

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***“DETERMINACIÓN DE MEROPENEM EN PLASMA
SANGUÍNEO MEDIANTE HPLC-DAD Y DSA-TOF-MS”***

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
de Magíster en Química área de Especialización: Química
Ambiental y Memoria para optar al Título de Química por:**

MARGARET SOFÍA GAMBOA ROJAS

**Directoras de Tesis: Dra. Tatiana Garrido Reyes
Dra. Leslie Escobar Oregón**

Santiago-CHILE

Enero 2020

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

MARGARET SOFÍA GAMBOA ROJAS

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Química, área de Especialización: Química Ambiental y Título de Química, en el examen público rendido el día

Directora de Tesis:

Dra. Tatiana Garrido R. _____

Co-directora de Tesis:

Dra. Leslie Escobar O. _____

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Alejandro Álvarez L. _____

Dr. Pablo Richter D. _____

M.Cs. Sylvia Copaja C. _____

AGRADECIMIENTOS

Durante el desarrollo de esta etapa muchas veces creí que no lo lograría, sin embargo, gracias al apoyo de quienes estuvieron ahí, es que hoy culminó una meta. En primer lugar, quiero agradecer a mi directora de tesis, profesora y mentora. Dra. Tatiana Garrido, quien no solo me brindó herramientas académicas, sino también contención emocional en los momentos difíciles, además de permitirme que el laboratorio fuese mi segunda casa, donde tuve mi mayor crecimiento personal gracias a la confianza y cariño otorgado. No puedo dejar de mencionar a mi codirectora Dra. Leslie Escobar, quién confió en mí sin conocerme, la que siempre se puso en mi lugar y entregó su apoyo constante.

En segundo lugar, quiero expresar mi gratitud al Dr. Javier Morales, quien abrió las puertas de su laboratorio, me acompañó con su alegría y de quien aprendí que cuando se comparte un ambiente grato todo es realizable. Quiero destacar también al Dr. Jorge Mendoza, quien tuvo mucha paciencia y una excelente disposición, lo que permitió mi crecimiento académico en el laboratorio.

En tercer lugar, a mis grandes amigas y amigos que conocí tanto en las aulas como en los laboratorios, porque las risas y los llantos, las desveladas de estudios y fiestas, las comilonas, las buenas y malas notas, pero por sobre todo el compañerismo, el cariño y a quienes fueron mi mejor barra cuando quise bajar los brazos y no me dejaron, cuando creí que no pasaba ese ramo, esa prueba o presentación, pero principalmente por siempre estar ahí. Quiero que sepan que sin ustedes: Alvaro, Dani, Fran, Diane, Yeya, José, Andrés y Pato, no lo hubiese logrado.

A mis queridos tío Julio, tía Roxy y tía Anita, gracias por hacerme sentir acompañada, por las sonrisas, el cariño y toda la buena onda que alegraron mis días en la facultad.

Finalmente, quiero agradecer a cada uno de los miembros de mi familia. A mi madre Jacqueline, quién me hizo querer ser mejor y entregó toda sus energías cada vez que me enfrenté a un desafío. A mi padre Aquiles, quién siempre vio potencial en mí y lo apoyo de manera incondicional, saltándose todas las luces rojas para que llegará a tiempo al control de matemática I. A mi primamiga Dominic, quien siempre ha sido mi cómplice y confidente, la que ha estado en mis altos y bajos, la que apaña en siempre. A mi casi gemela Rafaella, quién me apoyó desde que tengo uso de memoria, quién me enseñó valores, la que limpió mis rodillas cuando caí, la que me escucho mi presentación una y otra vez siempre tratando de aportar (hermana todavía no me sé la reacción de chichibabin, porfa no me preguntes de eso en la defensa pública), mi pilar fundamental, sin lugar a duda no hubiese podido lograrlo sin ella pero lo que más le agradezco es que me dio la posibilidad de ser la tía y madrina de un niño maravilloso, Simón, mi pequeño científico, el que ha sido mi felicidad en los días grises, el que me brinda infinitas risas, el que me devuelve la curiosidad por la ciencia cada vez que me pide explicaciones de los experimentos caseros que hacemos una y otra vez. Como olvidar su cara al entrar por primera al laboratorio, su genuina felicidad y su desbordante entusiasmo, todo esto reafirma que tomé la decisión correcta al elegir química.

Mi más sincera gratitud al proyecto Fondecyt de iniciación n°11150935 y al proyecto U-Redes-004/2015 (VID UChile), por el financiamiento para el desarrollo de este trabajo de tesis.

“Nada en la vida debe ser temido, solo entendido.
Ahora es el momento de entender más,
para temer menos”.

Marie Curie.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	x
RESUMEN	xii
SUMMARY	xiv
I. INTRODUCCIÓN	16
II. HIPÓTESIS	30
III. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo general	30
3.2 Objetivos específicos	30
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Reactivos	31
4.2 Materiales	31
4.3 Instrumentos y equipos	31
4.4 Métodos	33
4.4.1 Condiciones Cromatográficas	33
4.4.2 Condiciones DSA-TOF-MS	33
4.4.3 Solución Stock y curva de calibración en agua	34
4.4.4 Muestras de plasma sanguíneo	34
4.4.5 Fortificación de plasma	35
4.4.6 Curva de calibración en plasma	35
4.4.7 Parámetros analíticos	35
4.4.7.1 Limite de detección y cuantificación (LC y LD)	35
4.4.7.2 Porcentaje de recuperación	36
4.4.7.3 Precisión	36
4.4.8 Metodologías de extracción	36
4.4.8.1 Extracción en fase sólida (SPE)	36

4.4.8.2	Precipitación de proteínas con adición de solvente (PP)	38
4.4.8.3	Microextracción de dispersión líquido-líquido (DLLME)	38
4.4.8.4	Ultrafiltración (UF)	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
5.1.	Elección de la fase móvil para HPLC-DAD	44
5.2.	Curva de calibración de MER en agua	45
5.3.	Condiciones DSA-TOF-MS	49
5.4.	Evaluación de las técnicas de extracción analizadas por HPLC-DAD	51
5.4.1	SPE	51
5.4.2	PP	53
5.4.3	DLLME	55
5.4.4	UF	58
5.5.	Análisis de los extractos de PP y UF por DSA-TOF MS	61
5.5.1	PP	61
5.5.2	UF	62
VI.	CONCLUSIONES	68
VII.	REFERENCIAS	69
VIII.	ANEXOS	¡Error! Marcador no definido.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Condiciones experimentales descritas en bibliografía para la detección y cuantificación de MER.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 2. Programa de gradiente para la cuantificación de MER mediante HPLC-DAD.	44
Tabla 3. Parámetros de la curva de calibración de MER en agua.	47
Tabla 4. Valores obtenidos de LD y LC para MER en matriz acuosa.	48
Tabla 5. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con SPE.	53
Tabla 6. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con PP.	54
Tabla 7. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con UF.	58
Tabla 8. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con PP por DSA-TOF-MS.	62
Tabla 9. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con UF por DSA-TOF-MS.	63
Tabla 10. Comparación de las metodologías de extracción por HPLC-DAD.	64
Tabla 11. Comparación de las metodologías optimizadas y validadas de acuerdo con el eco-puntaje.	66
Tabla 12. Datos de masada para curva en triplicado de MER en agua.	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 13. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD de MER en agua.	76
Tabla 14. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER obtenido SPE.	78
Tabla 15. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante SPE por HPLC-DAD.	80
Tabla 16. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER mediante PP por HPLC-DAD.	81

Tabla 17. Datos de reproducibilidad para curva en triplicado del extracto MER mediante PP.	82
Tabla 18. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante PP por HPLC-DAD.	83
Tabla 19. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER mediante UF por HPLC-DAD.	84
Tabla 20. Datos de reproducibilidad para curva en triplicado del extracto MER mediante UF.	85
Tabla 21. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante UF por HPLC-DAD.	86
Tabla 22. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER mediante PP por DSA-TOF-MS.	86
Tabla 23. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante PP por DSA-TOF-MS.	87
Tabla 24. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER mediante UF por DSA-TOF-MS.	87
Tabla 25. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante UF por DSA-TOF-MS.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del meropenem (MER).	18
Figura 2. Estructura química del producto de degradación del MER.	19
Figura 3. Descripción de extracción en fase sólida (SPE).	20
Figura 4. Principios de la química verde propuestos por Anastas y Warner, 1998.	21
Figura 5. Descripción de la microextracción de dispersión líquido-líquido (DLLME).	22
Figura 6. Descripción de la ultrafiltración (UF).	23
Figura 7. Configuración típica de un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia.	24
Figura 8. Configuración de un sistema DAD.	25
Figura 9. Configuración de la ionización en análisis de muestra directa.	27
Figura 10. Ingreso de muestra en el analizador de muestra directa (DSA)	33
Figura 11. Obtención del plasma mediante centrifugación.	34
Figura 12. Descripción del proceso SPE.	37
Figura 13. Descripción del proceso PP.	38
Figura 14. Descripción de la prueba 1 de DLLME.	39
Figura 15. Descripción de la prueba 2 de DLLME.	40
Figura 16. Descripción de la prueba 3 de DLLME.	41
Figura 17. Unidades de filtración Amicon Ultra, ultracel 3-KDa.	42
Figura 18. Descripción del proceso UF.	43
Figura 19. Descripción del proceso de limpieza de las unidades de UF.	43
Figura 20. Cromatograma de MER en buffer fosfato y metanol.	45
Figura 21. Comparación de los cromatogramas para la elección del flujo. A: flujo 0,5 mL/min; B: flujo 0,9 mL/min.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 22. Curva de calibración de MER en agua analizada durante 3 días.	48
Figura 23. Espectro m/z de MER en matriz acuosa por DSA-TOF-MS.	49

Figura 24. Proceso de ionización del MER, m/z 358 (Hrabák y col.,2012).	50
Figura 25. Cromatograma de extracto de plasma fortificado obtenido por SPE, cuantificado por HPLC-DAD.	52
Figura 26. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por SPE, cuantificado por HPLC-DAD.	52
Figura 27. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por PP, cuantificado por HPLC-DAD.	54
Figura 28. Formación de gota, primera prueba DLLME.	55
Figura 29. Formación de gota, segunda prueba DLLME.	56
Figura 30. Cromatograma de extracto de plasma fortificado obtenido por DLLME segunda prueba, cuantificado por HPLC-DAD.	56
Figura 31. Formación de gota, tercera prueba DLLME.	57
Figura 32. Cromatograma de extracto de plasma fortificado obtenido por DLLME tercera prueba, cuantificado por HPLC-DAD.	57
Figura 33. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por UF, cuantificado por HPLC-DAD.	59
Figura 34. Comparación de resultados obtenidos para las distintas metodologías de extracción analizado por HPLC-DAD.	60
Figura 35. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por PP, cuantificado por DSA-TOF-MS.	61
Figura 36. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por UF, cuantificado por DSA-TOF-MS.	62
Figura 37. Clasificación de solventes según Prat y col., 2014.	65
Figura 38. Curva de calibración de MER en agua, cuantificado por DSA-TOF-MS.	77
Figura 39. Curva de calibración de MER en NaOH, cuantificado por DSA-TOF-MS.	77

RESUMEN

El uso excesivo de antibióticos como el meropenem ha generado una problemática de interés mundial, en relación a que los desechos generados por estos compuestos, en contacto con el ecosistema terrestre y acuático, inducen el desarrollo de mecanismos de resistencia microbiana, disminuyendo así en el largo plazo la eficiencia de los antibióticos frente a infecciones graves. Para reducir el ingreso de estos compuestos al medioambiente es necesario evaluar la posología usada en la práctica clínica, de tal forma de orientar la decisión sobre la dosis, de acuerdo con el nivel plasmático que alcanza realmente el meropenem en seres humanos bajo condiciones de enfermedad. Para esto es necesario identificar metodologías que permitan la determinación de este compuesto en plasma sanguíneo.

Una técnica analítica de extracción con bajo impacto ambiental de acuerdo con la química verde es aquella fomenta el uso de análisis directo, la miniaturización, automatización y ahorro tanto de energía como de insumos, con el objetivo final de reducir los desechos generados y garantizando la seguridad del operador.

El objetivo de este trabajo fue implementar, validar y comparar metodologías analíticas de extracción amigables con el medioambiente para la determinación de meropenem en plasma sanguíneo humano, cuantificando el compuesto mediante HPLC-DAD y DSA-TOF-MS.

Para el tratamiento de las muestras y posterior análisis de meropenem en plasma sanguíneo se eligieron dos metodologías convencionales, extracción en fase sólida (SPE) y precipitación de proteínas (PP), y dos metodologías menos convencionales tales como la microextracción de dispersión líquido-líquido (DLLME) y la ultrafiltración (UF).

Mediante la determinación de meropenem por HPLC-DAD se estableció que los porcentajes de recuperación para la extracción con SPE, PP y UF fueron de 76,

96 y 90 %, respectivamente. La repetibilidad obtenida para SPE, PP y UF, determinada como la desviación estándar relativa de las determinaciones, fue menor a 9% para las tres metodologías de extracción. Debido al bajo porcentaje de recuperación y repetibilidad de meropenem en plasma sanguíneo, se descartó la DLLME como metodología de extracción.

La cuantificación de meropenem por DSA-TOF-MS permitió establecer que las extracciones mediante PP y UF presentan un rango lineal entre 23 y 2000 mg MER/L, con un coeficiente de determinación promedio de 0,9779. El límite de detección y de cuantificación para meropenem usando PP, fue de 14,93 y 25,66 mg MER/L, respectivamente, con un porcentaje de recuperación de 47%. Con relación a UF, el rango lineal para la determinación de meropenem estuvo entre 20 y 2000 mg MER/L, con un coeficiente de determinación de 0,9963, en tanto que los límites de detección y de cuantificación fueron 4,876 y 5,383 mg MER/L, respectivamente, con un porcentaje de recuperación mayor a un 36%.

De acuerdo con los resultados obtenidos para las figuras de mérito, se concluye que las metodologías de extracción más adecuadas para la determinación de meropenem en plasma sanguíneo son PP y UF, siendo esta última una metodología innovadora, sin uso de solventes y que permite la reutilización de las unidades de filtración, lo cual le confiere un mayor eco-puntaje en relación con los criterios de la química verde y, por lo tanto, la más amigable con el medioambiente.

SUMMARY

The excessive use of antibiotics such as Meropenem has generated a problem of global interest, in relation to the fact that the generated wastes containing these compounds, in contact with the terrestrial and aquatic ecosystem, induce the development of microbial resistance mechanisms, decreasing thus in the long term the efficiency of antibiotics against serious infections. To reduce the entry of these compounds into the environment it is necessary to evaluate the dosage used in clinical practice, in order to guide the decision on the dose, according to the plasma level that Meropenem actually reaches in humans under disease conditions. For this it is necessary to identify methodologies that allow the determination of this compound in blood plasma.

An analytical of extraction with low environmental impact according to green chemistry is that encourages the use of direct analysis, miniaturization, automation and savings of both energy and inputs, with the final objective of reducing the waste generated and guaranteeing the safety of operator.

The objective of this thesis was to implement, validate and compare environmentally friendly analytical extraction methodologies for the determination of meropenem in human blood plasma, quantifying the compound by HPLC-DAD and DSA-TOF-MS.

For the treatment of the samples and subsequent analysis of meropenem in blood plasma, two conventional methodologies, solid phase extraction (SPE) and protein precipitation (PP) were chosen, and two less conventional methodologies such as microextraction of liquid-liquid dispersion (DLLME) and ultrafiltration (UF).

Through the analysis of meropenem by HPLC-DAD, it was established that the recovery percentages for the extraction with SPE, PP and UF were 76, 96 and 90%, respectively. The repeatability obtained for SPE, PP and UF, determined as the relative standard deviation of the determinations, was less than 9% for the

three extraction methodologies. Due to the low percentage of recovery and repeatability of meropenem in blood plasma, the DLLME was discarded as an extraction methodology.

The quantification of meropenem by DSA-TOF-MS allowed to establish that the extractions by means of PP and UF have a linear range between 23 and 2000 mg MER/L, with an average coefficient of determination of 0.9779. The limit of detection and quantification for meropenem using PP was 14,93 and 24,66 mg MER/L, respectively, with a recovery percentage of 47%. In relation to UF, the linear range for the determination of meropenem was between 20 and 2000 mg MER/L, with a coefficient of determination of 0.9963, while the detection and quantification limits were 4,876 and 5.383 mg MER/L, respectively, with a recovery percentage greater than 36%.

According to the results obtained for the merit figures, it is concluded that the most appropriate extraction methodologies for the analysis of meropenem in blood plasma are PP and UF, the latter being an innovative methodology, without solvent use and that allows reuse of the filtration units, which gives it a higher eco-score in relation to the criteria of green chemistry and therefore the most environmentally friendly.

I. INTRODUCCIÓN

El uso de antibióticos para tratar y prevenir enfermedades tanto en humanos como en animales supera a nivel mundial las 100.000 toneladas por año (Zhang y col., 2015), este consumo excesivo ha generado una nueva problemática de interés mundial relacionado a los desechos generados que contienen estos compuestos, en contacto con el ecosistema terrestre y acuático, estos que inducen el desarrollo de mecanismos de resistencia microbiana los cuales al contacto con la biota terrestre y acuática inducen el desarrollo de mecanismos de resistencia microbiana (Danner y col., 2019).

La resistencia microbiana se define como la capacidad de los microorganismos de evadir la acción eficiente del antibiótico, debido al desarrollo de mecanismos adaptativos que conducen a la falla en el control de la infección y la respuesta terapéutica (Crespo, 2005), lo que podría generar un significativo aumento en la mortalidad por el nulo efecto sobre el control de enfermedades infecciosas.

La dosificación de antibióticos debe ser controlada y ajustada a cada paciente, ya que el uso prolongado, prescripciones innecesarias e incorrectas contribuyen al ingreso de estos compuestos al medioambiente a través de los desechos. Cabe destacar que la dosificación de los fármacos se ha establecido a partir de parámetros farmacocinéticos empíricos obtenidos de pacientes sanos, la cual se establece de acuerdo con cuánto tiempo la concentración del antibiótico libre en el plasma supere la concentración inhibitoria mínima del patógeno (Carlier y col., 2015).

El ingreso de estos compuestos al medioambiente podría disminuir a través de la aplicación de estrategias de mitigación, donde en una primera etapa se desarrollen, implementen y validen metodologías analíticas que permitan la cuantificación de éstos compuestos en el plasma sanguíneo, para luego realizar la evaluación de las dosis administradas en pacientes hospitalarios y correlacionar los resultados obtenidos con las características de los individuos, lo

cual permitirá finalmente ajustar la dosificación, medida que evitaría por un lado la sobre medicación en pacientes críticos y además permitiría disminuir el ingreso de estos compuestos al medioambiente a través de desechos como la orina (Kraker y col., 2016).

Dicho escenario crítico impulsa la búsqueda y desarrollo de nuevas metodologías analíticas que permitan detectar y cuantificar antibióticos en matrices complejas, como el plasma sanguíneo, con indicadores que aseguren la calidad analítica de los resultados, aplicable a volúmenes pequeños de muestra y que además sean amigables con el medioambiente.

El concepto de química analítica verde involucra el desarrollo de metodologías analíticas con una preocupación medioambiental, eliminando o disminuyendo las fuentes de contaminantes con la intención de que los productos y procesos no pongan en peligro cualquier forma de vida. Fomenta el uso de análisis directo, así como a la miniaturización, automatización y ahorro tanto de energía como de insumos, reduciendo los desechos generados y garantizando la seguridad del operador (Armenta y col., 2019).

