

**TRABAJO FIN DE MÁSTER:
MÁSTER UNIVERSITARIO EN QUÍMICA
UNIVERSIDAD DE GRANADA**



Departamento de Química Analítica

**DESARROLLO DE UN MÉTODO MEKC PARA LA DETERMINACIÓN
DE 5-NITROIMIDAZOLES EN AGUAS DE RÍO**

Maykel Hernández Mesa

Granada, Septiembre 2011

1. OBJETO DE LA MEMORIA	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS	4
2.2. USO DE ANTIBIÓTICOS EN VETERINARIA	7
2.2.1. PROBLEMÁTICA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS VETERINARIOS	8
2.2.2. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS MEDIO AMBIENTALES	11
2.3. ANTIBIÓTICOS 5-NITROIMIDAZOLES	15
2.3.1. PROBLEMÁTICA DE LOS 5-NITROIMIDAZOLES	17
2.3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-NITROIMIDAZOLES	20
2.4. ELECTROFORESIS CAPILAR	24
3. REACTIVOS Y MATERIAL	31
4. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE	32
5. PROCEDIMIENTO ELECTROFORÉTICO DESARROLLADO	33
6. TRATAMIENTO DE MUESTRA	34
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
7.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA	35
7.1.1. ELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE ABSORCIÓN	35
7.1.2. OPTIMIZACIÓN DEL pH DE LA SEPARACIÓN	37
7.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA NATURALEZA Y DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN ELECTROFORÉTICO	42
7.1.4. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE	44
7.1.5. ADICIÓN DE MODIFICADORES ORGÁNICOS Y OTROS AGENTES	46
7.1.6. LONGITUD DEL CAPILAR	49
7.1.7. IDENTIFICACIÓN DE LOS 5-NITROIMIDAZOLES	50
7.1.8. MEDIO DE INYECCIÓN DE LA MUESTRA	51
7.1.9. OPTIMIZACIÓN DEL VOLTAJE DE SEPARACIÓN	56
7.1.10. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DEL CAPILAR	57
7.1.11. EMPLEO DE CAPILAR BURBUJA	58
7.1.12. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE INYECCIÓN	60
7.1.13. RESUMEN DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELECTROFORÉTICO	62
7.2. RECTAS DE CALIBRADO Y LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	63
7.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA	66
7.4. RECTAS DE CALIBRADO EN PRESENCIA DE MATRIZ Y LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN	69
7.5. EXACTITUD DEL MÉTODO: VERACIDAD Y PRECISIÓN	72
8. CONCLUSIONES	73
9. GLOSARIO	74
ANEXO I: COMENTARIO SOBRE LAS COMPETENCIAS ADQUIRIDAS	75

1. OBJETO DE LA MEMORIA

Los 5-nitroimidazoles (5-NDZs) son antimicrobianos con propiedades antibacterianas y antiprotozoarias. Debido a estas características se ha extendido su uso tanto como antibióticos humanos como veterinarios, mostrando eficacia contra la mayoría de bacterias anaerobias Gram negativas y algunas Gram positivas (*Bacteroides* grupo fragilis, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Veilonella spp.*, incluyendo *Clostridium difficile* y *C. perfringens*), así como contra protozoos tales como *Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Guardia lamblia* y *Balantidium coli*.

Existen informes que atribuyen propiedades genotóxicas, mutagénicas y carcinogénicas a los 5-NDZs. Además, se trata de compuestos de alta solubilidad en el agua y baja biodegradabilidad, lo que favorece su bioacumulación. Estos problemas, además de la aparición de resistencias bacterianas a los 5-NDZs, han llevado a la Unión Europea (UE) a prohibir la utilización de estas sustancias como antibióticos veterinarios.

Pese a esta prohibición, la Agencia de Seguridad Alimentaria Europea (EFSA) sigue registrando aletas sobre alimentos de origen animal que contienen trazas de 5-NDZs. Esto supone que actualmente se está incumpliendo el Reglamento (UE) N°37/2010, el cual establece que cualquier alimento de origen animal destinado al consumo humano debe estar exento de este tipo de antibióticos.

Como medida de control, y con objeto de garantizar el cumplimiento de la legislación vigente, se requieren de métodos analíticos que permitan la detección y cuantificación de los 5-NDZs, tanto en muestras de origen alimentario como medio ambiental. Por este motivo se ha desarrollado, dentro del Grupo de Investigación “*Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica (FQM-302)*”, un método analítico para la determinación de los mencionados antibióticos., el cual es descrito en la presente Memoria.

El método desarrollado emplea la Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar, una modalidad de Electroforesis Capilar que ha permitido la cuantificación del metronidazol (MNZ), metronidazol-OH (MNZ-OH), dimetridazol (DMZ), ipronidazol (IPZ), dimetridazol-OH (HMMNI), ipronidazol-OH (IPZ-OH), ronidazol (RNZ), ornidazol (ORZ) y ternidazol (TRZ). Dicho método se ha aplicado a la determinación de residuos de estos compuestos en muestras de agua del río Genil (Granada).

2. INTRODUCCIÓN

Desde el comienzo de la humanidad, en la lucha por la supervivencia, el hombre ha tenido que hacer frente a los ataques de otros seres vivos de muy diversos tamaños. Entre todos ellos, los microorganismos han sido los que más daño le han infligido, pues aún siendo inapreciables por el ojo humano, muchos de ellos resultan letales en sus acciones.

En sus orígenes, y ante la falta de los avances científicos y tecnológicos presentes en la sociedad actual, el hombre tuvo que asumir sus males, desconociendo completamente el origen de los mismos, y trató de combatirlos mediante remedios sintomáticos según su instinto.

Mientras el ser humano desarrollaba creencias, también permanecían los conocimientos heredados de sus antepasados. Los sacerdotes y chamanes de las primeras civilizaciones (Mesopotamia, Egipto, China, América Precolombina y Grecia Antigua) pasan del instinto al empirismo mágico-religioso para combatir las enfermedades ocasionadas por los microorganismos. Así, mientras recurrían a los dioses para intentar comprender lo inexplicable, empleaban distintas plantas y otros productos con propiedades antimicrobianas para luchar contra las enfermedades.

Aunque los griegos de la época clásica fueron los primeros en convertir en técnica el “arte de curar”, abordando la terapéutica antimicrobiana con criterios de racionalidad (Hipócrates, s. IV a.C.; Dioscórides, s. I d.C.; Galeno, s. II d.C.), la era antibiótica no comienza hasta el pasado siglo XX.

En 1929, fruto del azar, Alexander Fleming descubre el primer antibiótico, la penicilina, producido por el hongo *Penicillium notatum*. Pero fueron los trabajos posteriores de Ernst Chain y Howard Florey los que permitieron la extracción, purificación y producción industrial de la penicilina (1941). En 1945, tanto Fleming como Chain y Florey fueron galardonados con el Premio Nobel de Medicina.



Fig. 1. Fotografía de un cultivo de *Penicillium notatum*.



Fig. 2. A. Fleming, E. Chain y H. Florey, Premios Nobel de Medicina en 1945.

Los antibióticos, del griego *anti* (= contra) y *bios* (= vida), son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos (acción bacteriostática), u originan su destrucción (acción bactericida). En los últimos tiempos, el uso del término se ha ampliado para incluir compuestos sintéticos, como las sulfonamidas y las quinolonas, que presentan también actividad antibacteriana [1]. La acción antibacteriana de los antibióticos ocasiona un cambio en la capacidad de reproducirse y/o alimentarse de las células microbianas.

El gran éxito terapéutico en la lucha contra enfermedades de origen bacteriano trajo como consecuencia natural su empleo continuo, utilizándose, de forma progresiva, a partir de 1945. Desde entonces, se han preparado numerosas moléculas en búsqueda del antibiótico ideal, caracterizado por: ser efectivo para todas las infecciones, generar sólo el efecto buscado, no generar resistencias, actuar en cualquier parte del organismo, ser útil por vía oral y ser económicamente accesible.

2.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS

Dado que los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos, aunque los mismos dependen del tipo de clasificación realizada. En la práctica diaria, las clasificaciones que más se utilizan son las que se basan en la acción del antibiótico sobre la bacteria, las que los clasifican según su mecanismo de acción, las que tienen en cuenta la coloración de Gram de las bacterias y las que los agrupan según su estructura química [2].

[1] M.A. Sande, J.E. Kapusnik-Uner, G.L. Mandell (1993). Agentes microbianos. Consideraciones generales. En: Goodman A, Raw TW, Nies AS, Taylor P. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México DF: *Editorial Médica Panamericana*. 11 (44), págs. 991-1017.

[2] L. Cordiés Jackson, L.A. Machado Reyes, M.L. Hamilton Cordiés (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Medica*, 8 (1), págs. 13-27.

Se destaca, dada la utilidad que presenta, la clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción. La importancia de esta clasificación es especialmente relevante en el caso de la utilización de varios agentes simultáneamente. Dependiendo de la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos (Fig. 3), los antibióticos se clasifican en:

a) Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, y afectan la formación del polímero peptidoglicano que conforma la estructura de la pared bacteriana (penicilinas, cefalosporinas y otros antibióticos betalactámicos, y agentes varios, como vancomicina, bacitracina, cicloserina, inhibidores de betalactamasa y los antimicóticos imidazólicos, miconazol, ketoconazol y clotrimazol).

b) Agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomal como los que actúan sobre la subunidad 30s (aminoglucósidos, aminociclitolos y tetraciclinas) y sobre la subunidad 50s (macrólidos, lincosamidas y amfenicoles). Los antibióticos que actúan en el mismo nivel no deben asociarse, pues compiten por el sitio de unión y se antagonizan.

c) Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos (quinolonas, rifamicinas y antivirales).

d) Agentes antimetabolitos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico (sulfonamidas y trimetoprima).

e) Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo (polimixina B, colistina, colistimetato, detergentes y antimicóticos poliénicos, como nistatina y anfotericina B, que se unen a los esteroides de la pared celular).

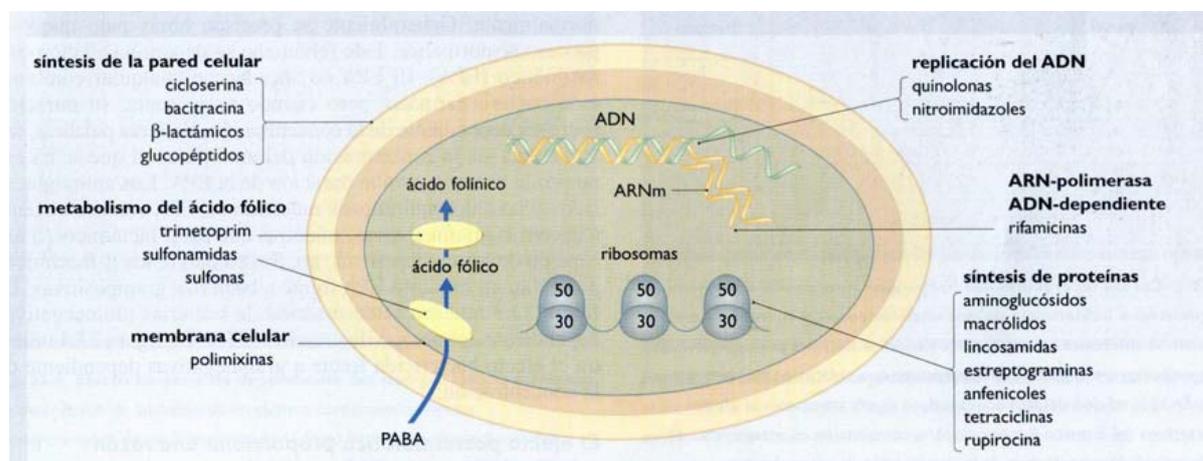


Fig. 3. Acción de los distintos antibióticos.

Desde el punto de vista del análisis químico de antibióticos, tiene especial importancia la clasificación de los mismos según su estructura química (Tabla 1). Esta clasificación se fundamenta en la similitud química de algunos antibióticos, según los núcleos base de sus estructuras, los cuales les confiere semejanzas en sus propiedades físico-químicas y farmacológicas.

PENICILINAS				
Penicilinas Naturales	Penicilina G Sódica Penicilina G Potásica Penicilina G Procaínica Penicilina G Clemizol Penicilina G Benzatínica Penicilina Potásica Fenoximetil Penicilina		Cefmetazol Cefminox Cefotetán	Sisomicina Isepamicina Tobramicina Kanamicina Espectinomina
Aminopenicilinas	Amoxicilina Ampicilina Hetacilina Bacampicilina Ciclacilina Epicilina Metampicilina Pivampicilina Tampicilina	Cefalosporinas de Tercera Generación	Cefmenoxima Cefazidima Cefodizina Ceftizoxima Cefoperazona Ceftriaxona Cefotaxima Moxalactam Cefsulodina Cefetamet Cefixima Cefpodoxima Cefibuteno	GLUCOPEPTIDOS Vancomicina Teicoplanina
Penicilinas Isoxazólicas	Cloxacilina Flucloxacilina Nafcilina Didoxacilina Meticilina Oxacilina	Cefalosporinas de Cuarta Generación	Cefepima Cefpiroma	OXAZOLIDINONAS Linezolid
Carboxipenicilinas	Carbenicilina Ticarcilina	CARBAPENEMICOS		RIFAMICINAS Rifampicina Rifabutina
Ureidopenicilinas	Apalcilina Azlocilina Furazlocilina Mezlocilina Piperacilina Sulbenicilina	MONOBACTAMICOS		HIDRACIDAS Isoniacida
INHIBIDORES DE BETALACTAMASAS		ANFENICOLES		POLIPÉPTIDOS Bacitracina Capreomicina Gramicidina Polimixina B y E
I. B. L.	Acido Clavulánico Sulbactam Tazobactam	TETRACICLINAS		QUINOLONAS
CEFALOSPORINAS		LINCOSAMINAS		Primera Generación
Cefalosporina de Primera Generación	Cefadroxilo Cefalexina Cefaloglicina Cefradina Cefapirina Cefazolina Cefaloridina Cefalotina	MACROLIDOS		Acido nalidíxico Acido oxolínico Acido pipemídico Cinoxacino Rosoxacino
Cefalosporinas de Segunda Generación	Cefuroxima Cefuroxima -Axetil Cefaclor Cefprozil Cefamandol Cefonicid Ceforonida Cefotiam Cefoxitina	14 átomos	Claritromicina Diritromicina Eritromicina Roxitromicina	Segunda Generación
		15 átomos (Azólidos)	Azitromicina	Ciprofloxacino Enoxacino Lomefloxacino Norfloxacino Ofloxacino Peфлоxacino Rufloxacino
		16 átomos	Diacetil-midecamicina Espiramicina Josamicina	Tercera Generación
		Cetólidos	Telitromicina	Gatifloxacino Esparfloxacino Grepfloxacino Pasufloxacino Terafloxacino
		ESTREPTOGRAMINAS		Cuarta Generación
		Quinupristina -Dalfopristina		Clinafloxacino Moxifloxacino Trovafloracino
		AMINOGLUCOSIDOS		SULFONAMIDAS
		Amikacina Neomicina Estreptomina Netilmicina Gentamicina		Sulfas de uso sistémico
				Sulfadiazina Sulfadoxima Sulfisoxazol Sulfametoxazol
				Sulfas de uso tópico
				Sulfacetamida Sulfadiazina argéntica
				NITROFURANOS
				Furazolidona Nifurtimox Nitrofurantoina Nitrofurazona
				NITROIMIDAZOLES
				Metronidazol Secnidazol Tinidazol Ornidazol

Tabla 1. Clasificación de antibióticos según su familia química.

2.2. USO DE ANTIBIÓTICOS EN VETERINARIA

Los antibióticos se empezaron a utilizar en medicina veterinaria poco después de su aplicación en medicina humana. Hoy en día la gran variedad de antibióticos existente permite el tratamiento de las enfermedades infecciosas que afectan tanto a los animales de compañía como a los destinados al consumo humano, contribuyendo así a mantener la salud de la población.

El empleo de antibióticos veterinarios tiene fines fundamentalmente terapéuticos y a veces profilácticos. Antiguamente, en los animales productores de alimentos también se utilizaron como promotores del crecimiento (APC), añadiéndolos al pienso en dosis subterapéuticas durante periodos de tiempo relativamente prolongados. Sin embargo, y tras un largo camino [3], actualmente el uso de antibióticos como APC no está permitido. En 2006 se prohibió en la UE la utilización de los últimos APC aún en uso (avilamicina, flavofosfolipol, salinomicina, monensina), consecuencia del Reglamento (CE) N° 1981/2003 en vigor años antes [4].

La producción animal a gran escala ha favorecido el desarrollo de productos que protegen la salud de los animales. Por razones económicas y medioambientales, muchas formas de producción animal suponen la concentración de un gran número de animales en un espacio reducido. En esta situación, las infecciones subclínicas pueden dañar seriamente la productividad de la explotación, ya que, en un momento dado, pueden alcanzar proporciones clínicas y afectar rápidamente a todos los animales de ese ambiente cerrado.

En este tipo de explotaciones, en las que tratar a cada individuo por separado es prácticamente imposible, tiene mucha importancia la adición de antibióticos y otros medicamentos al pienso para prevenir enfermedades o, en caso necesario, tratar a toda la población animal.

Dada la importancia del asunto, existe una amplia legislación que regula el uso de medicamentos veterinarios. El Real Decreto 109/1995 de 27 de enero [5] regula todo lo

[3] C. Torres, M. Zarazaga (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? *Gac Sanit*, 16 (2): 109-12.

[4] Reglamento (CE) N° 1831/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2003 sobre los aditivos en la alimentación animal.

[5] B.O.E. Real Decreto 109 sobre medicamentos veterinarios. Boletín Oficial del Estado N° 53 de 27 de enero de 1995.

relacionado con los medicamentos veterinarios, y el Real Decreto 157/1995 de 3 de febrero [6] establece las condiciones de preparación, puesta en el mercado y utilización de los piensos medicamentosos. Dicha normativa exige, además, que tales piensos, en lo que se refiere al componente medicamentoso, respeten las normas aplicables a los medicamentos veterinarios y que, en consecuencia, sólo se empleen premezclas medicamentosas autorizadas, así como que la entrega de piensos medicamentosos se efectúe mediante prescripción de un veterinario.

Tras la administración de antibióticos en veterinaria es necesario respetar un plazo de espera o periodo de supresión antes de utilizar la carne, leche, huevos o cualquier producto animal, para que el antibiótico haya sido eliminado totalmente y no queden residuos o que éstos se encuentren por debajo de un límite máximo de residuos fijado en cada caso y que se comentará posteriormente.

2.2.1. PROBLEMÁTICA DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS VETERINARIOS

La utilización de antibióticos en animales destinados al consumo humano proporciona innegables ventajas, ya que permite una mejora en la producción. Los beneficios alcanzan al consumidor, que encuentra disponibles con mayor facilidad proteínas de origen animal. Sin embargo, existe la posibilidad de que residuos de dichos compuestos (o sus metabolitos) persistan en el animal y, por tanto, pasen a la cadena de alimentación humana, comportando una serie de riesgos que implican problemas de índole sanitaria (toxicidad y aparición de resistencias), problemas tecnológicos y problemas analíticos, sin obviar los problemas medio ambientales asociados.

a) Problemas sanitarios:

El consumo de productos animales que contienen residuos de antibióticos puede producir los mismos efectos perjudiciales que si se administrara de forma directa una dosis equivalente. Los efectos tóxicos son, en general, poco probables, ya que los residuos estarán presentes en pequeñas cantidades, pero pueden producir reacciones alérgicas en individuos sensibles.

[6] B.O.E. Real Decreto 157 por el que se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicamentosos. Boletín Oficial del Estado Nº 64 de 3 de febrero de 1995.

El principal efecto peligroso es, desde el punto de vista sanitario, el desarrollo de resistencias bacterianas [7], que se pueden extender de unos microorganismos a otros pasando de los animales al hombre, ya que sus ecosistemas bacterianos no están separados. La ruta principal por la que pueden transmitirse las bacterias resistentes de los animales al hombre es el contacto directo con los animales que están siendo tratados o están consumiendo antibióticos con el alimento. Una vía de transmisión más general sería el consumo o manipulación de productos de origen animal, como la leche, los huevos y la carne, que contengan flora resistente a antibióticos. La carne es la que puede representar el mayor peligro debido a la contaminación por bacterias resistentes del contenido intestinal a la hora del sacrificio.

b) *Problemas tecnológicos:*

Los residuos de antibióticos dan lugar a fermentaciones anormales y fallos en los iniciadores de los productos cárnicos fermentados. La presencia de estos residuos en la leche puede inhibir el crecimiento de los microorganismos requeridos para la fabricación de queso o yogur.

c) *Problemas analíticos:*

Los residuos de antibióticos pueden inhibir el desarrollo de la flora microbiana que ha podido contaminar un alimento y, de esta forma, cuando se realiza el análisis bacteriológico pasa desapercibida la presencia de patógenos. De este modo podría permitirse comercializar un alimento potencialmente peligroso o de mala calidad bacteriológica, cuyos patógenos se desarrollarán una vez que en el curso de su manipulación el efecto inhibitor de los antibióticos se haya disipado.

Todos estos problemas han ocasionado que la normativa europea establezca los requisitos necesarios para garantizar la seguridad, eficacia y calidad de los medicamentos veterinarios en todo el proceso de su autorización, elaboración, comercio, almacenamiento, suministro y utilización, en relación con los animales de destino, así como de su seguridad, habida cuenta las repercusiones sobre la salud pública y el medio ambiente [5]. En el

[7] N.T. Crosby, Current trends in agricultural practice. En: Ellis Horwood (Ed.). Determination of Veterinary Residues in Food, London, 1991.

R.D. 109/1995 se exponen los requisitos de calidad, eficacia, seguridad y pureza que ha de cumplir un medicamento veterinario para poder ser registrado y autorizado.

Asimismo, debe tenerse en cuenta el Reglamento (UE) N°37/2010 [8] según el que se establece el Límite Máximo de Residuos (LMR) de los medicamentos veterinarios que pueden contener un alimento de origen animal destinados al consumo humano. Este Reglamento (UE) N°37/2010 simplifica al Reglamento (CEE) 2377/90 [9], estableciendo dos cuadros distintos, uno para las sustancias autorizadas, incluyendo aquellas para las que se establece un LMR, y uno para las sustancias prohibidas.

Todo ello pone de manifiesto la necesidad de disponer de métodos analíticos y técnicas de tratamiento de muestra para la detección de residuos de antibacterianos en alimentos, con la problemática que esto conlleva y que está relacionada con:

i) El gran número de compuestos que deben ser controlados, así como sus posibles metabolitos debido a que ciertos productos pueden oxidarse, reducirse o hidrolizarse en la primera etapa del metabolismo o incluso biotransformarse a conjugados solubles en etapas posteriores, como es el caso de los nitrofuranos, presentando los metabolitos cierta toxicidad.

ii) Los niveles extremadamente bajos a los cuales pueden presentarse estos residuos en los alimentos de interés (por debajo de los mg/Kg).

iii) La complejidad de la matriz objeto de análisis (carne, leche, huevos, etc., con alto contenido proteico, siendo posible la unión de estos antibacterianos con las proteínas, e incluso con ciertos cationes divalentes y trivalentes que forman complejos con éstos y que pueden aumentar su retención en diferentes tejidos).

La Decisión 2002/657/EC [10] relativa a la validación de los métodos analíticos de control de estos residuos en animales vivos y sus productos y la interpretación de los

[8] Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal.

[9] Reglamento 2377/90/CEE del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos.

[10] Commission Decision 2002/657/EEC, Off. J. Eur. Comm. L 221 (2002) 23.

resultados, en el marco de la Directiva 96/23/EC [11] no establecen obligación de usar métodos normalizados en el control de tales residuos en los alimentos. Sin embargo, se establecen distintos criterios de funcionamiento y requisitos que deben cumplir los métodos analíticos a aplicar en función del tipo de método.

2.2.2. RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN MUESTRAS MEDIO AMBIENTALES

Además de todo lo expuesto hasta ahora en cuanto al riesgo de la presencia de residuos de antibióticos en los alimentos y su control, existe otro problema adicional y es el de su presencia en el medio ambiente, ya que a pesar de que el efecto de los plaguicidas ha sido ampliamente estudiado en los últimos años, los fármacos se han incorporado constantemente en el medio ambiente (a través de la alimentación animal o de residuos orgánicos animales) sin el debido control [12,13]. En los últimos años se han publicado algunos artículos de revisión concernientes al efecto de los fármacos en el medio ambiente [14], lo que demuestra el creciente interés que este problema está suscitando en la comunidad científica.

En los últimos tiempos se han obtenido nuevos conocimientos sobre los efectos de xenobióticos de uso extendido, que actúan como disruptores endocrinos, lo que ha provocado inquietud en ámbitos relacionados con la salud pública ya que sustancias consideradas como seguras pueden causar efectos desconocidos incluso a concentraciones traza. Así, una gran variedad de productos farmacéuticos que incluye β -bloqueantes (como el propanolol), analgésicos (como el ibuprofeno), disruptores endocrinos (como el etinilestradiol) y antimicrobianos (como eritromicina, ciprofloxacina, sulfametazina y tetraciclina) se han detectado en plantas de tratamiento de aguas residuales [15- 20].

[11] Directiva 96/23/EC de Abril 1996 relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancia y sus residuos en animales vivos y sus productos y por la que se derogan las Directivas 85/358/EEC y 86/469/EEC y las Decisiones 89/18/EEC y 91/664/EEC, Off. J. Eur. Commun. L125 (1996) 10.

[12] F. M. Christensen (1998). Pharmaceuticals in the Environment-a Human Risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 28 (3) págs. 212-221.

[13] R.T. Williams (2005). Human Pharmaceuticals: Assessing the Impacts of Aquatic Ecosystems. Florida: *Editorial Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC)*.

[14] M.S. Díaz-Cruz, M.J. López de Alba, D. Barceló (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Anal. Chem.* 22, págs 340-351.

[15] S.D. Richardson (2002). Environmental mass spectrometry: Emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 74, págs 2719-2742.

[16] X.S. Miao, C.D. Metcalfe (2003). Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 998, págs. 133-141.

[17] W. Ahner, E. Scherwenk, W. Buchberger (2001). Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 910 págs. 69-78.

Además, estos contaminantes emergentes presentan las propiedades necesarias para su bioacumulación, provocando efectos desconocidos en los ecosistemas acuáticos o terrestres. De esta forma, los medicamentos se han convertido en un problema medio ambiental de envergadura. Si hasta hace unos años lo que preocupaba prioritariamente eran los vertidos de carácter industrial, ahora el interés se centra en el impacto de los vertidos que reciben los ríos desde los núcleos de población.

La exposición a fármacos del medio ambiente es función de la combinación de varios factores: cantidad manufacturada, desecho del producto sin usar o una vez caducado, dosis (cantidad, frecuencia y duración), eficacia de la excreción del compuesto inalterado y de sus metabolitos bioactivos, adsorción/desorción en los suelos y descomposición metabólica una vez sedimentado.

Así, los antibióticos empleados acaban vertiéndose al medio ambiente, sin que se tenga gran conocimiento de las consecuencias de esta exposición. Por ejemplo, las sustancias empleadas en ganadería, se excretan en la orina o heces directamente al campo, pudiendo presentar concentraciones locales altas. Asimismo, los antibióticos empleados en piscifactorías se vierten directamente al agua, acumulándose y afectando a los microorganismos acuáticos.

El destino de los fármacos en el medio ambiente puede dividirse en tres rutas principales [21,22]:

- a) El producto se mineraliza a dióxido de carbono y agua.
- b) El producto es lipofílico y parte de él no se degrada, quedando en los sedimentos.
- c) El producto se metaboliza a una forma más hidrofílica, pero aún persistente, terminando en las aguas residuales o en un río, pudiendo afectar a organismos acuáticos, si

[18] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.L. Kratz (1999). Occurrence of antibiotics in the aquatic environment *Sci. Total Environ.* 225, págs. 109-118.

[19] A. Göbel, C.S. McArdell, M.J.F. Suter, W. Giger (2004). Trace determination of macrolide and sulphonamide antimicrobials, a human sulphonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76, págs. 4756-4764.

