



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**Desarrollo y evaluación de recubrimientos poliméricos
para su aplicación potencial en la extracción de
antibióticos polares por sorción en barra de agitación
SBSE**

TESIS

PRESENTADA POR

MIGUEL ÁNGEL ÁVILA MARTÍNEZ

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

**Desarrollo y evaluación de recubrimientos poliméricos
para su aplicación potencial en la extracción de
antibióticos polares por sorción en barra de agitación
SBSE**

TESIS

PRESENTADA POR

MIGUEL ÁNGEL ÁVILA MANTÍNEZ

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

Mérida, Yuc., 6 de enero de 2018
Oficio Num.: PICQB/010/2018

Asunto: Autorización de impresión

La tesis "Desarrollo y evaluación de recubrimientos poliméricos para su aplicación potencial en la extracción de antibióticos polares por sorción en barra de agitación SBSE" presentada por el C. Miguel Ángel Ávila Martínez, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la impresión de los ejemplares correspondientes.

Directores de la tesis

Dr. David Muñoz Rodríguez

Dra. Yamilé Pérez Padilla

Sinodales:

Dra. Tania Isolina Coral Martínez

Firmas

Dr. Alejandro Ávila Ortega

Dr. Cristian Carrera Figueiras

ATENTAMENTE
"LUZ, CIENCIA Y VERDAD"

DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS
COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS



c.c. Archivo
MRSC

POSGRADO INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS QUÍMICAS
Y BIOQUÍMICAS

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Deseo expresar mis agradecimientos especialmente al Dr. David Muñoz Rodríguez y a la Dra. Yamile Pérez Padilla, mis directores de tesis, por la oportunidad de realizar este trabajo y por todos los recursos brindados. Todas sus enseñanzas y críticas respecto a la calidad de mi tesis de maestría hicieron posible la conclusión de la misma y sé que me servirán durante el ejercicio de mi vida profesional.

También agradezco a todos mis profesores y tutores de maestría, pues contribuyeron a ampliar mi conocimiento acerca de la ciencia de los materiales, química analítica y análisis estadístico de datos. Resalto el apoyo del M. C. Salvador Medina Peralta, académico de la Facultad de Matemáticas de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY), en lo relativo al análisis estadístico y también la ayuda brindada por la Q.I. Mariela Lope Navarrete, actual Responsable del Laboratorio de Análisis Instrumental.

Al H. Comité tutorial integrado por Dr. Alejandro Ávila Ortega, Dra. Tania Coral Martínez y Dr. Jesús Barrón Zambrano agradezco todos los comentarios y el tiempo invertido en la revisión de este trabajo, su experiencia contribuyó a enriquecerlo.

Finalmente, he de reconocer el apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) durante dos años, a través del otorgamiento de una beca, para la realización del presente trabajo de investigación.

Este trabajo de Tesis fue realizado en el laboratorio de Análisis Instrumental de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma de Yucatán bajo la dirección del Dr. David Muñoz Rodríguez y la Dra. Yamile Pérez Padilla. Formó parte del Proyecto CB167800 financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), con el apoyo de la beca concedida por CONACYT.

RESUMEN

Se elaboraron tres recubrimientos derivados de polidimetilsiloxano hidroxilado (PDMS-OH), 3-cianopropiltrióxido de silicio (CNPrTEOS) y feniltrióxido de silicio (TEFS) por síntesis sol-gel, para evaluar su capacidad como sorbentes de antibióticos polares disueltos en diferentes medios utilizando la extracción por sorción en barra de agitación (SBSE). La síntesis fue realizada a temperatura ambiente empleando diclorometano (DCM) como disolvente y ácido trifluoroacético (TFA) al 95%v/v como catalizador. Los materiales obtenidos fueron identificados como A, B y C, asociándose a los valores 1:1:2, 1:1.5:1.5 y 1:2:1 de la razón molar PDMS:TEFS:CNPrTEOS respectivamente. Tras 48 h de exposición a soluciones ácido-base (pH 1-12), la pérdida de masa de los recubrimientos no superó 0.5%. Ante disolventes polares (agua, acetonitrilo y metanol) e isooctano las pérdidas fueron menores a 12% con vórtex (30 min) o ultrasonido (60 min); pero aumentaron considerablemente ante acetona y acetato de etilo. El análisis termogravimétrico (TGA) demostró que todos los recubrimientos fueron estables hasta 230°C. Los materiales fueron analizados por espectroscopía de infrarrojo de reflexión difusa (DRIFTS), también se midieron sus ángulos de contacto con agua (hidrofilia: C<B<A). En medio acuoso fortificado (1 mg/L) los materiales extrajeron menos del 30% de los antibióticos; tras su desorción solo los antibióticos con logaritmos de coeficientes de reparto ($\text{Log}_{10}K_{OW}$) comprendidos entre 0 y 2 (sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol) fueron detectables en los extractos aunque sin preconcentración. Un *screening* factorial 2^4 en medio acuoso reveló que algunos factores y sus interacciones favorecían la extracción total de antibióticos con $0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$ (mayor contribución de sulfamidas) cuando se elevó el %NaCl, el tiempo y la velocidad de agitación; agregar acetonitrilo desfavoreció la extracción de sulfatiazol. El método del ascenso más pronunciado demostró que la baja afinidad del material A por los analitos limitó el incremento de sus áreas en los extractos. En medio orgánico el hinchamiento de los materiales y su contenido de ciano contribuyó a recuperar antibióticos, las tetraciclinas fueron detectables en los extractos pero no se preconcentraron y las otras sustancias presentaron factores de preconcentración entre 3-5. Un ANOVA bifactorial ($\alpha=0.05$) reveló que en medio orgánico el tipo de antibiótico, el material y la interacción de ambos afectan el área cromatográfica.

ÍNDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Principios teóricos de SBSE	3
Consideraciones prácticas de SBSE.....	5
Limitaciones.....	5
Recubrimientos para SBSE	6
Síntesis sol-gel	10
Caracterización y evaluación de la estabilidad de los materiales	12
Antibióticos con $\log_{10}K_{OW}<0$	12
Tetraciclinas	12
Metodos de cromatografía de líquidos para el análisis de las tetraciclinas.....	14
Antibióticos con $0<\log_{10}K_{OW}<2$	16
Cloranfenicol.....	16
Sulfamidas.....	17
Trimetoprim	21
Métodos de cromatografía de líquidos para el análisis multiresiduo de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol	23
OBJETIVOS	27
Objetivo general	27
Objetivos específicos.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
Materiales.....	29
Elaboración de las barras de agitación magnética de vidrio.....	29
Pre-tratamiento de las barras de agitación de vidrio	29
Preparación de las soluciones sol-gel.....	30
Recubrimiento de las barras de agitación magnética de vidrio.....	31
Condiciones curado térmico bajo atmósfera de vacío	31
Caracterización de los recubrimientos	32
Propiedades físicas.....	32
Análisis químico	32
Estabilidad ante disolventes.....	32
Estabilidad ante pH.....	32
Determinación del ángulo de contacto	33

Análisis termogravimétrico	33
Extracción de tetraciclinas	33
Extracción de muestras acuosas	33
Extracción de un medio orgánico	34
Extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol	34
Extracción de muestras acuosas	34
Extracción de un medio orgánico	37
Análisis cromatográfico de las tetraciclinas	37
Análisis cromatográfico de sulfamidas trimetoprim y cloranfenicol	38
Análisis cuantitativo y cualitativo de antibióticos	38
RESULTADOS Y DISCUSIONES	39
Elaboración de las barras magnéticas para SBSE	39
Barras de agitación magnética de vidrio	39
Síntesis de las fases poliméricas	39
Caracterización de los recubrimientos	43
Caracterización dimensional de los recubrimientos	43
Caracterización química por infrarrojo	43
Estabilidad ante disolventes	45
Estabilidad ante pH	50
Determinación del ángulo de contacto	52
Análisis termogravimétrico	53
Evaluación de las barras de agitación recubiertas para la extracción por SBSE	56
Extracción de Tetraciclinas	56
Extracción de tetraciclinas de medio acuoso	57
Efecto del pH	57
Efecto del modificador orgánico	59
Experimentos de desorción	60
Efecto salino	60
Extracción de tetraciclinas desde fase orgánica	61
Extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol	62
Extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol de medio acuoso	63
Efecto del tipo de recubrimiento	63
Experimentos de desorción	65

Optimización de la extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{OW} < 1.2$	68
Método del ascenso más pronunciado	79
Efecto de la estructura química	81
Extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol de medio orgánico	83
CONCLUSIONES	93
REFERENCIAS	95
ANEXOS	107

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Diseño experimental y métodos estadísticos.	107
Diseño factorial general	107
Diseños factoriales 2^k	110
Superficies de respuesta	115
Método del ascenso más pronunciado.....	117
Anexo B. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 completo para área total de antibióticos.	121
Anexo C. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 depurado (orden máximo de interacción: 2) para el inverso del área total de antibióticos.....	124
Anexo D. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 depurado (orden máximo de interacción: 2) para analizar la extracción de sulfatiazol.	127
Anexo E. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 depurado (orden máximo de interacción: 2) para analizar la extracción de sulfametoxazol.	130
Anexo F. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 completo para analizar la extracción de cloranfenicol.	133
Anexo G. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 completo para analizar la extracción de trimetoprim.	137
Anexo H. Análisis de estadístico de la extracción de antibióticos polares ($0 < \text{Log}_{10} K_{ow} < 2$) desde medio orgánico.	141
Anexo I. Análisis de estadístico de la extracción de antibióticos polares ($0 < \text{Log}_{10} K_{ow} < 2$) desde medio orgánico.	145
Anexo J. Abreviaturas	149

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Dispositivo analítico comercial utilizado para la extracción por sorción en barra de agitación con el recubrimiento polidimetilsiloxano (SBSE-PDMS).	4
Figura 2. Esquema general de la síntesis sol-gel y su aplicación para la obtención de películas sorbentes.	11
Figura 3. Representantes del grupo de las tetraciclinas.	13
Figura 4. Distribución de las diferentes especies de tetraciclina como función del pH.	13
Figura 5. Estructura del antibiótico cloranfenicol.....	16
Figura 6. Estructura de algunas sulfamidas.....	17
Figura 7. Diagrama de distribución de especies del sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina.	19
Figura 8. Estructura química del trimetoprim.	22
Figura 9. Diagrama de distribución de especies del trimetoprim.	22
Figura 10. Diseño de la barra de agitación magnética de vidrio elaborada para SBSE....	39
Figura 11. Modelos estructurales de materiales derivados de PDMS y organoalcoxisilanos sintetizados bajo condiciones ácidas.....	42
Figura 12. Barras de vidrio recubiertas con los materiales PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A, B y C.	43
Figura 13. Espectro infrarrojo obtenido para la material con la proporción PDMS:TEFS:CNPrTEOS correspondiente a 1:1:2 (recubrimiento A)..	44
Figura 14. Espectro infrarrojo obtenido para la material con la proporción PDMS:TEFS:CNPrTEOS correspondiente a 1:1.5:1.5 (recubrimiento B).	44
Figura 15. Espectro infrarrojo obtenido para la material con la proporción PDMS:TEFS:CNPrTEOS correspondiente a 1:2:1 (recubrimiento C)..	45
Figura 16. Resistencia ante disolventes de los recubrimientos A, B y C durante 15 y 30 minutos de agitación vórtex.	46
Figura 17. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de los ensayos de resistencia a disolventes con agitación vórtex durante 15 y 30 minutos.	47
Figura 18. Resistencia ante disolventes de los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) durante 30 y 60 minutos de ultrasonificación.....	48
Figura 19. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de los ensayos de resistencia a disolventes y ultrasonificación durante 30 y 60 min.	49

Figura 20. Resistencia ante pH de los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) luego de 24 y 48 h en condiciones ácidas (pH 1, 2 y 3) en ácido clorhídrico y ácido nítrico, y en condiciones básicas (pH 9 y 12)..	50
Figura 21. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de ser expuestas a diferentes condiciones de pH con ácido clorhídrico (HCl) por 24 y 48 h..	51
Figura 22. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de ser expuestas a diferentes condiciones de pH con ácido nítrico (HNO ₃) durante 24 y 48 h....	51
Figura 23. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de ser expuestas a diferentes condiciones de pH con hidróxido de sodio (NaOH) durante 24 y 48h.....	52
Figura 24. Variación del ángulo de contacto de una gota de agua en las superficies de los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1).....	53
Figura 25. Curvas termogravimétricas de los materiales híbridos A (PDMS:TEFS:CNPrTEOS [1:1:2]), B (PDMS:TEFS:CNPrTEOS [1:1.5:1.5]), C (PDMS:TEFS:CNPrTEOS [1:2:1]) y el blanco hidrofóbico PDMS-TEOS.	53
Figura 26. Descomposición de PDMS por el mecanismo de plegamiento molecular.	54
Figura 27. Descomposición de PDMS hidroxiterminal por el mecanismo de retroataque de cadena.	54
Figura 28. Formación de metano a partir de PDMS por vía radicalaria.....	55
Figura 29. Perfil cromatográfico de las disoluciones estándar de las tetraciclinas.	57
Figura 30. Porcentaje de oxitetraciclina (OT), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CT) y doxitetraciclina (DT) en las disoluciones acuosas fortificadas (1 mg/L) luego de realizar la extracción bajo diferentes valores de pH con la barra B	58
Figura 31. Antibióticos desorbidos de las barras recubiertas previamente utilizadas para la extracción de tetraciclinas en fase orgánica.	61
Figura 32. Perfil cromatográfico de sulfatiazol, trimetoprim, sulfametoxazol y cloranfenicol.....	63
Figura 33. Concentración de la sulfatiazol (STZ), trimetoprim (TMP), sulfametoxazol (SMX) y cloranfenicol (CRF) en las disoluciones acuosas fortificadas a 1 mg/L luego de realizar la extracción con diferentes recubrimientos.	64
Figura 34. Cromatogramas de los extractos metanólicos obtenidos después de desorber los antibióticos de diferentes recubrimientos híbridos.....	65
Figura 35. Porcentajes de desorción obtenidos utilizando vórtex y diferentes mezclas metanol-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) durante 20 o 40 min.....	66

Figura 36. Porcentajes de desorción obtenidos utilizando ultrasonido y diferentes mezclas metanol-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) durante 20 o 40 min.	66
Figura 37. Porcentajes de desorción obtenidos utilizando vórtex y diferentes mezclas acetonitrilo-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) durante 20 o 40 min.	67
Figura 38. Porcentajes de desorción obtenidos utilizando ultrasonido y diferentes mezclas acetonitrilo-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) durante 20 o 40 min.	68
Figura 39. Efecto de diferentes modificadores sobre las áreas de antibióticos desorbidos de la barra A	69
Figura 40. Gráfica de probabilidad normal para los efectos del modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción 2) sobre el inverso del área total de antibióticos recuperados	70
Figura 41. Diagrama de Pareto para los efectos del modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción 2) sobre el inverso del área total de antibióticos recuperados.	71
Figura 42. Gráfico de interacción tiempo*velocidad para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción 2) sobre el inverso del área total de antibióticos recuperados.	72
Figura 43. Gráfico de efecto individual de %NaCl para el modelo completo (máximo orden de interacción 2) del inverso del área total de antibióticos recuperados	72
Figura 44. Gráfica de probabilidad normal para los efectos de las fuentes de variación del modelo factorial 2^4 (máximo orden de interacción: 2) sobre el área total de sulfatiazol.	73
Figura 45. Diagrama de Pareto para los efectos de las fuentes de variación del modelo factorial 2^4 (máximo orden de interacción: 2) sobre el área de sulfatiazol.....	73
Figura 46. Gráfico de la interacción tiempo*velocidad sobre el área de sulfatiazol.	74
Figura 47. Gráfico de la interacción tiempo*%ACN sobre el área de sulfatiazol.	74
Figura 48. Gráfico de la interacción velocidad*%NaCl sobre el área de sulfatiazol.....	75
Figura 49. Gráfica de probabilidad normal para los efectos de las fuentes de variación del modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) sobre el área de sulfametoxazol.	76
Figura 50. Diagrama de Pareto para los efectos de las fuentes de variación del modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) sobre el área de sulfametoxazol.....	76
Figura 51. Gráfico de la interacción %NaCl*%ACN sobre el área de sulfametoxazol.	77
Figura 52. Gráfico de la interacción velocidad*%ACN sobre el área de sulfametoxazol. .	77
Figura 53. Superficie de respuesta graficada para los factores velocidad y %NaCl de un diseño factorial 2^4	81
Figura 54. Extracción de antibióticos con $0 < \log_{10}Kow < 1.2$ de medio acuoso a un nivel de concentración de 1 mg/L.....	82
Figura 55. Extracción de antibióticos con $0 < \log_{10}Kow < 2$ de medio acuoso a un nivel de concentración de 0.5 mg/L.	82