Hoy en día la preocupación va más allá de lo que se conoce como química verde, se hace mención a una química sustentable la cual está de acuerdo con velar por el medioambiente con el concepto de responsabilidad social. La química sustentable tiene como ventaja la obtención de resultados con metodologías de poco impacto ambiental, bajos efectos nocivos en los operarios, asequible, pero con la desventaja de obtener parametros de escasa calidad analítica, como son límites de detección, cuantificación y repetibilidad (Marcinkowskay col., 2019).

A través de los años se ha reducido el número antibióticos eficientes frente a infecciones graves debido a la resistencia microbiana, dentro de los que hoy se encuentran disponibles están los carbapenémicos, con un amplio espectro bactericida contra patógenos gram negativas, gram positivas, bacterias anaeróbicas y aquellas resistentes a cefalosporinas (Zou, y col., 2019). Dentro

de este grupo de carbapenémicos, se encuentra el meropenem (MER), uno de los más usados por su amplio espectro y baja toxicidad (Kipper, y col., 2009).

El MER tiene una masa molar de 383,463 g/mol, presenta una solubilidad en agua de 5,6 g/L, un coeficiente de reparto octanol/agua (log Kow) de -1,25 (DrugBank, 2019), por lo tanto, es un compuesto de carácter polar. Tiene un pK_{a1} de 2,9 y pK_{a2} de 7,4 (Girish y col., 2013), lo que implica que a pH bajo 2,9 la molécula se encuentra completamente protonada, a pH entre 2,9 y 7,4 el ácido carboxílico esta desprotonado, pero no la pirrolidina. A pH superiores a 7,4, tanto el ácido carboxílico como la pirrolidina del MER se encontrarían desprotonados. [fig. 1].

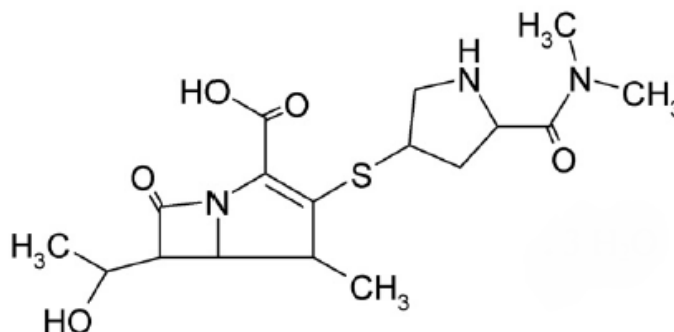


Figura 1. Estructura química del meropenem (MER).

Una vez administrado MER se distribuye en la mayoría de los tejidos y fluidos corporales, incluyendo mucosa bronquial, pulmón, bilis, tejido ginecológico, músculo, válvulas cardíacas y piel. La unión a proteínas plasmáticas es de aproximadamente un 2%. En adultos la dosis de MER administrada es de 1 gramo cada 8 horas, de la cual alrededor del 70% de la dosis intravenosa administrada se elimina en la orina como fármaco inalterado (PUBCHEM, 2019). El MER se caracteriza por una baja estabilidad química, causada por la hidrólisis del enlace amida en el anillo betalactámico, lo que conduce a la formación del metabolito farmacológicamente inactivo [fig. 2] (Paczkowska y col., 2015).

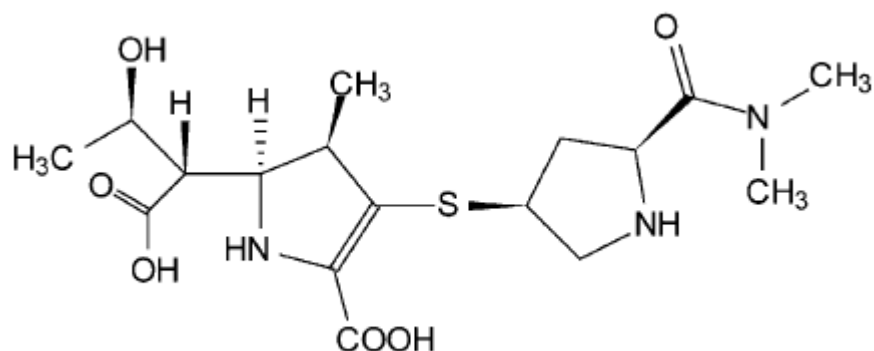


Figura 2. Estructura química del producto de degradación del MER.

Para el desarrollo de metodologías de análisis con indicadores que aseguren la calidad analítica se debe hacer uso de la química analítica, que corresponde al área que estudia los métodos y las técnicas que se emplean para determinar la composición de la materia, a través de la separación e identificación de sus componentes en matrices complejas como es el plasma sanguíneo (Skoog y West, 1992).

Para la determinación de un analito en cualquier matriz la primera etapa y considerada la más importante en el proceso analítico es la selección de una metodología de extracción.

Una de las metodologías de extracción más utilizadas para la determinación de antibióticos en plasma es la precipitación de proteínas (PP), en esta se modifica la solubilidad de la proteína por la adición de un reactivo y de esta manera su separación desde la solución (Evans y col., 2009). La PP puede ser inducida por la adición de sales, solventes orgánicos, polímeros hidrofílicos no iónicos, iones metálicos polivalentes o por ácidos o bases (Harrison y col., 2003), la elección depende de los requerimientos analíticos de la problemática.

Para la PP en matriz plasma se ha descrito la utilización de acetonitrilo (ACN) con posterior centrifugación, esta metodología se caracteriza por su sencillez y

su bajo costo, reportándose porcentajes de recuperación entre 81-92% (Dailly y col., 2011).

Otras de las metodologías utilizadas para la determinación de un analito en plasma sanguíneo es la utilización de la extracción en fase sólida (SPE). En esta técnica el analito de interés presente en la muestra líquida es retenido en un adsorbente sólido (resina), para luego ser eluido a través de la adición de un solvente (Wilson y col., 2000).

Para llevar a cabo la SPE, el primer paso es acondicionar la columna que contiene la resina a través de la adición de un solvente, la elección del solvente, así como el pH de éste definirá la polaridad de la resina y por lo tanto la capacidad de retención del analito. En una segunda etapa se adiciona la muestra con el analito de interés, sucesivo a esto se eluye la columna con un solvente no afín a los analitos para eluir los interferentes y por último se realiza la elución del analito por medio de la adición de un solvente afín [fig. 3].

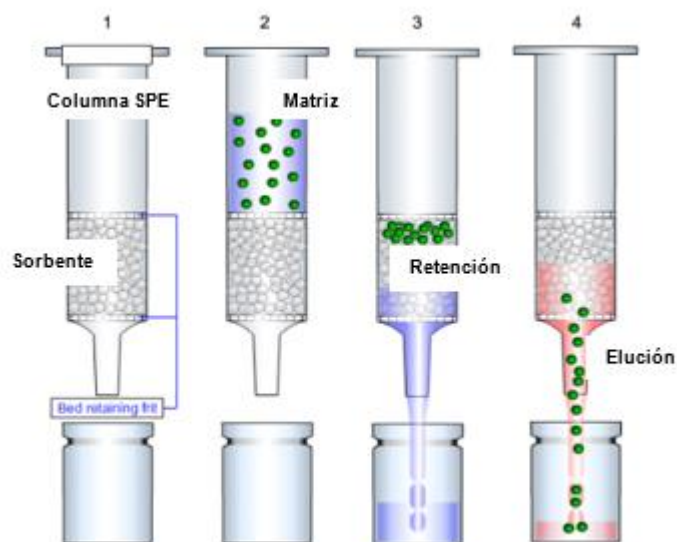


Figura 3. Descripción de extracción en fase sólida (SPE).

La SPE se caracteriza por su mayor costo de operación y el uso de altos volúmenes de solvente, a través de esta metodología se han reportado resultados reproducibles y con altos porcentajes de recuperación entre 83-104% (Ohmori, y col., 2011).

Pensando en la problemática que vamos a abordar y que ya se hizo mención de técnicas convencionales de extracción, se revisará lo que implica una técnica amigable con el medioambiente y para ello hay que tener en cuenta los 12 principios de la química verde [fig 4]

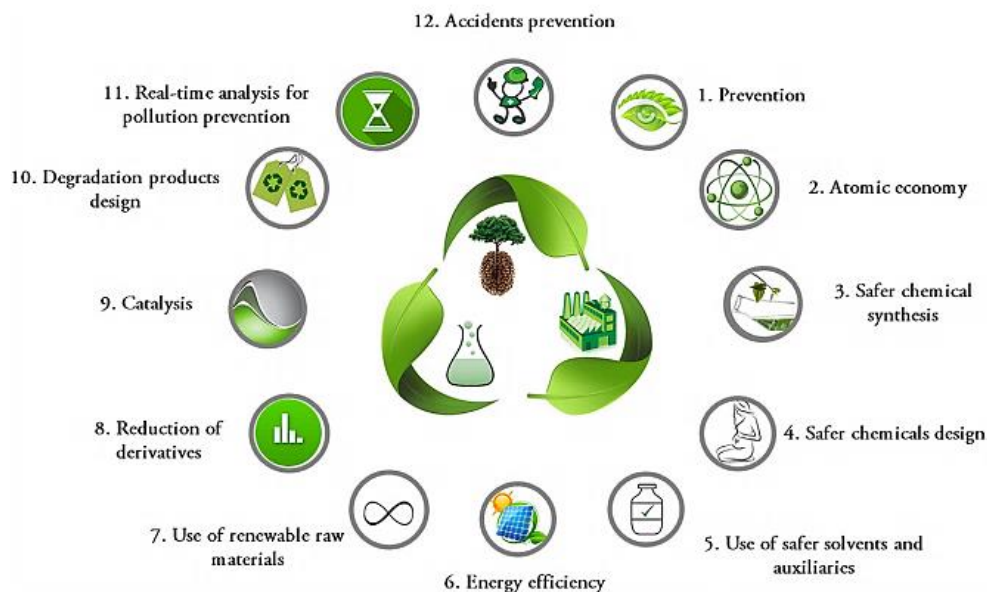


Figura 4. Principios de la química verde propuestos por Anastas y Warner, 1998.

Una de las metodologías menos convencionales y más amigable con el medioambiente es la microextracción de dispersión líquido-líquido (DLLME), la cual consiste en un sistema ternario de disolventes formado por una muestra acuosa que contiene a los analitos, un disolvente orgánico de extracción y un disolvente dispersor, este último soluble tanto en agua como en el solvente orgánico. La mezcla de los disolventes de extracción y dispersión es agregada

en la muestra acuosa, el equilibrio se alcanza de inmediato dada la gran superficie de contacto entre las pequeñas gotas de disolvente extractor y la muestra acuosa. Luego la mezcla es centrifugada, formándose la gota que está compuesta por el disolvente de extracción y el analito, la cual es retirada del tubo [fig. 5], para su posterior análisis (Rezaee y col., 2010).

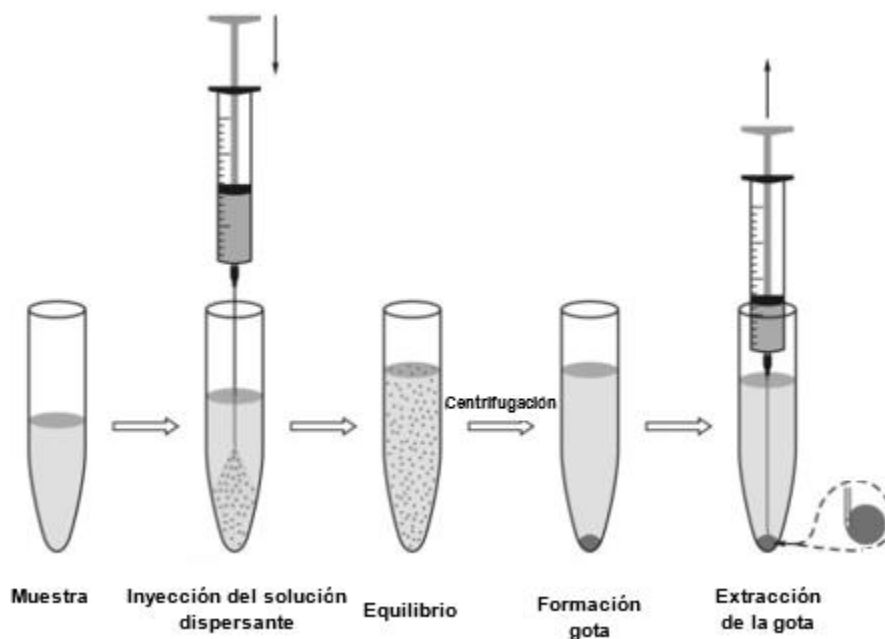


Figura 5. Descripción de la microextracción de dispersión líquido-líquido (DLLME).

Entre las ventajas de DLLME destacan ser un método rápido, económico y con bajo consumo de solvente orgánico.

Como se mencionó anteriormente, uno de los desafíos del mundo actual es desarrollar metodologías que apunten a la reducción de residuos, o bien a la elección de los solventes a utilizar de acuerdo con los estándares definidos por los 12 principios de la química verde [fig. 4] (Anastas y Warner, 1998; Häckl y Kunz 2018; Vian y col., 2017; Korany y col., 2017). Por lo tanto, los procesos de extracción que no necesiten solventes orgánicos son ideales (Principio 5:

Reducción del uso de sustancias auxiliares), como es la ultrafiltración (UF), dicha técnica utiliza la fuerza de centrifugación para aislar partículas suspendidas de su medio circundante (Olaribigbe, 2015), esta permite la concentración de analitos que están unidos a proteínas y aquellos que están libres, es decir, no unidos a proteínas (Lappas y Lappas, 2016).

Para la extracción por UF se utiliza un eppendorf que contienen un filtro, cuyo tamaño de poro depende la masa molar que se requiera separar, en el caso de muestra de plasma, la utilización de un tamaño de poro de 3 kDa permitiría retener a la proteína sobre el filtro y aquellos compuestos con menor masa molecular pasarían por el sistema de UF a la fracción bajo el filtro [fig. 6].

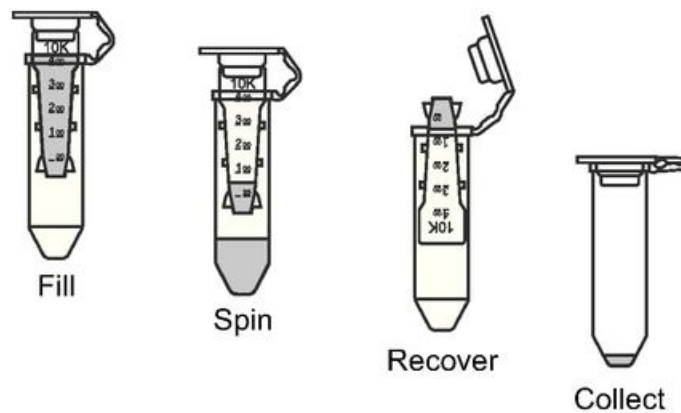


Figura 6. Descripción de la ultrafiltración (UF).

La unión del antibiótico a la proteína plasmática es un parámetro importante desde el punto de vista de la farmacocinética y farmacodinámica (Volpp y Holzgrabe, 2019), el MER se une solo un 2% a las proteínas, de modo que UF permitiría aislar al antibiótico libre, siendo sus ventajas el bajo tiempo utilizado en el proceso de extracción (Kratzer y col., 2016), además destaca por no utilizar solventes orgánicos y que el sistema compuesto por los eppendorf y sus filtros pueden ser reutilizables.

La última etapa en la determinación de un analito en una matriz compleja es la cuantificación, numerosas técnicas analíticas se han desarrollado durante varias décadas, siendo una de las más utilizadas la cromatografía líquida, cuyo origen se basa en la cromatografía en columna (cromatografía líquido-sólido), la cual consiste en una columna empacada con un adsorbente, que puede ser alúmina o sílica (fase estacionaria), la muestra que contiene el analito ingresa a la columna, interaccionando con el material y generando la separación de los analitos por un proceso de adsorción de los compuestos en la fase estacionaria (Lindsay, 1997), finalmente se eluye al analito retenido por la adición de un solvente apropiado.

Dentro de las técnicas cromatográficas más utilizadas esta la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), por su versatilidad y facilidad para separar compuestos. HPLC es un tipo de cromatografía en columna en la que, por acción de una bomba de alta presión, se hace pasar una muestra, la cual es movilizada por una mezcla de solventes, llamada fase móvil [fig. 7]. Ésta pasa a través de la columna, la que contiene la fase estacionaria, la cual puede corresponder a una sílica unida a diversos grupos químicos, que condicionan las características de la columna. El principio de separación de HPLC se basa en la interacción, tanto física como química, de los componentes de la muestra con la fase móvil y la fase estacionaria (Dong, 2006).

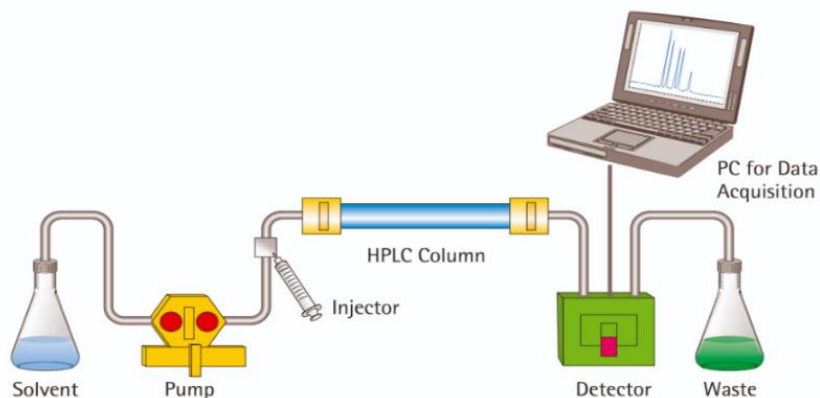


Figura 7. Configuración típica de un sistema de cromatografía líquida de alta eficiencia.

La elección de la composición de la fase móvil se basa en las características del analito en relación con su polaridad, otro factor importante en los análisis realizados por HPLC es la modalidad de la elución de la fase móvil, esta puede ser de manera isocrática, es decir, se utiliza la misma composición de fase móvil durante todo el análisis, o en forma de gradiente donde la composición de la fase móvil varía durante la corrida cromatográfica.

La selección del detector usado en HPLC se basa en las características del analito, si este es un cromóforo se recomienda utilizar un detector UV-vis, si el compuesto es fluorescente o con un marcador fluorescente el detector indicado será el de fluorescencia. Un detector que destaca por su sensibilidad, definida como la capacidad de discriminar entre compuestos, es el de espectroscopia de masas el que permite identificar compuestos con masa molares cercanas (Rubinson y col., 2001), con la desventaja de los altos costos de operación.

Otro de los detectores utilizados para cuantificar antibióticos es el de arreglo de diodos (DAD), que se caracteriza por su versatilidad, bajo costo de operación, amplio rango de concentración en el que se puede trabajar y además permite comparar los espectros a distintas longitudes de ondas. El funcionamiento del detector DAD es similar al ultravioleta [fig. 8], la luz pasa a través de la celda que contiene la muestra, lo que permite extender el espectro a través de una matriz de fotodiodos (Swartz, 2010).

