



**UNIVERSIDAD DE CUENCA**  
**Facultad de Ciencias Químicas**  
**Carrera de Ingeniería Química**

**Optimización del protocolo SPE-HPLC para el análisis de fármacos presentes en  
soluciones acuosas.**

Trabajo de Titulación previo a la obtención del

título de Ingeniero Químico

**AUTOR:**

Santiago Alfredo Serrano Burgos

C.I. 0105242077

**DIRECTOR:**

Ph.D. María Eulalia Vanegas Peña

C.I. 0103168118

**CUENCA – ECUADOR**

**03/10/2019**



## RESUMEN

En el siguiente trabajo de investigación se buscó desarrollar un método óptimo de concentración y recuperación de distintos medicamentos de uso común, presentes en una matriz de agua, mediante el uso de la técnica de extracción en fase sólida o por sus siglas SPE (en inglés *Solid Phase Extraction*), que utiliza cartuchos (columnas con distintos soportes que adsorben una gran variedad de moléculas de acuerdo a su estructura química). Consta de cuatro etapas principales, condicionamiento del cartucho, carga de la muestra, lavado de interferencias, elución de los analitos de interés por medio de un solvente. Para el diseño experimental se tomó en cuenta tres variables independientes (pH de la muestra de agua, solvente de elución y su pH), se valoró tres tipos de cartuchos (intercambio aniónico, intercambio catiónico y fase reversa), cada experimento se realizó con soluciones acuosas de los medicamentos a concentraciones conocidas para poder calcular el porcentaje de recuperación. Una vez concluido cada ensayo se procedió a medir la concentración por cromatografía HPLC, y a partir de los resultados se calculó los porcentajes de recuperación.

Al final del trabajo de investigación se optimizó un método SPE para la recuperación de los cinco fármacos analizados, partiendo de soluciones de 20µg/L, cuatro de ellos, Sulfametoxazol, Ciprofloxacina, Diclofenaco e Ibuprofeno, mediante el cartucho Hypersep PEP (fase reversa) obteniéndose porcentajes de recuperación del 111%, 86%, 88% y 80% respectivamente y el Paracetamol mediante el cartucho Hypersep AX, con un porcentaje de recuperación del 98%.

**Palabras clave:** Extracción en Fase Sólida (SPE). Cromatografía HPLC. Medicamentos. Agua.



## ABSTRACT

The following research work sought to develop an optimal method of concentration and recovery of various commonly used medications, present in a water matrix, by using the solid phase extraction technique or by its acronym SPE (Solid Phase Extraction), which uses cartridges (columns with different supports that adsorb a wide variety of molecules according to their chemical structure). It consists of four main stages, conditioning of the cartridge, loading of the sample, washing of interferences, elution of the analytes of interest by means of a solvent. For the experimental design, three independent variables were taken into account (pH of the water sample, elution solvent and its pH), three types of cartridges were evaluated (anion exchange, cation exchange and reverse phase), each experiment was performed with solutions aqueous medications at known concentrations to calculate the recovery percentage. Once each test was completed, the concentration was measured by HPLC chromatography, and the recovery percentages were calculated from the results.

At the end of the research work, an SPE method was optimized for the recovery of the five drugs analyzed, starting with solutions of 20 $\mu$ g/L, four of them, Sulfamethoxazole, Ciprofloxacin, Diclofenac and Ibuprofen, using the Hypersep PEP cartridge (reverse phase) obtaining percentages of recovery of 111%, 86%, 88% and 80% respectively and Paracetamol using the Hypersep AX cartridge, with a recovery percentage of 98%.

**Keywords:** Solid Phase Extraction (SPE). Cromatography HPLC. Drugs. Water.



## ÍNDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	2
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	6
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	8
<b>ÍNDICE DE ECUACIONES</b> .....	10
<b>DEDICATORIA</b> .....	13
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	14
<b>1.INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>2.CONTENIDO TEÓRICO</b> .....	17
2.1. Cromatografía Líquida de alta resolución (HPLC).....	17
2.1.1. Principio de operación.....	17
2.1.2. Validación del método cromatográfico.....	18
2.1.2.1. Especificidad.....	18
2.1.2.2. Exactitud.....	19
2.1.2.3. Precisión.....	19
2.1.2.4. Linealidad y rango.....	19
2.1.2.5. Límite de detección.....	19
2.1.2.6. Límite de cuantificación.....	19
2.1.2.7. Robustez.....	20
2.2. Preparación de muestras.....	20
2.3. Extracción en Fase Sólida.....	21
2.3.1. Cartucho Hypersep PEP.....	22
2.3.2. Cartucho Hypersep CX.....	23
2.3.3. Cartucho Hypersep AX.....	24
2.4. Fármacos.....	26
2.4.1. Sulfametoxazol.....	26
2.4.1.1. Especiación.....	26
2.4.1. Ciprofloxacina.....	27
2.4.1.1. Especiación.....	28
2.4.1. Paracetamol.....	28
2.4.1.1. Especiación.....	29
2.4.1. Diclofenaco Sódico.....	30



2.4.1.1. Especiación.....	30
2.4.1. Ibuprofeno.....	31
2.4.1.1. Especiación.....	31
<b>3.METODOLOGÍA.....</b>	<b>33</b>
3.1. Equipos.....	33
3.2. Reactivos.....	33
3.3. Cromatografía líquida de alta resolución.....	33
3.3.1. Condiciones Cromatográficas.....	33
3.3.2. Preparación de patrones.....	34
3.3.3. Construcción de curvas de calibración.....	34
3.4. Extracción en Fase Sólida (SPE).....	35
3.4.1. Cartuchos Hypersep PEP, CX y AX.....	36
<b>4.RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
4.1. Validación del método cromatográfico.....	38
4.1.1. Tiempo de retención de fármacos.....	38
4.1.2 Linealidad, LOD y LOQ.....	39
4.1.3. Precisión Interdía.....	39
4.1.4. Precisión Intradía.....	41
4.2. Método de Extracción en Fase Sólida (SPE).....	43
4.2.1. Hypersep PEP.....	43
4.2.2. Hypersep CX.....	46
4.2.3. Hypersep AX.....	48
4.3. Desarrollo de la metodología para extraer los cinco fármacos.....	50
<b>5.CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
5.1. Conclusiones.....	54
5.2. Recomendaciones.....	54
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>55</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>
ANEXO 1. Curvas de calibración de cada medicamento y cromatogramas a diferentes concentraciones .....	62
ANEXO 2. Diseños experimentales para cada cartucho.....	66
ANEXO 3. Fotografías de los equipos y diferentes ensayos realizados.....	68



ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Estructura interna del cartucho Hypersep PEP. Fuente: (Waters Corporation, 2017) ..... 22

**Figura 2.** Estructura del cartucho Hypersep CX. Fuente:(Waters Corporation, 2017).. 23

**Figura 3.** Interacciones en el cartucho CX de acuerdo al pH de la fase móvil. Fuente:(Waters Corporation, 2017) ..... 24

**Figura 4.** Estructura del cartucho Hypersep AX. Fuente:(Waters Corporation, 2017) . 25

**Figura 5.** Interacciones en el cartucho AX de acuerdo al pH de la fase móvil. Fuente:(Waters Corporation, 2017) ..... 25

**Figura 6.** Molécula del Sulfametoxazol. Fuente: PubChem ..... 26

**Figura 7.** Especiación del sulfametoxazol. Fuente:(Barros et al., 2018) ..... 27

**Figura 8.** Molécula de Ciprofloxacina. Fuente: PubChem. .... 27

**Figura 9.** Especiación de la Ciprofloxacina. Fuente:(Peng et al., 2015) ..... 28

**Figura 10.** Molécula de Paracetamol. Fuente: PubChem. .... 29

**Figura 11.** Especiación del Paracetamol. Fuente:(Environmental Organic Chemistry, 2008) ..... 29

**Figura 12.** Molécula del diclofenaco sódico. Fuente: PubChem ..... 30

**Figura 13.** Especiación del Diclofenaco Sódico. Fuente: Autor..... 31

**Figura 14.** Molécula del Ibuprofeno. Fuente: PubChem ..... 31

**Figura 15.** Especiación del Ibuprofeno. Fuente: Autor..... 32

**Figura 16.** Procedimiento general para SPE ..... 37

**Figura 17.** Cromatograma de un patrón de 4ppm ..... 39

**Figura 18.** Proceso para recuperar CPX, SMX, DCF e IBU. .... 53

**Figura 19.** Proceso para recuperar PCM..... 53

**Figura 20.** Curva de calibración para CPX..... 62

**Figura 21.** Curva de calibración para PCM. .... 62

**Figura 22.** Curva de calibración para SMX..... 63

**Figura 23.** Curva de calibración para DCF..... 63

**Figura 24.** Curva de calibración para IBU..... 63

**Figura 25.** Cromatograma para la curva de calibración a 0.25ppm..... 64

**Figura 26.** Cromatograma para la curva de calibración a 0.5ppm..... 64

**Figura 27.** Cromatograma para la curva de calibración a 1ppm..... 64

**Figura 28.** Cromatograma para la curva de calibración a 2ppm..... 64

**Figura 29.** Cromatograma para la curva de calibración a 4ppm..... 65



<b>Figura 30.</b> Cromatograma para la curva de calibración a 6ppm.....	65
<b>Figura 31.</b> Cromatografo YL 9300. ....	68
<b>Figura 32.</b> Columna Zorbax C-18.....	68
<b>Figura 33.</b> Cartucho Hypersep CX. ....	68
<b>Figura 34.</b> Cartucho Hypersep AX. ....	68
<b>Figura 35.</b> Cartucho Hypersep CX. ....	68
<b>Figura 36.</b> Sistema continuo para SPE. ....	68
<b>Figura 37.</b> Sistema continuo para SPE. ....	68



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Presencia de los distintos fármacos en diferentes ríos del mundo..... 32

Tabla 2. Niveles del diseño experimental..... 35

Tabla 3. Diseño experimental completo. .... 36

Tabla 4. Tiempos de retención de los medicamentos. .... 39

Tabla 5. Ecuación lineal, LOQ y LOD calculados. .... 39

Tabla 6. Porcentajes de la precisión interdía para CPX..... 40

Tabla 7. Porcentajes de la precisión interdía para PCM. .... 40

Tabla 8. Porcentajes de precisión interdía para SMX..... 40

Tabla 9. Porcentajes de precisión interdía para DCF..... 41

Tabla 10. Porcentajes de precisión interdía para IBU. .... 41

Tabla 11. Porcentajes de la precisión intradía para la CPX..... 42

Tabla 12. Porcentajes de la precisión intradía para PCM. .... 42

Tabla 13. Porcentajes de la precisión intradía para SMX..... 42

Tabla 14. Porcentajes de la precisión intradía para DCF..... 42

Tabla 15. Porcentajes de la precisión intradía para IBU..... 42

Tabla 16. Porcentajes de recuperación y desviación estándar de los medicamentos en el cartucho Hypersep PEP. .... 44

Tabla 17. Porcentajes de recuperación y desviación estándar de los medicamentos en el cartucho Hypersep CX..... 46

Tabla 18. Porcentajes de recuperación y desviación estándar de los medicamentos en el cartucho Hypersep AX..... 48

Tabla 19. Áreas resultantes de los picos de los fármacos de la primera carga a pH 4 con elución a pH 4. .... 50

Tabla 20. Réplica de la primera carga, valores expresados en función del área del pico del cromatograma. .... 51

Tabla 21. Áreas resultantes de la segunda carga con pH 10 y elución a pH 7, pH 4 y pH 10. .... 51

Tabla 22. Réplica de la segunda carga, valores expresados en área del pico de cada fármaco. .... 51

Tabla 23. Réplica 1 del método optimizado. .... 52

Tabla 24. Réplica 2 del método optimizado. .... 52

Tabla 25. Porcentaje de recuperación total del método optimizado con su respectiva variación estándar- .... 52

Tabla 26. Porcentaje de recuperación del PCM en el cartucho Hypersep AX. .... 52



## UNIVERSIDAD DE CUENCA

Tabla 27. Diseño experimental para el cartucho Hypersep PEP. ....	66
Tabla 28. Diseño experimental para el cartucho Hypersep CX.....	66
Tabla 29. Diseño experimental para el cartucho Hypersep AX. ....	67



**ÍNDICE DE ECUACIONES**

Ecuación 1. Precisión inter e intradía.....15  
Ecuación 2. Límite de detección.....15  
Ecuación 3. Límite de cuantificación.....16



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio  
Institucional

---

Santiago Alfredo Serrano Burgos en calidad de autor y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Optimización del protocolo SPE-HPLC para el análisis de fármacos presentes en soluciones acuosas.", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intransferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 3 de octubre del 2019

Santiago Alfredo Serrano Burgos

C.I: 0105242077



### Cláusula de Propiedad Intelectual

---

Santiago Alfredo Serrano Burgos, autor/a del trabajo de titulación "Optimización del protocolo SPE-HPLC para el análisis de fármacos presentes en soluciones acuosas.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor.

Cuenca, 3 de octubre del 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Santiago Alfredo Serrano Burgos", written over a horizontal line.

Santiago Alfredo Serrano Burgos

C.I: 0105242077



**DEDICATORIA**

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, especialmente mis padres, quienes me han apoyado incondicionalmente en todas las decisiones que he tomado durante toda mi vida, por su sacrificio, tolerancia y por todo el amor que me han podido brindar.

A la Universidad de Cuenca, por haberme permitido aprender y vivir una de las mejores experiencias de mi vida durante estos 5 años y medio.

Al Centro de Estudios Ambientales, por abrirme sus puertas para que desarrolle mi trabajo de titulación.



## AGRADECIMIENTOS

Primero, quiero agradecer al universo por permitirme ser un humano y no otro ser de la naturaleza, gracias a eso, estoy escribiendo este trabajo que ayuda a determinar contaminantes emergentes en las lagunas de oxigenación de Ucubamba.

Agradezco a mi mamá y a mi papá por apoyarme, aconsejarme y amarme, y principalmente por darme la oportunidad y las posibilidades para estudiar, gracias.

A mis mejores amigos de toda la vida Edison y Gorky, por las tardes de bolón y café con fuercita, les agradezco las acampadas y excursiones de varios días por el Camino del Inca, y al Chorro y por muchas cosas más.

A mis amigos, Juan Fernando, Lizeth y Rafael, por haberme acompañado durante los inicios de la universidad.

Al mejor grupo “Solo Unita”, los mejores amigos que encontré en esta etapa de mi vida, Christian, Mafer, Josué, Víctor y Melo, gracias por todas las fiestas, por todas las salidas, por las cenas de navidad, por los viajes de visitas técnicas, por todas las malas noches en que hacíamos los trabajos, gracias por enseñarme que la universidad no solo es estudio, si no también diversión y amistad. Y a la Jhuly, no hizo nada, pero bueno.

Gracias a la Dra. María Eulalia Vanegas por dirigir este trabajo de titulación y permitirme ser parte del Centro de Estudios Ambientales.

A la Ing. Anita Astudillo y a la Dra. Johanna Ortiz por asesorarme y ayudarme en la elaboración de mi tesis.

Y finalmente, quiero agradecer a ti, quien está leyendo esta tesis.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Identificación y justificación del problema

En los últimos años se ha visto un crecimiento exponencial de la población, lo que conlleva a un alto nivel de consumo de productos farmacéuticos, tales como antiinflamatorios, analgésicos y antibióticos. El cuerpo humano después de hacer uso de las facultades de estos fármacos, elimina el exceso que mediante el sistema de alcantarillado terminan en las aguas servidas o residuales de la ciudad, y después de un tratamiento convencional que no elimina estos medicamentos, son derivados a los ríos más cercanos, causando alteraciones en el medio ambiente. Al tratarse de volúmenes tan elevados de agua, los medicamentos pueden alcanzar concentraciones de partes por billón imposibles de ser medidas, incluso por técnicas de análisis instrumental de última generación, por lo cual se han ideado nuevas metodologías para la preconcentración de compuestos químicos y su separación de matrices complejas. Una de las metodologías en crecimiento y muy aceptada por su alto rendimiento es la Extracción en Fase Sólida (SPE), técnica que permite la concentración y separación de compuestos químicos, basándose en las interacciones producidas por la estructura química de los cartuchos utilizados y en este caso la estructura química de los fármacos a analizar, lo que permitirá su posterior análisis mediante cromatografía de alta resolución HPLC.