Figura 56. Extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{OW} < 1.2$ desde isooctano a un nivel de concentración de 1 mg/L.	83
Figura 57. Comparación del área (transformada con raíz cuadrada, $\sqrt{\text{área}}$) entre materiales con intervalos de confianza del 95% para las medias con la prueba LSD.	85
Figura 58. Comparación del área (transformada con raíz cuadrada, $\sqrt{\text{área}}$) entre antibióticos con intervalos de confianza del 95% para las medias con la prueba LSD.	85
Figura 59. Comparación del área (transformada con raíz cuadrada) entre combinaciones material-antibiótico con intervalos de confianza (95%) para medias con LSD.	86
Figura 60. Extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{OW} < 2.0$ de isooctano a un nivel de concentración de 0.50 mg/L.	87
Figura 61. Comparación entre medias raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) de los materiales con la prueba LSD ($\alpha=0.05$) para antibióticos ($0 < \log_{10} K_{OW} < 2$) extraídos de medio orgánico.	88
Figura 62. Comparación entre medias raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) de los antibióticos ($0 < \log_{10} K_{OW} < 2$) con la prueba LSD ($\alpha=0.05$) para la extracción en medio orgánico.	89
Figura 63. Comparación entre medias raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) de las combinaciones material-antibiótico ($0 < \log_{10} K_{OW} < 2$) con LSD ($\alpha=0.05$) para la extracción en medio orgánico.	90
Figura 64. Superficie de respuesta tridimensional donde se indica el rendimiento esperado de una reacción contra los factores temperatura (x_1) y presión (x_2).	116
Figura 65. Ilustración del carácter secuencial de la metodología de superficie de respuesta.	117
Figura 66. Superficie de respuesta de primer orden y trayectoria del ascenso más pronunciado.	118
Figura 67. Algunos mapas de contornos posibles para superficies ajustadas a modelos de segundo orden.	120
Figura 68. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.	121
Figura 69. Residuales contra tiempo para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.	122
Figura 70. Residuales contra velocidad para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.	122
Figura 71. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.	122
Figura 72. Residuales contra %ACN para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.	123
Figura 73. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial completo 2^4	123

Figura 74. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.	123
Figura 75. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.....	124
Figura 76. Residuales contra tiempo para el modelo factorial completo 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.....	125
Figura 77. Residuales contra velocidad para el modelo factorial completo 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.....	125
Figura 78. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial completo 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.....	125
Figura 79. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.	126
Figura 80. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.	126
Figura 81. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.	126
Figura 82. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfatiazol.	127
Figura 83. Residuales contra tiempo para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfatiazol.	128
Figura 84. Residuales contra velocidad para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfatiazol.	128
Figura 85. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfatiazol.	128
Figura 86. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfatiazol.	129
Figura 87. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfatiazol.....	129
Figura 88. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfatiazol.....	129
Figura 89. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfametoxazol.	130
Figura 90. Residuales contra tiempo para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfametoxazol.....	131
Figura 91. Residuales contra velocidad para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfametoxazol.....	131

Figura 92. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfametoxazol.....	131
Figura 93. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfametoxazol.	132
Figura 94. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfametoxazol....	132
Figura 95. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfametoxazol.....	132
Figura 96. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.....	133
Figura 97. Residuales contra tiempo para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.	134
Figura 98. Residuales contra velocidad para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.	134
Figura 99. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.	134
Figura 100. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.	135
Figura 101. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.	135
Figura 102. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 a la respuesta cloranfenicol.	135
Figura 103. Gráfico de distribución de probabilidad normal para los efectos del diseño factorial 2^4 completo sobre el área del cloranfenicol.	136
Figura 104. Gráfico de Pareto del diseño factorial 2^4 completo sobre el área del cloranfenicol.	136
Figura 105. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta trimetoprim.	137
Figura 106. Residuales contra tiempo para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.....	138
Figura 107. Residuales contra velocidad para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.....	138
Figura 108. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.....	138
Figura 109. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.....	139
Figura 110. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial ajustado a la respuesta trimetoprim.	139

Figura 111. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.....	139
Figura 112. Gráfico de distribución de probabilidad normal para los efectos del diseño factorial 2^4 completo sobre el área del trimetoprim.	140
Figura 113. Gráfico de Pareto para los efectos del diseño factorial 2^4 completo sobre el área del trimetoprim.	140
Figura 114. Distribución de probabilidad normal de residuales para el modelo bifactorial de la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$).	141
Figura 115. Residuales contra material para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$).	141
Figura 116. Residuales contra antibiótico para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$).	142
Figura 117. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$).	142
Figura 118. Residuales contra valor predicho para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$).	142
Figura 119. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$).	145
Figura 120. Residuales contra material para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$).	145
Figura 121. Residuales contra antibiótico para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{log}_{10}K_{OW} < 2$).	146
Figura 122. Residuales contra valor predicho para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{log}_{10}K_{OW} < 2$).	146
Figura 123. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{log}_{10}K_{OW} < 2$).	146

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nuevos recubrimientos propuestos para SBSE y sus aplicaciones.	7
Tabla 2. Métodos para determinar Tetraciclinas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)	15
Tabla 3. Métodos de HPLC desarrollados para el análisis multiresidual de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol.....	24
Tabla 4. Formulaciones para la preparación de los materiales A, B y C.....	30
Tabla 5. Matriz del diseño factorial 2^4 utilizado para la extracción de antibióticos.	35
Tabla 6. Resumen de efectos observados tras la adición de catalizadores a las relaciones A, B y C.....	41
Tabla 7. Parámetros de interés del método cromatográfico para analizar tetraciclinas. ...	56
Tabla 8. Parámetros del método cromatográfico utilizado para determinar sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol.	62
Tabla 9. Resultados del método del ascenso más pronunciado.....	79
Tabla 10. Resultados del método del ascenso más pronunciado sin adición de acetonitrilo.....	80
Tabla 11. Factores de preconcentración promedio respecto a 1 mg/L obtenidos por SBSE en medio orgánico para antibióticos con $0 < \log_{10}K_{OW} < 1.2$	84
Tabla 12. Factores de preconcentración respecto a 0.50 mg/L obtenidos por SBSE en medio orgánico para antibióticos con $0 < \log_{10}K_{OW} < 2.0$	87
Tabla 13. Análisis de varianza para un diseño bifactorial con modelo de efectos fijos ...	108
Tabla 14. Corridas experimentales para una sola réplica del diseño factorial 2^4	111
Tabla 15. Coeficientes de los contrastes para los efectos en un diseño factorial 2^4	112
Tabla 16. Resumen del análisis de varianza para un diseño 2^4	113
Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) del factorial 2^4 para los antibioticos totales....	121
Tabla 18. Análisis de varianza para antibióticos totales con transformación de respuesta tipo recíproca (1/y) para el área total de antibióticos.	124
Tabla 19. Análisis de varianza para sulfatiazol con máximo orden de interacción 2.....	127
Tabla 20. Análisis de varianza para sulfametoxazol con máximo orden de interacción 2.....	130
Tabla 21. Análisis de varianza completo para el área de cloranfenicol.....	133
Tabla 22. Análisis de varianza completo para trimetoprim....	137
Tabla 23. Análisis de varianza bifactorial completo para raíz cuadrada del área de antibióticos ($0 < \log_{10}K_{OW} < 1.2$) extraídos en medio orgánico por SBSE.....	141
Tabla 24. Comparación de medias raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre materiales para la extracción en medio orgánico de antibióticos ($0 < \log_{10}K_{OW} < 1.2$).....	143

Tabla 25. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$) para la extracción en medio orgánico.	143
Tabla 26. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre grupos material-antibiótico ($0 < \text{log}_{10}K_{OW} < 1.2$) para la extracción en medio orgánico.	144
Tabla 27. Análisis de varianza bifactorial completo para raíz cuadrada del área de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$).	145
Tabla 28. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre materiales para la extracción de antibióticos ($0 < \text{log}_{10}K_{OW} < 2$) en medio orgánico.	147
Tabla 29. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$) para la extracción en medio orgánico.	147
Tabla 30. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre grupos material-antibiótico ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$) para la extracción en medio orgánico.	148

INTRODUCCIÓN

Actualmente se requieren metodologías analíticas simples, económicas y ecológicamente seguras para determinar sustancias en matrices biológicas, alimentarias y ambientales. En este contexto, la preparación de la muestra es una etapa crítica del análisis químico; por ello, las técnicas contemporáneas de preparación se diseñan para reducir el consumo de disolventes orgánicos, miniaturizar la instrumentación, automatizar los procesos, reducir la destrucción de la muestra y lograr en un solo paso la extracción y preconcentración de diversas sustancias. Actualmente los analitos pueden extraerse desde fases muy diversas (sólidas, líquidas o gaseosas) utilizando técnicas como: las microextracciones líquido-líquido en sus distintas modalidades, la extracción sortiva con barras de agitación (SBSE), la microextracción sólida dispersiva (SPME) y la clásica extracción en fase sólida (SPE).¹

En SBSE la barra de agitación posee un recubrimiento polimérico capaz de extraer los analitos desde una fase líquida o gaseosa. El polidimetilsiloxano (PDMS) es la fase comercial más común y la retención de los analitos usualmente es adsorptiva (equilibrio de reparto), aunque la adsorción también puede ocurrir y hasta predominar en otros polímeros. En comparación con las técnicas de microextracción, se logran mejores recuperaciones por SBSE dado su mayor volumen de sorbente. La baja afinidad de PDMS por analitos polares, caracterizados por logaritmos de sus coeficientes de reparto octanol-agua ($\log_{10}K_{OW}$) menores a 2, supone un problema y representa una limitante para sus aplicaciones, actualmente son pocas las fases comerciales disponibles.¹⁻³ Desarrollar de nuevos sorbentes híbridos orgánicos-inorgánicos por vía sol-gel ha sido una estrategia para mejorar la afinidad hacia analitos polares mediante la introducción de grupos funcionales en los materiales que interaccionen favorablemente con dichas sustancias; además, es factible controlar las propiedades químicas y estructurales de estos materiales variando las condiciones de síntesis, el tiempo de envejecimiento y el tratamiento térmico.⁴⁻⁶

En este trabajo se sintetizaron tres nuevos materiales híbridos por vía sol-gel tomando como base la modificación de PDMS. Esencialmente se entrecruzaron las cadenas de PDMS-OH con precursores organotrioxisilanos funcionalizados con ciano y fenilo en condiciones ácidas, para promover interacciones dipolares y electrónicas π - π entre los sorbentes y los analitos polares. Todos los materiales se caracterizaron midiendo su estabilidad térmica, espectro infrarrojo, resistencia ante disolventes y pH. La evaluación de la capacidad sorbente de estos híbridos orgánicos-inorgánicos fue llevada a cabo mediante SBSE tanto en medio acuoso como en orgánico utilizando como analitos antibióticos muy polares y de variada estructura química: tetraciclinas, sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol. El uso intensivo de estas sustancias con fines veterinarios y las elevadas cantidades excretadas en forma activa por animales y humanos (vía heces y orina) suponen riesgos para la salud humana y ambiental como: desarrollo de microorganismos resistentes, inhibición del crecimiento

de plantas y animales acuáticos, disrupción endocrina y reacciones alérgicas. Actualmente es necesario monitorear los antibióticos en gran diversidad de matrices (alimentos, muestras ambientales, fluidos biológicos, etc.).^{7,8}

Debe destacarse que la presente investigación ha contribuido a ampliar el conocimiento sobre nuevos materiales híbridos orgánicos-inorgánicos, aportando valiosa información sobre sus propiedades físicas y químicas. La información generada podría servir como base para orientar futuras investigaciones en la dirección más conveniente en lo relativo a retención de compuestos polares.

ANTECEDENTES

En el análisis químico el tratamiento de la muestra es una etapa de crucial importancia ya que generalmente está asociada con el mayor consumo de tiempo y riesgo de error. Dicha etapa tiene como fin transferir el analito (la sustancia que se desea determinar) de la matriz muestral a otra fase más compatible con el equipo instrumental, aunque algunas veces también implica modificar la estructura química de la especie con ese fin. Técnicas tradicionales como la extracción líquido-líquido y la extracción Soxhlet se utilizaron ampliamente en el pasado, pero implicaban un consumo considerable de disolventes orgánicos tóxicos, múltiples transferencias (cambios de disolvente o de recipiente) y demandaban demasiado tiempo; esto se traducía en baja exactitud, aumento de la incertidumbre y en pérdida de analito.⁸ Para superar estas desventajas surgieron las técnicas de extracción que emplean un volumen mínimo de disolvente extractante como la microextracción líquido-líquido en gota suspendida (SDME), la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la microextracción con fibra hueca (HFME); también surgieron otras técnicas basadas en sólidos sorbentes como la extracción sortiva con barras de agitación (SBSE), la microextracción sólida dispersiva (SPME) y la clásica extracción en fase sólida (SPE).¹

Principios teóricos de SBSE

La microextracción en fase sólida (SPME) se desarrolló en 1990 y tan solo 9 años después apareció SBSE inicialmente para la extracción en fase vapor, ambas comparten esencialmente el mismo principio teórico y logran la extracción y preconcentración de los analitos en una sola etapa. SBSE presentó buena reproducibilidad y también eficacia para retener sustancias orgánicas en fase vapor o líquida; no obstante, fue superior su capacidad de extracción en comparación con SPME y con las microextracciones en fase líquida, esto la hizo muy útil para el análisis a niveles traza y ultratrazas.⁸⁻¹⁰

La barra de agitación más empleada para SBSE, conocida con el nombre comercial Twister®, consta de un imán incrustado en el interior de una envoltura de vidrio de 10–20 mm de longitud y posee un recubrimiento polimérico llamado polidimetilsiloxano (PDMS) que tiene usualmente entre 0.3–1.0 mm de espesor (volumen de 24–126 µL). La fase PDMS tiene un carácter no polar y es capaz de interactuar con las moléculas objetivo por fuerzas de Van-der-Waals, aunque enlaces de hidrógeno pueden ocurrir a través de los átomos de oxígeno presentes en el PDMS dependiendo de la estructura química de los analitos.¹¹

El PDMS permite la difusión de los analitos a través de él y es térmicamente estable sobre un amplio rango de temperaturas, el PDMS típicamente soporta hasta 220–320 °C. Por esta razón, este sorbente se utiliza también como fase estacionaria en cromatografía de gases (GC).¹¹

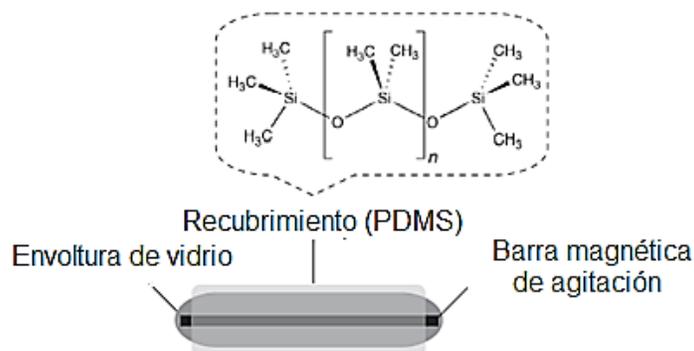


Figura 1. Dispositivo analítico comercial utilizado para la extracción por sorción en barra de agitación con el recubrimiento polidimetilsiloxano (SBSE-PDMS).