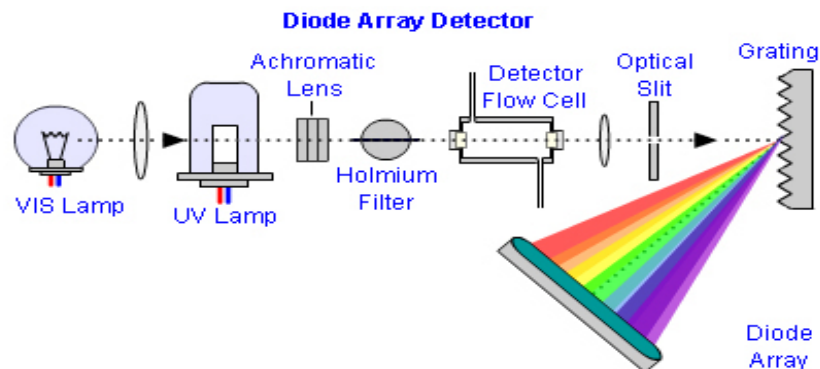


Figura 8. Configuración de un sistema DAD.

En relación con la determinación de MER en plasma sanguíneo en literatura se ha descrito PP como una de las metodologías más utilizadas, con altos porcentajes de recuperación, y límites de cuantificación de 0,5 mg/L. Usando las técnicas de cromatografía líquida de alta eficiencia acoplado tanto a detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD) como a espectroscopia de masas (HPLC-MS) para la cuantificación del analito [Tabla 1]. Este último detector permite separar analitos que coeluyen diferenciándolos por la razón masa/carga. HPLC-DAD se describe como una de las técnicas más utilizada debido a que los análisis son de menor costo en comparación con HPLC-MS (Cazes, 2005).

En relación con las condiciones de operación, MER al ser un compuesto ácido e hidrofílico requiere una fase móvil compuesta por un buffer salino, como el tampón fosfato o también la utilización de una fase móvil a pH neutro debido a la baja estabilidad de los carbapenem ante pH ácidos y básicos, condiciones para asegurar la retención y separación del analito en la columna. La resina recomendada para el análisis de MER es C₁₈, la cual está compuesta por una sílica unida a una cadena apolar de 18 carbonos, es una resina versátil, que permite el análisis de compuestos de distinta polaridad (Moldoveanu y David, 2016).

Como etapa final, para la validación de una metodología analítica se requiere la confirmación del analito, la cual puede ser realizada mediante la utilización de la técnica de análisis de muestra directa - tiempo de vuelo - espectrometría de masas (DSA-TOF-MS), la cual consiste en una espectrometría de masa de alta resolución, sensible y con una rápida adquisición de datos, lo cual permitiría la confirmación del analito en la matriz plasma sanguíneo. Esta técnica no requiere una exhaustiva preparación de la muestra para su análisis, ya que, el equipo consta de una malla donde se sitúa la muestra, la cual es ionizada con una corriente de nitrógeno a 300°C (Garrido y Mendoza, 2016) ingresando al espectrómetro con tiempo de vuelo para finalmente llegar al detector de masa,

generándose la separación de acuerdo con la relación masa carga (m/z) de los analitos presentes [fig. 9].

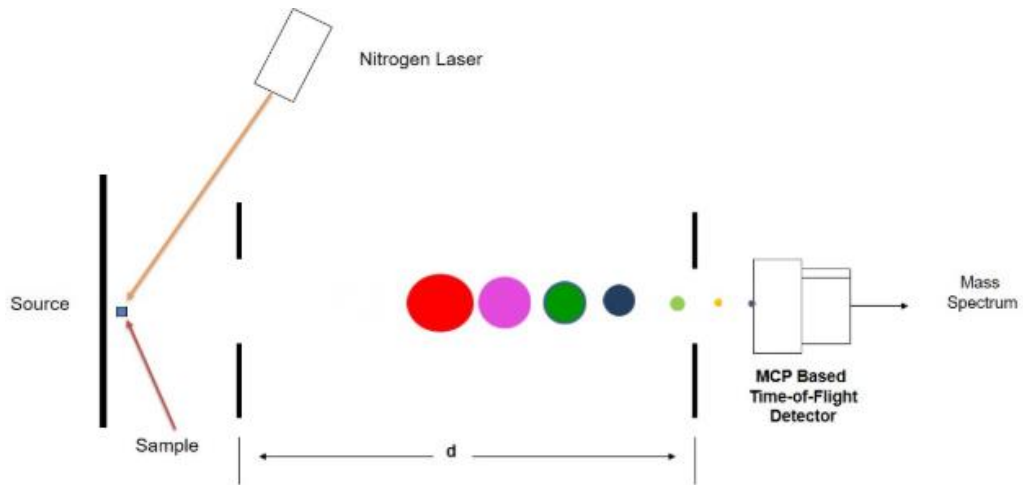


Figura 9. Configuración de la ionización en análisis de muestra directa.

En Chile y en Sudamérica no se ha implementado la medición rutinaria de MER (Soto, y col., 2015), pese a la necesidad de confirmar las dosis por lo que el desarrollo de una metodología analítica para la detección y cuantificación de MER en plasma es de gran importancia para su uso correcto en la práctica clínica.

Tabla 1. Condiciones experimentales descritas en bibliografía para la detección y cuantificación de MER.

Fase móvil	Detector HPLC	Metodología de extracción	LD	LC	Rango de Concentración	Referencia
MATRIZ PLASMA						
MeOH: Tampón fosfato pH 7	DAD	Precipitación de proteínas (ACN)		0,5 mg/L	0,5-100 mg/L	Dailly y col., 2011
Tampón fosfato: ACN: MeOH	DAD	Precipitación de proteínas (MeOH)	0,05 µg/mL	0,1 µg/mL	0,1-150 µg/mL	Kipper y col., 2009
Formiato de amonio: MeOH	MS/MS	SPE	0,05 µg/mL	0,1 µg/mL	0,05-50 µg/mL	Ohmori y col., 2011
ACN: Ácido fórmico	MS/MS	Precipitación de proteínas (ACN)	0,04 µg/mL	0,1 µg/mL	0,1-40 µg/mL	Lin y col., 2011

LD: límite de detección; LC: límite de cuantificación; ACN: acetonitrilo; MeOH: metanol; SPE: extracción en fase sólida.

En base a los antecedentes mencionados en este trabajo se realizará la evaluación y validación de cuatro metodologías analíticas de extracción para la cuantificación de MER en plasma sanguíneo, (PP, SPE, DLLME y UF), los resultados obtenidos se compararán, según los parámetros analíticos, así como las condiciones operacionales de cada una, con relación al impacto ambiental de las metodologías propuestas. Los extractos obtenidos serán analizados por las técnicas de HPLC-DAD para su cuantificación y se realizará su confirmación a través de DSA-TOF-MS.

Una vez establecida la metodología de análisis adecuada para la determinación de MER en plasma sanguíneo, se realizará la transferencia tecnológica a un centro de análisis, y de esta manera los resultados obtenidos serán el primer eslabón en la evaluación de las dosis de antibióticos suministrados.

II. HIPÓTESIS

Es posible identificar y cuantificar meropenem en matriz plasma, mediante metodologías analíticas amigables con el medioambiente, que permitan el análisis de volúmenes de muestra menores a 1 mL, por HPLC-DAD y DSA-TOF-MS.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar, validar y comparar metodologías analíticas amigables con el medioambiente para la determinación de meropenem en plasma humano.

3.2 Objetivos específicos

- Optimizar las técnicas de HPLC-DAD y DSA-TOF-MS para la cuantificación y confirmación de meropenem en plasma.
- Optimizar y validar la metodología de extracción en fase sólida, precipitación de proteínas, microextracción de dispersión líquido-líquido y ultrafiltración para la determinación de meropenem en matriz plasma.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Reactivos

- Reference Standard Meropenem, USP.
- Agua milliQ.
- Agua destilada.
- Agua para cromatografía (grado LC-MS), Merck.
- Cloroformo, P.A., Merck.
- Metanol, P.A., Merck.
- Ácido acético glacial (96%), P.A., Merck.
- Acetonitrilo, P.A., Merck.
- Calibrante APCI-L Low Concentration Tuning Mix
- Plasma blanco, obtenidos de muestras de sangre de voluntarios sanos sin consumo de medicamentos en los últimos 7 días.

4.2 Materiales

- Material de vidrio.
- Cartucho C₁₈, Sep-Pak, Waters.
- Manifold.
- Unidades de filtración Amicon Ultra, ultracel 3-KDa.

4.3 Instrumentos y equipos

- Balanza granataria, precisa 160M, Swiss Quality.
- Balanza analítica, precisa 125A, Swiss Quality.
- Handy Step, Brand.
- Placa calefactora, Sahara 310, Rocker.
- Autovortex S45, Stuart Scientific

- pH-metro, PMX 3000, WTW.
- Estufa 300°C, WTC, Binder.
- Espectrómetro de masas DSA-TOF-MS, Perkin-Elmer.
- Centrifuga Hermle z326 k.
- Centrifuga Hermle z383 k.
- Centrifuga Eba 8 Hettich.
- Baño seco Rocker Sahara 310.
- Micropipeta Pipet-Lite XLS, Rainin.
- Cromatógrafo Líquido de alta eficiencia, Shimadzu, con detector arreglo de diodo. Módulos:
 - Bomba LC 20AT
 - Inyector y muestreador SIL 20A
 - Horno CTO 20A
 - Detector SPD M20A
 - Columna C₁₈ Hypersil ODS

4.4 Métodos

4.4.1 Condiciones Cromatográficas

La cuantificación de MER se llevó a cabo en un HPLC SHIMADZU, equipado con un detector de arreglo de diodos (DAD). La columna utilizada fue una C₁₈ Hypersil ODS, 5µm, 4.6 x 250mm. Las condiciones cromatográficas fueron optimizadas a partir del estudio realizado por Dailly y col., 2011. Volumen de inyección 30 µL.

4.4.2 Condiciones DSA-TOF-MS

La confirmación y cuantificación de MER se realizó utilizando DSA-TOF-MS, Perkin-Elmer, donde las condiciones de trabajo del equipo fueron:

- Polaridad: positiva
- Corona: 3,0 µA
- APCI: 300°C
- Volumen de calibrante: 40 µL APCI-L
- Volumen de inyección: 10 µL
- Voltaje: 2900-3400 V.

La muestra fue colocada en una malla ubicada dentro del analizador de muestra directa (DSA), para su posterior análisis [fig. 10].



Figura 10. Ingreso de muestra en el analizador de muestra directa (DSA)

4.4.3 Solución Stock y curva de calibración en agua

Se preparó una solución stock de 100 mg/L de MER, para lo cual se masaron en balanza analítica (precisa 125A, Swiss Quality $\pm 0,0001$) 2,3 mg del estándar de 87% de pureza, el cual fue disuelto en agua grado HPLC, y llevado a un matraz aforado de 20 mL. A partir de esta solución se preparó una curva de calibración en agua por masada en un rango de concentración entre 1 - 100 mg/L por triplicado (10 puntos).

4.4.4 Muestras de plasma sanguíneo

Las muestras de plasma blanco se obtuvieron de 3 voluntarios sanos, dos mujeres y un hombre. Se utilizó técnica aséptica de acceso periférico vía Vacutainer® por parte de una enfermera del Hospital Dr. Exequiel González Cortés (HEGC). Se extrajeron las muestras en tubos de 4 mL con EDTA como anticoagulante, y centrifugada a 4°C a 10000 rpm [fig. 11]. El plasma se transfirió a crioviales y se mantuvo congelado a -30°C hasta el traslado al laboratorio de análisis.

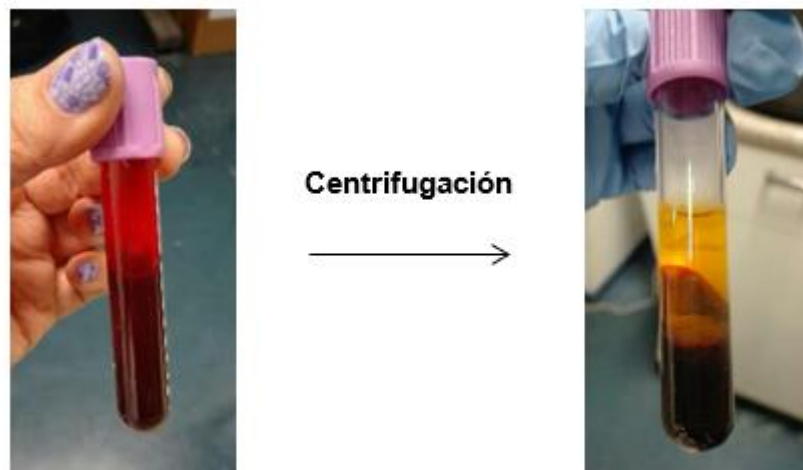


Figura 11. Obtención del plasma mediante centrifugación.

Considerando que en esta tesis enmarcada en el proyecto Fondecyt de iniciación n°11150935, requería contar con muestras reales para cuantificar la concentración de meropenem en plasma, se contó con autorización para el uso de muestras biológicas y acceso a base de datos clínicos a potenciales pacientes y voluntarios sanos que participasen en el estudio, previa firma de consentimiento informado V1 23.11.2015 autorizado por Comité Ético Científico del Servicio de Salud Metropolitano Sur (CEC-SSMS) vía Memo n°613/2015 del 15/12/2015 autorizando el proyecto para ser ejecutado en el HEGC, en Santiago.

4.4.5 Fortificación de plasma

Se fortificaron 3 muestras de plasma, en 3 rangos de concentración 400, 1000, 2000 mg MER/L, para realizar la curva de calibración en matriz y para la evaluación de los distintos métodos de extracción. La fortificación se realizó por pesada. Estas muestras se utilizaron para la determinación del porcentaje de recuperación de las extracciones realizadas y cuantificadas por HPLC-DAD y DSA-TOF-MS.

4.4.6 Curva de calibración en plasma

Se prepararon curvas de calibración en plasma por pesada, para lo cual se utilizaron las soluciones descritas en el punto 4.4.5. El rango de concentración fue entre 20 - 100 mg/L, en triplicado.

4.4.7 Parámetros analíticos

4.4.7.1 Limite de detección y cuantificación (LC y LD)

Los LD y LC, fueron determinados a partir de un blanco replicado diez veces, donde se registró el valor del área al tiempo de retención del analito, calculando el promedio y la desviación estándar (SD) de las determinaciones realizadas por HPLC-DAD. El cálculo de LD y LC se realizó utilizando las ecuaciones 1 y 2

(IUPAC, 1978) donde el valor de área se reemplazó en la ecuación de la curva de calibración de MER en agua.

$$\text{Ecuación 1: } LD = 3 \cdot SD + \bar{x} \qquad \text{Ecuación 2: } LD = 10 \cdot SD + \bar{x}$$

4.4.7.2 Porcentaje de recuperación

Para la determinación del porcentaje de recuperación, los valores de área obtenidos en la curva de calibración se introdujeron en la ecuación de esta misma, las concentraciones obtenidas se compararon con las concentraciones reales como se muestra en la ecuación 3.

$$\text{Ecuación 3: } \%Rec = \frac{\text{Concentración obtenida}}{\text{Concentración real}} \times 100$$

4.4.7.3 Precisión

Se determinó en base a los parámetros de reproducibilidad y repetibilidad según:

- Repetibilidad: se define como la dispersión de resultados originados por aplicaciones del mismo método a alícuotas de la misma muestra, para determinar el mismo analito, en el mismo laboratorio, por el mismo operador y con las mismas herramientas analíticas, en un corto intervalo de tiempo. Se expresará como desviación estándar relativa (Coeficiente de desviación).
- Reproducibilidad: de igual manera que la repetibilidad, pero con al menos una de las siguientes condiciones diferente: analista, instrumento, día.

4.4.8 Metodologías de extracción

4.4.8.1 Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE se realizó de acuerdo con trabajos descritos (Robatel y col., 2002), para el proceso de extracción fue necesario preparar buffer fosfato de sodio (Na_2HPO_4) a pH 7,4, hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 M y fosfato dipotásico (K_2HPO_4) 0,1 M.

Para la extracción se utilizaron cartridges de resina C₁₈, Sep-Pak, Waters (500 mg). En una primera etapa se acondicionó la resina con la adición de 3 porciones de 5 mL de metanol, seguidas de 2 porciones de 5 mL buffer fosfato de sodio ajustado a pH 7,4. Luego se adicionó el plasma fortificado se esperó 20 minutos para la interacción del analito con la resina. Posteriormente se realizó el lavado de los cartridge con 4 porciones de 5 mL de buffer fosfato a pH 7,4 y con 2 porciones de 5 mL de una mezcla de metanol (15%) y buffer fosfato (85%).

Finalmente se realizó la elución del compuesto de interés con 2 porciones de 6 mL de metanol, el eluido se colectó en viales de vidrio color ámbar, el cual se llevó a sequedad por medio de una corriente de nitrógeno a 60°C en baño seco, el extracto se reconstituyó con 1 mL de agua para su posterior análisis por HPLC-DAD [fig. 12].

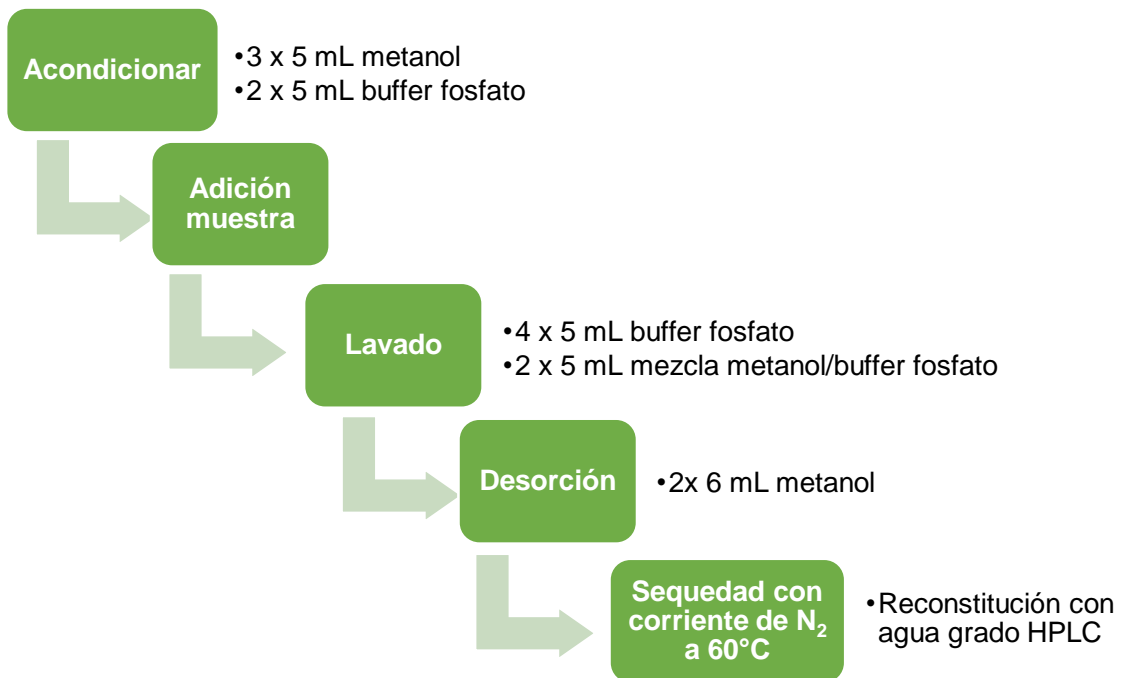


Figura 12. Descripción del proceso SPE.

4.4.8.2 Precipitación de proteínas con adición de solvente (PP)

Para la PP se utilizó acetonitrilo (ACN) como solvente, en una primera etapa se optimizó el volumen de éste fluctuando entre 0,5 y 2 mL, utilizando el mismo volumen de plasma.