### 1.2. Objetivos

#### Objetivo general

Desarrollar un protocolo que permita la concentración y recuperación efectiva de cinco medicamentos (Sulfametoxazol, Ciprofloxacina, Diclofenaco de Sodio, Ibuprofeno y Paracetamol) mediante el uso de la técnica de Extracción en Fase Solida (SPE), a partir de soluciones acuosas preparadas en el laboratorio.

#### Objetivos específicos

Desarrollar un método cromatográfico que permita la identificación de los cinco medicamentos, así como el desarrollo de curvas de calibración para las respectivas cuantificaciones.

Evaluar el desempeño de los diferentes cartuchos mediante la variación de pH en la muestra de agua, solvente de elución y su pH.

Determinar el tipo de cartucho más adecuado para la concentración y recuperación de cada uno de los fármacos.



### **1.3. Hipótesis**

Las moléculas de cada medicamento tienen un comportamiento distinto de acuerdo al pH en el que se encuentran. De acuerdo a este comportamiento se retienen en el soporte de los distintos cartuchos SPE, y pueden ser recuperados mediante un solvente polar que arrastra las moléculas del soporte del cartucho, las mismas que se concentran y se cuantifican mediante HPLC.

### **1.4. Resultados esperados**

Al finalizar este trabajo de investigación, se espera que el protocolo SPE obtenido sea capaz de recuperar un alto porcentaje de cada medicamento. Para esto se tomará en cuenta el mejor pH de carga de la muestra, el solvente con el cual se recupere un alto porcentaje de medicamentos y el cartucho de SPE, que logre la recuperación de la mayor cantidad de medicamentos. Esta investigación tiene el potencial de ser utilizada para distintos proyectos que se desarrollan en la Universidad de Cuenca.



## 2. CONTENIDO TEÓRICO

Los primeros pasos de la cromatografía datan desde finales del siglo XIX y comienzos del siglo XX, cuando Mikhail Tswett desarrolló una técnica de absorción en la cual los pigmentos de distintas hojas se separaban de manera distinta de acuerdo al solvente y al adsorbente seleccionados, estudiando de esta manera las características de adsorción de más de 100 sustancias sólidas orgánicas e inorgánicas (Ettre, 2003).

Paralelamente David T. Day en 1897 demostró según sus estudios que el petróleo al ser forzado a través de una columna con calcita en polvo ( $\text{CO}_3\text{Ca}$ ) se fraccionaba en aceites más ligeros y menos densos que los subsecuentes hidrocarburos, esta investigación fue presentada en el Primer Congreso de Petróleo en Paris en agosto de 1900 (Weil & Willams, 1950).

Con estas dos investigaciones se daba el inicio de una de las técnicas analíticas más utilizadas en los últimos años.

### 2.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución o por sus siglas HPLC (en inglés *High Performance Liquid Chromatography*) es una técnica analítica utilizada ampliamente para la separación, identificación y cuantificación de los diferentes constituyentes de una muestra acuosa, que a diferencia de la cromatografía líquida de columna, utiliza presiones elevadas (50 a 350 bar) (Thammana, 2016).

Durante las décadas de 1960 y 1970 la cromatografía líquida tuvo un gran avance principalmente en los equipos, en los cuales se podía inyectar la muestra y la fase móvil a presión lo que agilitaba el procedimiento y reducía el tiempo de cada ensayo, así mismo los soportes utilizados mejoraban mientras se descubrían nuevos materiales con gran afinidad a diferentes moléculas (Thammana, 2016).

Esta técnica es muy utilizada en la industria farmacéutica, se aplica en los procesos de descubrimiento, desarrollo, producción y control de calidad de los medicamentos, así como en la formulación y pureza (Bhardwaj, Dwivedi, & Agarwal, 2015).

#### 2.1.1. Principio de operación

Antes de explicar el principio de operación se debe entender ciertos parámetros previos según (Ahuja & Dong, 2005):

- Los compuestos a analizar deben ser solubles.



- Para lograr la separación correcta entre analitos, estos deben ser retenidos en la columna y deben tener un coeficiente de retención diferente entre ellos.
- La fase móvil controla la separación, controla la correcta separación entre los picos de las moléculas.
- La solución final a inyectarse debe ser preparada en la fase móvil si es posible o en un solvente más débil que la fase móvil.

Se tienen dos fases presentes, la fase móvil, hace referencia al solvente o mezcla de solventes que circulan por la columna de cromatografía, y la fase estacionaria que es el sólido poroso dentro de la columna que retiene los analitos (Bhardwaj et al., 2015).

La solución a analizar es inyectada al equipo y es transportada por la fase móvil hasta la columna, en donde ocurre la separación de los analitos. A medida que la solución atraviesa la columna, algunos compuestos, debido a su mayor afinidad por la fase estacionaria quedan retenidos durante más tiempo y son separados de los compuestos que tienen más afinidad por la fase móvil (Durgawati P., 2019).

Paso seguido, los analitos empiezan a salir de la columna por acción de la fase móvil y llegan al detector y al sistema de procesamiento de datos; aquí se puede observar el tiempo de retención de cada analito dentro de la columna, este parámetro varía de acuerdo a la estructura molecular del compuesto y naturaleza de fase móvil y estacionaria (Thammana, 2016).

### **2.1.2. Validación del método cromatográfico**

La validación de un método analítico es el proceso mediante el cual se establece que las características de rendimiento del método cumplen con los requisitos para la aplicación analítica prevista, es requerida para asegurarse que el método es capaz de dar resultados reproducibles y confiables (Bhardwaj et al., 2015).

Para validar un método cromatográfico existen varios parámetros estadísticos, según Gumustas, Kurbanoglu, Uslu, & Ozkan, 2013 son:

#### **2.1.2.1. Especificidad**

Habilidad de diferenciar a un analito en presencia de otros compuestos, ya sean estos interferencias o impurezas.



### 2.1.2.2.Exactitud

Es la cercanía de los resultados obtenidos comparados con un valor de referencia, este parámetro provee el error sistemático en el método.

### 2.1.2.3.Precisión

La precisión es la cercanía de los resultados obtenidos comparados entre ellos, luego de una serie de lecturas de varias muestras provenientes del mismo patrón.

$$\%CV = \frac{Desv.est*100}{Media} \quad (1)$$

*%CV: porcentaje del coeficiente de variación.*

*Desv.est: desviación estándar.*

*Media: valor promedio del número de muestras.*

### 2.1.2.4.Linealidad y rango

Capacidad del método para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analitos en muestras. La linealidad se debe realizar con 3 mediciones de 5 o más niveles de concentración que estén entre el 50 y 150% del rango de concentración esperado.

El gráfico se puede construir de la siguiente manera, en el eje X las concentraciones y en el eje Y las respuestas, en el caso del HPLC el área de los picos, de la misma manera el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) es aceptable cuando es mayor a 0.99.

### 2.1.2.5.Límite de detección (LOD)

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado con un valor exacto.

$$LOD = \frac{3*s_{eb}}{m} \quad (2)$$

*LOD: límite de detección.*

*s<sub>eb</sub>: error estándar del intercepto.*

*m: pendiente de la recta*

### 2.1.2.6.Límite de cuantificación (LOQ)

Es la mínima cantidad de analito en una muestra que se puede cuantificar con precisión y exactitud.

$$LOQ = 2 * LOD \quad (3)$$



*LOQ: límite de cuantificación.*

*LOD: límite de detección.*

### **2.1.2.7. Robustez**

Capacidad del método de no afectarse cuando ocurran pequeños cambios en los parámetros, por ejemplo, pH de la fase móvil, composición de la fase móvil, temperatura, etc., y muestra la confiabilidad del método durante su uso cotidiano.

## **2.2. Preparación de muestras**

En química analítica la preparación de muestras es un paso sumamente importante, lo que se requiere en esta etapa es lograr separar los compuestos de interés denominados analitos de la muestra o matriz, y se estima que toma el 80% del tiempo total de análisis (Lombardi, 2015).

También se necesita que los analitos de la muestra estén contenidos en un solvente adecuado para proceder con el análisis instrumental y tengan la menor cantidad de interferencias posibles (Berrueta, Gallo, & Vicente, 1995).

Principios importantes a tener en cuenta según Kenneth A. Rubinson & Judith F. Rubinson, (2001). son:

- No se debe perder ningún analito de interés.
- La preparación debe transformar al analito en la mejor forma química para el método de ensayo.
- Se deben eliminar las interferencias.
- No se deben agregar nuevas interferencias.

En algunos casos también es importante la preconcentración de los analitos, puesto que su concentración es muy baja, y se encuentran en trazas. De esta manera se asegura la integridad de las muestras durante el almacenamiento y análisis de las mismas (Berrueta et al., 1995).

La mayoría de fármacos que se encuentran en los distintos efluentes, están en concentraciones muy bajas, son muy complejos o no son compatibles con el sistema cromatográfico que se utilice, lo que impide su introducción directa. En consecuencia se necesita preparar la muestra antes de su introducción al sistema mediante fraccionamiento, separación o extracción (Javier Señoráns, 2014).



### 2.3. Extracción en Fase Sólida

Se tienen varias técnicas para la concentración y recuperación de los analitos presentes en las muestras, en este trabajo de investigación se centrará en la extracción en fase sólida o por sus siglas en inglés SPE (*Solid Phase Extraction*).

La SPE es una técnica que comenzó a utilizarse a principios de los años 1970, elimina las desventajas de la extracción líquido-líquido, reduce los tiempos de separación y utiliza menos cantidad de solvente, en los últimos años es el método preferido para el pretratamiento de muestras en las cuales los analitos de interés son fármacos. El fundamento de la extracción en fase sólida es sencillo, se basa en la distribución de compuestos entre dos fases una sólida y una líquida, los analitos presentes deben tener mayor afinidad por la fase sólida que por la fase líquida de la matriz (Berrueta et al., 1995).

El procedimiento general consiste en cuatro etapas principales, acondicionamiento de la columna, carga de la muestra, lavado de interferencias y elución. El proceso inicia con el acondicionamiento de la columna mediante un solvente orgánico, generalmente metanol, esto prepara el soporte adsorbente del cartucho para una mejor fijación de las moléculas. Se continúa con la carga de la muestra, en donde mediante un sistema continuo y aplicando vacío se logra pasar la muestra a través del cartucho, en este paso todos los compuestos químicos compatibles con los diferentes soportes quedan fijados y listos para la siguiente etapa (Lombardi, 2015).

Para simplificar la matriz o muestra con la que se está trabajando, necesitamos eliminar las interferencias o compuestos que no son de nuestro interés, esto se logra al hacer pasar agua modificada con un solvente orgánico (Liška, Krupčík, & Leclercq, 1989).

Finalmente los analitos de interés son eluidos con un solvente apropiado, los más utilizados son solventes orgánicos polares, y dependiendo el tipo de cartucho a utilizar se puede acidificar o alcalinizar el solvente de elución; también se debe tener en cuenta la velocidad de elución, la cual garantice una remoción total (Camel, 2003).

Existen varios tipos de cartuchos para SPE, depende del tipo de estructura del mismo. La empresa líder en investigación y fabricación de estos cartuchos, Waters Corporation, tiene como principal cartucho, al denominado HLB, cuya fase sólida consiste en un copolímero el cual proporciona la capacidad de retención de analitos mediante fase reversa (Waters Corporation, 2017).

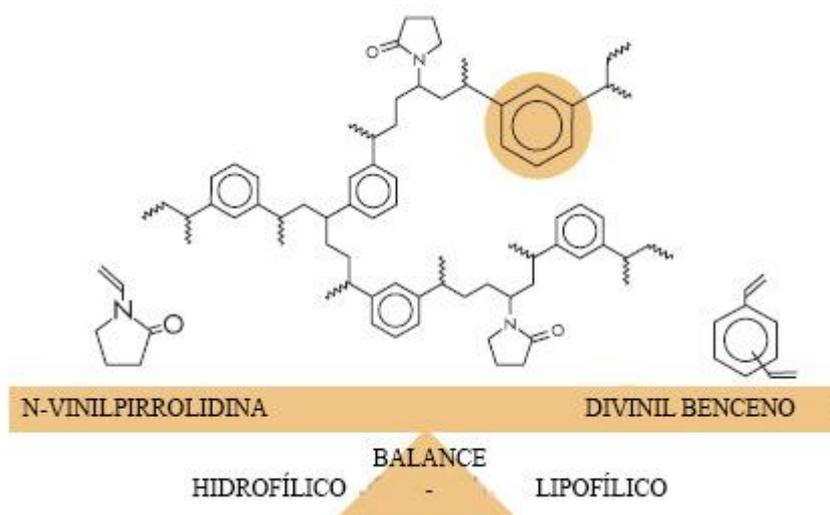
También, producen cartuchos con fases sólidas que utilizan un mecanismo llamado método mixto, los MCX (intercambio catiónico) y MAX (intercambio aniónico), cuentan

en su estructura con grupos sulfónicos (MCX) y aminas cuaternarias (MAX) que permiten el intercambio catiónico y aniónico respectivamente, aparte ambos tipos de cartuchos cuentan con grupos divinilbenceno, el cual es utilizado para retención en fase reversa.

La fase reversa es un término utilizado que indica el método de adsorción y desorción en cromatografía y en SPE, el soporte sólido tiene grupos funcionales apolares que interactúan, mediante fuerzas de Van der Waals, con moléculas de polaridad media y baja, tal es el caso de muchos medicamentos. Para lograr la separación de las moléculas del soporte se utiliza un solvente polar (normalmente metanol, etanol, acetonitrilo, etc) que rompen estas interacciones (CromLab S.A., 2017).

### 2.3.1. Cartucho Hypersep PEP

Es un cartucho que se utiliza para compuestos ácidos, básicos y neutros, su estructura, se presenta en la figura 1, la compone dos monómeros que le dan características hidrofílicas y lipofílicas, N-Vinilpirrolidina (hidrofílico) y Divinilbenceno (lipofílico); esta estructura le da la capacidad de retención en fase reversa con un “enganche polar” que permite retener compuestos polares, para este cartucho la capacidad de retención en fase reversa viene dada por el Divinilbenceno. (Waters Corporation, 2017).

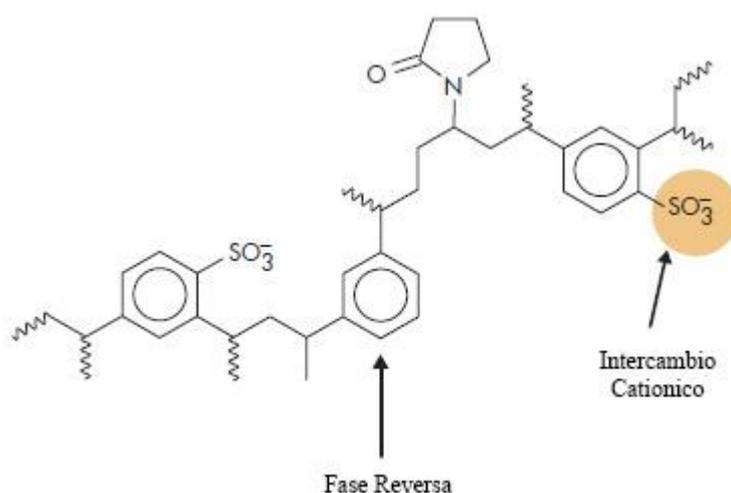


*Figura 1. Estructura interna del cartucho Hypersep PEP. Fuente: (Waters Corporation, 2017)*

### 2.3.2. Cartucho Hypersep CX

Este cartucho es ideal para compuestos básicos, como sus siglas lo indican es un cartucho Mixto de Intercambio Catiónico, soporta un amplio rango de pH, desde 0 hasta 14 Cabe recalcar que también cuenta con retención en fase reversa, fenómeno explicado anteriormente.