Para entender cómo ocurre la preconcentración de los analitos por SBSE se considera la extracción de una sustancia desde un medio acuoso con PDMS. Antes de alcanzar el equilibrio la concentración del analito retenido en PDMS depende del tiempo y de los factores hidrodinámicos que controlan la cinética de la retención. Sin embargo, una vez alcanzado el equilibrio la concentración se vuelve independiente del tiempo y la retención es gobernada por el coeficiente de partición del analito ($K_{PDMS,W} = C_{PDMS}/C_W$) entre la fase acuosa (W) y el sorbente PDMS, también por la razón de volúmenes ($\beta = V_W/V_{PDMS}$) entre las dos fases. Bajo este esquema el polímero se comporta similar a una película de líquido inmovilizado y retiene los analitos por un mecanismo predominantemente adsorptivo.¹²

Una expresión de la eficiencia de extracción teórica (R) se halla considerando que la masa inicial del analito en la fase acuosa (m_{W_0}) debe ser igual a la suma de sus masas en cada fase luego de la extracción (m_W y m_{PDMS}). La expresión de eficiencia teórica es entonces:¹²

$$R = \frac{m_{PDMS}}{m_{W_0}} = \frac{K_{PDMS,w}}{\beta + K_{PDMS,w}} \dots \dots \dots \text{Ec. 1}$$

Las eficiencias teóricas para PDMS serán altas cuando los analitos sean más apolares y la razón de fases β pequeña. También es importante mencionar que estudios recientes han correlacionado el coeficiente $K_{PDMS,W}$ con el coeficiente de distribución octanol-agua ($K_{O,W}$) y, aunque no es muy exacto, es posible estimar si un analito podrá ser extraído por SBSE-PDMS. Un analito puede considerarse relativamente apolar cuando $\log_{10}K_{O,W} > 3$.¹³

Consideraciones prácticas de SBSE

Trabajar con SBSE implica la extracción del analito desde el seno de la matriz muestra y su preconcentración simultánea en el recubrimiento, el paso siguiente es la desorción de la sustancia para su posterior análisis instrumental (generalmente cromatográfico).¹³

La extracción convencional de analitos desde un medio líquido se realiza por inmersión directa de la barra recubierta con sorbente en dicho medio. Sin embargo, también existe la modalidad *headspace*, útil cuando el analito es volátil o semivolátil, que implica promover la transferencia del analito de la matriz líquida hacia la fase vapor donde se realizará la extracción con una barra recubierta suspendida. En general, la extracción por SBSE es influenciada por factores como el espesor del recubrimiento y el volumen de muestra, pero también es importante optimizar parámetros cinéticos (tiempo de equilibración y velocidad de agitación) y parámetros termodinámicos (temperatura, pH, polaridad y fuerza iónica de la matriz).^{9, 12, 14}

Después de la extracción, se remueve la barra de agitación de la matriz acuosa, se lava con agua pura para eliminar interferencias y se seca con un pañuelo que no libere pelusa. La desorción de los analitos se efectúa en la modalidad térmica (TD) o la líquida (LD).¹³

La modalidad TD es útil para el análisis por cromatografía de gases (GC) debido a que implica liberar los analitos termoestables y con volatilidad alta o intermedia mediante calentamiento de la barra, pero requiere una cámara de desorción generalmente cara; además, necesita la optimización de la temperatura de desorción, el flujo de purga e instrumentación capaz de controlar la vaporización programada.¹³

La modalidad LD es útil para el análisis por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) y electroforesis capilar (CE), esto ya que logra la desorción de compuestos termolábiles no volátiles o semivolátiles; pero requiere optimizar condiciones como tipo y cantidad de disolvente(s) extractor(es), tiempo de aplicación de ultrasonido y número de etapas de desorción. Las aplicaciones de LD tienden a ser más variadas que las TD debido a que no está limitada a las sustancias volátiles.¹³

Limitaciones

Aunque SBSE tiene varias aplicaciones aún presenta limitaciones importantes. Una de ellas es que la desorción de los analitos retenidos en la barra recubierta no puede hacerse directamente en un puerto de inyección split/splitless de cromatógrafo de gases; esto implica forzosamente la transferencia previa de los analitos a un disolvente compatible con la técnica, o bien, una inversión monetaria en la adquisición de un dispositivo térmico especial para desorberlos directamente de la barra. También es evidente que en la modalidad LD las operaciones manuales como la remoción de la

barra de la muestra, el lavado y el secado son laboriosas y pueden introducir errores, sin embargo, su automatización implicaría un costo adicional.

Por otro lado, quizás la limitación más grande para SBSE son los pocos recubrimientos disponibles comercialmente: polidimetilsiloxano (PDMS Twister®), poliacrilato (AcrylateTwister®) y el polietilenglicol copolimerizado con PDMS (EG SiliconeTwister®). El PDMS es muy poco afín hacia analitos polares, pero la derivatización química de éstos usualmente ayuda a que sean más afines hacia las fases disponibles e implica modificar sus estructuras moleculares mediante reacciones químicas adecuadas; sin embargo, dicha manipulación introduce error adicional si la reacción no se completa o genera subproductos. Otra alternativa más efectiva ha sido desarrollar recubrimientos modificando PDMS o sintetizar nuevos materiales.^{8, 12}

Recubrimientos para SBSE

Para superar las limitaciones de SBSE se han preparado nuevos recubrimientos utilizando la síntesis polimérica sol-gel, la síntesis monolítica por polimerización radical *in situ*, adhesión física, entre otros métodos. La tabla 1 resume la información disponible.¹⁵⁻⁴⁹

La técnica monolítica origina materiales con poros interconectados y se preparan por polimerización radical *in situ*. Estos materiales tienen gran área superficial y pueden ser utilizados como fases de separación en microextracción capilar y cromatografía (fase reversa, intercambio iónico y afinidad), su amplia aplicación es debido a la posibilidad de modificar sus superficies agregando grupos funcionales. La polimerización *in situ* es barata, simple y altamente reproducible; implica seleccionar un iniciador de reacción (usualmente azobisisobutironitrilo), un monómero, un agente para controlar el tamaño de los poros (porógeno) y un agente de entrecruzado.⁸ Muchos analitos se han extraído con estos materiales aplicando SBSE,²⁹⁻³⁷ algunas barras sorbentes soportan hasta 10 extracciones sucesivas sin daños apreciables.²⁹

La técnica de impresión molecular (MIP) implica la síntesis de materiales con sitios activos generados artificialmente y con capacidad de enlazarse a compuestos específicos, discriminando de otros con estructura química similar. La síntesis consta de tres pasos: 1) enlace covalente o no covalente de una molécula modelo con el monómero, 2) unión química del complejo molécula modelo-monómero al material polimérico en formación por medio de un agente de entrecruzado y 3) remoción de la molécula modelo, esto deja libre un sitio activo en la red tridimensional del material y le provee de la capacidad de reconocer esa estructura molecular. La ventaja principal de estos materiales en SBSE es su selectividad y rápida dinámica de adsorción; se han aplicado en matrices ambientales y biológicas revelando variados usos.^{8,38-42}

Tabla 1. Nuevos recubrimientos propuestos para SBSE y sus aplicaciones.

Recubrimiento	Técnica	Analitos	Matriz/Medio	Desorción	Referencias
PDMS	Polimerización sol-gel	n-alcanos, PAHs, OPP	Muestras acuosas	LD, TD	15
PDMS	Polimerización sol-gel	OPP	Pepino y papa	TD	16
PEG/PDMS/PVA	Polimerización sol-gel	VOS	Agua pura	LD	17
PDMS/PVA	Polimerización sol-gel	OPP	Miel	LD	18
PDMS/ β -CD	Polimerización sol-gel	Retardantes de flama bromados	Suelo y polvo	LD	19
PDMS/ β -CD/DVB	Polimerización sol-gel	PAHs y PASHs	Agua de lago y suelo	LD	20
PDMS/ β -CD	Polimerización sol-gel	Estrógenos y Bisfenol A	Agua ambiental y residual doméstica	LD	21
PDMS/PVA	Polimerización sol-gel	DMSe y DMDSe	Ajo y cebolla	LD	22
TiO ₂ -OH-TSO	Polimerización sol-gel	Drogas anfetaminas	Orina	LD	23
PDMS/TEOS	Polimerización sol-gel	OPP	Agua pura	LD	24
PDMS/CNPrTEOS	Polimerización sol-gel	NSAIDs	Agua pura	LD	25
PMHS/CNPrTEOS	Polimerización sol-sol	NSAIDs	Agua pura	LD	26
PDMS-PMHS-MTMS-C ₁₈	Polimerización sol-sol	Sulfamidas	Leche (líquida y polvo)	LD	27
APTES-OH-TSO	Polimerización sol-sol	Benzoatos (preservativos)	Bebidas	LD	28
Poli(MOAE-EDMA)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	PAHs y esteroides anabólicos	Agua marina y orina	LD	29
Poli(MASE-EDMA)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	Hormonas sexuales esteroides	Orina	LD	30

APTES aminopropiltrióxido de silano, β -CD β -ciclodextrina, CNPrTEOS 3-cianopropiltrióxido de silano, DMSe dimetilselenio, DMDSe dimetildiselenio, DVB divinilbenceno, EDMA etilendimetacrilato, LD desorción líquida, MAOE octilmetacrilato, MASE éster metacrilato ácido esteárico, NSAIDs medicamentos no esteroideos antiinflamatorios, OPP plaguicidas organofosforados, PAHs hidrocarburos aromáticos policíclicos, PASHs policiclos aromáticos heterocíclicos azufrados, PDMS poldimetilsiloxano, PMHS polimetilhidrosilano, PVA alcohol polivinílico, RAM materiales de acceso restringido, TD desorción térmica, TEOS tetraetoxisilano, MTMS metiltrimetoxisilano, TSO aceite de silicona hidroxilado, VOS compuestos orgánicos azufrados volátiles.

Tabla 1. Nuevos recubrimientos propuestos para SBSE y sus aplicaciones (continuación).

Recubrimiento	Técnica	Analitos	Matriz/Medio	Desorción	Referencias
Poli(VP-EDMA)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	Fenoles	Agua de lago y marina	LD	31
Poli(VP-EDMA)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	Hormonas sexuales esteroides	Agua residual	LD	32
Poli(VPL-DVB)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	PAHs, hormonas, aminas aromáticas, fenoles y metales pesados (Cu ⁺² , Pb ⁺² , Cr ⁺³ , y Cd ⁺²)	Agua pura	LD	33
Poli(VIDVB)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	Aminas aromáticas	Agua potable, marina y residual	LD	34
Poli(META-DVB)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	Br, NO ⁻³ , PO ⁻³ , y SO ₄ ⁻²	Agua purificada	LD	35
Poli(MASE-DVB)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	Quinolonas	Agua residual	LD	36
Poli (AMPS-OCMA-EDMA)	Polimerización radicalica <i>in situ</i> de monolitos.	Fluoroquinolonas	Miel	LD	37
nylon 6 (modelo: monocrotofos)	MIP vía sol-gel modificada y luego inversión de fase.	OPPs	Suelo	LD	38
nylon 6 (modelo: L-glutamina)	MIP vía sol-gel modificada y luego inversión de fase.	D,L-Glutamina	Agua pura	LD	39
MAPS-MAA-TRIM (modelo: terbutilazina)	MIP vía polimerización radical <i>in situ</i> .	9 triazinas	Arroz, manzana, lechuga y suelo	LD	40

AMPS ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico, DVB divinilbenceno, EDMA etilendimetacrilato, LD desorción líquida, MAA ácido metacrílico, MAPS 3-(metacriloxi)propiltrimetoxisilano, MASE éster metacrilato ácido esteárico, META cloruro de metacrililoil oxi etil trimetil amonio, MIP polímero con impresión molecular, OCMA octadecil metacrilato, OPP plaguicidas organofosforados, PAHs hidrocarburos aromáticos policíclicos, PVA alcohol polivinílico, TRIM Trimetilolpropano trimetacrilato, VIDVB vinilimidazol divinilbenceno, VP vinilpiridina, VPL vinilpirrolidona.

Tabla 1. Nuevos recubrimientos propuestos para SBSE y sus aplicaciones (continuación).

Recubrimiento	Técnica	Analitos	Matriz/Medio	Desorción	Referencias
MAPS-MAA- EGDMA (modelo: Ractopamine)	MIP vía polimerización radicalica <i>in situ</i> .	Ractopamina, isoxsuprina, clenbuterol y fenoterol.	Cerdo, hígado y alimento animal	LD	41
MAPS-MAA-EDMA (modelo: Nicosulfuron)	MIP vía polimerización radicalica <i>in situ</i>	Nixosulfurón	Suelo y agua potable	LD	42
ADS (RAM)	Adhesión	Cafeína y metabolitos	Plasma sanguíneo	LD	43
PPESK	Inmersión-precipitación	OCPs y OPPs	Agua marina, jugos de durazno y uva.	LD	44
PDMS/PPY	Polimerización en solución	Antidepresivos	Plasma sanguíneo	LD	45
PPY	Electropolimerización	Benceno, tolueno, etilbenceno, o,p-xileno	Acuosa	LD	46
Poliuretano	Polimerización diisocianato-poliol	Atrazina y fluoreno	Agua pura	LD	47
Poliuretano	Polimerización diisocianato-poliol	Triazinas	Agua ambiental	LD	48
Poliuretano	Polimerización diisocianato-poliol	Fármacos ácidos	Agua ambiental	LD	49

ADS alquil diol silica, EDMA etilendimetacrilato, EGDMA etilenglicol dimetacrilato, LD desorción líquida, MAA ácido metacrílico, MAPS 3-(metacriloxi)propiltrimetoxisilano, MIP polímero con impresión molecular, OCPs plaguicidas organoclorados, OPP plaguicidas organofosforados, PDMS polidimetilsiloxano, PPY polipirrol, PPESK poli(Ftalazinona ether sulfona cetona), RAM materiales de acceso restringido.

La técnica de adhesión física es útil para materiales sólidos particulados, implica adherirlos a la superficie de soporte como el vidrio utilizando una sustancia adherente adecuada.⁸ Lambert *et al.*⁴³ empleando un pegamento epóxico (Epo-Tek 353ND) han aplicado esta tecnología a SBSE para adherir partículas de alquil diol sílica (ADS) a la barra, el resultado fue un recubrimiento capaz de extraer analitos polares (cafeína y sus metabolitos) de matrices complejas (orina y plasma). Fue reutilizable hasta 50 veces; además, el material puede considerarse de acceso restringido (RAM). Un material RAM consigue extraer analitos de fluidos biológicos y matrices complejas por ser biocompatible, las partículas por su tamaño de poro controlado extraen moléculas pequeñas pero excluyen macromoléculas.⁸

La polimerización sol-gel implica una reacción a baja temperatura, simple operación y la posibilidad de controlar la estructura y la morfología del material. Esta técnica abre las posibilidades de obtener una gran variedad de materiales inorgánicos o inclusive híbridos orgánicos-inorgánicos. Al enlazarse a un soporte de vidrio muchos materiales sol-gel tienden a mejorar su resistencia mecánica y estabilidad química. La tecnología sol-gel ha sido ampliamente utilizada en la preparación de fases sorbentes para SPE, SPME, microextracción capilar y es el método más útil para SBSE.⁸ La Tabla 1 pone en evidencia la cantidad de analitos que pueden ser extraídos con los recubrimientos sol-gel.¹⁵⁻²⁵ Algunas fases sorbentes aplicadas en SBSE tienen como ventaja una mejora en la reproducibilidad y son capaces de realizar más de 30 extracciones sucesivas con pérdida mínima de su recubrimiento. No obstante, es escasa la información sobre extracción de analitos orgánicos con $\log_{10}K_{OW} < 2$ empleando materiales a base de PDMS modificado vía sol-gel.^{18,20}

Debe destacarse que el uso de PDMS en la síntesis de recubrimientos para SBSE tiene reconocidas ventajas, por ejemplo, Hu *et al.*²¹ argumentan que su introducción: i) incrementa el área superficial del material empleado como recubrimiento, ii) contribuye a una distribución uniforme de la fase estacionaria, iii) reduce la fragilidad del recubrimiento y iv) ayuda a prevenir su fractura. Por otro lado, Ibrahim *et al.*²⁵ destacan que introducir CNPrTEOS en un recubrimiento tiende a incrementar su afinidad por analitos más polares por causa del momento dipolar del grupo ciano; además, aunque las interacciones del tipo puente de hidrógeno con ciano son un poco débiles debido a la baja basicidad del par electrónico libre del nitrógeno con respecto a las aminas, la retención de analitos con grupos aromáticos puede mejorar debido a interacciones π - π . Adicionalmente, según Vo Duy *et al.*⁹⁵ la incorporación de TEFS introduce el grupo fenilo y con ello más interacciones π - π con los analitos. Los derivados alcoxilados de silicio además de introducir grupos funcionales, también desempeñan la función de agentes entrecruzantes pues enlazan las cadenas de PDMS por condensación a modo de puentes.^{24,50,95}

Síntesis sol-gel

La síntesis sol –gel fue inicialmente utilizada para preparar materiales inorgánicos como vidrios y cerámicas partiendo de precursores alcóxidos alifáticos de metal ($M[OR]_x$, donde R es un n-alcano) o sales. Sin embargo, debido a la baja temperatura asociada con la síntesis, se hizo posible el empleo de precursores de silicio funcionalizados con grupos orgánicos $R'Si(OR)_x$; así fue posible la obtención de híbridos inorgánicos-orgánicos con propiedades únicas y difíciles de obtener por otras técnicas.⁵⁰ La figura 2 ilustra las etapas de la síntesis sol-gel y su aplicación para obtener recubrimientos en forma de películas.