Para la PP se tomaron 0,25 mL de plasma con micropipeta el cual se llevó a un tubo de ensayo, posteriormente se le adicionó 0,5 mL de ACN, se agitó con vórtex durante 30 segundos exactos, para luego centrifugarlo a 9000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue separado con pipeta pasteur evitando arrastrar las proteínas precipitadas desde el fondo del tubo, el cual fue posteriormente analizado por HPLC-DAD y DSA-TOF-MS [fig. 13].

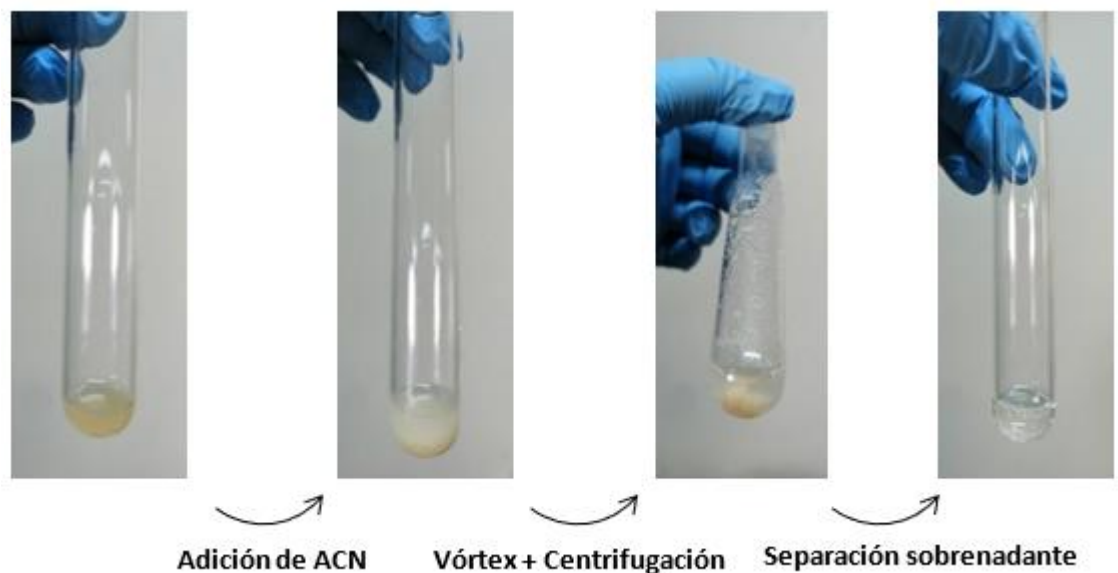


Figura 13. Descripción del proceso PP.

4.4.8.3 Microextracción de dispersión líquido-líquido (DLLME)

Para DLLME se optimizaron las variables de adición de sal (NaCl) y adición de solvente con el objetivo de favorecer la formación de la gota, realizando 3 pruebas.

En la prueba 1 se evaluó metanol (MeOH) como agente dispersante [fig. 14] para lo cual se llevó 1 mL de plasma fortificado (4.4.5) a un tubo de ensayo. luego se adicionó con micropipeta 3 ml de agua, posteriormente se adicionó con micropipeta 350 μ L de MeOH y 150 μ L de cloroformo, como agente extractante. El tubo de ensayo se agitó con vórtex durante 30 segundos exactos, para luego centrifugarlo a 9000 rpm durante 10 minutos.

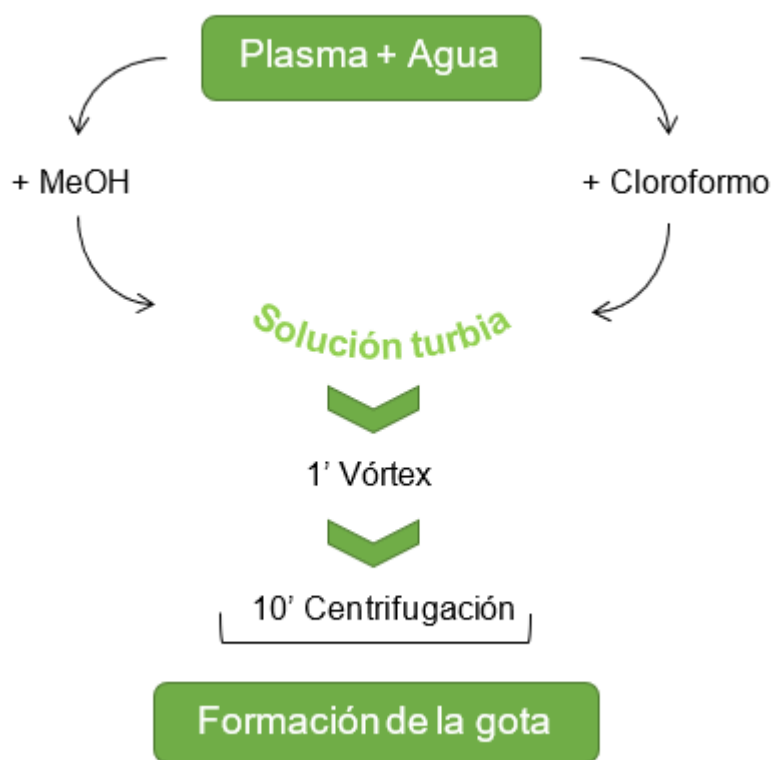


Figura 14. Descripción de la prueba 1 de DLLME.

En la prueba 2 se evaluó la adición de sal (NaCl) y tratamiento previo [fig. 15], para lo cual se llevó 1 mL de plasma fortificado (4.4.5) a un tubo de ensayo y se le adicionó con micropipeta 1mL de ACN para precipitar las proteínas, luego se agitó con vórtex durante 30 segundos exactos, para luego centrifugarlo a 9000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante de la precipitación con pipeta pasteur y se llevó a un tubo limpio. A este sobrenadante se le adicionó 1 mL de

la solución extractante compuesta de cloroformo y MeOH en la razón 3:7 con micropipeta. Posteriormente se adicionó 2,5 mL de una solución de NaCl 6% p/v a un pH 9. El tubo de ensayo se agitó con vórtex durante 30 segundos exactos, para luego centrifugarlo a 9000 rpm durante 10 minutos (Martins y col., 2017).

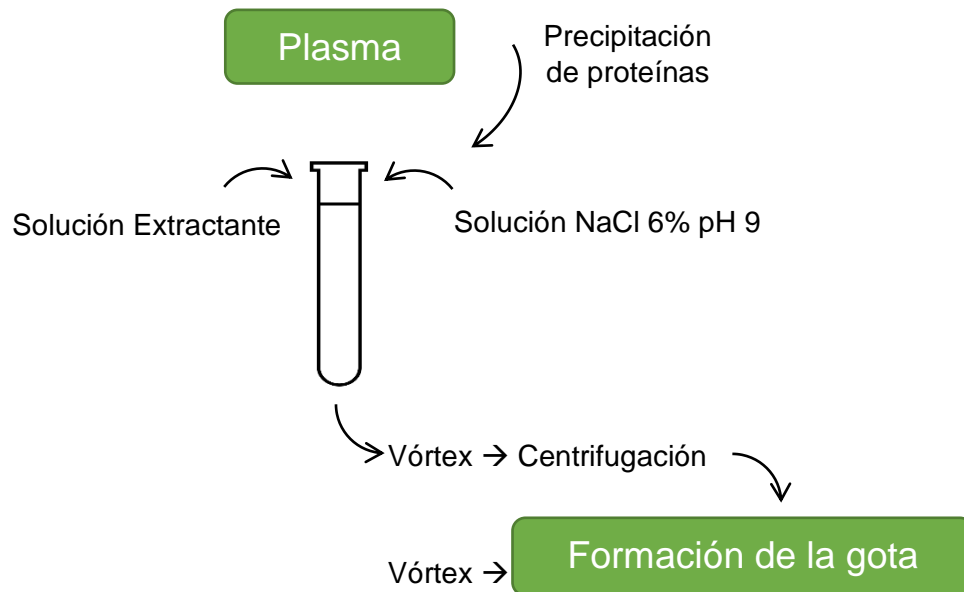


Figura 15. Descripción de la prueba 2 de DLLME.

En la prueba 3 se evaluó el porcentaje de sal adicionado, previo tratamiento de PP y la disminución las cantidades de muestra y solvente utilizado [fig. 16], para lo cual se llevó 0,25 mL de plasma fortificado (4.4.5) a un tubo de ensayo y se adicionó con micropipeta 500 μ L de ACN para precipitar las proteínas, luego se agitó con vórtex durante 30 segundos exactos, para posteriormente centrifugarlo a 9000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante de la precipitación con pipeta pasteur y se llevó a un tubo limpio. Al sobrenadante se le adicionó 250 μ L de cloroformo y posteriormente 2,5 mL de una solución de NaCl 8% a pH 11. El tubo de ensayo se agitó con vórtex durante 30 segundos exactos y se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos. Las gotas formadas en las tres pruebas se extrajeron con una jeringa y se llevaron a un vial, esta solución se llevó a

sequedad con una corriente de nitrógeno en baño seco a 45°C. La reconstitución se llevó a cabo con 1 mL de agua para cromatografía, para luego ser analizado por HPLC-DAD

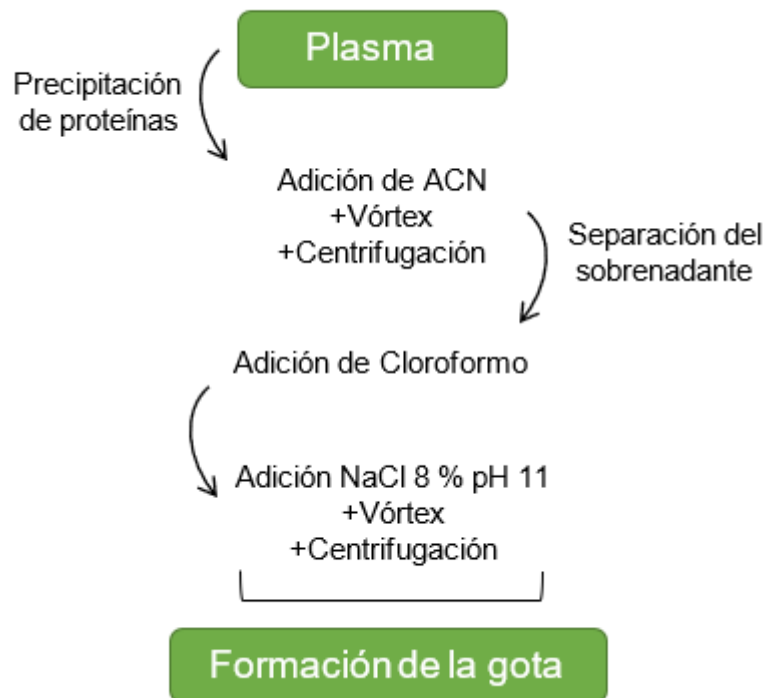


Figura 16. Descripción de la prueba 3 de DLLME.

4.4.8.4 Ultrafiltración (UF)

Para llevar a cabo UF se utilizaron unidades de filtración Amicon Ultra, ultracel 3-KDa [fig. 17]. Los filtros fueron acondicionados en tres etapas para su utilización. En una primera etapa se adicionó 500 μ L de agua milliQ con micropipeta, las unidades se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm. En la segunda etapa se desechó el agua previamente utilizada y se agregaron 500 μ L de hidróxido de sodio 0,1 M, las unidades se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm. En la última etapa del acondicionamiento de las unidades se desechó el hidróxido de sodio y se adicionó nuevamente 500 μ L de agua milliQ con micropipeta, luego

las unidades se centrifugaron durante 10 minutos a 13000 rpm, desechando finalmente el agua utilizada, quedando las unidades preparadas para ser utilizadas.



Figura 17. Unidades de filtración Amicon Ultra, ultracel 3-KDa.

Para el análisis de las muestras, a las unidades previamente acondicionadas se les adicionó 250 μ L de plasma fortificado (4.4.5) con micropipeta, estas fueron llevadas a centrifugación durante 10 minutos a 15000 rpm. Posteriormente se tomó la solución que traspasó el filtro, esta se diluyó para su posterior análisis por HPLC-DAD [fig. 18]. Para la limpieza de las unidades [fig. 19] y su futura reutilización, se sacó el filtro al cual se le adicionó 500 μ L de agua milliQ, para luego introducirlas en la unidad en posición opuesta a la inicial, se llevaron a centrifugación por 15 minutos a 10000 rpm. Finalmente, se desecha el agua adicionada y en el caso de ser reutilizadas las unidades son nuevamente acondicionadas, o bien almacenadas en una solución de 0,001 % de azida de sodio.

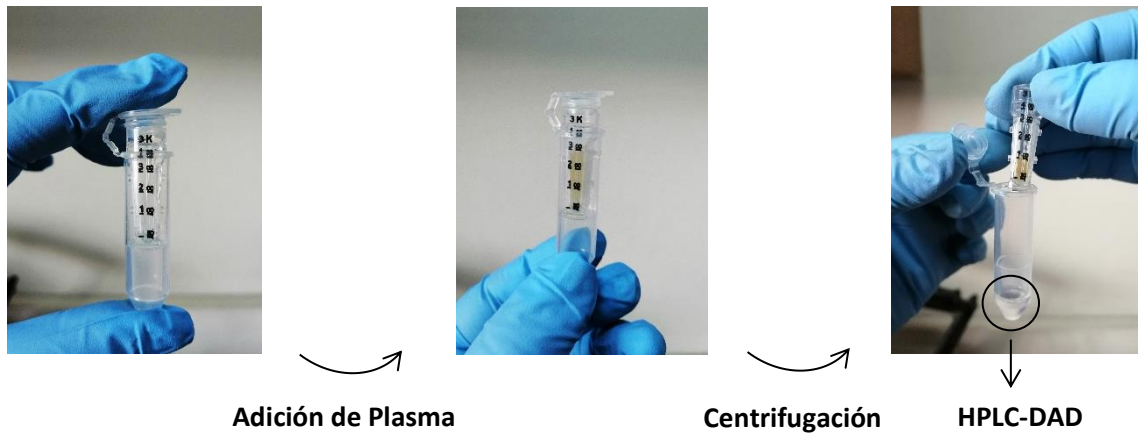


Figura 18. Descripción del proceso UF.

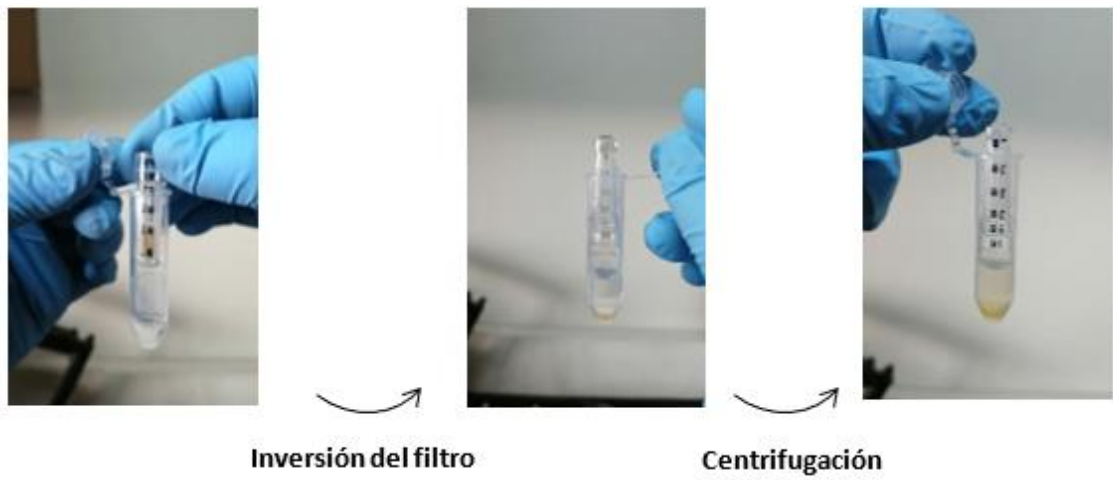


Figura 19. Descripción del proceso de limpieza de las unidades de UF.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Elección de la fase móvil para HPLC-DAD

Para la elección de la fase móvil se tomó como base información bibliográfica, las condiciones utilizadas fueron: longitud de onda de 298 nm, fase móvil: buffer fosfato de sodio a pH 7 (A) y metanol (B), con un flujo de 1 mL/min (Dailly y col., 2011). El programa de gradiente utilizado se describe en la tabla 2.

Tabla 1. Programa de gradiente para la cuantificación de MER mediante HPLC-DAD.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
5	70	30
7	90	10
13	90	10

En la figura 20 se presenta los resultados cromatográficos de MER en agua a una concentración de 100 mg MER/L, analizado por HPLC-DAD, obteniendo un pico cromatográfico simétrico a un tiempo de retención de 8,8 min.

Si bien se obtienen buenos resultados cromatográficos, se decidió cambiar la fase móvil para prolongar la vida útil de la columna, debido a que se ha descrito que el uso de buffer fosfato como fase móvil, podría formar precipitado dentro de esta (Aparecida de Marco y col., 2019).

La fase móvil utilizada para los análisis posteriores está constituida por: 10% acetonitrilo, 90% ácido acético 0,1 M con gradiente isocrático (Wu y col., 2008). En la figura 21 se presentan los resultados del análisis de MER en agua de concentración 100 mg MER/L a dos flujos 0,5 y 0,9 mL/min por HPLC-DAD,

obteniéndose picos cromatográficos definidos en tiempos de retención 11,98 y 10,58 minutos respectivamente.

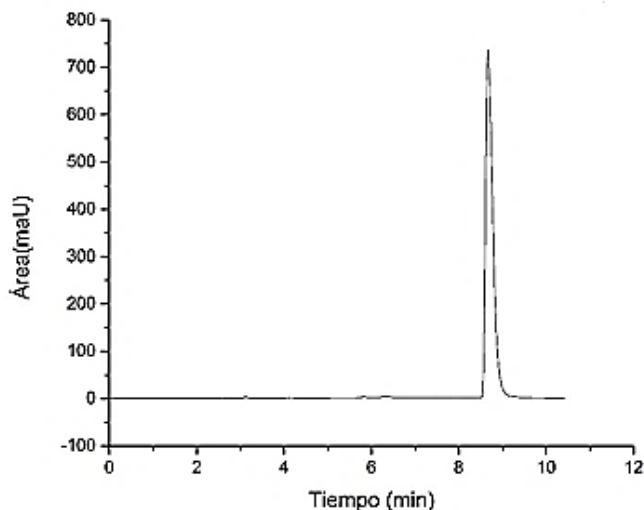


Figura 20. Cromatograma de MER en buffer fosfato y metanol.

La elección del flujo utilizado se basó en el tiempo de análisis de la muestra, seleccionándose 0,9 mL/min [fig. 21, B].

5.2. Curva de calibración de MER en agua

La curva de calibración se realizó mediante masada según 4.4.3 [Anexo 1]. Para la validación instrumental se determinó LD, LC, repetibilidad y reproducibilidad.

El rango lineal se evaluó entre concentraciones de 1 – 100 mg MER/L, estimando la estabilidad de las soluciones por medio de la variación de las señales de respuesta (durante 3 días), los parámetros de la curva de calibración se encuentran en la tabla 3.

