos son utilizados en la práctica veterinaria. Sin embargo, las quinolonas (QNs) constituyen uno de los principales grupos de antibióticos sintéticos que se utilizan para tratar enfermedades humanas y veterinarias, incluyendo infecciones urinarias, de las vías respiratorias y gastrointestinales[2], éstas también son muy útiles en la prevención de enfermedades en animales[3]. La amplia gama de aplicaciones y el uso extensivo de QNs en medicina veterinaria representan un peligro potencial para la salud humana y una preocupación sobre la posibilidad de la exposición a

bajos niveles de estos compuestos al permanecer residuos en los productos alimenticios, causando reacciones alérgicas o de resistencia a los antibióticos en los seres humanos[4, 5]. Por otro lado, la mayoría de las tetraciclinas (TCs) son poco absorbidas y son excretadas en las heces y la orina en su forma original y / o metabolitos primarios, por lo tanto, logran entrar en el medio ambiente a través del estiércol o agua subterránea. Debido a la aplicación de los excrementos de animales como fertilizante, aumentará en gran medida la disposición de las tetraciclinas en el medio ecológico como medio acuático [6-7].

La excreción urinaria o fecal introduce productos farmacéuticos en las aguas residuales que llegan a las plantas de tratamiento. Estos fármacos son removidos parcialmente, antes que el agua tratada llegue a los acuíferos. Según las propiedades fisicoquímicas de los fármacos, sus metabolitos, productos de degradación y las características de los suelos, pueden llegar a alcanzar las aguas subterráneas y contaminar los acuíferos o bien quedar retenidos en el suelo y acumularse pudiendo afectar al ecosistema y a los humanos a través de la cadena trófica. Es por esto, que se pueden considerar algunas características para identificar la problemática asociada, como lo son la persistencia y resistencia asociada al antibiótico. En base a lo anteriormente señalado, es de interés el estudio de quinolonas y tetraciclinas por su extensa vida media (100 días)[8].

Existen instituciones encargadas de regularizar y establecer los límites máximos residuales (LMR), dentro de las que destacan la Unión Europea en conjunto con el Comité de Medicamentos de Uso Veterinario (CVMP) la que establece los límites máximos residuales (LMR)[9] exigiendo por ley que los alimentos obtenidos a partir de animales tratados con medicamentos veterinarios o expuestos como la carne, la leche o los huevos entre otros, no deben contener ningún residuo que pueda representar un peligro para la salud del consumidor. Los LMR se muestran en el anexo I del Reglamento 37/2010 de la Comisión[10].

Complementariamente, Codex Alimentarius establece normas internacionales de los alimentos respecto de los LMR para medicamentos de uso veterinarios para garantizar alimentos inocuos y de calidad para el consumo humano. Los límites máximos residuales para los analitos en estudio en matriz de leche corresponden a  $100 \mu\text{gL}^{-1}$ . [11]

Por la problemática señalada anteriormente, se necesitan métodos analíticos que sean capaces de detectar y determinar estos antibióticos. Por lo tanto, en esta tesis doctoral, se desarrollará un método utilizando diferentes estrategias en la preparación de muestra para la determinación de EFX y su metabolito CFX en presencia de OTC por espectrofluorimetría en una matriz como leche [12,13] que ha ido incrementando su consumo en países desarrollados y necesita de métodos para su determinación y cuantificación para mantener controlados los LMR.

## **1.2. Quinolonas, fluoroquinolonas y tetraciclinas.**

### **1.2.1 Quinolonas y fluoroquinolonas.**

En función de su espectro antibacteriano, la potencia y la farmacología se clasifican en cuatro generaciones. La primera incluye a las denominadas quinolonas clásicas como la cinoxacina y flumequina[14]. La segunda y tercera generación incluyen las fluoroquinolonas, que contienen un átomo de flúor en la posición C-6 y un grupo piperazinilo en la posición C-7 las que le otorga mejor actividad antimicrobiana, como flúor aumenta la actividad frente a patógenos Gram-positivos, mientras que el resto piperazinilo mejora la eficacia frente a microorganismos Gram-negativos[15]. Por último, la cuarta generación corresponde a fluoroquinolonas que fueron sintetizadas para aumentar el espectro antibacteriano contra los anaerobios, preservando a su vez el espectro de las quinolonas de tercera generación.

Si bien las quinolonas en las concentraciones utilizadas son pocas tóxicas para animales, pero para humanos se han relacionado con algunos efectos colaterales como desorientación, alteración

motora y convulsiones sobre todo por ciprofloxacino en residuos [16]. A continuación, se describen las quinolonas pertenecientes al grupo de Fluoroquinolonas. Es el caso de enrofloxacin (EFX), ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(4-etilpiperazin-1-il)-1,4-dihidroquinolin-3-carboxílico y su metabolito ciprofloxacino (CFX), ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-quinolin-3-carboxílico, cabe destacar que CFX posee una actividad antimicrobiana más potente que EFX.

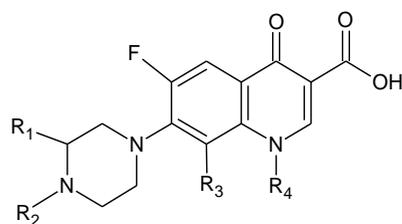


Figura 2. Estructura de las Fluoroquinolonas.

Tabla 1. Sustituyentes Fluoroquinolonas.

Fluoroquinolonas	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	pKa	Log P[17]
Enrofloxacin (EFX)	H		H		6,27 – 8,3[10]	1,15
Ciprofloxacino (CFX)	H	H	H		5,9 – 8,89[10]	-0,81

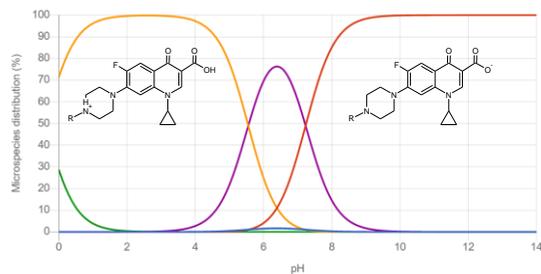


Figura 3. Distribución de microespecies en función del pH.

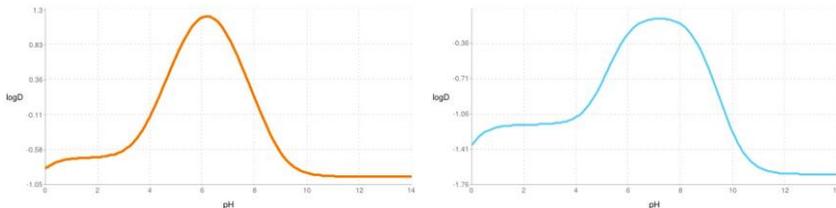


Figura 4. Constante de Distribución (LogD) en función del pH y Constante de Reparto (LogP), izquierda EFX y derecha su metabolito CFX.

### 1.2.2 Tetraciclinas.

Las tetraciclinas se suelen añadir a los alimentos de animales para la prevención y tratamiento de enfermedades como también, para promover el crecimiento. Dentro de las más utilizadas se incluyen oxitetraciclina (OTC), tetraciclina (TC), la clortetraciclina (CTC) y doxiciclina (DC)[18] con una estructura general como se observa en la Figura 5 y cada uno de los sustituyentes en la Tabla 2. Son un grupo de fármacos con estructura química básica, actividad antimicrobiana y propiedades

farmacológicas comunes. A pesar de que pueden establecerse diferencias específicas (origen, estructura química) sus características generales, como mecanismo de acción, espectro, y otras, permite describirlas como un solo grupo. Su mecanismo de acción es inhibir la síntesis de las proteínas bacterianas por fijarse a la subunidad 30s del ribosoma. En general, las tetraciclinas son agentes quelantes y su actividad antibacteriana y sus propiedades farmacocinéticas están influenciadas por la quelación de iones metálicos. El sitio de quelación incluye el sistema  $\beta$ -dicetona (posición 11 y 12), y los grupos enol (posición 1 y 3) y carboxamida (posición 2) del anillo.

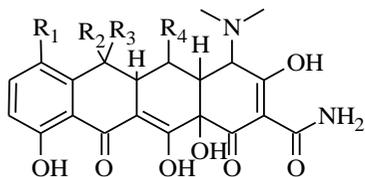
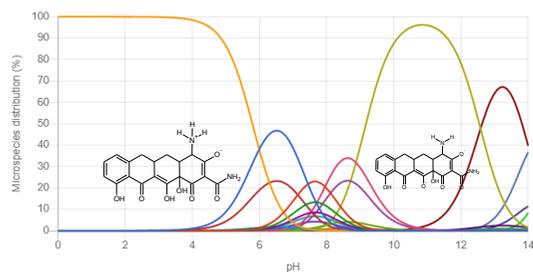


Figura 5. Estructura de las Tetraciclinas.

Tabla 2. Sustituyentes de las tetraciclinas y sus respectivos pKa.

Tetraciclina (TCs)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	pKa <sub>1</sub>	pKa <sub>2</sub>	pKa <sub>3</sub>	Log P
Oxitetraciclina (OTC)	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH	3,27	7,32	9,11[10]	-4,50[19]



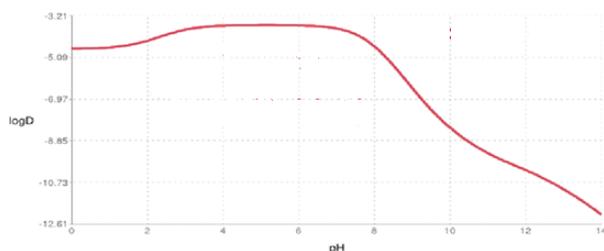


Figura 7.

Constante de Distribución en función del pH de OTC.

Figura 6. Distribución de microespecies en función del pH de OTC.

### 1.3. Preparación de muestra.

El uso extensivo de la Química Analítica en diversas áreas con el fin ya sea de asegurar la calidad o simplemente realizar monitoreos de algún producto en interés compromete que el proceso analítico entregue resultados que cumplan con una serie de parámetros de calidad. Este proceso por el cual podemos determinar y/o cuantificar la presencia de un analito en la muestra conlleva una serie de etapas que dependen tanto de la naturaleza química como de la matriz que se está trabajando. Es por esto que es de suma importancia la etapa de preparación de muestra, la que permite simplificar la matriz, ya que no es posible realizar una medición directa de la muestra pese al desarrollo tecnológico.

Las fluoroquinolonas y tetraciclinas son compuestos orgánicos presentes en diferentes matrices por lo que es necesario aplicar metodologías de preparación de muestra que permitan romper las interacciones analito-matriz, disminuir tanto el número de pasos en el proceso de extracción como el uso de solventes orgánicos para mejorar dicho proceso. Existen distintos métodos de extracción reportados, donde se destacan la extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE),

Extracción en fase sólida dispersiva (d-SPE), microextracción en fase sólida (SPME), extracción por sorción en barra de agitación (SBSE) y extracción por disco rotatorio (RDSE)[20]. Se destacan dentro de las más recientes, SPME que consiste en un filamento de sílice fundida recubierta con una fibra de fase sorbente (generalmente PDMS), donde la fibra debe contactarse con la muestra acuosa o en fase gaseosa. Por su parte, SBSE consiste en una barra magnética dentro de una cápsula de vidrio recubierta con una fase sorbente (generalmente PDMS), en este caso, mediante la rotación del dispositivo se produce una agitación durante el proceso de extracción, disminuyendo el grosor de la capa estática de agua, lo que agiliza el transporte de masa, reduciendo los tiempos de extracción. En cambio, SPE consiste en un cartucho donde la fase sorbente se encuentra entre dos fritas de polietileno, la muestra líquida ingresa al cartucho por el reservorio y pasa a través del sorbente por acción de una cámara de vacío, controlando el flujo con una válvula manual [21]. Una modificación de SPE es d-SPE, basado en la adición de un sorbente directamente en la solución seguida de dispersión favoreciendo el contacto entre el sorbente y los analitos [22]. El método de extracción RDSE muestra ciertas ventajas frente a los métodos antes expuestos como el de mantener una mayor razón área/volumen y una mayor capacidad de carga de fase sorbente que la soportada en SBSE. De la misma forma, RDSE posee ventajas significativas sobre SPE, destacando la recirculación de la muestra que permite una continua renovación de la interfase durante el proceso de extracción, de modo que no requiere etapas exhaustivas de limpieza en muestras complejas, como si lo requiere SPE, debido a que la extracción se realiza mediante un régimen de paso unidireccional, lo que provoca la obstrucción del filtro superior del cartucho, siendo esta la mayor dificultad para la utilización de SPE. Otra ventaja de RDSE sobre SPE es que requiere una menor supervisión durante el proceso de extracción ya que el proceso con RDSE ocurre a una velocidad de rotación constante, que no requiere intervención humana. Las ventajas señaladas para el sistema RDSE lo convierten en una técnica adecuada para su utilización en muestras complejas, como lo son las matrices de origen animal, permitiendo reducir los

tiempos de análisis, disminuir las etapas preparativas, reducir el volumen de disolventes orgánicos asociados al pretratamiento, disminuir la intervención humana y simplificar el procesamiento de las muestras.

En el caso de RDSE para extraer por sorción el analito se puede realizar mediante dos configuraciones. La primera, la fase sorbente es un polímero adherido a una de las caras del disco de teflón y la segunda en un disco con cavidad, en la cual se masa una cantidad de fase sorbente se agrega un filtro de fibra de vidrio y por último se sella con un anillo de teflón, como se ve en la Figura 8.



Figura 8. Configuraciones RDSE, izquierda disco plano y derecha disco con cavidad.

La segunda configuración del disco permite medir la fase sorbente directamente por espectrofluorimetría favoreciendo la sensibilidad del método y eliminando el uso de solventes. Además, de dar la posibilidad de una etapa de elución.

La sorción ocurrirá dependiendo de la afinidad química, desde una solución en la que se encuentre el analito. Se puede esperar que la extracción utilizando el disco rotatorio ofrezca mayores recuperaciones debido a su alta relación de área/volumen, esto en comparación con otros sistemas de extracción en fase sólida como extracción por sorción en barra de agitación (SBSE) y la extracción en fase sólida (SPE)[23, 24]. Permite utilizar una mayor velocidad de agitación ya que sólo está en contacto con la muestra y no con el fondo del vial pudiendo obtener una mayor extracción. A mayor velocidad de agitación (flujo turbulento), el espesor de la capa estacionaria disminuye, lo que facilita el transporte de masas desde el seno de la solución a la fase de extracción y, por consiguiente, el incremento de la velocidad de rotación del disco, aumenta significativamente

la cantidad de analito extraído a un menor tiempo (Figura 9). Uno de los limitantes importantes en la extracción es que se produce una capa estática de espesor definido, llamada capa estática de agua, la cual debe ser atravesada por el analito solo por difusión, siendo esta etapa la determinante para la velocidad de extracción y para alcanzar el tiempo de equilibrio. La rotación del disco produce la agitación de la muestra, produciendo la convección forzada que reduce el grosor de la capa estática o límite entre el fluido y el sólido. Así el transporte de masa se ve agilizado, disminuyendo los tiempos para alcanzar extracciones cuantitativas.



Figura 9. Efecto de la velocidad de rotación.

La transferencia de masa se puede describir con la siguiente expresión:

$$\frac{dn}{dt} = \left( \frac{D_s A}{\delta} \right) C_s \quad \text{Ecuación 1}$$

$$t_e = \frac{3 \times \delta \times K d \times P t}{D} \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $\delta$  es el espesor de la capa estacionaria; D es el coeficiente de difusión de la solución;  $t_e$ , el tiempo de equilibrio; Kd el coeficiente de distribución del analito entre la fase de PDMS y la solución de la muestra, Pt es el espesor de la fase de PDMS, n es el número de moles y A es el área de la fase.

Cabe destacar la importancia de otros parámetros fisicoquímicas como es el pH al momento de la extracción, por lo que en línea general se debe mantener una diferencia de dos unidades con respecto al pKa para asegurar la presencia de una especie y proporcionar el medio adecuado para la extracción. De igual forma, el coeficiente de partición (Log P) es un parámetro fisicoquímico que permite determinar de modo cuantitativo el grado de hidrofobicidad en base a la relación de solubilidad del analito entre octanol y agua. Con esto es posible establecer la afinidad del analito con las distintas fases sorbentes sin olvidar el coeficiente de distribución que permite establecer la relación del Log P con las formas del compuesto (ionizadas y no ionizadas) en cada una de las dos fases.

El propósito es lograr una extracción eficiente, ocupando la mínima cantidad de solvente en la etapa de preconcentración con RDSE con diferentes fases sorbentes, la retención de la fase depende de la afinidad que tenga con los analitos y la matriz; las fases serán medidas directamente por espectrofluorimetría con el fin de aumentar la sensibilidad del método. Así también, se realizará la elución por RDSE como una estrategia alternativa de determinación.

#### **1.4. Fases Sorbentes.**

La técnica RDSE es versátil con respecto a las distintas fases sorbentes que se pueden utilizar en el disco. Este dispositivo se puede adaptar a diferentes materiales sorbentes [25]. A continuación, se describen las fases propuestas.

❖ Anion-SR, copolímero de poli-(estirenodivinilbenceno) que ha sido modificado con grupos de amonio cuaternario. Anion-SR no está unido a sílice, sino que es una partícula copolimérica al 100% que es esférica, porosa y reticulada. El grupo funcional imparte una selectividad única para analitos aniónicos.

❖ BIO-RAD AG® 2-X8, resina de intercambio aniónico de grado analítico, polímero de estireno con un grupo amonio cuaternario, reticulación al 8%, tamaño de malla seco 20-50, tamaño de grano húmedo de 300-1,180 µm. Presenta una estabilidad térmica a 150 °C.

❖ Nylon, es una membrana hidrófila naturalmente, compatible con disolventes acuosos y orgánicos. Es mecánicamente resistente y también es térmicamente estable hasta 50°C. Presenta grupos amida.

❖ Oasis® HLB, consiste en un soporte orgánico que presenta cadenas hidrocarbonadas y anillos bencénicos que le otorgan un balance hidrofílico-lipofílico, para todos los compuestos. Por sus características ha sido utilizado ampliamente en extracción en fase sólida.

❖ Octadecil C18, es un adsorbente que ha sido utilizado ampliamente, para extraer analitos de baja polaridad en matrices líquidas complejas, utilizando dispositivos de tipo cartucho y filtros. Esta fase está estructurada por una superficie de sílice a la que se une un grupo octadecilo (C18), proporcionando interacciones apolares, para la extracción por adsorción de los analitos de baja polaridad.

❖ SupelMIP® SPE-Fluoroquinolonas, polímero molecularmente impreso que ofrece selectividad hecha a medida para la extracción de analitos trazas en matrices complejas. Su limpieza superior y selectividad proporcionan métodos rápidos y más simples de preparación de muestras que permiten a los analistas a alcanzar límites de detección más bajos y una mejor sensibilidad.

## **1.5. Hipótesis.**

Las propiedades fisicoquímicas de quinolonas y tetraciclinas permitirán obtener estructuras que por su afinidad química con la fase sólida darían origen al fenómeno de sorción que será la base para una extracción y la posterior cuantificación directa y/o indirecta por espectrofluorimetría.

### **1.6. Objetivo General.**

Desarrollar un método analítico de extracción y preconcentración para la determinación de quinolonas y tetraciclinas por espectrofluorimetría en leche mediante RDSE.

### **1.7. Objetivos Específicos.**

- ❖ Evaluar la afinidad de los analitos con las diferentes fases para RDSE, para una vez seleccionada la fase compararlo con d-SPE o SPE discos.
- ❖ Optimizar las variables hidrodinámicas y químicas que influyen en la extracción de EFX y OTC, con la fase seleccionada.
- ❖ Validar el método de extracción en matrices blancos fortificadas con concentración conocida de los antibióticos.
- ❖ Determinar los parámetros de calidad analítica y condiciones instrumentales óptimas.
- ❖ Aplicar el método validado en muestras reales.

## **PARTE EXPERIMENTAL**

### **2.1. Reactivos.**

- ❖ Acetato de etilo 99,8%, Merck.
- ❖ Ácido cítrico 99,5%, Merck.
- ❖ Ácido Clorhídrico 37%, Merck.