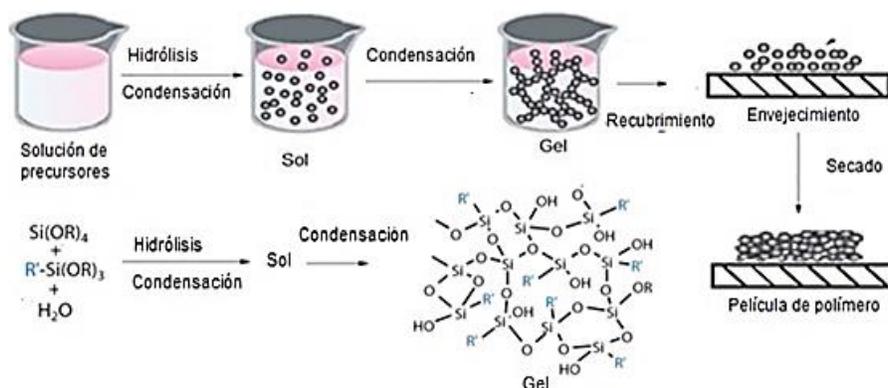


Figura 2. Esquema general de la síntesis sol-gel y su aplicación para la obtención de películas sorbentes.

La síntesis sol-gel implica pasar irreversiblemente de una solución monofásica de precursores (sol) hacia un sistema bifásico (gel) por polimerización. El disolvente elegido (no necesariamente acuoso) debe ser adecuado para los precursores y a veces incluye un alcohol ROH. La hidrólisis de los precursores (por catálisis ácida o básica) genera especies $R'Si(OR)_{x-1}(OH)_x$, luego éstas formarán partículas por condensación de grupos hidroxilo y se generarán enlaces Si-O-Si. La condensación adicional formará una red tridimensional rellena del disolvente: el gel. La condensación frecuentemente no es completa, por ello, un tiempo de envejecimiento usualmente es necesario para que progrese. La evaporación posterior del disolvente ocasiona que la estructura del gel experimente cierta compresión y origine un sólido con potencial utilidad como sorbente y usualmente poroso.^{50,51}

Las propiedades químicas y mecánicas de los materiales obtenidos por sol-gel se pueden ajustar variando condiciones como la naturaleza y proporción de los precursores, disolvente(s), el tiempo de reacción, el catalizador y el tiempo de envejecimiento después de la gelación.⁴ Además, se enlazan fácilmente a soportes que poseen silanol (Si-OH) en su superficie (como el caso del vidrio), permitiéndoles fungir como recubrimientos.^{24, 25}

Caracterización y evaluación de la estabilidad de los materiales

Para caracterizar los recubrimientos la literatura reporta el uso de: espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) para identificar vibraciones de enlace y agrupamientos atómicos particulares; microscopía de barrido electrónico (SEM), la cual permite examinar la morfología de la superficie; espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDX) para el análisis elemental del material y es posible utilizarla con SEM (SEM-EDX); ángulo de contacto para evaluar la humectabilidad del material y, por tanto, la existencia de fuerzas hidrofílicas en la superficie; microscopía de fuerza atómica (AFM) para analizar la morfología de superficies nanoestructuradas y obtener mapas de estas; y calorimetría de barrido diferencial (DSC), útil para identificar cambios de fase, temperatura vítrea, comportamiento amorfo o cristalino, entre otras propiedades. La estabilidad térmica se puede evaluar por análisis termogravimétrico (TGA) monitoreando la pérdida de masa del recubrimiento con el incremento de temperatura, y la resistencia a corrosión química sometiendo el recubrimiento a diversas sustancias y midiendo la variación de peso.⁵⁰⁻⁵⁴ La extracción por SBSE de analitos con diferente $\log_{10}K_{OW}$ también es una forma de caracterizar la naturaleza química de los materiales y sus aplicaciones potenciales como sorbentes.¹⁸

Antibióticos con $\log_{10}K_{OW}<0$

Tetraciclinas

Las tetraciclinas (TCs) son un grupo de antibióticos de amplio espectro que poseen actividad contra organismos Gram (+) y Gram (-), así como también contra parásitos micoplasma, rickettsia y protozoarios. Sus estructuras pueden observarse en la Figura 3. Constan de cuatro anillos de seis carbonos fusionados, pero solo uno con aromaticidad completa (anillo D). Han sido utilizadas principalmente con fines veterinarios para proteger la salud de animales de consumo y promover su crecimiento, aunque también se pueden emplear en humanos. Por su bajo costo son muy utilizadas a nivel mundial, pero se ha demostrado que los mamíferos excretan hasta un 70% de la dosis administrada en formas activas. Actualmente es posible encontrar residuos de estos compuestos en alimentos como la leche y en carnes, aunque finalmente llegan al agua y suelo naturales por descargas de aguas residuales o aplicación directa de estiércol con fines agrícolas. En el ambiente podrían promover el desarrollo de patógenos resistentes, producir efectos de toxicidad crónica, inducir daños endocrinos en organismos acuáticos e inhibir el crecimiento de organismos tanto terrestres como acuáticos.⁷

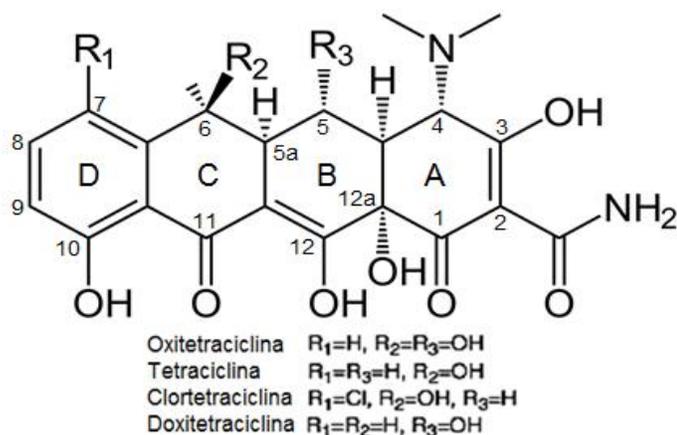


Figura 3. Representantes del grupo de las tetraciclinas.

Finalmente, las tetraciclinas, dependiendo del pH, pueden encontrarse portando una carga positiva (H_4TC^+), en forma switteriónica (H_3TC^\pm) y con una carga negativa (H_2TC^-), raramente con dos cargas negativas (HTC^{-2}) por cuestiones de inestabilidad en medios alcalino. La desprotonación del hidroxilo del C3 se asocia a las primeras constantes de disociación ácida (pK_{a1}) y se reportan valores en el rango 3.0-3.3. Los pK_{a2} y pK_{a3} se asocian a las reacciones de desprotonación del oxígeno en la posición 12 y del grupo dimetilamonio, sin embargo, la asignación exacta es controversial; para los pK_{a2} se reportan valores entre 7.5-8.0 y para los pK_{a3} entre 8.9-9.6.⁵⁵

La figura 4 presenta el diagrama de distribución de especies de la tetraciclina, para otras tetraciclinas diagramas similares pueden ser trazados.⁶²

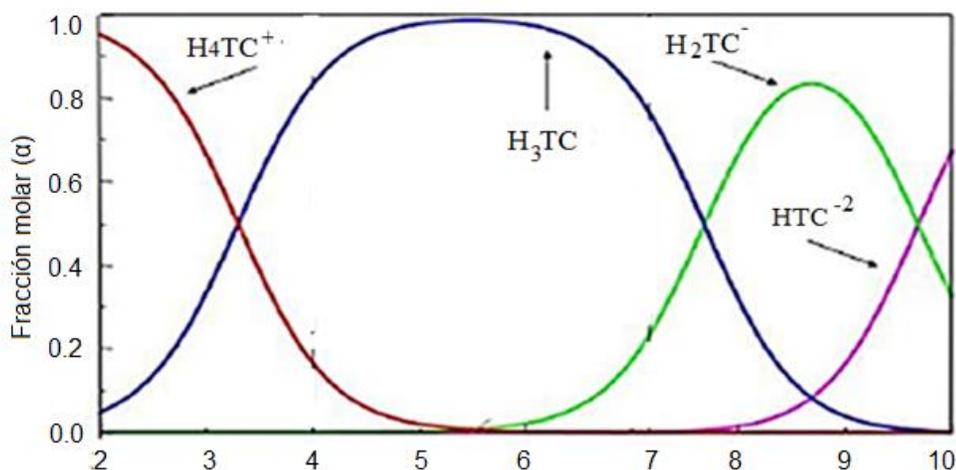


Figura 4. Distribución de las diferentes especies de tetraciclina como función del pH.

Las tetraciclinas son bastante solubles en agua y alcoholes de bajo peso molecular (metanol y etanol), en otros disolventes como acetonitrilo, acetato de etilo y acetona su solubilidad es variable. Sus $\log_{10}K_{OW}$ son negativos: oxitetraciclina (-1.12), tetraciclina (-1.37), clortetraciclina (-0.68) y doxitetraclina (-0.02). En agua son solubles en el rango de mg/L, pero en aguas naturales pueden diluirse hasta ng/L o $\mu\text{g/L}$; por esta razón es necesario preconcentrarlas antes de poder detectarlas con técnicas instrumentales.^{7,55}

Metodos de cromatografía de líquidos para el análisis de tetraciclinas

La extracción de tetraciclinas de medios líquidos utilizando SBSE con sorbentes poliméricos derivados de PDMS modificado no se ha reportado hasta donde se tiene conocimiento. La extracción de estos compuestos con sorbentes sólidos se ha realizado comúnmente en condiciones ácidas (pH 3-4) con SPE (OASIS HLB)⁵⁶ y también se ha utilizado SPME dispersiva⁵⁷.

Aunque las tetraciclinas pueden separarse en columnas cromatográficas de intercambio iónico, resulta evidente la versatilidad de llevar a cabo la separación en fase reversa. Usualmente la segunda opción implica menores tiempos de retención y un análisis relativamente rápido, permitiendo el ahorro de disolventes. Esto debido a la naturaleza polar de los antibióticos.⁵⁶

Las fases móviles orgánicas más comúnmente empleadas para separar tetraciclinas han sido metanol y acetonitrilo, los cuales actúan como modificadores orgánicos de fases acuosas y permiten modificar el orden de elución de los compuestos. Las fases móviles acuosas empleadas generalmente son disoluciones de ácidos orgánicos como el ácido cítrico y fórmico, aunque también es común utilizar el ácido oxálico.⁵⁶⁻⁶¹

La separación de tetraciclinas se ha realizado preferentemente en columnas termostatizadas para lograr reproducibilidad, generalmente a una temperatura de 25°C. Aunque en algunos casos ha sido más favorable llevar a cabo la separación a 15°C.⁵⁸

La tabla 2 lista algunas de las metodologías para separar y cuantificar las tetraciclinas utilizando HPLC y diversos detectores.⁵⁶⁻⁶¹ Debajo de la misma se han incluido el significado de las abreviaturas para facilitar al lector la comprensión de la misma.

Tabla 2. Métodos para determinar Tetraciclinas por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Técnica de extracción	Fase extractora	Elución	Fase móvil	Modo de separación	Columna y detección	Referencia
DLLME	Líquido iónico-etilacetato	N.A.	A: MeOH B: ACN C: ácido fórmico (0.1% v/v)	Gradiente (25°C) 0–8 min: 4% A, 12% B, y 84% C con flujo de 0.8mL/min y de 8.01–21.0 min: 8% A, 24% B, 68% C con flujo de 0.4mL/min	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 cm x 4.6 mm) Detector UV a 278nm	56
SPME dispersiva	Supelclean PSA	10:2:88 (v/v/v) ACN:HClO ₄ :H ₂ O	Fase A: ACN Fase B: ácido oxálico (10Mm)	Gradiente (25°C) Flujo: 1mL/min	Intersil ODS-2 (150mm x 4.6mm) Detector: DAD a 360nm	57
SPE	OASIS HLB®	Mezcla 50:50 (v/v) ACN: ácido fórmico al 1% (v/v)	Fase A: ACN Fase B: ácido fórmico en agua (0.1%v/v)	Gradiente (15°C) Flujo: 0.35mL/min	C ₁₈ (2.1mm×10cm, poro: 1.7 μm) Electrospray – Tandem (MS/MS)	58
SPE	Polímero de MAA-EDGMA impreso con TC	On-line con la fase móvil	Fase A: 0.05 M Na ₂ HPO ₄ -ácido cítrico (pH 6.0) Fase B: ACN	Gradiente (25°C) Flujo: 2 mL/min	Luna C ₁₈ (25cm x4.6 mm) Detector: DAD a 355 nm.	59
SPE	Zeolita imidazolato	On-line con la fase móvil	10% MeOH–20% ACN–70% ácido oxálico (0.02 M)	Isocrática (25°C) Flujo: 1.0 mL/min	C18 (4.6 mm x25 cm) Detector: DAD a 365 nm	60
SPE	HLB de Waters®	MeOH	Fase A: NH ₄ (HCO ₂) 10mM en 90/10 H ₂ O/MeOH con 0.3% de ácido fórmico. Fase B: NH ₄ (HCO ₂) 10 mM con 0.5% de ácido fórmico en MeOH.	Gradiente (25°C) Flujo: 0.60mL/min	Luna C8(2) (10cm x 4.6-mm, poro: 3μm) Electrospray-MS	61

ACN acetonitrilo, DAD detector de arreglo de diodos, DLLME microextracción líquido-líquido dispersiva, EDGMA etilenglicol dimetacrilato, HClO₄ ácido perclórico, MAA metracrilato, MeOH metanol, MS espectrómetro de masas, N. A. No aplica porque la fase extractora se evaporó y cambió por metanol, Na₂HPO₄ fosfato disódico, NH₄(HCO₂) formiato de amonio.

Antibióticos con $0 < \log_{10}K_{OW} < 2$

Cloranfenicol

El cloranfenicol (antiguamente cloromicetina) fue el primer compuesto con el grupo nitro encontrado en la naturaleza, se aisló del hongo *Streptomyces venezuelae* y presentó amplio espectro antimicrobiano; inclusive actualmente su producción sigue apoyándose de este microorganismo. La estructura del cloranfenicol se puede ver en la figura 5, posee 2 centros quirales pero de sus cuatro diastereoisómeros solo el D-Treo posee actividad antibiótica. También posee dos átomos de cloro, una función amida y dos grupos hidroxilo.⁶³

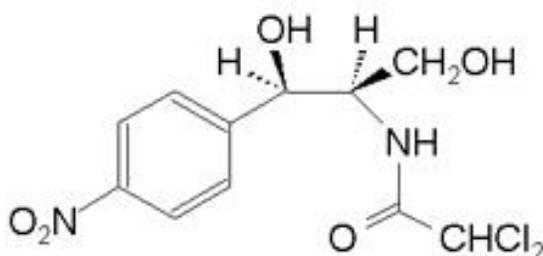


Figura 5. Estructura del antibiótico cloranfenicol.