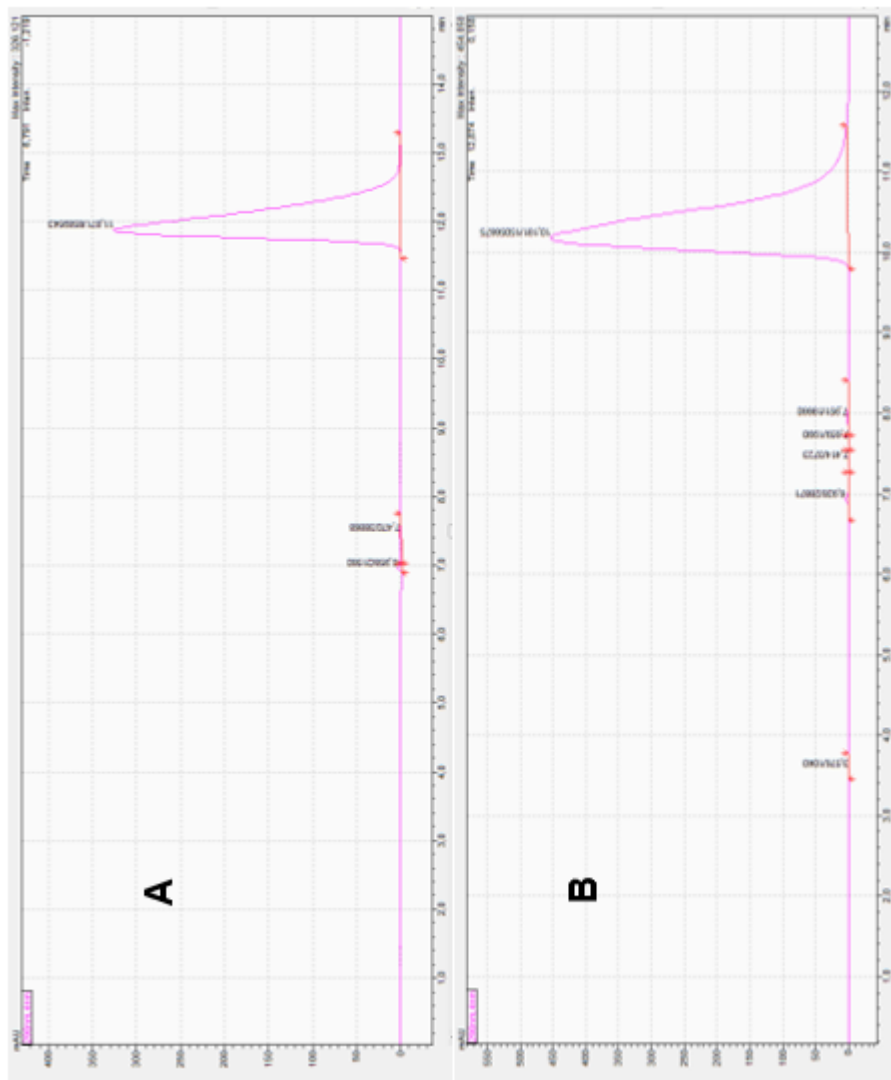


Figura 21. Comparación de los cromatogramas para la elección del flujo.
 A: flujo 0,5 mL/min; B: flujo 0,9 mL/min.

Tabla 2. Parámetros de la curva de calibración de MER en agua.

	Día 1	Día 2	Día 3
Pendiente (maU·L/mg MER)	48073	50204	57153
Intercepto (maU)	-3531,4	-71322	-211207
R²	0,9999	0,9981	0,9902

R² coeficiente de determinación

Los resultados de la linealidad en el tiempo del MER en agua se presentan en la figura 22, donde se determinó un comportamiento lineal entre 1-100 mg MER/L para la curva del día 1 (azul) y del día 2 (naranja), mientras que para el análisis de las muestras del día 3 (gris) la linealidad se presenta entre 1-70 mg MER/L, cabe destacar que para las tres curvas de calibración se utilizaron los mismos estándares, por lo tanto, la linealidad de MER va entre 1- 70 mg MER/L. Para todas las determinaciones la desviación estándar relativa fue menor al 2 %, los resultados observados concuerdan con lo descrito en bibliografía con relación a la degradación del MER, el cual es estable durante las primeras 2 horas, luego de 6 horas en autosampler se degrada en un 10% (Lin, y col., 2011).

Por lo descrito anteriormente se definió el tiempo de trabajo y análisis de las muestras menores a 3 días sin refrigeración, considerando para los análisis posteriores la utilización de la ecuación de la recta determinada para el día 1.

El cálculo de LD y LC se llevó a cabo según 4.4.7.a) [Tabla 4, Anexo 2]., obteniéndose 0,1044 y 0,1361 mg MER/L, respectivamente, resultados que coinciden con los informados en literatura (Dailly y col., 2011).

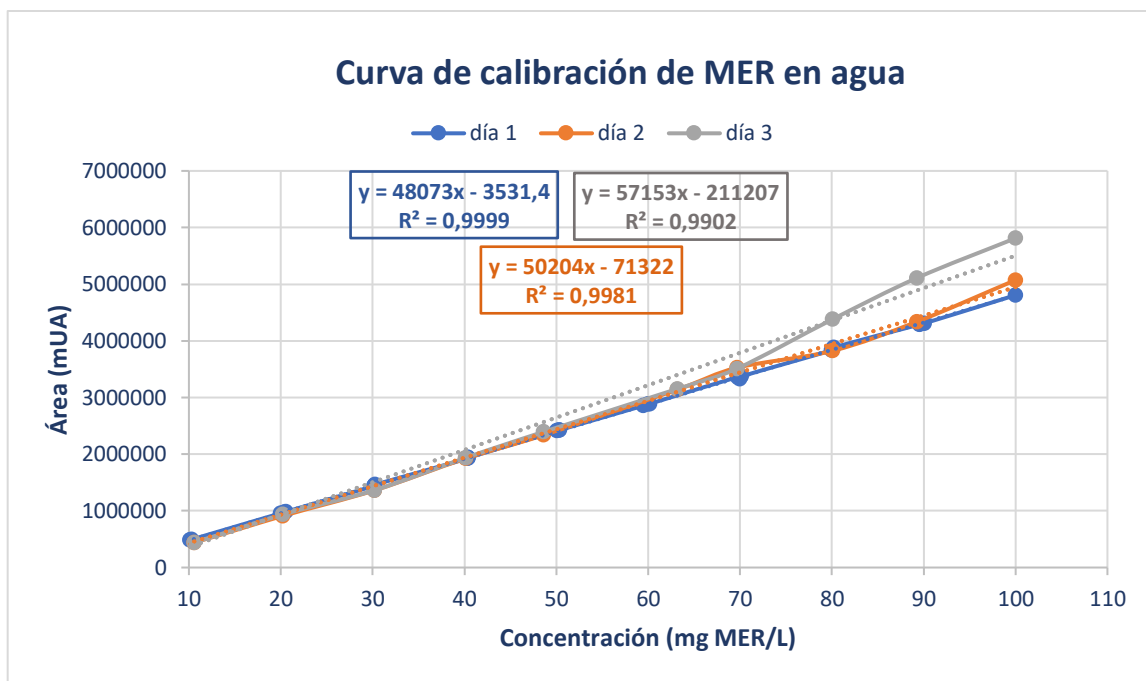


Figura 21. Curva de calibración de MER en agua analizada durante 3 días.

Tabla 3. Valores obtenidos de LD y LC para MER en matriz acuosa.

Área Promedio (maU)	443,6
SD (maU)	196,7
LD (mg MER/L)	0,1044
LC (mg MER/L)	0,1361

5.3. Condiciones DSA-TOF-MS

Las condiciones utilizadas se describen en 4.4.2 (Garrido y Mendoza, 2016). Se determinó la señal correspondiente a la masa/carga (m/z) del MER por medio del análisis reiterado de una solución acuosa de concentración 100 mg MER/L, determinando que la señal correspondiente al analito es $m/z=358$ [fig. 23]. Dicha masa corresponde a la hidrólisis y posterior descarboxilación del MER durante la ionización de la muestra [fig. 24], lo cual ha sido descrito en bibliografía (Hrabák, y col., 2012.).

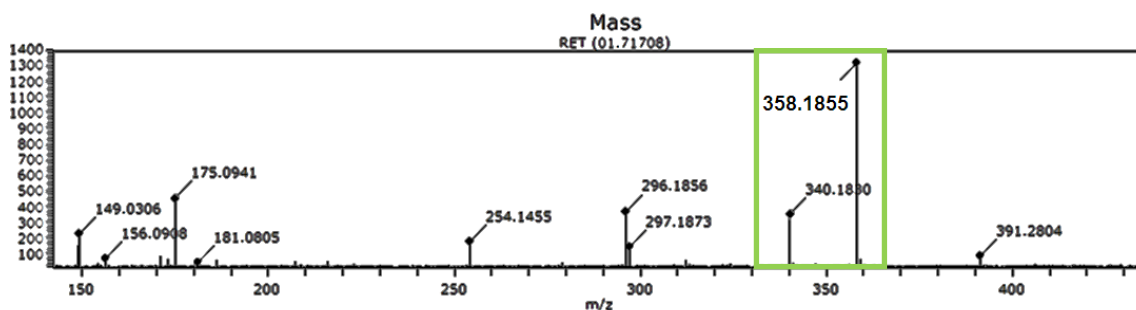


Figura 22. Espectro m/z de MER en matriz acuosa por DSA-TOF-MS.

Para evaluar el efecto del solvente sobre la ionización de la muestra se realizaron 2 curvas de calibración, la primera usando como solvente agua y la otra NaOH 0,1 M, para establecer en cuál de los dos medios se obtiene una mejor sensibilidad definida como la pendiente de la recta, para el ión ($m/z=358$). Para la curva de calibración en agua se obtuvo un coeficiente de determinación de 0,9996, mientras que para NaOH de 0,9432. Donde la sensibilidad es 0,4313 (área·L/ mg MER) para la curva en agua y 0,4216 para la curva en NaOH, se decidió trabajar con la curva en agua debido a que presenta una menor dispersión y mejor respuesta entre los datos en el rango de concentración de trabajo [Anexo 3].

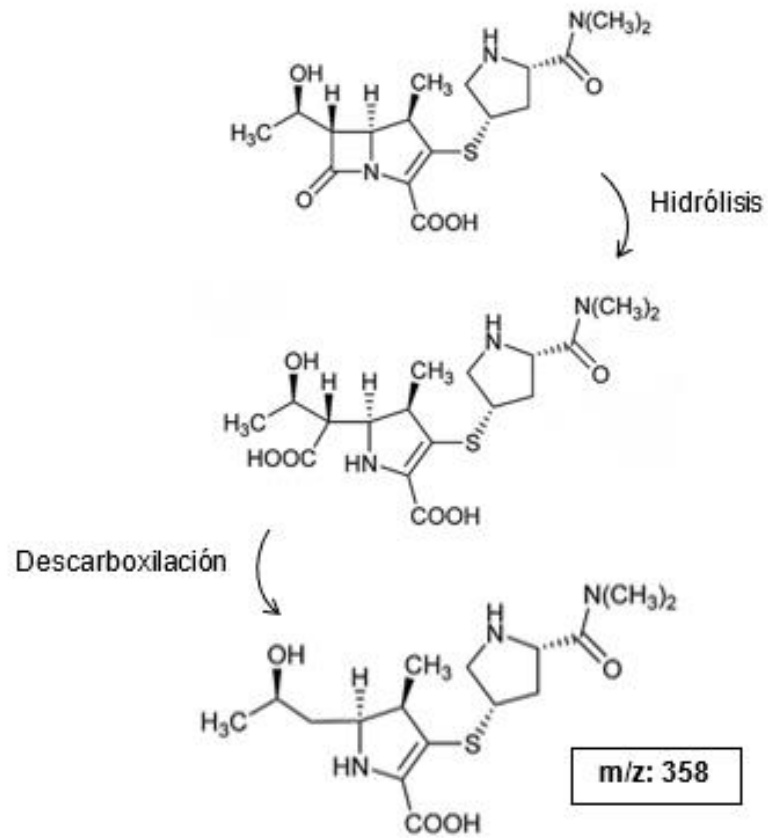


Figura 23. Proceso de ionización del MER, m/z 358 (Hrabák y col.,2012).

5.4. Evaluación de las técnicas de extracción analizadas por HPLC-DAD

5.4.1 SPE

La elección de las condiciones utilizadas de extracción se basó en bibliografía que se destaca por altos porcentaje de recuperación y reproducibilidad. (Ohmori y col., 2011, Hashemi y col., 2018).

Para evaluar SPE se utilizó una curva de calibración en matriz plasma entre 20 y 180 mg MER/L por triplicado a la cual se le aplicó la metodología de extracción [Anexo 4] según 4.4.5.

Los resultados obtenidos del análisis por HPLC-DAD dieron cuenta de una señal de área constante perteneciente a la matriz a los 7 minutos. Debido a la variabilidad de los resultados por la metodología empleada se decidió normalizar las áreas de las señales respectivas a MER con el promedio del área correspondiente a la señal de la matriz plasma [fig. 25].

A partir de los resultados obtenidos de la curva de calibración en matriz plasma se puede observar una linealidad [fig. 26], entre 60 y 180 mg MER/L, con un coeficiente de determinación de 0,9862.

El cálculo de LD y LC se llevó a cabo según 4.4.7.1 [Tabla 5, Anexo 5], obteniendo 0,1353 y 0,2093 mg MER/L respectivamente, resultados mayores que los reportados en literatura (Robatel, y col., 2002; Denooz y Charlier, 2008; Ohmori y col., 2011). El análisis de una muestra de plasma fortificada según 4.4.5 dio como resultado un porcentaje de recuperación de un 76%, valor menor a lo informado por bibliografía utilizando la misma metodología (Ohmori y col., 2011; Ferrone y col., 2019). La repetibilidad expresada como la desviación estándar relativa fue en promedio menor al 9% [Anexo 5].

Si bien los resultados obtenidos mediante SPE presentan altos porcentajes de recuperación y buen coeficiente de determinación para una matriz compleja, es

una metodología poco automatizada, por lo cual está sujeta a diversos cambios durante el proceso, lo que influye en la recuperación y repetibilidad.

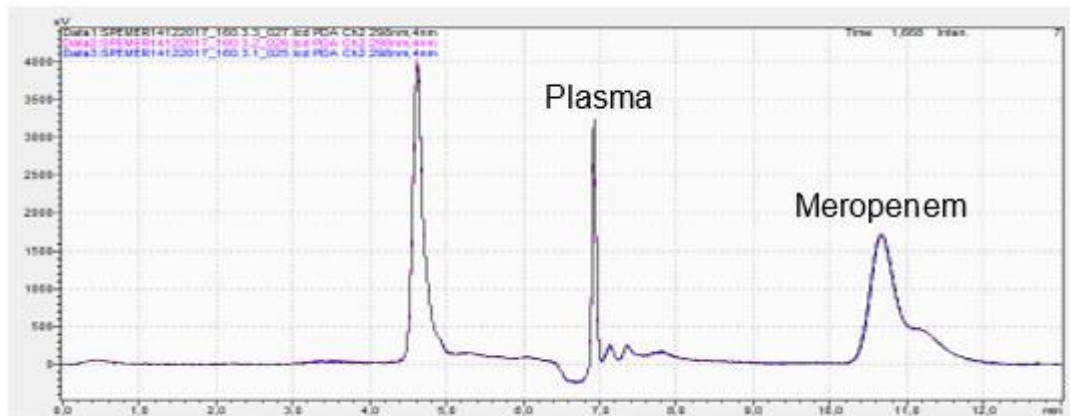


Figura 24. Cromatograma de extracto de plasma fortificado obtenido por SPE, cuantificado por HPLC-DAD.

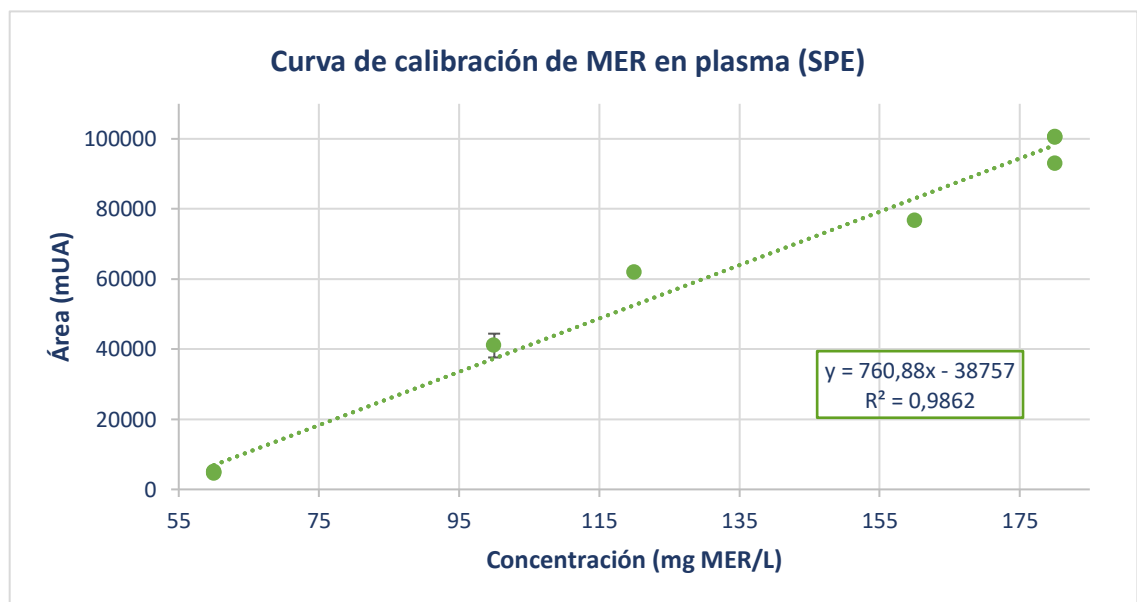


Figura 25. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por SPE, cuantificado por HPLC-DAD.

Tabla 4. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con SPE.

Área Promedio (maU)	1446,6
SD (maU)	508,2
LD (mg MER/L)	0,1353
LC (mg MER/L)	0,2093

5.4.2 PP

Para evaluar PP se utilizó una curva de calibración en matriz plasma entre 20 y 100 mg MER/L por triplicado a la cual se le aplicó la metodología de extracción [Anexo 6]. Los resultados de la curva se presentan en la figura 27, donde el coeficiente de determinación obtenido fue 0,9994. Al analizar una muestra de plasma fortificada según 4.4.5 se obtuvieron porcentajes de recuperación mayor a 96% para todo el rango de concentraciones.

El cálculo de LD y LC se llevó a cabo según 4.4.7.1 [Tabla 6, Anexo 7], obteniendo 0,1127 y 0,1821 mg MER/L respectivamente. Los resultados obtenidos por esta metodología de extracción fueron similares a lo informado por bibliografía utilizando la misma metodología (Lin y col., 2011). La repetibilidad y reproducibilidad expresada como la desviación estándar relativa fue menor al 0,9% y al 4%, respectivamente, para todas las concentraciones [Anexo 6].

La PP es un excelente método de extracción dada su sencillez y alto porcentaje de recuperación. La adición de solvente, en este caso ACN, cambia la constante dieléctrica del plasma modificando la estructura terciaria de las proteínas, produciendo su desnaturalización y posterior precipitación (Putnam, 1965).