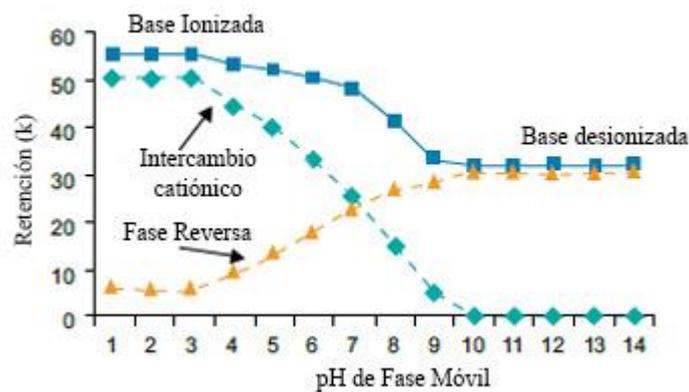
Primeramente se debe indicar que el soporte de este cartucho es sintetizado a partir del soporte del PEP, la molécula para lograr el intercambio catiónico es el ácido sulfónico y la molécula para la fase reversa es la divinilbenceno, como se muestra en la figura 2 (Waters Corporation, 2017).



*Figura 2. Estructura del cartucho Hypersep CX. Fuente:(Waters Corporation, 2017)*

El pH de la muestra y el pH de elución entran en juego, aunque se puede predecir el comportamiento de las moléculas de manera sencilla. A pH bajo los analitos están cargados y la retención se da mediante intercambio catiónico, aunque un poco se da por la fase reversa (Waters Corporation, 2017).

A un pH alto el intercambio catiónico se desactiva porque el analito se desioniza y la retención se da únicamente por la fase reversa (Supelco, 1998).



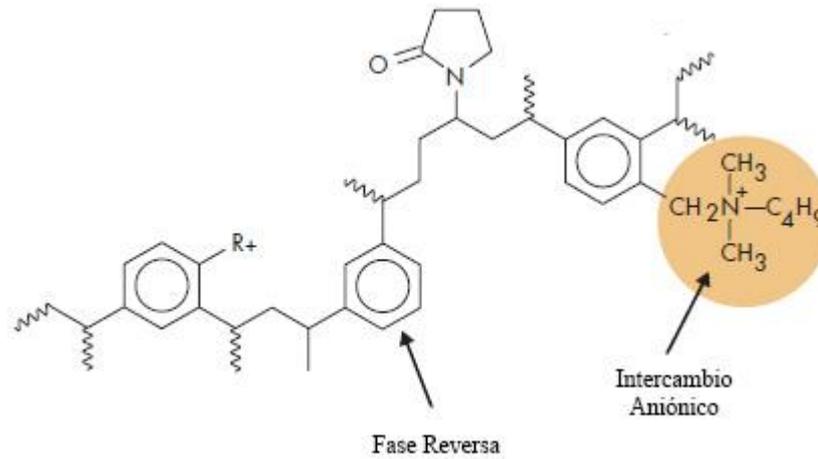
**Figura 3.** Interacciones en el cartucho CX de acuerdo al pH de la fase móvil. Fuente:(Waters Corporation, 2017)

La figura 3 se presenta el comportamiento de los compuestos básicos, el factor de retención  $k$  está definido como el cociente entre la concentración del analito en la fase estacionaria y la concentración del analito en la fase móvil (Moldoveanu & David, 2014).

### 2.3.3. Cartucho Hypersep AX

Los cartuchos AX, al igual que los CX son sintetizados a partir del copolímero del cartucho PEP por lo cual pueden retener las moléculas a través de dos maneras, mediante intercambio aniónico y retención por fase reversa, también soportan pH extremos.

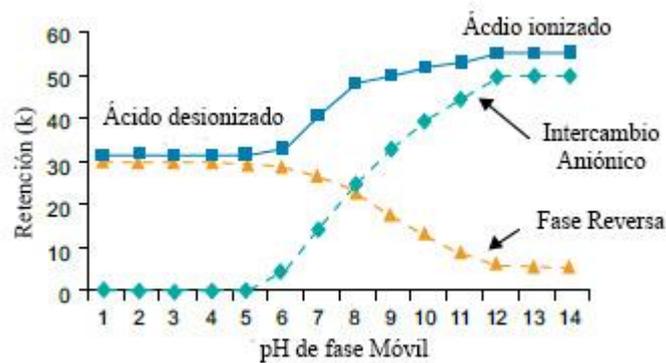
Compuestos ácidos son retenidos ya que en su estructura, que se observa en la figura 4, este cartucho tiene una amina cuaternaria que proporciona un intercambio aniónico fuerte y también tiene divinilbenceno que facilita la retención por fase reversa (Waters Corporation, 2017).



**Figura 4.** Estructura del cartucho Hypersep AX. Fuente: (Waters Corporation, 2017)

Cuando se tiene un pH alto el analito está cargado y la retención se da por el mecanismo de intercambio aniónico, aunque también se tiene retención mediante fase reversa.

A pH bajo el intercambio aniónico se desactiva porque el analito se encuentra desionizado, mientras que, se obtiene una máxima retención en fase reversa (Waters Corporation, 2017).



**Figura 5.** Interacciones en el cartucho AX de acuerdo al pH de la fase móvil. Fuente: (Waters Corporation, 2017)

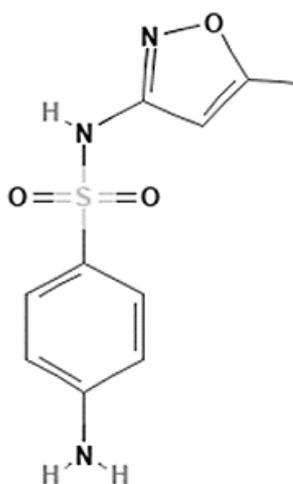
La figura 5 muestra el comportamiento de los compuestos ácidos en el cartucho cuando el pH de la fase móvil cambia.

## 2.4. Fármacos

Los 5 fármacos que se estudian son de interés por ser los más vendidos en el Ecuador e incluyen antibióticos, analgésicos y antiinflamatorios.

### 2.4.1. Sulfametoxazol

La estructura química de este antibiótico es una sulfonilamida, como lo muestra la figura 6; el efecto terapéutico es el de impedir la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas en las bacterias, por esta razón es una de las drogas más recetadas para el tratamiento de afecciones de vejiga, pulmones y oído. Cabe señalar que este medicamento también se utiliza para tratamiento de animales (Emily Anness & Kathryn Conoby, 2013).



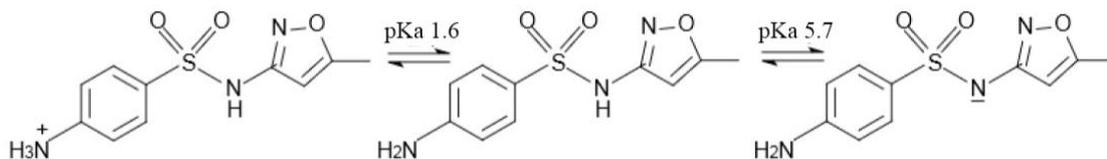
*Figura 6. Molécula del Sulfametoxazol. Fuente: PubChem*

El cuerpo humano no metaboliza todo el medicamento, y en promedio los pacientes excretan alrededor del 50% del mismo en su forma activa, por lo que su eliminación directa en aguas residuales afecta la actividad natural microbiológica de efluentes, afecta el ciclo del nitrógeno, aporta toxicidad al agua y genera mutaciones genéticas (Emily Anness & Kathryn Conoby, 2013).

Este medicamento tiene un peso molecular de 253.3 g/mol, un punto de fusión de 166°C y dos constantes de disociación ( $pK_a$ ), de 5.7 y de 1.6 (Emily Anness & Kathryn Conoby, 2013).

#### 2.4.1.1. Especiación

Al tener dos  $pK_a$  se encuentra al sulfametoxazol en su forma neutra, aniónica y catiónica, tal como lo muestra la figura 7.

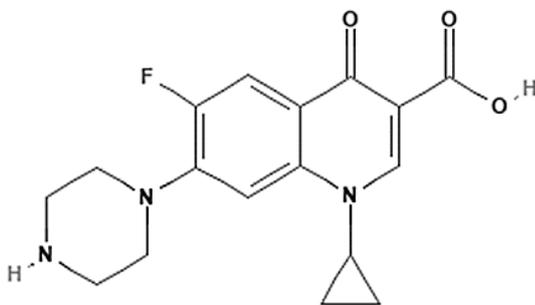


*Figura 7. Especiación del sulfametoxazol. Fuente: (Barros et al., 2018)*

Cuando el pH del medio se encuentra entre los valores de los pKa 1.6 y 5.7 las moléculas se encuentran en estado neutro, a pH menor a 1.6 el nitrógeno de la anilina adquiere un protón y se carga positivamente, mientras que a pH's superiores a 5.7 el nitrógeno del núcleo de la sulfonamida pierde un protón y se carga negativamente (Barros et al., 2018).

#### 2.4.2. Ciprofloxacina

La ciprofloxacina es un antibiótico cuya estructura química pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, estructura que se observa en la figura 8, es ampliamente utilizadas para tratar infecciones de huesos y articulaciones provocadas por bacterias gram positivas, así como en el tratamiento de infecciones en las vías urinarias y vías respiratorias (PubChem, s. f.; The American Society of Health-System Pharmacists, 2018).



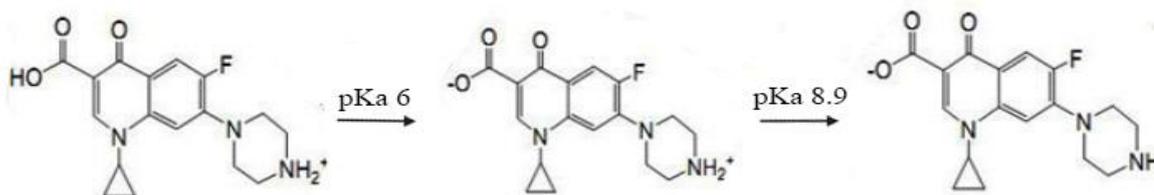
*Figura 8. Molécula de Ciprofloxacina. Fuente: PubChem.*

Inhíbe la acción del ADN girasa, actúa durante la replicación de las cadenas de ADN, la ciprofloxacina también inhibe la acción de las topoisomerasas, responsables de la forma espacial que adquiere el ADN (Jeffreys N. Johnson, 2014).

Con respecto a la absorción en el cuerpo humano, se ha encontrado hasta un 15% de metabolitos del fármaco en la orina de pacientes tratados y hasta el 50% del medicamento en su forma normal, con respecto a la cantidad administrada vía oral (DrugBank Canadá, 2018).

Este medicamento tiene un peso molecular de 331.3 g/mol y dos pKa de 6.1 y 8.9, con un punto de fusión de 255°C (PubChem, s. f.).

### 2.4.2.1. Especiación



**Figura 9.** Especiación de la Ciprofloxacina. Fuente: (Peng et al., 2015)

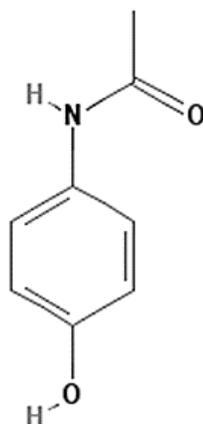
La ciprofloxacina (figura 9) es un compuesto zwitteriónico, es eléctricamente neutro, pero presenta cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes, entre pH 6 y 8.9 esta es la forma predominante (Dorival García, 2013).

A pH mayor a 6 el ácido estará desasociado, mientras que a pH menor a 8.7 el nitrógeno de la piperazina estará protonado (Torniainen, Tammilehto, & Ulvi, 1996).

A pH más bajos que el primer pka de 6, se produce la protonación de la amina secundaria de la piperazina, dando lugar a la forma catiónica de la ciprofloxacina, y a pH mayor a 9 se encuentra la forma aniónica de la ciprofloxacina producida por la pérdida del hidrógeno del grupo carboxílico (Peng et al., 2015).

### 2.4.3. Paracetamol

Es un medicamento derivado del p-aminofenol, y su estructura se puede observar en la figura 10, es el analgésico y antipirético más usado en el mundo, inhibe la síntesis de prostaglandinas y bloquea la generación del impulso doloroso a nivel periférico (Jóźwiak-Bebenista & Nowak, 2014; Morocho, Cuesta, & Meneses, 2017).

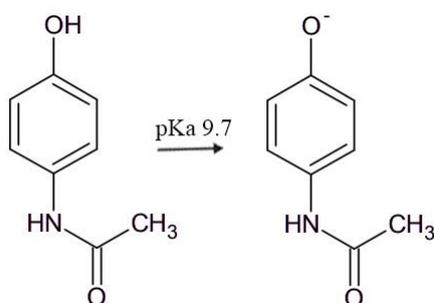


**Figura 10.** Molécula de Paracetamol. Fuente: PubChem.

El cuerpo humano excreta cantidades muy bajas de este medicamento una vez se haya suministrado, solo el 4% del paracetamol es excretado sin alteraciones en su estructura, mientras que sus metabolitos tienen un porcentaje de excreción que va desde el 30% hasta el 50% (Prescott, 1980).

Con un peso molecular de 151.2 g/mol, este fármaco tiene un  $pK_a$  de 9.7 y un punto de fusión de 336°C.

#### 2.4.3.1. Especiación

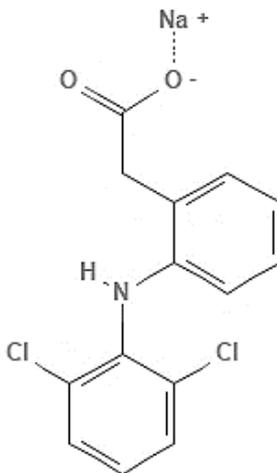


**Figura 11.** Especiación del Paracetamol. Fuente: (Environmental Organic Chemistry, 2008)

En la figura 11 se muestra que, un pH por encima de 9.7 la mitad de las moléculas se presentan en su forma neutra y la otra mitad en la forma desprotonada en el oxígeno del grupo fenol; de igual forma en un rango de pH entre 2 y 9 las moléculas están en su forma neutra (Environmental Organic Chemistry, 2008).

#### 2.4.4. Diclofenaco de Sodio

Clasificado dentro de los antiinflamatorios no esteroideos y derivado del ácido fenilacético, este medicamento actúa como analgésico y antipirético y es utilizado en tratamientos a largo plazo de enfermedades degenerativas de las articulaciones (Almanza Oyola, 2012). A continuación, en la figura 12 se puede observar la estructura del Diclofenaco sódico.



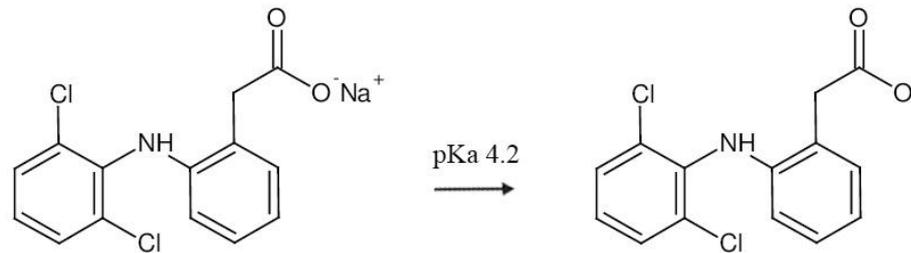
*Figura 12. Molécula del diclofenaco sódico. Fuente: PubChem*

El diclofenaco de sodio es metabolizado casi en su totalidad por el cuerpo humano, se excreta solo el 4% en su forma normal mediante la orina y sus metabolitos en un 37% (Sawchuk et al., 1995).

Tiene un peso molecular de 318.1 g/mol, un punto de fusión de 284°C y un  $pK_a$  de 4.2.

##### 2.4.4.1. Especiación

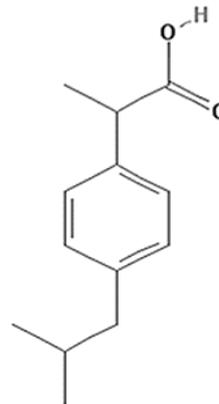
El diclofenaco de sodio se mantiene con carga neutra cuando se encuentra a pH menor a 4.2, desde este valor se disocia y se puede apreciar, en la figura 13, que se desprotona el grupo carboxilo y la molécula adquiere una carga negativa cuando pasa el valor del pH antes mencionado (Tiwari, Lalhriatpuia, & Lee, 2015).