- ❖ Ácido tricloroacético ≥ 99,5%, Merck.
- ❖ Agua destilada, 0,01 µS/cm.
- ❖ Anion- SR poli-(estirenodivinilbenceno), SUPELCO.
- ❖ BIO-RAD AG® 2-X8, 300-1180 µm, 3,2 meq/g, BIO RAD Laboratories.
- ❖ Cinoxacino ≥ 99%, Sigma-Aldrich.
- ❖ Ciprofloxacino 99,0%, Sigma-Aldrich.
- ❖ Columnas Oasis® HLB 30 µm 6 cc/200 mg, Waters.
- ❖ Diclorometano ≥ 99,8%, Merck.
- ❖ Difloxacino hidrocloreuro 98,3%, Sigma-Aldrich.
- ❖ Disodio hidrogenofosfato dihidrato ≥ 99,5%, Merck.
- ❖ Doxiciclina hclato 99,1%, Sigma-Aldrich.
- ❖ Enrofloxacino 99,8%, Sigma-Aldrich.
- ❖ Flumequina ≥ 98%, Sigma-Aldrich.
- ❖ Hexano ≥ 98%, Merck.
- ❖ Hidróxido de sodio 99%, Merck.
- ❖ Membrana de nylon 0,20 µm, Merck.
- ❖ Metanol 99,9%, Merck.
- ❖ Octadecil endcapped bonded silica, SELECTRASORB™.
- ❖ Octadecil unendcapped bonded silica, SELECTRASORB™.
- ❖ Oxitetraciclina hidrocloreuro ≥ 95%, Sigma-Aldrich.
- ❖ Sarafloxacino hidrocloreuro hclato 97,2%, Sigma-Aldrich.
- ❖ SupelMIP® SPE-Fluoroquinolonas 25 mg/3 mL, SUPELCO.
- ❖ Titriplex III (ácido etilendinitrilotetraacético, sal disódica, dihidrato) 99%, Merck.

## **2.2. Materiales.**

- ❖ Celdas de cuarzo 1 cm de paso óptico.
- ❖ Celdas de cuarzo 18-F de 2 mm de paso óptico.
- ❖ Discos rotatorios, creación propia.
- ❖ Cinta de doble contacto, 3M.
- ❖ Matraces de aforo ámbar clase A (5-10-25-250 mL), ISOLAB.
- ❖ Embudos analíticos, DURAN®.
- ❖ Micropipetas (10 - 100 uL, 100 - 1000 uL, 0,5-5 mL, 1-10 mL), Brand®.
- ❖ Papel filtro fibra de vidrio N° 161 de 66x8 cm, Rilab®.
- ❖ Papel filtro de 90 mm, ADVANTEC.
- ❖ Viales de vidrios ámbar con cuello de rosca EPA de 20 mL y 40 mL.

## **2.3. Equipos, Instrumentos y *Softwares*.**

- ❖ Agitadores magnéticos con calefacción, Stuart CB-162.
- ❖ Balanza Analítica Sartorius modelo R200D, sensibilidad  $\pm 0,01$  mg.
- ❖ Baño ultrasonido, Branson 2210.
- ❖ Campana de extracción de gases.
- ❖ Centrífuga Eppendorf 5430, Merck.
- ❖ Espectrofotómetro de fluorescencia Hitachi F-2700.
- ❖ Espectrofotómetro UV-Visible Shimadzu, UV-1603.
- ❖ Estufa de secado con control de temperatura, Memmert.
- ❖ pH-metro, Hanna HI 111, precisión de 0,01 pH.
- ❖ Placas calefactoras y agitadoras Stuart CB-162.
- ❖ Purificador de agua por osmosis inversa, Vigaflow.

- ❖ Sacabocados emparejables, BOEHM®.
- ❖ Sonicador Branson 2210.
- ❖ Vortex Mixer KMC-1300V.

## **2.4. Procedimientos experimentales.**

### **2.4.1. Preparación de soluciones.**

Las soluciones estándares preparadas se realizaron utilizando reactivos analíticos, que en conjunto con los procedimientos logran asegurar la calidad de las preparaciones, el detalle de la preparación se adjunta en el Anexo II.

### **2.4.2. Conducta espectral de los analitos por espectrofotometría UV-visible y espectrofluorimetría.**

La solución estándar de  $3,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de EFX, CFX y OTC se midió por espectrofotometría contra blanco. Lo mismo se realizó por espectrofluorimetría, a partir de cada solución estándar de  $3,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  se preparó una solución en metanol de  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### **2.4.3. Acondicionamiento de las fases sorbentes.**

#### **2.4.3.1 Nylon.**

La membrana adherida al disco con cinta de doble contacto se agitó de manera individual con 10 mL de metanol, luego con 10 mL de una solución de  $\text{HCl } 1 \times 10^{-2} \text{ M}$  a  $2.200 \pm 20 \text{ rpm}$  por 5 min.

#### **2.4.3.2 BIO-RAD AG® 2-X8.**

Se masó 50 mg de resina en el dispositivo RDSE y se agitó con 10 mL de metanol a  $2.200 \pm 20 \text{ rpm}$  por 5 min.

#### **2.4.3.3 Anion-SR poli-(estirenodivinilbenceno).**

La membrana adherida en el dispositivo RDSE con cinta de doble contacto se agitó de manera individual con 10 mL de acetona, luego con metanol, agua destilada, solución de NaOH  $1 \times 10^{-2}$  M y finalmente agua destilada a  $2.200 \pm 20$  rpm por 5 min.

#### **2.4.3.4 SupelMIP® SPE-Fluoroquinolonas.**

Se masó 50 mg de resina en el dispositivo RDSE y se agitó de manera individual con 10 mL de metanol, luego con agua destilada a  $2.200 \pm 20$  rpm por 5 min.

#### **2.4.3.5 Octadecil, C18 endcapped y unendcapped.**

Se masó 50 mg de resina en el dispositivo RDSE y se agitó de manera individual con 10 mL de acetato de etilo, luego con metanol y finalmente con agua destilada a  $2.200 \pm 20$  rpm por 5 min.

#### **2.4.3.6 Oasis ®HLB.**

Se masó 50 mg de resina en el dispositivo RDSE y se agitó de manera individual con 10 mL de acetato de etilo, luego con metanol y finalmente con agua destilada a  $2.200 \pm 20$  rpm por 5 min.

### **2.4.4 Estudio de fases sorbentes mediante la extracción de los analitos.**

#### **2.4.4.1 Nylon.**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se colocó 278  $\mu$ L de la solución estándar  $3,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de cada uno de los analitos y se completó a un volumen final de 20 mL con la solución al pH deseado. Por último, se realizó la extracción a  $2200 \pm 20$  rpm por 30 min y se midió la solución después de la extracción junto al estándar de  $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectivo a cada analito. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.4.4.2 BIO-RAD AG® 2-X8 y Anion-SR poli-(estirenodivinilbenceno).**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se llevó 278  $\mu$ L de la solución estándar  $3,6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de cada uno de los analitos y se completó a un volumen final de 20 mL con la solución al pH deseado.

Por último, se realizó la extracción a  $2.200 \pm 20$  rpm por 30 min y se midió la solución después de la extracción junto al estándar de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivo a cada analito. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### 2.4.4.3 SupelMIP® SPE-Fluoroquinolonas, Octadecil y Oasis ®HLB.

En diferentes viales ámbar de 40 mL se agregó 278  $\mu\text{L}$  de la solución estándar  $3,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de cada uno de los analitos y se completó a un volumen final de 20 mL con la solución al pH deseado. Por último, se realizó la extracción a  $2.200 \pm 20$  rpm por 30 min y se midió la solución después de la extracción junto al estándar de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  respectivo a cada analito. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### 2.4.5 Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la extracción con RDSE.

El siguiente procedimiento de optimización se realizó con la fase seleccionada Oasis ®HLB depositada en la cavidad del sistema RDSE como se muestra en la Figura 10.



Figura 10. Esquema del método propuesto por RDSE directo para la determinación de EFX, CFX y OTC.

##### 2.4.5.1 Estudio de pH.

En diferentes viales ámbar de 40 mL se agregó alícuotas de la solución estándar para lograr una concentración  $50 \mu\text{gL}^{-1}$  del analito en estudio y se llevó a un volumen final de 25 mL con buffer McIlvaine–EDTA 0,1 M en un rango de pH entre 2 y 8. Por último, se realizó la extracción con el sistema RDSE a  $2.200 \pm 20$  rpm por 30 min y se midió la fase directamente por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación de 380 nm y un  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.4.5.2 Estudio del tiempo de extracción.**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se agregó alícuotas de la solución estándar para lograr una concentración  $50 \mu\text{gL}^{-1}$  del analito en estudio y se llevó a un volumen final de 25 mL con buffer McIlvaine–EDTA 0,1M a pH 4. Por último, se realizó la extracción con el sistema RDSE a  $2.200 \pm 20$  rpm en un rango de tiempo de 10 y 120 min y se midió la fase directamente por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación de 380 nm y un  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.4.5.3 Estudio de velocidad de rotación.**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se agregó alícuotas de la solución estándar para lograr una concentración  $50 \mu\text{gL}^{-1}$  del analito en estudio y se llevó a un volumen final de 20 mL con buffer McIlvaine–EDTA 0,1M a pH 4. Por último, se realizó la extracción en un rango de velocidad de 700 a 2.200 rpm por 100 min con el sistema RDSE y se midió la fase directamente por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación de 380 nm y un  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.4.5.4 Efecto del volumen de solución de muestra sobre la extracción.**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se agregó alícuotas de la solución estándar para lograr una concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  del analito en estudio y se llevó a un volumen final de 10, 15, 20, 25 y 30 mL con buffer McIlvaine–EDTA 0,1M a pH 4. Por último, se realizó la extracción con el sistema RDSE a 2.200 rpm por 100 min y se midió la fase directamente por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación de 380 nm y un *slit*<sub>exc-em</sub> de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.4.5.6 Efecto de la concentración del amortiguador Mc Ilvaine – EDTA sobre la extracción.**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se agregó alícuotas de la solución estándar para lograr una concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  del analito en estudio y se llevó a un volumen final de 25 mL con buffer McIlvaine–EDTA pH 4 a diferentes concentraciones entre 0,1M y 0,9M. Por último, se realizó la extracción con el sistema RDSE a 2.200 rpm por 100 min y se midió la fase directamente por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación de 380 nm y un *slit*<sub>exc-em</sub> de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.4.5.7 Efecto de la temperatura sobre la extracción.**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se agregó alícuotas de la solución estándar para lograr una concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  del analito en estudio y se llevó a un volumen final de 25 mL con buffer McIlvaine–EDTA 0,3M a pH 4 ajustando su temperatura entre los 30°C y 90°C. Por último, se realizó

la extracción con el sistema RDSE a 2.200 rpm por 100 min y se midió la fase directamente por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación de 380 nm y un *slit* exc-em de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajos las mismas condiciones, con ausencia del analito.

## **2.5 Linealidad del sistema para RDSE directo por espectrofluorimetría.**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se agregó diferentes alícuotas de la solución estándar  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de EFX, CFX y OTC por separado, y se llevó a un volumen final de 25 mL con buffer McIlvaine–EDTA 0,3M a pH 4 para al menos 5 concentraciones por triplicado. Por último, se realizó la extracción a 2.200 rpm por 120 min con el dispositivo RDSE y se midió la fase directamente por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación de 380 nm y un *slit* exc-em de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajos las mismas condiciones, con ausencia del analito.

## **2.6 Validación para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche en RDSE por espectrofluorimetría.**

Los parámetros analíticos se definieron según la terminología utilizada en la guía Eurachem [26]. Los parámetros que se utilizaron para validar los resultados de esta tesis son presentados a continuación.

### **2.6.2 Preparación de muestra.**

Para la validación del método se utilizó una leche de vaca en ausencia de analitos del sector San José de los Lingues, San Fernando. Estas muestras se recolectaron en botellas plásticas de 1000 mL previamente lavadas y secadas según la norma (NCh 411/10-norma 410 o 411)[27]. Se fortificaron con los analitos en diferentes concentraciones ( $50 - 250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) y se mantuvieron refrigerados hasta su uso. Luego, la muestra se centrifugó a 7.000 rpm durante 30 minutos después de la adición de 5 mL de ácido tricloroacético al 10%. El sobrenadante se filtró a través de un filtro

de celulosa de 90 mm. Esto se almacenó en un vial de color ámbar para su uso posterior. Los blancos se procesaron en las mismas condiciones en ausencia de analitos.

#### **2.6.3 Protocolo de extracción.**

Se centrifugó 10 mL de la muestra blanco de leche enriquecida con diferentes concentraciones entre 50-250  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  de EFX, CFX y/o OTC a 7.000 rpm por 30 minutos con 5 mL de ácido tricloroacético 10%, el sobrenadante se filtró a través un filtro de celulosa de 90 mm. Este fue almacenado en un vial ámbar. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, en ausencia del analito.

#### **2.6.4 Linealidad del método.**

En diferentes viales ámbar de 40 mL se midió una alícuota de 5 mL de la muestra de leche tratada de acuerdo al protocolo 2.6.3. Por último, se realizó el protocolo descrito en 2.5 realizando por triplicado los 5 niveles de concentración para un intervalo entre 10 y 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, en ausencia del analito.

#### **2.6.5 Selectividad.**

Este parámetro expresa la capacidad del método para medir y diferenciar el analito de interés en presencia de componentes endógenos que podrían afectar la medición de las muestras.

Para el estudio de interferentes se consideró como criterio que la señal de intensidad de fluorescencia para la relación analito/interferente no fuera alterada en un 5% con respecto a la señal sin interferente.

Experimentalmente a una muestra se le agregó un contenido de concentración conocida de interferente, con el objetivo de estudiar individualmente el efecto, luego se realizó el protocolo de extracción 2.6.3.

#### **2.6.6 Límite de cuantificación y detección.**

Con el fin de conocer cuál es la concentración más baja de analito que se puede detectar bajo las condiciones experimentales desarrolladas en el método, se calculó el límite de detección (LD) y se define como:  $LD = 3,3 \times DS / S$ . El límite de cuantificación (LC) es la mínima concentración que se puede cuantificar y se define como:  $LC = 10 \times DS/S$ , donde “DS” es la desviación estándar de 11 blancos y “S” la sensibilidad, es decir, pendiente de la curva de calibración. También se calculó el rango de determinación, se define como el LC y el más alto se define como la concentración a la cual en donde se distinguen anomalías significantes en la sensibilidad, es decir, en donde existe una pérdida de la linealidad.

#### **2.6.7 Precisión y exactitud.**

La precisión se evaluó midiendo el grado de dispersión entre muestras medidas el mismo día “Intra day” y en días diferentes “Inter day”, por 3 días consecutivos a tres niveles de concentración con tres réplicas cada uno.

Con el fin de conocer la exactitud y veracidad de los resultados obtenidos, se calculó el porcentaje de recuperación de las muestras y el porcentaje relativo, respectivamente.

#### **2.7 Estrategia de elución para la determinación de EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.**

Con el objetivo de determinar simultáneamente estos analitos estudiados se realizó la extracción descrita en la sección 2.5 con una etapa posterior de elución (Factor de preconcentración: 2), midiendo la solución eluida por espectrofluorimetría como se muestra en la Figura 11. Se determinó los porcentajes de recuperación y se optimizaron variables químicas e hidrodinámicas, descritos a continuación.



Figura 11. Esquema del método propuesto por elución de RDSE, para la determinación de EFX, CFX y OTC.

## 2.7.2 Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la elución.

Se realizaron pruebas de elución utilizando metanol como agente eluyente, como una estrategia alternativa para la determinación de los analitos. Para este estudio se utilizaron las longitudes de onda de excitación de cada uno de los analitos.

### 2.7.2.1 Efecto de la masa de fase sorbente sobre la elución.

Se realizó la extracción descrita en la sección 2.5, sólo que en la cavidad del dispositivo RDSE se varió la masa de fase Oasis HLB® entre 10 mg y 80 mg. Por último, se llevó a elución con 20 mL de metanol por 15 min para medir la solución eluída por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de onda de excitación correspondiente al analito  $\lambda_{exc-em}$  de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajos las mismas condiciones, con ausencia del analito.

### 2.7.2.2 Efecto del solvente sobre la elución.

Se realizó la extracción descrita en la sección 2.5 y posteriormente se realizó la elución con 10 mL de diferentes solventes por 15 min para medir la solución eluída por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación

correspondiente al analito *slit* exc-em de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajos las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.7.2.3 Efecto del tiempo sobre la elución.**

Se realizó la extracción descrita en la sección 2.5 y posteriormente, se llevó a elución con 20 mL de metanol por 5,10, 15 y 20 min para luego medir la solución eluída por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 nm con una longitud de excitación correspondiente al analito *slit* exc-em de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajos las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.7.2.4 Efecto del volumen en el proceso de elución.**

Se realizó la extracción descrita en la sección 2.5 y posteriormente se varió el volumen de elución, entre 10, 15 y 20 mL por 15 min para medir la solución eluída por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 con una longitud de excitación correspondiente al analito *slit* exc-em de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajos las mismas condiciones, con ausencia del analito.

### **2.8 Linealidad del sistema para elución RDSE por espectrofluorimetría.**

Se realizó la extracción descrita en la sección 2.6.3 y posteriormente se llevó a elución con las variables optimizadas en la sección 2.7.1. para medir la solución eluída por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 con una longitud de excitación correspondiente al analito *slit* exc-em de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajos las mismas condiciones, con ausencia del analito.

### **2.9 Validación para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por elución de RDSE por espectrofluorimetría.**

Los parámetros analíticos se definieron según la terminología utilizada en la guía Eurachem [26]. Los parámetros que se utilizaron para validar los resultados de esta tesis son presentados a continuación.

#### **2.9.2 Linealidad del método para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por elución de RDSE por espectrofluorimetría.**

Se realizó la extracción descrita en la sección 2.6.3 y posteriormente se llevó a elución con las variables optimizadas en la sección 2.7.2. para medir la solución eluída por espectrofluorimetría en un rango de longitud de onda de emisión de 220 a 800 con una longitud de excitación correspondiente al analito *slit* exc-em de 10-10 nm. Los blancos se realizaron bajo las mismas condiciones, con ausencia del analito.

#### **2.9.3 Selectividad del método para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por elución de RDSE por espectrofluorimetría.**

Experimentalmente a una muestra se le agregó un contenido de concentración conocida de interferente, con el objetivo de estudiar individualmente el efecto, luego se realizó el protocolo de extracción 2.9.1.

#### **2.9.4 Límite de cuantificación y detección.**

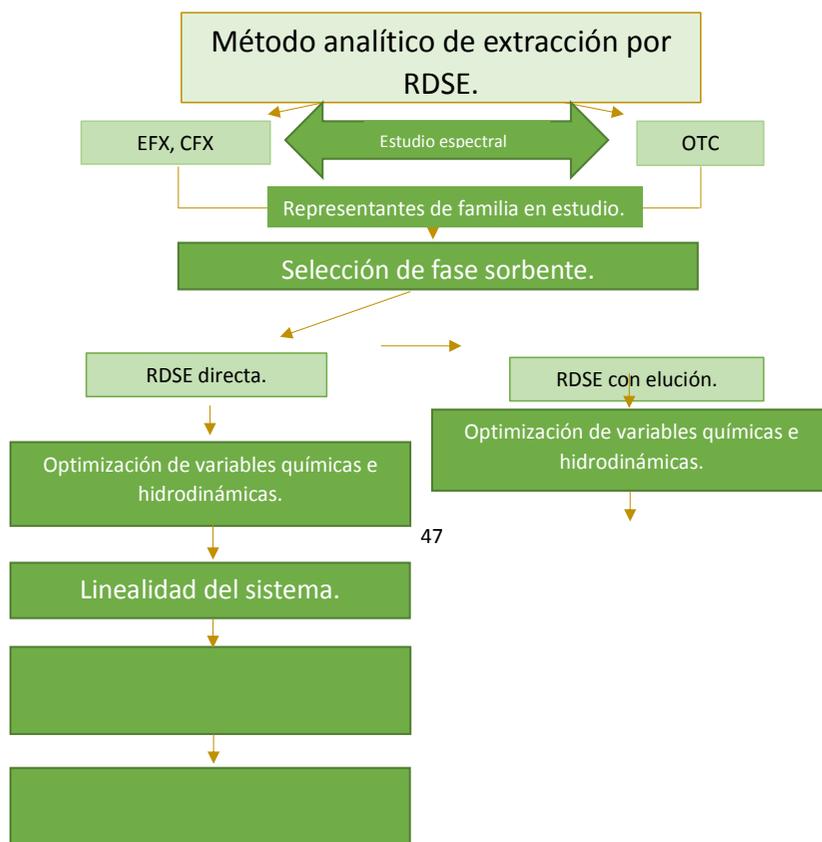
Se llevó a cabo el procedimiento detallado en la sección 2.6.5.