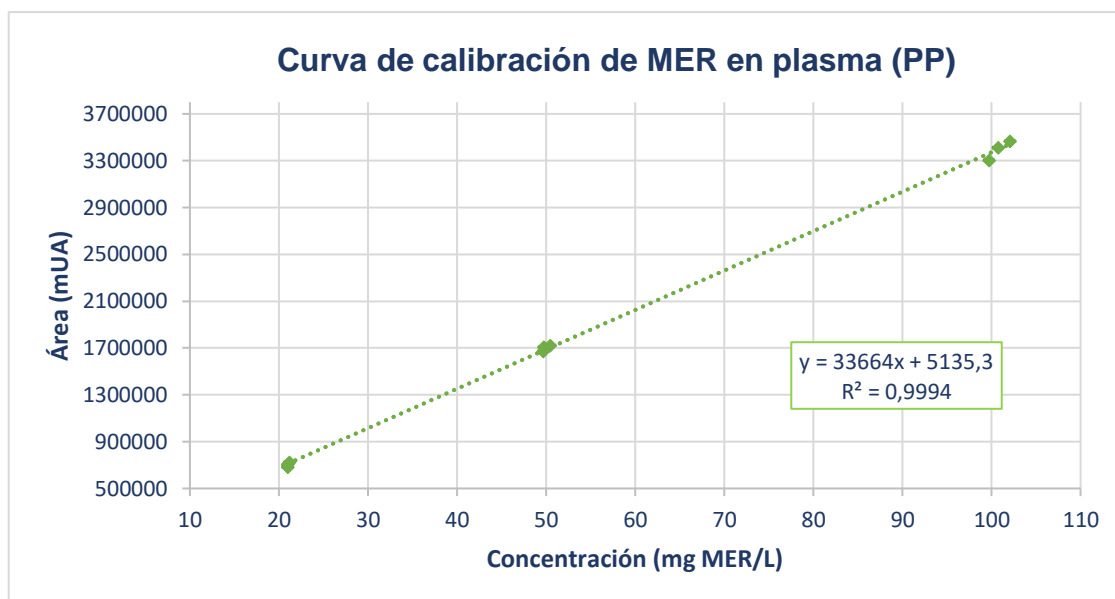


Figura 26. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por PP, cuantificado por HPLC-DAD.

Tabla 5. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con PP.

Área Promedio (maU)	4363,5
SD (maU)	476,9
LD (mg MER/L)	0,1127
LC (mg MER /L)	0,1821

5.4.3 DLLME

La DLLME se destaca por su capacidad de concentrar el analito y por ser amigable con el ambiente (Rezaee y col., 2010).

En la primera prueba de DLLME se utilizó como agente dispersante MeOH y como agente extractante cloroformo, al adicionar ambos solventes al plasma se modifica la constante dieléctrica del medio, precipitando las proteínas, lo cual podría impedir la extracción de la gota [fig. 28].



Figura 27. Formación de gota, primera prueba DLLME.

En base a lo descrito se decidió previo a la DLLME realizar una PP con la adición de solvente (ACN) tal como se describió en la sección 4.4.8.2.

Para esta segunda prueba se consideró un blanco (plasma sin analito) y tres muestras de plasma fortificadas a una concentración de 100 mg MER/L. Como resultado de esta prueba se observó la formación de la gota [fig. 29]. Las muestras de gota obtenidas fueron secadas con corriente de nitrógeno en baño seco a 45 °C y reconstituidas en agua grado HPLC para su posterior análisis en HPLC-DAD, donde sólo se observó la señal cromatográfica del analito en una de las muestras fortificadas, con un área 2456 maU correspondiente a una concentración 6,217 mg MER/L [fig. 30].



Figura 28. Formación de gota, segunda prueba DLLME.

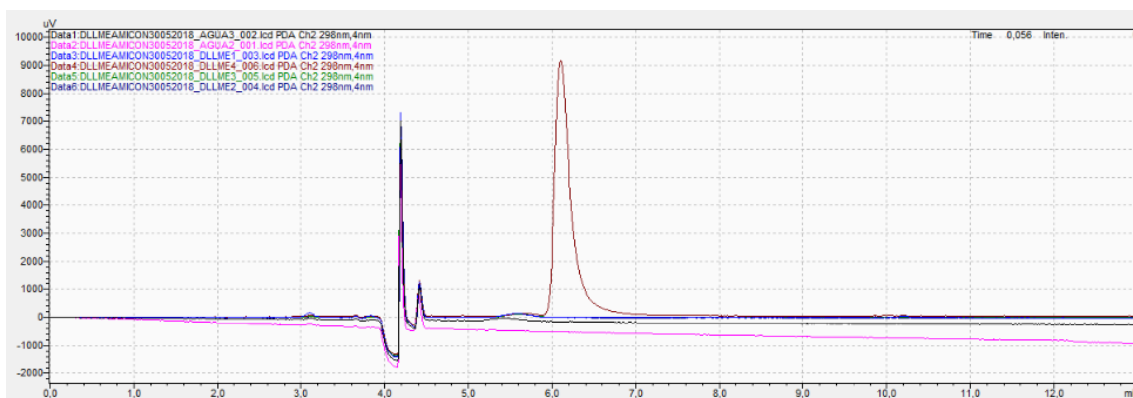


Figura 29. Cromatograma de extracto de plasma fortificado obtenido por DLLME segunda prueba, cuantificado por HPLC-DAD.

Para la tercera y última prueba realizada se llevó a cabo en una primera etapa PP a un blanco (plasma sin analito) y tres muestras de plasma fortificadas a una concentración de 100 mg MER/L. En esta prueba se decidió no agregar MeOH ya que el ACN actúa agente dispersante. A partir de estas condiciones se observó la formación de la gota [fig. 31]. Estas muestras de gotas obtenidas fueron secadas con corriente de nitrógeno y baño seco, fueron reconstituidas en agua grado HPLC para su posterior análisis en HPLC-DAD [fig. 32]. Al interpolar los

valores de área obtenidos en la curva de calibración en agua se obtiene un porcentaje de recuperación menor al 1%, dado la complejidad de la extracción, la escasa transferencia del analito a la fase orgánica y los bajos porcentajes de recuperación se decidió no utilizar esta metodología para análisis de muestras *posteriores*.



Figura 30. Formación de gota, tercera prueba DLLME.

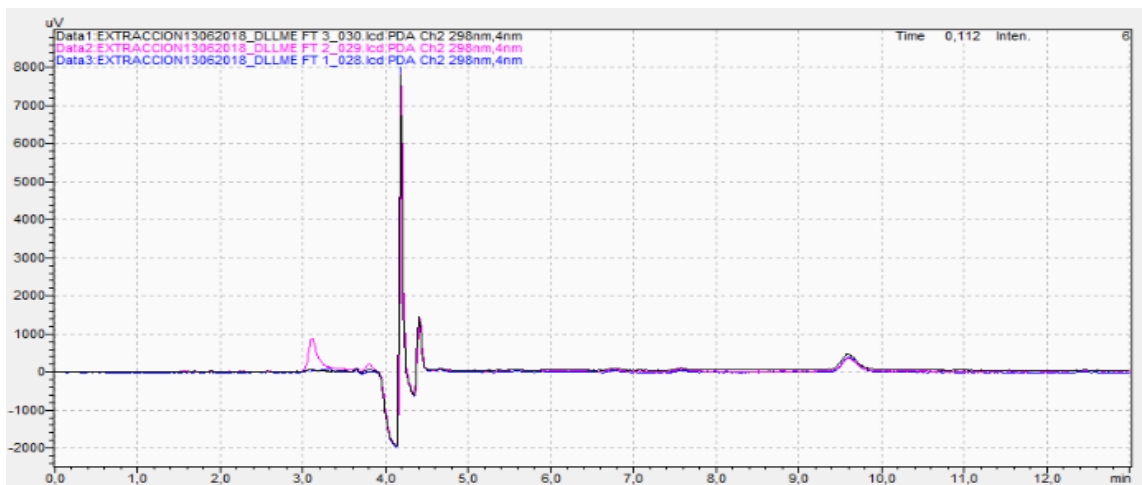


Figura 31. Cromatograma de extracto de plasma fortificado obtenido por DLLME tercera prueba, cuantificado por HPLC-DAD.

5.4.4 UF

Para evaluar UF se utilizó una curva de calibración en matriz plasma entre 20 y 100 mg MER/L por triplicado a la cual se le aplicó la metodología de extracción [Anexo 8]. Los resultados de la curva se presentan en la figura 33, donde el coeficiente de correlación obtenido es de 0,9972, con una desviación estándar relativa menor al 1,3 % para todas las concentraciones. Al analizar una muestra de plasma fortificada según 4.4.5 se obtuvieron porcentajes de recuperación mayor a 90% para todo el rango de concentraciones.

El cálculo de LD y LC se llevó a cabo según 4.4.7.1 [Tabla 7, Anexo 9], obteniendo 0,1057 y 0,1465 mg MER/L respectivamente. Obteniéndose resultados similares a lo informado por bibliografía utilizando la misma metodología (Briscoe y col., 2012). La repetibilidad y reproducibilidad expresada como la desviación estándar relativa fue menor al 1,3% y al 0,9% para todas las concentraciones respectivamente [Anexo 8].

Tabla 6. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con UF.

Área Promedio (maU)	710,2
SD (maU)	280,2
LD (mg MER/L)	0,1057
LC (mg MER/L)	0,1465

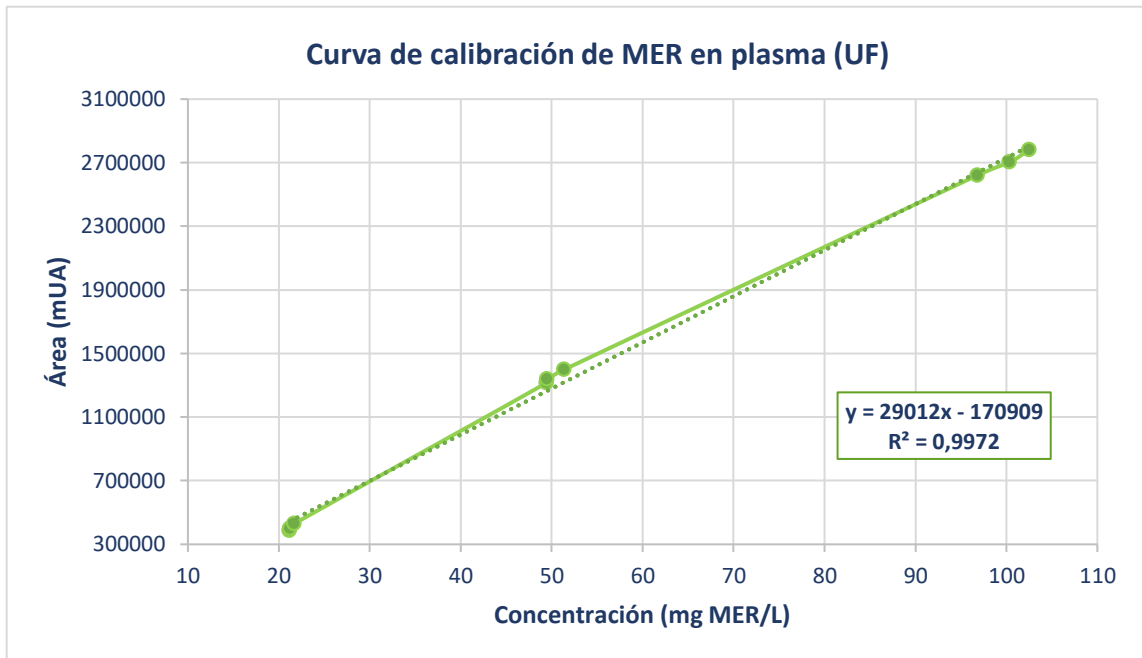


Figura 32. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por UF, cuantificado por HPLC-DAD.

En contraste con muchos métodos comúnmente utilizados, UF se caracteriza por un casi nulo tratamiento de la muestra, por lo que se minimizan las interacciones con la matriz o superficies. (Kingsbury y Laue 2011). Por lo tanto, este método se destaca por su sencillez, alto porcentaje de recuperación y por ser amigable con el medioambiente al no utilizar solventes y además por reutilizar las unidades de UF.

Se compararon los resultados de sensibilidad (expresada como pendiente de la recta), recuperación y coeficiente de determinación obtenidos de las distintas técnicas de extracción SPE, PP y UF. Los resultados reflejan que las últimas dos técnicas presentan los coeficientes de determinación de 0,9994 y 0,9972, respectivamente [fig. 34], por lo cual los extractos obtenidos por estas técnicas fueron analizados por DSA-TOF-MS.

Como se mencionó anteriormente los resultados de SPE pueden ser considerados óptimos para una matriz compleja, pero es una técnica poco automatizada lo cual influye en la recuperación y reproducibilidad, en cambio la PP es un excelente método de extracción dada su sencillez y alto porcentaje de recuperación. Mientras que UF es una técnica que, si bien requiere una instrumentación sofisticada presenta ventaja con relación a los interferentes y uso de solvente.

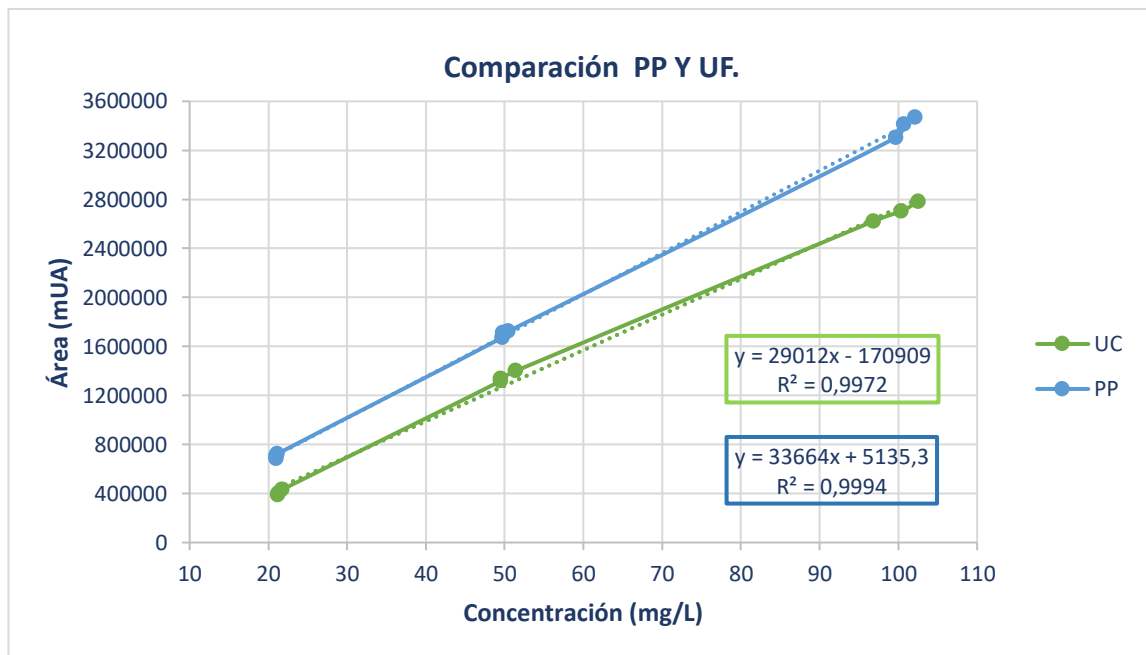


Figura 33. Comparación de resultados obtenidos para las distintas metodologías de extracción analizado por HPLC-DAD.

5.5. Análisis de los extractos de PP y UF por DSA-TOF MS

5.5.1 PP

Los resultados del análisis por DSA-TOF-MS de los extractos obtenidos por PP de la curva calibración en matriz plasma entre 23 y 2000 mg MER/L [Anexo 10] se presentan en la figura 35, donde el coeficiente de determinación obtenido fue 0,9595. Al analizar una muestra de plasma fortificada según 4.4.5 se obtuvieron porcentajes de 47%.

El cálculo de LD y LC se llevó a cabo según 4.4.7.1 [Tabla 8, Anexo 11], obteniéndose 14,93 y 25,66 mg MER/L respectivamente.

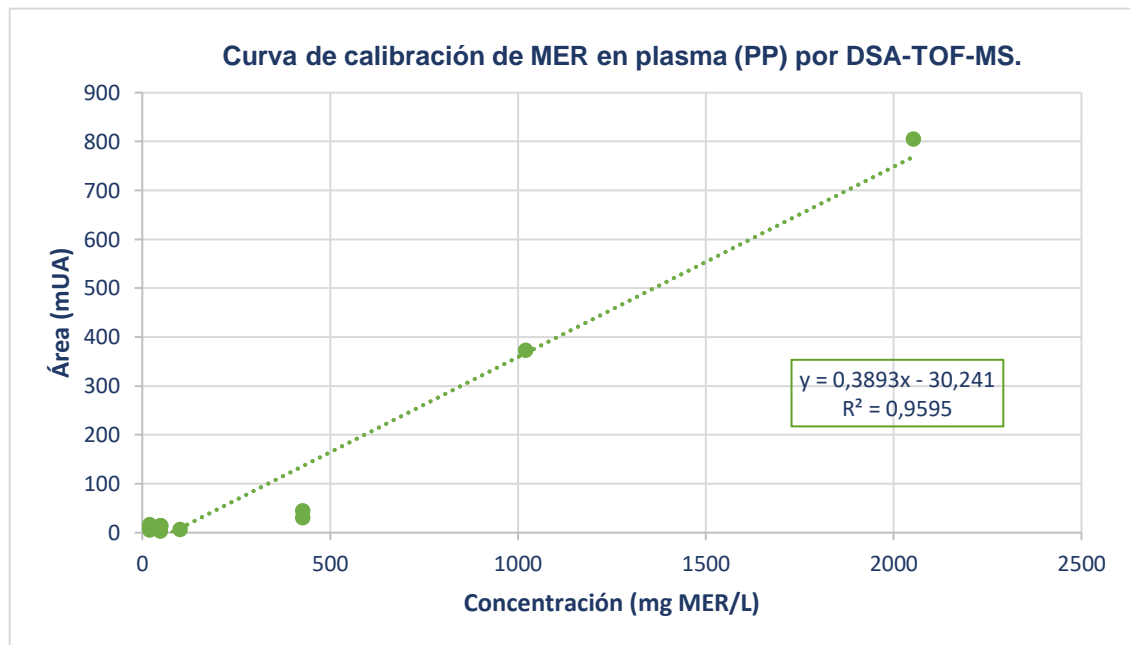


Figura 34. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por PP, cuantificado por DSA-TOF-MS.

Tabla 7. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con PP por DSA-TOF-MS.

Área Promedio (maU)	9,976
SD (maU)	5,969
LD (mg MER/L)	14,93
LC (mg MER/L)	25,66

5.5.2 UF

Los resultados del análisis por DSA-TOF-MS de los extractos obtenidos por UF de la curva calibración en matriz plasma entre 20 y 2000 mg MER/L [Anexo 12] se presentan en la figura 37, donde el coeficiente de determinación obtenido fue 0,9963. Al analizar una muestra de plasma fortificada según 4.4.5 se obtuvieron porcentajes de recuperación entre 36% y 60%, con una desviación estándar relativa menores al 12% para todas las muestras.