[20] X.S. Miao, F. Bishay, M. Chen, C.D. Metcalfe (2004). Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. *Environ. Sci. Technol.* 38, págs. 3533-3541.

[21] S.E. Jørgensen, B. Halling-Sørensen (2000). Drugs in the environment. *Chemosphere.* 40 págs. 691-699.

[22] B. Halling-Sørensen, S. Nors Nielsen, P.F. Lanzky, F. Ingerslev, H.C. Holten Lützhøfl, S.E. Jørgensen (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere.* 36 (2), págs. 357-393.

los metabolitos son biológicamente activos. Pueden permanecer en sedimentos o campos de cultivo, terminar formando parte del estiércol y afectar a microorganismos o cultivos.

Las directivas propuestas prescriben que el control del riesgo ambiental debe ser parte del procedimiento para aprobar un nuevo fármaco. La *Food and Drug Administration* (FDA) ha emitido el *Environmental Assessment Technical Handbook* para sus requerimientos medio ambientales. En 1995 emitió una guía para la industria destinada a la valoración medio ambiental de fármacos y suplementos de consumo humano, así como documentos para el control del impacto ambiental de algunos fármacos en concreto. Sin embargo, estas normativas parecen no tener una gran difusión, ya que en los últimos años, sólo unos pocos de los nuevos fármacos incluyen un estudio ecotoxicológico apropiado. En Europa la legislación en este campo se inició al comienzo de los años 90, y distingue entre sustancias médicas que no contienen (o no consisten en) organismos modificados genéticamente y aquellas que los contienen.

Así, las nuevas normativas de la UE incluyen el medio ambiente en sus decisiones. Esto implica que cualquier ley (en transporte, agricultura, pesca, medicina e industria farmacéutica) tendrá en cuenta el posible impacto medio ambiental. En enero de 1998, la UE emitió una guía técnica para controlar el riesgo de la exposición medio ambiental a fármacos empleados en veterinaria (EM/CAMP/055/96-final). Asimismo, la Directiva Técnica 81/852/EEC (enmienda desde el 1 de abril de 1993) concerniente a productos médicos veterinarios, incluye secciones con los requerimientos básicos para hacer un estudio del riesgo de ecotoxicidad medio ambiental, mientras que la guía EMEA/cvmp/055/96-Final de 1997 proporciona las directrices técnicas para la evaluación del riesgo de sustancias médicas veterinarias.

Sin embargo, las directivas técnicas para productos médicos de consumo humano (directiva UE 75/318/EEC) no incluyen ninguna referencia a la ecotoxicidad o ecotoxicología y aparentemente no hay planes de incluirlas próximamente. En este aspecto difiere de su homólogo veterinario (directiva UE 81/852/EEC), descrito anteriormente. Así, excepto para los productos que contienen organismos modificados genéticamente, la legislación no especifica cómo realizar una evaluación del riesgo medio ambiental de los productos farmacéuticos.

El borrador de la Guía III/5504/94 propuesta en 1994, indica que las recomendaciones dadas para productos veterinarios son también aplicables a fármacos de consumo humano. En Europa, Alemania es el país que más ha trabajado en este campo y Dinamarca destaca por el número de depuradoras que ya tiene operativas con medios suficientes como para eliminar los restos de medicamentos antes de que lleguen a los ríos. En los demás países, las investigaciones aún son escasas y en España se conoce muy poco del grado de contaminación real que ejercen estas sustancias. Avanzar en el conocimiento del problema es uno de los principales objetivos del programa europeo «Aquaterra», que se desarrollará durante cinco años en cinco grandes ríos del continente: Ebro, Meuse, Brevilles, Elba y Danubio. Participan 45 instituciones de trece países de la UE, más Suiza y Serbia. Un grupo de expertos, coordinado por el Dr. Damiá Barceló [23-25], del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del CSIC, lleva ya varios años evaluando la calidad de las aguas del Ebro y profundizando en el impacto que están teniendo los medicamentos y de evaluar en general la contaminación industrial, agrícola y urbana. Aunque el efecto contaminante de los medicamentos no es un hecho nuevo, el avance en las técnicas analíticas ha permitido detectarlos y tomar conciencia del problema que causan en los ecosistemas, siendo necesario potenciar los estudios que determinen el alcance del riesgo, para tomar las medidas necesarias. De momento no se conoce ninguna legislación sobre el tema, siendo necesario impulsar los estudios que proporcionen métodos suficientemente fiables, sensibles y selectivos para su determinación con objeto de esclarecer si es necesario regular la cantidad máxima de cada fármaco que puede salir de una depuradora.

Por todo lo expuesto hasta ahora, el consumo de fármacos (tanto humano como en veterinaria) obliga al control de sus residuos tanto en alimentos como en el medio ambiente, garantizando que no supongan un riesgo para la salud pública. La correcta evaluación del impacto que supone el uso de estos productos y el diseño de medidas conducentes a eliminar o paliar sus efectos, sólo se puede llevar a cabo si se dispone de técnicas analíticas suficientemente sensibles y selectivas que originan datos analíticos fiables.

[23] D. Barcelo, R. Brix, M. Farre (2006). Monitoring and managing river pollutants. *Trends Anal. Chem.* 25, págs. 743-747.

[24] J. Barth, P. Grathwohl (2006). Das integrierte EU-Projekt AquaTerra erreicht sein zweites Projektjahr. *Grundwasser* 11(2), págs. 131-132.

[25] N. Ratola, S. Lacorte, A. Alves, D. Barcelo (2006). Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles by gas chromatography-mass spectrometry. Comparison of different extraction and clean-up procedures. *J. Chromatogr. A.* 1114, págs. 198-204.

2.3. ANTIBIÓTICOS 5-NITROIMIDAZOLES

Los NDZs son antibacterianos sintéticos con actividad inicialmente antiparasitaria (protozoarios) que se obtuvieron de la azomicina (2-nitro-imidazol), de los que a partir de su uso clínico en 1959, se descubrieron propiedades bactericidas ligadas a microorganismos anaerobios.

Los NDZs son compuestos heterocíclicos sintéticos relacionados con los nitrofuranos, y se obtienen a partir de la nitrificación del anillo imidazólico. Existen dos grupos de nitroimidazoles, los 5-nitro y los 2-nitroimidazoles. Solamente los 5-nitro derivados son útiles como antibacterianos y antiparasitarios [26], mientras que ambos grupos potencian el efecto de las radiaciones sobre tumores de centro necrótico (anóxicos).

Por tanto, los 5-NDZs constituyen una familia de antibióticos de amplio espectro cuya eficacia se ha demostrado contra la mayoría de bacterias anaerobias Gram negativas y algunas Gram positivas (*Bacteroides* grupo fragilis, *Fusobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Veilonella spp.*, incluyendo *Clostridium difficile* y *C. perfringens*), además de haberse empleado con éxito en el tratamiento de enfermedades ocasionadas por protozoarios anaerobios (*Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Guardia lamblia*, *Balantidium coli*). La actividad de los 5-NDZ es limitada contra las bacterias aerobias, aunque son muy activos contra bacterias como *Gardnerella vaginalis* y *Helicobacter pylori* [27].

Los 5-NDZs se han empleado tanto como antibióticos humanos como veterinarios. Así, el MNZ, el tinidazol (TNZ) y el ORZ son los más conocidos, aunque existen otros menos empleados como el nimorazol, carnidazol (CRZ) o el secnidazol (SNZ). Algunos 5-NDZs son exclusivamente de uso veterinario tales como el DMZ, IPZ y RNZ. Actualmente en España se comercializan sólo el MNZ, TNZ y el ORZ como antibióticos humanos. En EE.UU. el MNZ es uno de los cien fármacos más recetados, siendo considerado como uno de los medicamentos esenciales según la OMS [28]. En la Fig. 4 se muestran las estructuras de los 5-NDZs abordados en el presente trabajo.

[26] D.I. Edwards (1993). Nitroimidazole Drugs-Action and Resistance Mechanisms I. Mechanisms of Action. *J. Antimicrob. Chemother.* 31, págs. 9-30.

[27] E. Pérez-Trallero, L. Iglesias (2003). Tetraciclinas, sulfamidas y MNZ. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 21 (9) págs., 520-528.

[28] World Health Organization (Marzo 2011). *WHO Model List of Essential Medicines, 17th List.*

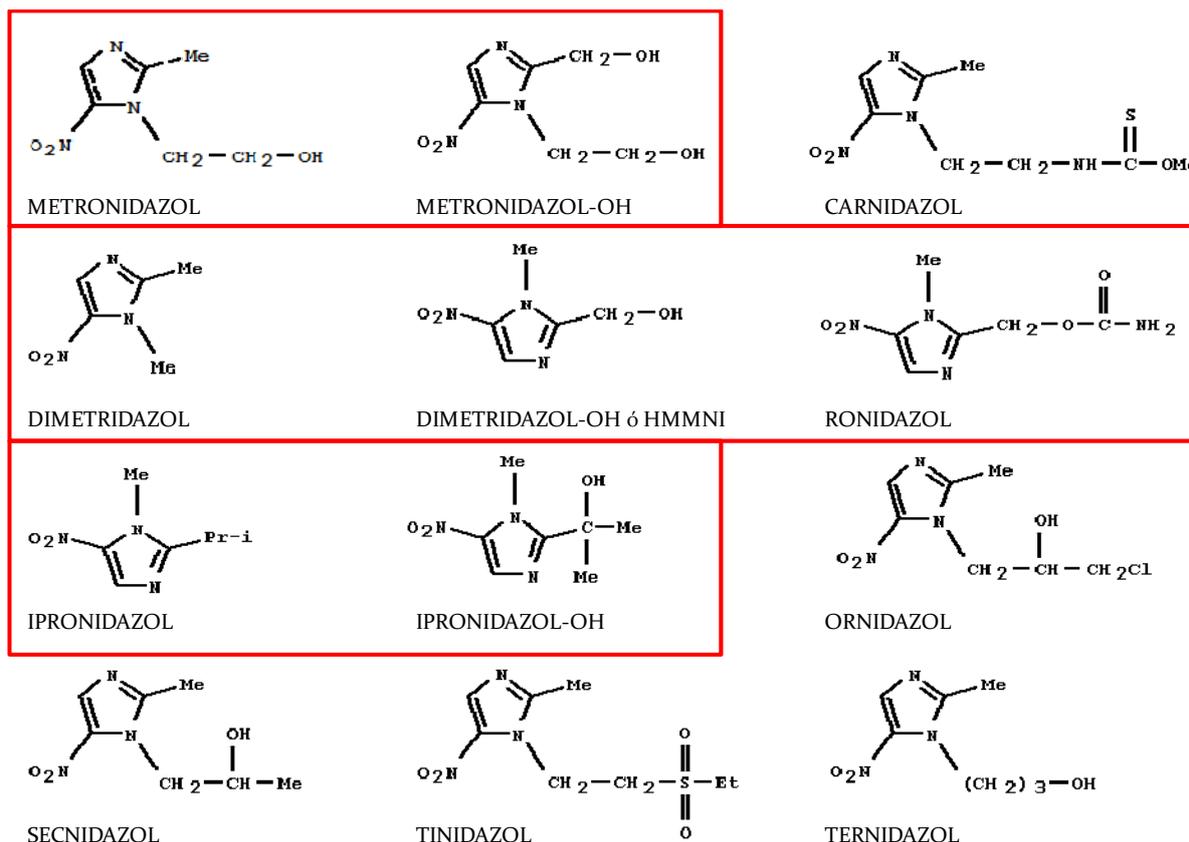


Fig. 4. Estructura de los 5-nitroimidazoles estudiados. El MNZ-OH es metabolito del MNZ, así como el HMMNI lo es del RNZ y el DMZ, y el IPZ-OH del IPZ.

Además de su aplicabilidad como antibióticos, los 5-NDZs han mostrado tener otros efectos, tales como la promoción del crecimiento y el aumento de la eficiencia alimentaria [29]. Sin embargo, desde el periodo 2001-2004 se retiraron los 5-NDZs de la lista de antibióticos permitidos como APC [30].

Los NDZs ejercen su acción antibacteriana y antiprotozoaria por desestructuración del ADN [31]. El mecanismo de acción de estos compuestos se realiza en cuatro fases [32]:

[29] D.S. Lindsay, B.I. Blagburn (2001). Antiprotozoan drugs. En: H.R. Adams. Veterinary Pharmacology and Therapeutics. Iowa: Editorial Blackwell Publishing, págs. 992-1016.

[30] R. Cepero Briz (2006). Retirada de los antibióticos promotores de crecimiento en la Unión Europea: Causas y Consecuencias. Dpto. de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

[31] D. I. Edwards (1980). Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *Br. J. Vener. Dis*, 56, págs. 285-374.

[32] F. Vázquez, M^a J. García, F. Pérez, V. Palacio (Marzo 2001). *Trichomonas vaginalis*: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*, 9 (3), págs. 114-124.

i. Penetración del fármaco por difusión pasiva a través de la pared celular del protozoo y se incrementa por el nivel de reducción intracelular.

ii. Reducción del grupo nitro a un intermediario transitorio tóxico. La reducción es llevada a cabo por proteínas del metabolismo anaerobio (proteínas de transporte de electrones de bajo potencial redox, como la ferredoxina). Estas proteínas son exclusivas de algunos parásitos y de bacterias anaerobias y algunas microaerófilas.

iii. Acción sobre el ADN de parásito. Inhiben la síntesis y degradan el ADN, siendo mayor cuanto más contenido de adenina + timina tiene el ADN, por eso las roturas se producen entre estos residuos, sobre todo en la timina, y liberan una mezcla de timina y timina fosfato.

iv. Liberación de productos finales inactivos.

2.3.1. PROBLEMÁTICA DE LOS 5-NITROIMIDAZOLES

El empleo de 5-NDZs como antibióticos veterinarios conlleva los mismos inconvenientes asociados al empleo de cualquier otro antibiótico, los cuales ya se comentaron en apartados anteriores, además de otros específicos de este tipo de compuestos.

Uno de los principales problemas asociados al uso de 5-NDZs como antibióticos veterinarios es la aparición de bacterias resistentes [33]. Este hecho es de especial interés si se tiene en cuenta que, por ejemplo, el MNZ está indicado para el tratamiento de numerosas enfermedades, ocasionadas por microorganismos, tales como: infecciones articulares, óseas, cutáneas y pleuropulmonares, así como en abscesos cerebrales y en el caso de sobrecrecimiento bacteriano intestinal, vaginosis bacteriana, etc. La presencia de cantidades traza de los 5-NDZs en alimentos de origen animal puede favorecer la creación de resistencias bacterianas que limiten su capacidad como antimicrobianos en humanos.

En general los 5-NDZs presentan propiedades genotóxicas, carcinogénicas y mutágenicas [34-36], cuyas características también presentan sus metabolitos en algunas

[33] H.K. S. Leiros, S. Kozielski-Stuhrmann, U. Kapp, L. Terradot, G. A. Leonard, S. M. McSweeney (2004). Structural Basis of 5-Nitroimidazole Antibiotic Resistance. *J. Biolog. Chem.* 279 (53), págs. 55840-55849.

[34] L. Dobias, M. Cerna, P. Rossner, R. Sram (1994). Genotoxicity and Carcinogenicity of metronidazole. *Mutation Research – Reviews in Genetic Toxicology.* 317 (3) págs. 177-194.

[35] G. Elizondo, M.E. Gonsebatt, A.M. Salazar, I. Lares, P. Santiago, J. Herrera, E. Hong, P. Ostrosky-Wegman (1996). Genotoxic Effects of MNZe. *Mutation Research – Genetic Toxicology.* 370, págs. 75-80.

especies animales, puesto que conservan el anillo imidazólico original. Esto implica que no sólo deban considerarse los efectos perjudiciales que supone el uso de los NDZs como antibióticos veterinarios, sino también los producidos por sus metabolitos, en caso de hallarse en alimentos de origen animal destinados al consumo humano.

Asimismo, la utilización de 5-NDZs en piscifactorías, y su presencia en los efluentes procedentes de industrias cárnicas y de aguas residuales de hospitales [37], puede ocasionar un problema medio ambiental importante. Estos compuestos, de naturaleza polar, poseen una solubilidad en el agua elevada, así como una biodegradabilidad baja, lo cual favorece su bioacumulación y los convierten en sustancias peligrosas.

La bioacumulación de NDZs debe tenerse muy en cuenta, pues actualmente las plantas de tratamiento de aguas residuales no disponen de la tecnología necesaria para la eliminación de los antibióticos presentes en las aguas que tratan. A esto debe sumarse el desconocimiento existente sobre sistemas efectivos que permitan la eliminación de los 5-NDZs del agua [38,39].

Debido a las consecuencias que tiene el empleo de 5-NDZs en animales destinados al consumo humano, y considerando los informes que advierten sobre los efectos perjudiciales que originan los mismos sobre la salud humana, la UE tomó la decisión de prohibir su uso como antibióticos veterinarios. Así, se prohibió el uso del RNZ en 1993, del DMZ en 1995 y del MNZ en 1998.

Los NDZs están prohibidos como antibióticos veterinarios en animales productores de alimentos ya que no se pudo fijar la ingesta máxima admisible, y en consecuencia su LMR. Por lo tanto, cualquier alimento de origen animal destinado al consumo humano debe estar exento de cualquier tipo de residuo de 5-NDZs, tal como se recoge en el Reglamento (UE) N°37/2010 [8]. Así mismo el uso de 5-NDZs, como antibióticos veterinarios en animales

[36] IARC: International Agency for Research on Cancer (1987). *Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans*, pág. 251.

[37] A.B. Boxall, L.A. Fogg, P.A. Blackweell, P. Kay, E.J. Pemberton, A. Croxford (2004). Veterinary Medicines in the Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 180, págs. 1-91.

[38] J. Rivera-Utrilla, M. Sánchez-Polo, G. Prados-Joya, M.A. Ferro-García, I. Bautista-Toledo (2010). Removal of tinidazole from waters by using ozone and activated carbón in dynamic regime. *J. Hazardous Mat.*, 174, págs. 880-886.

[39] J. Rivera-Utrilla, G. Prados-Joya, M. Sánchez-Polo, M.A. Ferro-García, I. Bautista-Toledo (2009). Removal of nitroimidazole antibiotics from aqueous solution by adsorption/bioadsorption on activated carbón. *J. Hazardous Mat.*, 170, págs. 298-305.

productores de alimentos destinados al hombre, tampoco está permitido en EE.UU. [40] y China [41].

Pese a la legislación que prohíbe el uso de 5-NDZs como antibióticos veterinarios, existen evidencias de trazas residuales de estos compuestos en alimentos de origen animal producidos e importados en la UE. Las alertas alimentarias, relativas a la presencia de 5-NDZs en alimentos de origen animal con destino la UE, son registrados por la EFSA. A continuación se recogen algunas de las alertas más significativas [42]:

- 8/12/2005 – MNZ (6.3 ng/L) en trucha ahumada procedente de Dinamarca. Alerta registrada en Dinamarca.

- 07/06/2006 – RNZ (30.7 ng/L) en carne congelada de pavo procedente de los Países Bajos. Alerta registrada en Alemania.

- 30/06/2008 – MNZ (0.3 ng/L) en pollos congelados sin vísceras procedentes de Argentina, vía Bélgica. Alerta registrada en Países Bajos.

- 18/06/2010 - MNZ (3 ng/L) en carne de ternera envasada al vacío procedente de EE.UU. Alerta registrada en Bélgica

- 10/06/2011 – MNZ (0.2 ng/L) en miel procedente de China. Alerta registrada en Bélgica. *Información pendiente de estudio.*

Respecto a la presencia de NDZs en muestras medio ambientales, recientemente se ha notificado concentraciones de 5-NDZs en agua a concentraciones de 0.1-90.2 µg/L [43].

El uso ilegal de los 5-NDZs requiere de métodos analíticos lo suficientemente robustos y fiables para la detección de trazas de estos compuestos tanto en muestras alimentarias de origen animal, como en muestras medio ambientales.

[40] USA Food and Drug Administration (2010). FDA's prohibited drug list. *Food Animal Residue Avoidance and Depletion Program (FARAD)*.

[41] Preparado por: M. Meador, W. Bugang (2002) Traducción: List of Veterinary Drugs Banned for Use for Food Animals. *República Popular de China*.

[42] RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed (2011). Este sistema de alertas alimentarias está regulado por el Reglamento (EC) N°178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de Enero de 2002.

[43] R. Lindberg, P. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind (2004). Determination of antibiotics substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, 57, págs. 1479-1488.

En ausencia de límites mínimos establecidos como punto de referencia para el empleo de un método analítico en la detección de 5-NDZs, los Laboratorios de Referencia Comunitarios de la Unión Europea (CRLs) recomiendan que cualquier método analítico, destinado a la determinación de 5-NDZs, debe permitir detectar hasta 3 µg/L de trazas de estos compuestos en cualquier matriz. Esta concentración recomendada, que no sigue ninguna directriz legal, no está definida ni para el IPZ ni para el IPZ-OH [44].

2.3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS PROPUESTOS PARA LA DETERMINACIÓN DE 5-NITROIMIDAZOLES

En bibliografía se recogen numerosos artículos que describen distintos métodos analíticos para la determinación de 5-NDZs en muestras biológicas y alimentarias. Entre las técnicas analíticas más empleadas destaca la Cromatografía Gaseosa (CG) [45], principalmente acoplada a espectrometría de masas (MS) [46,47], y la Cromatografía Líquida (LC), tanto acoplada a un detector Ultravioleta (UV) [48,49] como, de forma general, acoplada a un sistema de MS [50- 63]. Tal como se puede concluir a partir de la

[44] CRL Guidance Paper – CRLs view on state of the art analytical methods for the national residue plans for control of residues, available from the EU CRLs for veterinary drug residue analysis, 2007.

[45] J.H. Wang (2001). Determination of three nitroimidazole residues in poultry meat by gas chromatography with nitrogenphosphorus detection. *J. Chromatogr. A*, 918 (2), págs. 435-438.

[46] J. Polzer, P. Gowik (2001). Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and corresponding hydroxyl metabolites in turkey and swine muscle by means of gas chromatography-negative ion chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 761 (1), págs. 47-60.

[47] C. Ho, D. W. M. Sin, K. M. Wong, H. P. O. Tang (2005). Determination of dimetridazole and metronidazole in poultry and porcine tissues by gas chromatography-electron capture negative ionization mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 530 (1), págs 23-31.

[48] J. Zhou, J. Shen, X. Xue, J. Zhao, Y. Li, J. Zhang, S. Zhang (2007). Simultaneous determination of nitroimidazole residues in honey samples by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J. AOAC Int.*, 90 (3), págs 872-878.

[49] H.W. Sun, F.C. Wang, L.F. Ai (2007). Simultaneous determination of seven nitroimidazole residues in meat using HPLC-UV detection with solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B*, 857 (2), págs. 296-300.

[50] P. Mottier, I. Hure, E. Gremaud, P. A. Guy (2006). Analysis of four 5-nitroimidazoles and their corresponding hydroxylated metabolites in egg, processed egg, and chicken meat by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 54 (6), págs. 2018-2026.

[51] M. Cronly, P. Behan, B. Foley, E. Malone, L. Regan (2009). Rapid confirmatory method for the determination of eleven nitroimidazoles in egg using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1216 (46), págs 8101-8109.

[52] A. Cannavan, D. G. Kennedy (1997). Determination of dimetridazole in poultry tissues and eggs using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. *Analyst*, 122(9), págs. 963-966.

[53] M. J. Sams, P. R Strutt, K. A. Barnes, A. P. Damant, M. D. Rose (1998) Determination of dimetridazole, ronidazole and their common metabolite in poultry muscle and eggs by high performance liquid chromatography with UV detection and confirmatory analysis by atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Analyst*, 123(12), págs. 2545-2549.

[54] E. Daeseleire, H. De Ruyck, R. Van Renterghem, (2000). Rapid confirmatory assay for the simultaneous detection of ronidazole, metronidazole and dimetridazole in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analyst*, 125(9), págs. 1533-1535.

Tabla 2, actualmente la investigación se ha centrado, en su mayor parte, en el desarrollo de métodos para detectar o analizar residuos de NDZs en muestras biológicas. Sin embargo, pocos son los métodos propuestos para la determinación de estos compuestos en muestras medio ambientales, tales como agua de ríos, agua de mar, aguas residuales hospitalarias [43,64,65] etc.

Kasprzyk-Hordern y col. [64] han desarrollado un método multiresiduo para la determinación de fármacos (entre ellos el MNZ), productos de higiene personal, drogas y disruptores endocrinos en aguas de río. En dicho método proponen la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia con detección mediante Espectrometría de Masas en tándem (HPLC-MS/MS) como técnica de análisis, empleando cartuchos de extracción en fase sólida Oasis® MCX para la extracción de los compuestos objetivo de las muestras analizadas. En este estudio se analizaron muestras de los ríos Taff y Ely durante un periodo de diez meses. Por otra parte, Lindberg y col. [65] proponen el uso de cartuchos de fase mixta (C₂/ENV +)

[55] D. Hurtaud-Pessel, B. Delepine, M. Laurentie (2000). Determination of four nitroimidazole residues in poultry meat by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 882(1+2), págs. 89-98.

[56] X. Xia, X. Li, J. Shen, S. Zhang, S. Ding, H. Jiang (2006). Determination of four nitroimidazoles in poultry and swine muscle and eggs by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. AOAC Int.*, 89(1), págs. 94-99.

[57] S. Fraselle, V. Derop, J.M. Degroodt, J. Van Loco (2007) Validation of a method for the detection and confirmation of nitroimidazoles and the corresponding hydroxy metabolites in pig plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 586(1-2), págs. 383-393.

[58] L. F. Capitan-Vallvey, A. Ariza, R. Checa, N. Navas (2007). Liquid chromatography-mass spectrometry determination of six 5-nitroimidazoles in animal feedstuff. *Chromatographia*, 65(5/6), págs. 283-290.

[59] X. Xia, X. Li, S. Zhang, S. Ding, H. Jiang, J. Shen (2007). Confirmation of four nitroimidazoles in porcine liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 586(1-2), págs. 394-398.

[60] X. Xia, X. Li, S. Ding, S. Zhang, H. Jiang, J. Li, J. Shen (2009) Determination of 5-nitroimidazoles and corresponding hydroxy metabolites in swine kidney by ultra-performance liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 637(1-2), págs. 79-86.

[61] H. Wang, Z. Wang, S. Liu, Y. Jiang, Y. Wu, J. Shan (2009). Quantification of nitroimidazoles residues in swine liver by liquid chromatography-mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 82(4), págs. 411-414.

[62] M. Cronly, P. Behan, B. Foley, E. Malone, L. Regan (2009). Development and validation of a rapid method for the determination and confirmation of 10 nitroimidazoles in animal plasma using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B*, 877(14+15), págs. 1494-1500.

[63] R. Mohamed, P. Mottier, L. Treguier, J. Richoz-Payot, E. Yilmaz, J.C. Tabet, P.A. Guy (2008). Use of molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the determination of four 5-nitroimidazoles and three of their metabolites from egg-based samples before tandem LC-ESIMS/MS analysis. *J. Agric. Food Chem.*, 56(10), págs. 3500-3508.

[64] B. Kasprzyk-Hordern, R.M. Dinsdale, A.J. Guwy (2008). The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*. 42 (3), págs. 3498-3518.

[65] R. Lindberg, P.A. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson, M. Tysklind (2004). Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere*, 57, págs. 1479-1488.

para la extracción y posterior determinación (mediante LC- MS/MS) de antibióticos (incluido el MNZ) presentes en aguas residuales hospitalarias.