En un principio se consideró a esta sustancia el antibiótico ideal porque pasaba fácilmente la membrana celular bacteriana e interrumpía la síntesis de proteínas, igualmente podía pasar la barrera sangre-cerebro (algo poco usual en los antibióticos); sin embargo, desde los años 60s se descubrió una relación independiente de la dosis con la peligrosa e irreversible anemia aplásica que ocurre con frecuencia de 1/10000-1/40000. Su aplicación en neonatos puede producir el síndrome gris que es potencialmente mortal ya que causa baja presión arterial y cianosis (baja oxigenación). Por ello, el cloranfenicol actualmente se usa para tratar muy pocas enfermedades como *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* o *Streptococcus pneumoniae* cuando otro agente microbiano no está disponible, también es frecuente su uso oftalmológico. Desde 1994 su empleo en animales de consumo se prohibió por el riesgo de la anemia aplásica, pero está permitido para mascotas.⁶³

El cloranfenicol es anfífilo y no se encuentra ionizado bajo condiciones fisiológicas. La sustancia es muy estable y puede ser almacenada por largo tiempo, no se hidroliza rápidamente entre pH 2-6 a 20-22°C (tarda 290 días en descomponerse la mitad); sin embargo, es fotosensible. En condiciones alcalinas (pH 7.4) es aún más persistente. A 115 °C por 30 min apenas se descompone un 10%. No es soluble en benceno, éter de petróleo o aceites vegetales. Es soluble en etanol (50 g/L), aunque es muy soluble en butanol, acetona, y acetato de etilo; es ligeramente soluble en agua (2.5 - 4.4 g/L a 25 - 28°C) a pH 5.5-7. Posee un $\log_{10}K_{OW}=1.14$.⁶³

El cloranfenicol se ha detectado en miel, res, camarón, pescado, pollo, huevos y leche aplicando la extracción líquido-líquido con acetato de etilo o acetonitrilo en combinación con algún buffer ácido.⁶⁴ La microextracción líquido-líquido dispersiva se ha reportado para miel utilizando tetracloroetano y acetonitrilo como dispersante, y también se ha extraído desde el suelo por dispersión de matriz en fase sólida con MIP. La microextracción en fase sólida en agua y orina se ha realizado con fases de DVB-PDMS, poliacrilato (PA) y carbowax templado (CW-TMP), siendo la última la que tuvo mejor desempeño especialmente con 20% de NaCl, pH 5 y extrayendo por 20 min; la desorción se realizó con 7/3 v/v ACN/Buffer acetato (10 mM, pH 4.6).^{65,66} Típicamente la determinación de cloranfenicol se ha realizado por HPLC-MS/MS aunque también hay reportes de HPLC-UV a 275-278 nm. Las columnas utilizadas comúnmente tienen fases C18, mientras que las fases móviles son agua o soluciones ácidas (0.1% v/v HCOOH, 2-5 mM CH₃COONH₄) junto con MeOH o ACN como fases orgánicas (a veces con 0.1% v/v HCOOH).⁶⁴⁻⁶⁶

Sulfamidas

Las sulfamidas (sulfonamidas o sulfas) son compuestos organoazufrados que se caracterizan por contener los grupos $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ o $-\text{SO}_2\text{NH-R}$. Las sulfamidas con actividad antibiótica pueden considerarse amidas del ácido p-aminobenzenosulfónico y, tal como lo muestra la figura 6, los diversos antibióticos de este grupo solo difieren por la identidad sustituyente R. En dicha figura se ilustran los sustituyentes que caracterizan a sulfas como sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinaxolina.^{67,68}

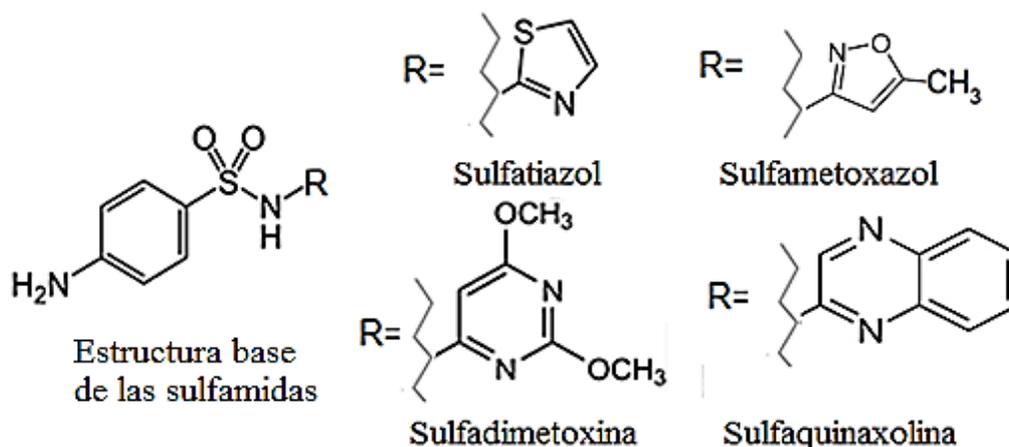


Figura 6. Estructura de algunas sulfamidas.

Las sulfamidas inhiben la síntesis del ácido fólico en microorganismos, frenando con ello su crecimiento, pero sin destruirlos. Ejercen efecto sobre bacterias Gram (+), algunas Gram (-) y clamidias. Hace 30 años redujeron la mortalidad por gonorrea, meningitis, disentería por *Shigella* e infecciones por estafilococos y estreptococos; sin embargo, actualmente su errónea administración y uso excesivo ha permitido el desarrollo de resistencia bacteriana y ya no se tratan con ellas las enfermedades mencionadas. Las sulfamidas hoy se aplican para tratar infecciones en animales de consumo y para promover su crecimiento; en humanos combaten infecciones del tracto urinario.⁶⁸

Las sulfamidas frecuentemente se combinan con fármacos diaminopiridinas (siendo más frecuente con Trimetoprim); dicha mezcla es más activa que cada fármaco por separado (sinergismo) e inhibe el proceso de síntesis del ácido fólico en dos etapas diferentes, minimizando así el surgimiento de resistencia bacteriana. Cotrimoxazol es el fármaco combinado más común, contiene Trimetoprim y Sulfametoxazol en proporción 1/5.⁶⁸

Los hervíboros metabolizan más rápido las sulfamidas, estos compuestos se acetilan en el nitrógeno aromático y son estos metabolitos acetilados los analitos mayoritarios hallados en orina de cerdo, res y ovejas. En dosis terapéuticas las sulfamidas pueden pasar a la orina a través de los riñones sin ser metabolizadas, especialmente cuando la orina se vuelve más alcalina. También se excretan por la leche materna aunque en menor cantidad.⁶⁸

Las sulfamidas dependiendo del pH pueden existir como cationes (H_2A^+), moléculas neutras (HA) o aniones (A^-). La primera desprotonación se asocia a la amina unida al anillo aromático ($-Ar-NH_3^+$), la segunda se asocia con la desprotonación del nitrógeno enlazado al azufre ($-SO_2NH-R$). Por ejemplo, se han reportado valores de pK_{a1} entre 2.01-2.08 para sulfatiazol, entre 1.80-1.85 para el sulfametoxazol, entre 1.87-2.13 para sulfadimetoxina y de 1.86 para sulfaquinaxolina; en lo relativo a pK_{a2} se han reportado valores de pK_{a2} entre 6.11-7.24 para sulfatiazol, entre 5.6-5.9 para sulfametoxazol, 5.86-6.13 para sulfadimetoxina y 5.56-6.10 para sulfaquinoxalina. En la figura 7 se presentan los diagramas de distribución de especies ácido-base para estos antibióticos.^{67,69}

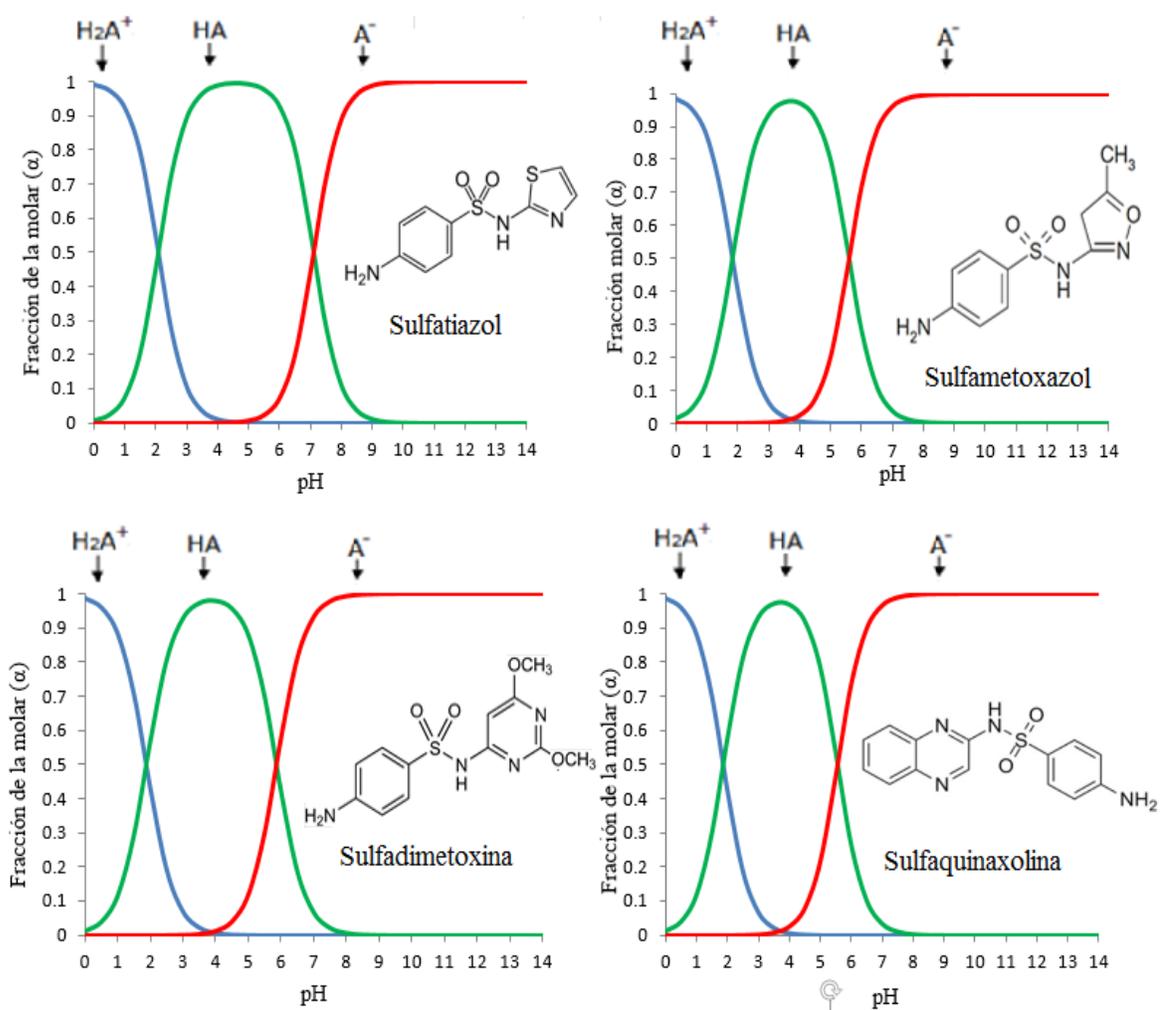


Figura 7. Diagrama de distribución de especies del sulfatiazol, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfaquinaxalina.

La solubilidad del sulfatiazol ($\log_{10}K_{OW}=0.05$) a 25°C es baja en agua (373 mg/L) y en comparación con otros disolventes sigue el orden: agua < 2-propanol < acetona. En cloroformo y en éter es insoluble, no obstante, se solubiliza bien en soluciones acuosas ácidas o alcalinas. El sulfametoxazol ($\log_{10}K_{OW}=0.89$) es menos soluble en agua y sigue la tendencia: agua < cloroformo < 1-propanol < etanol < metanol < acetona.^{70,71} La sulfadimetoxina ($\log_{10}K_{OW}=1.63$) es todavía aún menos hidrofílica (340 mg/L), pero es más soluble en acetonitrilo, acetona y en alcoholes (metanol > etanol > 1-propanol > 1-butanol). La sulfaquinaxolina ($\log_{10}K_{OW}=1.68$) es muy poco soluble en agua (7.5 mg/L), aunque es bastante soluble en acetonitrilo (100 mg/L), 95% alcohol (750 mg/L) y aún más en acetona (4300 mg/L).⁷²⁻⁷⁴

Debido a su aplicación en la crianza de animales no es raro que los humanos terminen estando expuestos a estas sustancias a través de huevos, carne, miel y

productos lácteos. Lo preocupante es que el consumo prolongado de sulfamidas se ha asociado a alteraciones en la microflora intestinal, reacciones alérgicas y con el desarrollo de infecciones difíciles de tratar; además, algunos productos de descomposición resultan con mayor toxicidad que los compuestos originales. Por otro lado, estos antibióticos entran al medio ambiente debido a una mala disposición de aguas negras cargadas con residuos humanos y animales (de granjas avícolas o porcícolas principalmente). El contenido de sulfamidas usualmente crece en el siguiente orden: agua de mar < agua subterránea < agua superficial < agua tratada < agua residual municipal no tratada < residuos hospitalarios < suelo < estiércol animal. En agua no tratada el contenido total de sulfamidas oscila entre 0.01 -19.2 µg/ L y en agua tratada entre 0.004-6.0 µg/L, siendo usualmente el metoxazol la especie más común.⁶⁸

Para extraer sulfonamidas de aguas la técnica predominante ha sido la extracción en fase sólida con los cartuchos comerciales OASIS HLB y Strata-X (contienen poliestireno con un anillo de pirrolidona), Bond Elut-ENV (Poliestireno-divinilbenceno) y Hysphere C18. Los mejores eluyentes han sido metanol, acetona o la mezcla en proporción 1:1, en todos los casos tuvieron mejor desempeño que acetonitrilo. Técnicas alternativas que se han reportado incluyen las microextracciones líquido-líquido en gota, la microextracción en fase sólida, la microextracción líquido-líquido dispersiva y también se han propuesto líquidos iónicos como extractores. La separación típicamente se ha realizado en fase reversa con columnas C18. Con detección HPLC-MS/MS se ha utilizado la modalidad en gradiente empleando como fase acuosa ácido fórmico (0.1%v/v o 10mM) y como fase orgánica acetonitrilo acidificado (0.1%v/v o 10mM). Con detectores de arreglo de diodos (DAD), en el rango de longitudes de onda 265-280 nm, se han reportado separaciones isocráticas o en gradiente con disoluciones acuosas ácidas (pH 3.2-4.9) de ácido fórmico, ácido acético o buffer fosfato combinadas con fases orgánicas MeOH o ACN.⁷⁵

En aguas residuales se evaluó la microextracción en fase sólida utilizando 5 recubrimientos: PDMS, carbowax/divinilbenceno (CW/DVB), carbowax templado (CW/TPR), poliacrilamida (PA) y PDMS/DVB. La fibra CW/DVB fue la mejor, se encontraron sus condiciones óptimas de extracción (20 min, 10% KCl, pH 4.5) y desorción (estática por 30 min).⁷⁶

Yu y Hu *et al.*²⁷ extrajeron sulfamidas de leche líquida y en polvo utilizando materiales con partículas de sílica C₁₈ adheridas; para pegarlas se evaluaron dos adhesivos: PDMS-polimetilhidrosiloxano (PMHS)-metiltrimetoxisilano (MTMS) y un pegamento epoxídico. El material sol-gel a base de PDMS retuvo mejor las partículas durante las extracciones (resistió 20 sucesivas sin perderlas) y también tuvo mejor estabilidad ante disolventes. La extracción SBSE se realizó en disoluciones acuosas de leche previamente desproteinizada y bajo condiciones de pH 2, con 15% m/v de NaCl, a 600 rpm y por 10 min; la desorción se realizó con 90 µL de MeOH y aplicando ultrasonido por 10 min.

Huang *et al.*⁷⁷ reportan la aplicación de SBSE para extraer sulfonamidas de carne de puerco y pollo con un material monolítico de poli(vinilftalimida-co-N,N metilenbisacrilamida) (VPMB) sintetizado por vía radicalica. Antes de aplicar SBSE los analitos se extrajeron con acetonitrilo (5mL) y ultrasonido, luego este extracto se diluyó a 100 mL con agua. Las mejores extracciones se consiguieron con pH 4 a 5, 5% m/v de NaCl y 2 h; la desorción se realizó con metanol por 60 min. Las recuperaciones estuvieron entre el 55-106%. La barra recubierta con PDMS comercial no logró extracción significativa de las sulfamidas, otro recubrimiento monolítico (VPDE) basado en poli(vinilpiridina-co-etilendimetacrilato) tuvo mejor desempeño pero ninguno fue superior al recubrimiento VPMB. El método cromatográfico implicó una separación con una columna Kinetex C18 (100 mm×3.0 mm, 2.6 µm) y detección con triple cuadrupolo (HPLC-MS/MS).