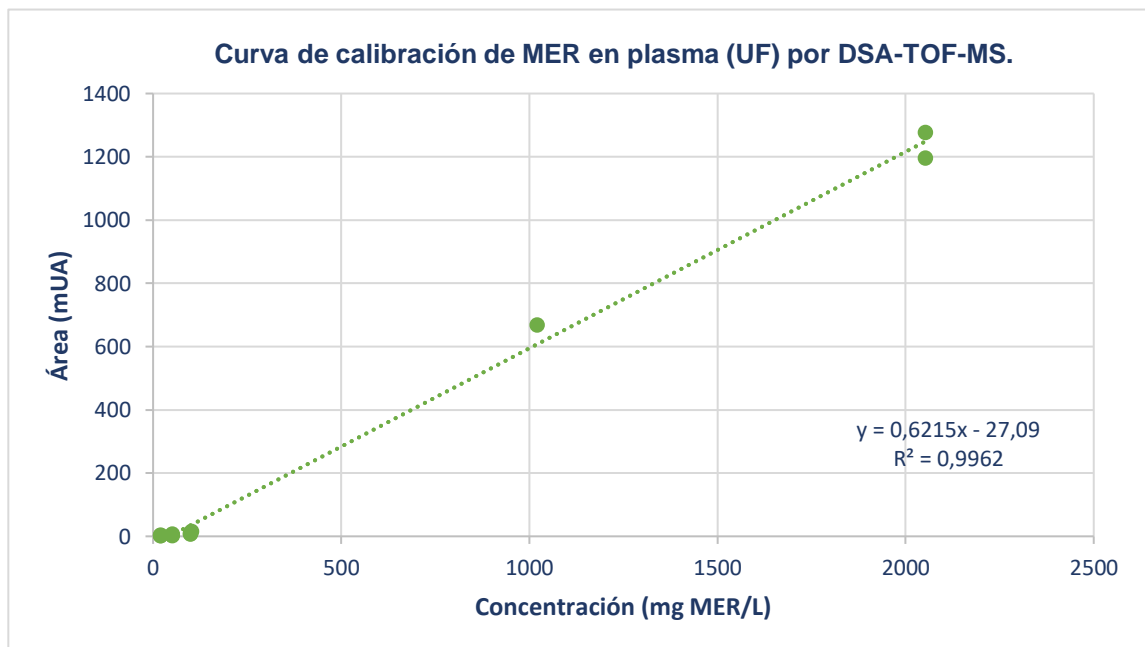


Figura 35. Curva de calibración de MER en extracto de plasma obtenido por UF, cuantificado por DSA-TOF-MS.

El cálculo de LD y LC se llevó a cabo según 4.4.7.1 [Tabla 9, Anexo 13], obteniéndose 4,876 y 5,383 mg MER/L respectivamente.

Tabla 8. Valores obtenidos de LC y LD para MER en matriz plasma con UF por DSA-TOF-MS.

Área Promedio (maU)	1,867
SD (maU)	0,4500
LD (mg MER/L)	4,876
LC (mg MER/L)	5,383

En relación con los análisis realizados por DSA-TOF-MS utilizando PP y UF la sensibilidad de UF es aproximadamente el doble de PP. La metodología de extracción UF permite obtener un extracto con menor efecto matriz, estos resultados son opuestos a los obtenidos por HPLC-DAD, lo cual podría deberse a que los análisis por DSA-TOF-MS se realizan a elevadas temperaturas lo cual disminuiría el efecto matriz de las muestras.

A partir de los resultados obtenidos de la optimización y validación de las metodologías de extracción, se puede determinar que SPE, PP y UF permite cuantificar con buenas cifras de mérito MER en plasma, tanto por HPLC-DAD como por DSA-TOF-MS [Tabla 10], para realizar la selección de la metodología de extracción más adecuada ahora debe contrastarse el impacto ambiental de cada una de ellas, para lo cual se deben considerar los principios de la química verde.

Tabla 9. Comparación de las metodologías de extracción por HPLC-DAD.

Técnica	Pendiente	Intercepto	R²	LD	LC	%Rec.
SPE	760,88	-38757	0,9862	0,1353	0,2093	76
PP	33664	5135	0,9994	0,1127	0,1821	96
UF	29012	-170909	0,9972	0,1057	0,1465	90

***%Rec.: porcentaje de recuperación.**

En relación al impacto ambiental del proceso analítico la etapa más conflictiva es la extracción desde la matriz, ya que en esta se consume la mayor cantidad de solvente y tiempo del proceso (60%) (Aparecida de Marco y col., 2019), es por esta razón que se realizó la comparación en relación al impacto ambiental de las metodologías de extracción desarrolladas y validadas en esta tesis.

Para la evaluación del impacto ambiental las metodologías se analizaron de acuerdo con el eco-puntaje descrito por Galuszka, y col., 2012 en el cual se les asigna a las tres metodologías un puntaje inicial de 100 puntos, y de acuerdo con las características se realiza una penalización.

En el caso del uso de solvente se utilizó como base la clasificación según Prat y col., 2014, asignando puntuación de 0 a 5 de acuerdo con la figura 37.

Con relación a los equipos de cuantificación y confirmación no se asignó puntaje, ya que, el análisis de los extractos obtenidos por las tres metodologías se realizó por DSA-TOF-MS y HPLC-DAD.

Otro de los puntos que se incorporó en el eco-puntaje fue el ítem instrumentación utilizada durante el proceso de extracción, considerando una penalización de 3 para instrumentación sofisticada y de 1 a material de uso común de laboratorio.

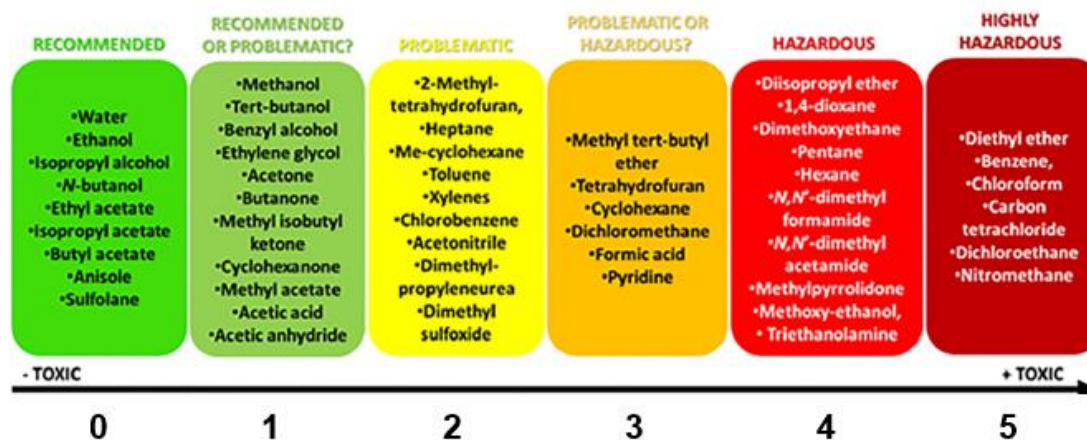


Figura 36. Clasificación de solventes según Prat y col., 2014.

El tiempo de análisis también fue considerado, ya que este podría tener efecto sobre el operario en lo que respecta al uso de solventes, penalizándose con 3 puntos a los tiempos de tratamiento de la muestra mayor a 3 horas, 2 puntos para el tratamiento entre 2-3 a horas y 1 punto para tratamiento de hasta 2 horas. Se incluyó además la evaluación de la simplicidad del proceso de extracción penalizando con 1 punto por cada etapa que contemple la metodología. Finalmente se consideró la miniaturización penalizando con 2 puntos volúmenes mayores a 1,5 mL, con 1 puntos volúmenes entre 1,5 -1 mL y 0 puntos a volúmenes menores 1 mL. Los resultados obtenidos de la asignación de eco-puntaje se presentan en la tabla 11.

Tabla 10. Comparación de las metodologías optimizadas y validadas de acuerdo con el eco-puntaje.

Criterio	SPE	PP	UF
Reactivos	1 (resina)	0	0
Desechos	5 (>10 mL)	3 (1-10 mL)	1 (<1 mL)
Solventes (Prat,2014)	1 (MeOH)	2 (ACN)	0
Instrumentación	2(Manifold, vacío)	2 (Vórtex y centrifuga)	3 (Ultracentrífuga)
Simplicidad	6 (Acondicionamiento, traspaso de muestra, secado, elución, secado y reconstitución)	5 (Traspaso de muestra, adición de solvente, vórtex, centrifugación y separación)	4 (Acondicionamiento, traspaso de muestra, centrifugación y separación)
Tiempo	3 (>3 horas)	2 (2-3 horas)	1 (hasta 2 horas)
Miniaturización	2 (>1,5 mL)	0 (<1 mL)	0 (<1 mL)
Total	80	86	91

En relación a las metodologías optimizadas y validadas en este trabajo, UF permite su reutilización contribuyendo a la disminución de desechos que ingresan al medioambiente. Esta técnica de extracción se clasifica como un tratamiento suave, aplicable a volúmenes pequeños de muestra lo que facilita la detección de MER en adultos, pero más importante en niños donde la muestra es reducida. Además se destaca por no utilizar solventes de acuerdo al quinto principio de la química verde (Anastas y Warner, 1998), no obstante conlleva una mayor

demanda energética, convirtiéndose en una desventaja para el proceso (Häckl y Kunz, 2018).

Realizando el mismo análisis relacionado a la química verde la técnica de PP se clasifica como un tratamiento destructivo (Armenta y col.,2017), que requiere el uso de solventes orgánicos como el ACN, el cual es tóxico y puede tener efectos sobre la salud del operador, por lo cual requiere un adecuado manejo del personal, implementación del laboratorio y la realización de un protocolo de eliminación de desechos correcto, lo que tendrá un costo adicional en el proceso analítico (Aparecida de Marco y col., 2019).

VI. CONCLUSIONES

Es posible identificar y cuantificar meropenem en matriz plasma mediante metodologías analíticas SPE, PP y UC por HPLC-DAD y DSA-TOF-MS.

Las condiciones operacionales optimizadas de HPLC-DAD para la detección y cuantificación de MER en agua y matriz plasma fueron:

- Longitud de onda 298 nm.
- Fase móvil: 10 % acetonitrilo, 90 % ácido acético 0,1 M con gradiente isocrático.
- Flujo: 0,9 mL/min.

El LD y LC de la técnica fueron 0,1044 y 0,1361 mg MER/L respectivamente.

Para los análisis por DSA-TOF-MS se determinó que la señal correspondiente a la masa/carga del MER es 358.

Las metodologías de extracción más adecuadas para el análisis de MER en plasma son PP y UF por las cifras de mérito obtenidas. Ambas metodologías permiten trabajar con volúmenes menores a 1 mL de sangre.

La metodología UF presenta una sensibilidad y un porcentaje de recuperación menor que PP, sin embargo, UF es una metodología innovadora sin uso de solventes y que permite la reutilización de sus unidades de filtración, siguiendo los principios de la química analítica verde, siendo la que obtiene un mayor eco-puntaje.

VII. REFERENCIAS

1. Anastas , P., & Warner, J. (1998). *Green Chemistry: Theory and Practice*. New York: Oxford University Press.
2. Aparecida de Marco, B., Saú Rechelo, B., Gandolpho Tótolí, E., Kogawa, A., & Nunes Salgado, H. (2019). Evolution of green chemistry and its multidimensional impacts: A review. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 27: 1-8.
3. Armenta , S., Esteve-Turrillas , F., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2017). Green Analytical Chemistry: The Role of Green Extraction Techniques. En *Comprehensive Analytical Chemistry* (1-23). Madrid: Wilson&Wilson.
4. Armenta, S., Garrigues, S., Esteve-Turrillas, F., & de la Guardia, M. (2019). Green extraction techniques in green analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 116:248-253.
5. Briscoe, S., McWhinney, B., Roberts, J., & Ungerer, J. (2012). A method for determining the free (unbound) concentration of ten beta-lactam antibiotics in human plasma using high performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 907: 178-184.
6. Carlier, M., Stove, V., Steven, W., De Waele, J., Verstraete, A., Lipman, J., & Roberts, J. (2015). Assays for therapeutic drug monitoring of -lactam antibiotics: A structured review. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46:367-375.
7. Cazes, J. (2005). *Encyclopedia of Chromatography Vol 2*. Florida.USA. Taylor&Francis.
8. Crespo, M. (2005). La resistencia bacteriana: ¿estamos preparados para detectarla? *Infectio*, 9: 31- 45.
9. Dailly, E., Bouquié, R., Deslandes, G., Jolliet, P., & Le Floch, R. (2011). A liquid chromatography assay for a quantification of doripenem, ertapenem, imipenem, meropenem concentrations in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*, 879: 1137-1142.
10. Danner, M., Robertson, A., Behrends, V., & Reiss, J. (2019). «Antibiotic pollution in surface fresh waters: Occurrence and effects». *Science of the Total Environment*, 669:793-804.

11. Denooz, R., & Charlier, C. (2008). Simultaneous determination of five B-lactam antibiotics (cefepim, ceftazidim, cefuroxim, meropenem and piperacillin) in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B*, 864: 161-167.
12. Dong, M. (2006). «*Modern HPLC Practicing Scientist*». 2006. USA. John Wiley & Sons.
13. DRUGBANK. (2019). Última visita el 25 de Septiembre de 2019, disponible en <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00760>
14. Evans, D., Romero, J., & Westoby, M. (2009). Chapter 9: Concentration of Proteins and Removal of Solutes. *Methods in Enzymology*, 463:97-120.
15. Ferrone, V., Cotellesse, R., Cichella, A., Raimondi, P., Carlucci, M., Palumbo, P., & Carlucci, G. (2019). Meropenem and ciprofloxacin in complicated gastric surgery for cancer patients: A simple SPE-UHPLC-PDA method for their determination in human plasma. *Biomedical Chromatography*, 33: 3-23.
16. Galuszka, A., Konieczka, P., Migaszewski, Z., & Namiesnik, J. (2012). Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *Trends in Analytical Chemistry*, 37: 61-72.
17. Garrido, T., y Mendoza, J. (2016). Characterization of dissolved organic matter in river water by conventional methods and direct sample analysis-time of flight-mass spectrometry. *Journal of Chemistry*. ID:1537370, 11 pages.
18. Girish, K., Vamshi, T., Shaila, L., & Usha, S. (2013). Significance of reconstitution time and other physical parameters por evaluation of dry powder injectables. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5: 612-614.
19. Häckl, K., & Kunz, W. (2018). Some aspects of green solvent. *Comptes Rendus Chimie*, 21: 572-580.
20. Harrison, R., Todd, P., Rudge, S., & Petrides, D. (2003). «*Bioseparations Science and Engineering*». USA. Oxford University Press.
21. Hashemi, B., Zohrabi, P., & Shamsipu, M. (2018). Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. *Talanta*, 187:337-347.
22. Hrabák, J., Studentová, V., Walková, R., & Bergerova, T. (2012). Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by

matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 50:2441-3.

23. Kingsbury, J., & Laue, T. (2011). Fluorescent-detected sedimentation in dilute and highly concentrated solutions. *Methods in Enzymology*, 492: 283-304.
24. Kipper, K., Kaili, A., Ivo, L., Juri, K., Kersti, O., & Kait, H. (2009). Rapid Determination of Meropenem in Biological Fluids by LC: Comparison of Various Methods for Sample Preparation and Investigation of Meropenem Stability. *Chromatographia*, 70: 1423-1427.
25. Korany, M., Mahgoub, H. H., Ragab, M., & Elmallah, O. (2017). Green Chemistry: Analytical and Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 16: 839-852.
26. Kraker, M., Stewardson, A., & Harbarth, S. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050?. *Plos Medicine*, 13:11.
27. Kratzer, A., Frieder, K., & Christoph, D. (2016). Unbound fraction of fluconazole and linezolid in human plasma as determined by ultrafiltration: Impact of membrane type. *Journal of Chromatography B*, 1039:74-78.
28. Lappas, N., & Lappas, C. (2016). «*Forensic Toxicology: Principles and Concepts*». London, UK. Academic Press.
29. Lin, G., Zhang, H., Xue, F., Li, W., Liu, N., & Chen, L. (2011). Determination of Meropenem in Rabbit Plasma by LC–MS/MS. *Latin American Journal of Pharmacy*. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30: 1895-1900.
30. Lindsay, S. (1997). «*High Performance Liquid Chromatography*». London, UK. John Wiley & Sons.
31. Marcinkowska, R., Namiesnik, J., & Tobiszewski, M. (2019). Green and equitable analytical chemistry. *Green and Sustainable Chemistry*, 19:19-23.
32. Martins, A., dos Santos, J., Todeschini, B., Saldanha, L., da Silva, D., Reichert, J., & Souza, D. (2017). Occurrence of cocaine and metabolites in hospital effluent - A risk evaluation and development of a HPLC method using DLLME. *Chemosphere*, 170:176-182.
33. Moldoveanu, S., & David, V. (2016). «*Selection of the HPLC Method in Chemical Analysis*». Amsterdam, Netherlands. Elsevier and Book Aid.

34. Ohmori, T., Suzuki, A., Niwa, T., Ushikoshi, H., Shirai, K., Yoshida, S., Itoh, Y. (2011). Simultaneous determination of eight β -lactam antibiotics in human serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 879: 1038-1042.
35. Olaribigbe, S. (2015). A Review on Centrifugation in the Pharmaceutical Industry. *American Journal of Biomedical Engineering*, 5:67-78.
36. Paczkowska, M., Mizera, M., Szymanowska-Powalowska, D., Lewandowska, K., Błaszczak, W. (2015). Beta-Cyclodextrin complexation as an effective drug delivery system for meropenem. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 99:24-34.
37. Prat, D., Hayler, J., & Wells, A. (2014). A survey of solvents selection guides. *Green Chemistry*, 10: 27-32.
38. *PUBCHEM*. (2019). Última visita el 25 de Septiembre del 2019, disponible en <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/meropenem#section=Chemical-and-Physical-Properties>
39. Putnam, F. (1965). «*The plasma proteins: isolation, characterization and function*». New York, USA. Academic Press.
40. Rezaee, M., Yamini, Y., & Faraji, M. (2010). Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A*, 1217 :2342-2357.
41. Robatel, C., Buclin, T., Eckert, P., Schaller, M., Biollaz, J., & Decosterd, L. (2002). Determination of meropenem in plasma and filtrate-dialysate from patients under continuous veno-venous haemodiafiltration by SPE-LC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29:17-33.
42. Rubinson, K., Rubinson, & J. (2001). «*Análisis Instrumental*». Michigan , USA. Pearson Education.
43. Skoog, D., & West, D. (1992). «*Química Analítica*». USA. McGraw-Hill.
44. Soto, D., Silva, C., M, A. V., Soto, N., Wong, K., & Andresen, M. (2015). Monitorización terapéutica de antibióticos. Nuevas metodologías: biosensores. *Med Chile*, 143:1050-1057.
45. Swartz, M. (2010). Journal of Liquid Chromatography & related Technologies. *HPLC detectors: A Brief Review* , 33:1130-1150.

46. Trinh, A., Marlatt, L., & Bell, D. (2006). Controlling spe selectivity through pH and organic modifier manipulation . *Reporter EU*, 21:412-413.
47. Vian, M., Breil, C., Vernes, L., Chaabani, E., & Chemat, F. (2017). Green solvents for sample preparaton in analytical chemistry. *Green and Sustainable Chemistry*, 5:44-48.
48. Volpp, M., & Holzgrabe, U. (2019). Determination of plasma protein binding for sympathomimetic drugs by means of ultrafiltration. *European Journal of Pharmaceutical Science*, 127:175-184.
49. Wilson, I., Adlard, E., Cooke, M., & Poole, C. (2000). *Encyclopedia of Separation Science*. London, UK. Academic Press.
50. Wu, S., Chein, C., & Wen, Y. (2008). Analysis of ciprofloxacin by a sample high-performance liquid chromatography method. *Journal of Chromatographic Science*, 46: 490-495.
51. Zhang, Q., Ying, G., Pan, C., Liu, Y., & Zhao, J. (2015). « Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance». *Enviromental Science & Technology*, 49: 6772-6782.
52. Zou, L., Meng, F., Hu, L., Huang, Q., Liu, M., Yin, & T. (2019). A novel reversed-phase high-performance liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of imipenem and meropenem in human plasma and its application in TDM. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 169: 142-150.