*Figura 13. Especiación del Diclofenaco Sódico. Fuente: Autor.*

### 2.4.5. Ibuprofeno

El ibuprofeno es un medicamento antiinflamatorio no esteroideo, su estructura química deriva del ácido propiónico, y fue introducido en 1969 como una alternativa a la aspirina, podemos observar su estructura en la figura 14 (Bushra & Aslam, 2010; Kawamoto, 2010).



*Figura 14. Molécula del Ibuprofeno. Fuente: PubChem*

Dentro del cuerpo, el ibuprofeno es metabolizado por completo, y no se encuentra restos en la orina; aunque si se encuentran dos de sus metabolitos más importantes con un porcentaje del 25% al 37% (Mazaleuskaya et al., 2015).

Tiene un peso molecular de 206.3g/mol, cuenta con un  $pK_a$  de 4.9 y un punto de fusión de 76°C.

#### 2.4.5.1. Especiación

La figura 15 nos muestra que, el ibuprofeno al tener un  $pK_a$  de 4.9 su interacción con el medio acuoso es sencilla, a pH menor que el  $pK_a$  el ibuprofeno se encuentra en su forma no ionizada o forma protonada, mientras que a pH mayor que el  $pK_a$  se encuentra en su forma iónica o desprotonada (Iovino, Canzano, Capasso, Erto, & Musmarra, 2015).

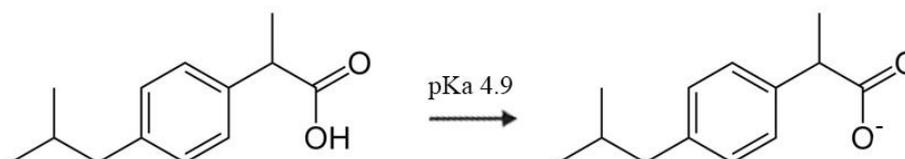


Figura 15. Especiación del Ibuprofeno. Fuente: Autor

### Resumen de la presencia de fármacos en distintas ciudades del mundo.

A continuación, la tabla 1 presenta las concentraciones que han sido encontradas en varios cuerpos de agua alrededor del mundo, por diversos investigadores utilizando las mismas técnicas analíticas.

Tabla 1. Presencia de los distintos fármacos en diferentes ríos del mundo.

Nombre	Concentración en efluentes	Referencias
<b>Sulfametoxazol</b>	<sup>1</sup> 0.18 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Kalmar, Suecia) <sup>2</sup> 0.1 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Río Pípiripau, Brasilia)	<sup>1</sup> (Lindberg, 2006) <sup>2</sup> (Lorz, Makeschin, & Weiss, 2014)
<b>Ciprofloxacina</b>	<sup>1</sup> 0.240 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Kalmar, Suecia) <sup>2</sup> 220 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Umea, Suecia)	<sup>1</sup> (Lindberg, 2006) <sup>2</sup> (Olofsson, 2004)
<b>Ibuprofeno</b>	<sup>1</sup> 1.9 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Baltimore, USA) <sup>2</sup> 0.2 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Río Pípiripau, Brasilia)	<sup>1</sup> (Yu, Bouwer, & Coelhan, 2006) <sup>2</sup> (Lorz et al., 2014)
<b>Paracetamol</b>	<sup>1</sup> 15.72 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Río Danubio, Serbia) <sup>2</sup> 8.3 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Río Pípiripau, Brasilia)	<sup>1</sup> (Petrović, Škrbić, Živančev, Ferrando-Climent, & Barcelo, 2014) <sup>2</sup> (Lorz et al., 2014)
<b>Diclofenaco</b>	<sup>1</sup> 11.34 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Río Danubio, Serbia) <sup>2</sup> 6.0 $\mu\text{gL}^{-1}$ (Río Pípiripau, Brasilia)	<sup>1</sup> (Petrović et al., 2014) <sup>2</sup> (Lorz et al., 2014)



### 3. METODOLOGÍA

#### 3.1. Equipos

*Cromatógrafo de alta resolución*

Marca y modelo: YL Instruments YL9300 HPLC, detector: UV/Vis, longitud de onda: 190 – 600 nm, software: YL CLarity.

*Columna HPLC*

Marca y modelo: Zorbax SB-C18 (octadecil), fase estacionaria: Silica gel, tamaño de partícula: 5µm, tamaño de poro: 120 Å, longitud x diámetro interno: 15cm x 4.6mm.

*Cartuchos SPE*

Marca: Thermo Scientific Hypersep Retain, modelo: PEP (equivalente Oasis HLB), AX (equivalente Oasis MAX), CX (equivalente Oasis MCX), volumen de carga: 3mL, capacidad: 60mg.

*Cámara de vacío*

Marca y modelo: Supelco Visiprep DL, capacidad: 12 cartuchos, vacío máximo: 25mmHg, vacío recomendado: 20mmHg.

#### 3.2. Reactivos

*Ciprofloxacina (CPX)*: marca: Sigma Aldrich, pureza: >98% grado HPLC.

*Sulfametoxazol (SMX)*: marca: Sigma Aldrich, pureza: >99.9% estándar analítico.

*Diclofenaco de sodio (DCF)*: marca: Sigma Aldrich, pureza: >99.5% estándar analítico.

*Ibuprofeno (IBU)*: marca: Sigma Aldrich, pureza: >99.9% estándar farmacéutico secundario.

*Paracetamol (PCM)*: marca: Sigma Aldrich, pureza: >99.9% estándar farmacéutico secundario.

*Metanol (Met)*: marca: Lichrosolv, gradiente para cromatografía líquida.

*Acetonitrilo (ACN)* gradiente para cromatografía líquida.

#### 3.3. Cromatografía líquida de alta resolución

##### 3.3.1. Condiciones cromatográficas

La identificación y cuantificación de los 5 fármacos se realizó utilizando HPLC, con detección UV/Vis. El método fue validado mediante los parámetros exigidos, límite de



detección y cuantificación, linealidad, precisión interdía e intradía. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

Columna: Zorbax C-18  
Temperatura de la columna: 25°C  
Volumen de inyección: 20µl  
Fase móvil: Solvente A: H<sub>2</sub>O 66.6%, ACN 33.3% pH 2.7 (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)  
Solvente B: ACN

Gradiente:	Tiempo (min)	Solvente A	Solvente B
	0	80	20
	3	80	20
	7	35	65
	10	35	65
	12	0	100
	15	80	20
	18	80	20

Flujo: 0.9mL/min

Longitud de onda: 264nm

### 3.3.2. Preparación de patrones

Se prepararon soluciones patrones de 100mg/L de cada fármaco, se partió de compuestos sólidos, por lo tanto:

- Para el SMX, PCM, DCF E IBU la disolución se realizó mediante un 80% de la fase móvil y 20% de ACN puro.
- Para la CPX la disolución se realizó acidificando la fase móvil con un volumen de 20mL de una solución 90% ACN y 10% Ácido acético.

### 3.3.3. Construcción de curva de calibración

Posteriormente, para la construcción de la curva de calibración, se preparó una mezcla de los fármacos a partir de las soluciones de 100mg/L, estas soluciones con concentraciones de: 0.25mg/L, 0.5mg/L, 1mg/L, 2mg/L, 4mg/L, 6mg/L.

Cabe recalcar que existe una curva de calibración para cada fármaco individualmente.



### 3.4. Extracción en fase sólida (SPE)

El método para la extracción en fase sólida fue desarrollado mediante diseño experimental con tres variables:

- pH de carga de la solución: x1
- pH del solvente de elución: x2
- tipo de solvente: x3

Para el nivel inferior (-) el pH es de 4, para el nivel intermedio (0), el pH es de 7 y para el nivel superior (+) el pH seleccionado es de 10.

A continuación, en la tabla 2 se muestra el resumen de los niveles seleccionados.

Tabla 2. Niveles del diseño experimental.

	Nivel -	Nivel 0	Nivel +
x1	4	7	10
x2	4	7	10
x3	ACN	-	Met

Los solventes elegidos fueron el ACN y el Met, al ser lo suficientemente fuertes como para recuperar los analitos del soporte de los cartuchos.

Por lo tanto, el diseño experimental se estableció como lo indica la tabla 3:



Tabla 3. Diseño experimental completo.

Exp N°	x1	x2	x3	pH carga	pH elución	Solvente
1	-	-	-	4	4	ACN
2	+	-	-	10	4	ACN
3	0	-	-	7	4	ACN
4	-	+	-	4	10	ACN
5	+	+	-	10	10	ACN
6	0	+	-	7	10	ACN
7	-	0	-	4	7	ACN
8	+	0	-	10	7	ACN
9	0	0	-	7	7	ACN
10	-	-	+	4	4	Met
11	+	-	+	10	4	Met
12	0	-	+	7	4	Met
13	-	+	+	4	10	Met
14	+	+	+	10	10	Met
15	0	+	+	7	10	Met
16	-	0	+	4	7	Met
17	+	0	+	10	7	Met
18	0	0	+	7	7	Met

Se aplicó el mismo diseño para los 3 tipos de cartuchos que se disponía, Hypersep PEP, AX y CX.

Se estableció un volumen de 100mL de la solución de la cual se quiere recuperar los analitos, con una concentración inicial baja de 20 $\mu$ g/L, y se espera que después de la SPE se tenga una concentración de alrededor de 1mg/L, que puede ser leída directamente en el HPLC. La velocidad de carga y elución se estableció en 1.5mL/min, velocidad recomendada por el fabricante.

### 3.4.1. Cartuchos Hypersep PEP, AX y CX

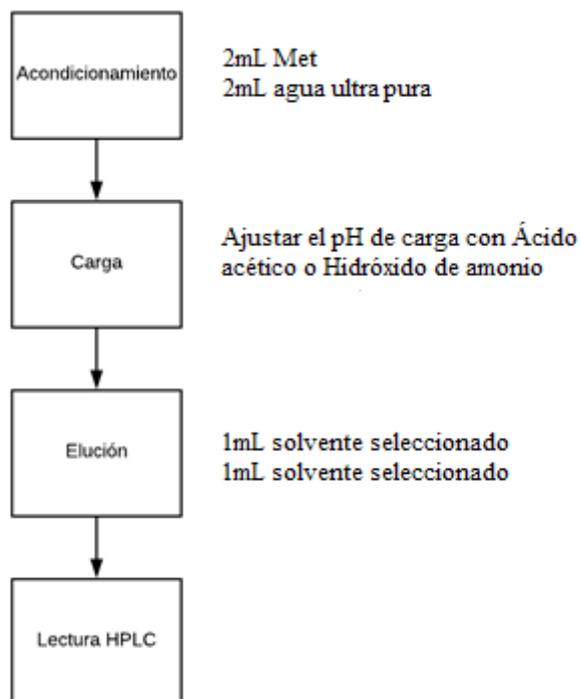
En la figura 16 se aprecia que, el primer paso del proceso SPE es el acondicionamiento del cartucho, mediante el paso de 2mL de Met y después 2mL de agua ultra pura, esto con el objetivo de activar los centros activos del soporte del cartucho.

A continuación, se realiza la carga de la muestra, en donde los 100mL se pasan a través del cartucho mediante un sistema continuo.

Una vez que todo el volumen de la muestra haya pasado por el cartucho se continúa con la elución, para este estudio se utilizarán 2mL de solvente, colocados en dos pasos, 1mL hasta que el cartucho quede sin líquido remanente y 1mL en un segundo paso para

asegurar la elución completa de los fármacos, este volumen final de 2mL son recolectados en un tubo de ensayo.

Posteriormente se inyecta en el HPLC para la correspondiente cuantificación y cálculo del porcentaje de recuperación.



*Figura 16. Procedimiento general para SPE*



## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Validación método cromatográfico

Los resultados para la validación del método cromatográfico se dividen por medicamentos, es decir, se tiene una curva de calibración para cada fármaco, las cuales se mostrarán en el anexo 1 en conjunto con los cromatogramas a diferentes concentraciones.

El desarrollo del método cromatográfico comenzó mediante la selección de las fases móviles adecuadas para la correcta elución de los analitos de interés.

Como fase móvil A se seleccionó una mezcla de 66.6% de ACN con un 33.3% de agua ultra pura, adicionando ácido ortofosfórico hasta obtener un pH ácido de 2.7; valor de pH en el cual la columna del HPLC trabaja sin ningún problema y los picos del DCF e IBU son separados de manera correcta y están bien resueltos (Sultana, Saeed, Mehboob, & Nadir, 2013).

Para la fase móvil B se eligió ACN puro, sin ninguna modificación de pH.

Ambas fases móviles fueron seleccionadas debido a que los cinco fármacos tenían una solubilidad elevada en este solvente, y los diferentes autores recomiendan que los analitos deben ser disueltos en la fase móvil para evitar ruido y picos superpuestos debidos a solventes diferentes a los de la fase móvil.

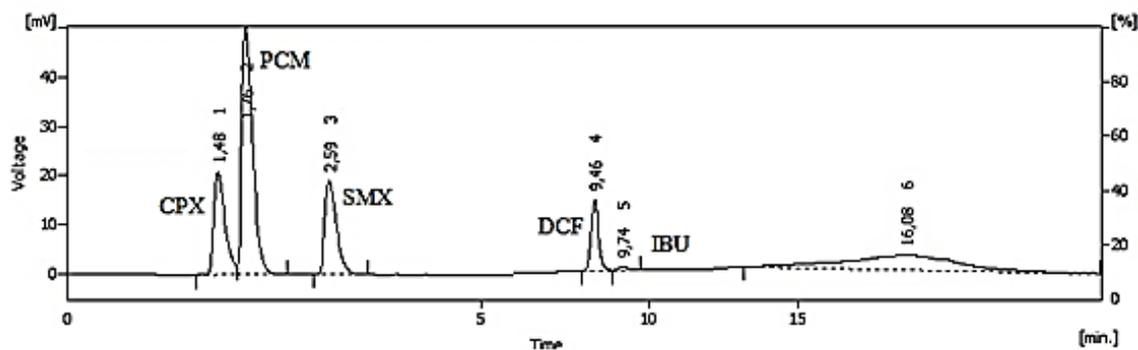
El gradiente seleccionado está pensado en optimizar el método cromatográfico, en los primeros minutos se eluye la CPX y el PCM, cuando comienza el gradiente al minuto 2.5 se eluye el SMX y al minuto 9.4 y 9.7 se eluye el DCF e IBU respectivamente, al final del método se procede a regresar a la concentración inicial de la fase móvil A para lavar la columna de posibles residuos.

#### 4.1.1. Tiempo de retención de fármacos

El método desarrollado fue capaz de diferenciar los 5 medicamentos presentes en diferentes muestras de soluciones acuosas, ver figura 17, y los correspondientes tiempos de retención se observan en la tabla 4.

*Tabla 4. Tiempos de retención de los medicamentos.*

Fármaco	TR (min)
CPX	1.47
PCM	1.77
SMX	2.62
DCF	9.45
IBU	9.72


*Figura 17. Cromatograma de un patrón de 4ppm*

#### 4.1.2. Linealidad, LOD y LOQ

Para todos los fármacos se eligió la curva con el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) más cercano a 1, y a partir de esta se calculó los diferentes parámetros estadísticos, la ecuación de la curva de calibración, el límite de detección y el límite de cuantificación, mostrados en la tabla 5.

*Tabla 5. Ecuación lineal, LOQ y LOD calculados.*

Fármaco	Ecuación	r2	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
CPX	$y = 34.36 * x + 2.234$	0.9997	0.039	0.079
PCM	$y = 86.29 * x - 0.283$	0.9996	0.047	0.094
SMX	$y = 38.09 * x - 0.296$	0.9995	0.050	0.099
DCF	$y = 19.03 * x - 0.162$	0.9997	0.040	0.080
IBU	$y = 1.418 * x - 0.119$	0.9998	0.026	0.052

#### 4.1.3. Precisión interdía

En la precisión interdía, se obtienen las medias de las concentraciones de las dos réplicas de cada día, posteriormente se obtiene un promedio de las medias de todos los días y con



esos resultados se obtiene la desviación estándar y el coeficiente de variación, el cual debe ser menor al 20%.