#### **2.9.5 Precisión y exactitud.**

Se llevó a cabo el procedimiento detallado en la sección 2.6.6.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

En la Figura 12, se muestra un esquema del método analítico para las estrategias de extracción estudiado en esta tesis por espectrofluorimetría. Se presenta de esta forma con el objetivo de orientar en la presentación de los resultados.



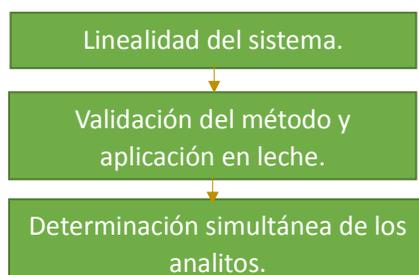
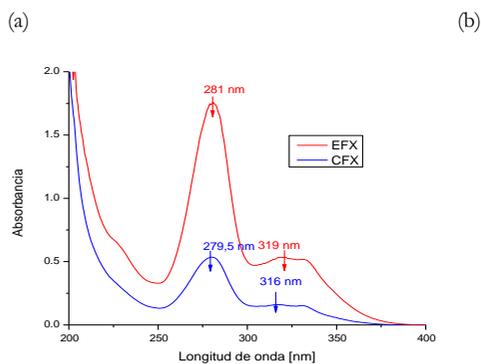


Figura 12. Esquema general de metodología para la extracción de Fluoroquinolonas y tetraciclinas.

### 3.1 Estudio de la conducta espectral de los analitos por UV- visible.

Se seleccionó un representante de la familia de fluoroquinolonas, EFX y su metabolito CFX. Además, OTC perteneciente a las tetraciclinas. Para seleccionar la longitud de excitación de los analitos en estudio se realizó un barrido en UV- visible con la finalidad de obtener los máximos de cada uno, como se observa en la Figura 13. Cabe destacar que los analitos están disueltos en metanol, el cual se seleccionó por ser un solvente que presenta una solubilidad alta para ambas familias de analitos. Además, las señales de los analitos se ven favorecidos con una mayor intensidad de absorbancia y con un desplazamiento batocrómico con respecto a otros solventes.



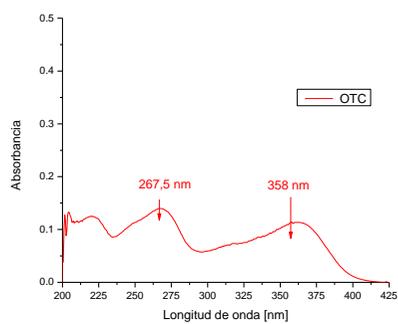


Figura 13. Espectros de absorción de a) fluoroquinolonas, b) tetraciclina. Concentración de los analitos  $3,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en metanol.

Tabla 3. Máximos de absorbancia de los analitos.

Analitos	Máximos de absorbancia [nm]	
CFX	279,5	316
EFX	281	319
OTC	267,5	358

A continuación, se utilizan los máximos obtenidos de la Tabla 3 para realizar la medición de los analitos en solución por espectrofluorimetría.

### 3.2 Estudio de la conducta espectral de los analitos por espectrofluorimetría.

Se presentan en la Figura 14 los espectros de emisión de la solución de los analitos a diferentes longitudes de excitación ( $\lambda_{exc}$ ), las que fueron obtenidas de sus respectivos espectros de absorción señalados en la Tabla 3.

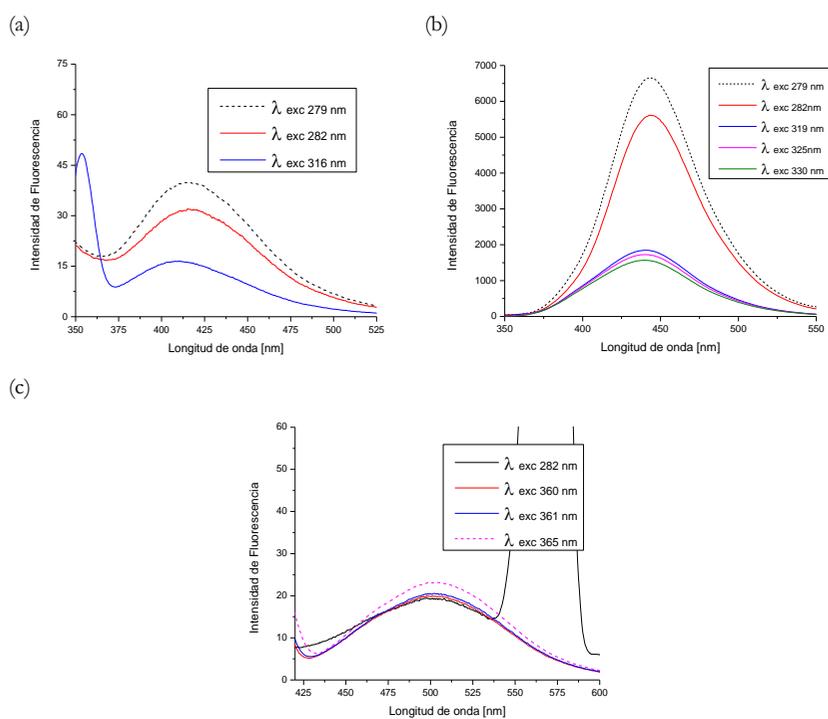


Figura 14. Espectros de emisión de los analitos a diferentes longitudes de onda de excitación a) CFX, b) EFX y c) OTC. Concentración  $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $slit_{exc-em}$  10-10 nm.

La longitud de onda de excitación óptima se seleccionó para cada uno de los analitos, teniendo presente una diferencia con la banda de excitación, con mayor resolución a la banda de emisión de los analitos y mayor intensidad de fluorescencia, para favorecer sensibilidad al método.

La longitud de onda de excitación seleccionada para cada uno de los analitos que se muestra en la Tabla 4 es la que se utilizará para realizar el estudio de fases sorbentes propuesto.

Tabla 4. Longitudes de excitación seleccionadas.

Analitos	Longitud de excitación [nm]
CFX	279
EFX	279
OTC	365

### 3.3 Estudio de fases sorbentes.

Dado las características estructurales y físico-químicas de EFX, CFX y OTC y con el propósito de trabajar en conjunto con los analitos se realizó un estudio del efecto de pH sobre la conducta espectral ya que presentan características ácido-base. Se realizó de acuerdo al procedimiento 2.5. considerando el predominio de una sola especie, de acuerdo al criterio  $\text{pH}=\text{pK}_a\pm 2$

A continuación, con la finalidad de encontrar una fase óptima para realizar la medición directa de EFX y OTC se procedió a realizar el estudio de las fases.

Se realizó la extracción de OTC, CFX y EFX a una concentración de  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  con las fases sorbentes utilizando RDSE, donde se determinó el porcentaje recuperación. Cabe destacar, que con BIO-RAD AG® 2-X8 y Anion-SR poli-(estirenodivinilbenceno) se trabajó a un pH 10 por las características de las fases y del analito, donde la especie predominante de los analitos se encuentra cargada negativamente favoreciendo las interacciones. Las fases sorbentes restantes se trabajaron a un pH común para los analitos considerando sus características físicoquímicas como es su pKa,

coeficiente de partición (Log D) como se muestra en la sección 1.2. Por lo dicho anteriormente, se seleccionó pH 4 y pH 10 para obtener los porcentajes de recuperación con las fases Oasis ®HLB, Octadecil endcapped y unendcapped y MIP.

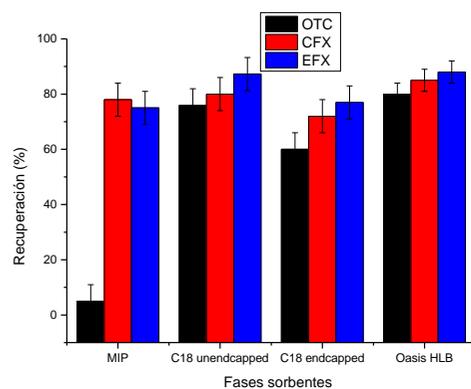


Figura 15. Recuperación de las fases sorbentes a pH 4 de extracción para EFX, CFX y OTC.

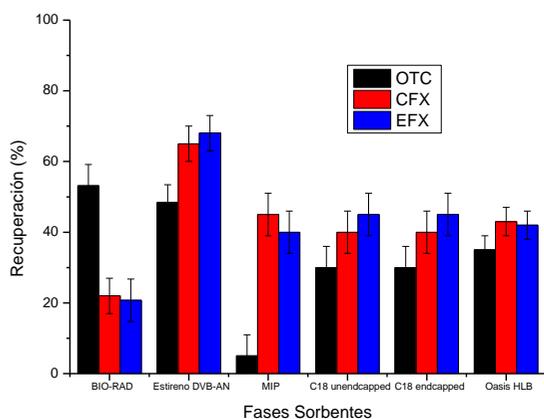


Figura 16. Recuperación de las fases sorbentes a diferentes pH 10 de extracción para EFX, CFX y OTC.

Como se muestra en la Figura 16 las recuperaciones son menores a pH 10, sólo en el caso de Anion-SR poli-(estirenodivinilbenceno) se obtiene un porcentaje mayor al 60% para EFX y CFX, sin embargo, para OTC se encuentran bajo un 50%. En el caso de las extracciones de los analitos a un pH 4 como se muestra en la Figura 15 las recuperaciones aumentan casi al doble, logrando porcentajes de recuperaciones mayores al 70% para la fase Oasis®HLB y Octadecil unendcapped. En el caso de la fase MIP, por la recuperación baja de OTC se comprueba su selectividad frente a analitos de la familia de las fluoroquinolonas. Se realiza el estudio espectral a las fases que presentaron mayor porcentaje de recuperación para EFX, CFX y OTC como son presentadas en la Figura 15, con el propósito de lograr una determinación simultánea de los analitos. Es decir, que

espectralmente exista una diferencia para su futura determinación. Adicionalmente, se presentarán las señales de las fases restantes en el anexo a modo de que pueda ser utilizado en futuros trabajos.

### 3.3.1 Octadecil C<sub>18</sub>.

En primera instancia se realizó el estudio de extracción con C<sub>18</sub> *encapped* dado a los valores de porcentajes de recuperación altos se realizó el estudio con C<sub>18</sub> *unencapped* esperando que los porcentajes de recuperación aumentaran ya que esta fase presenta capa abierta a diferencia de C<sub>18</sub> *encapped*. Cabe destacar que la fase de capa abierta presenta un grupo hidroxilo, el que le entrega características polares, por lo que los porcentajes de recuperación obtenidos mejoraron para los representantes de los analitos como era predecible. Por lo tanto, con C<sub>18</sub> *unencapped* se realizó el estudio por espectrofluorimetría (Figura 18).

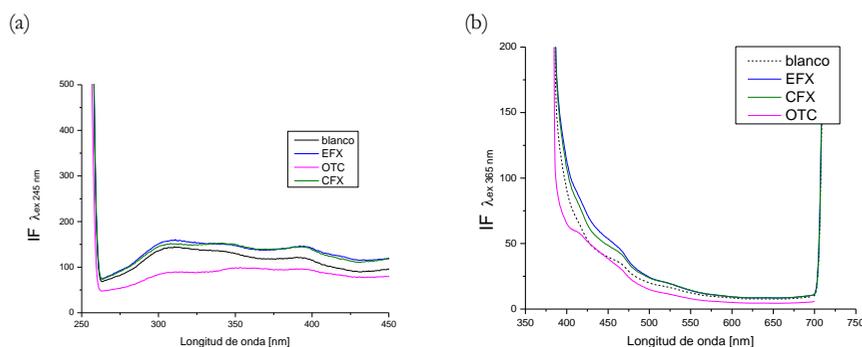


Figura 17. Espectros de emisión de los analitos medidos directamente en fase C<sub>18</sub> a diferentes longitudes de onda de excitación a) 245 nm y b) 365 nm. Concentración 50 μg·L<sup>-1</sup> y *slit*<sub>exc-em</sub> 10-10 nm.

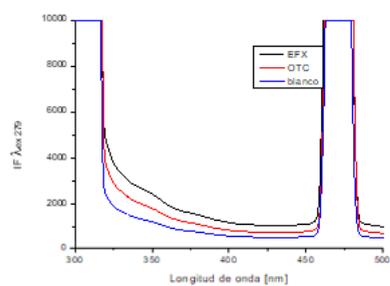


Figura 18. Espectros de emisión de los analitos medidos directamente en fase  $C_{18}$  a una longitud de onda de excitación de 279 nm. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  10-10 nm.

En la Figura 17 y 18 se observa el comportamiento de los analitos representativos extraídos con la fase  $C_{18}$  *unencapped*. En la Figura 17a) y b) se observa una diferencia en el espectro con respecto al blanco, pero no lo suficiente significativo para lograr cuantificar los analitos. En cambio, en la Figura 19 se observa una banda definida para EFX y CFX, representantes de las fluoroquinolonas, al igual que una diferencia importante con el blanco por lo que es seleccionada como óptima.

Por los datos obtenidos con anterioridad, se realizó una curva de calibración de EFX para observar si existe una correlación entre las concentraciones y los valores de intensidad de fluorescencia a la longitud de excitación de 279 nm, seleccionada previamente (Figura 19).

(a)

(b)

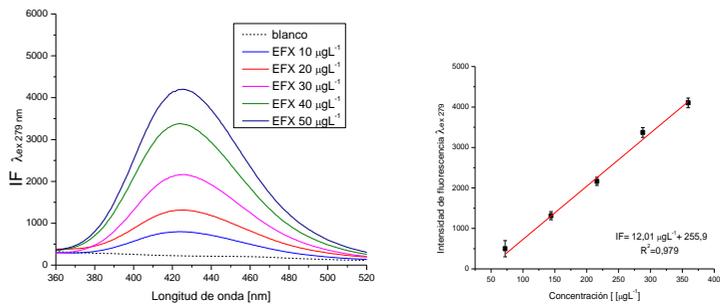


Figura 19 a) Espectros de emisión de EFX medido directamente en fase  $C_{18}$  y *slit*<sub>exc-em</sub> 10-10 nm. b) Regresión lineal de la curva de calibración.

En la Figura 19 es posible observar una correlación entre la concentración y la intensidad de fluorescencia. Cabe destacar, que para transferir la fase a la celda de medición fue necesario agregar 100 µL de metanol, por lo que existe la posibilidad de que el analito desorba en el solvente. Es por esto que se realizó la extracción de EFX y la fase se retiró con diferentes volúmenes de metanol (Figura 20).

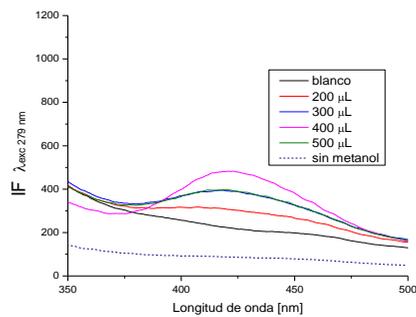
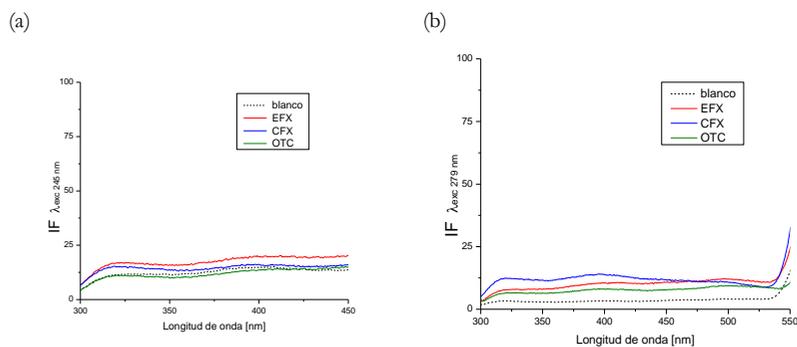


Figura 20. Espectros de emisión de EFX medido directamente en fase  $C_{18}$  con diferentes volúmenes de metanol. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y *slit*<sub>exc-em</sub> 10-10 nm.

Tal como se muestra en la Figura 20, existe una diferencia en la señal de EFX con diferentes volúmenes de metanol. Esta diferencia se atribuye a que el analito desorbe, esto es porque se debe ocupar un solvente para transferir la fase del disco sino es imposible medirla directamente. El uso de solvente es necesario para llevar la fase a la celda, porque con agua es imposible por las características apolares de la fase. Se trasvasió la fase sin metanol y no presenta la misma señal que con metanol, es por esto que se le atribuye a la desorción del analito en el solvente. Frente a estos resultados, para realizar la medición directa de la fase es necesario que el volumen de metanol se mantenga constante, pero a la vez, abre la alternativa de realizar la determinación de EFX por elución con metanol.

### 3.3.2 Oasis ®HLB.

Por último, la fase Oasis ®HLB que presenta más de un 70 % de recuperación frente a los representantes de los analitos en estudio mostrados en la Figura 15. En esta fase, se realizó el estudio de su conducta espectral por espectrofluorimetría (Figura 21).



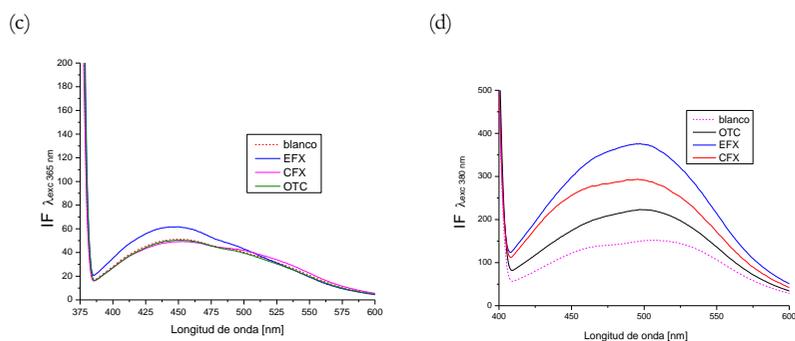


Figura 21. Espectros de emisión de los analitos medido directamente en la fase a diferentes longitudes de onda de excitación a) 240 nm, b) 279 nm, c) 365 nm y d) 380 nm.

Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  10-10 nm.

En la Figura 21 se presentan los espectros de emisión con diferentes longitudes de onda de excitación. Cabe destacar que a una longitud de onda de excitación 365 nm y 380 nm, las bandas de emisión son bien definidas y las intensidades de fluorescencia de los analitos son más altas que las del blanco (Figura 21 a,b y c). Sin embargo, a una longitud de onda de excitación de 380 nm (Figura 22), la señal está más separada de la banda de excitación que la de 365 nm, por lo que se seleccionó la longitud de onda de excitación 380 nm para realizar los próximos estudios. Cabe destacar, que no ocurre lo mismo que con la fase  $C_{18}$  para la extracción de la fase desde el disco para depositarla en la celda, debido a que no se ocupa metanol, sino que 200  $\mu\text{L}$  de agua destilada. El blanco tiene la misma señal que el analito, siendo esta última mayor a la intensidad de fluorescencia del blanco. Por lo antes mencionado, es la fase seleccionada para los próximos estudios.

Previo al estudio de las variables químicas e hidrodinámicas se realizó una prueba de acondicionamiento, donde se utilizó acetato de etilo, metanol, agua y una mezcla de ellos (Figura 22).

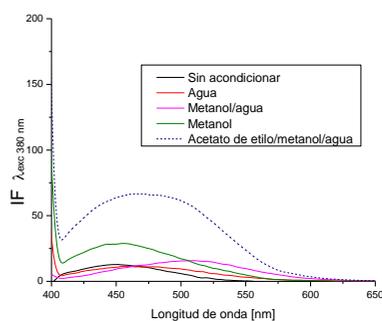


Figura 22. Espectros de emisión de la fase medida directamente, con diferentes acondicionamientos.  $\lambda_{exc-em}$  10-10 nm.

Como se muestra en la Figura 22, se acondicionó la fase sorbente previa extracción con diferentes solventes y mezclas de ellos. Resultó que sin acondicionar la fase entrega una señal más baja en su intensidad de fluorescencia favoreciendo la señal espectral. Se optó por no acondicionar, pero si dejando sumergida la solución de extracción por 5 minutos para proporcionar el ambiente a la fase y para evitar que la fase se encuentre seca, aumentando la posibilidad de que se logre una homogeneidad en la recirculación de la fase dentro de la cavidad del disco. Se corroboró que el porcentaje de recuperación de extracción de la fase no fuese modificado, éste se mantiene sin realizar el acondicionamiento privilegiando la señal analítica y el no uso de solventes para lograr un método verde.