VIII. ANEXOS

Anexo 1.

Tabla 12. Datos de masada para curva en triplicado de MER en agua.

Conc. (mg MER/L)	J c/ MER (mg)	J s/ MER (mg)	J c/ agua (mg)	J s/ agua (mg)	Vol. MER (mg)	Vol. Agua (mg)	Vol. Total (mg)	Conc. Real (mg MER/L)
0,5	27322	27290	80668	75729,5	32	4938,5	4970,5	0,643798
0,5	27323,5	27290,6	80695,2	75751,1	32,9	4944,1	4977	0,661040
0,5	27320,5	27295,4	80693,1	75749,4	25,1	4943,7	4968,8	0,505152
1	27308	27295,8	42715,8	41734,8	12,2	981	993,2	1,22835
1	27311,5	27296,9	42715,8	41735,2	14,6	980,6	995,2	1,46704
1	27306,9	27296,7	42713,2	41735,5	10,2	977,7	987,9	1,03249
10	31633,1	31529,7	42632,5	41734,3	103,4	898,2	1001,6	10,3234
10	31631,7	31529,8	42621,8	41735	101,9	886,8	988,7	10,3064
10	31630,1	31529,4	42630,2	41736,8	100,7	893,4	994,1	10,1297
20	31735,1	31530,8	42527,1	41737,6	204,3	789,5	993,8	20,5574
20	31733,3	31531,5	42525,7	41737,3	201,8	788,4	990,2	20,3797
20	31731,1	31531,5	42535	41737,2	199,6	797,8	997,4	20,0120
30	31834	31531,2	42436,2	41736,8	302,8	699,4	1002,2	30,2135
30	31834,6	31531,6	42435	41737,8	303	697,2	1000,2	30,2939
30	31833,1	31530,1	42437,5	41735,2	303	702,3	1005,3	30,1402
40	31932,6	31529,9	42330,3	41737,2	402,7	593,1	995,8	40,4398
40	31931	31529,5	42329	41736,6	401,5	592,4	993,9	40,3964
40	31930	31530,4	42326,5	41737	399,6	589,5	989,1	40,4003

Conc. (mg MER/L)	J c/ MER (mg)	J s/ MER (mg)	J c/ agua (mg)	J s/ agua (mg)	Vol. MER (mg)	Vol. Agua (mg)	Vol. Total (mg)	Conc. Real (mg MER/L)
50	32037	31531,3	31679,8	31181,5	505,7	498,3	1004	50,3685
50	32033,3	31530,8	31677,2	31180,5	502,5	496,7	999,2	50,2902
50	32029,7	31529,9	31677,5	31179,5	499,8	498	997,8	50,0901
60	42405,8	41805,8	31579,4	31179,7	600	399,7	999,7	60,0180
60	42410,3	41807	31579,2	31179,6	603,3	399,6	1002,9	60,1555
60	42397,9	41807,4	31582,2	31179,8	590,5	402,4	992,9	59,4722
70	42505	41807,2	31479,5	31182,4	697,8	297,1	994,9	70,1377
70	42515,4	41810,5	31484,1	31181,9	704,9	302,2	1007,1	69,9930
70	42499,3	41808,7	31481	31181,4	690,6	299,6	990,2	69,7434
80	42610,1	41812	31383	31181,7	798,1	201,3	999,4	79,8579
80	42607,5	41810,1	31380,8	31184,3	797,4	196,5	993,9	80,2293
80	42601,1	41813,9	31380,1	31183,1	787,2	197	984,2	79,9837
90	42704,5	41811,5	31280	31181,4	893	98,6	991,6	90,0564
90	42698,7	41815,4	31284,2	31181,1	883,3	103,1	986,4	89,5478
90	42704,5	41813,8	31285,5	31181,4	890,7	104,1	994,8	89,5355

Conc: concentración, J c/: jeringa con, J s/: jeringa sin, Vol.: volumen.

Anexo 2.

Tabla 11. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD de MER en agua.

	Área (maU)
Blanco 1	201
Blanco 2	320
Blanco 3	500
Blanco 4	850
Blanco 5	382
Blanco 6	631
Blanco 7	275
Blanco 8	508
Blanco 9	202
Blanco 10	567
Promedio	443,6
SD	196,7
LD (mg MER/L)	0,1044
LC (mg MER/L)	0,1361

Anexo 3.

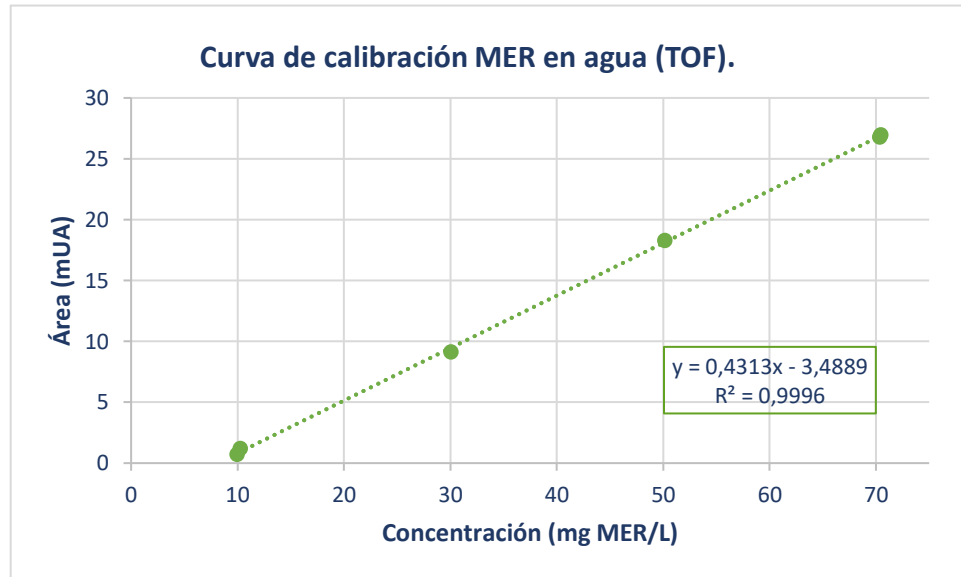


Figura 37. Curva de calibración de MER en agua, cuantificado por DSA-TOF-MS.

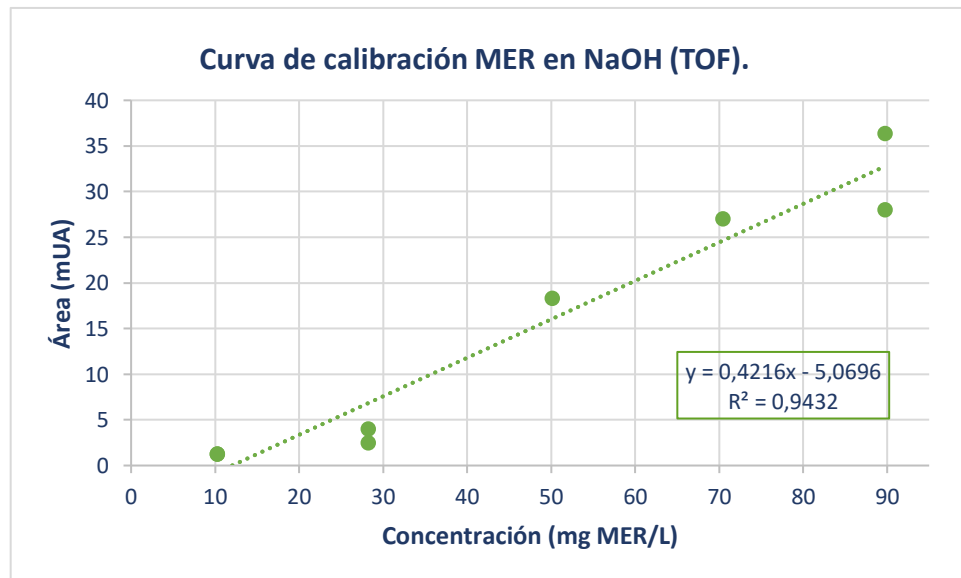


Figura 38. Curva de calibración de MER en NaOH, cuantificado por DSA-TOF-MS.

Anexo 4.

Tabla 12. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER obtenido SPE.

Conc. (mg MER/L)	Área Plasma (maU)	Área MER (maU)	Área Normalizada (maU)	Promedio (maU)
20	14256	2368	2219,4	2159,8
	14234	2475	2323,2	
	16135	2339	1936,9	
20	14585	4017	3679,9	3578,9
	14745	3157	2860,7	
	15071	4733	4196,0	
20	14652	5525	5038,3	4592,2
	16485	5548	4496,7	
	16623	5277	4241,5	
60	16256	5618	4617,6	4586,6
	14099	4529	4292,0	
	14683	5330	4850,2	
60	17523	7006	5342,0	5121,5
	15981	6218	5198,7	
	16248	5866	4823,8	
60	18259	5845	4277,1	4884,2
	15563	6568	5638,8	
	15870	5626	4736,6	
100	10331	34015	43992,0	41027,9
	10182	31830	41768,5	
	11772	32884	37323,3	
100	11003	26297	31933,1	31798,2
	10857	26185	32224,6	
	10773	25186	31236,9	
100	10124	108509	143205,3	144010,4
	10087	108550	143784,9	
	10089	109520	145041,0	

Conc. (mg MER/L)	Área Plasma (maU)	Área MER (maU)	Área Normalizada (maU)	Promedio (maU)
120	10930	194847	238187,5	159948,8
	10976	99492	121112,6	
	10991	99162	120546,2	
120	10901	59730	73210,2	152650,4
	10665	153303	192059,2	
	10568	152401	192681,7	
120	10248	47517	61952,0	61903,8
	10213	47357	61955,0	
	10282	47561	61804,3	
160	13512	76487	75633,4	76698,8
	13264	77108	77673,0	
	13491	77536	76790,0	
160	13957	72932	69818,6	67859,2
	13129	64831	65977,6	
	13027	66086	67781,4	
160	13162	52402	53195,1	53755,0
	13242	53689	54172,3	
	13216	53312	53897,7	
180	10881	76143	93498,9	92999,1
	10894	75767	92926,2	
	10913	75610	92572,2	
180	12218	91598	100168,5	100384,4
	12198	91690	100433,5	
	12140	91361	100551,3	
180	13200	98744	99949,9	100548,1
	13099	99477	101468,2	
	13082	98132	100226,3	
	Promedio	13361,2		

Anexo 5.

Tabla 13. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante SPE por HPLC-DAD.

	Área (maU)
Blanco 1	1064
Blanco 2	1400
Blanco 3	1056
Blanco 4	1518
Blanco 5	990
Blanco 6	2038
Blanco 7	2314
Blanco 8	1987
Blanco 9	826
Blanco 10	1273
Promedio	1446,6
SD	508,2
LD (mg MER/L)	0,1353
LC (mg MER/L)	0,2093

Anexo 6.

Tabla 14. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER mediante PP por HPLC-DAD.

Conc. Real (mg MER/L)	J c/ MER (mg)	J s/ MER (mg)	Vol. plasma (mg)	Área (maU)	CV
20,9687	31441,6	31550,3	0,24514	684125	0,953156
				691689	
				678692	
20,985	31813,6	31554,3	0,24695	704366	0,67342
				700489	
				709933	
21,1399	31810,1	31552,9	0,24495	722576	0,571992
				720340	
				728362	
49,6853	31444,1	31184,9	0,24685	1673192	0,310341
				1666184	
				1676316	
49,7437	31442,2	31186,9	0,24314	1707222	0,283025
				1713678	
				1704215	
50,4443	31440,7	31185,1	0,24342	1723695	0,264349
				1718152	
				1727184	
99,7054	31808	31553,1	0,24276	3304309	0,160321
				3308872	
				3298311	
100,722	31809,9	31552,4	0,24523	3413267	0,158597
				3404589	
				3414523	
102,091	31812,4	31551,4	0,24857	3467234	0,126759
				3472671	
				3463969	

Conc: concentración, J c/: jeringa con, J s/: jeringa sin, Vol.: volumen, Prom.: promedio, CV: coeficiente de variación.

Tabla 15. Datos de reproducibilidad para curva en triplicado del extracto MER mediante PP.

Conc. Real (mg MER/L)	J c/ MER (mg)	J s/ MER (mg)	Vol. plasma (mg)	Área (maU)	CV
20,9687	31441,6	31550,3	0,24514	685795	1,41413
				698692	
				705140	
20,985	31813,6	31554,3	0,24695	681510	1,91072
				705497	
				703519	
21,1399	31810,1	31552,9	0,24495	700085	3,14239
				723539	
				745519	
49,6853	31444,1	31184,9	0,24685	1721632	1,03480
				1754845	
				1750397	
49,7437	31442,2	31186,9	0,24314	1773472	1,15195
				1804826	
				1812562	
50,4443	31440,7	31185,1	0,24342	1772573	1,08479
				1806792	
				1805786	
99,7054	31808	31553,1	0,24276	3107302	2,14135
				3139537	
				3237301	
100,722	31809,9	31552,4	0,24523	3096699	2,05418
				3146247	
				3225242	
102,091	31812,4	31551,4	0,24857	3102400	3,89196
				3301169	
				3336963	

Conc: concentración, J c/: jeringa con, J s/: jeringa sin, Vol.: volumen, Prom.: promedio, CV: coeficiente de variación.

Anexo 7.

Tabla 16. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante PP por HPLC-DAD.

	Área (maU)
Blanco 1	4834
Blanco 2	3956
Blanco 3	4425
Blanco 4	4736
Blanco 5	4629
Blanco 6	4075
Blanco 7	3454
Blanco 8	3981
Blanco 9	4939
Blanco 10	4606
Promedio	4363,5
SD	476,9
LD (mg MER/L)	0,1127
LC (mg MER/L)	0,1821

Anexo 8

Tabla 17. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER mediante UF por HPLC-DAD.

Conc. Real (mg MER/L)	J c/ MER (mg)	J s/ MER (mg)	Vol. plasma (mg)	Área (maU)	CV
21,2051	31769,4	31502,8	0,253904	387132	1,32197
				392492	
				382256	
21,2296	31767,1	31506,7	0,248	396281	0,841963
				402292	
				401924	
21,7351	31765,9	31505,8	0,247714	428227	0,667962
				433659	
				432614	
49,4712	31443,8	31189,5	0,24219	1316907	0,337550
				1312031	
				1320905	
49,4907	31448,6	31184,5	0,251524	1337416	0,363727
				1343192	
				1333519	
51,3979	31438,8	31184,6	0,242095	1399530	0,344157
				1405094	
				1395498	
96,8499	31811,8	31549,7	0,249619	2620494	0,160813
				2626592	
				2618499	
100,37	31793,7	31546,1	0,23581	2702940	0,118645
				2700593	
				2706937	
102,522	31804,7	31548,1	0,244381	2782047	0,119784
				2786368	
				2779811	

Conc: concentración, J c/: jeringa con, J s/: jeringa sin, Vol.: volumen, Prom.: promedio, CV: coeficiente de variación.

Tabla 18. Datos de reproducibilidad para curva en triplicado del extracto MER mediante UF.

Conc. Real (mg MER/L)	J c/ATB (mg)	J s/ATB (mg)	Vol. plasma (mg)	Área (maU)	CV
21,2051	31769,4	31502,8	0,253904	506457	0,906433
				512889	
				503970	
21,2296	31767,1	31506,7	0,248	501774	0,798970
				504008	
				496238	
21,7351	31765,9	31505,8	0,247714	518100	0,694606
				523098	
				516097	
49,4712	31443,8	31189,5	0,24219	1300850	0,721799
				1306871	
				1319373	
49,4907	31448,6	31184,5	0,251524	1350496	0,797672
				1347151	
				1330500	
51,3979	31438,8	31184,6	0,242095	1421102	0,380946
				1429104	
				1418768	
96,8499	31811,8	31549,7	0,249619	2441082	0,605669
				2438855	
				2414534	
100,37	31793,7	31546,1	0,23581	2364210	0,767011
				2360752	
				2393863	
102,522	31804,7	31548,1	0,244381	2349185	0,867777
				2317029	
				2354596	

Conc: concentración, J c/: jeringa con, J s/: jeringa sin, Vol.: volumen, Prom.: promedio, CV: coeficiente de variación.

Anexo 9

Tabla 19. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante UF por HPLC-DAD.

	Área (maU)
Blanco 1	346
Blanco 2	540
Blanco 3	982
Blanco 4	875
Blanco 5	451
Blanco 6	652
Blanco 7	732
Blanco 8	389
Blanco 9	982
Blanco 10	1153
Promedio	710,2
SD	280,2
LD (mg MER/L)	0,1057
LC (mg MER/L)	0,1465

Anexo 10.

Tabla 20. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER mediante PP por DSA-TOF-MS.

Conc. (mg MER/L)	J c/ MER (mg)	J s/MER (mg)	Vol. plasma (mg)	Conc. Real (mg MER/L)
20	31807,7	31550,3	0,245143	20,9850
20	31813,6	31554,3	0,246952	21,1399
20	31810,1	31552,9	0,244952	20,9687
50	31444,1	31184,9	0,246857	21,1318
50.	31442,2	31186,9	0,243143	20,8138
50	31440,7	31185,1	0,243429	20,8383
100	31808	31553,1	0,242762	20,7812
100	31809,9	31552,4	0,245238	20,9932
100	31812,4	31551,4	0,248571	21,2785
400	77966,9	75833,7	2,03162	428,016
1000	77974,2	75829,5	2,04257	1021,73
2000	78852,4	75740,1	2,96409	2053,56

Conc: concentración, J c/: jeringa con, J s/: jeringa sin, Vol.: volumen.

Anexo 11.

Tabla 21. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante PP por DSA-TOF-MS.

Conc.	Área (maU)
20,9850	346
20,9687	540
21,1399	982
Promedio	9,977
SD	5,970
LD (mg MER/L)	14,93
LC (mg MER/L)	25,66

Anexo 12.

Tabla 22. Datos de pesada para curva en triplicado del extracto MER mediante UF por DSA-TOF-MS.

Conc. (mg MER/L)	J c/ MER (mg)	J s/ MER (mg)	Vol. plasma (mg)	Conc. Real (mg MER/L)
20	31808,5	31548,5	0,247619	21,1970
20	31808,5	31549,5	0,246667	21,1155
20	31808,2	31548,8	0,247048	21,1481
50	31765,2	31505,8	0,247048	50,4832
50	31769,7	31506,1	0,251048	51,3006
50	31770,1	31506,1	0,251429	51,3784
100	31441,2	31184,6	0,244381	100,370
100	31446,5	31184,5	0,249524	102,483
100	31442,7	31185,5	0,244952	100,605
400	77966,9	75833,7	2,03162	428,016
1000	77974,2	75829,5	2,04257	1021,73
2000	78852,4	75740,1	2,96410	2053,56

Conc: concentración, J c/: jeringa con, J s/: jeringa sin, Vol.: volumen.

Anexo 13.

Tabla 23. Áreas de señales blanco para el cálculo de LC y LD del extracto de MER en plasma obtenido mediante UF por DSA-TOF-MS.

Conc.	Área (maU)
21,7350	1,54
21,2296	1,68
21,2051	2,38
Promedio	1,867
SD	0,4500
LD (mg MP/L)	4,876
LC (mg MP/L)	5,383