<u>Referencia</u>	<u>Analitos</u>	<u>Muestra</u>	<u>Técnica de análisis</u>
[52]	DMZ	Tejidos de aves de corral (músculo, hígado) y huevos	LC-termospray-MS
[53]	DMZ, RNZ, HMMNI	Músculo de ave de corral y huevos	HPLC-UV LC-APCI-MS
[54]	RNZ, MNZ, DMZ	Huevos de pollo	LC-ESI-MS/MS
[55]	DMZ, RNZ, MNZ, HMMNI	Músculo de ave de corral	LC-ESI-MS
[66]	MNZ, MNZ-OH	Músculo y piel de trucha arco iris	HPLC-PDA
[45]	DMZ, RNZ, MNZ	Carne de ave de corral	GC-NPD
[46]	DMZ, RNZ, IPZ, HMMI, MNZ-OH, IPZ-OH	Pavo y carne de cerdo	GC-NCI-MS
[67]	DMZ, MNZ, RNZ, IPZ, HMMNI, IPZ-OH	Pavo (carne de pechuga y muslo, hígado, plasma y retina)	GC-NCI-MS
[47]	DMZ, MNZ	Carne de ave de corral, riñón e hígado porcino e hígado de pollo	GC-ECNI-MS
[56]	RNZ, MNZ, DMZ, HMMNI	Orina porcina	LC-ESI-MS/MS
[50]	DMZ, HMMNI, RNZ, MNZ, MNZ-OH, IPZ, IPZ-OH	Huevos (huevos frescos, huevos en polvo, yema de huevo en polvo), carne de pollo y pescado	LC-ESI-MS/MS
[57]	DMZ, HMMNI, RNZ, MNZ, MNZ-OH, IPZ, IPZ-OH	Plasma de cerdo	LC-APCI-MS/MS
[48]	MNZ, DMZ, RNZ, TNZ, HMMNI	Miel	HPLC-UV
[58]	DMZ, MNZ, RNZ, TNZ, SNZ, IPZ	Alimentos de ave de corral	LC-ESI-MS
[59]	DMZ, MNZ, RNZ, HMMNI	Hígado de cerdo	LC-MS/MS

Tabla 2. Determinación de nitroimidazoles en muestras biológicas (Adaptación de [68]). Abreviaturas: ionización química a presión atmosférica (APCI), ionización por captura de electrones (ECNI), ionización por electrospray (ESI), ionización química de ión negativo (NCI), detección de nitrógeno-fósforo (NPD), detección mediante batería de fotodiodos (PDA)

[66] L. K. Sorensen, H. Hansen (2000) Determination of metronidazole and hydroxymetronidazole in trout by a high-performance liquid chromatographic method. *Food Add. and Contam.*, 17(3) págs. 197-203.

[67] J. Polzer, C. Stachel, P. Gowik (2004) Treatment of turkeys with nitroimidazoles Impact of the selection of target analytes and matrices on an effective residue control. *Anal. Chim. Acta*, 521(2) págs. 189-200.

[68] C. Mahugo-Santana, Z. Sosa-Ferrera, M^a E. Torres-Padrón, J. J. Santana-Rodríguez (2010). Analytical methodologies for the determination on nitroimidazole residues in biological and environmental liquid samples: A review. *Anal. Chim. Acta*, 665, págs. 113-122

[49]	DMZ, MNZ, RNZ, ORZ, SNZ, TNZ, HMMNI	Carne de cerdo y aves de corral	HPLC-UV
[60]	RNZ, MNZ, DMZ, IPZ, HMMNI, IPZ-OH	Riñón de cerdo	UHPLC-MS/MS
[61]	RNZ, MNZ, DMZ	Hígado de cerdo	LC-APCI-MS
[62]	MNZ, DMZ, RNZ, IPZ, MNZ-OH, ORZ, HMMNI, TRZ, IPZ-OH, CRZ	Muestras de plasma animal	LC-ESI-MS/MS
[51]	MNZ, DMZ, RNZ, IPZ, MNZ-OH, ORZ, HMMNI, TRZ, TNZ, IPZ-OH, CRZ	Huevos	LC-ESI-MS/MS
[69]	DMZ, IPZ, MNZ, RNZ, HMMNI	Huevos y carne de pollo	ELISA
[63]	DMZ, IPZ, MNZ, RNZ, HMMNI, IPZ-OH, MNZ-OH	Muestras de huevo en polvo	LC-ESI-MS/MS
[70]	DMZ, IPZ, MNZ, RNZ, HMMNI, IPZ-OH, MNZ-OH	Riñón porcino, bovino y ovino, hígado aviar, suero y huevos y leche bovina	Biosensores ópticos

Continuación Tabla 2. Determinación de nitroimidazoles en muestras biológicas (Adaptación de [68]) Abreviaturas: cromatografía líquida de ultra alta resolución (UHPLC)

Sin embargo, y atendiendo a la información encontrada en bibliografía, pocos son los métodos analíticos, propiamente dichos, desarrollados que emplean como técnica la Electroforesis Capilar, y cuando la utilizan, la determinación de 5-NDZs se limita a resolver un máximo de tres compuestos [71 - 74].

Así, por ejemplo, se ha propuesto un método basado en la Electroforesis Capilar Zonal, empleando la detección UV, para el estudio de la difusión externa del MNZ en microcápsulas de alginato y quitosán [74]. La determinación de 5-NDZs también se ha

[69] A.C. Huet, L. Mortier, E. Daeseleire, T. Fodey, C. Elliott, P. Delahaut (2005). Development of an ELISA screening test for nitroimidazoles in egg and chicken muscle. *Anal. Chim. Acta*, 534(1), págs. 157-162.

[70] C.S. Thompson, I.M. Traynor, T.L. Fodey, S. R. H. Crooks (2009) Improved screening method for the detection of a range of nitroimidazoles in various matrices by optical biosensor. *Anal. Chim. Acta*, 637(1-2), págs. 259-264.

[71] B. Santos, B. M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel (2007). Integrated 2-D CE. *Electrophoresis*, 28, págs. 1345-1351.

[72] L. Nozal, L. Arce, B. M. Simonet, A. Ríos, M. Valcárcel (2006). New supported liquid membrane-capillary electrophoresis in-line arrangement for direct selective analysis of complex samples. *Electrophoresis*, 27, págs. 3075-3085.

[73] W. Jin, W. Li, Q. Xu, Q. Dong (2000). Quantitative assay of metronidazole by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a gold microelectrode. *Electrophoresis*, 21, págs. 1409-1414.

[74] O.V. Manaenkov, A.I. Sidorov, E. M. Sul'man (2003). Quantitative determination of metronidazole by capillary band electrophoresis with UV detection. *Pharm. Chem. J.*, 37 (11), págs. 612-613.

abordado en estudios relacionados con el desarrollo de sistemas de separación bidimensional mediante Electroforesis Capilar. La separación de un conjunto de tetraciclinas de otro de NDZs (incluyendo el MNZ, DMZ y RNZ) [71] se lleva a cabo mediante Electroforesis Capilar Zonal con detección UV-Vis. Posteriormente, la mezcla de NDZs se resuelve por Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar con MS. Además, se ha empleado el análisis de NDZs (incluyendo el MNZ, DMZ y RNZ) en hígado de cerdo [72] para comprobar el potencial de extracción de un sistema de micromembrana integrado en un equipo de Electroforesis Capilar, consiguiendo un tratamiento de muestra en línea. Se empleó la técnica de la Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar, utilizando como sistema de detección un detector UV-Vis con diodos en fila (DAD). La Electroforesis Capilar Zonal también se ha propuesto para la detección de MNZ en orina humana [73] usando la detección amperométrica con microelectrodo de oro.

En esta Memoria se ha propuesto la Electroforesis Capilar en su modalidad de Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar como técnica separativa alternativa a las técnicas cromatográficas comúnmente empleadas en la determinación de 5-NDZs. Por tanto, los fundamentos y aspectos más relevantes de esta técnica se muestran a continuación.

2.4. ELECTROFORESIS CAPILAR

El desarrollo de métodos basados en electroforesis capilar (CE) para separar diversos analitos en muestras de distinta naturaleza ha aumentado muy rápidamente en la última década [75- 79] y la técnica ha demostrado su potencialidad en aplicaciones muy diferentes.

Como características de la CE debemos destacar que se trata de una nanotécnica, tanto en los volúmenes de muestra que emplea (1 a 40 nL) como en los volúmenes de reactivos. Esto la convierte en una técnica más barata y menos contaminante si se compara con el HPLC. Se trata también de una técnica rápida puesto que los tiempos de análisis suelen ser siempre inferiores a 30 min., incluso a veces se consiguen separaciones en menos de 2 min. Quizás su característica más destacable es su alta eficacia, pudiéndose conseguir fácilmente

[75] S.F.Y. Li (1993). *Capillary Electrophoresis: Principles, and Practice and Applications*. Amsterdam: *Editorial Elsevier*.

[76] P. Camilleri (1993). *Capillary Electrophoresis: Theory and Practice*. Boca Raton, FL (EE.UU.): *Editorial CRC Press*.

[77] J.P. Landers (1994). *Handbook of Capillary Electrophoresis*. Boca Raton, FL (EE.UU.): *Editorial CRC Press*.

[78] D.L. Baker (1995). *Capillary Electrophoresis*. Nueva York (EE.UU.): *Editorial John Wiley and Sons, Inc.*

[79] K.D. Altria (1996). *Capillary Electrophoresis Guidebook. Methods in Molecular Biology. Vol 52*. Totowa (Nueva Jersey): *Editorial Humana Press*.

cientos de miles de platos teóricos y en ocasiones hasta varios millones. La razón estriba fundamentalmente en su perfil de flujo plano, recordemos que en HPLC los perfiles de flujo son parabólicos. Otra característica importante es que no se encuentra limitada por el peso molecular de los analitos, pudiendo separar, en la misma columna, desde pequeñas moléculas hasta otras mucho más complicadas. Al igual que HPLC se puede automatizar completamente, y si bien es cierto que CE presenta una limitación en cuanto a sensibilidad debido al poco volumen de muestra que se introduce en el capilar, y al reducido camino óptico, también es posible realizar técnicas de concentración “*on-line*” e “*in-line*” que aumentan considerablemente su capacidad de detección, además de recurrir a técnicas de detección más sensibles, como es el caso de la fluorescencia inducida por láser o la quimioluminiscencia.

La separación por CE se basa en las diferencias entre las movilidades electroforéticas de los distintos analitos (como consecuencia de su diferente relación carga/tamaño) dentro de un tubo capilar lleno de disolución tampón cuando son sometidos a la acción de un campo eléctrico. Para llevar a cabo la separación son necesarios los siguientes elementos (Fig. 5):

- Fuente de alto voltaje: capaz de aplicar hasta 30 kV.
- Capilar: su diámetro interno oscila entre 25 y 100 μm y el externo es de 375 μm .
- Viales: además del vial de muestra son necesarios un vial con agua, otro con NaOH y otro con disolución tampón para acondicionar el capilar, un vial de desecho y dos más con tampón para cerrar el circuito cuando apliquemos un voltaje.

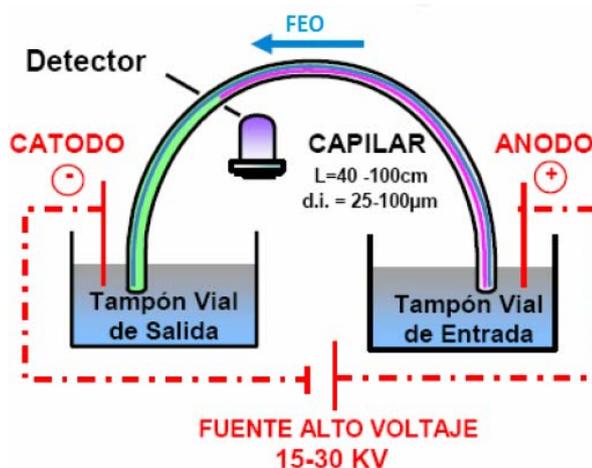


Fig. 5. Diagrama de un sistema de Electroforesis Capilar.

- Sistema de introducción de la muestra: el modo más habitual es aplicando presión sobre el vial de muestra (inyección hidrodinámica) aunque también se puede hacer mediante la aplicación de un voltaje (inyección electrocinética). Otra posibilidad es elevando el vial de entrada para que la muestra entre por gravedad (inyección por efecto sifón).

Instrumentalmente, la aplicación de presión en el vial de entrada es la solución más sencilla, la que adoptan la mayoría de equipos y ha sido la empleada en esta Memoria. Este tipo de inyección presenta la ventaja de que la cantidad de cada analito inyectada es independiente de la movilidad electroforética del mismo. La presión y el tiempo que ésta se aplica (tiempo de inyección) son los dos parámetros que controla el analista para variar el volumen de inyección (vol), que puede ser calculado según la ecuación de Hagen-Poiseuille:

$$vol = \frac{\Delta P \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t}{128 \cdot \eta \cdot L} \quad \text{Ecuación 1.}$$

El volumen inyectado es función de la presión aplicada (ΔP), el tiempo de inyección (t), la viscosidad de la disolución (η) y características del capilar como su longitud (L) o el diámetro interno (d). Valores de inyección próximos a 250 mbar s⁻¹ son habituales en CE. Con este sistema de inyección, la precisión del área de pico es del orden del 2% (medida como coeficiente de variación).

- Detector: el más utilizado es el de UV-Vis de DAD aunque también se puede utilizar un detector fluorescente, un espectrómetro de masas y en menor medida se encuentran los detectores quimioluminiscentes, fosforescentes y de espectroscopia Raman.

El detector UV-Vis destaca por su universalidad, ya que son muchos los analitos que poseen algún grupo cromóforo que absorbe en el intervalo de longitudes de onda entre 190-600 nm en el cual trabajan la mayoría de detectores. Además, en el caso de CE este tipo de detectores también pueden ser aplicados a compuestos no absorbentes haciendo uso de una detección indirecta. La detección se realiza en el capilar, eliminando parte del recubrimiento de poliimida del mismo. La dependencia de la absorbancia con el camino óptico, según la ley de Lambert-Beer, hace que la sensibilidad esté limitada como consecuencia del pequeño camino óptico que el capilar ofrece. Esto hace que el detector tenga que ser cuidadosamente diseñado para enfocar la máxima luz en el capilar y para minimizar la luz dispersa que llega al monocromador. La utilización de un detector DAD en lugar de la detección por única o múltiple longitud de onda supone muchas ventajas, como

son: visualización del espectro UV-Vis en todo momento del análisis, obtención del electroferograma a cualquier longitud de onda en una sola inyección, determinación del máximo de absorbancia para todos los analitos, identificación de compuestos y determinación de la pureza de pico.

Existen algunos métodos que permiten mejorar la sensibilidad mediante el aumento del camino óptico, que se muestran en la Fig. 6, consistentes en el uso de iluminación axial en lugar de perpendicular, utilizando una celda de flujo de alta detección o el uso de capilares con camino óptico extendido (capilares de burbuja), en los que el diámetro interno está aumentado de 3 a 5 veces en el punto de detección, sin que esto implique un aumento en la difusión del analito.

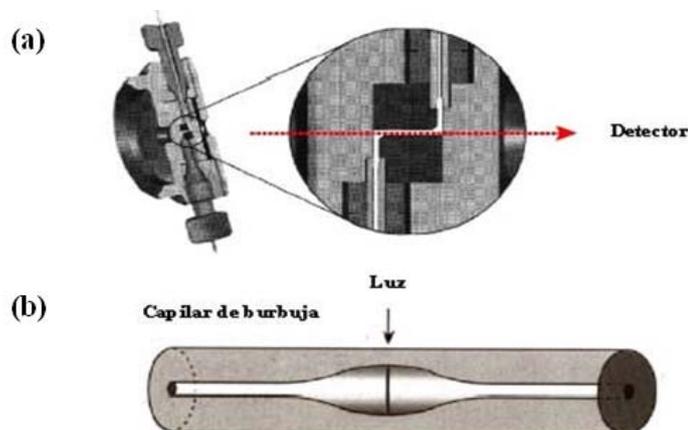


Fig. 6. Celda de flujo de alta detección (a) y capilar de burbuja (b).

Los dos fenómenos en los que se basan las separaciones electroforéticas son: electroósmosis y electromigración [80].

La electromigración consiste en el movimiento neto de las especies que forman la muestra a través de la disolución tampón dentro del capilar, bajo la influencia del campo eléctrico, es decir, afecta de forma individual a cada uno de los analitos que se encuentran en dicho capilar y el resultado es la aparición de la llamada movilidad electroforética, directamente proporcional a la relación carga/tamaño de los analitos.

La electroósmosis es un fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un sistema líquido (como es el medio electroforético) que esté en contacto directo con una superficie cargada (como es el interior del capilar de sílice fundida), dando como

[80] C. Cruces-Blanco (1998). *Electroforesis Capilar*. Almería (España): Ediciones Universidad de Almería.

resultado un movimiento, tanto de las especies neutras como del conjunto de la disolución tampón, que se conoce con el nombre de movilidad electroosmótica. Este fenómeno da lugar a un perfil plano del flujo, eliminándose así una de las causas del ensanchamiento del flujo cuando éste se genera externamente, como sucede en HPLC, donde el perfil del flujo es parabólico, constituyendo una causa de ensanchamiento de las bandas y pérdida de eficacia. Cuando el ensanchamiento de bandas es controlado exclusivamente por difusión, se obtienen picos que generalmente superan los 105 platos teóricos.

El flujo electroosmótico (EOF), consecuencia de la electroósmosis, está provocado por el movimiento de los cationes de la disolución tampón que contrarrestan la carga negativa de los grupos silanoles que constituyen las paredes internas del capilar de sílice. Se forma una doble capa eléctrica o, también denominada, capa móvil. Estos cationes arrastran moléculas de disolvente en su movimiento hacia el cátodo lo que origina un flujo de disolvente en ese sentido. Cuanto mayor es el pH mayor es este flujo.

Al existir los dos fenómenos de migración, la velocidad, la movilidad y el tiempo de migración reales de cada especie van a ser la suma de las dos contribuciones. En capilares de sílice huecos, el movimiento de los analitos está influenciado por la naturaleza del medio electroforético. Debido a que para que tenga lugar la separación en CE se aplica un campo eléctrico a la disolución que contiene la muestra, el medio electroforético tiene que ser tal que conduzca bien la corriente eléctrica. El más empleado es una disolución tampón, generalmente de tipo inorgánico, puesto que presentan una baja conductividad y el efecto térmico se minimiza, pudiendo trabajar con voltajes elevados y conseguir adecuadas resoluciones. El tipo de tampón elegido es de vital importancia ya que determina el comportamiento de los analitos, que se afectan enormemente por propiedades tales como el pH, fuerza iónica y composición del mismo. El flujo de iones será la suma del EOF y del flujo electroforético. El flujo electroforético sólo afecta a las especies cargadas en disolución cuando se someten a la acción de un campo eléctrico externo (Fig. 7).

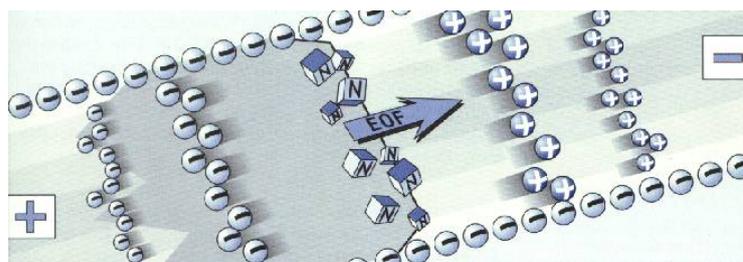


Fig. 7. Migración diferencial de las moléculas según carga/radio.

Junto con la naturaleza del medio electroforético, otra variable que va a afectar en gran medida a la magnitud y dirección del EOF y, por tanto, a la calidad de las separaciones, es la composición del capilar. El capilar es la parte más importante de un equipo de CE ya que, gracias a su empleo, se pueden aplicar voltajes elevados, consiguiendo una buena disipación del calor generado y, por tanto, minimizándose el calentamiento o el efecto Joule.

Una de las características más destacables de la CE es su gran versatilidad para afrontar una gran variedad de análisis. Esta versatilidad se fundamenta en gran parte en los diversos modos de operación que la técnica ofrece. Estos modos son en su mayoría fácilmente accesibles cambiando la composición del tampón de separación o algunas condiciones de separación. En la Tabla 3 se recoge un breve resumen de los distintos modos de operación que permite la electroforesis capilar.

Modo	Características/aplicaciones	Mecanismo
Electroforesis Capilar Zonal (CZE)	-Capilar lleno de electrolitos de fondo, aplicación de campo eléctrico. -Aplicaciones: aminoácidos, péptidos, proteínas, drogas, metabolitos, contaminantes, iones inorgánicos, ácidos orgánicos, compuestos quirales, fragmentos de DNA, oligosacáridos, etc.	Separación de analitos según su movilidad en solución
Cromatografía Capilar Electrocinética Micelar (MEKC)	-Capilar lleno de electrolito de fondo que contiene un tensioactivo. -Aplicaciones: aminoácidos, vitaminas, fármacos e hidrocarburos aromáticos.	Interacciones hidrofóbicas e iónicas de analitos con las micelas.
Electroforesis Capilar en Gel (CGE)	-Capilar relleno con gel que funciona como tamiz molecular. -Aplicaciones: macromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas.	Diferencia de tamaños y cargas.
Electrocromatografía Capilar (CEC)	-Capilar funcionarizado con fase estacionaria. -Aplicaciones: macromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas.	Diferencia de tamaños y cargas

Tabla 3. Características y mecanismo de separación de los distintos modos de CE.

<p>Enfoque Isoeléctrico Capilar (CIEF)</p>	<p>-Capilar lleno de electrolitos, cada uno capaz de tamponar a un pH diferente. Extremos del capilar sumergidos en dos soluciones: una ácida y otra básica. Se genera gradiente de pHs en el capilar.</p> <p>-Aplicaciones: sustancias anfotéricas como péptidos, proteínas y aminoácidos.</p>	<p>Punto isoeléctrico de los analitos: migran hasta alcanzar el pH donde son neutros.</p>
<p>Isotacoforesis Capilar (CITP)</p>	<p>-Sistema discontinuo de tampón: tampones con distinta movilidad. Separación en zonas consecutivas: escalones, no picos.</p> <p>-Aplicaciones: iones metálicos, aniones orgánicos e inorgánicos.</p>	<p>Separación en el interior de zona delimitada por los dos tampones.</p>

Continuación Tabla 3. Características y mecanismo de separación de los distintos modos de CE.

3. REACTIVOS Y MATERIAL

Todos los reactivos empleados son de grado analítico, así como los disolventes de grado HPLC. El isopropanol, dihidrógeno fosfato sódico, hidrógeno fosfato sódico, ácido ortofosfórico 85% e hidróxido sódico han sido suministrados por Panreac-Química (Madrid, España); el etanol por Merck (Darmstadt, Alemania); el metanol y el ácido clorhídrico 37% por VWR International (West Chester, Pensilvania, EE.UU); el acetonitrilo (ACN), dodecil sulfato sódico (SDS), 1-Butil-3-metilimidazol tetrafluoroborato (BMIM-BF₄) y urea fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU).

El agua utilizada en este trabajo ha sido agua ultrapura (18.2 mΩcm⁻¹) obtenida mediante el sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU).

El MNZ, DMZ, RNZ, TNZ, ORZ, CRZ, HMMNI, MNZ-OH e IPZ-OH han sido suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE.UU); el IPZ, TRZ (hidrocloruro) y SNZ (0.5 hidratado) por Witega (Berlín, Alemania).

Se emplearon disoluciones estándar de 1000 mg/L de cada 5-NDZ en ACN. Estas disoluciones estándar se conservan a -20 °C en frascos de vidrio topacio, preservándolas de la luz. A partir de estas disoluciones estándar se prepararon distintas disoluciones intermedias de 100 mg/L de cada 5-NDZ en ACN. Estas disoluciones intermedias se conservan a 4 °C en frascos de vidrio topacio, preservándolas de la luz.

Las disoluciones de trabajo se preparan a partir de la mezcla de alícuotas de las diferentes disoluciones intermedias de cada 5-NDZ. Las disoluciones de trabajo deben estar exentas de disolventes orgánicos, por lo que es necesario eliminar el ACN. El ACN se evapora empleando una corriente de nitrógeno. La mezcla de 5-NDZs se recompone, según volumen requerido, en una disolución de tampón fosfato 20 mM pH = 6.5.

El filtrado de las muestras de agua de río se realiza a vacío, empleando filtros de nylon 66 (0.2 μm x 47 mm) suministrados por Supelco (Bellefonte, PA, EE.UU).

Para la etapa de extracción en fase sólida, del tratamiento de muestras, se utilizan cartuchos Oasis® HLB 6 cc (200 mg) adquiridos a Waters (Milford, MA, EE.UU).

4. INSTRUMENTACIÓN Y SOFTWARE

El método de separación de los 5-NDZs se llevó a cabo mediante CE en un instrumento Agilent 7100 CE System adquirido a Agilent Technologies (Waldbron, Alemania). Dicho instrumento viene equipado con un detector UV-Vis de DAD que permitió la detección de los 5-NDZs a una longitud de onda de 320 nm, dentro del rango del UV.

Para la separación se empleó un capilar estándar de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno y 64.5 cm de longitud total (56 cm de longitud efectiva) suministrado por Polymicro Technologies (Phoenix, AZ, EE.UU). Así mismo, se utilizó un capilar burbuja de 50 μm de diámetro interno y 64.5 cm de longitud total, suministrado por Agilent Technologies (Waldbron, Alemania).

Los electroferogramas obtenidos se registraron y procesaron con el programa HP ChemStation, revisión B.02.01. Así mismo, se utilizó el programa Excel (Microsoft) para el posterior tratamiento de datos.

Los espectros de absorción UV-Vis de los distintos compuestos se obtuvieron con un espectrofotómetro Agilent 8453 (Waldbron, Alemania).

Para las medidas de pH se utilizó un pH-metro Crison modelo pH 2000 (Barcelona, España). En la preparación de las disoluciones estándar, intermedias, de trabajo y muestras se empleó un agitador Vórtex-2 Genie (Scientific Industries, Bohemia, NY, EE.UU) y un sistema de evaporación de nitrógeno Evaporators EVA EC-S/EVA LS-S (VLM GmbH, Bielefeld, Alemania).

5. PROCEDIMIENTO ELECTROFORÉTICO DESARROLLADO

Se propone un método analítico para la determinación de nueve compuestos pertenecientes a la familia de los 5-NDZs. La separación de los mismos (MNZ, DMZ, IPZ, RNZ, MNZ-OH, IPZ-OH, HMMNI, TRZ, ORZ) se lleva a cabo en un equipo de CE con detección UV ($\lambda = 320$ nm), mediante MEKC.

Se emplea un capilar burbuja de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno (siendo el diámetro interno en la ventana de detección de 150 μm) y longitud efectiva de 56 cm (64.5 cm de longitud total).

Como electrolito de fondo se emplea un tampón fosfato 20 mM pH = 6.5, que se prepara a partir de la mezcla de las sales de hidrógeno fosfato disódico y monohidrógeno fosfato sódico, y SDS 150 mM.

El voltaje aplicado es de 25 kV, en tanto que la temperatura del capilar se mantiene a 20 °C. Se registra una corriente eléctrica estable de en torno a 58 μA .

La muestra se inyecta automáticamente en el equipo de forma hidrodinámica con una presión de 50 mbar durante 15 s. El medio de inyección de la muestra es tampón fosfato 20 mM pH = 6.5.

Para la utilización del capilar de separación deben seguirse las pautas que se indican a continuación. En el caso de capilares nuevos, éstos deben acondicionarse mediante lavado con una disolución de NaOH 1 M durante 20 min. a 60 °C, agua Milli-Q durante 10 min. a 25 °C y tampón electroforético durante 15 min. a 25 °C. Al comienzo de cada sesión de trabajo, el capilar debe acondicionarse mediante lavado con una disolución de NaOH 0.1 M durante 7 min. a la temperatura de trabajo, agua Milli-Q durante 1 min. a 20 °C y tampón electroforético durante 10 min. a 20 °C. Antes de cada análisis, el capilar debe acondicionarse mediante lavado con una disolución de NaOH 0.1 M durante 2 min. a la temperatura de trabajo, agua Milli-Q durante 1 min a 20 °C y tampón electroforético durante 5 min a 20 °C.

Respecto a la conservación del capilar, una vez finalizada la sesión de trabajo, debe lavarse con agua Milli-Q durante 5 min a 20 °C, seguido del lavado con una corriente de aire durante 5 min a 20 °C.

6. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Se propone el siguiente tratamiento de muestra para la determinación de nueve 5-NDZs (MNZ, DMZ, IPZ, RNZ, MNZ-OH, IPZ-OH, HMMNI, TRZ, ORZ) en aguas de río mediante el método electroforético propuesto anteriormente:

- i. Tomar 25 mL de muestra de agua.
- ii. Filtrar la muestra a vacío empleando filtros de nylon 66 (0.2 μm x 47 mm).
- iii. Ajustar la muestra a $\text{pH} = 2$ con una disolución de ácido ortofosfórico (de pureza 85%) 1:5 (v/v).
- iv. Aplicar la metodología de extracción en fase sólida para separar los analitos usando cartuchos Oasis® HLB (200 mg):
 - Acondicionar el cartucho con 2 mL de ACN, 1 mL de metanol y 1 mL de tampón fosfato 0.1 M $\text{pH} = 2$.
 - Pasar los 25 mL de muestra a través del cartucho.
 - Lavar el cartucho con 1 mL de metanol.
 - Eluir los analitos con 1.5 mL de ACN
- v. Secar el volumen de ACN que contiene los analitos con una corriente de nitrógeno.
- vi. Reconponer la muestra con 0.5 mL de tampón fosfato 20 mM $\text{pH} = 6.5$.
- vii. Inyectar la muestra en el equipo de electroforesis capilar.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El método propuesto para la determinación de compuestos 5-NDZs en muestras ambientales se ha realizado en dos etapas. En una primera fase se llevó a cabo la separación de los de los analitos en estudio mediante MEKC con detección UV. Posteriormente se caracterizó el tratamiento de muestras que permite la determinación de 5-NDZs en aguas de río.

7.1. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN ELECTROFORÉTICA

La optimización de la separación electroforética se desarrolló de forma univariante. Con objeto de establecer los valores óptimos de las variables que influyen la separación, inicialmente se siguieron dos criterios. En primer lugar, se pretendió conseguir una separación adecuada de todos los analitos en estudio con una resolución entre picos satisfactoria (resolución mínima de 1.5) y por otra parte se consideró llevar a cabo el análisis en el menor tiempo posible. Igualmente se consideró para la selección de los óptimos el obtener la máxima intensidad de la señal analítica (área y altura de pico) y se tuvo en cuenta un requisito limitante, y es que la máxima corriente alcanzada durante la separación electroforética no superase los 150 μ A.

Las condiciones iniciales a partir de las cuales se desarrolló la optimización fueron las siguientes: capilar de sílice fundida de una longitud de 64.5 cm (56 cm de longitud efectiva) y diámetro interno de 50 μ m, seleccionando un voltaje para la separación de 20 kV, y una temperatura de capilar de 20°C. La muestra inyectada, mezcla de los doce 5-NDZs inicialmente considerados, con una concentración de 5 μ g/mL cada uno, se realizó de forma hidrodinámica durante 5 s. a una presión de 50 mbar.

A continuación se describen los distintos parámetros que se han optimizado para conseguir la mejor separación electroforética según los criterios definidos anteriormente, así como se indican los óptimos establecidos en cada caso.

7.1.1. ELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE ABSORCIÓN

Dado que en el método analítico a desarrollar se utiliza la absorción UV como medio de detección empleando un sistema DAD, se requiere seleccionar la longitud de onda (λ) a la cual los distintos compuestos en estudio dan la máxima absorción. La longitud de onda

seleccionada será una aproximación a aquella en la que el conjunto de los 5-NDZs originen la máxima señal.

Se registran los espectros de absorción UV de cada uno de los compuestos en estudio con la ayuda de un espectrofotómetro UV-Vis. Para ello se emplean disoluciones acuosas de 2 $\mu\text{g/mL}$ de cada analito.

En la Tabla 4 se recoge la longitud de onda de máxima absorción para cada uno de los doce 5-NDZs. En el caso del RNZ y el CRZ se indican las dos longitudes de onda de máxima absorción, debido al interés que presenta la segunda λ de máxima absorción UV.

Compuesto	Longitud de onda, λ (nm)	Absorción (AU)
Secnidazol	319	0.178
Dimetridazol	319	0.250
Ipronidazol	322	0.204
Ronidazol	202 / 308	0.213 / 0.202
Ornidazol	319	0.166
Metronidazol-OH	311	0.116
Ternidazol	320	0.113
HMMNI	311	0.257
Tinidazol	318	0.097
Metronidazol	321	0.288
Ipronidazol-OH	314	0.178
Carnidazol	242 / 320	0.123 / 0.065

Tabla 4. Longitudes de onda de máxima absorción ultravioleta para los 5-nitroimidazoles.

Como puede observarse en la Fig. 8, se selecciona **320 nm** como la longitud de onda óptima a la cual los 5-NDZs producen la máxima absorción UV.

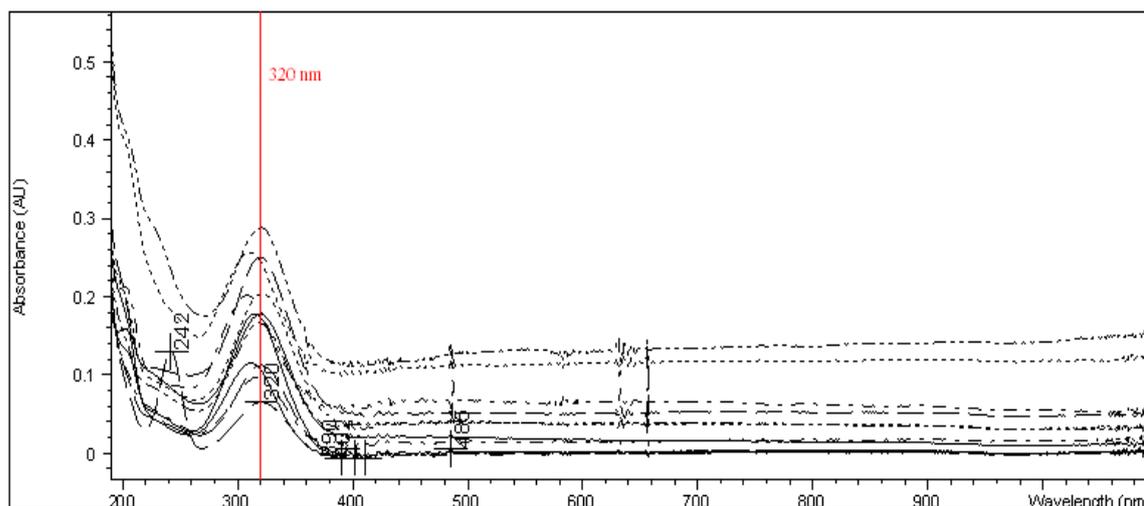


Fig. 8. Conjunto de espectros UV-Vis de los 5-nitroimidazoles.

7.1.2. OPTIMIZACIÓN DEL pH DE LA SEPARACIÓN

Uno de los parámetros clave en la separación analítica de cualquier mezcla de compuestos en CE es el pH. Es por ello que es la primera variable experimental del método que debe definirse. En bibliografía se propone la separación del DMZ, MNZ y RNZ por CE a pH = 5 [71] y pH = 8.5 [72], respectivamente, por lo que indica que las mezclas de 5-NDZs pueden resolverse bajo distintas condiciones de pH, aunque en ambos casos la separación se lleva a cabo mediante MEKC.

Dado que no se tiene constancia de ningún estudio previo sobre la separación de una mezcla de 5-NDZs tan compleja como la propuesta, se opta por estudiar un rango de pH amplio (pH 2-9) en CZE. Para este estudio se emplearon las siguientes disoluciones electroforéticas:

- Disolución 50 mM de H_3PO_4 para pH = 2 (ajustado con NaOH 1 M).
- Disolución 50 mM de NaH_2PO_4 para pH = 4 (ajustado con H_3PO_4 v/v = 1:20).
- Disolución 50 mM mezcla de las sales $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$ para pH = 7.
- Disolución 50 mM de Na_2HPO_4 para pH = 9 (ajustado con H_3PO_4 v/v = 1:20).

Tal y como se observa en los electroferogramas recogidos en la Fig. 9, a medida que aumenta el pH, la resolución entre picos disminuye, hasta tal punto que a pH 7 y 9 todos los compuestos presentan el mismo tiempo de migración. Esto tiene su explicación desde el punto de vista del estado iónico que presentan los 5-NDZs en función del pH del medio.

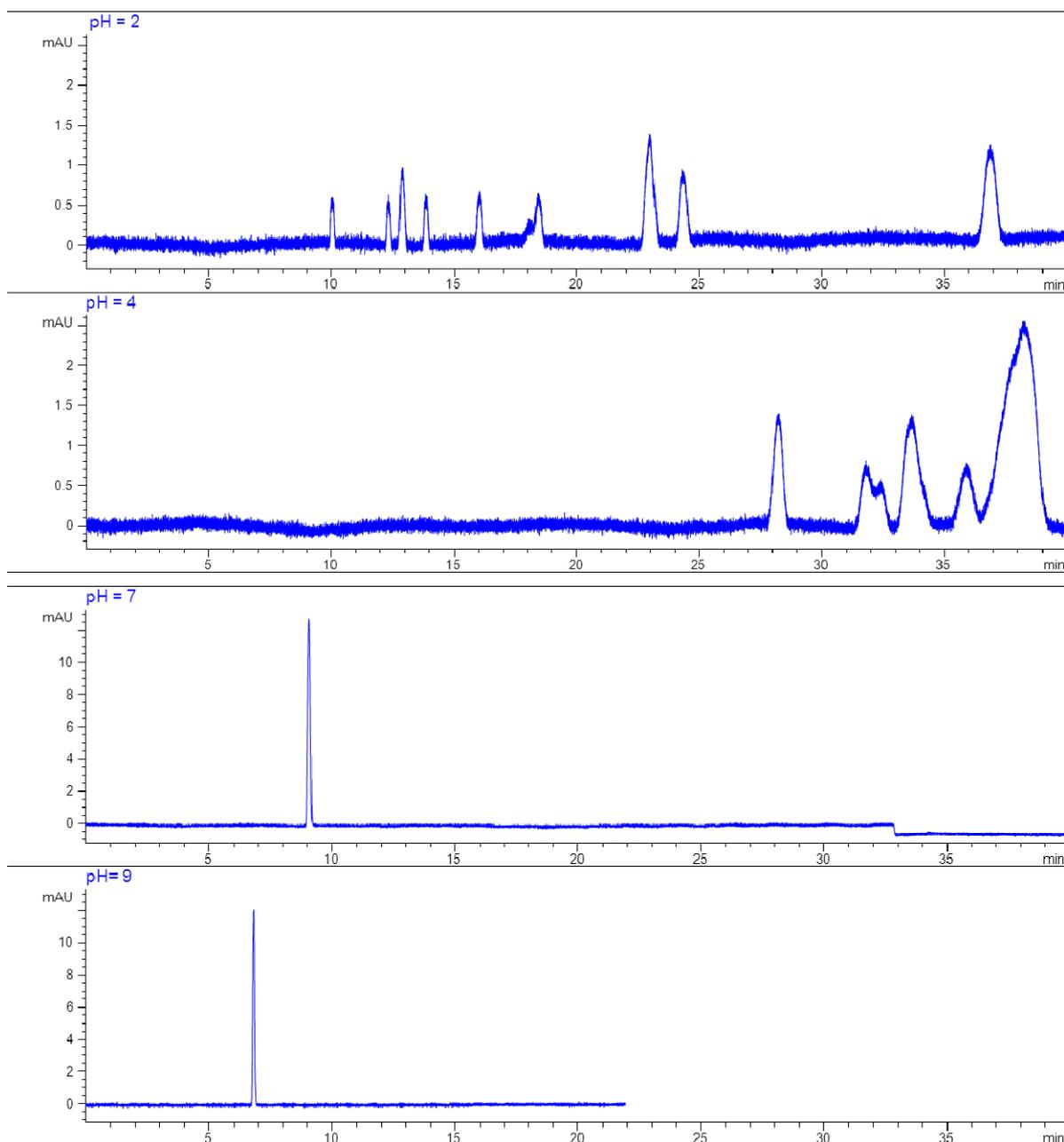


Fig. 9. Electroferogramas correspondientes a la separación de los 5-NDZs por electroforesis capilar zonal (CZE) bajo las condiciones iniciales. De arriba abajo, a pH = 2, 4, 7 y 9.

A pHs muy ácidos los 5-NDZs están cargados positivamente (Fig. 10), pudiendo llevarse a cabo su separación por diferencia de cargas tal y como se observa en la Fig. 9. Sin embargo, a pHs superiores dentro del rango en estudio los 5-NDZs son neutros (intervalo $pK_{a1} < pH_{del\ medio} < pK_{a2}$, Tabla 5), por lo que no tiene lugar la separación mediante CZE.

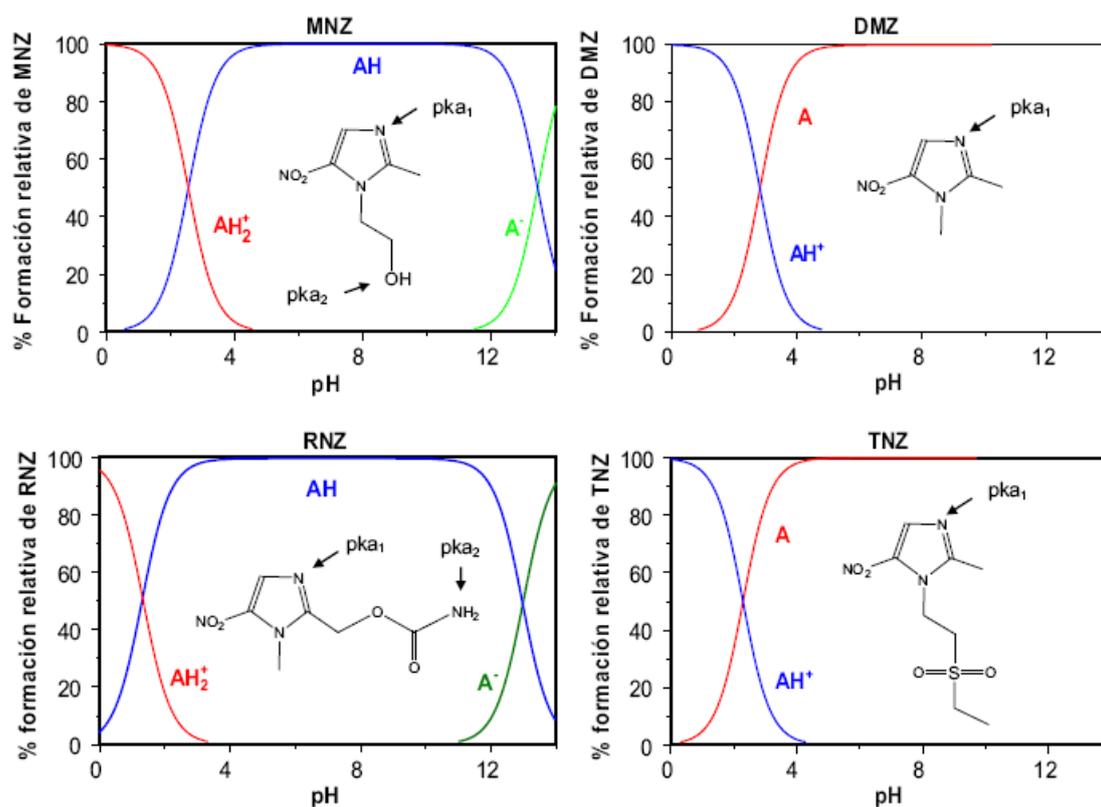


Fig. 10. Diagrama de distribución de especies de moléculas de MNZ, DMZ, RNZ y TNZ en función del pH del medio [81].

Compuesto	pKa ₁	pKa ₂	Compuesto	pKa ₁	pKa ₂
Metronidazol	2.58 ± 0.34	14.44 ± 0.10	Ternidazol	2.72 ± 0.34	14.90 ± 0.10
Dimetridazol	2.81 ± 0.25		Ornidazol	2.72 ± 0.35	13.29 ± 0.20
Ipronidazol	2.55 ± 0.25		Carnidazol	2.58 ± 0.34	13.03 ± 0.70
Ronidazol	1.32 ± 0.25	12.99 ± 0.50	HMMNI	2.21 ± 0.25	13.31 ± 0.10
Secnidazol	2.62 ± 0.35	14.50 ± 0.20	Metronidazol-OH	1.98 ± 0.34	13.28 ± 0.10
Tinidazol	2.30 ± 0.34		Ipronidazol-OH	2.21 ± 0.25	13.44 ± 0.29

Tabla 5. pKas de los 5-NDZs [82].

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se opta por realizar un estudio más exhaustivo de la influencia del pH en la separación, concretamente en el intervalo de pH comprendido entre 1.5 y 4.

[81] G. Prados Joya (2010) Tesis doctoral: Tratamiento de Aguas para la Eliminación de Antibióticos – Nitroimidazoles- mediante Adsorción sobre Carbón Activado y Tecnologías Avanzadas de Oxidación. Universidad de Granada, pág 119

[82] Buscador: Scifinder®.

Como resultado de este estudio, se observa que la mejor separación posible se consigue a $\text{pH} = 1.5$ sin demasiada resolución (Fig. 11), además de tratarse de un valor de pH al cual hay ausencia de EOF, lo cual no es deseable debido a las ventajas que aporta.

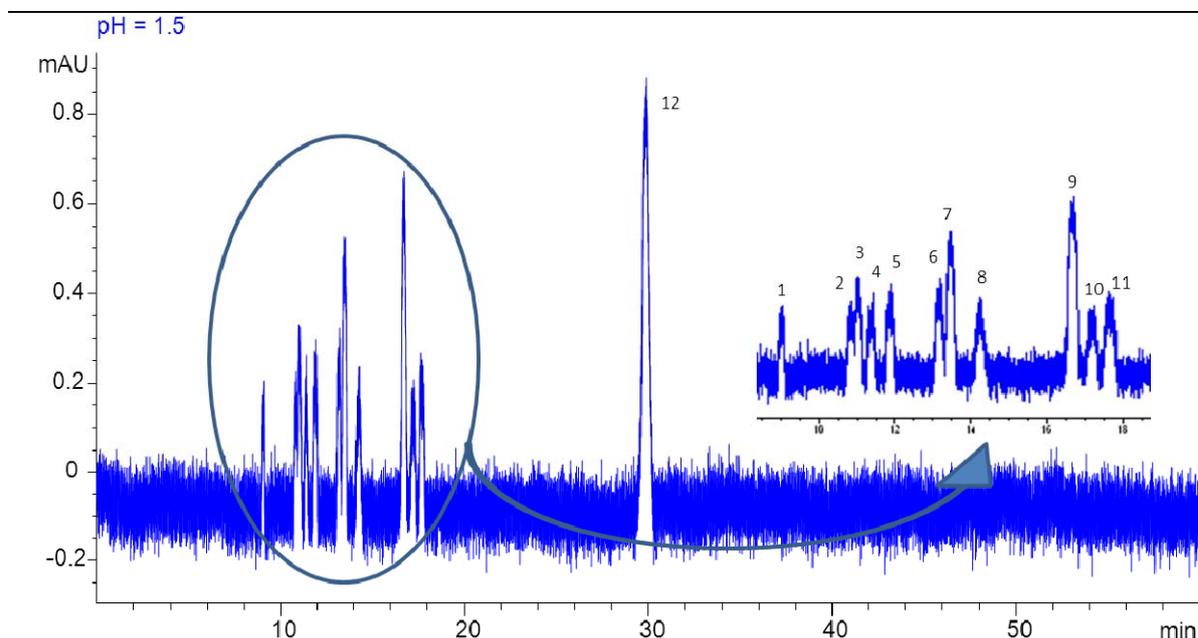


Fig. 11. Electroferograma correspondiente a la separación de los 5-NDZs a $\text{pH} = 1.5$ mediante CZE.

Por este motivo, se opta por llevar a cabo la separación mediante MEKC, tal y como se recoge en bibliografía en referencia a mezclas de 5-NDZs con un menor número de analitos [71,72].

Para seleccionar el pH más adecuado para la separación por MEKC, se realizará un estudio de la influencia del pH entre 6 y 9 (Fig.12). Todas las disoluciones también empleadas serán de fosfato 50 mM en presencia de SDS 50 mM.

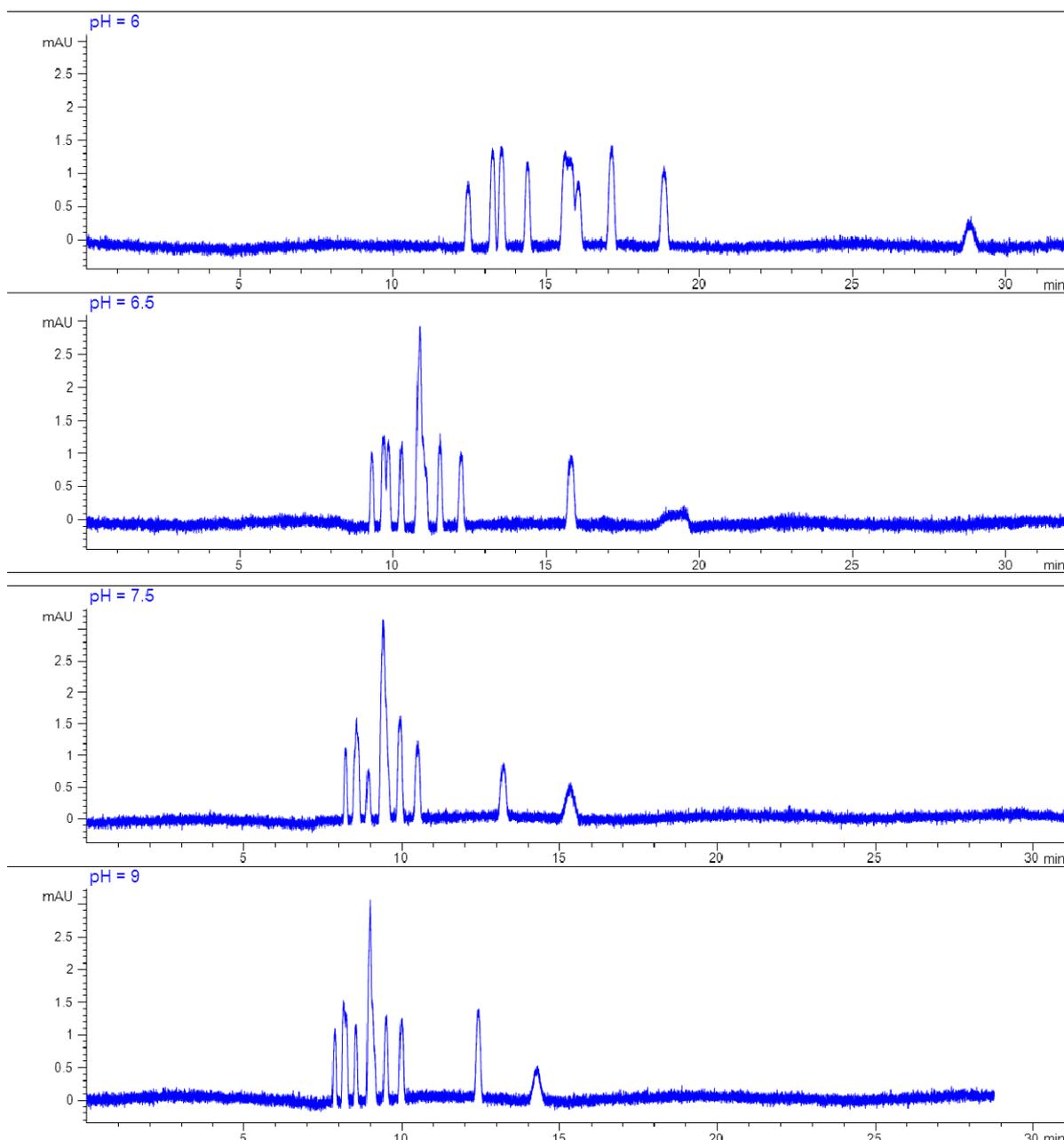


Fig. 12. Electroferogramas correspondientes a la separación de los 5-NDZs por MEKC bajo las condiciones iniciales. De arriba abajo, a pH = 6, 6.5, 7.5 y 9.

Como se observa en la Fig. 12, los tiempos de análisis aumentan a medida que disminuye el pH de la disolución electroforética, aunque se consigue mejorar la resolución entre picos a pHs más bajos. Un compromiso entre ambos parámetros conlleva a considerar como óptimo para la separación en MEKC de los 5-NDZs un **pH = 6.5**.

7.1.3. OPTIMIZACIÓN DE LA NATURALEZA Y DE LA CONCENTRACIÓN DEL TAMPÓN ELECTROFORÉTICO

Para determinar la naturaleza de los electrolitos más adecuados para la separación de los 5-NDZs se estudió la influencia de los siguientes tampones electroforéticos en la separación: tampón imidazol, tampón fosfato y tampón McIlvaine. Se seleccionan dichos tampones por ser los más empleados en aquellos procesos analíticos que tienen lugar a $\text{pH} = 6.5$.

Tanto la concentración del tampón fosfato (se prepara a partir de una mezcla de las sales NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4) como la del tampón imidazol (ajuste del pH con HCl) se fija en 50 mM. Para la preparación del tampón McIlvaine se considera una concentración de fosfato de 50 mM. En todos los casos se añade SDS a la disolución electroforética en una concentración de 50 mM.

La preparación del tampón McIlvaine se lleva a cabo mediante la combinación de las sales Na_2HPO_4 y $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Las cantidades necesarias a añadir de cada sal han sido definidas por McIlvaine en función del pH requerido para un volumen de disolución total de 20 mL [83]. Para elaborar un tampón McIlvaine a $\text{pH} = 6.5$ es necesario 14.2 mL de Na_2HPO_4 0.2 M y 5.8 mL de ácido cítrico 0.1 M.

En la Fig. 13 se recogen los electroferogramas registrados para la separación de los 5-NDZs en función del tipo de disolución electroforética empleada. Aparentemente la utilización del tampón McIlvaine como disolución electroforética puede resultar el más indicado, dado que se aprecia cierta separación de los analitos que componen el pico registrado entre los 11 y 12 min., lo cual no se observa al emplear los otros dos tampones.

Sin embargo, se opta por seleccionar el **tampón fosfato** como el más adecuado puesto que se prima la obtención de un menor tiempo de análisis, ya que la separación lograda con el tampón McIlvaine no es mucho mejor a la conseguida con el tampón fosfato.

[83] T.C. McIlvaine (1921). A Buffer Solution For Colorimetric Comparison. *J. Biol. Chem.*, 49, págs. 183-186.