A continuación, en las tablas 6 – 10 se muestran los promedios, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada fármaco a cada concentración.

Tabla 6. Porcentajes de la precisión inter día para CPX.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Promedio de medias (mV.s)	12.56	20.96	37.88	71.63	143.01	217.04
Desviación estándar (mV.s)	1.76	2.73	1.94	4.17	6.40	5.28
Coef. Variación (%)	14	13	5	6	4	2

Tabla 7. Porcentajes de la precisión inter día para PCM.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Promedio de medias (mV.s)	22.07	48.34	93.12	187.35	378.35	561.28
Desviación estándar (mV.s)	1.40	5.18	4.38	13.24	15.63	39.70
Coef. Variación (%)	6	11	5	7	4	7

Tabla 8. Porcentajes de precisión inter día para SMX.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Promedio de medias (mV.s)	10.91	24.17	46.30	93.74	185.81	281.90
Desviación estándar (mV.s)	1.75	5.12	7.03	16.25	32.17	48.75
Coef. Variación (%)	16	17	15	17	17	17



Tabla 9. Porcentajes de precisión interdía para DCF.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Promedio de medias (mV.s)	4.10	8.86	17.29	34.92	69.52	108.17
Desviación estándar (mV.s)	0.40	0.54	2.02	3.69	7.01	6.63
Coef. Variación (%)	10	6	12	11	10	6

Tabla 10. Porcentajes de precisión interdía para IBU.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Promedio de medias (mV.s)	0.25	0.60	1.21	2.46	4.84	7.44
Desviación estándar (mV.s)	0.04	0.10	0.12	0.30	0.71	1.15
Coef. Variación (%)	16	16	10	12	15	15

#### 4.1.4. Precisión intradía

Para hallar la precisión intradía se obtiene el promedio de cada día y un promedio total de todos los días. Luego se procede a restar, para cada concentración y para cada día el promedio menos el promedio total. Esta diferencia se transforma a valor absoluto y se suma, para nuestro caso se tiene 3 días, por lo tanto 3 ensayos diferentes. Finalmente, para la desviación estándar se divide la suma anterior para el número de ensayos.

A continuación, se muestran los valores de la desviación estándar y coeficiente de variación para cada concentración, el valor del coeficiente de variación se encuentra por debajo del 20%, lo que indica que los análisis son confiables, ya que están por debajo del valor límite (Tablas 11 – 15).



Tabla 11. Porcentajes de la precisión intradía para la CPX.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Desv. Estandar (mV.s)	1.3	2.1	1.4	3	4.4	4
CV (%)	10	10	4	4	3	2

Tabla 12. Porcentajes de la precisión intradía para PCM.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Desv. Estandar (mV.s)	1	3.8	3.1	10.2	11.9	30.6
CV (%)	4	8	3	5	3	5

Tabla 13. Porcentajes de la precisión intradía para SMX.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Desv. Estandar (mV.s)	1.3	3.7	5	12.3	24.4	37.3
CV (%)	12	15	11	13	13	13

Tabla 14. Porcentajes de la precisión intradía para DCF.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Desv. Estandar (mV.s)	0.3	0.4	1.4	2.8	5.3	5
CV (%)	7	5	8	8	8	5

Tabla 15. Porcentajes de la precisión intradía para IBU.

Concentración (mg/L)	0.25	0.5	1	2	4	6
Desv. Estandar (mV.s)	0	0.1	0.1	0.2	0.5	0.8
CV (%)	12	11	8	9	10	11



## 4.2. Método de Extracción en Fase Sólida (SPE)

Los ensayos mostrados en el diseño experimental se realizaron con una réplica, debido a la mínima cantidad de cartuchos disponibles.

El método para la extracción en fase sólida comenzó por estudiar las especiaciones de los fármacos y las curvas de absorción de los 3 cartuchos utilizados para este estudio (PEP, CX, AX), de igual manera se tomó en cuenta 2 solventes para la elución, Met y ACN, solventes recomendados por el fabricante; el Met es un solvente de tipo donador de protones ( $H^+$ ), tiene un poder de elución de 1, mientras que el ACN es un solvente dipolo-dipolo y un poder de elución de 3.1 (Snyder, 1974).

A las muestras de los 5 medicamentos se les modificó el pH, a 4, 7 y 10, para realizar la carga y al solvente de elución también se le modificó el pH a 4, 7 y 10.

El método de acondicionamiento de los cartuchos, el método de carga y el método de elución es exactamente el mismo para los 3 tipos de cartuchos, la diferencia es el comportamiento de cada fármaco y su interacción con el soporte de la fase estacionaria del cartucho.

Los valores de recuperación aceptados están comprendidos entre 70% a 120% (CORESTA, 2018; Reynolds, 2013).

En el anexo 2 se encuentran los diseños experimentales para cada cartucho con su respectivo código de ensayo.

### 4.2.1. Hypersep PEP

En la tabla 16 se muestran los resultados obtenidos de los diferentes experimentos realizados en los cartuchos Hypersep PEP, cada uno con su réplica, por tal motivo se calculó el promedio de los dos experimentos y su desviación estándar, los valores de desviación estándar para este tipo de análisis deben ser menores al 20% para ser aceptados (Cardoso et al., 2011).



Tabla 16. Porcentajes de recuperación y desviación estándar de los medicamentos en el cartucho Hypersep PEP.

Exp N°	pH carga	pH elución	Porcentaje de recuperación (%)				
			SMX	CFX	PCM	DFC	IBU
PEP001	4.1	4.4	89 ± 4	24 ± 7	6 ± 1	51 ± 6	100 ± 13
PEP002	9.6	4.4	12 ± 1	33 ± 15	5 ± 1	82 ± 3	33 ± 46
PEP003	7.0	4.4	82 ± 2	24 ± 9	5 ± 1	79 ± 16	23 ± 32
PEP004	4.1	9.6	84 ± 5	22 ± 1	6 ± 1	55 ± 1	98 ± 58
PEP005	9.6	9.6	9 ± 3	23 ± 4	5 ± 0	66 ± 22	76 ± 4
PEP006	6.8	9.6	85 ± 6	23 ± 7	6 ± 0	79 ± 5	78 ± 7
PEP007	4.1	6.9	115 ± 2	52 ± 12	11 ± 0	77 ± 5	372 ± 239
PEP008	9.5	6.9	10 ± 1	96 ± 20	8 ± 2	113 ± 11	215 ± 90
PEP009	6.6	6.9	105 ± 6	66 ± 14	11 ± 1	113 ± 13	150 ± 86
PEP010	4.1	4.1	86 ± 12	56 ± 3	52 ± 6	53 ± 5	14 ± 4
PEP011	9.7	4.1	2 ± 2	69 ± 6	51 ± 2	76 ± 7	19 ± 2
PEP012	6.7	4.1	81 ± 3	71 ± 5	48 ± 1	77 ± 5	11 ± 2
PEP013	4.0	9.8	94 ± 10	47 ± 11	45 ± 5	52 ± 7	32 ± 7
PEP014	9.5	9.8	2 ± 0	42 ± 2	44 ± 2	84 ± 4	112 ± 39
PEP015	6.6	9.8	90 ± 3	54 ± 8	44 ± 2	75 ± 8	134 ± 27
PEP016	4.1	7	96 ± 2	42 ± 6	51 ± 12	63 ± 5	152 ± 4
PEP017	9.6	7	0	41 ± 7	51 ± 11	75 ± 9	109 ± 31
PEP018	6.7	7	82 ± 2	26 ± 2	13 ± 0	67 ± 2	515 ± 16

### *Sulfametoxazol*

Durante los experimentos realizados, se pudo observar que en el cartucho Hypersep PEP, se tienen recuperaciones altas y repetibles en todos los ensayos en los que se tiene pH de carga de 4 y 7; en este punto puede notar que, la retención se da por interacciones lipofílicas entre los grupos bencénicos de la molécula de sulfametoxazol y el divinil benceno presente en el cartucho Hypersep PEP, ya que en un gran porcentaje las moléculas se encuentran en estado neutro a estos pH's, las recuperaciones varían desde 81% hasta 115%.

Mientras que a pH cercano a 10 la mayoría de moléculas se encuentran cargadas negativamente, en el nitrógeno de la molécula principal de sulfonamida, esto impide la retención de la molécula en el cartucho debido a que la hidrofiliidad de la molécula aumenta en forma exponencial con relación a las moléculas neutras o cargadas de manera positiva, evitando que se retengan en el cartucho, dando unos porcentajes de 0% hasta 12% (Barros et al., 2018; Lian et al., 2014).

Las recuperaciones no se ven afectadas por los solventes de elución, ni por su pH.



### *Ciprofloxacina*

La recuperación de la ciprofloxacina es baja cuando se utiliza ACN a pH 4 y pH 10 como solvente de elución y se tiene recuperaciones del 22 al 33%, por otro lado, si el ACN es utilizado a un pH neutro, la ciprofloxacina tiene un alto porcentaje de recuperación (52 - 96%).

Según (Peng et al., 2015), la ciprofloxacina a pH 6.1 a pH 8.7 se encuentra en su totalidad en forma zwitteriónica y en menor cantidad en su forma neutra, sumado a esta teoría, en estudios de (Kłosińska-Szmarło et al., 2014), las moléculas neutras de la ciprofloxacina tienen baja solubilidad en solventes polares, mientras que, las moléculas zwitteriónicas de la ciprofloxacina tienen una gran afinidad por ambientes polares, este fenómeno permite explicar el alto porcentaje de recuperación cuando el pH de elución es 7, en primer lugar, las moléculas se retienen de manera efectiva en las moléculas del cartucho PEP y se recuperan en su totalidad utilizando un solvente como el ACN, capaz de atrapar mediante fuerzas dipolo a las moléculas de ciprofloxacina.

### *Paracetamol*

El paracetamol existe en su forma neutra en pH's bajo de 9, por lo tanto, se espera una retención mediante fase reversa, no obstante, los resultados muestran lo contrario, ningún ensayo da resultados con una recuperación mayor a 11%, con ACN como solvente de elución.

Con metanol como solvente de elución los porcentajes mejoran hasta un 52%, esto es debido a que el paracetamol es un compuesto que tiene más afinidad por solventes alcohólicos, que son más polares que el acetonitrilo (Granberg & Rasmuson, 1999).

### *Diclofenaco sódico*

Para el diclofenaco sódico el solvente de elución no afecta, de igual forma su pH, lo que si muestran los resultados es que el factor predominante es el pH de carga de la muestra, las recuperaciones van desde el 63% hasta 113% cuando la muestra tiene un pH de 7 y 10 debido a que la molécula cargada se fija en el cartucho mediante fase reversa. A pH de carga 4 las moléculas se encuentran con el sodio y tienen más afinidad por el agua por lo que la recuperación se reduce un poco. Las interacciones para que se dé la retención en el cartucho son mediante fase reversa y la recuperación se da por la mayor afinidad del diclofenaco sódico por el solvente de elución que por la fase sólida, ya que las interacciones con el sorbente son débiles (Fuerzas de Van der Waals).



### *Ibuprofeno*

Las interacciones que ocurren para la retención del ibuprofeno son mediante fase reversa por la afinidad lipofílica del ibuprofeno, ya que es un ácido débil. (Czyrski, 2019).

Los resultados varían y no son constantes entre replicas, teniendo recuperaciones de hasta 11% y otras de hasta 515%, este error puede deberse a distintos factores como algún tipo de contaminación presente en la muestra al momento de cargar al cartucho o contaminación en la columna de HPLC.

### 4.2.2. Hypersep CX

En la tabla 17 se muestran los resultados obtenidos de los diferentes experimentos con el cartucho Hypersep CX, cada uno con su réplica, por tal motivo se calculó el promedio de los dos experimentos y su desviación estándar, los valores de desviación estándar para este tipo de análisis deben ser menores al 20% para ser aceptados (Cardoso et al., 2011).

Tabla 17. Porcentajes de recuperación y desviación estándar de los medicamentos en el cartucho Hypersep CX

Exp N°	pH carga	pH elución	Porcentaje de recuperación (%)				
			SMX	CFX	PCM	DFC	IBU
CX001	4.0	4	25 ± 1	0	57 ± 4	53 ± 1	9 ± 2
CX002	9.7	4	58 ± 11	0	55 ± 2	79 ± 6	15 ± 9
CX003	6.6	4	23 ± 33	0	28 ± 40	83 ± 3	14 ± 9
CX004	4.0	9.7	0	0	59 ± 8	65 ± 13	5 ± 7
CX005	9.8	9.7	63 ± 11	0	54 ± 1	77 ± 1	6 ± 8
CX006	6.5	9.7	13 ± 18	0	63 ± 3	83 ± 3	21 ± 7
CX007	4.1	6.8	0	0	47 ± 4	58 ± 1	15 ± 1
CX008	9.8	6.8	63 ± 11	0	43 ± 2	77 ± 6	3 ± 5
CX009	6.4	6.8	13 ± 19	0	63 ± 7	89 ± 3	16 ± 5
CX010	4.0	4.1	22 ± 1	0	65 ± 6	57 ± 4	36 ± 4
CX011	9.9	4.1	45 ± 10	0	60 ± 5	71 ± 8	32 ± 13
CX012	7.0	4.1	42 ± 18	0	69 ± 17	84 ± 4	18 ± 3
CX013	4.2	10.1	0	0	42 ± 59	57 ± 4	27 ± 4
CX014	10.2	10.1	28 ± 6	0	50 ± 6	55 ± 5	8 ± 0
CX015	6.8	10.1	29 ± 9	0	52 ± 9	67 ± 7	34 ± 7
CX016	4.1	7.1	21 ± 6	0	32 ± 46	62 ± 1	37 ± 2
CX017	10.0	7.1	46 ± 3	0	60 ± 2	70 ± 6	21 ± 2
CX018	6.7	7.1	45 ± 8	0	64 ± 4	81 ± 1	53 ± 12

### *Sulfametoxazol*

En el cartucho Hypersep CX, el fármaco no tiene una buena recuperación, llegando a un máximo del 63%, como se presentó en la tabla 6.



Según Barros et al., 2018 y Lian et al., 2014, las moléculas de sulfametoxazol a pH 7 y 4 se encuentran en estado neutro y en muy poca cantidad cargadas negativamente, esto nos indica que la retención se da mediante interacciones de los grupos bencénicos y de manera nula mediante intercambio catiónico. Lo mismo sucede a pH 10, al estar las moléculas en su totalidad, cargadas negativamente, no existe intercambio catiónico, la retención se da por interacciones de fase reversa.

Otra vez el solvente de elución y su pH no influye en la recuperación.

### *Ciprofloxacina*

Como muestran los resultados no existe recuperación de las moléculas de ciprofloxacina en el cartucho de intercambio catiónico, a pH 4 las moléculas están cargadas positivamente, lo que nos indicaría que existe un intercambio catiónico entre la molécula de ciprofloxacina y las moléculas del cartucho CX, la explicación de la nula recuperación del fármaco en los experimentos CX001 y CX010, puede darse debido a que el solvente de elución no contenía los suficientes cationes que reemplacen a las moléculas de la ciprofloxacina o en su defecto los cationes del hidróxido de amonio (base débil) no fueron lo suficientemente fuertes como para reemplazar las moléculas de ciprofloxacina del sorbente. A pH 7 y pH 10 no existe recuperación con ningún tipo de solvente.

### *Paracetamol*

Con ACN como solvente de elución el paracetamol presenta recuperaciones que van desde 28% hasta 63%, y utilizando metanol como solvente disminuye hasta un 32%.

De igual forma las mayores recuperaciones se dan cuando se carga la muestra a pH 7, las interacciones mediante fase reversa son las esperadas.

No se produce intercambio catiónico porque el pH de nuestro estudio no es tan bajo para lograr obtener la protonación del nitrógeno presente en la molécula de paracetamol.

### *Diclofenaco sódico*

Existe poca o casi nula interacción entre las moléculas del diclofenaco sódico y las moléculas de intercambio del cartucho CX, puesto que la mayoría de las moléculas del diclofenaco están cargadas negativamente y un cierto porcentaje están en su forma neutra y el intercambio catiónico no puede ocurrir en estas condiciones. Razón suficiente para explicar que la retención se da por fase reversa, siendo las mejores con pH de carga 7.