Huang *et al.*⁷⁸ también reportaron la aplicación de SBSE para extraer sulfamidas de leche con un recubrimiento monolítico de poli(vinilimidazol-divinilbenceno). Para ello, la leche se diluyó 1/10 y la extracción se realizó desde una disolución acuosa de 50 mL. La extracción se efectuó por 60 min a 300 rpm y pH 3 a 5, pero mejoró con 15% m/v NaCl. Se hizo la desorción con 3 mL de acetonitrilo-agua 9/1 v/v por 40 min, pero luego se evaporó y se reconstituyó con metanol para análisis por HPLC-MS/MS. La separación se realizó con Kromasil C18 column (250mm×4.6mm×5µM.), la fase móvil fue agua con 35%v/v ACN y la detección se realizó por DAD a 268 nm a un flujo de 1mL/ min.

Xu *et al.*⁷⁹ reportaron la extracción SBSE de varias sulfamidas en medio orgánico (tolueno) utilizando como fase extractora un MIP sintetizado a partir de ácido metacrílico y etilenglicoldimetacrilato utilizando como molécula modelo sulfametazina. Previamente tejidos de pollo y cerdo fueron fortificados con sulfamidas, luego los antibióticos se extrajeron con diclorometano, se evaporó el disolvente y se reconstituyó con 5 mL de tolueno. La extracción SBSE se realizó en la muestra reconstituida con tolueno agitando la barra a 500 rpm y la desorción con metanol (150 µL) fue asistida por ultrasonido (10 min).

Trimetoprim

El trimetoprim es un antiguo antibiótico que fue introducido en los años 60s y usado en combinación con el sulfametoxazol bajo el nombre comercial Bactrim® dado que actúan sinérgicamente. Actualmente también se aplica con fines veterinarios en la crianza de animales domésticos y de consumo. El trimetoprim es una diaminopiridina que actúa como las sulfamidas interfiriendo en la síntesis de ácido fólico y, por tanto, como bacteriostático inhibiendo el crecimiento bacteriano; sin embargo, lo hace en una etapa distinta del proceso. La administración del medicamento generalmente es oral y solo un 10-20% de la dosis es metabolizada a través de la oxidación del metileno o del grupo amino. Un 60% de la droga se excreta en forma activa por la orina o como conjugados de ácido glucurónico o sulfatos, mientras más ácido sea el pH de la orina

mayor cantidad se excretará; menos del 4% se elimina por las heces. El trimetoprim no es muy tóxico para humanos y mamíferos de manera oral.⁶⁰ Su estructura química puede observarse en la figura 8.

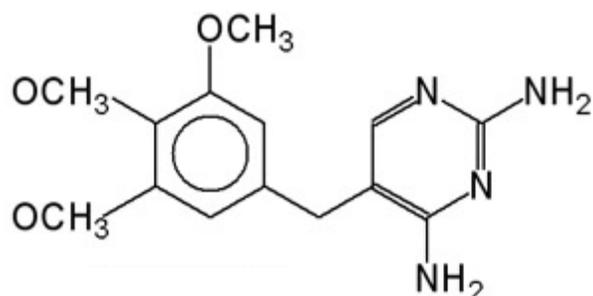


Figura 8. Estructura química del trimetoprim.

Potenciométricamente se ha estimado que los valores del pK_{a1} y pK_{a2} del trimetoprim son 3.23 y 6.76. Dependiendo del pH este compuesto puede existir soportando dos cargas positivas H_2M^{+2} , solo una HM^+ y en forma neutra HM ; la protonaciones ocurren en los nitrógenos que forman parte del anillo aromático. En la figura 9 se presenta el diagrama de distribución de especies para el trimetoprim.⁶⁷

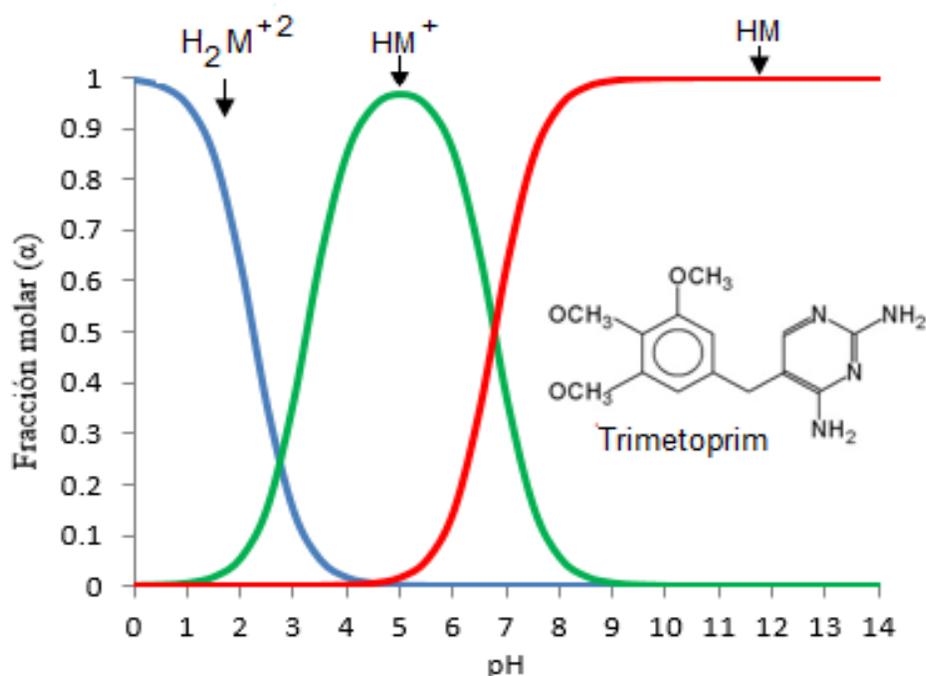


Figura 9. Diagrama de distribución de especies del trimetoprim.

El trimetoprim ($\log_{10}Kow=0.91$) es soluble en agua (0.4 mg/ml). También es soluble en DMSO (50 mg/ml), dimetilacetamida (138.6 mg/ml), alcohol bencílico (72.9 mg/ml), propilenglicol (25.7 mg/ml), cloroformo (18.2 mg/ml), metanol (12.1 mg/ml), éter (0.3 mg/ml), y benceno (0.02 mg/ml). La solubilidad del fármaco incrementa con la temperatura y disminuye en disolventes puros siguiendo el orden: etanol > acetonitrilo > 2-propanol > acetato de etilo > agua.⁸¹

El fármaco se ha determinado junto con sulfamidas en matrices como leche, músculo de pollo o res, orina, huevo y pescado utilizando una extracción previa con disolventes orgánicos como diclorometano, acetona, agua, acetonitrilo o mezclas seguido de una retención en fase sólida (intercambio catiónico, OASIS HLB, Fases C18, DVB) como *clean up*. La desorción se realiza típicamente con metanol o acetonitrilo solos, o bien, en combinación con algún ácido (o disolución ácida). La separación se ha realizado por HPLC de fase reversa (comúnmente con fase C18) utilizando una disolución acuosa ácida y MeOH o ACN. La detección predominantemente ha sido por tándem MS/MS aunque ya se incrementan las metodologías con los detectores DAD/UV.⁸²⁻⁸⁴

Alternativamente, la electroforesis capilar con espectrometría de masas (CE-MS) o en tándem (CE-MS/MS) han sido otra opción para el análisis multiresiduo de trimetoprim y otros antibióticos.⁸⁵ Hasta donde se tiene conocimiento SBSE no se ha aplicado en la extracción de trimetoprim. La determinación individual del trimetoprim en agua ya no es frecuente, actualmente la tendencia ha sido desarrollar metodologías multiresiduo para determinarlo con sulfamidas y otros tipos de antibióticos por HPLC-MS/MS o HPLC-DAD en fase reversa, los detalles de algunas de estas metodologías se presentan en la tabla 3.

Métodos de cromatografía de líquidos para el análisis multiresiduo de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol

La tabla 3 resume algunos métodos desarrollados para el análisis multiresidual de los compuestos estudiados por HPLC en matrices líquidas simples como el agua, pero también en matrices líquidas más complejas como pueden ser la leche y la orina caracterizadas por la presencia de proteínas, sales y otras sustancias biológicas. Las separaciones no se han limitado exclusivamente al modo gradiente, aunque resulta evidente la predominante tendencia a que se realicen en fase reversa.

Tabla 3. Métodos de HPLC desarrollados para el análisis multiresidual de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol.

Técnica de extracción	Matriz	Fase extractora	Elución	Fase móvil	Modo de separación	Columna y detección	Referencia
SPE	Leche bovina	OASIS HLB (Previa desproteinización MeOH-CCl ₃ CO ₂ H)	MeOH	Fase A: CH ₃ CO ₂ Na 75mM, 35mM CaCl ₂ , 25mM EDTA pH 7 Fase B: MeOH-ACN 25:75 v/v	Isocrático 0-30 min de 10-50%B, 30-37 de 50-10%B. Flujo: 0.7 mL/min	Octadecyl X-Terra Detector: DAD 265nm y 311 nm	86
LLE	Leche	Cloroformo-acetona (2:1 v/v)	N.A.	A: CH ₃ CO ₂ Na 0.02M /ACN (95:5 v/v). B: CH ₃ CO ₂ Na 0.02M /ACN (20:80 v/v).	Gradiente (25°C): 0-5 min 0%B, 5-20 min 0-100%B, 20-30 min 100%B, 30-35 min 100-0%B, 35-40 min 0%B	LiChroCART250-4 (250mm x4.6mmx5µm) Detector UV a 278nm	87
SPE (Muestra pH 5 HCl y con EDTA)	Agua	Strata-X	Acetona y mezcla acetona/agua (9/1, v/v)	Fase A: ACN/MeOH (2/1) Fase B: CH ₃ CO ₂ Na 20mM (pH 5)	Gradiente (40°C) Flujo: 0.20 mL/min	MZ-Aqua Perfect C18 (250mm x 2.1 mmx 5µm) HPLC –MS/MS	88
SPE (Se aplica a un extracto de MeOH-ACN-Orina pH8)	Orina	BondElut®PlexaTM	MeOH, CH ₂ Cl ₂ ACN	Fase A: 0.1%v/v-ácido fórmico en agua Fase B: ACN	Gradiente (30°C) Flujo: 0.70 mL/min 0-7 min 1%B, 7-35 min 1-30%B, y reequilibrar 5 min con 1%B	Gemini C18 (150mmx4.6mm x5µm) Detector: DAD a 280 nm.	89
SPE (Muestra ajustada a pH 4 HCl)	Agua	OASIS HLB	MeOH	Fase A: 0.05%v/v-ácido fórmico en agua Fase B: ACN	Gradiente (25°C) 0-3 min 10%B, 3-8 min 10-20%B, 8-17 min 20-35% B, 17-22min 35-50%B, 20-25 min 100%B y mantener 10 min. Reequilibrar por 5 min	Zorbax Eclipse XDB-C18 (150mmx4.6mmx3.5µm) Detector: DAD a 280 nm.	90

ACN acetonitrilo, CH₃CO₂Na acetato de sodio, CH₂Cl₂ diclorometano, DAD detector de arreglo de diodos, EDTA etilendiamíntetraacetato, HLB balance hidrofóbico-hidrofílico, HCl ácido clorhídrico, MeOH metanol, LLE extracción líquido-líquido, SPE extracción en fase sólida.

El presente trabajo de tesis aporta conocimiento sobre las propiedades físicas y químicas de materiales híbridos orgánicos-inorgánicos derivados de PDMS. Se evaluó la hidrofobicidad superficial de los materiales (ángulo de contacto), su resistencia ante disolventes, su estabilidad ante distintas condiciones ácido-base y también ante cambios de temperatura en condiciones de atmósfera inerte. Se presentan datos relevantes sobre la síntesis de los materiales que podrían ser útiles para el mejoramiento de sus propiedades en el futuro. Debe resaltarse que, hasta donde se tiene conocimiento, a la fecha no hay reportes del uso de sorbentes a base de PDMS funcionalizado con ciano y fenilo (por vía sol-gel) que hayan sido aplicados en SBSE para extraer analitos tan polares como tetraciclinas o sulfamidas en fase acuosa o en medios orgánicos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la capacidad de extracción de antibióticos polares ($\log_{10}K_{OW}<2$) de recubrimientos sol-gel en diferentes medios mediante SBSE.

Objetivos específicos

Desarrollar recubrimientos poliméricos a partir de polidimetilsiloxano con hidroxilos terminales (PDMS-OH), 3-cianopropiltrietoxisilano (CNP_rTEOS) y trietoxifenilsilano (TEFS) por síntesis sol-gel.

Caracterizar los recubrimientos poliméricos por espectroscopía de infrarrojo (IR), análisis termogravimétrico (TGA), ángulo de contacto, estabilidad a diversos disolventes y pH.

Evaluar la extracción de tetraciclina [TC], oxitetraciclina [OTC], clortetraciclina [CTC], doxitetraciclina [DTC], sulfatiazol [STZ], sulfametoxazol [SMX], sulfaquinaxolina [SQX], sulfadimetoxina [SDMX]), cloranfenicol [CRF] y trimetoprim [TMP] con las nuevas fases poliméricas desde una fase acuosa u orgánica.

Identificar los factores e interacciones con efectos significativos sobre la cantidad de antibióticos extraídos por SBSE mediante el análisis estadístico de la variabilidad de sus áreas cromatográficas.

Verificar mediante la metodología de ascenso más pronunciado la viabilidad de la optimización posterior de la extracción en fase acuosa de antibióticos con $\log_{10}K_{OW}<1.2$.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Agua (HPLC, impurezas < 0.20 ppb), ácido trifluoroacético (99%), acetonitrilo HPLC (Chromasolv Plus > 99.9%), acetona (99% HPLC), 2,2,4-trimetilpentano (98% HPLC), metanol (99.96% HPLC), diclorometano (99.8% Ultra resi-analyzed) y acetato de etilo (99.90% HPLC) fueron adquiridos de J.T. Baker®. Ácido clorhídrico (grado reactivo 36-37% m/m) e hidróxido de sodio (99.0%) fueron adquiridos de Fluka®. Polidimetilsiloxano ($M_n=550$ g/mol), cloranfenicol (>98%), clorhidrato de clortetraciclina (>97%), hidrato de doxiciclina (>98%), clorhidrato de tetraciclina (>95%), trietoxifenilsilano (TEFS 98%), clorhidrato de oxitetraciclina (>95%), sulfatiazol sódico (<98%), sulfametoxazol (99%), trimetoprim cristalizado (>99%) y 3-cianopropiltrietoxifenilsilano (CNPrTEOS 98%) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Sulfadimetoxina (100 µg/mL en acetonitrilo) y sulfaquinoxalina (100 µg/mL en metanol) de ChemService. Todos los reactivos fueron utilizados como fueron proporcionados sin purificación posterior.

Elaboración de las barras de agitación magnética de vidrio

Se elaboraron barras de agitación de vidrio de 12 mm de longitud y de 1.6 mm de diámetro, su núcleo consistió de acero inoxidable (ACCO estándar No.1). El material de partida para elaborar dichas barras fueron tubos capilares de vidrio (Kimble Chase®) de 10 cm de longitud y 1.6 mm de diámetro, se utilizó un cortador para capilares con el fin de reducir los tubos a fragmentos de 13 mm de longitud. Después un trozo de acero inoxidable de 9 mm se introdujo en cada fragmento de tubo capilar y utilizando un mechero Bunsen se encapsuló dentro del vidrio, esto sellando por fundición ambos extremos de cada fragmento de tubo capilar. El tamaño final de las barras magnéticas de vidrio se determinó con un Vernier digital marca Mitutoyo® y su masa se midió con una balanza analítica Denver Instrument APX-200 ($d \pm 0.1$ mg).

Pre-tratamiento de las barras de agitación magnética de vidrio

Antes de recubrir las barras de vidrio con los materiales sintetizados, se activaron los grupos silanol (Si-OH) en sus superficies. Para ello, las barras se sumergieron en una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 1 M durante 3 h, luego se lavaron con agua destilada dos veces, se escurrieron y después se colocaron en una solución de ácido clorhídrico (HCl) 0.1 M durante 3 h para neutralizar el exceso de NaOH. Finalmente, las barras de vidrio se lavaron nuevamente con agua destilada dos veces, se escurrieron y se secaron a 125 °C por 2 h en una estufa de convección (Techni-Lab Modelo HCM-D82).