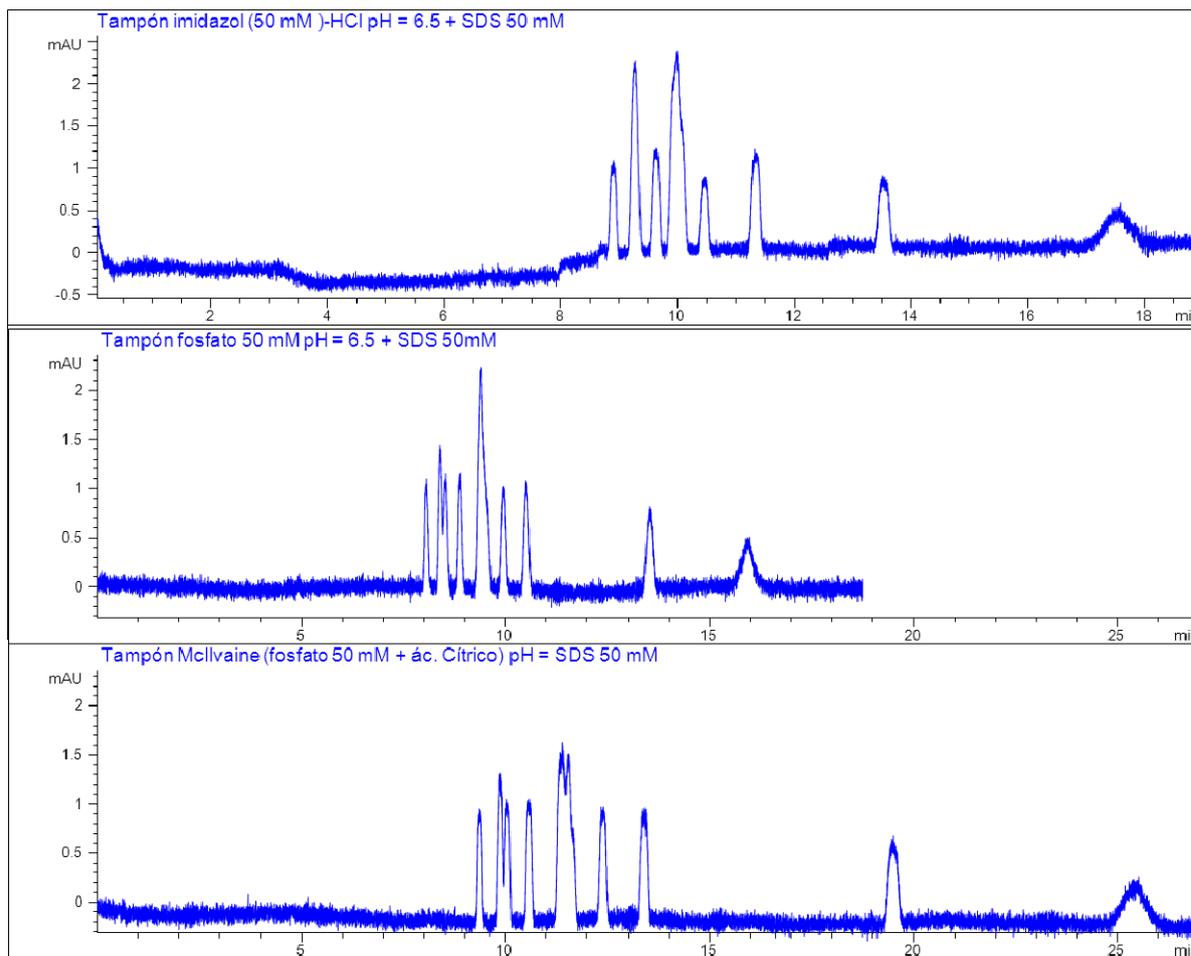


Fig. 13. Electroferogramas según la naturaleza del tampón electroforético empleado.

Así mismo, se optimizó la concentración del tampón fosfato dentro del intervalo comprendido entre 10 y 70 mM. En la Fig. 14 se recogen algunos de los electroferogramas obtenidos para la separación en MEKC de los 5-NDZs en estudio.

En vista de los resultados obtenidos, una disminución de la concentración del tampón fosfato conlleva una mayor separación de los analitos. Sin embargo, concentraciones tan bajas como 10 mM originan problemas de corriente eléctrica debido a la baja concentración de electrolitos presente. Por todo ello, se elige la concentración **20 mM** como la óptima del tampón fosfato a emplear como electrolito de fondo, puesto que durante los estudios se ha observado que a esta concentración la corriente eléctrica es estable, algo que no ocurría cuando la concentración de fosfato era inferior.

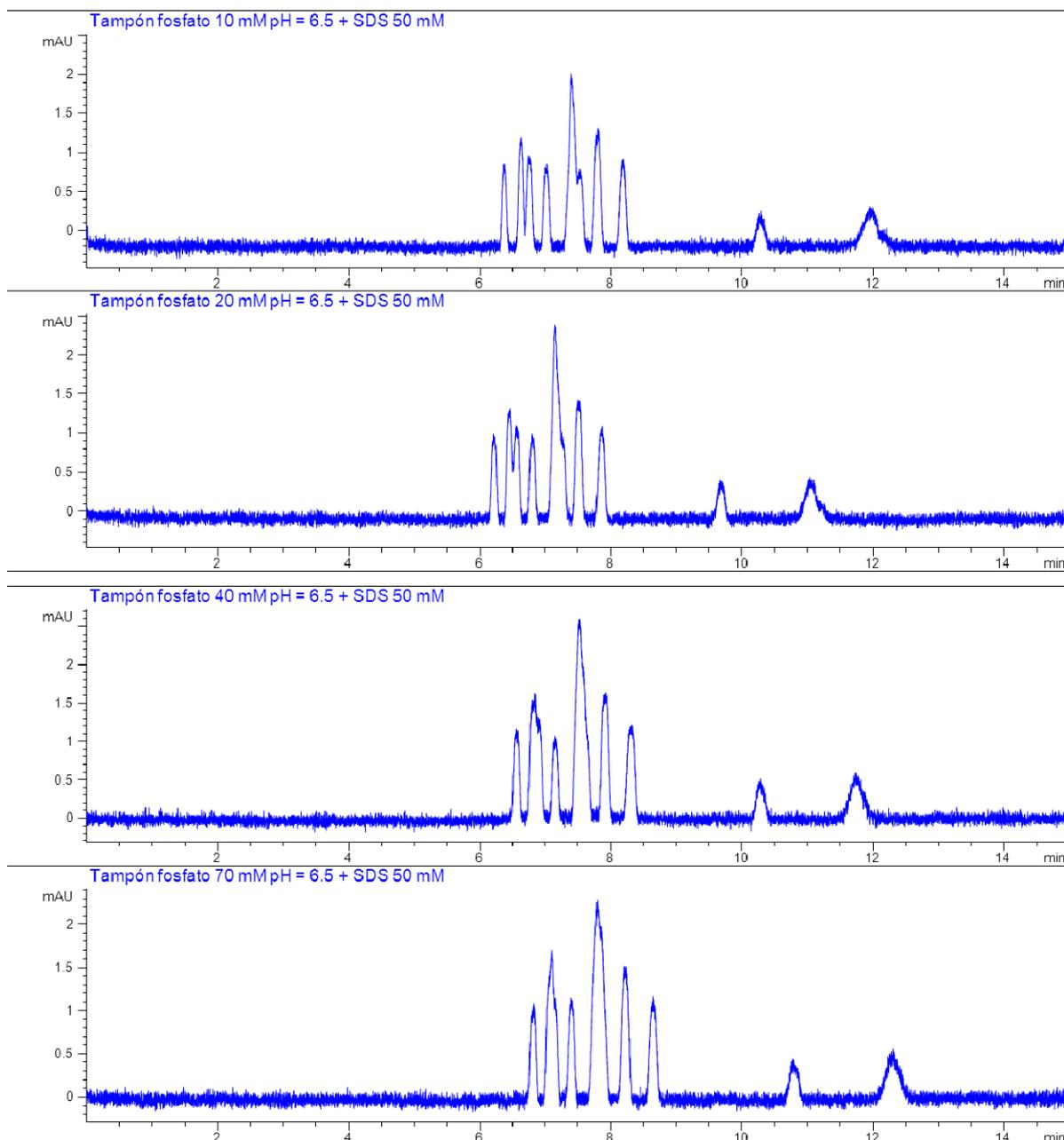


Fig. 14. Electroferogramas asociados a una variación de la concentración del tampón fosfato empleado como disolución electroforética.

7.1.4. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE

Tal y como se ha comentado anteriormente, los 5-NDZs son moléculas neutras a $\text{pH} = 6.5$, por lo que es necesario añadir un surfactante al medio electroforético (en este caso SDS), para conseguir la separación de los analitos en función de su interacción con las micelas.

La concentración de medio micelar en el tampón electroforético se estudió en el rango comprendido entre 30 mM y 200 mM. Se establece como requisito que la concentración sea superior a la concentración micelar crítica (CMC) del surfactante seleccionado, que en el caso del SDS es 8.2 mM en agua pura a 25 °C.

Tal y como se observa en la Fig. 15, un aumento de la concentración de SDS supone una mayor separación entre picos, aunque ello está asociado a un aumento en los tiempos de migración de todos los analitos, y por tanto a un mayor tiempo de análisis.

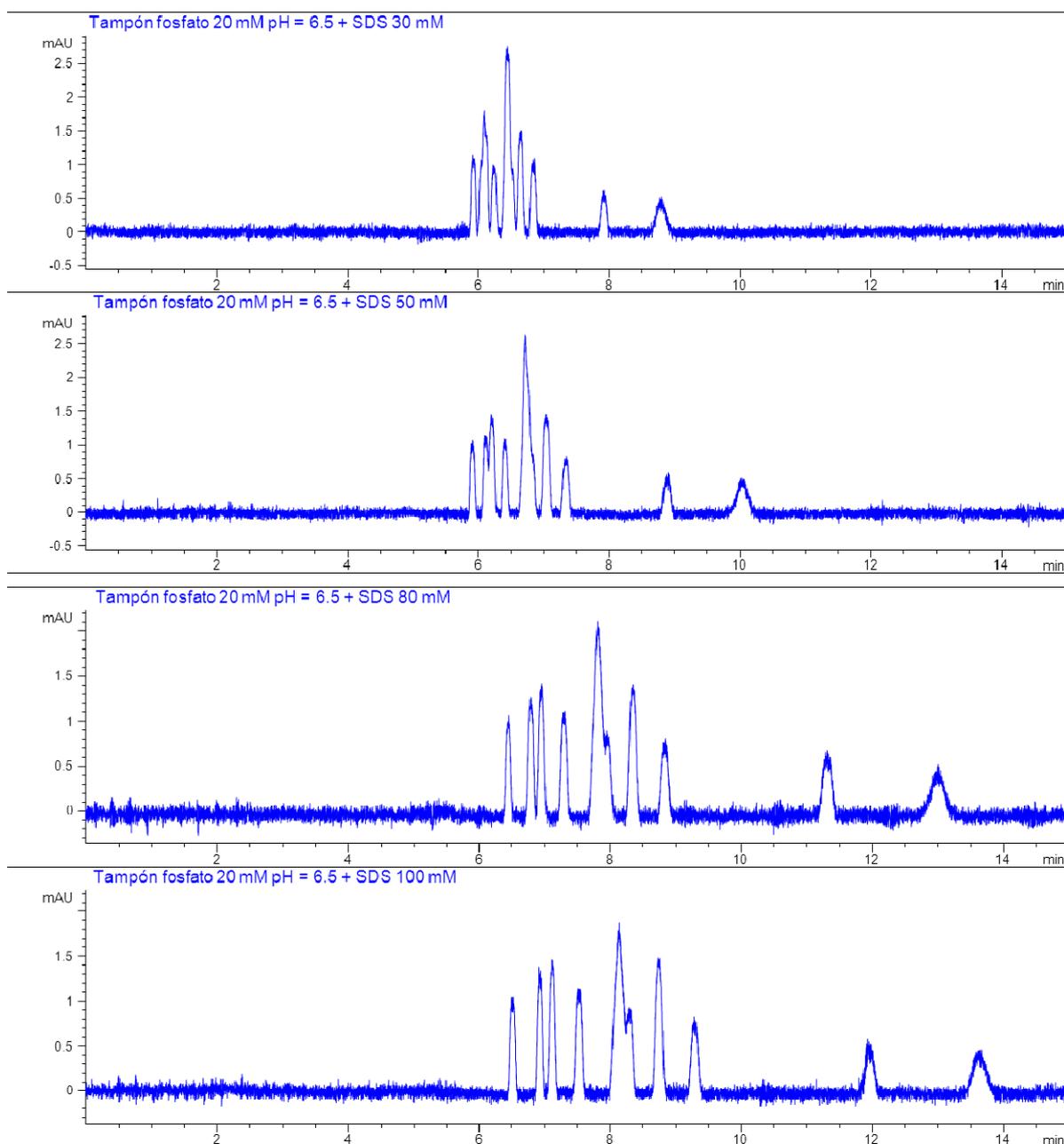
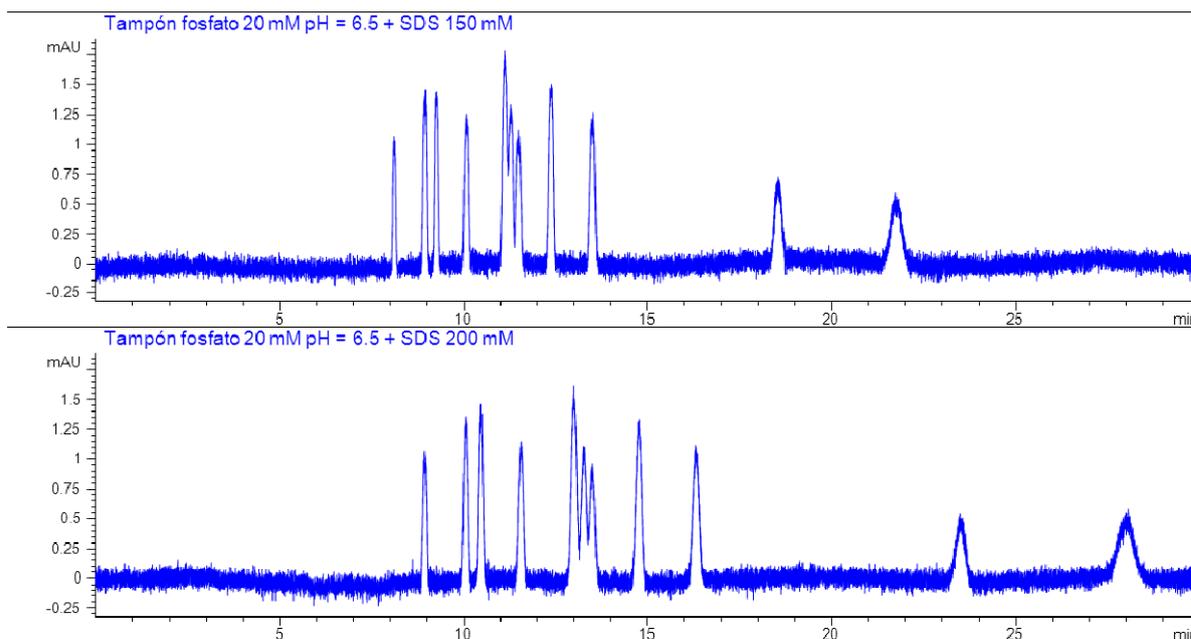


Fig. 15. Electroferogramas obtenidos para la separación de 5-NDZs mediante MEKC a distintas concentraciones de SDS.



Continuación Fig. 15. Electroferogramas obtenidos para la separación de 5-NDZs mediante MEKC a distintas concentraciones de SDS.

Se elige **150 mM** como la concentración óptima de SDS en el tampón electroforético debido al compromiso exigido entre la máxima resolución entre picos y el tiempo de análisis. A concentraciones superiores, la mejora en la resolución de los analitos no es significativa, respecto al incremento que experimenta el tiempo de análisis.

7.1.5. ADICIÓN DE MODIFICADORES ORGÁNICOS Y OTROS AGENTES

Generalmente los modificadores orgánicos se añaden a la disolución tampón para alterar su polaridad y viscosidad y, como consecuencia de ello, modificar el EOF y la movilidad electroforética de los analitos, influyendo fundamentalmente en el tiempo de migración, lo cual puede conllevar a una mejor separación de los analitos [84,85].

Con el objetivo de aumentar la separación entre los 5-NDZs asociados a los picos no resueltos hasta ahora, se emplearon los siguientes modificadores orgánicos: metanol, isopropanol, etanol y ACN. Todos ellos se adicionaron a la disolución electroforética (tampón fosfato 20 mM pH = 6.5 en presencia de SDS 150 mM), en una concentración del

[84] C.W. Huie (2003). Review: Effects of organic solvents on sample pretreatment and separation performances in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24, págs. 1508-1529.

[85] Z. Lui, H. Zou, M. Ye, J. Ni, Y. Zhang (1999). Effects of organic modifiers on solute retention and electrokinetic migrations in micellar electrokinetic capillary chromatography. *Electrophoresis*, 20, págs. 2898-2908.

10%, con la intención de visualizar el efecto provocado por su uso, sin que ello repercutiese en la estabilidad de la corriente eléctrica debido a una disminución de la conductividad de la disolución. Los resultados obtenidos se recogen en la Fig. 16.

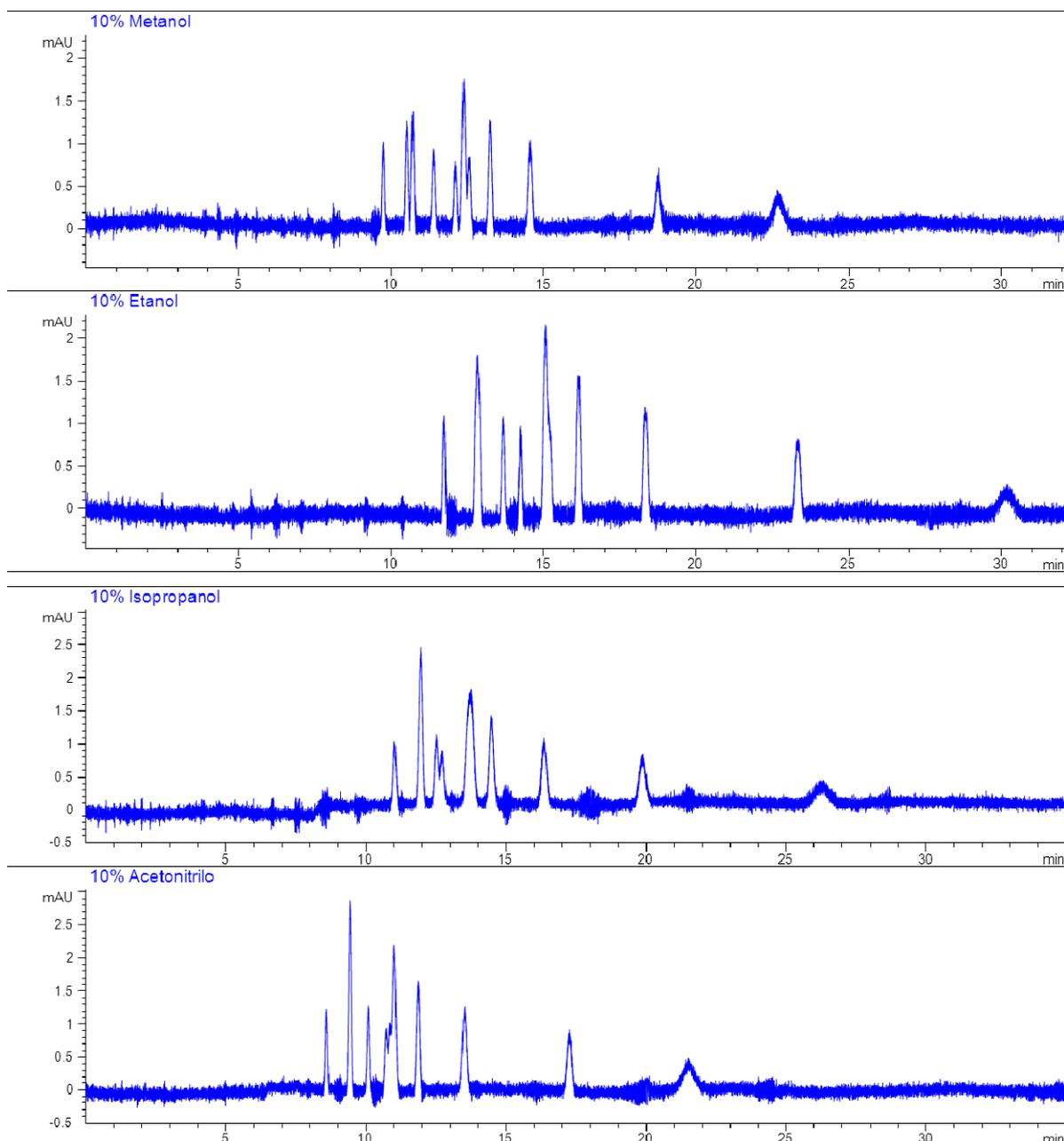


Fig. 16. Electroferogramas en los cuales se evalúa el efecto originado por la adición de modificadores orgánicos en el tampón electroforético empleado para la separación de 5-NDZs.

Si se compara la separación de los analitos obtenida al añadir diferentes modificadores orgánicos, con la lograda exclusivamente con el tampón fosfato 20 mM pH = 6.5 + SDS 150 mM (Fig.15), no se observa ninguna mejoría en las características del método, sino un

empeoramiento de las mismas, concretamente en el caso del empleo de isopropanol, etanol y ACN, en los que se producen una disminución en la resolución de los picos.

Dado que el metanol puede aportar una mejora en las características del método, se optó por hacer un estudio de la influencia de distintos porcentajes del mismo en el medio. Así se varió su concentración entre el 2% y el 15% observando que la adición de metanol, en cualquiera de las concentraciones estudiadas, no introducía mejoras en la separación al compararse con la separación obtenida en ausencia de modificador orgánico.

En vista de los resultados, se descarta la opción del uso de modificadores orgánicos con el objetivo de mejorar la separación de los 5-NDZs.

Aunque los modificadores orgánicos son los aditivos del tampón electroforético más usados para mejorar la separación entre compuestos, no son los únicos que pueden emplearse. En bibliografía se recoge el uso de otras sustancias como modificadores de los tiempos de migración, tales como la urea [86,87] y los líquidos iónicos [88,89].

Por ello, se ha estudiado la influencia que tiene la adición de los distintos modificadores mencionados en el tampón electroforético. Para ello se preparan diferentes disoluciones de tampón fosfato 20 mM pH = 6.5 + SDS 150 mM, añadiendo 2.5 M de urea en una de ellas y 10 mM del líquido iónico BMIM-BF₄ en otra. En ambos casos la concentración del modificador adicionado se corresponde con la concentración considerada como óptima en la bibliografía consultada. En el caso de la urea se recomiendan concentraciones entre 2 y 2.5 M, aunque puede adicionarse en concentraciones de hasta 8 M.

En la Fig. 17 se recogen los electroferogramas obtenidos para la separación de los 5-NDZs cuando se modifica el tampón electroforético seleccionado con urea y el líquido iónico BMIM-BF₄, respectivamente.

[86] L.A. Kartsova, E.A. Bessonova (2007). Determination of Steroids in Biological Samples by Micellar Electrokinetic Chromatography. *J. Anal. Chem.*, 62, págs. 68-75.

[87] M. Yoshinaga, M. Tanaka (1995). Effect of urea addition on chiral separation of dansylamino acids by capillary zone electrophoresis with cyclodextrins. *J. Chromatogr. A*, 70, págs. 331-337.

[88] Hsiu-Li Su, Wan-Chun Kao, Kuan-Wen Lin, Cheng-yu Lee, You-Zung Hsieh (2010). 1-Butyl-3-methylimidazolium-based ionic liquids and an anionic surfactant: Excellent background electrolyte modifiers for the analysis of benzodiazepines through capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1217, págs. 2973-2979.

[89] K. Behera, S. Pandey (2007). Modulating properties of aqueous sodium dodecyl sulfate by adding hydrophobic ionic liquid. *J. Colloid Interf. Sci.*, 316, págs. 803-814.

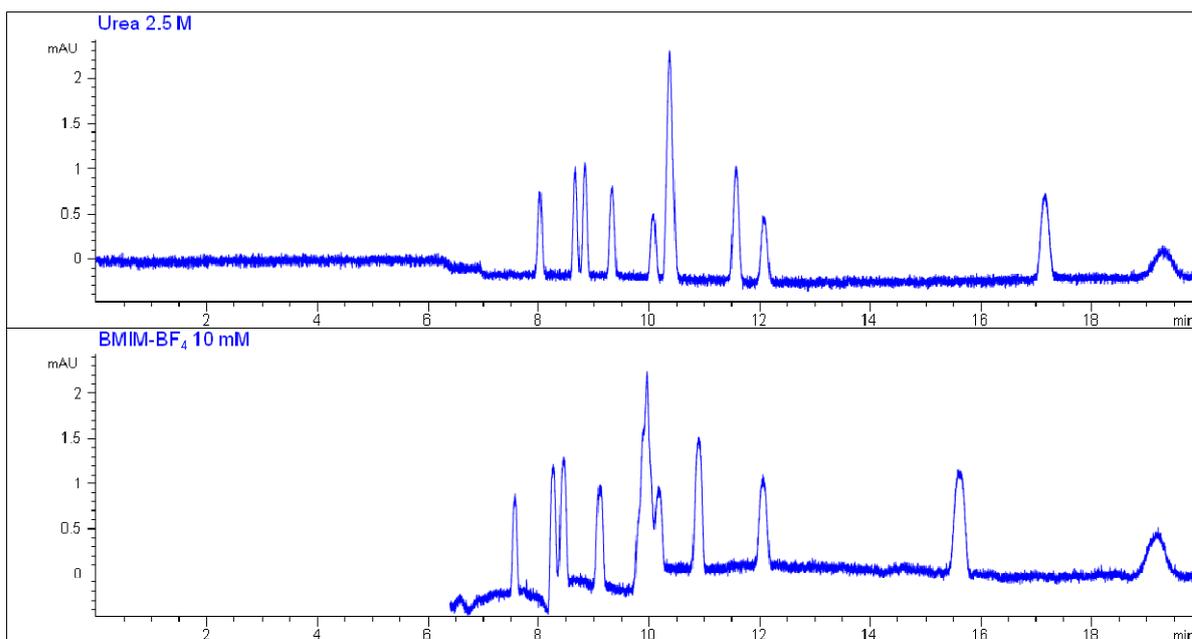


Fig. 17. Electroferogramas correspondientes a la separación de los 5-NDZs cuando se añaden distintos modificadores electroforéticos al tampón electroforético.

Como se observa en estos electroferogramas, no se produce ninguna mejora en la separación de los 5-NDZs, cuando se añade alguno de los modificadores electroforéticos propuestos. Por ello, se decide continuar con la optimización del resto de variables que influyen en la separación, considerando que la disolución electroforética adecuada es **tampón fosfato 20 mM pH = 6.5 en presencia de SDS 150 mM**, sin adición de ningún modificador.

7.1.6. LONGITUD DEL CAPILAR

Inicialmente se optó por el empleo de un capilar de sílice fundida de 64.5 cm de longitud y 50 μm de diámetro interno. Aunque en principio el método se ha optimizado para estas dimensiones concretas del capilar, es de especial interés el analizar cómo afecta el incremento o disminución de la longitud del mismo.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon capilares de sílice fundida de 48 cm, 64.5 cm y 79.5 cm de longitud total (Fig. 18). La distancia entre la salida del capilar y la ventana donde se mide la absorción UV de los analitos es de 8.5 cm, por lo que se trabaja con capilares de 39.5 cm, 56 cm y 71 cm de longitud efectiva. En todos los casos el diámetro interno del capilar es de 50 μm .

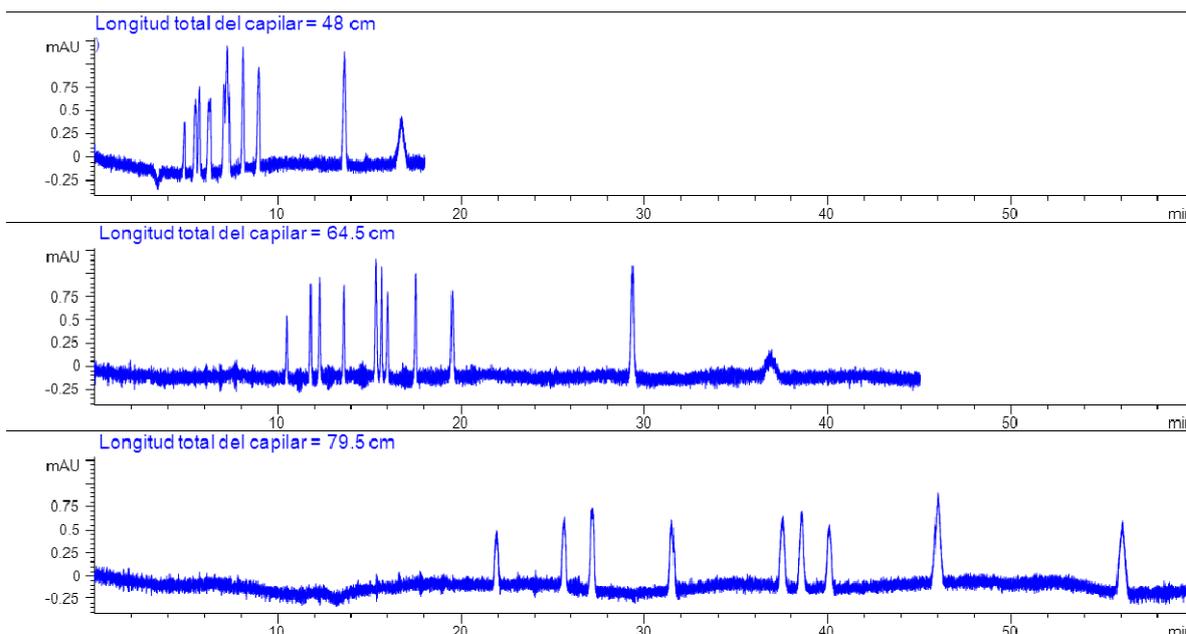


Fig. 18. Evaluación de la longitud del capilar en la separación de los 5-NDZs.