### *Ibuprofeno*

En este cartucho de intercambio catiónico no se produce una buena recuperación del ibuprofeno, en un rango de pH desde 4 hasta 7, las moléculas empiezan a cargarse de manera negativa, por lo que no ocurre intercambio catiónico, los porcentajes bajos de recuperación se deben a interacciones de fase reversa por la afinidad lipofílica del ibuprofeno (Czyrski, 2019).

Con ACN como solvente de elución, los porcentajes de recuperación que van desde 3% hasta 15%, mientras que utilizando Met los porcentajes se elevan alcanzando hasta un 53%

### **4.2.3. Hypersep AX**

En la tabla 18 se muestra los resultados obtenidos de los diferentes experimentos realizados en los cartuchos Hypersep AX, cada uno con su réplica, por tal motivo se calculó el promedio de los dos experimentos y su desviación estándar, los valores de desviación estándar para este tipo de análisis deben ser menores al 20% para ser aceptados (Cardoso et al., 2011).

Tabla 18. Porcentajes de recuperación y desviación estándar de los medicamentos en el cartucho Hypersep AX.

Exp N°	pH carga	pH elución	Porcentaje de recuperación (%)				
			SMX	CFX	PCM	DFC	IBU
AX001	4.1	4	57 ± 5	9 ± 1	13 ± 1	15 ± 3	40 ± 5
AX002	9.6	4	20 ± 3	5 ± 2	28 ± 3	13 ± 1	34 ± 4
AX003	7.0	4	63 ± 4	20 ± 0	12 ± 0	21 ± 3	45 ± 5
AX004	4.1	9.7	7 ± 0	11 ± 7	12 ± 2	22 ± 1	42 ± 6
AX005	9.6	9.7	4 ± 3	3 ± 1	17 ± 1	24 ± 6	74 ± 38
AX006	6.8	9.7	0	20 ± 1	11 ± 1	20 ± 1	53 ± 4
AX007	4.1	6.8	13 ± 4	11 ± 1	10 ± 0	25 ± 2	62 ± 27
AX008	9.5	6.8	1 ± 2	4 ± 3	18 ± 2	19 ± 0	66 ± 23
AX009	6.6	6.8	0	9 ± 7	11 ± 0	15 ± 5	30 ± 3
AX010	4.1	4.1	79 ± 1	26 ± 4	8 ± 1	9 ± 0	18 ± 2
AX011	9.7	4.1	80 ± 1	57 ± 2	119 ± 18	40 ± 9	0
AX012	6.7	4.1	86 ± 4	26 ± 3	98 ± 2	16 ± 9	0
AX013	4.0	10.1	32 ± 3	10 ± 2	78 ± 9	15 ± 2	31 ± 9
AX014	9.5	10.1	4 ± 0	4 ± 1	74 ± 5	31 ± 3	21 ± 2
AX015	6.6	10.1	5 ± 1	8 ± 0	78 ± 5	16 ± 1	37 ± 9
AX016	4.1	7.1	32 ± 0	7 ± 0	77 ± 7	15 ± 4	33 ± 6
AX017	9.6	7.1	4 ± 0	4 ± 2	125 ± 16	37 ± 1	43 ± 3
AX018	6.6	7.1	5 ± 0	13 ± 1	114 ± 15	17 ± 0	79 ± 1



### *Sulfametoxazol*

Con el cartucho Hypersep AX, el sulfametoxazol solo se recupera de manera eficiente cuando se eluye con Met a pH 4, obteniéndose porcentajes de 79%, 80% y 86%, esto para los pH's de carga de 4, 10 y 7 respectivamente.

Las moléculas, que son cargadas en el cartucho a pH 4, están en su mayoría en estado neutro, por lo que las interacciones se dan mediante fase reversa. A pH 7, cuando un porcentaje elevado de las moléculas del sulfametoxazol empiezan a ionizarse, se obtiene recuperaciones altas, lo mismo ocurre cuando se carga la muestra a pH 10.

Las recuperaciones con ACN a pH 4 son altas comparadas con las demás pruebas realizadas con ACN (>55%), pero no llegan a cumplir con el porcentaje aceptado.

### *Ciprofloxacina*

Los resultados muestran que, cuando se carga la muestra a pH 10, la ciprofloxacina tiene una recuperación mínima, sus moléculas están cargadas negativamente y la retención se da mediante intercambio aniónico, nuevamente la explicación para la baja recuperación es la fuerza de los aniones presentes en el solvente de elución, en este caso el ácido acético. Cuando se carga la muestra a pH 7 las moléculas están en estado zwitteriónico y neutro por lo que la recuperación aumenta considerablemente a un promedio de 16%, sea cual sea el solvente de elución y su pH, se considera que la retención se da mediante fase reversa. A pH 4 las moléculas están cargadas positivamente, por lo que no existe intercambio aniónico, la poca retención se da por fase reversa.

Sin embargo, el ensayo AX011 muestra un elevado porcentaje de recuperación de 57%, mismo que se repite en su réplica, la muestra fue cargada a pH 10, dándose el debido intercambio aniónico, el solvente de elución es el Met a pH 4, este compuesto es descrito como un solvente donador de protones y con los aniones del ácido acético es posible un reemplazo elevado de las moléculas de ciprofloxacina en los sitios activos del sorbente (Snyder, 1974).

### *Paracetamol*

En este cartucho se da una recuperación alta cuando se utiliza Met como solvente de elución, las interacciones se dan mediante fase reversa cuando la muestra es cargada a un pH de 4 y 7 y mediante intercambio aniónico cuando se carga la muestra a un pH de 10, siempre y cuando la elución sea con Met a pH de 4, este comportamiento es el esperado, en un principio las moléculas del paracetamol se desprotonan y quedan libres para



adsorberse con los centros activos del sorbente y al momento de eluir con pH bajo y con Met se separan del sorbente de manera eficiente con recuperaciones cercanos al 100%.

*Diclofenaco sódico*

Existen solo 2 experimentos en donde el diclofenaco sódico presenta una recuperación alta, aunque, no llega a el rango aceptable.

Los experimentos AX011 y AX017, en donde se carga la muestra a pH 10, donde todas las moléculas están cargadas negativamente, y se eluye a pH 4 y 7 respectivamente; en estos experimentos ocurre un intercambio aniónico.

*Ibuprofeno*

Los experimentos en donde se muestran porcentajes altos de recuperación son los AX005, AX007, AX008, AX018, el pH de carga 10, 4, 7 y 7 respectivamente para cada ensayo, rangos en los que la literatura nos indica que todas las moléculas están disociadas y ocurre en este cartucho un intercambio aniónico. Las moléculas son arrastradas posteriormente con los dos solventes de manera eficiente, cuando el pH del mismo se encuentra en 7.

**4.3. Desarrollo de la metodología para extraer los cinco fármacos**

Todos los datos anteriores fueron analizados de manera de que se pueda plantear un sistema SPE, que se recuperen los cinco fármacos estudiados.

El método fue el siguiente y se observa el proceso en las figuras 18 y 19:

- La primera carga de la muestra se realiza ajustando el pH 4 y la elución se realiza con ACN a pH 4, el sulfametoxazol, el diclofenaco y el ibuprofeno tienen altos porcentajes de recuperación. Se realizaron otras eluciones para comprobar la elución total de los compuestos y se encontró que la elución posterior a pH 10 también se recupera el diclofenaco, tal como lo muestra la tabla 19 y 20.

Tabla 19. Áreas resultantes de los picos de los fármacos de la primera carga a pH 4 con elución a pH 4.

Elución 1	pH 4 (área mV.s)	pH 10 (área mV.s)
CPX	20.239	
PCM	9.539	
SMX	61.146	
DCF	12.601	1.7
IBU	1.518	



Tabla 20. Réplica de la primera carga, valores expresados en función del área del pico del cromatograma.

Elución 1	pH 4 (área mV.s)	pH 10 (área mV.s)
CPX	23.09	
PCM	7.89	
SMX	60.86	
DCF	12.62	2.14
IBU	1.31	

- Para la segunda carga, la muestra anteriormente utilizada se ajusta a pH 10 y la elución con ACN a pH 7 para lograr retener y recuperar la ciprofloxacina, esto también se logró dando porcentajes similares a los de la primera carga, pero esta vez asegurándonos que todas las moléculas se hayan retenido en el cartucho.

También se recuperó un poco más de paracetamol y de diclofenaco, como lo muestra la tabla 21 y 22.

Se realizaron otras eluciones posteriores para comprobar la elución total de los compuestos y se encontró que a pH 4 y 10 también se recupera la ciprofloxacina, sulfametoxazol y diclofenaco.

Tabla 21. Áreas resultantes de la segunda carga con pH 10 y elución a pH 7, pH 4 y pH 10.

Elución 2	pH 4 (área mV.s)	pH 7 (área mV.s)	pH 10 (área mV.s)
CPX	2.58	18.36	-
PCM	-	5.80	-
SMX	3.92	-	-
DCF	-	2.13	2.11
IBU	-	-	-

Tabla 22. Réplica de la segunda carga, valores expresados en área del pico de cada fármaco.

Elución 2	pH 4 (área mV.s)	pH 7 (área mV.s)	pH 10 (área mV.s)
CPX	4.68	22.09	-
PCM	1.57	4.44	-
SMX	3.92	-	-
DCF	-	2.28	2.28
IBU	-	-	-

En la tabla 23 y 24 se tiene la suman de todas las áreas, dando así los resultados finales; los porcentajes de recuperación se calcularon con un patrón de referencia de 5mg/L:



Tabla 23. Réplica 1 del método optimizado.

Total	Área (mV.s)	Recuperación (%)
CPX	41.18	101
PCM	15.34	15
SMX	65.07	89
DCF	18.54	86
IBU	1.52	86

Tabla 24. Réplica 2 del método optimizado.

Total	Área (mV.s)	Recuperación (%)
CPX	49.86	121
PCM	12.33	13
SMX	64.78	84
DCF	19.31	90
IBU	1.31	74

En la tabla 25 se observa el promedio de los porcentajes de recuperación, ya que se realizaron dos réplicas, estos porcentajes van acompañados de su desviación estándar que está por debajo del límite máximo permitido.

Tabla 25. Porcentaje de recuperación total del método optimizado con su respectiva variación estándar-

Total	Porcentaje de Recuperación (%)
CPX	111 ± 14
PCM	14 ± 1
SMX	86 ± 4
DCF	88 ± 3
IBU	80 ± 8

El paracetamol se recupera por separado en un cartucho Hypersep AX, la carga de la solución se la hace a pH 7 y se eluye con Met a pH 4, dando una recuperación alta que se aprecia en la tabla 26.

Tabla 26. Porcentaje de recuperación del PCM en el cartucho Hypersep AX.

Total	Porcentaje de Recuperación (%)
PCM	98 ± 2

En la investigación de Brogat en 2013, en donde estudia varios fármacos, entre ellos SMX, DCF e IBU, y su detección en soluciones acuosas, se muestran resultados que concuerdan con esta investigación, siendo el cartucho con estructura hidrofílica – lipofílica (PEP) el que retiene los tres fármacos de manera eficiente, a pesar de que el pH

de su estudio es diferente. Lo que comprueba la capacidad del cartucho Hypersep PEP de retener y recuperar una amplia variedad de compuestos.

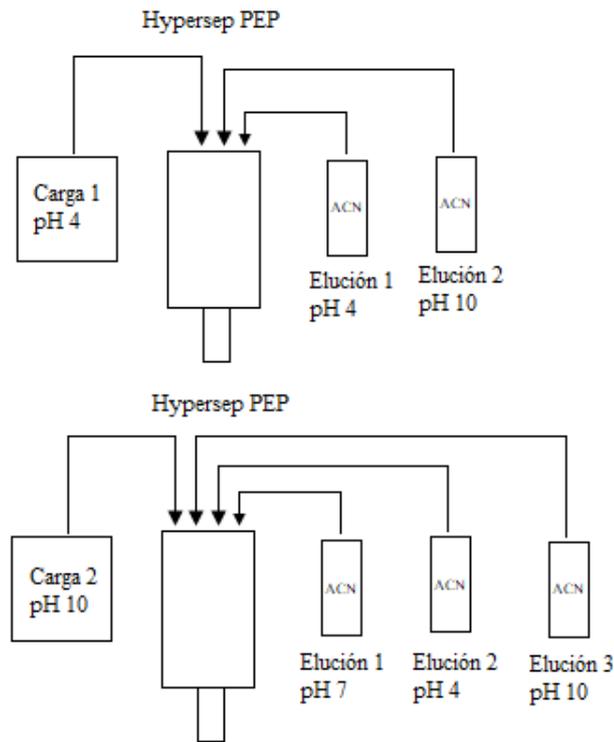


Figura 18. Proceso para recuperar CPX, SMX, DCF e IBU.

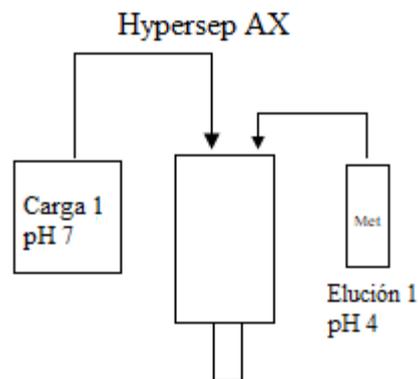


Figura 19. Proceso para recuperar PCM.



## 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

El método cromatográfico desarrollado alcanzó su objetivo al lograr identificar, separar y cuantificar de manera excelente los 5 fármacos analizados en este trabajo. Adicionalmente, la validación del método determinó:

- Los coeficientes de correlación para cada medicamento fueron mayores a 0.999.
- Los límites de detección y de cuantificación se calcularon de manera satisfactoria.
- Las precisiones inter e intradía calculadas para cada fármaco están dentro del rango establecido por diferentes autores para el análisis instrumental de aguas residuales.

Por otra parte, se pudo obtener un método eficiente de Extracción en Fase Sólida, método que permitió recuperar altos porcentajes de 4 de los 5 medicamentos analizados utilizando un solo cartucho.

- Los ensayos del diseño experimental utilizando los cartuchos Hypersep PEP, CX y AX permitieron desarrollar y optimizar un método continuo que facilita la extracción de la Ciprofloxacina, Sulfametoxazol, Diclofenaco Sódico e Ibuprofeno, porcentajes que son:  $111\% \pm 14$ ,  $86\% \pm 4$ ,  $88\% \pm 3$ ,  $80\% \pm 8$  respectivamente para cada medicamento.
- El paracetamol se recupera en un porcentaje de  $98\% \pm 2$  cuando se utiliza el cartucho Hypersep AX, con Met como solvente de elución.

### 5.2. Recomendaciones

Esta investigación puede ser ampliada, mediante el uso de nuevos cartuchos, especialmente los C-18, que tienen el alcance de retener y recuperar una amplia gama de compuestos, esta habilidad depende del acondicionamiento previo que se dé al cartucho. Por otro lado, las variaciones de pH son fundamentales en el estudio de recuperación de estos medicamentos; por lo que sería de gran beneficio realizar más pruebas con un rango de pH más amplio, un rango que comience en pH 2 y llegue hasta pH 12, los cartuchos utilizados y el nuevo cartucho recomendado resisten y tienen la capacidad de trabajar entre el rango de pH descrito anteriormente.