Preparación de las soluciones sol-gel

La metodología de Ibrahim *et al.*²⁴ se modificó para obtener tres materiales por síntesis sol-gel a temperatura ambiente (20-25°C) a partir de polidimetilsiloxano hidroxilo terminal (PDMS-OH, $M_n=550$ g/mol), 3-cianopropiltrietoxisilano (CNPrTEOS) y trietoxifenilsilano (TEFS), esto utilizando diclorometano (DCM) como disolvente. El reactor fue un tubo de polipropileno Eppendorf (2 mL) para microcentrífuga y el catalizador fue una solución acuosa de ácido trifluoroacético (TFA) (95% v/v). La relación molar PDMS:(CNPrTEOS+TEFS) se mantuvo 1:3 en los tres materiales, pero se varió la proporción de TEFS y CNPrTEOS. Dependiendo de los valores que adoptó la relación PDMS:TEFS:CNPrTEOS, se denominó como material A al que tenía la proporción 1:1:2, es decir, se sintetizó con más moles de CNPrTEOS; el material B tuvo la proporción 1:1.5:1.5, es decir, se sintetizó con una cantidad equimolar de TEFS y CNPrTEOS; y el material C estuvo asociado a la proporción 1:2:1, se utilizó más TEFS. La tabla 4 presenta las formulaciones utilizadas en la síntesis de cada material.

Tabla 4. Formulaciones para la preparación de los materiales A, B y C.

Reactivo	Material A	Material B	Material C
DCM (μL)	300	300	300
PDMS-OH (μL)	210.5	210.5	210.5
TEFS (μL)	89	134	178
CNPrTEOS (μL)	179	133	88
TFA (μL)	50	50	50

La síntesis de los materiales se llevó a cabo adicionando a 300 μL de DCM los reactivos PDMS-OH, TEFS y CNPrTEOS, tras la adición de cada reactivo se homogeneizó la mezcla de reacción 2-5 min en el vórtex. Después se agregó el catalizador TFA, se agitó 2 min en vórtex (Vórtex Genie-2) y se aplicó ultrasonido (Baño ultrasónico Branson 1510) a la mezcla por 5 min. Posteriormente, se permitió que la reacción procediera por 2 h y luego se destapó el tubo reactor para envejecer la solución por 15-16 h dentro de un desecador con salida a una campana de extracción.

Los recubrimientos PDMS-TEOS y PDMS-CNPrTEOS (1:3) se sintetizaron siguiendo las instrucciones de Burgos⁹¹ y el recubrimiento PDMS-TEFS (1:3) con las de Medina⁹². Los procedimientos reportados por los autores se reprodujeron con exactitud y sin modificaciones. En todos los casos el reactor fue un tubo Eppendorf de polietileno con forma de bala (2 mL), en él se disolvieron 210.5 μL de PDMS-OH en 300 μL de cloruro de metileno (CH_2Cl_2). Luego se añadió el volumen de entrecruzante requerido para cada recubrimiento particular (80 μL de TEOS, 261 μL de CNPrTEOS y 263 μL TEFS respectivamente), después se homogeneizó en vórtex. Seguido se añadió el catalizador (50 μL de TFA al 95%, v/v) para iniciar la reacción y nuevamente se homogeneizó con vórtex (2 min) y ultrasonido (5 min). Las soluciones PDMS-CNPrTEOS y PDMS-TEFS se dejaron envejecer a temperatura ambiente por 10 y 12 h

respectivamente antes de recubrir las barras. En el caso de la solución PDMS-TEOS, luego de homogeneizar 2 min en vórtex y 5 min en ultrasonido, se tuvo que centrifugar a 12,000 rpm por cinco minutos para separar el precipitado (TEOS no incorporado) del sobrenadante claro y homogéneo. El sobrenadante (PDMS-TEOS) se transfirió a un nuevo tubo y se dejó envejecer por dos horas bajo agitación constante antes de usarlo para recubrir.

Recubrimiento de las barras de agitación magnética de vidrio

El recubrimiento de las barras de vidrio (pre-activadas mediante tratamiento ácido-base) con el material sol-gel se realizó utilizando moldes cilíndricos de policloruro de vinilo (PVC) con un diámetro interno de 3 mm y longitud de 2.50 cm. Cada molde se selló por su extremo inferior con silicón y se colocó en posición vertical. Por el extremo superior se depositó aproximadamente 100 μ L de la solución envejecida (del material A, B o C) con ayuda de una jeringa y luego se introdujo una barra de vidrio, después se permitió que el gel solidificara gradualmente y se aseguró que la barra quedara suspendida en el mismo, centrada y sin contacto con los extremos del molde. El gel aún era un sólido elástico muy pegajoso tras 24 horas en todos los casos, por ello, la barra recubierta se desmoldó cuidadosamente después de 1 semana cuando el material adquirió más solidez y fue menos adherente. Finalmente, la barra recubierta se sometió a curado térmico con el programa que se describe en la sección siguiente, para favorecer el entrecruzado de las cadenas de PDMS (reacción de condensación), evaporar residuos del disolvente y consolidar el recubrimiento.

En el caso de la solución PDMS-TEOS, siguiendo la metodología de Burgos⁹¹, luego de 2 h de envejecimiento inmediatamente fue vertida en moldes de policloruro de vinilo y se procedió a depositar la barra de vidrio activada. Los moldes con la solución y las barras de agitación se dejaron gelificar por un período de dos días antes de desmoldar y de tratar térmicamente con el programa descrito en la siguiente sección.

Condiciones de curado térmico bajo atmósfera de vacío

El curado térmico de las barras recubiertas se realizó con una estufa de vacío (Hi-Temp Vacuum Oven de Barnstead Lab Line) bajo las siguientes condiciones: 40°C durante 24 h, 60°C durante 24 h, 100°C durante 24 h y 180°C durante 4 h. La presión se redujo y mantuvo por debajo de 4 pulgadas de mercurio durante todo el tratamiento. Posteriormente, el calentamiento fue suspendido, la estufa despresurizada y, cuando la temperatura descendió a menos de 40°C, las barras se extrajeron y se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente en un desecador. Luego las barras fueron cortadas y su longitud final fue ajustada a 1.50 cm.

Caracterización de los recubrimientos

Propiedades físicas.

Se determinó la masa de los recubrimientos enlazados a las barras de vidrio con una balanza analítica O´Haus ($d=0.01\text{mg}$). El grosor se midió con un vernier marca Mitutoyo.

Análisis infrarrojo.

El análisis cualitativo de infrarrojo para un recubrimiento particular se realizó aplicando la técnica de espectroscopía de reflectancia difusa de infrarrojo con transformada de Fourier (DRIFTS), esto utilizando un equipo Thermo-Nicolet Nexus 670. Un disco abrasivo de carburo de silicio (SiC) funcionó como herramienta soporte para poder analizar los materiales. Se abarcó una ventana espectral de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$, la resolución seleccionada fue de 4 cm^{-1} y el número de barridos se programó en 64 scans.

Estabilidad ante disolventes.

Se evaluó la estabilidad de los recubrimientos frente a diferentes disolventes comúnmente utilizados en las extracciones SBSE, estos fueron: agua, metanol (MeOH), acetona, acetato de etilo (AcEt), acetonitrilo (ACN) e isooctano (IsoOct). Las barras fueron colocadas en tubos Eppendorf para microcentrífuga de 2 mL y se les agregó 1 mL del disolvente a evaluar, se realizó cada análisis por triplicado. La barra inmersa en el disolvente fue expuesta a ultrasonido (frecuencia: 40kHz) por 30 y 60 minutos (tiempo total: 90 min), o bien, a agitación mecánica por vórtex (nivel 7) por 15 y 30 minutos (tiempo total: 45 min). Se monitoreó la pérdida de peso de la barra en ambos casos, para ello, se suspendía la perturbación y la barra se dejaba secar a temperatura ambiente sobre una superficie de aluminio libre de polvo por 1 h, posteriormente se determinaba gravimétricamente el cambio de masa del recubrimiento con una microbalanza analítica Sartorius modelo 54.

Estabilidad ante pH.

También se evaluó la estabilidad de los recubrimientos frente a diferentes condiciones de pH, esto se llevó a cabo exponiendo las barras recubiertas a pH ácido (1, 3 y 6) con disolución de ácido clorhídrico (HCl) o ácido nítrico (HNO_3), y en condiciones de pH básico (9 y 12) con disolución de hidróxido de sodio (NaOH). Se evaluaron cambios tras 24 y 48 h dejando secar las barras por 1 h y determinando gravimétricamente la pérdida de masa con una microbalanza analítica Sartorius modelo 54. Las pruebas se realizaron por triplicado y los recubrimientos se observaron en un microscopio estereoscopio marca Motic images plus 2.0 antes y después de las pruebas para advertir cambios en la superficie.

Determinación del ángulo de contacto.

Para evaluar la hidrofobicidad superficial de los materiales se determinó el ángulo de contacto de cada uno en placas de vidrio (2.5 cm de largo, 6 mm de ancho y 1 mm de espesor) recubiertas con los mismos, esto empleando la técnica de gota sésil. Una vez depositada una gota de agua destilada (20 μ L), se midió el ángulo de contacto (media de los ángulos izquierdo y derecho de la gota) realizando una captura digital con una cámara y el programa Motic images plus 2.0. Se realizaron 10 mediciones a cada muestra para obtener una estimación de la media y desviación estándar. Burgos⁹¹, Medina⁹² y Liu *et al.*⁹³ han reportado el uso de esta metodología para medir el ángulo de contacto de superficies recubiertas con PDMS o PDMS modificado.

Análisis termogravimétrico.

Se utilizó un analizador termogravimétrico modelo 8000 (TGA-8000) de Perkin Elmer para evaluar la estabilidad térmica de los recubrimientos sintetizados en el intervalo de temperatura de 50 a 800°C y a una velocidad de calentamiento de 10°C/min en atmósfera de nitrógeno (flujo de 50 mL/min).

Extracción de tetraciclinas

Extracción de muestras acuosas

Se prepararon soluciones stock de cada una de las tetraciclinas (1000 mg/L) por pesada utilizando metanol grado HPLC, estas soluciones se mantuvieron en frascos ámbar a 4°C hasta su uso por un tiempo no mayor a un mes. Diariamente, a partir de las soluciones stock, se prepararon mezclas estándar de trabajo (100 mg/L) en metanol y se utilizaron para la fortificación de muestras acuosas de 10 mL hasta una concentración de 1 mg/L.

La extracción se aplicó a las soluciones acuosas fortificadas, para ello, una barra de agitación recubierta se introdujo en 10 mL de solución y se sometió a agitación (250 rpm). Después de un tiempo determinado se suspendió la agitación y la barra se removió de la solución con un imán, luego se secó con papel absorbente libre de pelusa. Posteriormente, se colocó la barra en un tubo Eppendorf de polipropileno (0.600 mL) y se agregó 500 μ L del disolvente de desorción elegido. Los analitos extraídos se desorbieron con ayuda de un baño ultrasónico o agitación vórtex. Cuando se usó metanol puro para desorber, los extractos luego se diluyeron con un volumen igual de ácido oxálico 20 mM antes de inyectar al HPLC; pero cuando se utilizó la mezcla metanol:ácido oxálico 20 mM para desorber, no se realizó dilución del extracto si el porcentaje de metanol era igual o menor a 50%. Antes de inyectar al equipo de HPLC una muestra o estándar se filtró utilizando membranas de politetrafluoroetileno (PFTE) de 45 μ m con el apoyo de una jeringa.

Las barras recubiertas se utilizaron para evaluar la recuperación de los analitos ante diferentes condiciones de extracción y desorción. Se estudiaron factores de extracción como el tiempo (30-120 min), la fuerza iónica (0-30% m/v NaCl) y el pH (2-7); en la desorción fueron analizados el tiempo de ultrasonido o de vórtex (20 y 40 min) y el tipo de disolvente (MeOH-H₂C₂O₄ 20 mM con 0-100%v/v MeOH).

Extracción de un medio orgánico

A partir de las soluciones stock de tetraciclinas de 1000 mg/L se prepararon disoluciones de trabajo de 100 mg/L empleando como diluyente metilisobutilcetonal (MIBK). Las disoluciones de trabajo se prepararon y utilizaron el mismo día, estas disoluciones hicieron posible la fortificación de muestras de isooctano de 10 mL hasta 1 mg/L.

Se evaluó la capacidad de extracción de las barras recubiertas colocándolas en las muestras de isooctano durante 2 h y agitando a baja velocidad (250 rpm). Transcurrido ese tiempo se retiraron del medio no polar, se secaron con papel libre de pelusa y se dejaron evaporar residuos del disolvente durante 30 minutos. Posteriormente, se colocaron las barras recubiertas en viales Eppendorf de polipropileno (600 µL) y se les adicionó 500 µL de una disolución de ácido oxálico 0.01 M con 40%MeOH. La desorción por vórtex duró 40 min.

Extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol

Extracción de muestras acuosas

Se prepararon soluciones stock de sulfatiazol sódico, sulfametoxazol, cloranfenicol y trimetoprim de 1000 mg/L por pesada con metanol grado HPLC, y se mantuvieron en frascos ámbar a 4°C hasta su uso; no se almacenaron por un tiempo mayor a un mes. A partir de las disoluciones stock diariamente se prepararon mezclas de trabajo de los 4 antibióticos de 100 mg/L utilizando buffer de ácido fórmico 0.1%v/v (pH 4.5, ajustado con NaOH) y metanol en proporción 1:1 v/v; las mezclas de trabajo se utilizaron para fortificar disoluciones acuosas hasta 1 mg/L. En el caso de sulfadimetoxina y sulfaquinaxolina las soluciones stock de partida fueron estándares de 100 mg/L (en acetonitrilo y metanol respectivamente), a partir de ellas se prepararon por dilución las soluciones de trabajo en metanol. La fortificación de muestras acuosas con la mezcla de los 6 antibióticos (se agregaron sulfadimetoxina y sulfaquinaxolina) se efectuó hasta alcanzar 0.50 mg/L de cada antibiótico.

Para optimizar la desorción de la mezcla de los 4 antibióticos se realizó la extracción en 10 mL de medio buffer de ácido fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) por 120 min con agitación de 250 rpm. La desorción para sulfatiazol, sulfametoxazol, trimetoprim y cloranfenicol se evaluó con mezclas de acetonitrilo (o metanol) y buffer de ácido fórmico (pH 4.5), se varió el porcentaje de disolvente orgánico en la mezcla (0-100%), el tiempo de desorción (20-40 min) y el método (vórtex o ultrasonido).

En el caso de la extracción en medio acuoso se utilizó un diseño factorial 2^4 con 5 puntos centrales para determinar si los factores tiempo (factor A), velocidad (factor B), porcentaje de NaCl (factor C) y porcentaje de acetonitrilo (factor D) tenían influencia en la recuperación de antibióticos. La desorción se realizó con 40% metanol y 60% buffer fórmico (pH 4.5) para evitar diluir el extracto antes de su análisis por HPLC. La tabla 5 presenta los factores estudiados y sus niveles. En el anexo A el lector no familiarizado con el uso de diseños factoriales puede consultar las bases teóricas de éstos y también el fundamento de su análisis estadístico.

Tabla 5. Matriz del diseño factorial 2^4 utilizado para la extracción de antibióticos.