### 3.4 Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la extracción con RDSE.

La optimización que se realizó fue con la fase sorbente Oasis HLB a una longitud de excitación de 380 nm, se corroboró los porcentajes de recuperación estudiados con los parámetros seleccionados como el pH 4 y la fase sin acondicionar para disminuir la cantidad de solvente utilizado no siendo significativo para el proceso de extracción. Cabe destacar que el estudio se realizó con dos niveles de concentración sólo que en las figuras se presenta una para lograr una exposición más clara de los resultados.



Figura 23. Esquema del método propuesto por RDSE para la determinación de EFX, CFX y OTC.

#### 3.4.1 Efecto de pH.

Con la fase sorbente seleccionada Oasis @HLB, medida a una longitud de onda de excitación de 380 nm, se realizó el estudio del efecto del pH con los representantes de la familia de fluoroquinolonas y tetraciclinas, EFX Y OTC, respectivamente (Figura 24). Cabe destacar que ya en

la sección 3.3 se seleccionó el pH de extracción, el objetivo de este estudio es corroborar algún cambio en la señal espectral.

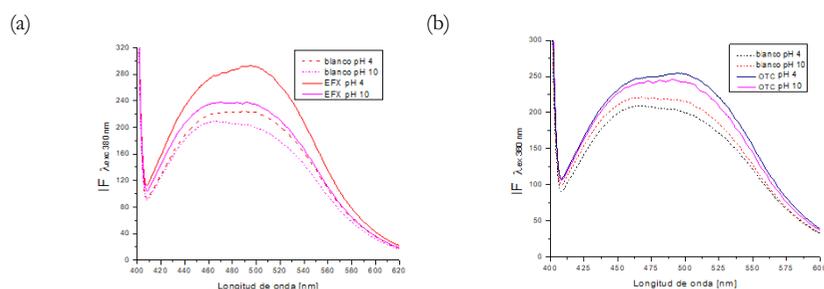


Figura 24. Espectros de emisión de representantes de los analitos  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  medida directamente la fase a diferentes pH a) EFX y b) OTC y  $\lambda_{exc-em}$  10-10 nm.

En la Figura 24 se observa que los espectros de emisión de EFX a pH 4 y 10 no presentan corrimiento espectral, sin embargo, las señales a pH 4 presentan mayor resolución y una diferencia significativa entre el blanco y el analito. Algo similar ocurre para OTC, si bien a pH 8 las señales presentan similar intensidad de fluorescencia, pero no tiene mayor diferencia el analito y el blanco por lo que se descarta. En cambio, a pH 4 presenta la misma banda definida y una mayor diferencia entre el blanco y el analito. Por lo tanto, se corroboró para ambos representantes de las familias fluoroquinolonas y tetraciclinas la selección de pH 4 para los próximos estudios. Lo expuesto anteriormente se puede atribuir como respuesta de las interacciones que hay presentes a este pH seleccionado, entre fase sorbente y analitos. A partir de su estructura química a pH 4 es posible una interacción electrostática entre el anión enolato del grupo tricarbonilo de la tetraciclina con el nitrógeno protonado del grupo vinilpirrolidona de la fase Oasis <sup>®</sup>HLB. En el caso de las fluoroquinolonas predominan los puentes de hidrógeno entre el oxígeno del carbonilo del grupo lactama, con el hidrógeno del grupo carboxilo de las fluoroquinolonas. Además, se estima que existan

fuerzas de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas y anillos bencénicos de los analitos con las de la fase sorbente. Tal como se muestra en la Figura 25.

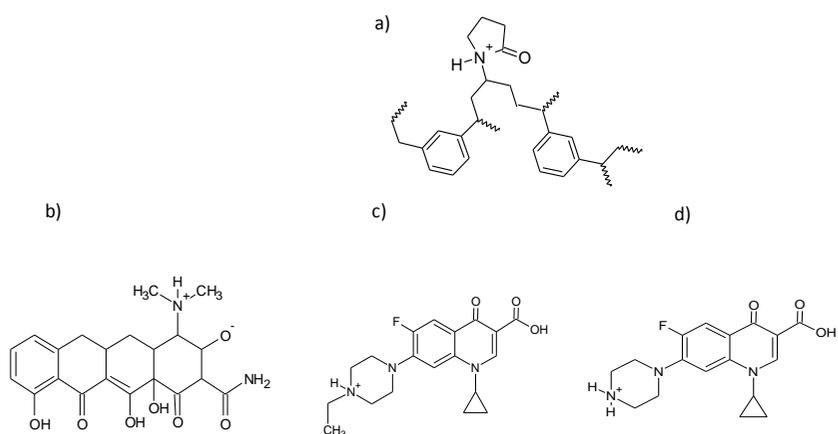


Figura 25. Estructuras posibles a pH 4 de a) Oasis HLB, b) Oxitetraciclina y c) Enrofloxacin y d) Ciprofloxacin.

### 3.4.2 Efecto de tiempo de extracción.

Se realizó el estudio del tiempo de extracción para los representantes de la familia de las tetraciclinas y fluoroquinolonas, OTC y EFX, respectivamente.

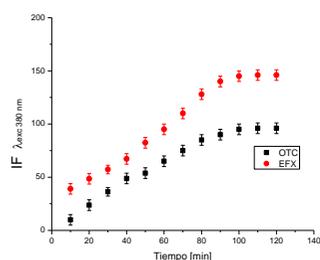


Figura 26. Efecto del tiempo de extracción para EFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\lambda_{exc-em} 10-10 \text{ nm}$ .

En la Figura 26, en el caso de OTC alcanza el tiempo de equilibrio a los 90 min. Con el objetivo de trabajar simultáneamente se seleccionó como tiempo de extracción óptimo 120 min. donde se observa que a partir de este tiempo se alcanza el equilibrio logrando extracciones cuantitativas.

### 3.4.3 Efecto de velocidad de rotación.

La velocidad de rotación es uno de los factores más importantes para una sorción eficiente en este tipo de extracción en fase sólida. Por lo cual se estudió la velocidad para los representantes de la familia tetraciclinas y fluoroquinolonas, OTC y EFX, respectivamente.

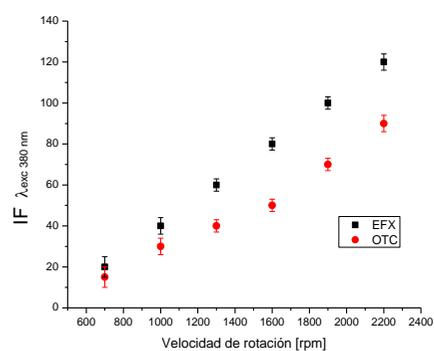


Figura 27. Efecto de la velocidad de rotación para EFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $slit_{exc-em}$  10-10 nm.

Como se aprecia en la Figura 27 la intensidad de fluorescencia es proporcional a la velocidad de rotación. De acuerdo a la disponibilidad de los agitadores magnéticos, se trabajará a  $2.200 \pm 20$  rpm. Por consiguiente, el incremento de la velocidad de rotación del disco, aumenta significativamente la cantidad de analito extraído a un menor tiempo de equilibrio.

### 3.4.4 Efecto del volumen de solución de muestra en la extracción.

Para conocer el efecto del volumen de solución en la extracción se estudió en los representantes de la familia en estudio como se muestra en la Figura 28. Lo mínimo que se utilizó fueron 10 mL con la finalidad que el disco quede sumergido completamente en la solución y logre realizar una extracción óptima de acuerdo a la hidrodinámica de este mismo, facilitando el transporte de masas desde el seno de la solución a la fase de extracción.

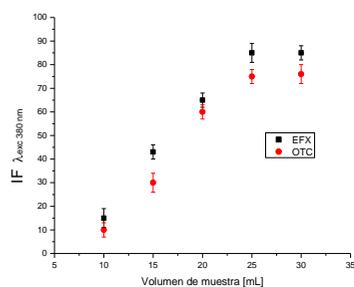


Figura 28. Efecto del volumen de muestra para EFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y *slit* exc-em 10-10 nm.

La figura 28 muestra una constancia a partir de los 25 mL, para favorecer la extracción y preconcentración de los analitos, se seleccionó 25 mL como volumen de solución.

### 3.4.5 Estudio de la concentración del amortiguador Mc Ilvaine – EDTA en la extracción.

Se realizó el estudio variando la concentración del buffer Mc Ilvaine – EDTA para observar el efecto que tiene en el procedimiento de extracción, lo que se observa en la Figura 29.

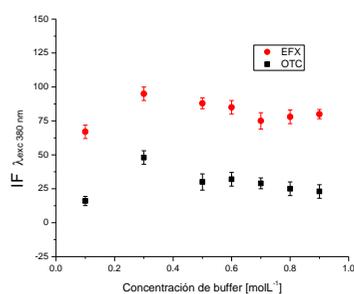


Figura 29. Efecto de la concentración de buffer para EFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\lambda_{\text{exc-em}}$  10-10 nm.

El buffer Mc Ilvaine – EDTA se utilizó en la extracción de EFX y OTC el cual no presenta señal interferente a las longitudes de emisión de los analitos. Al contener EDTA, permite quelar iones metálicos[28] como el calcio que se encuentra en la muestra permitiendo eliminar esta posible interferencia y así favorecer el proceso de extracción. En la Figura 8 se puede observar más claramente que existe un aumento en la intensidad de fluorescencia al aumentar la concentración del buffer a 0,3 M, es decir, al aumentar la concentración de sal en la solución *salting out* hay un incremento en la eficiencia del proceso de extracción. Posterior a la utilización de 0,3 M de Buffer, se ve en la solución la formación de un precipitado lo que se ve reflejado en la disminución de la intensidad de

fluorescencia. Es por esto que se seleccionó la concentración del buffer 0,3M, siendo significativo para el proceso de extracción.

### 3.4.6 Efecto de la temperatura en la extracción.

Se planteó el estudio de la temperatura como una de las variables químicas y se realizó en un rango de temperatura entre 20 y 80 °C.

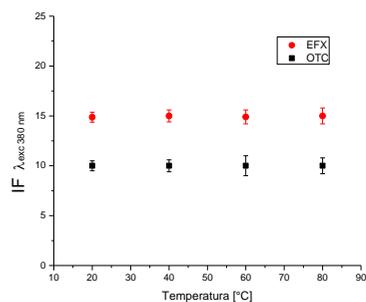


Figura 30. Efecto de la temperatura para EFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  10-10 nm.

La temperatura no presentó algún efecto en las muestras de los representantes de las familias, como se muestra en la Figura 30. Por lo que se continuó realizando la extracción a temperatura ambiente. Este factor tenía que ser estudiado pese a la estabilidad conocida de los analitos [29].

**3.5 Validación para la determinación de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por espectrofluorimetría.**

**3.5.1 Linealidad del sistema para RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.**

Se realizó una curva de calibración de estándares de los analitos con la fase Oasis ®HLB, como se muestra en la Figura 32, 33 y 34 de acuerdo a los parámetros optimizados según la metodología descrita en el procedimiento 2.6.3. y Figura 31.

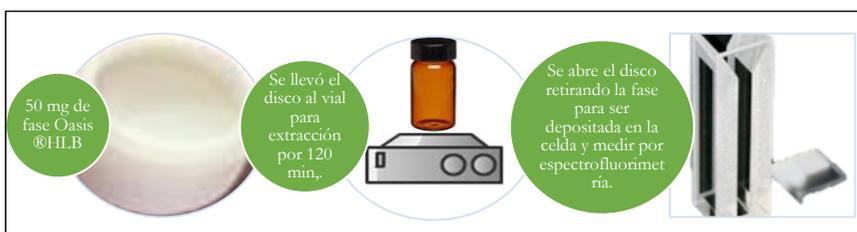


Figura 31. Proceso de extracción de EFX, CFX y OTC

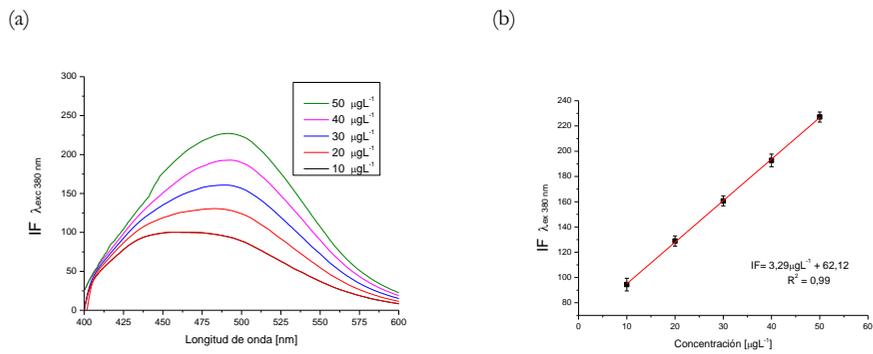


Figura 32. a) Espectros de emisión de EFX medida directamente la fase. b) Regresión lineal de la curva de calibración y  $\lambda_{exc-em}$  10-10 nm.

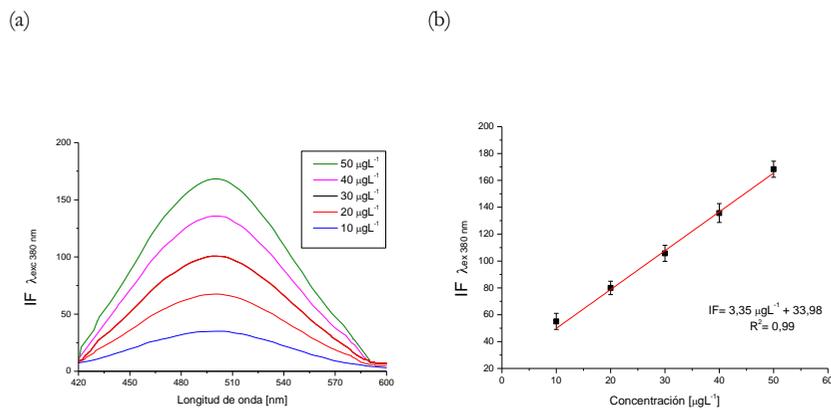


Figura 33. a) Espectros de emisión de CFX medida directamente la fase. b) Regresión lineal de la curva de calibración y  $\lambda_{exc-em}$  10-10 nm.

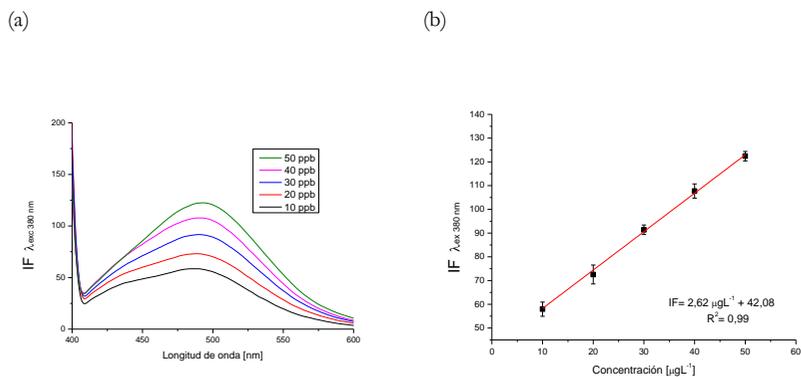


Figura 34. a) Espectros de emisión de OTC medida directamente la fase. b) Regresión lineal de la curva de calibración y  $\lambda_{exc-em}$  10-10 nm.

Como se observa en la Figura 32, 33 y 34, existe una correlación entre las concentraciones e intensidades de fluorescencia de cada uno de las representantes de las familias. Se procedió a calcular la desviación estándar de los blancos (n=11). En las Tabla 5 se muestran los parámetros analíticos para EFX, CFX y OTC, respectivamente. Es importante señalar que las curvas de calibración fueron obtenidas con las correspondientes intensidades de fluorescencia restando el blanco.

Tabla 5. Parámetros analíticos de EFX, CFX y OTC en estándares medida directamente la fase.

	EFX	CFX	OTC
<b>Longitud de onda de excitación (nm)</b>	380	380	380
<i>Slit<sub>exc/em</sub></i>	10/10	10/10	10/10
<b>Longitud de onda analítica (nm)</b>	491,5	500,5	493
<b>Regresión lineal</b>	IF = 3,29C ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + 62,1	IF=3,35 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + 33,9	IF = 1,62 C ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + 42,1
<b>Coefficiente de correlación (R<sup>2</sup>)</b>	0,9997	0,9907	0,9981
<b>Límite de detección (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	4,44	4,36	9,02
<b>Límite de cuantificación (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	13,47	13,22	10,44
<b>Intervalo de concentración (<math>\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}</math>)</b>	13,47-85,0	13,22-80,5	10,44-86,5

En la Tabla 5 se presenta la ecuación obtenida para la curva de calibración con estándares utilizando Oasis HLB® como fase sorbente en el dispositivo RDSE, ésta se ajustó con el modelo de regresión lineal obteniendo un coeficiente de determinación cercano a 1 verificando su linealidad.

### 3.5.2 Linealidad del método para RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.

Por literatura se tiene la premisa de la composición de la leche la que está mayoritariamente constituida por agua bordeando el 90% seguido de materia grasa (4%) y, por último, las proteínas (2,5%) [30]. Con respecto a la proteína de la leche que corresponde a un 80% de caseína, se estudió y presenta su señal en el mismo rango de emisión en el que se está trabajando. Por lo descrito anteriormente es que se hace de importancia el tratamiento de la muestra para eliminar esta interferencia. Ahora bien, el punto isoelectrónico de las proteínas es 4,6, es decir bajo este pH precipitan por lo que se utilizó ácido tricloroacético para realizar este procedimiento. Por otro parte, para separar la materia grasa es necesario destruir el estado globular lo que se logra con ácido como el que se utilizará adicional a la centrifugación [31]. Se estudió el volumen de ácido tricloroacético,

Figura 35, hasta que la muestra no presentará efecto de matriz, es decir que la señal analítica no sea modificada.

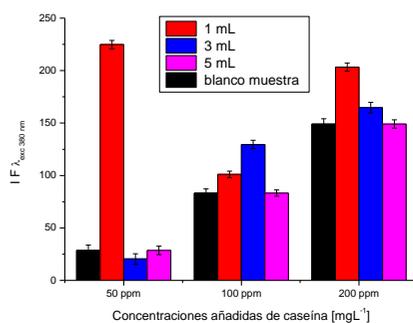


Figura 35. Diferentes concentraciones de caseína tratadas con ácido tricloroacético.

Como se muestra en la Figura 35, se observa que la intensidad de fluorescencia de la señal de la muestra blanco (barra negra) con la señal de la muestra blanco de leche tratada con 5 mL de ácido tricloroacético (barra lila) es semejante. Esta semejanza se atribuye que la caseína no presenta interferencia una vez tratada la muestra con 5 mL de ácido tricloroacético. Estas pruebas se realizaron con tres niveles de concentración de caseína añadida y el blanco respectivo; para confirmar que no presente influencia sobre la señal. La caseína emite señal en un rango de longitud de onda entre los 300 nm y 400 nm, con base en esto se compara con la elución de la muestra blanco fortalecida con EFX. El tratamiento de la muestra también es conforme con los resultados a los espectros de la Figura 36, donde se aprecia que la elución de la muestra de leche tratada con 5 mL de ácido tricloroacético no presenta la señal atribuida a caseína. La señal de la caseína se ve disminuida al nivel de no interferir, no existe alteración en la señal ni tampoco algún corrimiento en la medición por lo que el tratamiento de la muestra es satisfactorio.

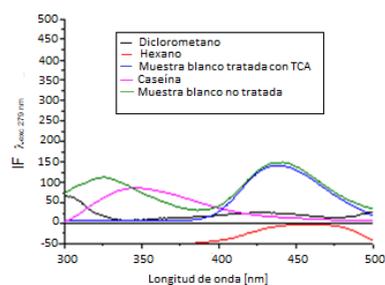


Figura 36. Espectros de emisión de muestra blanco fortificada con EFX, con diferentes tratamientos de muestra. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  10-10 nm.

Analizando los espectros de emisión de la Figura 36, se verificó por medio de la elución que la señal de la muestra tratada con los 5 mL de ácido tricloroacético no presenta corrimiento espectral ni alteración en comparación con la del estándar. Además, queda en evidencia que no es necesario el uso de solventes orgánicos para la precipitación de proteínas ni en la extracción de lípidos y grasas con diclorometano y/o hexano, ya que la señal del analito es totalmente afectada por éstos. Finalmente, el tratamiento propuesto se muestra en la Figura 37.