Tal y como se esperaba, la longitud del capilar adecuado para la separación de los 5-NDZs es de 64.5 cm para el modo MEKC que se propone. Sin embargo, para otros métodos de separación en electroforesis capilar puede emplearse un capilar más corto con el objetivo de disminuir el tiempo de análisis si se tiene una separación satisfactoria de los compuestos en estudio. Para mezclas poco resueltas se aconseja capilares más largos, aunque ello conlleva tiempos de análisis superiores.

7.1.7. IDENTIFICACIÓN DE LOS 5-NITROIMIDAZOLES

Dado que en las condiciones actuales de separación se visualizan hasta once picos de los doce analitos inyectados, se opta por llevar a cabo en este punto la identificación de cada uno para comprobar que compuestos tienen el mismo tiempo de migración.

La identificación (Fig.19) se lleva a cabo por comparativa de electroferogramas obtenidos en el análisis de varias muestras formadas por distintas mezclas de 5-NDZs, donde no sólo se incluyen o no los diferentes compuestos, sino donde también se modifica su concentración respecto a otras muestras que los contienen.

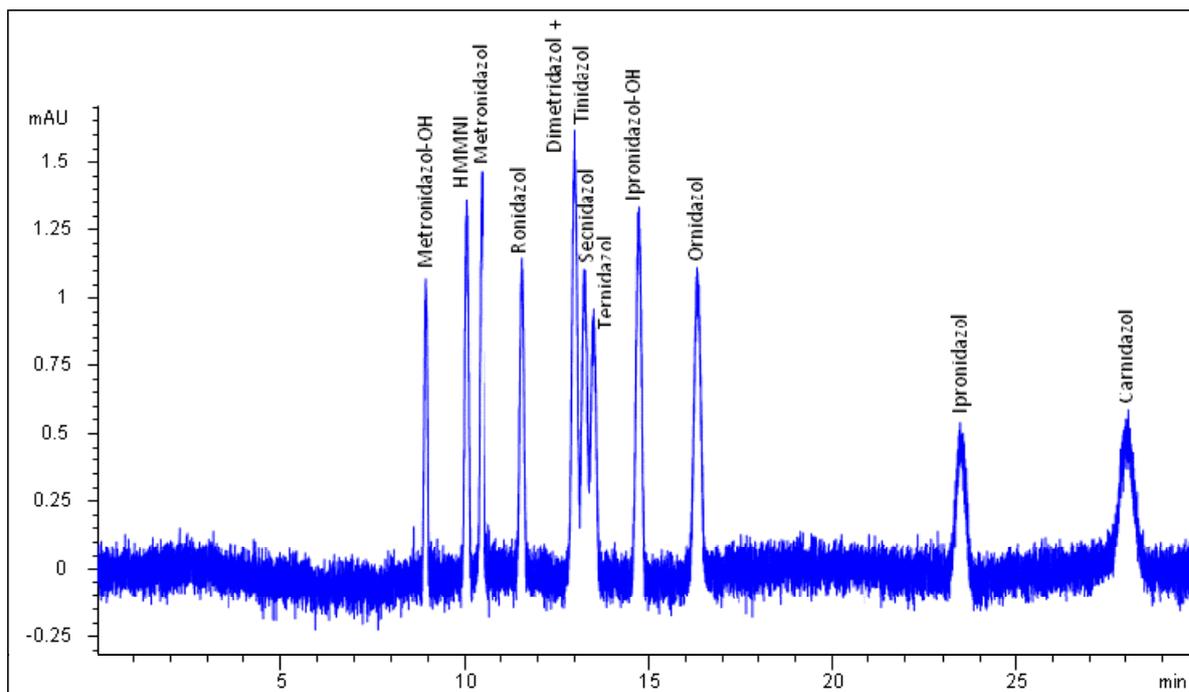


Fig. 19. Electroferograma correspondiente a la separación de los 5-NDZs mediante MEKC en el que se indica el compuesto que corresponde a cada pico.

Hasta el momento, se ha conseguido prácticamente la separación de todos los 5-NDZs en estudio, excepto del DMZ y el TNZ. Así mismo, el tándem formado por estos dos compuestos, tienen una baja resolución de pico respecto al SNZ, y éste respecto al TRZ, quedando pendiente la optimización de dos parámetros instrumentales como son la temperatura y el voltaje.

7.1.8. MEDIO DE INYECCIÓN DE LA MUESTRA

Hasta ahora la optimización del método se ha llevado a cabo inyectando muestras de 5 µg/mL de los doce 5-NDZs. Sin embargo, la señal analítica instrumental obtenida para estas concentraciones es demasiado baja, si se tiene en cuenta el límite mínimo de 3 ng/mL que establecen los CRLs que debe alcanzar cualquier método analítico para la determinación de los 5-NDZs. Caber recordar que para el caso del IPZ y del IPZ-OH dichos límites no se han establecido todavía.

Con objeto de disminuir los límites de detección (LODs) y aumentar la sensibilidad, se han propuesto varias técnicas de preconcentración *on-line* en CE basadas en el fenómeno de

apilamiento de analitos en el propio capilar (*stacking*) [90-93]. Las técnicas empleadas se basan fundamentalmente en la variación del medio de inyección de la muestra respecto a la disolución electroforética.

Considerando que la composición del tampón electroforético se ha definido como fosfato 20 mM pH = 6.5 + SDS 150 mM, se ha llevado a cabo el estudio del factor de preconcentración obtenido llevando a cabo tres procedimientos *on-line* diferentes:

1. *Sweeping* (barrido, empleando como medio de inyección tampón electroforético). El principio básico del *sweeping* [94,95] se ilustra en la Fig. 20: El tampón electroforético contiene un aditivo (fase pseudoestacionaria o medio micelar), mientras que la disolución que contiene la muestra está exenta de este aditivo; ambos medios deben tener una conductividad similar. La muestra se concentra en una estrecha banda dentro del capilar gracias a su interacción con el aditivo presente en el tampón electroforético, ya que este aditivo (las micelas) actúa “barriendo” a los analitos cuando éstos, al moverse dentro del capilar, pasan de la zona de muestra a entrar en contacto con el tampón electroforético. El grado en que se produce la preconcentración depende de la intensidad de estas interacciones, consiguiendo preconcentrar tanto moléculas neutras como cargadas. En este caso el medio de inyección empleado es tampón fosfato 20 mM pH = 6.5 en ausencia de micelas en el medio de inyección.

[90] M. Silva (2009). Review: Micellar electrokinetic chromatography: Methodological and instrumental advances focused on practical aspects. *Electrophoresis*, 30, págs. 50-64.

[91] K. Michalska, G. Pajchel, S. Tyski (2009). Different simple stacking strategies for the determination of ertapenem and its impurities by micellar electrokinetic chromatography in pharmaceutical formulation. *J. Chromatogr. A*, 1216, págs. 2934-2942.

[92] L. Liu, X. Deng, X. Chen (2010). Micelle to trapping solution stacking in micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1217, págs. 175-178.

[93] Hsiu-Ping Jen, Yuan-Chien Tsai, Hsiu-Li Su, You-Zung Hsieh (2006). On-line preconcentration and determination of ketamine and norketamine by micellar electrokinetic chromatography. Complementary method to gas chromatography/mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1111, págs 159-165.

[94] A.T. Aranas, Jr.A.M. Guidote, J.P. Quirino (2009). Sweeping and new on-line sample preconcentration techniques in capillary electrophoresis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 394, págs. 175-185.

[95] J.P. Quirino, J.B. Kim, S. Terabe (2002). Sweeping: Concentration mechanism and applications to high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 965, págs. 357-373.

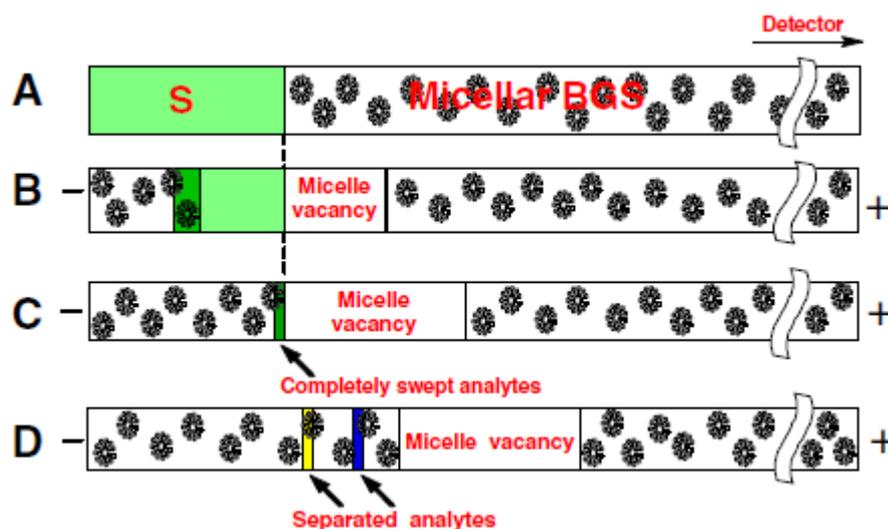


Fig. 20. Principio básico de la preconcentración mediante *sweeping*.

2. *Sweeping* (barrido, empleando como medio de inyección agua desionizada). De idéntico fundamento al caso anterior, únicamente se sustituye el medio de inyección. Se emplea agua desionizada en vez de tampón electroforético.

3. *Stacking high salt* (apilamiento por elevado medio salino). Este método, empleado en MEKC, está basado en el aumento de la conductividad del medio de inyección respecto al tampón electroforético, debido a la adición de mayor cantidad de sales al medio de inyección [96-98]. Como resultado se obtiene un campo eléctrico heterogéneo dentro del capilar, siendo menor el experimentado en la zona de muestra respecto al observado en el tampón electroforético. Como consecuencia de este fenómeno de campos eléctricos diferentes, se origina el apilamiento de las micelas, lo que conduce a un incremento de la concentración de las mismas en la zona de la muestra. Esto conlleva, a su vez, a un apilamiento o preconcentración de los analitos, y por tanto, un incremento significativo de LODs y resolución. En la Fig. 21 se compara el fenómeno que tiene lugar cuando existe preconcentración *on-line high-salt* (B) con el proceso MEKC habitual (A). En este experimento se ha añadido cloruro sódico 100 mM al medio de inyección.

[96] J. Palmer, N.J. Munro, J.P. Landers (1999). A universal concept for stacking neutral analytes in micellar capillary electrophoresis. *Anal. Chem.*, 71, págs. 1679-1687.

[97] J.F. Palmer (2004). High-salt stacking principles and sweeping: comments and contrasts on mechanisms for high-sensitivity analysis in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1036, págs. 95-100.

[98] B.C. Giordano, C.I.D. Newman, P.M. Federowicz, G.E. Collins, D.S. Burgi (2007). Micelle Stacking in Micellar Electrokinetic Chromatography. *Anal. Chem.*, 79, págs. 6287-6294.

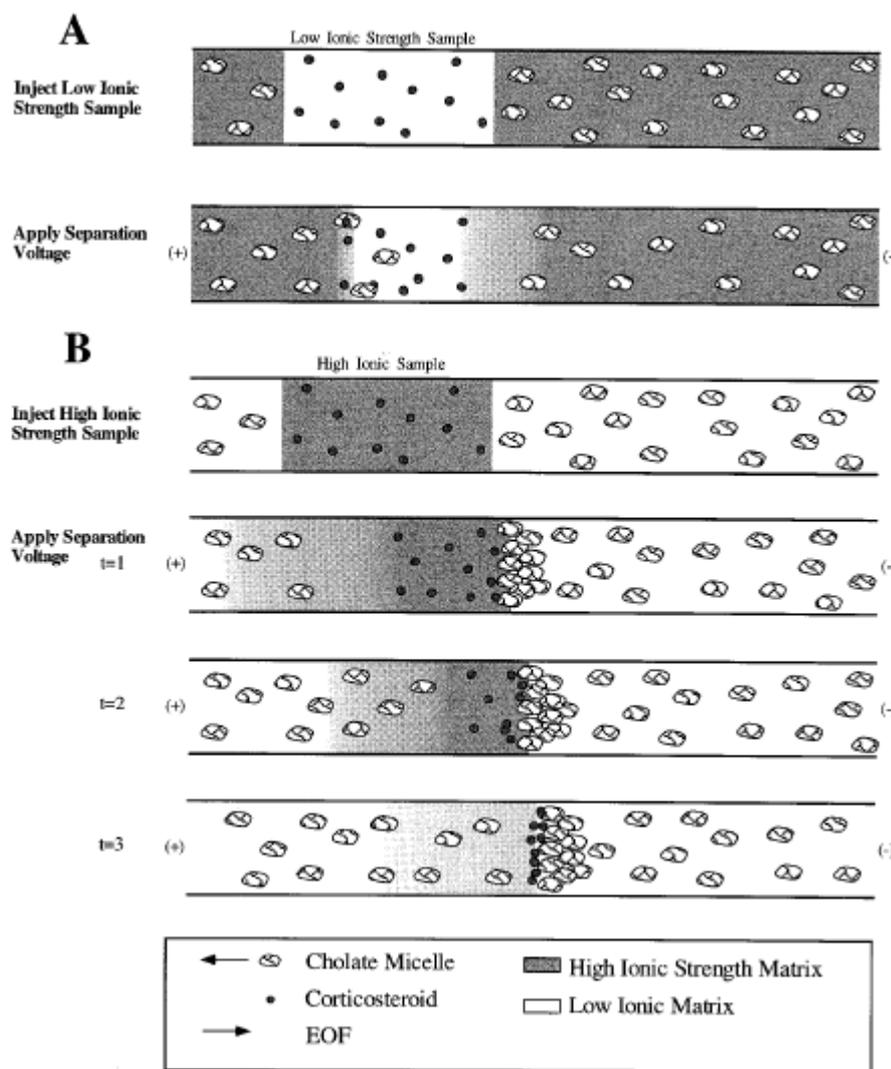


Fig. 21. Mecanismo propuesto para el efecto *stacking high-salt* [96]. (A) Efecto de *stacking* habitual conseguido cuando el medio de inyección tiene una fuerza iónica baja. (B) Efecto *stacking high-salt* logrado cuando la fuerza iónica del medio de inyección es mucho mayor a la del tampón de separación.

El incremento de la señal analítica (altura de pico) cuando se realizan los distintos sistemas de preconcentración *on-line* puede observarse en la Fig. 22. Los mejores resultados se obtienen cuando el medio de inyección de la muestra es **tampón fosfato 20 mM pH = 6.5** en ausencia de micelas.

Asimismo, en la Fig. 23, se compara el electroferograma obtenido al realizar la preconcentración *on-line* propuesta, con el obtenido en ausencia de este efecto.

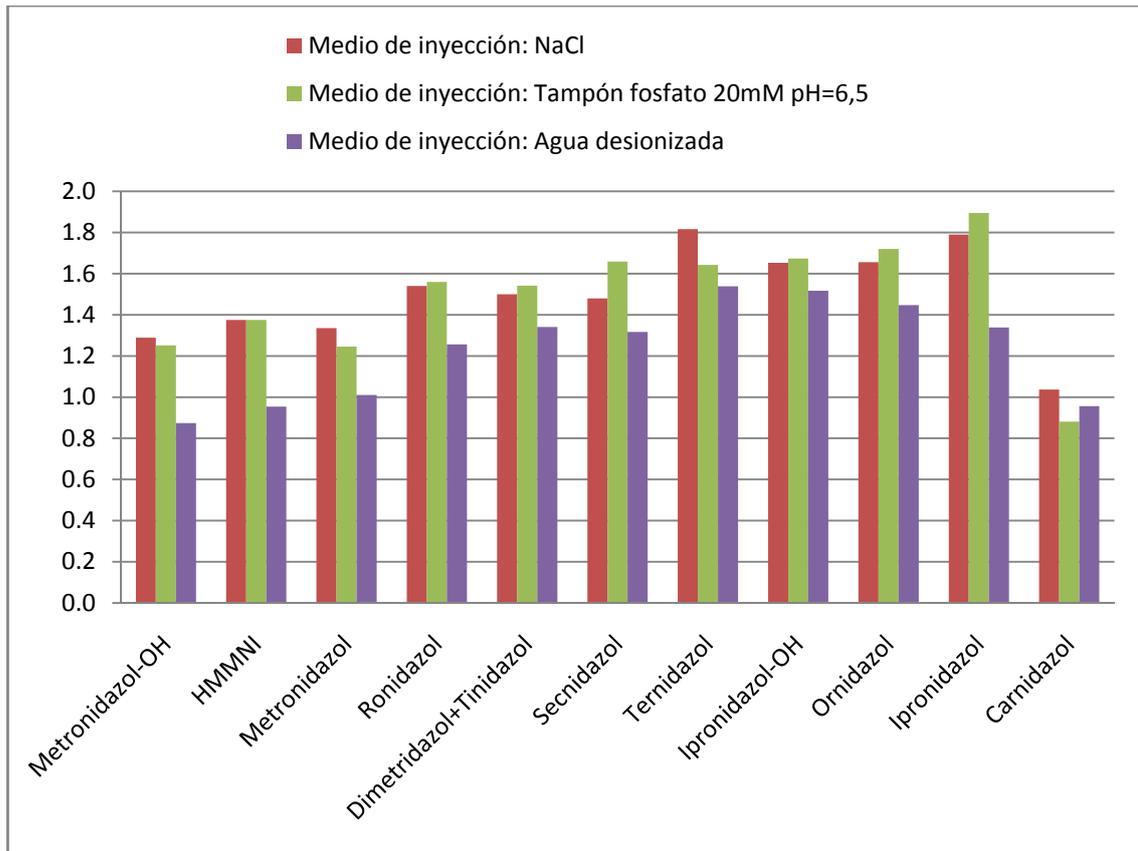


Fig. 22. Señal analítica relativa (altura de pico) obtenida tras la aplicación de los diferentes sistemas de preconcentración *on-line*.

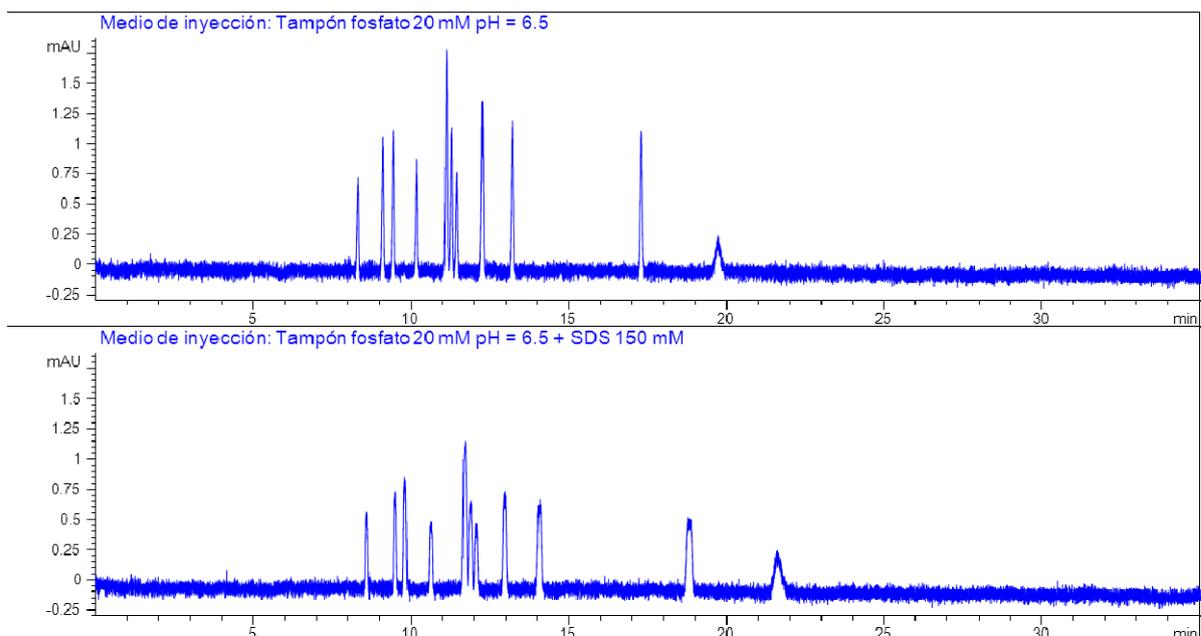


Fig. 23. Electroferogramas de la separación de los 5 NDZs mediante MEKC en diferentes medios de inyección.

7.1.9. OPTIMIZACIÓN DEL VOLTAJE DE SEPARACIÓN

Con objeto de analizar la influencia del voltaje aplicado en la separación de los 5-NDZs se realizó un barrido del mismo entre los 19 kV y los 30 kV (Fig. 24).

La optimización del voltaje se realiza con mezclas de 5-NDZs de 2 $\mu\text{g/mL}$, y no de 5 $\mu\text{g/mL}$ como se venía trabajando hasta ahora, motivado por la preconcentración *on-line* conseguida, y anteriormente descrita. Dado que no se ha logrado la separación del TNZ del resto de analitos, éste se excluye del presente trabajo.

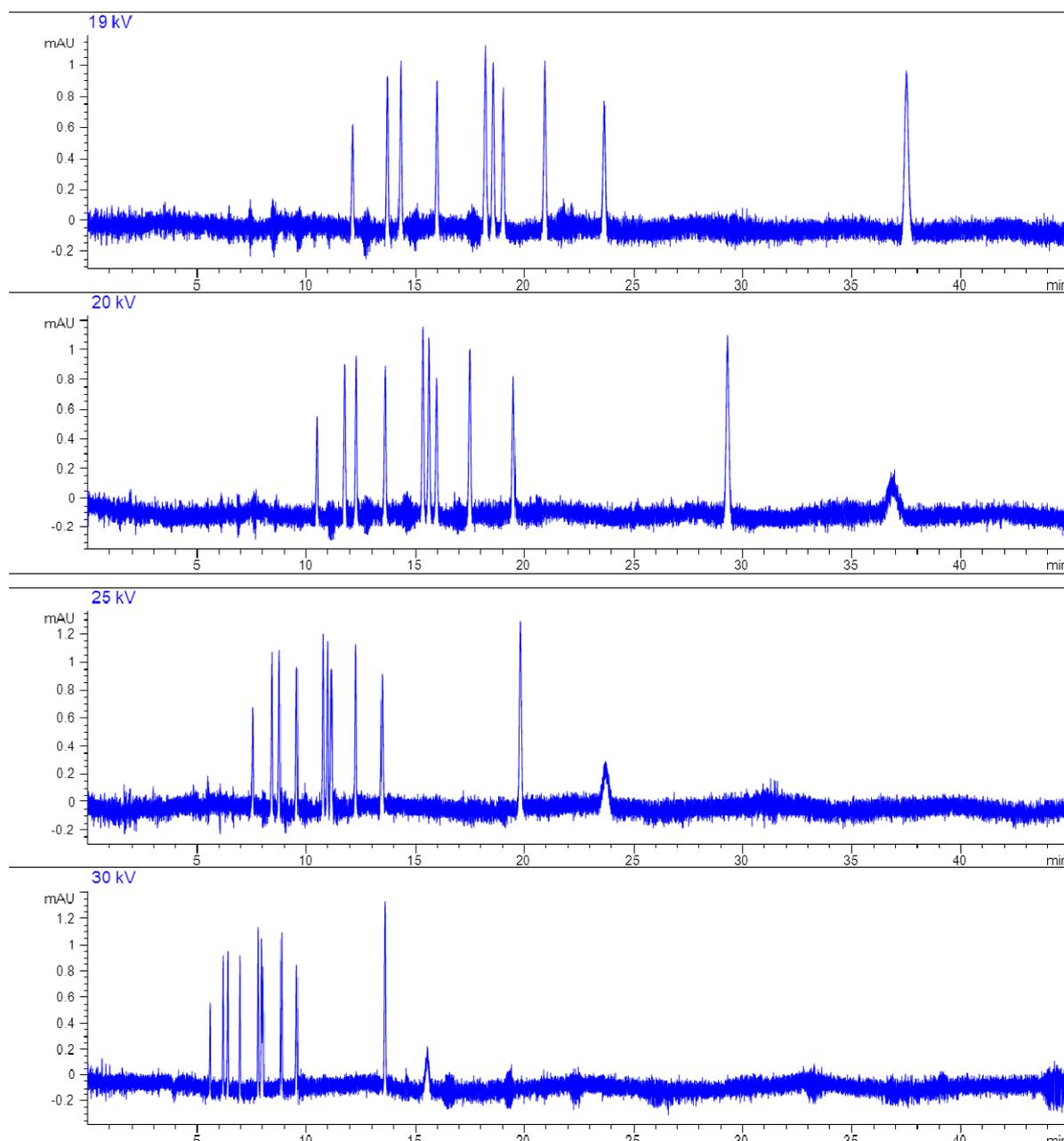


Fig. 24. Electroferogramas correspondientes a la separación de los 5-NDZ mediante MEKC a diferentes voltajes.

Como se observa en la Fig. 24, un aumento del voltaje aplicado conlleva una disminución del tiempo de análisis pero, a su vez, una cierta pérdida de resolución entre los picos, la cual es crítica, concretamente en el caso de los picos correspondientes al DMZ, SNZ y TRZ, puesto que son los analitos que poseen tiempos de migración más similares. Se observa que la menor resolución entre picos se da entre el SNZ y el TRZ.

La resolución entre los picos del TRZ y del SNZ es próxima a 1.5 para el caso de que el voltaje aplicado sea de 25 kV. Dado que 1.5 es el mínimo valor deseable para la resolución entre picos, se considera que el valor óptimo es **25 kV**.

7.1.10. OPTIMIZACIÓN DE LA TEMPERATURA DEL CAPILAR

Con objeto de estudiar la influencia de la temperatura del capilar en la separación de los 5-NDZs se modificó la misma dentro del rango comprendido entre los 15 °C y los 30 °C (Fig. 25).