## REFERENCIAS

- Ahuja, S., & Dong, M. (2005). *Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC*. Elsevier.
- Almanza Oyola, F. A. (2012). *ESTUDIO FÍSICOQUÍMICO DE LA SOLUBILIDAD DE DICLOFENACO SÓDICO EN MEZCLAS ETANOL + AGUA* (Masters, Universidad Nacional de Colombia). Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/8823/>
- Barros, M. A. M. F. de, Antonino, A. C. D., Schuler, A. R. P., Lima, J. R. de S., Gondim, M. V. S., Lima, V. F. de, ... Lima, V. F. de. (2018). Sulfamethoxazole sorption in eutrophic Regolithic Neosol. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 22(7), 506-510. <https://doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v22n7p506-510>
- Berrueta, L. A., Gallo, B., & Vicente, F. (1995). A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments. *Chromatographia*, 40(7-8), 474-483. <https://doi.org/10.1007/BF02269916>
- Bhardwaj, S. K., Dwivedi, K., & Agarwal, D. D. (2015). *Review Article A Review: HPLC Method Development and Validation*. 6.
- Brogat, M., Cadiere, A., Sellier, A., Thomas, O., Baures, E., & Roig, B. (2013). MSPE/UV for field detection of micropollutants in water. *Microchemical Journal*, 108, 215-223. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.10.025>
- Bushra, R., & Aslam, N. (2010). An Overview of Clinical Pharmacology of Ibuprofen. *Oman Medical Journal*, 25(3), 155-1661. <https://doi.org/10.5001/omj.2010.49>
- Camel, V. (2003). Solid phase extraction of trace elements. *Elsevier*. Recuperado de <http://www.cnstn.rnrt.tn/raf7009/wp->



content/themes/Savarona/documents/Scientific%20Documents/Scientific%20Articles%20Hg/Solid-phase%20extraction%20review.pdf

Cardoso, L. V., Tomasini, D., Sampaio, M. R. F., Caldas, S. S., Kleemann, N., Primel, E. G., & Gonçalves, F. F. (2011). Optimization and validation of a method using SPE and LC-APCI-MS/MS for determination of pharmaceuticals in surface and public supply water. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(10), 1944-1952. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011001000016>

CORESTA. (2018). *Technical Guide for Pesticide Residues Analysis on Tobacco and Tobacco Products*. Recuperado de [https://www.coresta.org/sites/default/files/technical\\_documents/main/Guide-No05-Pesticide-Residue-Analysis\\_Oct18.pdf](https://www.coresta.org/sites/default/files/technical_documents/main/Guide-No05-Pesticide-Residue-Analysis_Oct18.pdf)

CromLab S.A. (2017). Extracción en Fase Sólida EFS-SPE. Recuperado 4 de noviembre de 2018, de [http://www.cromlab.es/EFSS\\_Principal.htm](http://www.cromlab.es/EFSS_Principal.htm)

Czyski, A. (2019). Determination of the Lipophilicity of Ibuprofen, Naproxen, Ketoprofen, and Flurbiprofen with Thin-Layer Chromatography [Research article]. <https://doi.org/10.1155/2019/3407091>

Dorival García, N. I. (2013). *Estudio del comportamiento y eliminación de antibióticos y disruptores endocrinos químicos en un biorreactor de membrana: Implicaciones ambientales*. Editorial de la Universidad de Granada, Granada.

DrugBank Canadá. (2018). Ciprofloxacina. Recuperado 12 de mayo de 2019, de <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00537>

Durgawati P., P. P. (2019). *HPLC Chromatography/ Animation/ High Performance Liquid Chromatography/ Instrumentation and Working*. Recuperado de <https://www.youtube.com/watch?v=Ia8yrBL2Xwc>



- Emily Anness, & Kathryn Conoby. (2013). *Removal of Sulfamethoxazole from Water by Ion-Exchange Adsorption* (Worcester Polytechnic Institute). Recuperado de [https://web.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-042913-094742/unrestricted/SMX\\_MQP.pdf](https://web.wpi.edu/Pubs/E-project/Available/E-project-042913-094742/unrestricted/SMX_MQP.pdf)
- Environmental Organic Chemistry. (2008). *Acetaminophen (Tylenol): A Pain to the Environment*. Recuperado de <https://web.viu.ca/krogh/chem331/Acetaminophen.pdf>
- Ettre, L. S. (2003). *M.S. Tswett and the Invention of Chromatography*. 7.
- Granberg, R. A., & Rasmuson, Å. C. (1999). Solubility of Paracetamol in Pure Solvents. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 44(6), 1391-1395. <https://doi.org/10.1021/je990124v>
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., & Ozkan, S. A. (2013). UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, 76(21-22), 1365-1427. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2477-8>
- Iovino, P., Canzano, S., Capasso, S., Erto, A., & Musmarra, D. (2015). A modeling analysis for the assessment of ibuprofen adsorption mechanism onto activated carbons. *Chemical Engineering Journal*, 277, 360-367. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2015.04.097>
- Javier Señoráns. (2014). *La preparación de la muestra*. Recuperado de [http://www.uam.es/personal\\_pdi/ciencias/alimento/TemaJS-AISA.pdf](http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/alimento/TemaJS-AISA.pdf)
- Jeffreys N. Johnson. (2014). *Investigating effects of the antibiotic ciprofloxacin on the dopaminergic SH-SY5Y cell line* (University of Massachuset). Recuperado de [https://scholarworks.umass.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1275&context=masters\\_theses\\_2](https://scholarworks.umass.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1275&context=masters_theses_2)



- Józwiak-Bebenista, M., & Nowak, J. Z. (2014). Paracetamol: Mechanism of action, applications and safety concern. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 71(1), 11-23.
- Kawamoto, S. (2010). *Acetaminophen versus Ibuprofen for the control of immediate and delayed pain following orthodontic separator placement*. University Missouri-Kansas.
- Kenneth A. Rubinson, & Judith F. Rubinson. (2001). *Análisis Instrumental*. Madrid: Pearson Education, S.A.
- Kłosińska-Szmurło, E., Pluciński, F. A., Grudzień, M., Betlejewska-Kielak, K., Biernacka, J., & Mazurek, A. P. (2014). Experimental and theoretical studies on the molecular properties of ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin in determining bioavailability. *Journal of Biological Physics*, 40(4), 335-345. <https://doi.org/10.1007/s10867-014-9354-z>
- Lian, F., Sun, B., Song, Z., Zhu, L., Qi, X., & Xing, B. (2014). Physicochemical properties of herb-residue biochar and its sorption to ionizable antibiotic sulfamethoxazole. *Chemical Engineering Journal*, 248, 128-134. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.03.021>
- Lindberg, R. (2006). *Determination of Antibiotics in the Swedish Environment with Emphasis on Sewage Treatment Plants* (Umea University). Recuperado de <https://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:144405/FULLTEXT01.pdf>
- Liška, I., Krupčík, J., & Leclercq, P. A. (1989). The use of solid sorbents for direct accumulation of organic compounds from water matrices-a review of solid-phase extraction techniques. *Journal of High Resolution Chromatography*, 12(9), 577-590. <https://doi.org/10.1002/jhrc.1240120903>
- Lombardi, C. (2015). *Solid Phase Extraction*. 3.



- Lorz, C., Makeschin, F., & Weiss, H. (2014). *Integrated Water Resource Management in Brazil*. IWA Publishing.
- Mazaleuskaya, L. L., Theken, K. N., Gong, L., Thorn, C. F., FitzGerald, G. A., Altman, R. B., & Klein, T. E. (2015). PharmGKB summary: Ibuprofen pathways. *Pharmacogenetics and genomics*, 25(2), 96-106.  
<https://doi.org/10.1097/FPC.0000000000000113>
- Moldoveanu, S. C., & David, V. (2014). *Modern Sample Preparation for Chromatography*. Elsevier.
- Morocho, S., Cuesta, S., & Meneses, L. (2017). *Caracterización de productos intermedios en la ruta sintética del Acetaminofén*.
- Olofsson, U. (2004). *Fate of Human Antibiotics During Sewage Water Treatment*. 37.
- Peng, X., Hu, F., Lam, F. L.-Y., Wang, Y., Liu, Z., & Dai, H. (2015). Adsorption behavior and mechanisms of ciprofloxacin from aqueous solution by ordered mesoporous carbon and bamboo-based carbon. *Journal of Colloid and Interface Science*, 460, 349-360. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2015.08.050>
- Petrović, M., Škrbić, B., Živančev, J., Ferrando-Climent, L., & Barcelo, D. (2014). Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia. *Science of The Total Environment*, 468-469, 415-428. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.079>
- Prescott, L. F. (1980). Kinetics and metabolism of paracetamol and phenacetin. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 10(S2), 291S-298S.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.1980.tb01812.x>
- PubChem. (s. f.). Ciprofloxacin. Recuperado 12 de mayo de 2019, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2764>



- Reynolds, S. (2013). *Analytical Quality Control*. 48.
- Sawchuk, R. J., Maloney, J. A., Cartier, L. L., Rackley, R. J., Chan, K. K. H., & Lau, H. S. L. (1995). Analysis of Diclofenac and Four of Its Metabolites in Human Urine by HPLC. *Pharmaceutical Research*, 12(5), 756-762.  
<https://doi.org/10.1023/A:1016276012891>
- Snyder, L. (1974). *Solvent Properties of Common Liquids*. Recuperado de <https://gimitec.com/file/oasis14.pdf>
- Sultana, N., Saeed, M., Mehboob, M., & Nadir, S. (2013). *Development of Liquid Chromatography–UV Method for Simultaneous Determination of Leflunomide and NSAIDs in API and Pharmaceutical Formulations: It's Application to In vitro Interaction Studies*. Recuperado de <https://pdfs.semanticscholar.org/e2d4/e3187e177fcb5f075f8b5ec3b7b59d02b0db.pdf>
- Supelco, S. A. (1998). *Guide to Solid Phase Extraction*. Recuperado de <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>
- Thammana, M. (2016). A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5(2), 7.
- The American Society of Health-System Pharmacists. (2018, febrero 19). Ciprofloxacin Monograph for Professionals. Recuperado 19 de febrero de 2018, de Drugs.com website: <https://www.drugs.com/monograph/ciprofloxacin.html>
- Tiwari, D., Lalhriatpuia, C., & Lee, S.-M. (2015). Hybrid materials in the removal of diclofenac sodium from aqueous solutions: Batch and column studies. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 30, 167-173.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.05.018>



Torniainen, K., Tammilehto, S., & Ulvi, V. (1996). The effect of pH, buffer type and drug concentration on the photodegradation of ciprofloxacin. *International Journal of Pharmaceutics*, 132(1-2), 53-61. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04332-2](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04332-2)

Waters Corporation. (2017). *Sample Preparation*.

Weil, H., & Willams, T. I. (1950). History of Chromatography. *Nature*, 166(4232), 1000-1001. <https://doi.org/10.1038/1661000b0>

Yu, J. T., Bouwer, E. J., & Coelhan, M. (2006). Occurrence and biodegradability studies of selected pharmaceuticals and personal care products in sewage effluent. *Agricultural Water Management*, 86(1-2), 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.agwat.2006.06.015>

ANEXOS

ANEXO 1. Curvas de calibración de cada medicamento y cromatogramas a diferentes concentraciones.

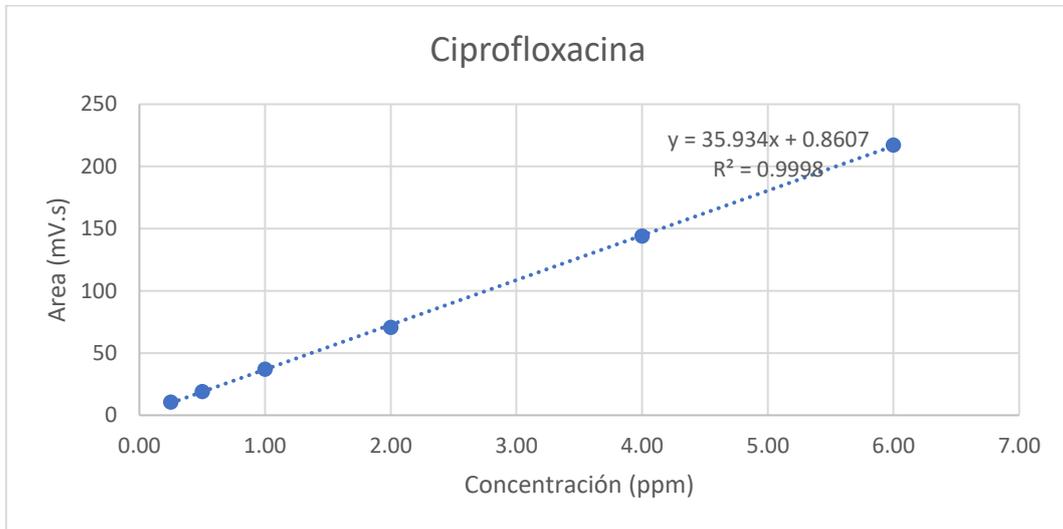


Figura 20. Curva de calibración para CPX.

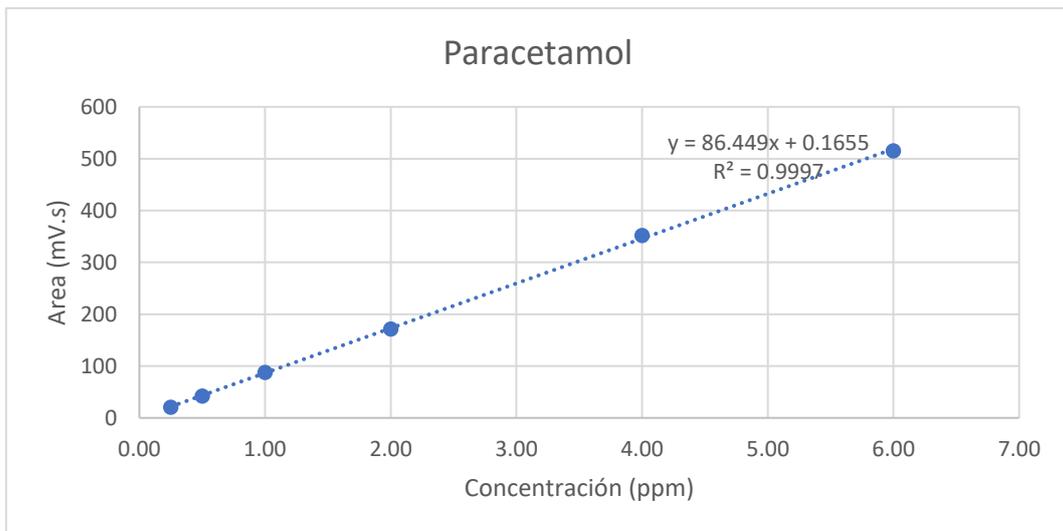
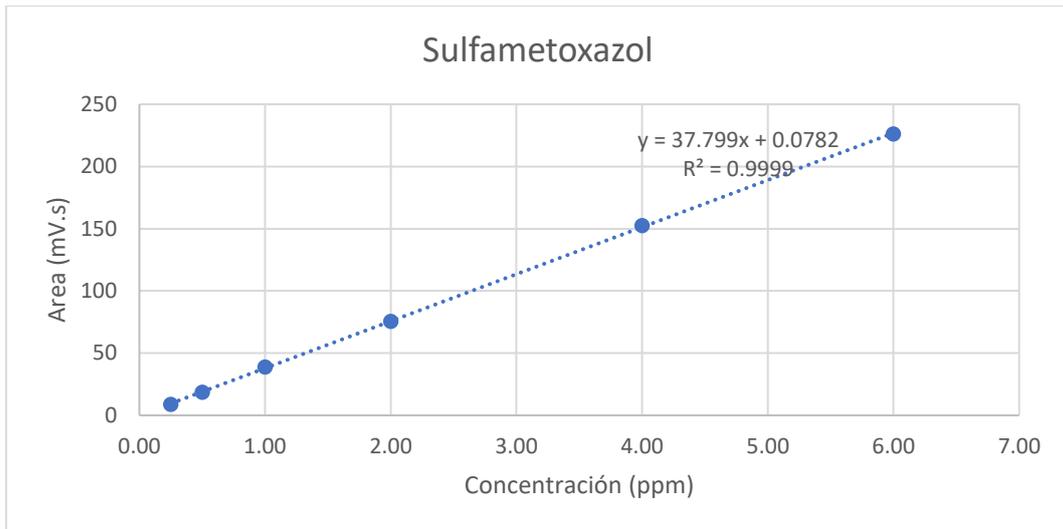
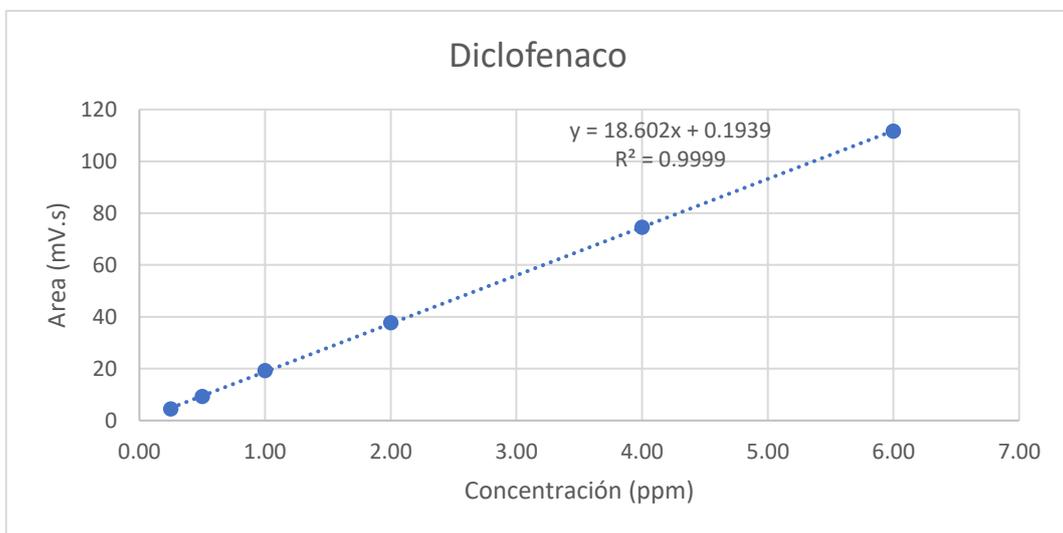