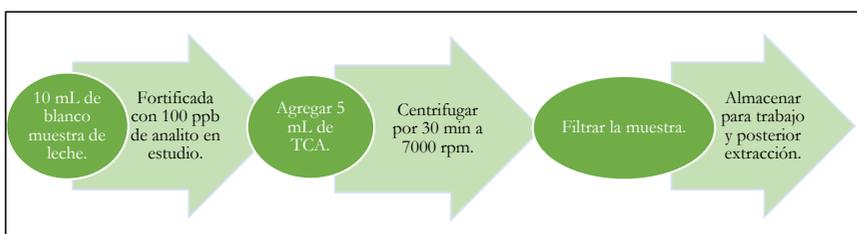
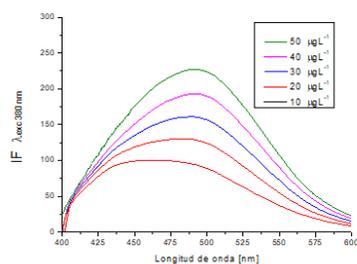


Figura 37. Esquema de tratamiento de muestra para EFX, CFX y OTC desde muestra blanco, según protocolo 2.6.2.

Siguiendo con el proceso de validación del método, se realizan las curvas calibración de los analitos con la fase Oasis HLB® en muestra blanco, de acuerdo a los parámetros optimizados según la metodología descrita en el procedimiento 2.6.3., como se muestra en las Figuras 38, 39 y 40.

(a)



(b)

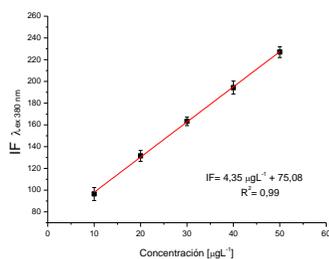
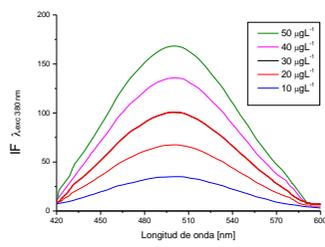


Figura 38. (a) Espectros de emisión de muestra blanco enriquecida con EFX medida directamente en fase b) Regresión lineal de la curva de calibración y  $slit_{exc-em}$  10-10 nm.

(a)



(b)

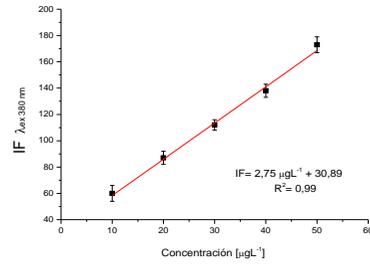
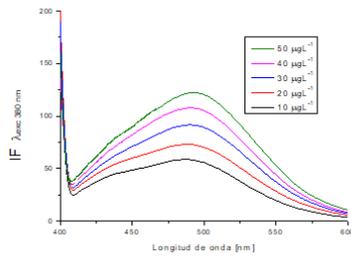


Figura 39. (a) Espectros de emisión de muestra blanco enriquecida con CFX medida directamente en fase b) Regresión lineal de la curva de calibración y  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  10-10 nm.

(a)



(b)

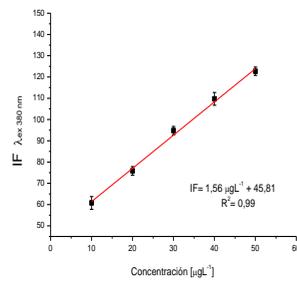


Figura 40. Espectros de emisión de muestra blanco enriquecida con OTC medida directamente en fase b) Regresión lineal de la curva de calibración y  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  10-10 nm.

Tabla 6. Parámetros analíticos de EFX, CFX y OTC en muestra blanco medida directamente la fase.

	EFX	CFX	OTC
<b>Longitud de onda de excitación (nm)</b>	380	380	380
<i>Slit<sub>exc/em</sub></i>	10/10	10/10	10/10
<b>Longitud de onda analítica (nm)</b>	491,5	500,5	493
<b>Regresión lineal</b>	IF = 4,35C (μg·L <sup>-1</sup> ) + 75,1	IF=2,75 C(μg·L <sup>-1</sup> ) +30,9	IF = 1,56 C (μg·L <sup>-1</sup> ) + 45,8
<b>Coefficiente de correlación (R<sup>2</sup>)</b>	0,9994	0,9933	0,9936
<b>Límite de detección (μg·L<sup>-1</sup>)</b>	3,36	5,32	9,37
<b>Límite de cuantificación (μg·L<sup>-1</sup>)</b>	10,18	16,11	12,23
<b>Intervalo de concentración (μg·L<sup>-1</sup>)</b>	10,18-80,3	16,11-85,5	12,23-80,5

Al comparar las curvas de calibración y parámetros analíticos como se muestra en la Tabla 6 con las del sistema, no existe algún corrimiento o cambio de forma de la señal analítica. Además, cabe destacar que los máximos de cuantificación se mantuvieron en los analitos atribuyéndolo a que cualquier interferencia fue eliminada. Tanto el calcio que fue tratado con EDTA del Buffer Mc Ilvaine- EDTA y caseína con el tratamiento de muestra con ácido tricloroacético y centrifugación.

Se realizó la comparación con otra preparación de muestra, se utilizó el sistema de d-SPE donde la gran diferencia es no la utilización del dispositivo RDSE. Es decir, la fase queda depositada en el mismo vial pero no contenida en el dispositivo RDSE. Al comparar los resultados obtenidos de ambas preparaciones de muestra los límites obtenidos son del mismo orden no siendo alterados (Tabla 7), aunque el porcentaje de recuperación se ve favorecido en

10 % atribuido a una mayor recirculación de la muestra. Pese al aumento que existe en el porcentaje de recuperación se privilegia el dispositivo RDSE frente a la d-SPE por el manejo de la fase el que es crucial en la preparación de muestra previo a la medición instrumental. Además de que los límites obtenidos están dentro de métodos reportados. [32]

Tabla 7. Parámetros analíticos de EFX, CFX y OTC medida directamente la fase utilizando d-SPE.

	EFX	CFX	OTC
<b>Longitud de onda de excitación (nm)</b>	380	380	380
<b>Slit<sub>exc/em</sub></b>	10/10	10/10	10/10
<b>Longitud de onda analítica (nm)</b>	491,5	500,5	493
<b>Regresión lineal</b>	IF = 3,32C (µg·L <sup>-1</sup> ) + 65,1	IF=2,82 C(µg·L <sup>-1</sup> ) +29,3	IF = 1,46 C (µg·L <sup>-1</sup> ) + 43,6
<b>Coefficiente de correlación (R<sup>2</sup>)</b>	0,9993	0,9934	0,9937
<b>Límite de detección (µg·L<sup>-1</sup>)</b>	3,26	5,42	9,28
<b>Límite de cuantificación (µg·L<sup>-1</sup>)</b>	9,08	15,01	11,32
<b>Intervalo de concentración (µg·L<sup>-1</sup>)</b>	9,08-80,3	15,01-85,5	11,32-80,5

### 3.5.3 Selectividad del método.

La muestra blanco se trató con el procedimiento descrito en la sección 2.6.2 que eliminó interferencia de parte de la matriz de leche en la señal analítica lo que se describe en la sección 3.5.2. Por lo dicho con anterioridad se estudia el límite de tolerancia que presenta el método frente al resto de analitos estudiados.

Tabla 8. Límite de tolerancia de EFX, CFX y OTC frente a interferentes en muestra blanco.

Interferentes [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	Límite de tolerancia 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EFX	Límite de tolerancia 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ CFX	Límite de tolerancia 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ OTC
<b>EFX</b>	-	20	10
<b>CFX</b>	40	-	10
<b>OTC</b>	50	20	-

En la tabla 8 se presenta los límites de tolerancia, si bien son aceptables frente a los LMR respectivos se realizará la estrategia de elución presentada en la sección 3.6 con la finalidad de poder determinar y cuantificar los tres analitos simultáneamente, mejorando la selectividad del método.

#### 3.5.4 Precisión y exactitud.

La precisión del método de evaluó aplicando el procedimiento experimental 2.6.6. Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 9, 10 y 11 para los analitos en estudio.

Tabla 9. Precisión y exactitud de la medición directa de la fase Oasis HLB® con EFX por espectrofluorimetría.

EFX			
"Intra day"			
Concentración [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	Concentración encontrada [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	10,02	100,2	3,2
30	29,96	99,7	3,3
50	50,13	100,3	2,7
"Inter day"			
Concentración [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	Concentración encontrada [ $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	10,03	100,3	3,6
30	29,95	99,8	2,7
50	50,14	100,3	2,5

Tabla 10. Precisión y exactitud de la medición directa de la fase Oasis HLB® con CFX por espectrofluorimetría.

CFX			
"Intra day"			
Concentración [µg·L <sup>-1</sup> ]	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	9,86	98,6	3,3
30	30,02	100,1	2,2
50	50,13	100,3	2,6
"Inter day"			
Concentración [µg·L <sup>-1</sup> ]	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	9,93	99,3	3,8
30	30,05	100,2	2,9
50	49,14	98,3	3,5

Tabla 11. Precisión y exactitud de la medición directa de la fase Oasis HLB® con OTC por espectrofluorimetría.

OTC			
"Intra day"			
Concentración [µg·L <sup>-1</sup> ]	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	9,82	98,2	3,1
30	30,10	100,3	2,1
50	50,26	100,5	2,4
"Inter day"			
Concentración [µg·L <sup>-1</sup> ]	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	9,86	98,6	2,6
30	30,15	100,5	2,5
50	50,56	101,1	3,0

Para validar el método propuesto, se evaluó la cuantificación posterior a la extracción de los analitos en muestra blanco para tres niveles de concentración conocidos en un grupo de muestras para analizar durante un día y durante días consecutivos con los respectivos blancos de acuerdo al

procedimiento 2.6.3. Se evaluó el grado de dispersión mediante la desviación estándar relativa y la exactitud mediante el porcentaje de recuperación, los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 9,10 y 11; en los cuales se encontró que el método propuesto presenta buena precisión, con una DER<5% y porcentajes de recuperación entre 98,3% y 101,1% para la cuantificación de los analitos utilizando el método RDSE, con las condiciones optimizadas.

### 3.5.5 Aplicación del método.

El método propuesto se aplicó en muestra de supermercado marca colun. Las concentraciones determinadas sobre la base de la adición estándar de los analitos en estudio se presentan en la Tabla 12. Las muestras fueron enriquecidas con el nivel medio de concentración correspondiente a 30 µgL<sup>-1</sup>

Tabla 12. Porcentajes de recuperación de EFX, CFX y OTC en leche comercial.

Analitos	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
EFX	30,01	100,03	1,5
CFX	29,96	99,87	1,7
OTC	30,13	100,43	1,6

De acuerdo a las recuperaciones obtenidas y presentadas en la Tabla 12 no se encuentra presencia de analitos en el lote de leches analizadas.

Finalmente, se logró la determinación individual de EFX, CFX y OTC en muestra de leche por RDSE directo. No obstante, con el propósito de mejorar la selectividad se presenta a continuación una estrategia alternativa por elución del sistema RDSE para la determinación de EFX, CFX y OTC.

### 3.6 Estrategia de elución para la determinación de EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.

En primera instancia se estudió la recuperación de la elución de los analitos en estudio como se muestra en la Figura 41. Se utilizaron las longitudes de onda de excitación respectivas para cada analito, siendo para fluoroquinolonas (EFX y CFX) 279 nm y para oxitetraciclina 365 nm.

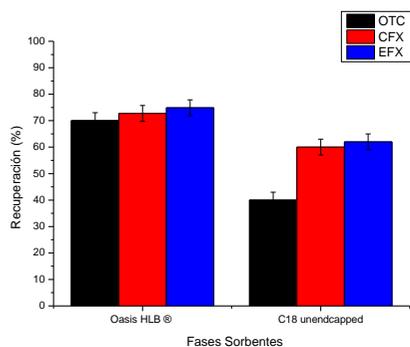


Figura 41. Porcentajes de recuperación de la elución de EFX, CFX y OTC con las fases sorbentes.

Como se aprecia en la Figura 41, la fase Oasis HLB® presenta porcentajes de recuperación de elución mayores al 70 % para EFX, CFX y OTC. Una de las características de la fase es su balance hidrofílico- lipofílico, la que permite obtener porcentajes como los presentados para los analitos en estudio. En el caso de la fase C18 unendcapped se muestra en la Figura 41 porcentajes de recuperación mayores al 60% para el caso de fluoroquinolonas, lo que condice con los resultados

obtenidos en la sección 3.3.4. En esta última fase el porcentaje de recuperación se ve disminuido para el caso de OTC por las características apolares propias de la fase, que pese que tenga un hidroxilo, a diferencia de la C18 endcapped, para entregarle características polares no es lo suficiente para retener compuestos polares como OTC. Si bien los porcentajes no son bajos, mayores al 40%, existe una diferencia entre la elución de los analitos dependiendo de su polaridad. Ahora bien, al momento de realizar la elución con c18 unendcapped en la muestra blanco de leche presenta sobre la fibra de vidrio una especie de “emulsión” la que se le atribuye a la leche por sus características apolares y por consiguiente su afinidad con la fase. Es por este efecto que los porcentajes de recuperación en el proceso de elución se ven disminuidos notoriamente como se muestra en la Figura 41, además de las señales espectrales. Considerando lo anterior, se optimizó el proceso de elución con la fase Oasis HLB® en muestra blanco. Cabe destacar que los estudios de la elución en blanco reactivo se presentan en la sección 3.3.

### **3.6.1 Optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la elución.**

#### **3.6.1.1 Estudio del solvente de elución.**

Se realizó el estudio con solventes próticos y otro aprótico, además con una constante dieléctrica alta considerando la polaridad de los analitos y manteniendo una baja toxicidad. Los resultados se presentan en la Figura 42.

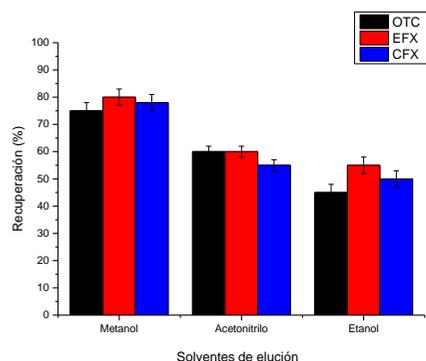


Figura 42. Solventes utilizados para la elución de EFX, CFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y *slit* exc-em 10-10 nm.

Los resultados presentados en la Figura 42 muestran porcentajes de recuperación altos para los analitos utilizando como solvente de elución metanol. Este solvente tiene una constante dieléctrica intermedia frente a los otros solventes a lo que se le atribuye la conducta que favorece la elución sumado a que es un solvente prótico el que favorece las interacciones entre solvente-analito. Además de favorecer la recuperación, se ve beneficiada la señal espectral al utilizar metanol entregando señales definidas y con una diferencia entre los analitos lo que ayudará a la separación de ellos.

### 3.6.1.2 Estudio del tiempo de elución.

El tiempo de elución se estudió por 25 min., eluyendo las muestras en 10 mL de metanol.

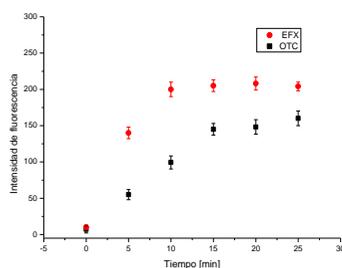


Figura 43. Efecto del tiempo de elución para EFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y *slit*<sub>exc</sub> en 10-10 nm.

En la Figura 43 se aprecia que el tiempo en el que se alcanza el equilibrio es de 10 min para la representante de las fluoroquinolonas, EFX. En el caso de las tetraciclinas, OTC alcanza un equilibrio a los 15 min de elución. Con el objetivo de trabajar en conjunto con los analitos en estudio se selecciona los 15 min. como tiempo óptimo de elución.

### 3.6.1.3 Estudio de la masa de fase sorbente.

El efecto de la masa de fase sorbente se estudió variando la cantidad de Oasis HLB® entre 30 y 70 mg depositados en la cavidad del disco. Como se observa en la Figura 44, cuando la masa de fase sorbente varía, la intensidad de fluorescencia se mantiene. Este efecto se puede explicar ya al variar la masa de fase sorbente no tiene efecto en su recuperación sólo en el tiempo que demora la extracción, así una mayor masa se llega al porcentaje de recuperación en un menor tiempo favoreciendo una mejor preconcentración de los analitos. La recirculación de la fase sorbente dentro del disco beneficia el proceso. Por lo tanto, la masa de resina se puede mantener en los 50 mg, tal

como se muestra en la Figura 44 no presenta una variación en la intensidad de fluorescencia, manteniendo el porcentaje de recuperación y satisfaciendo así la preconcentración.

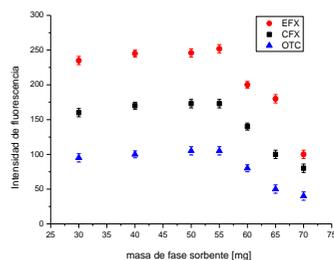


Figura 44. Efecto de la masa sorbente para EFX, CFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y *slit* exc-em 10-10 nm.

Se observa en la Figura 44 que la masa de fase sorbente Oasis HLB<sup>®</sup> se mantiene constante la elución desde los 30 mg hasta los 55 mg. Superando los 55 mg de fase sorbente en el disco, la elución se ve desfavorecida disminuyendo la intensidad de fluorescencia por lo también su porcentaje de recuperación debido al impedimento de la fase a una recirculación en la cavidad del disco del sistema RDSE. Lo descrito anterior le da una importancia adicional a la etapa de masado de la fase en el disco.

#### 3.6.1.4 Efecto del volumen de elución.

Para conocer el efecto que produce un cambio en el volumen de elución, se varió el volumen de metanol entre 10 y 40 mL por 15 min. Tal como se muestra en la Figura 45, hay constancia en la intensidad de fluorescencia en el rango estudiado. Se seleccionó 12,5 mL como volumen de elución, para favorecer la preconcentración (factor de concentración :2).

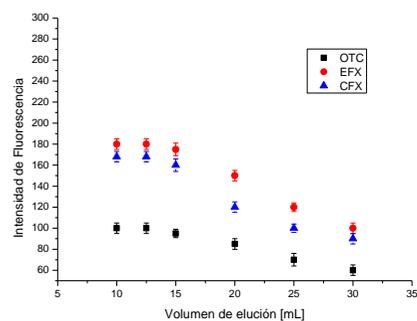


Figura 45. Efecto del volumen de elución para EFX, CFX y OTC. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y *slit* exc-em 10-10 nm.

Cabe destacar que en la etapa de elución la velocidad de agitación es un factor clave, dado que se ocupa un volumen menor de solvente por lo que no es conveniente utilizar velocidades altas de agitación. Esto es para evitar la formación de un *vórtex* que impida el contacto de la fase sorbente con el solvente de elución. Por eso la cantidad mínima de volumen de metanol corresponde a 10 mL. Es por lo señalado con anterioridad y favoreciendo el factor de preconcentración se seleccionó el volumen de elución de 12,5 mL.

Se presentan en la Figura 46 los resultados obtenidos de la optimización de las variables químicas e hidrodinámicas en la elución.

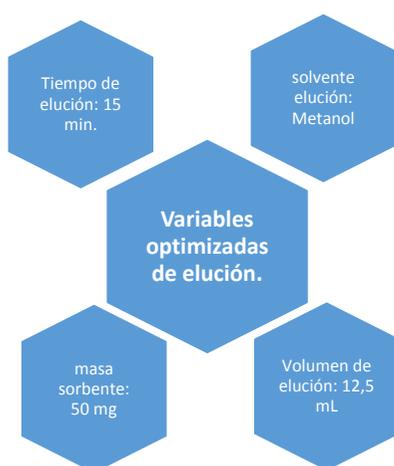


Figura 46. Variables optimizadas para el proceso de elución de la fase Oasis HLB®.