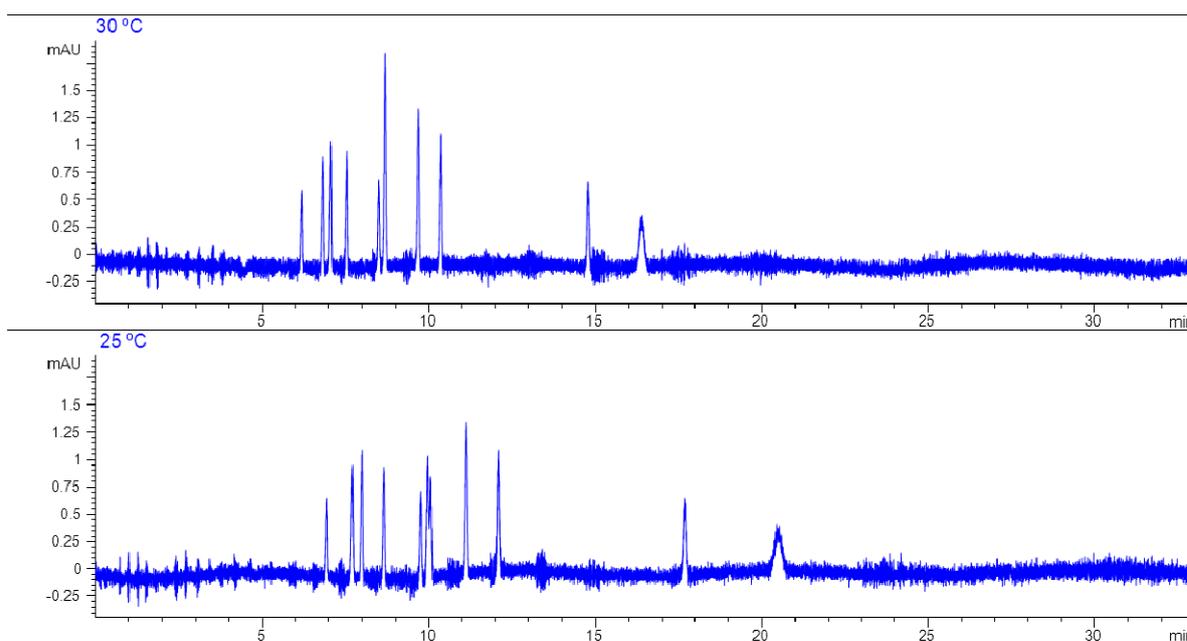
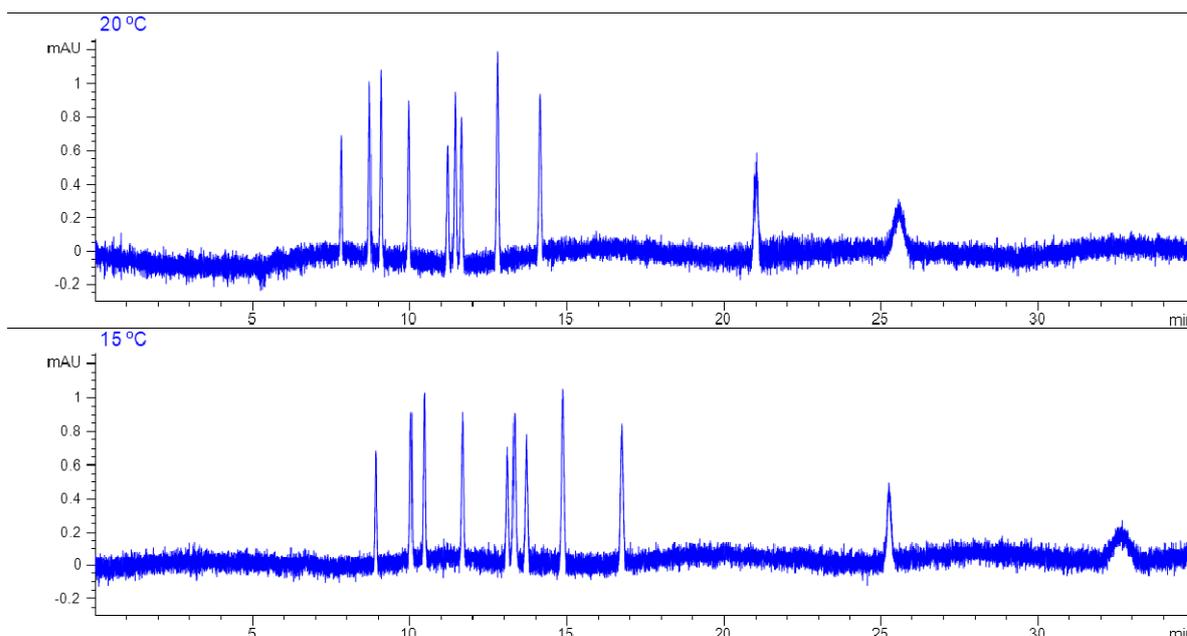


Fig. 25. Electroferogramas correspondientes a la separación de los 5-NDZs mediante MEKC a distinta temperatura del capilar.



Cont. Fig. 25. Electroferogramas correspondientes a la separación de los 5-NDZs mediante MEKC a distinta temperatura del capilar.

Un incremento en la temperatura del capilar provoca una disminución del tiempo de análisis, aunque esto repercute en una pérdida de resolución entre picos. Esta pérdida es considerable entre el SNZ y el TRZ a temperaturas superiores a los 20 °C, por ello se considera, como temperatura óptima del capilar, para el resto del trabajo experimental de **20 °C**.

7.1.11. EMPLEO DE CAPILAR BURBUJA

Habitualmente en CE se emplean capilares de sílice fundida cuyo diámetro interior es constante en toda su longitud. Sin embargo, existen otros tipos de capilares que pueden incrementar la sensibilidad del método, tales como los capilares burbuja, también denominados capilares de paso de luz extendido.

Los capilares burbuja pueden incrementar la sensibilidad del método entre 3 y 5 veces. El ancho de este tipo de capilares se ve aumentado únicamente en la ventana de detección, lo que permite evitar la difusión que se origina en los capilares de mayor diámetro,

aumentando la sensibilidad como se ha comentado, y todo ello con una generación de corriente baja y sin sacrificar la resolución entre picos [99].

Para analizar las ventajas que aportan este tipo de capilares, con vistas a aumentar la sensibilidad del método desarrollado, se compara la señal analítica obtenida cuando se emplea un capilar estándar en la separación de los 5-NDZs con la obtenida cuando se emplea un capilar burbuja (Fig. 26).

El capilar estándar utilizado es del mismo tipo al empleado en la optimización del método, siendo su diámetro interno de 50 μm . El capilar burbuja usado también es de 50 μm , incrementando su diámetro interno hasta los 150 μm en la ventana de detección.

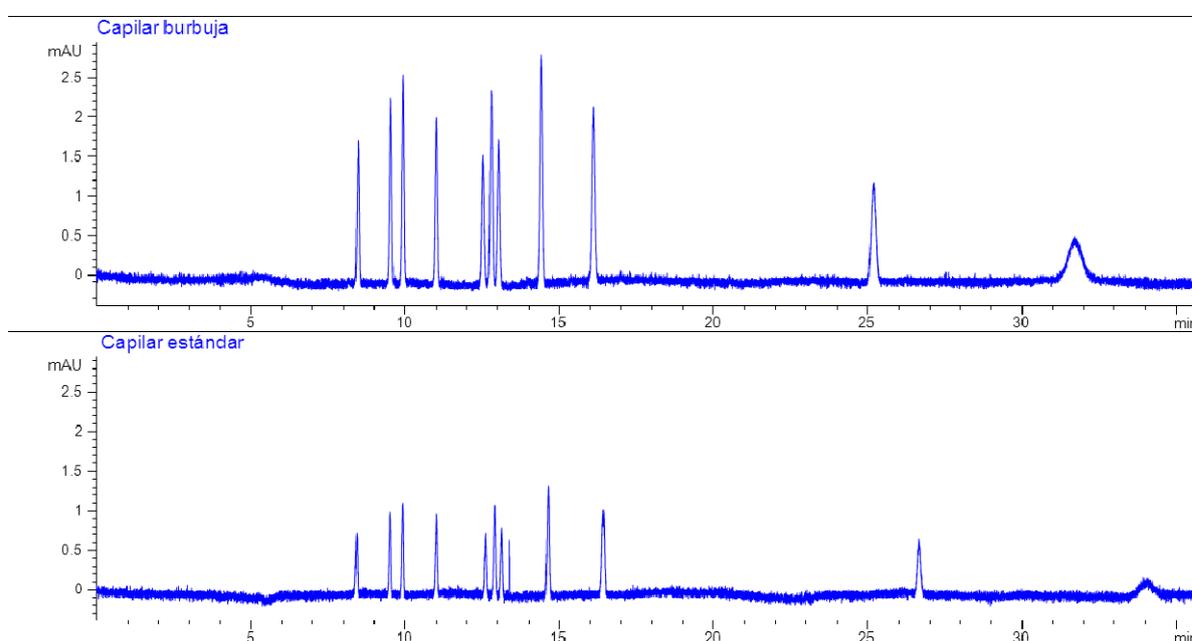


Fig. 26. Electroferogramas obtenidos para la separación de los 5-NDZs (muestras con una concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$ de cada analito) en el caso de emplear el capilar burbuja (arriba) y el capilar estándar (abajo).

En la Tabla 6 se recoge el incremento de sensibilidad obtenido con el capilar burbuja de 50 μm de diámetro interno (150 μm diámetro interno del capilar en la ventana de detección) respecto al capilar estándar de 50 μm de diámetro interno.

[99] Agilent Technologies. Guide to Capillaries, Reagents, and Supplies for CE and CEC. *Agilent publication number 5990-3822EN*, pág. 14.

Compuesto	Δ Sensibilidad	Compuesto	Δ Sensibilidad
Metronidazol	2.17	Ternidazol	2.18
Dimetridazol	2.08	Ornidazol	2.00
Ipronidazol	1.86	Carnidazol	2.00
Ronidazol	2.10	HMMNI	2.09
Secnidazol	2.18	Metronidazol-OH	2.22
Ipronidazol-OH	2.07		

Tabla 6. Incremento de la sensibilidad con el capilar burbuja respecto al capilar estándar.

Dado que el incremento de la sensibilidad en la señal analítica es importante al usar un capilar burbuja, tal y como se ha comprobado, se opta por su empleo en detrimento del capilar estándar. La utilización del capilar burbuja, pese a su coste, se justifica en este caso debido a que se necesita un aumento notable de la sensibilidad obtenida con el sistema de detección seleccionado.

7.1.12. OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE INYECCIÓN

Un aumento del volumen de muestra inyectada en el equipo de CE conlleva una disminución de los LODs conseguidos. Sin embargo, esto también conduce a una pérdida de resolución entre picos debido al ensanchamiento de los mismos.

Dado que se lleva a cabo una inyección hidrodinámica de la muestra, existen dos parámetros dependientes que se deben controlar para variar el volumen de inyección. Dichos parámetros son la presión y el tiempo de inyección. La presión se fija en 50 mbar, en tanto que el tiempo se varía desde los 10 s. hasta los 20 s.

En la Tabla 7 se indica el volumen inyectado en función del tiempo de inyección para una presión de 50 mbar y en la Fig. 27 los correspondientes electroferogramas.

Tiempo de inyección [s]	Volumen de muestra inyectada [nL]
10	11.9
15	17.8
20	23.8

Tabla 7. Volumen de muestra inyectada en función del tiempo de inyección. Inyección hidrodinámica a 50 mbar.

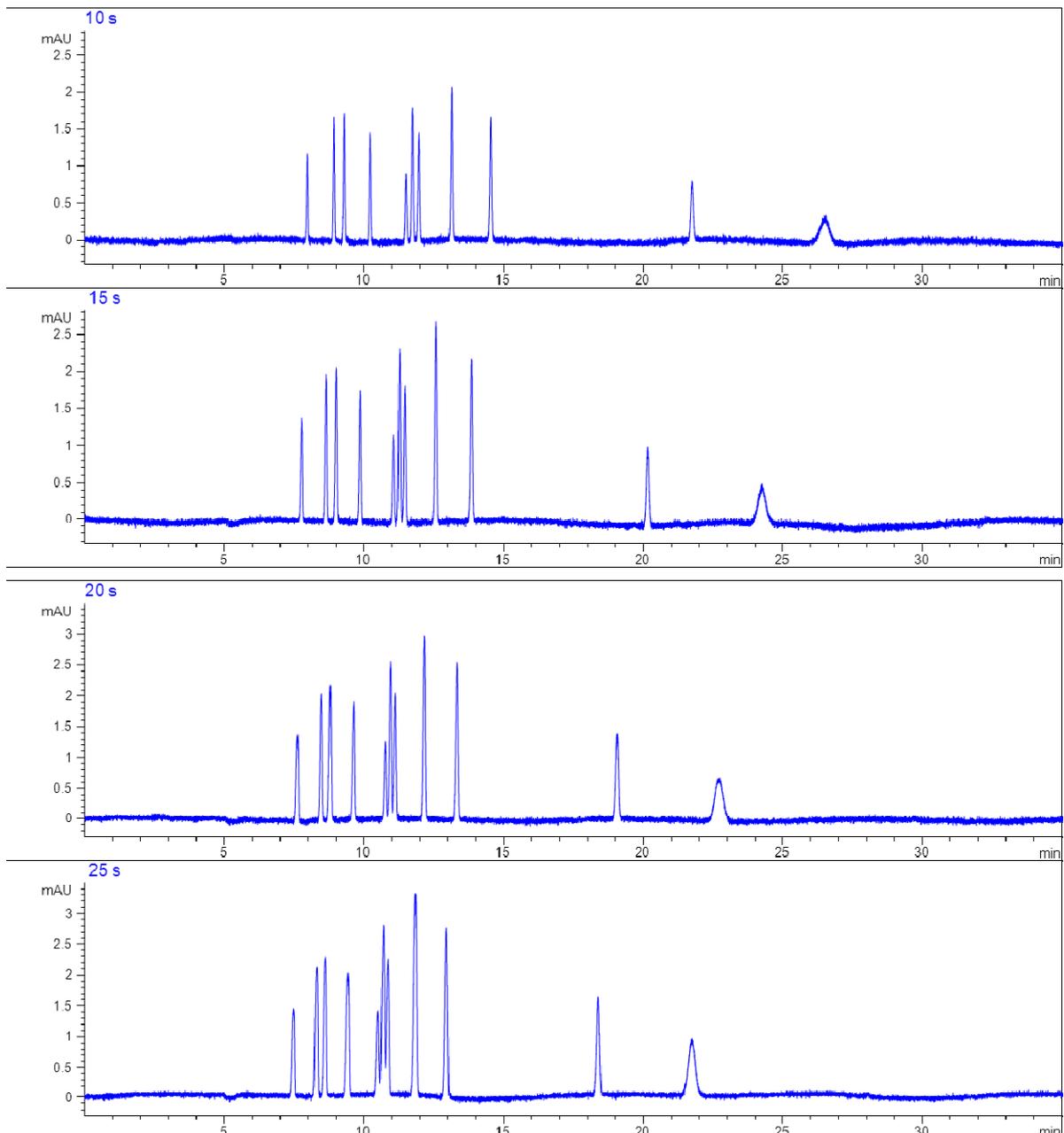


Fig. 27. Electroferogramas correspondientes a la separación de los 5-NDZs (muestras con una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$ de cada analito) en función del tiempo de inyección de la muestra.

Se observa que la inyección de muestra durante más de 15 s produce una pérdida de resolución de los picos correspondientes al SNZ y al TRZ. Por tanto, se considera óptima la inyección de un volumen de muestra durante **15 s a 50 mbar**.

7.1.13. RESUMEN DE LA OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO ELECTROFORÉTICO

A continuación, y a modo de resumen de la optimización del método electroforético propuesto, se muestran los valores seleccionados para cada uno de los parámetros estudiados (Tabla 8), así como un electroferograma correspondiente a la separación de los 5-NDZs mediante el método desarrollado (Fig. 28).

Capilar	Capilar burbuja. 64.5 cm de longitud (56 cm longitud efectiva). 50 μm de diámetro interno (150 μm diámetro interno de la ventana de detección)
Tampón electroforético	Fosfato 20 mM pH = 6.5, SDS 150 mM
Medio de inyección	Fosfato 20 mM, pH = 6.5
Voltaje de separación	25 kV
Temperatura del capilar	20 $^{\circ}\text{C}$
Tipo de inyección	Hidrodinámica, 15 s a 50 mbar (17.8 nL)

Tabla 8. Resumen de los valores óptimos de la separación electroforética.

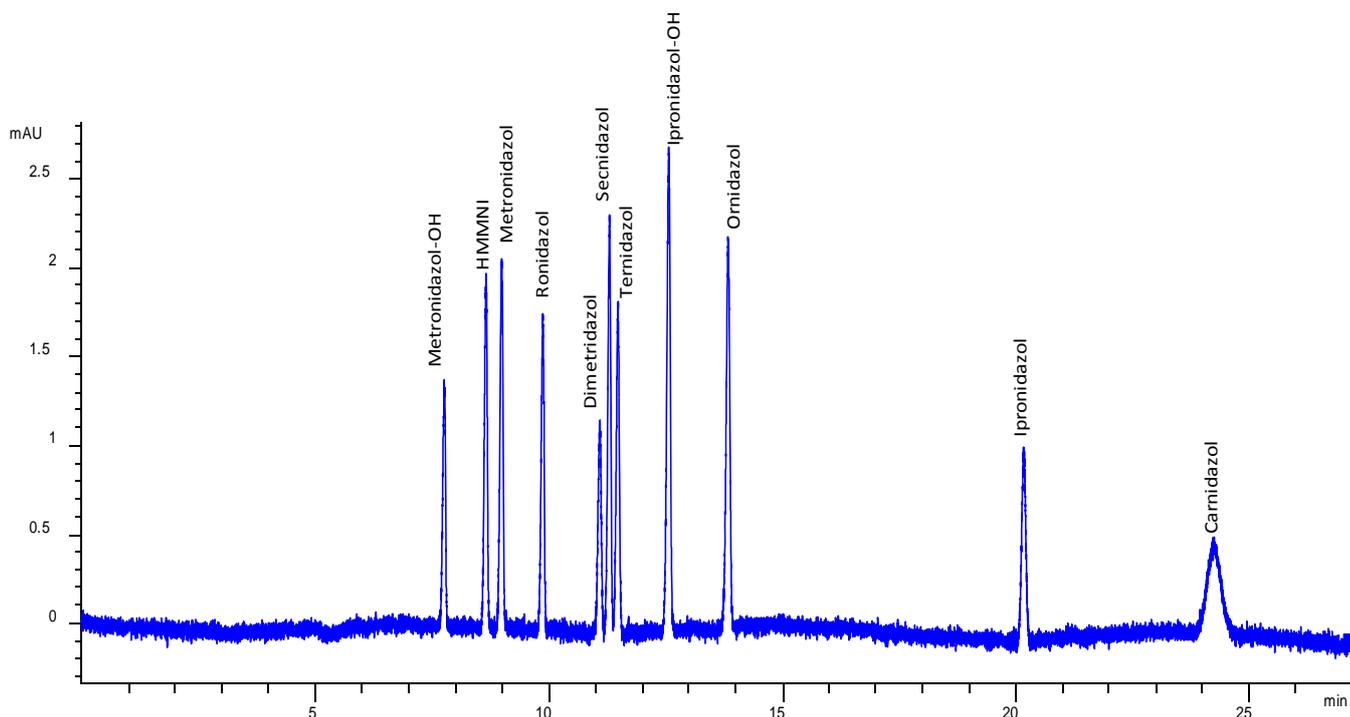


Fig. 28. Electroferograma correspondiente a la separación de los 5-NDZs según el método electroforético desarrollado.

7.2. RECTAS DE CALIBRADO Y LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Con objeto de describir el rango lineal del método propuesto para la determinación de los once 5-NDZs mediante MEKC, se procede a la obtención de las rectas de calibrado para cada uno de los 5-NDZs. Para ello se emplean patrones de cada uno de los compuestos estudiados.

Las rectas de calibrado (Fig. 29) se establecieron a partir de disoluciones estándar de los distintos 5-NDZs a diferentes niveles de concentración: 0.75 – 5 mg/L para el DMZ y el IPZ, 0.4 – 5 mg/L para el CRZ y 0.1 – 5 mg/L para el MNZ-OH, HMMNI, MNZ, RNZ, SNZ, TRZ, ORZ e IPZ-OH.

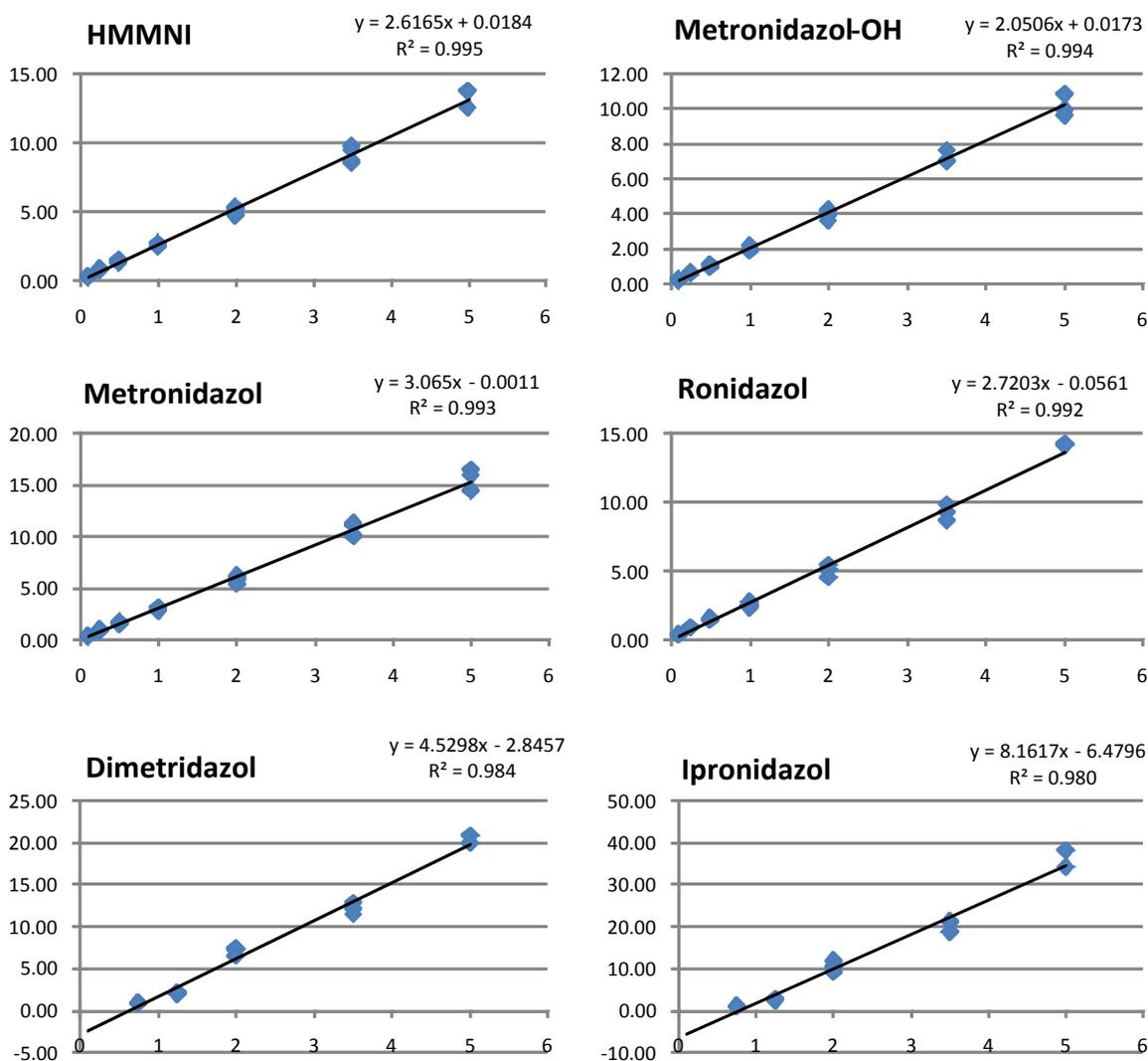
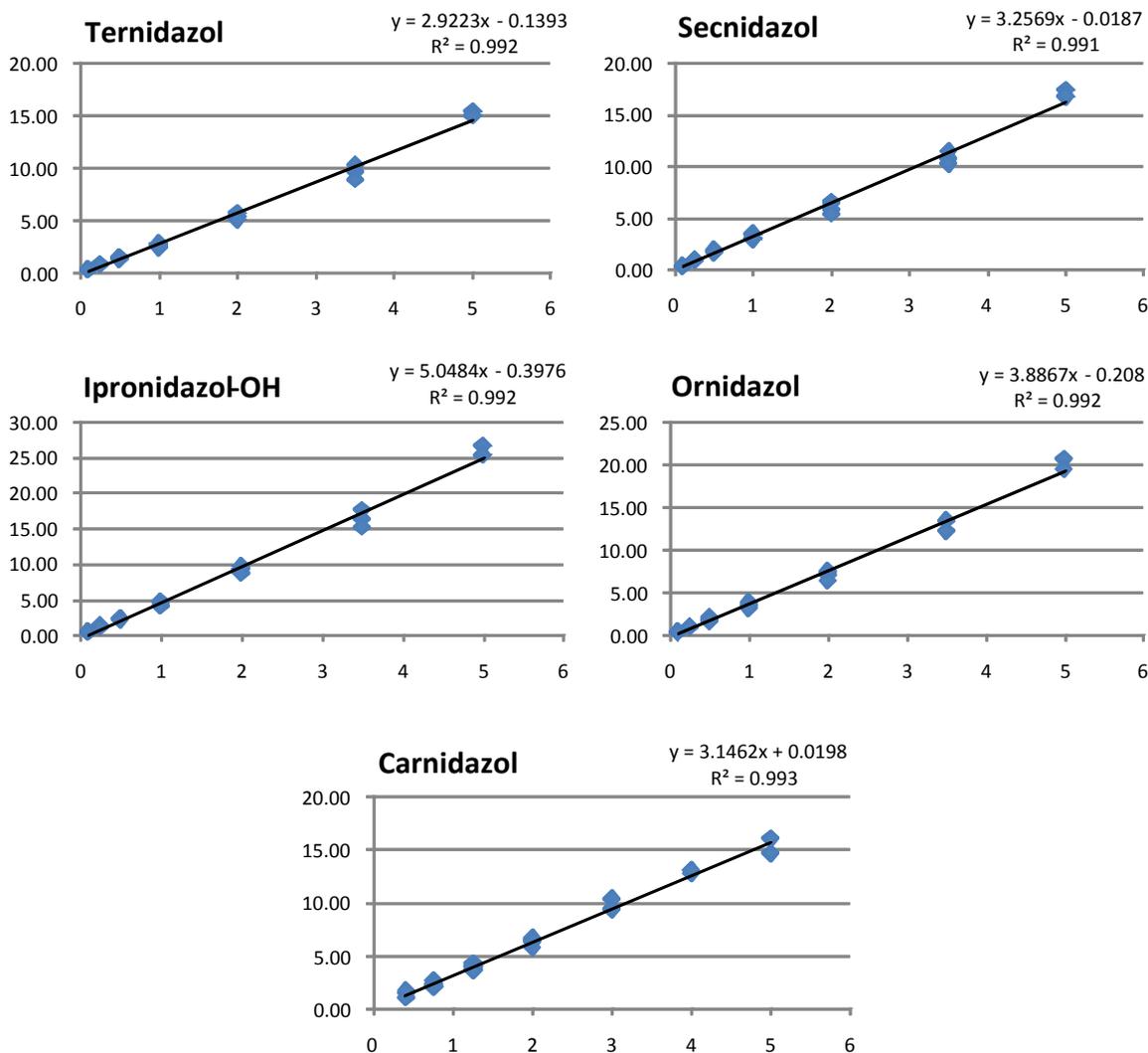


Fig. 29. Rectas de calibrado para cada uno de los 5-NDZs estudiados.



Cont. Fig. 29. Rectas de calibrado para cada uno de los 5-NDZs estudiados.

Los parámetros estadísticos calculados mediante regresión por mínimos cuadrados y los LODs y límites de cuantificación (LOQs) se muestran en la Tabla 9. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas de los once 5-NDZs se ajustan a un modelo lineal en el rango estudiado.

Los LODs y LOQs se obtuvieron a partir de la relación 3 x señal/ruido y 10 x señal/ruido, respectivamente. Se observa que los LODs alcanzados (28 – 154 $\mu\text{g/L}$) son muy superiores a los establecidos por los CRLs (3 $\mu\text{g/L}$), por lo que el método analítico instrumental desarrollado debe ir precedido de una preconcentración *off-line*, obtenida en la etapa de tratamiento de muestra, posteriormente desarrollada.

Compuesto	Rango lineal (mg/L)	Pendiente	Ordenada	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Metronidazol-OH	0.045 - 5	2.050	0.017	0.994	0.045	0.150
HMMNI	0.037 - 5	2.616	0.018	0.995	0.037	0.125
Metronidazol	0.031 - 5	3.065	-0.001	0.993	0.031	0.105
Ronidazol	0.038 - 5	2.720	-0.056	0.992	0.038	0.126
Dimetridazol	0.076 - 5	4.529	-2.845	0.984	0.076	0.254
Secnidazol	0.032 - 5	3.256	-0.018	0.991	0.032	0.108
Ternidazol	0.034 - 5	2.922	-0.139	0.992	0.034	0.114
Ipronidazol-OH	0.028 - 5	5.048	-0.397	0.992	0.028	0.095
Ornidazol	0.031 - 5	3.886	-0.208	0.992	0.031	0.103
Ipronidazol	0.014 - 5	8.161	-6.479	0.980	0.014	0.047
Carnidazol	0.154 - 5	3.146	0.019	0.993	0.154	0.513

Tabla 9. Parámetros estadísticos y límites del método instrumental propuesto.