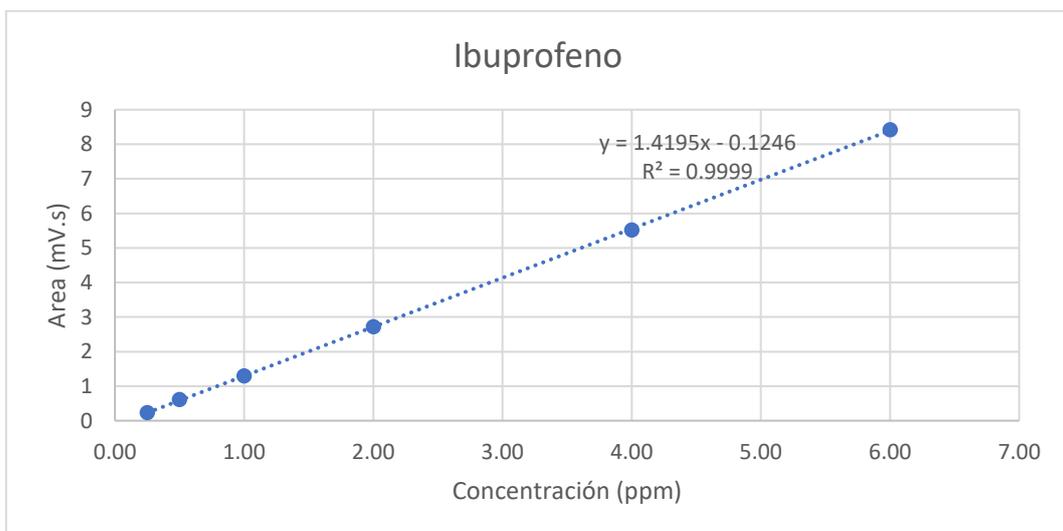
Figura 21. Curva de calibración para PCM.



**Figura 22.** Curva de calibración para SMX.



**Figura 23.** Curva de calibración para DCF.



**Figura 24.** Curva de calibración para IBU.

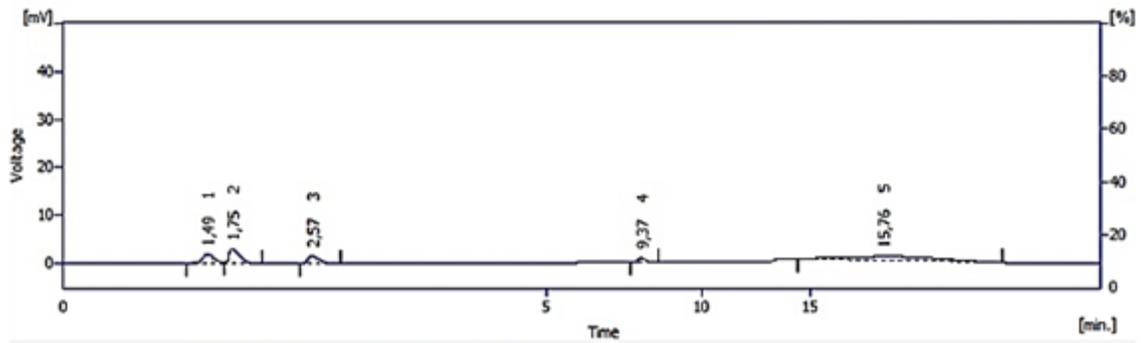


Figura 25. Cromatograma para la curva de calibración a 0.25ppm.

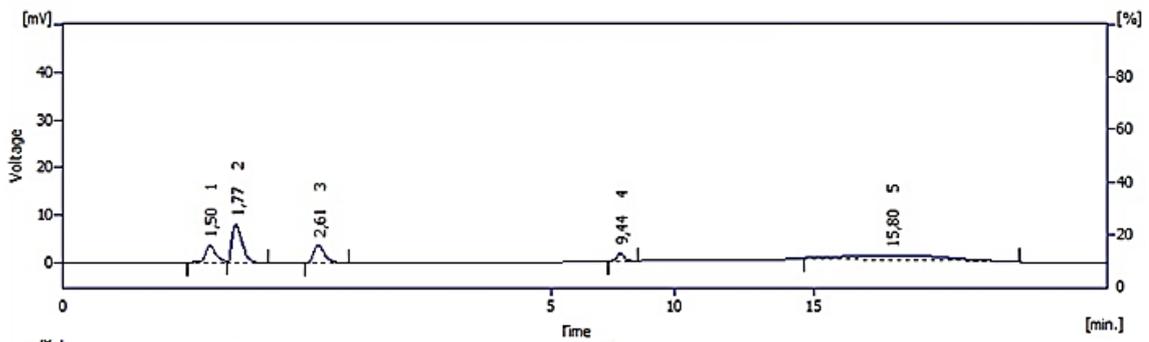


Figura 26. Cromatograma para la curva de calibración a 0.5ppm.

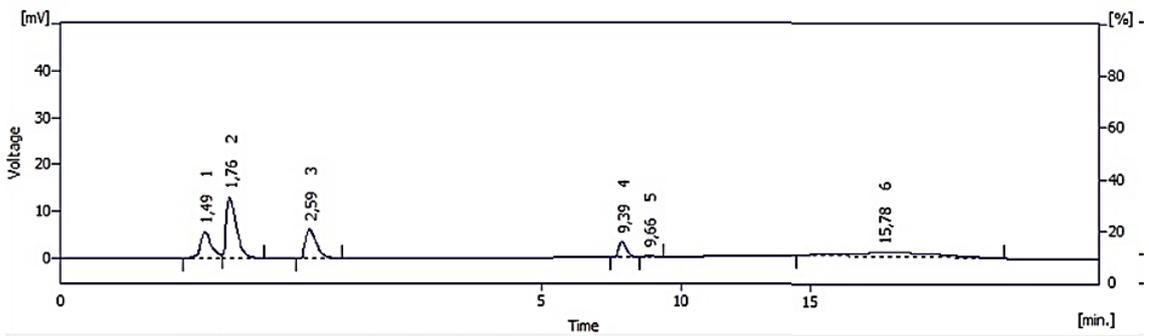


Figura 27. Cromatograma para la curva de calibración a 1ppm.

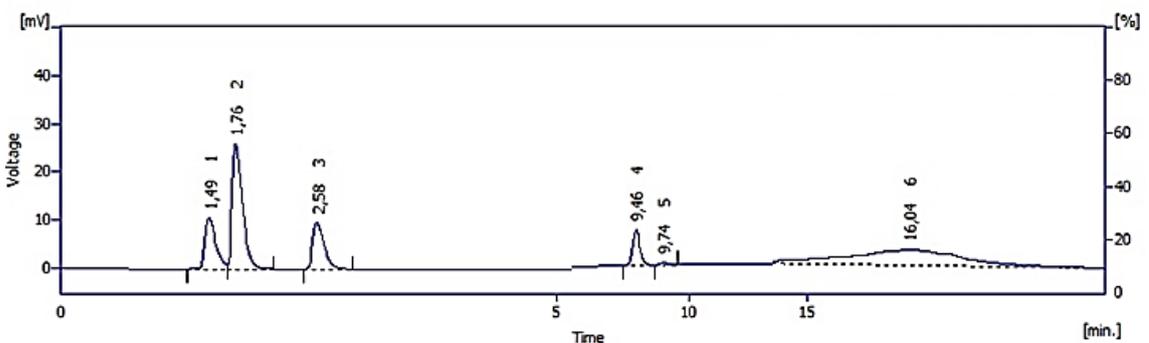


Figura 28. Cromatograma para la curva de calibración a 2ppm.

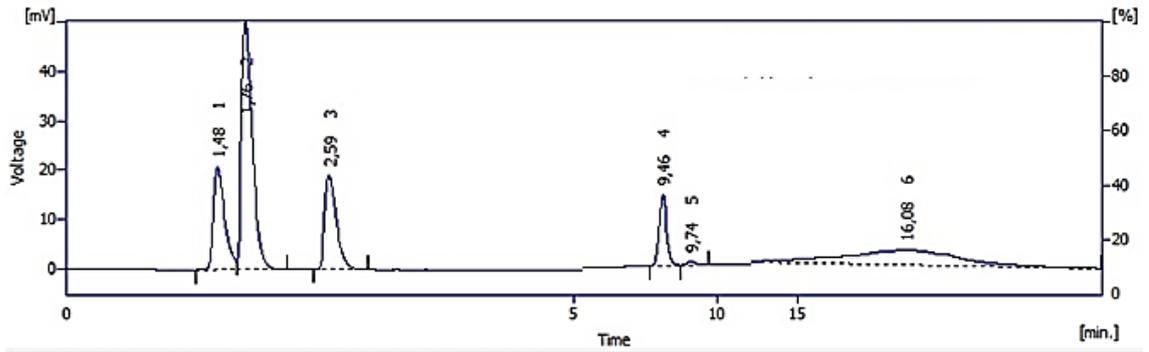


Figura 29. Cromatograma para la curva de calibración a 4ppm.

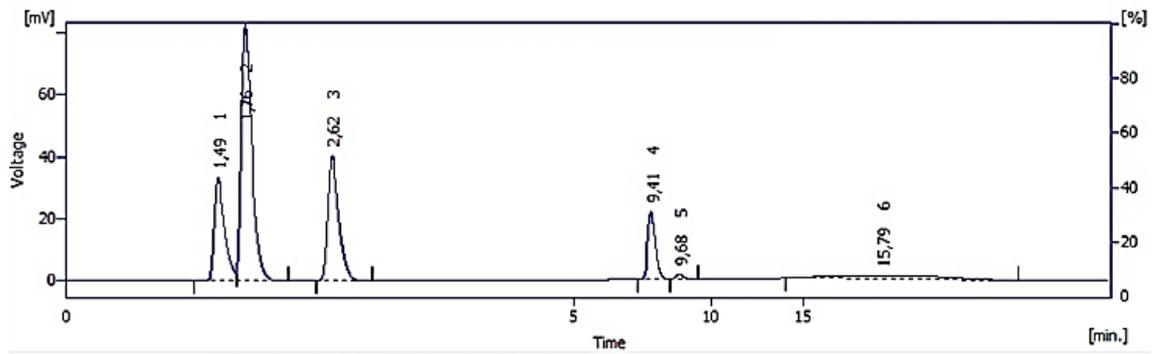


Figura 30. Cromatograma para la curva de calibración a 6ppm.



ANEXO 2. Diseños experimentales para cada cartucho.

Tabla 27. Diseño experimental para el cartucho Hypersep PEP.

Exp N°	x1	x2	x3	pH carga	pH elución	Solvente	Código	Código replica
1	-	-	-	4	4	ACN	PEP001	PEP101
2	+	-	-	10	4	ACN	PEP002	PEP102
3	0	-	-	7	4	ACN	PEP003	PEP103
4	-	+	-	4	10	ACN	PEP004	PEP104
5	+	+	-	10	10	ACN	PEP005	PEP105
6	0	+	-	7	10	ACN	PEP006	PEP106
7	-	0	-	4	7	ACN	PEP007	PEP107
8	+	0	-	10	7	ACN	PEP008	PEP108
9	0	0	-	7	7	ACN	PEP009	PEP109
10	-	-	+	4	4	Met	PEP010	PEP110
11	+	-	+	10	4	Met	PEP011	PEP111
12	0	-	+	7	4	Met	PEP012	PEP112
13	-	+	+	4	10	Met	PEP013	PEP113
14	+	+	+	10	10	Met	PEP014	PEP114
15	0	+	+	7	10	Met	PEP015	PEP115
16	-	0	+	4	7	Met	PEP016	PEP116
17	+	0	+	10	7	Met	PEP017	PEP117
18	0	0	+	7	7	Met	PEP018	PEP118

Tabla 28. Diseño experimental para el cartucho Hypersep CX.

Exp N°	x1	x2	x3	pH carga	pH elución	Solvente	Código	Código replica
1	-	-	-	4	4	ACN	CX001	CX101
2	+	-	-	10	4	ACN	CX002	CX102
3	0	-	-	7	4	ACN	CX003	CX103
4	-	+	-	4	10	ACN	CX004	CX104
5	+	+	-	10	10	ACN	CX005	CX105
6	0	+	-	7	10	ACN	CX006	CX106
7	-	0	-	4	7	ACN	CX007	CX107
8	+	0	-	10	7	ACN	CX008	CX108
9	0	0	-	7	7	ACN	CX009	CX109
10	-	-	+	4	4	Met	CX010	CX110
11	+	-	+	10	4	Met	CX011	CX111
12	0	-	+	7	4	Met	CX012	CX112
13	-	+	+	4	10	Met	CX013	CX113
14	+	+	+	10	10	Met	CX014	CX114
15	0	+	+	7	10	Met	CX015	CX115
16	-	0	+	4	7	Met	CX016	CX116
17	+	0	+	10	7	Met	CX017	CX117
18	0	0	+	7	7	Met	CX018	CX118



Tabla 29. Diseño experimental para el cartucho Hypersep AX.

Exp N°	x1	x2	x3	pH carga	pH elución	Solvente	Código	Código replica
1	-	-	-	4	4	ACN	AX001	AX101
2	+	-	-	10	4	ACN	AX002	AX102
3	0	-	-	7	4	ACN	AX003	AX103
4	-	+	-	4	10	ACN	AX004	AX104
5	+	+	-	10	10	ACN	AX005	AX105
6	0	+	-	7	10	ACN	AX006	AX106
7	-	0	-	4	7	ACN	AX007	AX107
8	+	0	-	10	7	ACN	AX008	AX108
9	0	0	-	7	7	ACN	AX009	AX109
10	-	-	+	4	4	Met	AX010	AX110
11	+	-	+	10	4	Met	AX011	AX111
12	0	-	+	7	4	Met	AX012	AX112
13	-	+	+	4	10	Met	AX013	AX113
14	+	+	+	10	10	Met	AX014	AX114
15	0	+	+	7	10	Met	AX015	AX115
16	-	0	+	4	7	Met	AX016	AX116
17	+	0	+	10	7	Met	AX017	AX117
18	0	0	+	7	7	Met	AX018	AX118

ANEXO 3. Fotografías de los equipos y diferentes ensayos realizados.



*Figura 31. Cromatografo YL 9300.*



*Figura 34. Cartucho Hypersep AX.*



*Figura 32. Columna Zorbax C-18*



*Figura 35. Cartucho Hypersep CX.*



*Figura 33. Cartucho Hypersep CX.*



*Figura 36. Sistema continuo para SPE.*



*Figura 37. Sistema continuo para SPE.*