### 3.7 Validación para la determinación simultánea de EFX y CFX en presencia de OTC por elución.

Para la determinación simultánea se estudiaron un set de longitudes de onda de excitación con la finalidad de encontrar la óptima tal que permitiera realizar la determinación de los analitos en conjunto. Se seleccionó la longitud de excitación a 279 nm, en la que sólo presentan señal en el espectro de emisión los analitos pertenecientes a la familia de fluoroquinolonas como lo son EFX y CFX. Por el contrario, oxitetraciclina no presenta señal de emisión a esa longitud de onda de excitación. Esto entrega una alternativa para la determinación simultánea de EFX, CFX y OTC. Se

realizó la elución con buffer McIlvaine–EDTA 0,3M a pH 4/metanol 50:50 para mantener la especie mayoritaria de los analitos y evitar posible interferencia.

### 3.7.1 Linealidad del sistema para elución por RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.

Se realizó una curva de calibración de la elución de los estándares de los analitos con la fase Oasis HLB®, de acuerdo a los parámetros optimizados según la metodología descrita en el procedimiento 2.8 Como se muestra en la Figura 47 y 48.

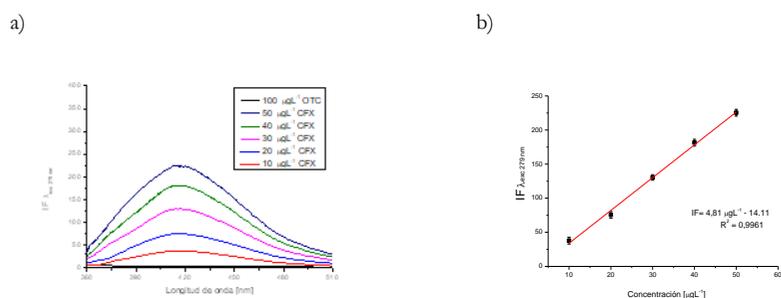


Figura 47. a) Espectro de emisión clásico de elución de estándares con CFX en presencia de OTC. b) Regresión lineal de la curva de calibración y  $\lambda_{exc-em}$  10-10 nm.

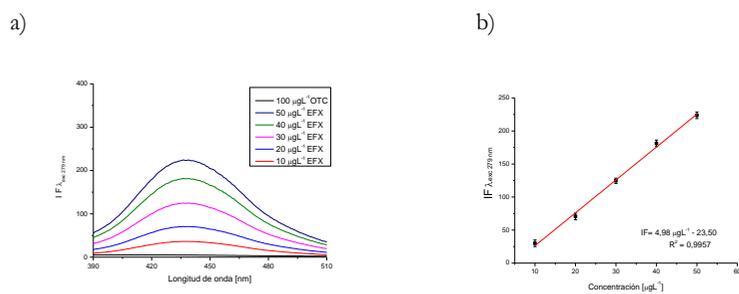


Figura 48. a) Espectro de emisión clásico de elución de estándares con EFX en presencia de OTC. b) Regresión lineal de la curva de calibración y  $slit_{exc-em}$  10-10 nm.

A partir de los espectros de emisión se encontró datos proporcionales entre la concentración del analito y la intensidad de fluorescencia. Además, se calcularon las cifras de mérito del sistema (Tabla 13) y al comparar con otros métodos reportados se obtuvo valores de LD desde 3 hasta 4 veces menores; mientras que, para el LC obtenido fue de 2 a 4 veces, mejorando con lo reportado ligeramente estos parámetros [33].

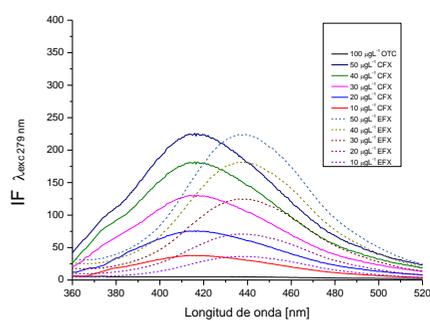
Tabla 13. Parámetros analíticos de EFX, CFX estándares en elución RDSE.

Parámetros Analíticos	EFX	CFX
Longitud de onda de excitación (nm)	279	279
$Slit_{exc/em}$	10/10	10/10
Longitud de onda analítica (nm)	438	417
Regresión lineal	IF = 4,98C ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) - 23,50	IF=4,81 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) - 14,11
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0,9957	0,9961
Límite de detección ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	3,02	3,09
Límite de cuantificación ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	9,04	9,36
Intervalo de concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	9,04-95,0	9,36-110,0

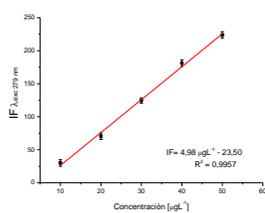
### 3.7.2 Linealidad del método para elución por RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.

Se realizó una curva de calibración en matriz blanco de la elución de los analitos con la fase Oasis HLB® de acuerdo a los parámetros optimizados según la metodología descrita en el procedimiento 2.8. Como se muestra en la Figura 49.

a)



b)



c)

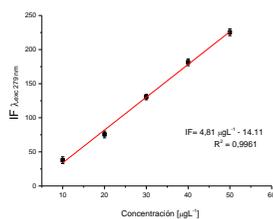


Figura 49. Espectros de emisión clásico de elución en muestra blanco enriquecida con EFX y CFX en presencia de OTC. b) Regresión lineal de la curva de calibración EFX y  $slit_{exc-em}$  10-10 nm y c) Regresión lineal de la curva de calibración CFX y  $slit_{exc-em}$  10-10 nm.

Tabla 14. Parámetros analíticos de EFX, CFX en muestra blanco para elución RDSE.

Parámetros Analíticos	EFX	CFX
Longitud de onda de excitación (nm)	279	279
$Slit_{exc/em}$	10/10	10/10
Longitud de onda analítica (nm)	438	417
Regresión lineal	IF = 4,88C ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) - 18,50	IF=5,81 ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) - 15,11
Coefficiente de correlación ( $R^2$ )	0,9937	0,9941
Límite de detección ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	3,56	3,48
Límite de cuantificación ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	9,33	9,43
Intervalo de concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	9,33-95,0	9,43-110,0

De los resultados de la Tabla 14 se observó una relación lineal de la curva de calibración obtenida a partir de las muestras blancos con un satisfactorio valor de  $R^2$  ajustado, cabe destacar que al comparar las pendientes y los parámetros analíticos obtenidos a partir de la matriz blanco con los de estándares no se presentó diferencias significativas, ya que no ocurre ninguna variación, formación o desplazamiento en la bandas espectral; por lo tanto, los datos son factibles de utilizar para realizar la validación del método utilizando esta matriz.

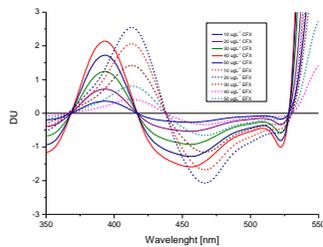
Se estudió un rango de longitudes de onda de excitación para encontrar la óptima que permitiera la determinación simultánea de analitos. Se seleccionó 279 nm como longitud de onda de excitación óptima para proporcionar una diferencia y resolver los espectros para realizar la determinación. Los extractos EFX, CFX y OTC se evaluaron directamente después desorción con

RDSE restado del blanco. Teniendo en cuenta que las bandas se superponen considerablemente, se utilizó espectrofluorimetría derivada, ya que permite la resolución de las mezclas, aumentando la selectividad del método y de esta forma hace factible la determinación simultánea de ambos antibióticos.

Para la determinación simultánea se utilizó espectrofluorimetría derivada mediante *zero crossing*, en la que se estudiaron las variables espectrales. Al respecto, la primera y segunda derivadas son de mayor interés analítico, pues perturban en menor medida la sensibilidad, ya que al aumentar el orden de la derivada disminuye la intensidad de la señal, sin embargo, la resolución espectral obtenida es mayor [34].

Se logra determinar simultáneamente EFX y CFX en presencia de OTC derivando los espectros clásicos debido a que existe una diferencia mayor a 3 nm en su longitud de onda de emisión, además que oxitetraciclina no emite a una longitud de onda de excitación de 279 nm, como se muestra en las Figuras 50 los de EFX y CFX. Los parámetros analíticos se presentan en la tabla 15. Los espectros derivados se basaron en el modelo matemático de Savitzky Golay y se obtuvieron utilizando los resultados de software FL acopladas al espectrofluorímetro. Este método consiste en la evaluación de la relación  $IF / \Delta\lambda$  correspondiente a una columna de intensidad de fluorescencia y un intervalo de barrido  $\Delta\lambda$  constante (expresado en nm) utilizando resolución de mínimos cuadrados para diferenciación, lo que favorece la reducción del ruido de fondo [34]. Cuando se utiliza este método, se deben optimizar diferentes variables espectrales. Para seleccionar el orden derivado, se deben considerar la máxima resolución y sensibilidad sin sacrificar la relación señal / ruido.

a)



b)

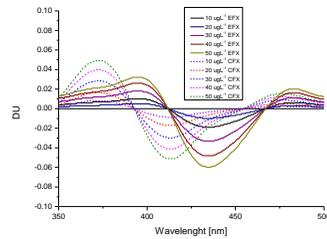


Figura 50. Espectros de emisión de elución de a) primer orden b) segundo orden de derivada en muestra blanco enriquecida con EFX y CFX en presencia de OTC.

La Figura 50 muestra que las primeras derivadas permitieron determinar EFX y CFX mediante *zero crossing*. El factor de suavizado es el número de puntos utilizados para la diferenciación, que depende directamente del rango de longitud de onda utilizado. A medida que aumenta este factor, las alturas de las derivadas disminuyen y también se observa una clara reducción del ruido. Además, el factor de amplificación incrementó la señal analítica y el ruido de fondo en la misma proporción. Este factor solo afecta al logro de una buena lectura de la señal analítica ya que no aumenta la sensibilidad. Es necesario lograr un compromiso entre la amplificación de la señal y el efecto de distorsión en las bandas espectrales, porque si la señal se amplifica en exceso, el espectro puede distorsionarse y provocar una lectura errónea.

De acuerdo a la Figura 50 se seleccionó la primera derivada privilegiando la relación señal/ruido y un factor de amplificación de 100.

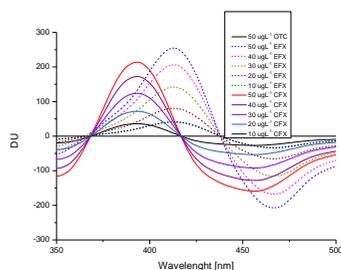


Figura 51. Espectro de primera derivada para EFX, CFX y OTC en metanol a diferentes concentraciones de analito.

Como puede verse en la Figura 51, las derivadas de primer orden presentan áreas características para cuantificar CFX y EFX en presencia de OTC. Además, se observó una buena linealidad de las señales con la concentración de analito. La determinación se realizó utilizando *zero crossing* en la primera derivada. Las longitudes de onda que se pueden utilizar para la determinación simultánea por *zero crossing* fueron 417 nm para EFX y 438 nm para CFX, porque proporcionaron más sensibilidad y un menor ruido de fondo. El incremento en el orden de la derivada se descartó porque dio como resultado un aumento del ruido y una disminución de la sensibilidad. El factor de suavizado fue de 95 puntos y se seleccionó un factor de amplificación de 100, ambas opciones proporcionadas por el software FL Solutions.

Tabla 15. Parámetros analíticos de EFX, CFX en muestra blanco para elución RDSE.

	EFX	CFX
Longitud de onda de excitación (nm)	279	279
<i>Slit</i> exc/em	10/10	10/10
Longitud de onda analítica (nm)	455,0	411,5
Regresión lineal	UD = 1,01C (µg·L <sup>-1</sup> ) - 2,8	UD =6,5 C(µg·L <sup>-1</sup> ) - 2,5
Coefficiente de correlación (R <sup>2</sup> )	0,9945	0,9891
Límite de detección (µg·L <sup>-1</sup> )	2,06	3,34
Límite de cuantificación (µg·L <sup>-1</sup> )	10,24	11,43
Intervalo de concentración (µg·L <sup>-1</sup> )	10,24-83,2	11,43-86,4

### 3.7.3 Selectividad del método para elución por RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.

La muestra blanco se trató con el procedimiento descrito en la sección 2.6.2 que eliminó interferencia de parte de la matriz de leche en la señal analítica lo que se describe en la sección 3.5.2. y fue corroborado por elución. Por lo dicho con anterioridad se estudia el límite de tolerancia que presenta el método frente al resto de analitos estudiados.

Tabla 16. Límite de tolerancia de EFX, CFX y OTC frente a interferentes.

Interferentes [µg·L <sup>-1</sup> ]	Límite de tolerancia 10 µg·L <sup>-1</sup> EFX	Límite de tolerancia 10 µg·L <sup>-1</sup> CFX	Límite de tolerancia 10 µg·L <sup>-1</sup> OTC
EFX	-	150	200
CFX	150	-	200
OTC	150	150	-

Por último, como se muestra en la Tabla 16 los límites de tolerancia frente a otros analitos presente en la muestra son mejorados en comparación con el método directo por RDSE. Con base a las observaciones anteriores, es posible indicar que el método desarrollado basado en la elución del

analito, es una metodología sensible, de fácil desarrollo y simple; además con los valores obtenidos permitiría la determinación de EFX y CFX en muestras de leche.

### 3.7.4 Precisión y exactitud método para elución por RDSE para EFX, CFX y OTC por espectrofluorimetría.

La precisión del método de evaluó aplicando el procedimiento experimental 2.9.1 Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 17 y 18 para los analitos en estudio.

Tabla 17. Precisión y exactitud de la medición de la elución de EFX con fase Oasis HLB® por espectrofluorimetría.

EFX			
"Intra day"			
Concentración [µg·L <sup>-1</sup> ]	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	9,88	98,80	3,8
30	30,02	100,06	2,9
50	49,89	99,78	3,5
"Inter day"			
Concentración [µg·L <sup>-1</sup> ]	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	10,11	101,10	3,3
30	29,99	99,97	2,7
50	50,05	100,10	2,8

Tabla 18. Precisión y exactitud de la medición de la elución de EFX con fase Oasis HLB® por espectrofluorimetría.

CFX			
"Intra day"			
Concentración [µg·L <sup>-1</sup> ]	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	10,05	100,5	3,3
30	29,95	99,8	2,4
50	50,13	100,3	2,6
"Inter day"			
Concentración [µg·L <sup>-1</sup> ]	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
10	9,97	99,7	3,6
30	29,89	99,6	2,8
50	50,07	100,1	3,3

De los resultados obtenidos se encontró para la cuantificación de EFX y CFX en presencia de OTC una recuperación en un intervalo desde 98,8 hasta 101,1% con una desviación estándar relativa menor al 5%, estos datos indican un método preciso y exacto análogo a la validación realizada para EFX, CFX y OTC en muestras blanco de leche utilizando el sistema RDSE directo.

### 3.7.5 Aplicación del método.

El método propuesto se aplicó en muestra de supermercado marca colun. Las concentraciones determinadas por sobre la base de la adición estándar de los analitos en estudio se

presentan en la Tabla 19. Las muestras fueron enriquecidas con el nivel medio de concentración correspondiente a 30 µg·L<sup>-1</sup>.

Tabla 19. Porcentajes de recuperación de EFX, CFX y OTC en leche comercial por elución RDSE.

Analitos	Concentración encontrada [µg·L <sup>-1</sup> ]	Recuperación (%)	DER (%)
<b>EFX</b>	30,01	100,03	1,5
<b>CFX</b>	29,96	99,87	1,7
<b>OTC</b>	30,13	100,43	1,6

Con los datos obtenidos y mostrados en la Tabla 19 se corrobora que no se encuentra presencia de analitos en el lote de leches analizadas, tal como en la sección 3.5.5.

En el contexto de la química verde, se puede ponderar cuán amigable es el método de análisis con el medio ambiente. Se pondera su eco-escala [35] determinada por la suma de los puntos de penalización (PPs), ponderados en cada etapa del proceso, donde el valor de la eco escala se expresa como se muestra en la ecuación 7: En la tabla 12 se observa las ponderaciones del método.

$$\text{Escala Eco analítica} = 100 - \text{total de puntos de penalización} \quad \text{Ecuación 9}$$

Un valor de eco escala >50 se cataloga como un nivel verde aceptable,

>75 como un nivel verde excelente

<50 presenta un inadecuado nivel verde.

Tabla 20. Puntaje eco-escala para los métodos RDSE propuestos.

	Método RDSE directo	Método RDSE elución
<b>Reactivos</b>	Puntos de penalización	Puntos de penalización
Ácido cítrico	1	1
Fosfato ácido de potasio	0	0
EDTA	1	1
Ácido tricloroacético	4	4
Metanol		6
<b>Instrumental</b>	Puntos de penalización	Puntos de penalización
Centrífuga	1	1
Espectrofluorímetro	0	0
Agitador	1	1
Riesgo	0	0
desechos	5	10
<b>Total de puntos</b>	<b>12</b>	<b>24</b>
<b>Puntaje Eco escala Analítica</b>	<b>88</b>	<b>76</b>

Según el total de puntos obtenidos presentado en la tabla 20 y por medio de la ecuación 9 el valor de la escala eco corresponde a un valor de 88 para RDSE medida la fase directa y de 76 para RDSE elución, lo que se cataloga como un método con un nivel verde excelente para ambos casos.

El nuevo método propuesto no requiere disolventes orgánicos para extracciones cuantitativas y, en consecuencia, no genera residuos tóxicos. El método desarrollado tiene una calificación de nivel verde excelente, según la ecoescala propuesta por Galuszka et al [35]. Finalmente,

el método propuesto se comparó con los reportados para fluoroquinolonas en muestras de leche (Tabla 21) mostrando varias mejoras como rapidez, menor volumen de muestra, bajo costo y fácil operación. Esto último, particularmente en la simplicidad y automatización del proceso de extracción en comparación con SPE y DLLME. Además, la no utilización de disolventes orgánicos en la etapa de desproteinización hace que el método sea ecológico.

Tabla 21. Comparación del método propuesto RDSE con otras preparaciones de muestra.

Método	Analitos	Técnica	Solventes usados en Extracción/desorción	Volumen de muestra (mL)	Puntaje total escala analítica	LOD ( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	Recuperación (%)	RSD (%)	Ref.
SPE-C18	Enrofloxacin Ciprofloxacino	HPLC-FD	TFA/ACN/MEOH	5	69	2.02-2.28	95.9-99.7	0.03-0.94	14
SPE-Oasis HLB	Antibióticos	LC-HRMS	MCILVAINE BUFFER / HEXANE /METHANOL	5	74	10-15	88-99	<20	25
SO-DLLME-DES-BE	Sparfloxacin Gatifloxacin Enrofloxacin Ciprofloxacino Lomefloxacin Levofloxacin	MECC-UV	N-DECANOIC ACID/METHYLTRIOCTYL AMMONIUM BROMIDE	150	84	6-10	87.8-114.1	<7.6	8
MPFS-DID	Fleroxacin Lomefloxacin Norfloxacin Ofloxacin	HPLC-UV	ETOH/HCl/HEXANO/ACN/ NH <sub>4</sub> OH/MEOH	0.5	80	30	70-75	5-8	26
RDSE elución Oasis HLB	Enrofloxacin Ciprofloxacino Oxitetraciclina	Espectro fluorimetría	MCILVAINE BUFFER/ METHANOL	5	76	2.06-3.34	98.8-100.3	2.6-3.8	Tesis
RDSE directa Oasis HLB			MCILVAINE BUFFER	5	88	3.36-9.37	98.2-100.5	1.5-3.8	Tesis

## CONCLUSIONES.

Las estrategias en la preparación de muestra permitieron desarrollar un método de extracción para cuantificar EFX, CFX y OTC mediante RDSE en matriz de leche obteniendo resultados de calidad analítica utilizando espectrofluorimetría de emisión.

Se realizaron estudios de las variables químicas e hidrodinámicas para los analitos representantes de las familias de las fluoroquinolonas y tetraciclinas, EFX y OTC, respectivamente. Estos resultados entregaron condiciones óptimas de trabajo: pH 4, tiempo de extracción de 120 min, volumen de solución de muestra de 25 mL y una velocidad de rotación de 2.200 rpm. Las variables espectrales óptimas seleccionadas fueron; longitud de onda de excitación de 380 nm y  $\lambda_{\text{exc-em}}$  de 10-10 nm.