Aunque se ha caracterizado tanto el rango lineal como los parámetros de calidad para el CRZ, se ha observado que este compuesto no presenta demasiada reproducibilidad en sus tiempos de migración para el método analítico planteado (Tabla 10).

Compuesto	Tiempo de migración (min)
Metronidazol-OH	7.80 ± 0.69
HMMNI	8.72 ± 0.87
Metronidazol	9.08 ± 0.95
Ronidazol	9.97 ± 1.16
Dimetridazol	11.27 ± 1.49
Secnidazol	11.44 ± 1.54
Ternidazol	11.64 ± 1.60
Ipronidazol-OH	12.77 ± 1.95
Ornidazol	14.12 ± 2.41
Ipronidazol	21.16 ± 5.78
Carnidazol	25.19 ± 7.52

Tabla 10. Tiempos de migración de los 5-nitroimidazoles para el método MEKC desarrollado (número de réplicas, n=24).

Debido a la irreproducibilidad en los tiempos de migración del CRZ, se excluye este compuesto en los estudios posteriores.

7.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA

El método analítico desarrollado en la presente Memoria es un procedimiento novedoso, no habiéndose encontrado referencias en bibliografía de métodos analíticos para la determinación de tantos compuestos pertenecientes a la familia de los 5-NDZs mediante MEKC-UV. Por ello, la aplicación de este método a cualquier matriz que pueda contener 5-NDZs, tanto medio ambiental como alimentaria, presenta gran interés.

En este caso se decide aplicar el método a muestras ambientales, concretamente a aguas de río, debido a los problemas que presentan los 5-NDZs de bioacumulación y baja biodegradabilidad.

Únicamente se ha encontrado un artículo que describe la determinación simultánea de 5-NDZs en muestras acuosas (agua potable, agua mineral, agua de río y agua de mar) [100]. En este trabajo se determinó un grupo de cinco 5-NDZs (MNZ, DMZ, IPZ, RNZ y HMMNI) mediante LC-MS. Para el tratamiento de muestras se empleó la extracción en fase sólida con cartuchos Oasis® HLB (500 mg). Las recuperaciones oscilaron entre el 98% y 104%, estableciéndose un LOQ de los analitos de 0.2 µg/L. En la Fig. 30 se recoge un esquema del tratamiento de muestra empleado: la muestra (50 ml) se filtra y ajusta a pH = 2. Posteriormente se eluyen, con un caudal de 1 mL/min, a través del cartucho Oasis® HLB (500 mg) previamente acondicionado. Los analitos se eluyen del cartucho con 1 mL de ACN. El extracto resultante se seca con una corriente de nitrógeno y se recompone en 0.1 mL en el medio de inyección.

[100] L.F. Capitan-Vallvey, A. Ariza, R. Checa, N. Navas (2002). Determination of five nitroimidazoles in water by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 978. Págs. 243-248.

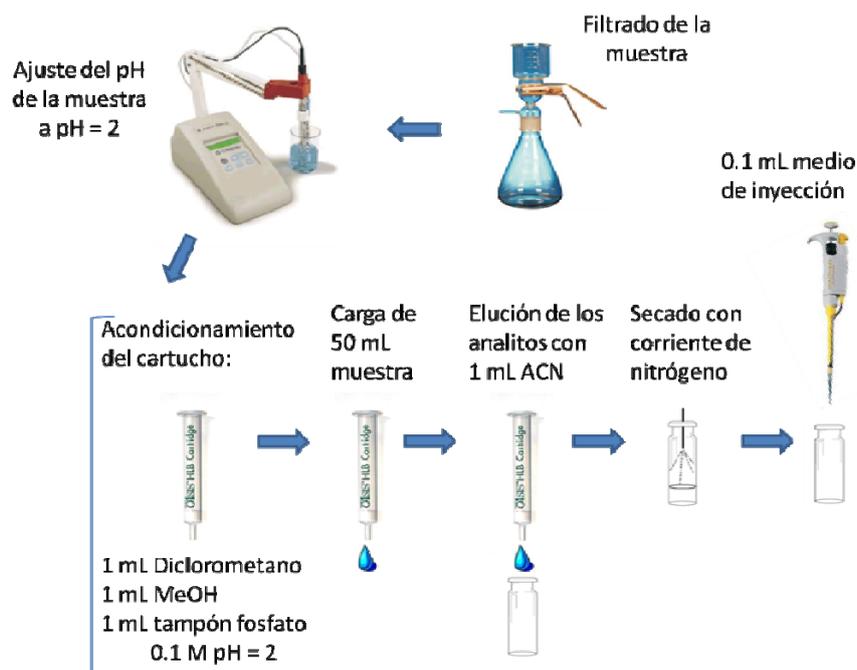


Fig. 30. Tratamiento de muestra propuesto en [100] para el posterior análisis de 5-NDZs en aguas mediante LC-MS.

Tomando como punto de partida este antecedente se desarrolla un tratamiento de muestra en el que se introducen las modificaciones que se mencionan a continuación para la determinación de los nueve 5-NDZs en aguas de río mediante el método MEKC propuesto. Para ello se usó agua del río Genil (Granada):

- Se emplean cartuchos Oasis® HLB de menor cantidad de sorbente (200 mg).
- Se demostró que el volumen de muestra tratada es un factor crítico en la recuperación de los analitos, puesto que un alto volumen de muestra implica bajas recuperaciones. El volumen de muestra tratada es de 25 mL.
- Con la intención de homogenizar los reactivos empleados en las etapas de acondicionamiento del cartucho y elución, se sustituye el uso de diclorometano por ACN en la etapa de acondicionamiento. El ACN es más polar que el diclorometano, por lo que se favorece más la retención de los 5-NDZs en el cartucho debido a la polaridad de estos compuestos. Así mismo, se observa que el empleo de 1 mL de ACN no es suficiente para el acondicionamiento de toda la masa del cartucho. Con objeto de mejorar el acondicionamiento se emplean 2 mL de ACN.

- Se comprobó que queda agua remanente en el cartucho tras el paso de los 25 mL de muestra. Esto implica una etapa de secado a 35 °C con una duración entre 3-4 horas. El secado por vacío del cartucho previa elución de los 5-NDZs no es efectivo, puesto que disminuyen las recuperaciones obtenidas por pérdidas de los analitos. Se propone incorporar una etapa de lavado del cartucho entre el paso de muestra y la elución de los compuestos.
- La etapa de lavado se lleva a cabo con 1 mL de metanol, con objeto de homogenizar los disolventes empleados. Se comprobó que en esta etapa no se pierden en ningún porcentaje los 5-NDZs.
- Se aumenta hasta 1.5 mL el volumen de ACN empleado en la elución con lo que se mejoran los porcentajes de recuperación de los analitos. En este caso el tratamiento de muestra abarca hasta nueve 5-NDZs, en tanto que el método original se optimizó para la determinación de sólo cinco 5-NDZs.
- Se recompone en 0.5 mL de medio de inyección (fosfato 20 mM pH = 6.5). La preconcentración conseguida es de 50 veces.

Un esquema del tratamiento de muestra propuesto se recoge en la Fig. 31.

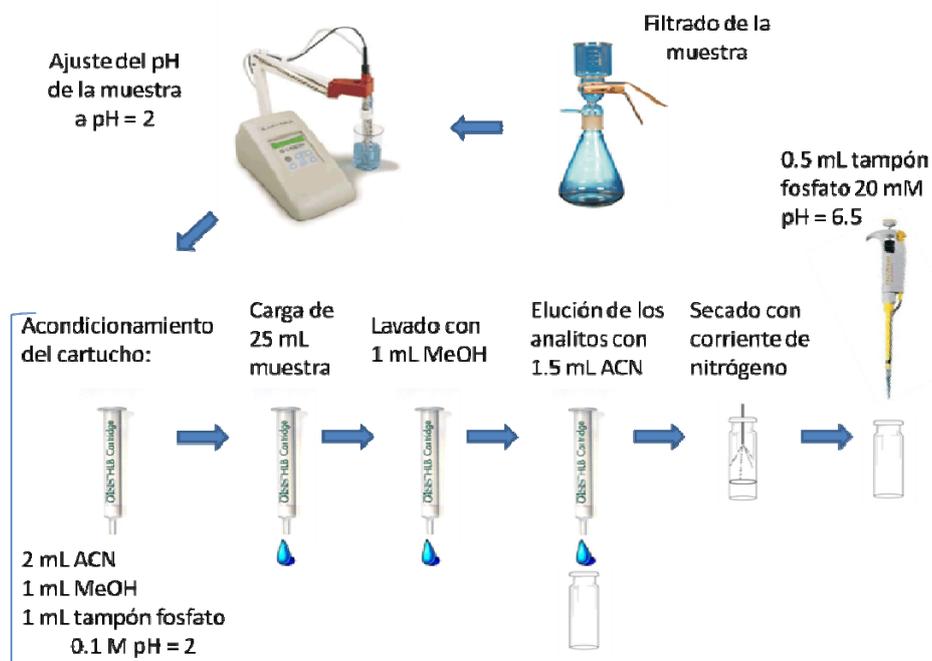


Fig. 31. Tratamiento de muestra empleado para la determinación de 5-NDZs en agua de río mediante el método MEKC propuesto.

En la Fig. 32 se muestran electroferogramas correspondientes a una muestra del agua del río Genil dopada con diversas concentraciones de los 5-NDZs en estudio, así como de un blanco de matriz.

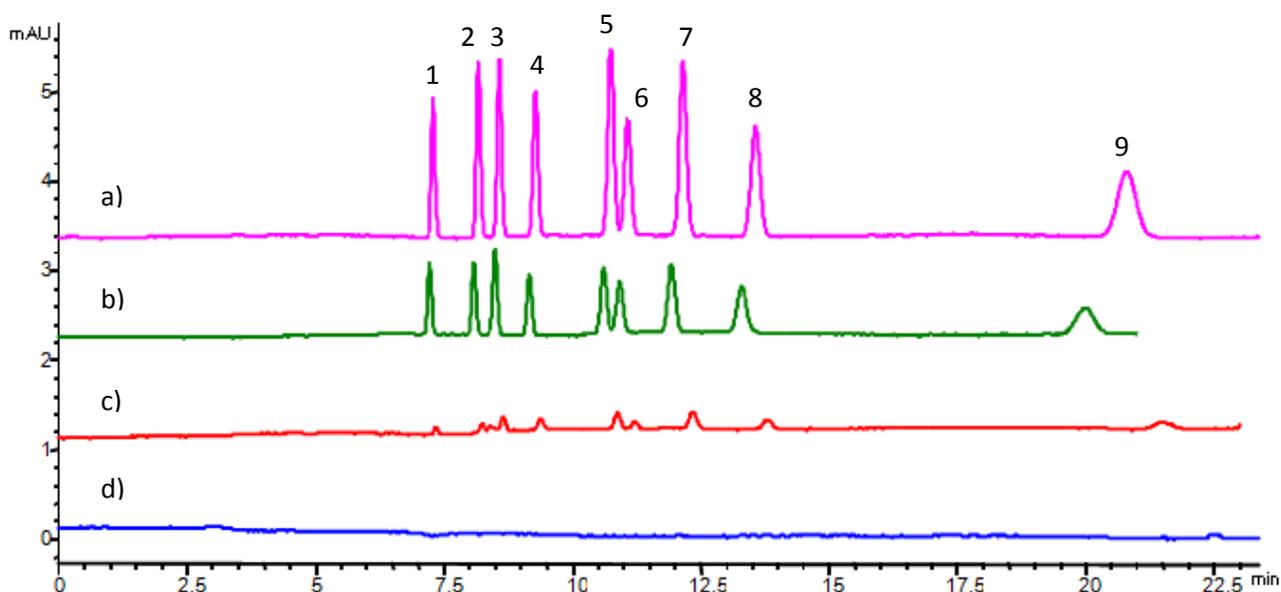


Fig. 32. Electroferogramas de aguas de río. a) agua dopada con 60 $\mu\text{g/L}$ de los nueve 5-NDZs; b) agua dopada con 20 $\mu\text{g/L}$ de los nueve 5-NDZs; c) agua dopada con 3 $\mu\text{g/L}$ de los nueve 5-NDZs; d) blanco de muestra. 1. MNZ-OH; 2. HMMNI; 3. MNZ; 4. RNZ; 5. DMZ; 6. TRZ; 7. IPZ-OH; 8. ORZ; 9. IPZ.

El SNZ se excluye del presente estudio puesto que al analizar las distintas muestras de agua de río dopadas, se observa una pérdida de resolución entre los picos del DMZ, SNZ y TRZ. Dado que la resolución obtenida entre picos es inferior a 1.5, se opta por limitar el método propuesto para la determinación de hasta nueve 5-NDZs en aguas de río.

7.4. RECTAS DE CALIBRADO EN PRESENCIA DE MATRIZ Y LÍMITES DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

A continuación se establecieron las rectas de calibrado obtenidas para la determinación de 5-NDZs en presencia de matriz, en este caso agua de río.

Para ello se usaron muestras de aguas de río recogidas en el Río Genil a su paso por el barrio Bola de Oro (Granada, España). Dichas muestras se doparon con los 5-NDZs a diferentes niveles de concentración y se sometieron al procedimiento de tratamiento de muestra propuesto, aplicando el método MEKC desarrollado. El rango de concentraciones estudiado comprende el intervalo entre 3 – 60 $\mu\text{g/L}$ para los compuestos estudiados.

En la Fig. 33 se indican las rectas de calibrado obtenidas para la determinación de MNZ, HMMNI, MNZ-OH, RNZ, DMZ, TRZ, ORZ, IPZ-OH e IPZ en aguas de río mediante el método analítico desarrollado en el presente trabajo.

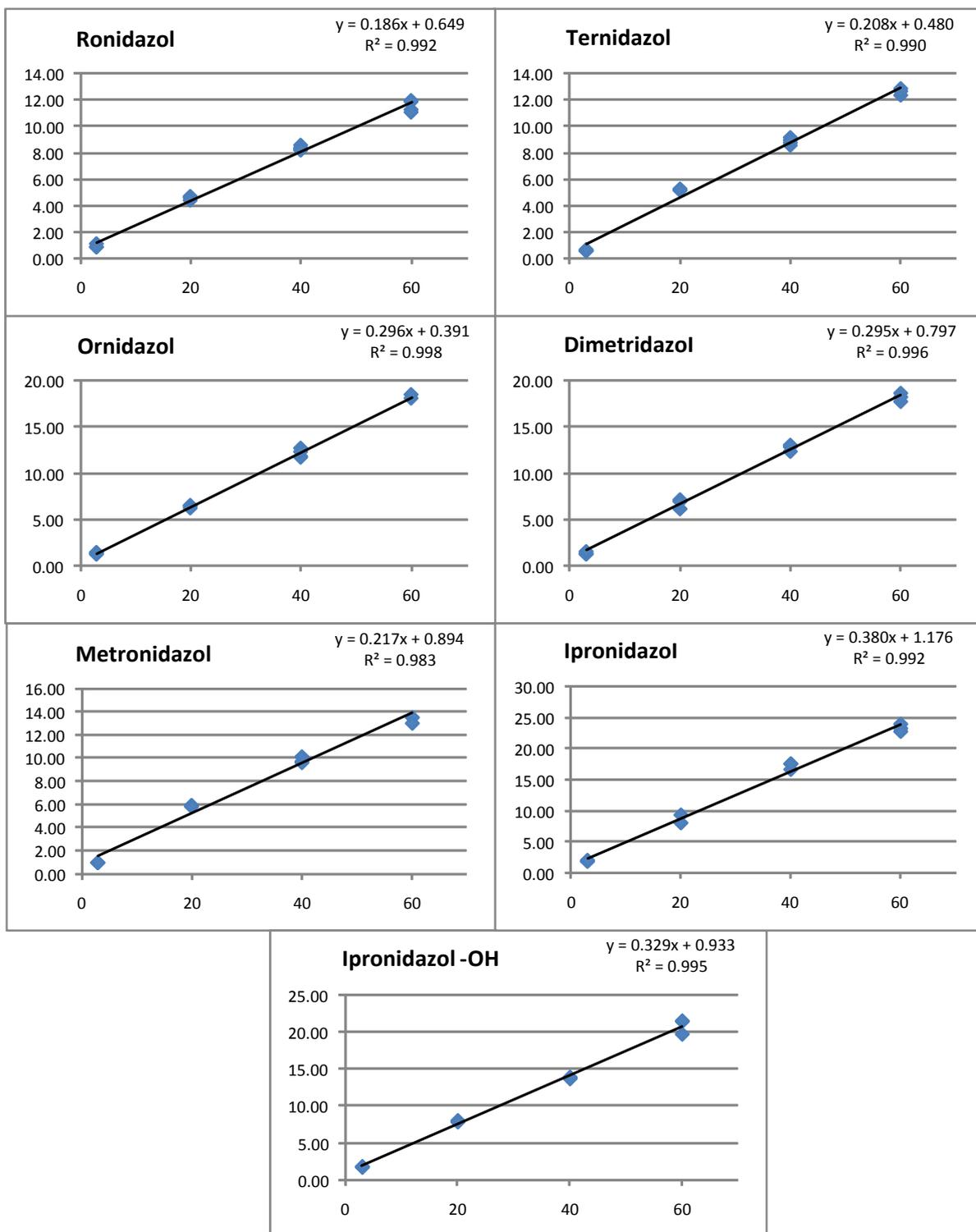
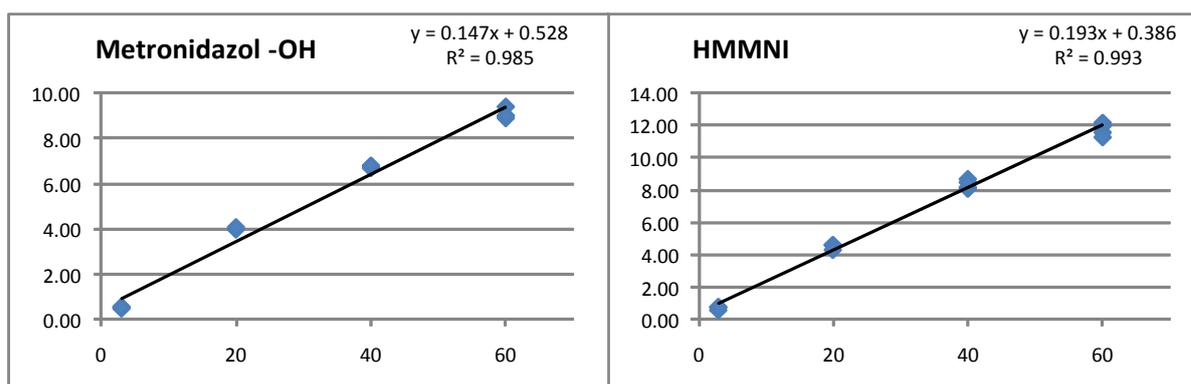


Fig. 33. Rectas de calibrado en agua de río dopada para cada uno de los 5-NDZs estudiados.



Cont. Fig. 33. Rectas de calibrado en agua de río dopada para cada uno de los 5-NDZs estudiados.

Los parámetros estadísticos calculados mediante regresión por mínimos cuadrados se muestran en la Tabla 11. Los coeficientes de determinación (R^2) obtenidos confirman que las respuestas de los nueve 5-NDZs se ajustan a un modelo lineal en el rango estudiado.

Los LODs y cuantificación LOQs se obtuvieron a partir de 3 x señal/ruido y 10 x señal/ruido, respectivamente. Se observa que los LODs alcanzados son inferiores a los establecidos por los CRLs ($< 3 \mu\text{g/L}$), por lo que el método analítico propuesto cumple con este requisito necesario para su implantación en laboratorios de rutina.

Compuesto	Rango lineal ($\mu\text{g/L}$)	Pendiente	Ordenada	R^2	LOD ($\mu\text{g/L}$)	LOQ ($\mu\text{g/L}$)
Metronidazol-OH	0.901 - 60	0.147	0.528	0.985	0.901	3.003
HMMNI	0.819 - 60	0.194	0.386	0.993	0.819	2.731
Metronidazol	0.542 - 60	0.217	0.894	0.983	0.542	1.808
Ronidazol	0.678 - 60	0.186	0.649	0.993	0.678	2.260
Dimetridazol	0.479 - 60	0.295	0.797	0.996	0.479	1.595
Ternidazol	1.105 - 60	0.208	0.480	0.990	1.105	3.682
Ipronidazol-OH	0.469 - 60	0.329	0.933	0.995	0.469	1.565
Ornidazol	0.798 - 60	0.296	0.391	0.998	0.798	2.659
Ipronidazol	1.039 - 60	0.380	1.176	0.992	1.039	3.463

Tabla 11. Parámetros estadísticos y límites del método propuesto.

7.5. EXACTITUD DEL MÉTODO: VERACIDAD Y PRECISIÓN

Con objeto de finalizar la caracterización del método se pretende realizar la evaluación de la exactitud en sus dos vertientes, estimación de la veracidad, a través de estudios de recuperación a diferentes niveles de concentración y cálculo de la precisión, tanto inter-día como intra-día o precisión intermedia.

Estudios preliminares de la recuperación de 5-NDZs en agua de río usando el método propuesto (con muestras dopadas a concentraciones de 40 µg/L para cada 5-NDZ) han originado los porcentajes de recuperación que se muestran en la Tabla 12, todos ellos superiores al 89%.

Compuesto	Recuperaciones
Metronidazol-OH	96 %
HMMNI	97 %
Metronidazol	100 %
Ronidazol	98 %
Dimetridazol	94 %
Ternidazol	93 %
Ipronidazol-OH	90 %
Ornidazol	102 %
Ipronidazol	89 %

Tabla 12. Estudios preliminares de recuperación para el método propuesto.

Estos estudios de recuperación pretenden realizarse en muestras de agua de río dopadas (dado que no se ha detectado la presencia de los 5-NDZs en ellas) con otras concentraciones de 5-NDZs (3 y 20 µg/L), llevando a cabo réplicas con objeto de estimar la desviación estándar relativa.

Asimismo, los parámetros de precisión se calcularán intra- e inter-día para distintos niveles de concentración distribuidos a lo largo del rango lineal (3, 20 y 40 µg/L). Para la precisión intra-día se analizarán tres muestras de agua de río dopadas. El análisis instrumental de cada muestra se repetirá tres veces. Para la precisión interdía se analizarán muestras de agua de río dopadas siguiendo un procedimiento similar, durante cinco días consecutivos.

8. CONCLUSIONES

- ✓ En la presente memoria se ha propuesto un método para la determinación simultánea de once 5-NDZs (DMZ, IPZ, CRZ, HMMNI, MNZ, MNZ-OH, RNZ, SNZ, TRZ, IPZ-OH y ORZ) mediante MEKC con detección UV.
- ✓ El método descrito se ha aplicado con éxito en la determinación de hasta nueve 5-NDZs (DMZ, IPZ, MNZ, MNZ-OH, HMMNI, RNZ, TRZ, IPZ-OH y ORZ) en aguas de río.
- ✓ La separación de los 5-NDZs tiene lugar en un tiempo inferior a los 25 minutos.
- ✓ Para el tratamiento de las muestras de agua de río se ha definido un proceso de extracción en fase sólida, en el cual se emplean cartuchos Oasis® HLB (200 mg).
- ✓ El método analítico aplicado a muestras de agua de río presenta un LOD inferior a 1.2 µg/L para cada uno de los analitos, cumpliendo con lo establecido por los CRLs. Los CRLs indican la conveniencia de que cualquier método analítico, destinado a la determinación de 5-NDZs, deba tener como mínimo un límite para la identificación de hasta 3 µg/L de cada uno de estos compuestos.
- ✓ Para alcanzar los LODs indicados se han aplicado técnicas de preconcentración *on-line* (“*sweeping*”) y preconcentración *off-line* (preconcentración de hasta 50 veces mediante extracción en fase sólida). Asimismo, y con objeto de aumentar la sensibilidad del método instrumental, se ha empleado un capilar de paso de luz extendido, capilar burbuja.
- ✓ Actualmente se están llevando a cabo los estudios de recuperación y de precisión del método. Estudios preliminares (ensayos realizados con muestras dopadas a concentraciones de 40 µg/L para cada 5-NDZ) indican que la recuperación para cada uno de los analitos es superior al 89%.
- ✓ Se pretende aplicar el presente método a muestras de agua de río distintas a las empleadas en este estudio.
- ✓ Se prevé hacer extensible el presente método para la determinación de 5-NDZs en muestras alimentarias de origen animal.

9. GLOSARIO

ACN – acetonitrilo	LOD – límite de detección
APC – antibióticos promotores del crecimiento	LOQ – límite de cuantificación
APCI – ionización química a presión atmosférica	MEKC – cromatografía capilar electrocinética micelar
BMIM-BF₄ – 1-butil-3-metilimidazol tetrafluoroborato	n – número de réplicas
CE – electroforesis capilar	MNZ – metronidazol
CG – cromatografía gaseosa	MNZ-OH – metronidazol-OH
CRLs – Laboratorios de Referencia Comunitarios de la Unión Europea	MS – espectrometría de masas
CRZ – carnidazol	NCI – ionización química de ión negativo
CZE – electroforesis capilar zonal	NPD – detección de nitrógeno fósforo
DAD – diodos en fila	NDZ – nitroimidazol
DMZ – dimetridazol	ORZ – ornidazol
ECNI – ionización por captura de electrones	PDA – detección mediante batería de fotodiodos
EFSA – Agencia de Seguridad Alimentaria Europea	SDS – dodecilsulfato sódico
EOF – flujo electrosmótico	SNZ – secnidazol
ESI – ionización por electrospray	RNZ – ronidazol
HMMNI – dimetridazol-OH	TNZ – tinidazol
HPLC – cromatografía líquida	TRZ – ternidazol
IPZ – ipronidazol	UPLC – cromatografía líquida de ultra alta resolución
IPZ-OH – ipronidazol-OH	UV-Vis – ultravioleta-visible
LC – cromatografía líquida	v/v – relación de volúmenes
LMR – límite máximo de residuo	

ANEXO I: COMENTARIO SOBRE LAS COMPETENCIAS ADQUIRIDAS

Dado que mi formación previa es en Ingeniería Química, el Máster Universitario de Química de la Universidad de Granada (UGR), ha sido un buen complemento a mis conocimientos en el área de la Química. Me ha permitido profundizar en conceptos que anteriormente apenas conocía, así como adquirir otros nuevos que me resultarán muy útiles para desempeñar mi futuro en la investigación en la rama de la Química Analítica de forma eficaz.

Desde el punto de vista de los conocimientos teóricos, no sólo he aprendido sobre nuevos temas relacionados con los distintos campos de la Química (Química Física, Química Orgánica, Química Inorgánica y Química Analítica), sino que he podido establecer numerosos vínculos entre todos ellos, lo que me aporta un abanico más amplio de soluciones a los posibles problemas que me encuentre dentro de mi campo de trabajo. Además, debido a los numerosos trabajos teóricos presentados durante la realización de los diversos cursos que conforman el máster, he cogido mayor soltura en el empleo de diversas herramientas informáticas, así como en el uso de distintas fuentes de búsqueda de información. Asimismo, la presentación oral de dichos trabajos me ha permitido perfeccionar mis aptitudes relacionadas con la comunicación oral.

En varias materias de la totalidad que componen el Máster Universitario de Química de la UGR se da mucha importancia al aspecto práctico de la Química. El contacto con el laboratorio, sobre todo muy presente en la ejecución del presente Trabajo Fin de Máster, ha sido fundamental en mi formación. Este trabajo práctico, así como las distintas conferencias desarrolladas dentro del máster, me ha permitido adquirir una visión más real del mundo laboral respecto a la que tenía consecuencia de mi formación académica previa, sobre todo en el campo de la Investigación, ámbito hacia el que quiero dirigir mi futuro profesional.

Finalmente, y tan importante como lo anterior, destacar el crecimiento personal y profesional que me ha supuesto el contacto con profesores e investigadores de una universidad tan valorada en la investigación como la UGR y, muy especialmente, con mis compañeros y amigos del Máster Universitario de Química de la UGR de la promoción 2010-2011, así como con los miembros del grupo de investigación FQM 302 en el que he realizado este TFM.