En la extracción de los EFX, CFX y OTC se utilizó buffer McIlvaine-EDTA 0,3M pH 4 con el objetivo de mantener el pH de trabajo óptimo, además de contrarrestar alguna posible interferencia de parte del calcio presente en la muestra blanco de leche. Se realizó una curva de calibración obteniendo una correlación entre las concentraciones y la intensidad de fluorescencia, además de sus parámetros analíticos. La muestra blanco de leche se trató centrifugando por 30 min. con 5 mL de ácido tricloroacético 10% para precipitar proteínas y grasa. Se logró evitar cualquier posible interferencia presente en la muestra, espectralmente no presentó corrimiento e interferencia en la señal por lo que se realizó las curvas correspondientes en muestra blanco de leche fortificada con los analitos en estudio. Se lograron porcentajes de recuperación entre los  $98,3 \pm 3,5\%$  y  $101,1 \pm 3,0\%$ .

Se realizó la comparación con otra preparación de muestra, se utilizó el sistema de d-SPE donde la gran diferencia es no la utilización del dispositivo RDSE. Es decir, la fase queda

depositada en el mismo vial pero no contenida en el dispositivo RDSE. Al comparar los resultados obtenidos de ambas preparaciones de muestra los límites obtenidos son del mismo orden no siendo alterados (Tabla 3), aunque el porcentaje de recuperación se ve favorecido en 10 % atribuido a una mayor recirculación de la muestra. Pese al aumento que existe en el porcentaje de recuperación se privilegia el dispositivo RDSE frente a la d-SPE por el manejo de la fase el que es crucial en la preparación de muestra previo a la medición instrumental, especialmente en muestras complejas. Además, los límites obtenidos por RDSE están dentro de métodos reportados.

El método propuesto se aplicó en muestra de supermercado marca colun. De acuerdo a las recuperaciones obtenidas y presentadas en la Tabla 9 no se encuentra presencia de analitos en el lote de leches analizadas.

Por último, como una estrategia alternativa de determinación de los analitos se realizó la elución del dispositivo RDSE. Para llevar a cabo este procedimiento se optimizaron las variables involucradas, siendo 12,5 mL de metanol como solvente de elución por 15 minutos. Con las variables ya optimizadas se procedió a realizar las curvas de calibración para validar el método y se logra determinar simultáneamente EFX y CFX en presencia de OTC derivando los espectros clásicos a segunda derivada privilegiando señal/ruido debido a que existe una diferencia mayor a 3 nm en su longitud de onda de emisión se puede obtener *zero crossing*, además que oxitetraciclina no emite a la longitud de onda de excitación de 279 nm, como se muestra en las Figuras 49. Además, al comparar los valores LD y LC obtenidos (Tabla 10) con los de otros métodos reportados en literatura se encuentran entre 3 y 4 veces menores. Con base en los resultados es posible indicar que el método desarrollado basado en la medición directa y elución del analito, son metodologías sensibles, de fácil desarrollo y simples; además con los valores obtenidos permitiría la determinación de EFX y CFX en muestras de leche.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Agudelo-Londoño PA, Rivera-Caycedo JE, Bernal-Vera ME, Castaño-Ramírez E (2012) Caracterización del riesgo de contaminación por actividades pecuarias en el río Molinos , Villamaría (Caldas, Colombia). *Vet y Zootecnia* 6:56–82.
2. Cañada-Cañada F, Espinosa-Mansilla A, de la Peña AM (2007) Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: application to pharmaceuticals and ofloxacin determination in urine. *J Sep Sci* 30:1242–1249.
3. Lynas L, Currie D, McCaughey WJ, McEvoy JD, Kennedy DG (1988) Contamination of animal feedingstuffs with undeclared antimicrobial additives. *Food Addit Contam* 15:162–70.
4. Lolo M, Pedreira S, Fente C, Vázquez BI, Franco CM, Cepeda A (2005) Study of enrofloxacin depletion in the eggs of laying hens using diphasic dialysis extraction/purification and determinative HPLC-MS analysis. *J Agric Food Chem* 53:2849–2852.
5. Agency EM (2014) European public MRL assessment report ( EPMAR ) European public MRL assessment report ( EPMAR ) Summary of the scientific discussion for the establishment of. 44:0–18.
6. Leng F, Zhao XJ, Wang J, Li YF (2013) Visual detection of tetracycline antibiotics with the turned on fluorescence induced by a metal-organic coordination polymer. *Talanta* 107:396–401.
7. Hernando MD, Mezcuca M, Fernández-Alba AR, Barceló D (2006) Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and

sediments. *Talanta* 69:334–342.

8. Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin Y-F, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI (2009) Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *J Environ Qual* 38:1086.
9. Companyó R, Granados M, Guiteras J, Prat MD (2009) Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Anal Bioanal Chem* 395:877–891.
10. The European Commission (2010) Commission Regulation (EU) N° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J Eur Union* L15:1–72.
11. Codex Alimentarius (2014) Maximum residue limits (mrls) and risk management recommendations (rmrs) for residues of veterinary drugs in foods updated as at the 37th session of the codex alimentarius commission. 22.
12. Sumano H., Ocampo L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGram-Hill Interamericana. Capítulos 4-7. Pag 34-87.
13. Sumano H., Ocampo L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGram-Hill Interamericana. Capítulo 41. Pag 519-531.
14. (1996) Residues of some veterinary drugs in animals and foods. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. *FAO Food Nutr Pap* 41:1–166.
15. Samanidou VF, Christodoulou EA, Papadoyannis IN (2005) Direct determination of five fluoroquinolones in chicken whole blood and in veterinary drugs by HPLC. *J Sep Sci* 28:325–331.

16. Sumano H., Ocampo L. 1997. *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana. Capítulo 16. Pag 180-189.
17. Base de datos y simulador online. <http://www.chemicalize.org/>.
18. Traviesa-Alvarez JM, Costa-Fernández JM, Pereiro R, Sanz-Medel A (2007) Direct screening of tetracyclines in water and bovine milk using room temperature phosphorescence detection. *Anal Chim Acta* 589:51–58.
19. Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin Y-F, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI (2009) Fate and Transport of Antibiotic Residues and Antibiotic Resistance Genes following Land Application of Manure Waste. *J Environ Qual* 38:1086.
20. Lucena R (2012) Extraction and stirring integrated techniques: Examples and recent advances. *Anal Bioanal Chem* 403:2213–2223.
21. Simpson N. 2000. *Solid-phase extraction. Principles, Techniques, and Applications*. Taylor & Francis Group LLC. Pag 18-37.
22. Gabriela Islas, Israel S. Ibarra, Prisciliano Hernandez, Jose M. Miranda, and Alberto Cepeda. Dispersive Solid Phase Extraction for the Analysis of Veterinary Drugs Applied to Food Samples: A Review. *International Journal of Analytical Chemistry* Volume 2017
23. Giordano A, Richter P, Ahumada I (2011) Determination of pesticides in river water using rotating disk sorptive extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 85:2425–2429.
24. Nigel JKS (2001) *Solid phase extraction; principles, techniques and applications*. 354.
25. Cañas A, Richter P, Escandar GM (2014) Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon-attached rotating disks. Simultaneous determination of

polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences. *Anal Chim Acta* 852:105–111.

- 26 B. Magnusson, U. Örnemark, *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, 2nd ed., Eurachem, 2014. [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org).
- 27 superintendencia de servicios sanitarios, *Calidad del Agua. Muestreo.*, in: *Man. Oper. LA NORMA MUESTREO AGUASRESIDUALESNCH 411/10 – 2005*, 1 st, santiago, 2010: p. 30.
- 28 M. L. Castillo-García, M. P. Aguilar-Caballo, and A. Gómez-Hens, “A europium- and terbium-coated magnetic nanocomposite as sorbent in dispersive solid phase extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography for antibiotic determination in meat samples,” *Journal of Chromatography A*, vol. 1425, pp. 73–80, 2015.
29. Meixia Chen, Fang Wen, Hui Wang, Nan Zheng and Jiaqi Wang, "Effect of various storage conditions on the stability of quinolones in raw milk", *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, vol. 1147-54, 2016.
- 30 Dairy processing handbook. The chemistry of milk. Chapter 2.

31. Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Página 100-105.
32. A. Posyński, J. Zmudzki, and K. Mitrowska, "Dispersive solidphase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography," *Journal of Chromatography A*, vol. 1087, no. 1-2, pp. 259–264, 2005.
33. I. S. Ibarra, J. A. Rodríguez, M. E. Páez-Hernández, E. M. Santos, and J. M. Miranda, "Determination of quinolones in milk samples using a combination of magnetic solid-phase extraction and capillary electrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 33, no. 13, pp. 2041–2048, 2012.
34. S. Abraham, Golay Marcel J.E, Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures, 36 (1964) 1627–1639.
35. Agnieszka Galuszka, Piotr Konieczka, Zdzisław M. Mięszewski, Jacek Namieśnik. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 37, 2012
36. D. Skoog, J.F. Holler, T.A. Nieman, Introducción a la espectrometría por absorción molecular ultravioleta-visible. Aplicaciones, in: *Principios Análisis Instrum.*, 5th ed., McGraw Hill/ Interamericana de España, Madrid, 2001: pp. 322–380.
37. López de Alba P. y López Martínez L., 1993. "Una introducción a la espectrometría de derivadas" *Educación química* 4, volume 3, page 160-170.
38. Savitzky A. y Golay M. 1964. Smoothing and Differentiation of Data by Simplified Least Squares Procedures. *Anal. Chem.* 36, page 1627-1639.
39. Toral M., Orellana S., Saldías M., Soto C. 2009. Strategies used to develop analytical methods for simultaneous determination of organic compounds by derivative spectrophotometry.

Quím. Nova vol.32 no.1, page 257-262.

40. Cañas, A., Richter Duk, P. y Escandar, G. (2014). Espectroscopía de fluorescencia de emisión de excitación asistida por quimiometría en discos rotativos unidos a nylon. Determinación simultánea de hidrocarburos aromáticos policíclicos en presencia de interferencias.

## ANEXOS.

### 6.1 Preparación de estándares y reactivos.

#### 6.1.1 Analitos en estudio.

En un matraz de aforo de 250 mL se agregó  $0,90 \pm 0,01$  mg del analito y se aforó con metanol, obteniendo una concentración final de  $3,6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .

#### 6.1.2 Ácido clorhídrico.

En un matraz de aforo de 500 mL se agregó 41,39 mL de HCl y se aforó con agua destilada, obteniendo una concentración final 1 M. De esta solución se prepararon las diferentes concentraciones ocupadas.

#### 6.1.3 Hidróxido de sodio.

En un matraz de aforo de 500 mL se agregó 20 g de NaOH y se aforó con agua destilada, obteniendo una concentración final 1 M. De esta solución se prepararon las diferentes concentraciones ocupadas.

#### 6.1.4 Amortiguador McIlvaine-EDTA 0,3 M pH 4.

En un matraz de aforo de 500 mL se agregó 26,69 g de fosfato disódico dihidratado y se aforó con agua destilada. Por otro lado, se agregó 31,52 g de ácido cítrico monohidratado en agua y se aforó con agua destilada. Ambas soluciones se mezclaron en la siguiente proporción: 500 mL de fosfato disódico con 320 mL de la solución de ácido cítrico y se comprobó que el pH fuese  $4,0 \pm 0,1$ . Por último se agregó 2,65 g de EDTA a la solución.

## 6.2 Estudio de fases sorbentes.

### 6.2.1 Nylon.

Por trabajos reportados del nylon como una fase óptima para ser medida directamente por fluorescencia [33], se realizó el estudio de los analitos OTC y EFX como representantes de la familia de las tetraciclinas y fluoroquinolonas, respectivamente y se obtuvieron las recuperaciones mostradas en la Tabla 22.

Tabla 22. Porcentajes de recuperación de a) OTC y b) EFX. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y *slit*  
exc-em 10-10 nm.

Analitos	pH	$\lambda_{\text{exc}}$ [nm]	$\lambda_{\text{em}}$ [nm]	IF	IF	% en	%
				estándar	Extracción	solución	recuperación
a) OTC	2	365	450	2,823	7,11	251,86	-151,86
	4		420	46,62	45,37	97,34	2,68
	6		460	2,561	11,17	436,16	-336,16
	8		450,5	9,84	45,3	460,46	-360,46

	10		450	7	15,51	232,57	-132,57
	12		455	6,624	34,52	521,14	-421,14
b) EFX	2	279	450	976,4	941,1	96,38	<b>3,62</b>
	4		448	4649	3588	77,18	<b>22,82</b>
	6		414	822,2	974,2	118,49	-18,49
	8		313,5	213	373,3	175,26	-75,26
	10		426	689	615,3	89,30	<b>10,70</b>
	12		409	82,82	350,3	422,97	-322,97
	10		345	31,5	33,23	105,49	-5,49
	12		365	35,7	51,3	143,70	-43,70

Como se muestra en la Tabla 22, se obtiene una respuesta positiva al no presentar mayor interferencia para EFX a pH 2, 4 y 10. El resto de los valores negativos pueden ser atribuidos a que después de la extracción la fase desprende parte de ella y posiblemente se produce una interacción entre el analito y la fase. Por eso con intención de optimizar la extracción de los analitos se realizan otros experimentos con el objetivo de disminuir las posibles interferencias. Es así, que se realizaron ensayos de acondicionamiento de la fase para EFX que muestra los mejores valores positivos a pH 4 y 10 (Tabla 23 y 24).

Tabla 23. Extracción de EFX con acondicionamiento de la fase con solución ácida.

pH	$\lambda_{exc}$ [nm]	$\lambda_{em}$ [nm]	IF estándar	IF extracción	% en solución	% recuperación
4	279	440	13	28,49	219,15	-119,15
10	279	400	37,88	64,06	169,11	-69,11

Tabla 24. Extracción de EFX con acondicionamiento de la fase con metanol.

pH	$\lambda_{exc}$ [nm]	$\lambda_{em}$ [nm]	IF estándar	IF extracción	% en solución	% recuperación
4	279	440	13	35,66	274,31	-174,31
10	279	400	37,88	48,22	127,30	-27,30

Según la Tabla 23 y 24, el acondicionamiento de la fase no afecta en forma positiva la extracción. Debido a que los valores que se obtienen de la extracción sin acondicionamiento (Tabla 22b) para EFX son bajos pero mejores que los obtenidos realizando un previo acondicionamiento de la fase.

Se midió la fase de nylon directamente por espectrofluorimetría a la longitud de onda de excitación de 279 nm y a otras longitudes de onda no encontrándose una banda espectral con las condiciones que permita determinar los analitos en estudio, sin previo acondicionamiento, la que no presenta interferencia para EFX. En la Figura 52 se muestra la mejor señal que se logró obtener de la fase de nylon con los analitos respectivos a una longitud de onda de excitación de 279 nm.

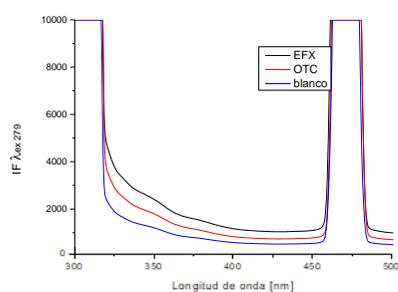


Figura 52. Espectros de emisión de EFX y OTC medido directamente en fase nylon con su respectivo blanco. *slit*<sub>exc-em</sub> 10-10 nm.

En resumen, por los porcentajes de recuperación obtenidos donde se muestra una interferencia después de la extracción atribuida principalmente al uso de solvente y /o soluciones ácidas, además de considerar los espectros de la Figura 52 donde las señales de EFX y OTC no presentan diferencia espectral que permita la determinación de los analitos se descartó la fase de nylon. Si bien se apostaba a lograr una respuesta positiva dado la estructura y características químicas del nylon y los analitos, la respuesta no fue así en comparación con otros estudios de nylon medido en fase directa. Se asocia a la polaridad de la molécula, ya que ha sido utilizado con analitos con un Log P>3 dando óptimos resultados. Esto se condice con la respuesta que se obtuvo frente a EFX a diferencia de OTC.

#### **6.2.2 BIO-RAD AG® 2-X8.**

La fase BIO-RAD AG® 2-X8, no presenta porcentajes de recuperación altos a excepción del representante de la familia de las tetraciclinas (OTC). A continuación, se presentan los espectros de OTC a diferentes longitudes de excitación con sus respectivos blancos, como se aprecia en la Figura 53.

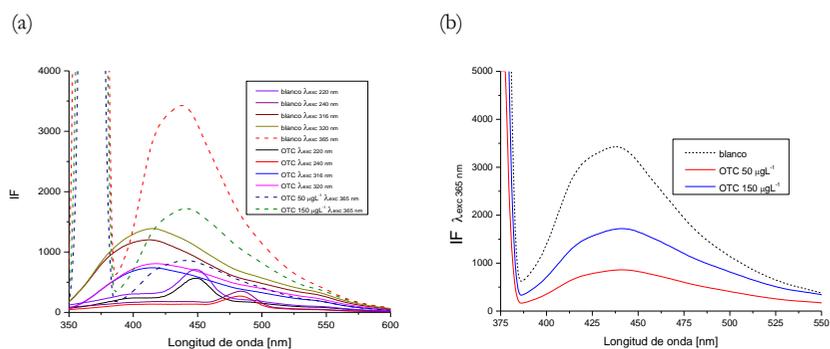


Figura 53. Espectro de emisión de OTC medidos directamente en fase BIO-RAD AG® 2-X8. a) a diferentes longitudes de onda de excitación y b) OTC extraída con BIO-RAD AG® 2-X8.

Concentraciones  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\lambda_{exc-em}$  10-10 nm.

Como se observa en la Figura 53 se midió la fase BIO-RAD AG® 2-X8 a diferentes longitudes de onda de excitación con el objetivo de encontrar una señal para cuantificar, pero las bandas espectrales de los blancos son mayores a las de oxitetraciclina, por lo que no se logró el objetivo propuesto. La fase presentó una longitud de excitación óptima a 365 nm, las concentraciones mostradas  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $150 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  siguen un comportamiento correlativo con la intensidad de fluorescencia, pero el blanco sigue presentando una señal con mayor intensidad de fluorescencia que el analito. Esto se puede atribuir a que la fase presenta tal rigidez que por sí sola su fluorescencia es alta, lo que está en concordancia con que a una mayor rigidez del compuesto su fluorescencia es mayor. Por lo mencionado, se descarta esta fase y se continúa con Anion-SR poli (estirenodivinilbenceno), la cual presenta mayor porcentaje de recuperación.

### 6.2.3 Anion-SR poli-(estirenodivinilbenceno).

Según la Figura 54, esta fase Anion-SR poli-(estirenodivinilbenceno), presentó un porcentaje de recuperación indirecto más alto para cada uno de los representantes de los analitos en estudio. Por

lo que se seleccionó para estudiar su conducta espectral por espectrofluorimetría, como se muestra en la Figura 54.

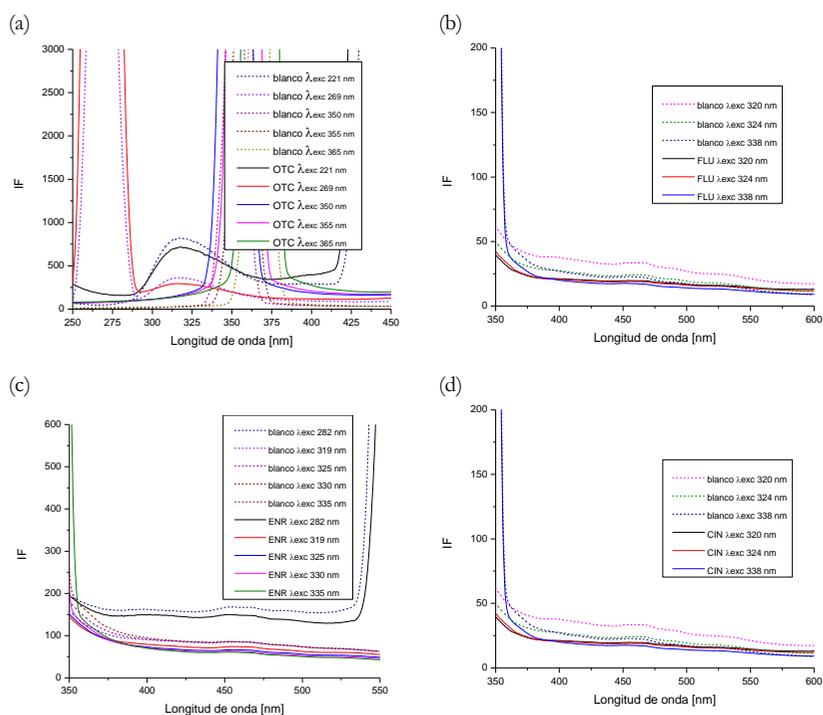


Figura 54. Espectros de emisión de los analitos medidos directamente en fase aniónica a diferentes longitudes de onda de excitación a) OTC, b) FLU, c) EFX y d) CIN. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 10 y  $\lambda_{exc-em}$  10-10 nm.

Como se puede observar en la Figura 54, la señal de la fase extraída con los analitos representativos excitados a diferentes longitudes de onda no es definida ni apta para cuantificar los analitos. La única señal que presenta la fase es a  $\lambda_{exc}$  221 y  $\lambda_{exc}$  269, como se puede observar en la

Figura 54a, pese a esto la señal de los blancos son mayores a las de los analitos. Por lo que esta fase también fue descartada.

### 1.1.1 SupelMIP® SPE-Fluoroquinolonas.

Se corroboró la selectividad de la fase SupelMIP® SPE-Fluoroquinolonas por medio de los datos obtenidos en la Figura 55, en la que se muestra que el representante de la familia de las tetraciclinas, OTC, es extraída sólo un 5%. Se midió la fase por espectrofluorimetría de los representantes de las familias como se muestra en la Figura 55.

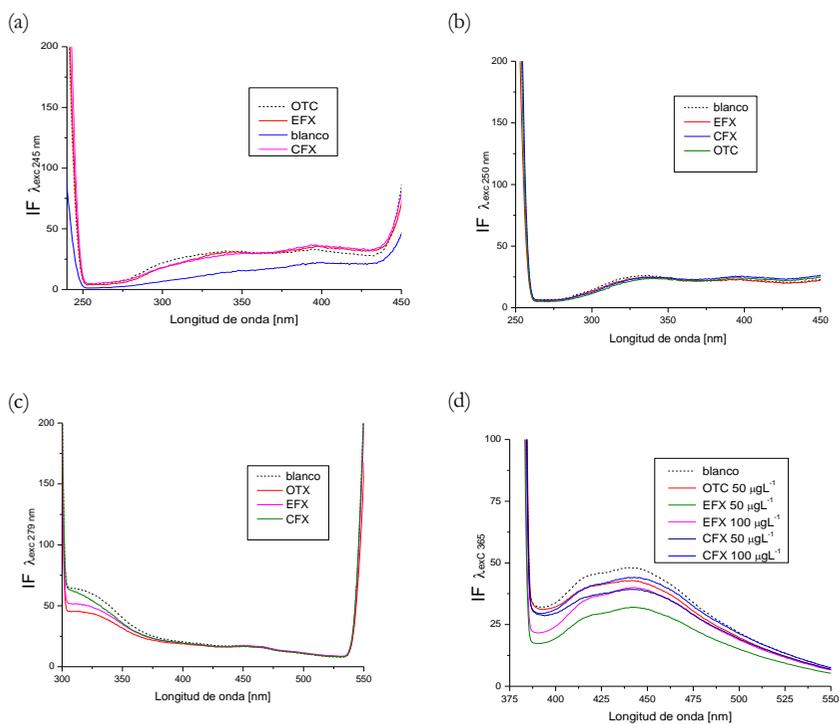


Figura 55. Espectros de emisión de los analitos medido directamente en la fase a diferentes longitudes de onda de excitación a) 245 nm, b) 250 nm, c) 279 nm y d) 365 nm. Concentración  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\text{slit}_{\text{exc-em}}$  10-10 nm.

Los representantes seleccionados de las respectivas familias, EFX, CFX y OTC a diferentes longitudes de ondas de excitación con sus respectivos blancos muestran que a  $\lambda_{\text{exc}}$  245 nm,  $\lambda_{\text{exc}}$  250 nm,  $\lambda_{\text{exc}}$  279 nm, los analitos no presentan una banda de emisión definida, también presentan una baja intensidad de fluorescencia, quedan bajo la señal de sus blancos, no logrando el objetivo de cuantificar los analitos. A  $\lambda_{\text{exc}}$  365 se observa una banda definida, la señal de los analitos también se encuentran bajo el blanco existiendo una correlación en sus concentraciones.

## 1.2 Fundamentos generales de las técnicas de Espectrofotometría UV-vis y Espectrofluorimetría.

La técnica de Espectrofotometría UV-visible está basada en la absorción de radiación electromagnética de las moléculas como consecuencia de la excitación de los electrones de enlace, provocando la transición del electrón desde el estado basal a un estado excitado; por lo tanto, los picos de absorción se pueden relacionar con el tipo de enlace que forma a la molécula. Es decir, mientras mayor es la energía incidente que se requiere para una determinada transición, menor es la longitud de onda de la radiación que se debe suministrar, por ello que las energías de excitación entre las transiciones electrónicas, principalmente en  $\pi \rightarrow \pi^*$  son medianamente altas absorbiendo en la región UV cercano (190 nm - 350 nm) y las transiciones  $n \rightarrow \pi^*$  que requieren menor energía, presentan una mayor longitud de onda absorbiendo en la región visible del espectro[36].

La espectrofotometría UV-vis. emplea como medida del fenómeno la absorbancia o  $A_{\text{bs}}$ , con la cual es posible determinar el contenido de diferentes especies orgánicas e inorgánicas a través del

uso de la Ley de Lambert-Beer, que determina una proporción lineal entre  $A_{bs}$  y la concentración de la disolución “C” como se observa en la ecuación 3, en donde b corresponde al paso óptico de la celda de medición y  $\epsilon$  al coeficiente extinción molar. Esta ley también es posible de utilizar en la determinación de más de un analito en una mezcla ya que la absorbancia total que presente la solución corresponderá a la suma individual de cada componente que participe en la composición; lo cual se conoce como la Ley de aditividad de absorbancia (Ecuación 4).

$$Abs = \epsilon b C \quad \text{Ecuación 3}$$

$$Abs_{Total} = Abs_1 + Abs_2 + \dots + Abs_n = \epsilon_1 b C_1 + \epsilon_2 b C_2 + \dots + \epsilon_n b C_n \quad \text{Ecuación 4}$$

Con el uso de la técnica espectrofotometría UV-vis. y las reacciones redox se monitoreará los experimentos cinéticos para la determinación de los analitos de interés, a través de la ley de Lamber-Beer que será utilizada en un tiempo  $t$  como se muestra en la ecuación 5; la cual se reescribir en términos del orden de reacción. Utilizando como ejemplo una reacción de primer orden se obtiene la expresión de la ecuación 6, expresión matemática que demuestra la factibilidad de medida directa y uso de la técnica de espectrofotometría UV-vis en términos cinéticos.

$$(Abs)_t = \epsilon b [A]_t \quad \text{Ecuación 5}$$

$$(Abs)_t = \epsilon b e^{-k't} [A]_0 = c [A]_0 \quad \text{Ecuación 6}$$

Mientras que la técnica anterior se basa en la medición del fenómeno de absorción la técnica de Espectrofluorimetría se fundamenta en el proceso fotoquímico de la fluorescencia, el cual es producto de la emisión de fotones de una especie química en los procesos de relajación molecular, desde estados electrónicos excitados ( $S_1, \dots, S_n$ ) hacia estados fundamentales o basales ( $S_0$ ), en donde no ocurre un cambio de *spin* durante la transición electrónica; razón por la cual, el proceso posee un tiempo vida media cortos ( $10^{-8}$  a  $10^{-4}$  s) al dejar de incidir radiación.. La fluorescencia y la

fosforescencia son dos manifestaciones diferentes del fenómeno fotoluminiscente. Estos dos efectos difieren entre sí en el mecanismo a través del cual son producidos, además del tiempo de duración de la fotoluminiscencia una vez que ha cesado de excitarse la muestra con radiación electromagnética. La fluorescencia cesa casi inmediatamente después de que a la muestra se le suspende la radiación (<10-6 s), mientras que la fosforescencia puede durar varios segundos o minutos en iguales circunstancias. La fluorescencia no está restringida a un estado físico determinado de la materia, ésta puede existir en: gases, sólidos o líquidos.

Los compuestos que generalmente presentan fluorescencia son conocidos como fluoróforos intrínsecos, los cuales presentan grupos funcionales de los tipos aromáticos, heterociclos aromáticos con anillos fusionados o dobles enlaces múltiples o conjugados. Sin embargo, existen moléculas y átomos, con excepción de los lantánidos, que no presentan por sí mismos fluorescencia y requieren fluoróforos externos para su medición. Por lo tanto, para poder medir este fenómeno se debe tener en cuenta esto y los factores que favorecen y desfavorecen la medida de intensidad de fluorescencia, ya que al igual que en Espectrofotometría UV-vis. los factores como concentración, temperatura, pH, solvente y fuerza iónica afectan la señal analítica y además en el caso de Espectrofluorimetría se deben considerar también los factores de oxígeno disuelto en la muestra y la rigidez estructural.

La aplicación analítica de la espectrofotometría clásica, se encuentra desfavorecida en aquellos sistemas donde diferentes analitos absorben en zonas cercanas, produciéndose interferencias por solapamiento de bandas, trayendo consigo alteraciones de la señal espectrofométrica, debido a la presencia de bandas no resueltas.

Con el fin de solucionar los problemas planteados, se introdujo, la espectrofotometría derivada, con la cual es posible obtener la estructura fina de bandas espectrales. La técnica, está basada en el uso de espectros derivados resultantes de la derivación de los espectros clásicos de absorción UV - Vis, de orden cero ( $D^0$ ):

$$D^n = d^n A / d^n \lambda \quad \text{Ecuación 7}$$

Es importante señalar que todas las leyes establecidas en la espectrofotometría clásica [37] se conservan al derivar los espectros, por lo cual la ley de aditividad se mantiene, los espectros derivados de una mezcla son la suma de los espectros derivados de cada componente:

$$D^n_{mezcla} = D^n_1 + D^n_2 + \dots + D^n_n \quad \text{Ecuación 8}$$

Donde  $D^n_{mezcla}$  es la suma  $D^n_1, D^n_2, D^n_n$  corresponden a los valores de la señal analítica de cada componente y  $n$  el orden derivada.

Una de las modalidades de la espectrofotometría derivada digital, está basada en el modelo matemático propuesto por Savitzky y Golay[37], en donde la derivación y suavizado del espectro se realiza por la resolución de un polinomio mediante los mínimos cuadrados. Esta técnica, toma en consideración sólo una columna de valores de absorbancias y  $\Delta\lambda$  corresponde al rango de barrido del espectro original.

Emplear espectrofotometría derivada en el análisis químico, trae asociado optimizar variables espectrales tales como: factor de suavizado, factor de escala, orden de derivada y longitud de onda analítica.

El factor de suavizado, es entregado por defecto por el “software” y tiene importantes efectos en los espectros derivados. El aumento del suavizado privilegia la precisión disminuyendo el ruido, pero al mismo tiempo y como consecuencia se genera una disminución de la sensibilidad por disminución de la señal analítica. Cuando se aplica el suavizado al análisis cuantitativo, la distorsión de los datos tiene un efecto mínimo sobre los resultados cuantitativos, ya que los errores de distorsión

tienden a anularse cuando las muestras y los patrones se suavizan de la misma forma [28]. En general, la selección de este factor se basa en obtener una buena sensibilidad del método sin sacrificar una buena relación señal/ruido.

El factor de escala, tiene como objetivo solamente facilitar la lectura de la señal, permitiendo obtener valores en forma precisa y adecuada para fines analíticos; este efecto no genera alteraciones en los resultados. Al amplificar la señal, la sensibilidad y el ruido de fondo aumentan en la misma proporción, por lo que los límites de detección y cuantificación permanecen inalterados.

En cuanto al orden de la derivada espectral, los espectros pueden ser derivados en más de un orden, siendo posible emplear desde la primera hasta la cuarta derivada (Figura 56), la que será seleccionada de acuerdo a la complejidad o información que se desee obtener. En este aspecto, la primera y segunda derivada son de mayor interés analítico, debido a que perturban en menor grado la sensibilidad [38], ya que al incrementar el orden de la derivada disminuye la intensidad de la señal, no obstante, la resolución espectral obtenida es mayor. En la selección del orden de la derivada, se debe considerar que existan zonas de absorción características para cada analito.

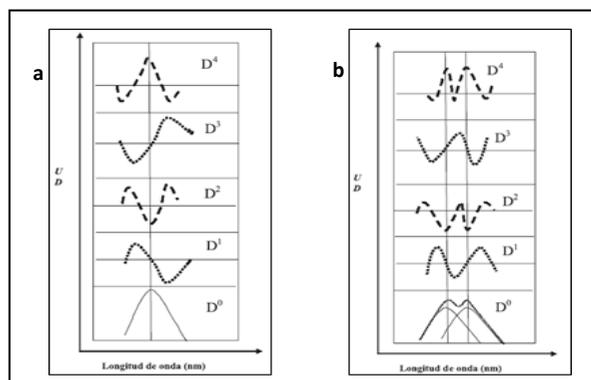


Figura 56: a) Representación gráfica de un espectro clásico D0 y de espectros derivados de primer a cuarto orden, Dn (n=1, 2,3,4). b) espectro clásico y derivados de una mezcla de analitos.

A continuación, se describen las características de las derivadas espectrales de acuerdo al orden:

- **Primera derivada:** Los puntos de inflexión del espectro clásico dan origen a un máximo y a un mínimo. El valor cero corresponde a la posición del máximo de absorción del espectro normal.
- **Segunda derivada:** Los puntos de inflexión del espectro original, se convierten en máximos, y el máximo de absorción en mínimos. La segunda derivada, generalmente, proporciona mayor información de la estructura fina del espectro, sin embargo, la sensibilidad disminuye.
- **Tercera derivada:** La tercera derivada transforma el mínimo y un máximo de la primera derivada, en un máximo y un mínimo respectivamente.
- **Cuarta derivada:** Esta derivada presenta un máximo que coincide con el espectro clásico. Son más resueltas, pero presentan un alto ruido de fondo, trayendo consigo una disminución de la relación señal/ruido.

La determinación de la señal analítica consiste en realizar la cuantificación en una determinada longitud de onda en donde el analito A presenta un valor cero en la línea de base, es decir cruza el eje X, así se utiliza el valor absoluto de la UD del analito B, con lo cual se atribuye toda la absorbancia presente a esa longitud de onda al analito B (Figura 57). Para utilizar este método es necesario optimizar las variables espectrales, mencionadas anteriormente, de tal forma que los espectros entreguen los puntos necesarios para la determinación simultánea. Para utilizar esta técnica se requiere que exista una diferencia mínima de 3 nm de longitud de onda entre los picos máximos de las señales [39]. Esto se extiende para espectrofluorimetría.

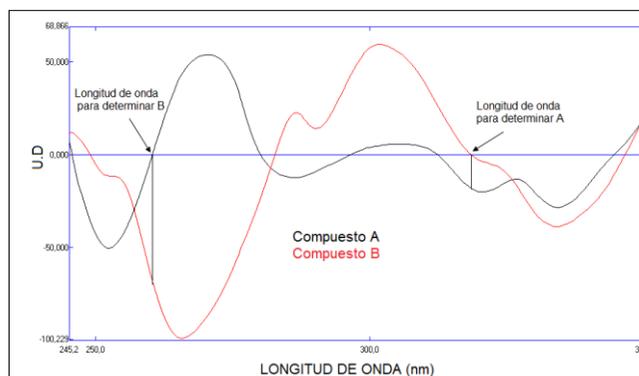


Figura 57. Métodos de “zero-crossing”.

En Espectrofluorimetría se registran tantos espectros de excitación y emisión, sin embargo, el que dará la información analítica cuantitativa y cualitativa remitidas al fenómeno en cuestión serán estos últimos. Por lo tanto, para la obtención de estos se debe excitar la muestra a una determinada longitud de onda de excitación y luego de la obtención del espectro de emisión registrar la longitud de onda analítica. Y considerando que la intensidad de luz emitida ( $[Int]_i$ ) por las especies fluorescentes también son dependientes de la concentración; comportamiento explicado también por la Ley de Lambert-Beer.

La espectrofluorimetría es una técnica ampliamente utilizada en el desarrollo de métodos para la determinación de antibióticos [40]. Uno de los aspectos más atractivos de la fluorescencia es

su sensibilidad inherente, con límites de detección que son a menudo tres órdenes de magnitud más pequeños que los encontrados en la espectroscopía de absorción molecular. Los límites de detección típicos son del orden de partes por billón.

En química analítica la aplicación de estos fenómenos está restringida a la fluorimetría, que consiste en la cuantificación de la radiación emitida por fluorescencia de una especie química que posee estas características y que es directamente proporcional a su concentración. Como toda técnica analítica tiene factores que influyen en ella haciendo disminuir la intensidad de fluorescencia, estos factores son: estructura química, temperatura, naturaleza del solvente, pH y oxígeno disuelto.

## APORTE CIENTÍFICO Y DIFUSIÓN

### 7.1. Publicaciones referentes a la tesis.

First- derivative spectrofluorimetric determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in cow milk using rotating sorptive extraction. J. Chil. Chem. Soc. (2021) aceptado.

### 7.2. Participación de Congresos.

N. Yutronic, M. Flores, M. Leal, D. Pino, G. Arriagada, C. Campos, L. Barrientos, P. Jara.

Nanodecoración del compuesto de inclusión de alpha-ciclodextrina con feniletamina relacionada con el enamoramiento., 3° Latin American Symposium on coordination and organometalic chemistry silqcom, Chile, La Serena, 2011.

N. Yutronic, M. Flores, M. Leal, D. Pino, G. Arriagada, C. Campos, L. Barrientos, P. Jara, E. Lang. Caracterización de nanopartículas de oro depositadas sobre complejos de B- ciclodextrina con tioles aromáticos., 3° Latin American Symposium on coordination and organometalic chemistry silqcom, Chile, La Serena, 2011.

María Inés Toral Ponce, Diego Pino, Gabriela Arriagada, Determinación simultánea de oxitetraciclina y flumequina al estado de par- iónico con azul de metileno por espectrofotometría UV-VIS., XI Encuentro de química analítica y ambiental, Chile, Antofagasta, 2012.

M. Inés Toral Ponce, Gabriela Arriagada, Diego Pino, Romina Otipka, Cesar Soto,

David Contreras, Jorge Yañez, Screening method for emerging contaminants;  
for Ethenylestradiol and Chlormadinone acetate, in water by derivative spectrophotometry,  
Congreso internacional de química analítica FACSS, Estados Unidos, Reno -Tahoe, 2013.

M. Inés Toral, Diego Pino, Gabriela Arriagada, Cesar Soto, David Contreras,  
Jorge Yañez, Método de screening para la determinación de Etinilestradiol y Acetato  
de Clormadinona en agua potable., XXX Jornadas Chilenas de Química, Chile, Pucón, 2013.

M. Inés Toral, Diego Pino, Gabriela Arriagada, Determinación simultánea de acetato de  
clormadinona y 17 A-Etinilestradiol, 1º congreso de la Facultad de Ciencias, Chile, Santiago, 2014.

Gabriela Arriagada, Diego Pino, M<sup>a</sup> Inés Toral, Pablo Richter, Determinación de  
fluoroquinolonas por extracción por sorción en disco rotatorio y fluorimetría en fase sólida.,  
18º Encuentro nacional de Química Analítica, Florianópolis, SC, 2016.

Diego Pino, Gabriela Arriagada, M<sup>a</sup> Inés Toral, Pablo Richter, Extracción de sildenafil en  
fase sólida y su determinación directa mediante fluorescencia., 18º Encuentro nacional de Química  
Analítica, Florianópolis, SC, 2016.

Gabriela Arriagada, Diego Pino, M<sup>a</sup> Inés Toral, Pablo Richter, Determinación de oxitetraciclina por extracción por sorción en disco rotatorio y fluorimetría en fase sólida., XIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Chile, Valdivia, 2016.

Diego Pino, Gabriela Arriagada, M<sup>a</sup> Inés Toral, Pablo Richter, Extracción de tadalafilo en fase sólida y su determinación directa mediante fluorescencia.,XIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Chile, Valdivia, 2016.

M<sup>a</sup> Inés Toral, Diego Pino, Catalina Reyes, Gabriela Arriagada, Pablo Richter, Extracción de ácido oxolínico y oxitetraciclina en fase sólida y su determinación directa mediante fluorescencia.,XIII Encuentro de Química Analítica y Ambiental, Chile, Valdivia, 2016.

M<sup>a</sup> Gabriela Arriagada, Diego Pino, M<sup>a</sup> Inés Toral and Pablo Richter, Determination of enrofloxacin in bovine milk by rotating disk sorptive extraction and solid phase by spectrofluorimetry. XIX EUROANALYSIS, Suecia, Estocolmo, 2017.