Corrida	Niveles de los factores (escala codificada)				Niveles de los factores (escala natural)			
	x_1	x_2	x_3	x_4	A(min)	B(rpm)	C(%m/v)	D(%v/v)
Centro	0	0	0	0	75	500	7.5	10
(1)	-	-	-	-	30	250	0	0
a	+	-	-	-	120	250	0	0
b	-	+	-	-	30	750	15	0
ab	+	+	-	-	120	750	15	0
Centro	0	0	0	0	75	500	7.5	10
c	-	-	+	-	30	250	0	0
ac	+	-	+	-	120	250	0	0
bc	-	+	+	-	30	750	15	0
abc	+	+	+	-	120	750	15	0
Centro	0	0	0	0	75	500	7.5	10
d	-	-	-	+	30	250	0	20
ad	+	-	-	+	120	250	0	20
bd	-	+	-	+	30	750	15	20
abd	+	+	-	+	120	750	15	20
Centro	0	0	0	0	75	500	7.5	10
cd	-	-	+	+	30	250	0	20
acd	+	-	+	+	120	250	0	20
bcd	-	+	+	+	30	750	15	20
abcd	+	+	+	+	120	750	15	20
Centro	0	0	0	0	75	500	7.5	10

La transformación las variables de escala natural a codificada se realizó utilizando los niveles centrales de las variables, las ecuaciones 2, 3, 4 y 5 dan cuenta de esta codificación.

$$\text{Tiempo} = x_1 = \frac{\xi_1 - 75}{45} \dots \dots \dots \text{Ec. 2}$$

$$\text{Velocidad} = x_2 = \frac{\xi_2 - 500}{250} \dots\dots\dots \text{Ec. 3}$$

$$\% \text{NaCl} = x_3 = \frac{\xi_3 - 7.5}{2.5} \dots\dots\dots \text{Ec. 4}$$

$$\% \text{ACN} = x_4 = \frac{\xi_4 - 10}{10} \dots\dots\dots \text{Ec. 5}$$

El análisis estadístico del diseño factorial se llevó a cabo conjuntamente con los softwares Statgraphics Centurion XVI y Minitab 17 para verificar la equivalencia de los resultados. Para el diseño factorial 2^4 se llevó a cabo un análisis de varianza multifactorial, se examinaron los antibióticos como una suma total y por separado. La significancia de efectos e interacciones en el modelo factorial se evaluó a un nivel de confianza $\alpha=0.05$ para controlar el error tipo I. Se verificaron los supuestos del ANOVA multifactorial, para ello, se examinaron los residuos de cada modelo contra los niveles de los factores para inspeccionar la homocedasticidad de manera informal, aunque también se aplicaron en cada caso las pruebas de Levene y Bartlett para verificar formalmente este supuesto ($\alpha=0.05$); la normalidad de los residuos se examinó informalmente con los gráficos de distribución de probabilidad normal de los residuos y más formalmente con las pruebas de Anderson-Darling y Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0.05$); y finalmente, la independencia se evaluó comprobando la distribución aleatoria de los residuos en los gráficos de residuo contra orden temporal de recolección de datos y residuo contra valor predicho. Los gráficos de distribución normal de los efectos de Daniel y diagramas de Pareto se utilizaron en la depuración de modelos para descartar fuentes de variación no significativas. Se trazaron los diagramas de factores individuales e interacciones para determinar los niveles que favorecían el incremento de las respuestas.

Asimismo, se utilizó la metodología de trayectoria de ascenso más pronunciado para intentar optimizar la respuesta área total de antibióticos. Detalles teóricos y supuestos de esta metodología se presentan en el anexo A para el lector no familiarizado. Inicialmente se evaluó el ajuste a un modelo de primer orden ($\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4$) con variables codificadas, este modelo fue estimado utilizando el factorial 2^4 con 5 puntos centrales. Una vez verificada la ausencia de curvatura en el modelo de primer orden con una prueba de falta de ajuste ($\alpha=0.05$), se eligió la variable con mayor influencia (x_i) sobre la respuesta para definir el tamaño de paso a través de un incremento de esta variable (Δx_i) y se utilizaron los coeficientes del modelo de primer orden para calcular los incrementos de las otras variables en cada paso subsecuente por la trayectoria ($\Delta x_j = \beta_j \Delta x_i / \beta_i$).

Extracción de un medio orgánico

A partir de las soluciones stock de sulfatiazol, sulfametoxazol, trimetoprim y cloranfenicol de 1000 mg/L se prepararon disoluciones de trabajo de 100 mg/L utilizando como diluyente metilisobutilcetonal (MIBK). Las disoluciones de trabajo se utilizaron el mismo día que se prepararon; posteriormente, con ellas se fortificaron muestras de isooctano (10 mL) hasta que cada uno de los 4 antibióticos tuvo una concentración de 1 mg/L. En el caso de sulfadimetoxina y sulfaquinaxolina los estándares madre fueron de 100 mg/L (en acetonitrilo y metanol respectivamente), a partir de ellos se prepararon las soluciones de trabajo en acetona. Debe resaltarse que cuando la fortificación de muestras de isooctano se realizó con la mezcla de 6 antibióticos (se agregaron sulfadimetoxina y sulfaquinaxolina) se hizo solamente hasta 0.50 mg/L, además se cambió el disolvente de dilución por acetona en todos los casos al preparar las disoluciones de trabajo para evitar que la señal de pico MIBK interfiera con las de las dos sulfamidas añadidas en el cromatograma.

Se evaluó la capacidad de extracción de las barras recubiertas colocándolas en las muestras de isooctano fortificadas a un determinado nivel de concentración de antibiótico por 2 h y se les hizo girar a baja velocidad (250 rpm). Transcurrido ese tiempo se retiraron del medio no polar, se secaron con papel libre de pelusa y se dejaron evaporar residuos del disolvente durante 30 minutos. Posteriormente, se colocaron las barras recubiertas en viales Eppendorf de polipropileno de 600 μ L y se les adicionó 500 μ L de una disolución de ácido fórmico pH 4.5 con 40% MeOH.

Para analizar los datos de la extracción se utilizó el ANOVA bifactorial (*two-way ANOVA*) considerando como factores fijos el material y el tipo de antibiótico, y como respuesta el área de cada antibiótico. La significancia de los efectos de los factores y de la interacción se evaluó a un nivel de confianza del 95%. El análisis *post hoc* de mínima diferencia significativa LSD ($\alpha=0.05$) se realizó para las medias de los factores por separado y para los grupos definidos por su interacción. Se realizaron las transformaciones pertinentes de la respuesta cuando fue necesario para verificar el cumplimiento de los supuestos del ANOVA (homocedasticidad, linealidad e independencia) mediante gráficos de residuales.

Análisis cromatográfico de las tetraciclinas

Para el análisis de los compuestos extraídos se utilizó un cromatógrafo de líquidos Agilent Technologies modelo 1100 con bomba cuaternaria y desgasificador (G1379A). La columna para separar los compuestos fue una Kinetex C₁₈ (150 mm x 4.2 mm DI x 5 μ m). El flujo de fase móvil fue 1 mL/min. La fase móvil fue una mezcla de la fase A que consistió en una disolución acuosa de ácido oxálico 20 mM y la fase B fue acetonitrilo grado HPLC. Se utilizó la modalidad de elución con gradiente: de 0 a 5 min se incrementó B de 20% a 35%, de 5.0 a 5.5 min B se mantuvo en 35%, de 5.5 a 6.5 min se retornó a 20% de B. Luego se esperó 8 minutos para reequilibrar la columna

antes de cada inyección. La corrida duró 15 min y se inyectó un volumen de 10 µL de muestra. La columna se operó a 25°C y se empleó un detector UV con arreglo de diodos (278 nm).

Análisis cromatográfico de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol

Para el análisis de estos compuestos se utilizó el mismo cromatógrafo de líquidos antes mencionado, la misma columna, y el mismo flujo. Sin embargo, se cambió la fase móvil A por una disolución acuosa de ácido fórmico 0.1% v/v mezclada con metanol en proporción 9/1 v/v (el pH se ajustó a 4.5 con NaOH) y la fase B fue metanol grado HPLC. Se utilizó la modalidad de elución con gradiente de tal forma que de 0 a 10 min se incrementó linealmente el contenido de B de un 20-50%, de 10 a 13 min B se mantuvo en 50%, y de 13 a 15 min se retornó a 20% de B. Se esperó 8 minutos para reequilibrar la columna antes de cada inyección. La corrida duró 23 min y se inyectó un volumen de 10 µL de muestra. La columna se operó a 25°C y la detección se realizó con un detector UV con arreglo de diodos (278 nm).

Análisis cuantitativo y cualitativo de antibióticos

Las curvas de las tetraciclinas se prepararon a partir de las disoluciones stock de 1000 mg/L en metanol. Diluyendo se prepararon soluciones estándar de 0.125, 0.25, 0.50, 1, 5, 10, 20 y 40 mg/L usando como disolvente la mezcla 1:1 v/v de metanol y disolución de ácido oxálico (20 mM, pH 2).

Las curvas de las sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol se prepararon a partir de la disolución stock de 1000 mg/L en metanol. Diluyendo se prepararon soluciones estándar de 0.125, 0.25, 0.50, 1, 5, 10, 20 y 40 mg/L usando como disolvente la mezcla 1:1 v/v de metanol y buffer de ácido fórmico (0.10% v/v, pH 4.5).

Se estimaron los límites de detección y cuantificación instrumentales mediante el método señal-ruido ($S/R=2H/h$) de la USP (United States Pharmacopeia), esto utilizando la amplitud promedio del ruido (h) cerca de los tiempos donde salen los analitos y la altura del pico del analito (H). Relaciones $S/R=3$ se consideraron para estimar los límites de detección y $S/R=10$ para estimar los límites de cuantificación.

La eficiencia de extracción del recubrimiento desarrollado se estimó comparando las áreas de los picos cromatográficos de cada analito después de la extracción por SBSE con las áreas de la mezcla estándar de 1 mg/L.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

La sección de resultados y discusiones puede considerarse dividida en tres subsecciones principales: 1) elaboración de barras magnéticas sorbentes para SBSE, donde se presentan primordialmente detalles de la síntesis de recubrimientos; 2) caracterización de recubrimientos, donde se discuten propiedades físicas y químicas de los materiales; y 3) aplicación de los materiales para extraer antibióticos polares, la cual a su vez se dividen en dos apartados: a) la extracción de tetraciclinas ($\log_{10}K_{OW}<0$), tanto en medio acuoso como en medio orgánico y b) la extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol ($0<\log_{10}K_{OW}<2$) tanto en medio acuoso como en orgánico.

Elaboración de las barras magnéticas sorbentes para SBSE

Barras de agitación magnética de vidrio

Las barras de vidrio magnéticas fueron elaboradas de 12.30 ± 0.02 mm ($n=30$) de longitud, 1.53 ± 0.01 mm ($n=30$) de diámetro y el peso promedio fue 64.38 ± 0.03 mg ($n=30$). En la figura 10 se muestra una barra de vidrio representativa.

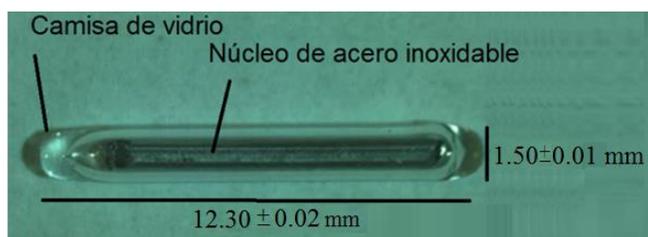


Figura 10. Diseño de la barra de agitación magnética de vidrio elaborada para SBSE.

Como antes se describió, antes de poder enlazar los materiales sintetizados a las barras de vidrio fue necesario activar las superficies de éstas por erosión en medio básico seguido de lavado ácido para generar grupos silanoles (Si-OH) enlazables. Varios autores^{15,25} consideran crítico este paso de activación y han reportado protocolos similares al de este trabajo que les han permitido corroborar la mejora en la resistencia mecánica y estabilidad ante disolventes de los recubrimientos.

Síntesis de las fases poliméricas

La síntesis sol-gel de los materiales A, B y C a partir de PDMS, TEFS y CNPrTEOS se realizó a baja temperatura y en solución, es decir, en condiciones de química suave. Este protocolo permitió llevar a cabo las reacciones en una sola fase y no hubo riesgo de explosión debido a la reactividad moderada de los precursores. Fue necesario mantener el sistema de reacción abierto porque el disolvente y varios subproductos de reacción debían eliminarse para promover el avance de la reacción y evitar un estado estacionario. Acorde a la literatura, las reacciones de hidrólisis y

condensación de los reactivos organoalcoxilanos generalmente son reversibles e implican liberación de moléculas pequeñas como H₂O y alcoholes.^{25,50}

También debe resaltarse que la metodología descrita en esta tesis para preparar los soles de los materiales A, B y C permitió obtener mezclas homogéneas de todos los reactivos, no hubo necesidad de centrifugarlas posteriormente ya que no se formaron precipitados. Concretamente la proporción PDMS:(CNPrTEOS+TEFS) fijada en 1:3 permitió obtener la homogeneidad con 300 μ L de DCM y 50 μ L de TFA. Esto resultó ventajoso porque Ibrahim *et al.*²⁴ comentan que obtener un sol homogéneo usualmente es difícil, aunque se ha asociado con la generación de recubrimientos con menos tendencia a fracturarse.

Para sintetizar los materiales del presente estudio se utilizó catálisis ácida. Como puede corroborarse en la literatura¹⁵⁻²⁵, la mayoría de los recubrimientos obtenidos por síntesis sol-gel para SBSE han implicado una síntesis catalizada de esta manera. Vo Duy *et al.*⁹⁵ argumentan que el uso de un catalizador ácido favorece la hidrólisis sobre la policondesación y esto se traduce en menos entrecruzamiento entre cadenas (comparado con una catálisis básica), generando recubrimientos más densos y menos quebradizos. Alternativamente, Ibrahim *et al.*²⁵ reportaron el uso del ácido mineral HCl diluido en agua, pero tuvieron que utilizar surfactantes para lograr que dicha fase acuosa se dispersara en el diclorometano. El ácido trifluoroacético (TFA) utilizado en esta tesis, un ácido orgánico, es una alternativa que se ha reportado²⁴ para minimizar la introducción de agua (que causa separación de fases con disolventes orgánicos) y, además, su volatilidad favorece su eliminación posterior.

Durante la búsqueda de las mejores condiciones de síntesis para las relaciones molares PDMS:TEFS:CNPrTEOS correspondientes a los valores 1:1:2 (relación A), 1:1.5:1.5 (relación B) y 1:2:1 (relación C) se investigó el efecto de la cantidad del catalizador ácido (TFA al 95%) evaluando 3 volúmenes de éste (10, 50 y 200 μ L); en todos los casos inicialmente se consiguió una disolución homogénea y transparente. De acuerdo con Brinker *et al.*⁹⁶, la cantidad de catalizador añadida puede afectar la estructura del material, altas concentraciones de catalizador en la solución inicial puede inducir que el ácido no se ionice y evitar la condensación de los grupos hidroxilo, dando como resultado partículas (soles) extremadamente pequeñas y, en última instancia, un polímero de bajo peso molecular. Esto justificó evaluar la influencia de diferentes dosis de catalizador en esta tesis.

A continuación en la tabla 6 se resumen brevemente los efectos observados al variar el volumen del catalizador adicionado a las mezclas de reacción correspondientes a las relaciones molares PDMS:TEFS:CNPrTEOS con valores 1:1:2 (relación A), 1:1.5:1.5 (relación B) y 1:2:1 (relación C).

Tabla 6. Resumen de efectos observados tras variar la cantidad de catalizador adicionado a las mezclas de reacción correspondientes a las relaciones molares PDMS:TEFS:CNPrTEOS con valores 1:1:2 (relación A), 1:1.5:1.5 (relación B) y 1:2:1 (relación C).

	Volumen de catalizador (μL)		
	10	50	200
Formación de película superficial	Luego de 15 h en el caso de la relación A y tras 24 h para las otras relaciones.	En todos los casos observable luego de 15 h.	En todos los casos observable luego de 4h.
Gelificación	En todos los casos observable tras 34-36 h. El tiempo de gelificación aumentó con el contenido de TEFS. Se formaron sólidos pegajosos y transparentes.	En todos los casos observable tras 23-24 h. El tiempo de gelificación aumentó con el contenido de TEFS. Se formaron sólidos pegajosos y transparentes.	En todos los casos observable tras 15-16 h. El tiempo de gelificación aumentó con el contenido de TEFS. Se formaron sólidos no pegajosos, opacos y blanquecinos.
Reducción de volumen máxima	Tras 48 hrs la pérdida de volumen fue 40-42% y se detuvo en todos los casos.	Tras 24 hrs la pérdida de volumen fue 40-42% y se detuvo en todos los casos.	Tras 15 hrs la pérdida de volumen fue mayor a 40%. Se obtuvieron materiales con burbujas atrapadas.
Remoción del molde	Fue posible tras 5 días. Los materiales obtenidos eran transparentes, poco adherentes y flexibles.	Fue posible tras 5 días. Los materiales obtenidos eran transparentes, poco adherentes y flexibles.	Fue posible tras 24 horas pero las tres relaciones generaron materiales quebradizos, opacos, blanquecinos y con burbujas atrapadas.

Dado lo anterior, se justifica elegir el nivel intermedio de catalizador para obtener materiales homogéneos, transparentes y flexibles en el menor tiempo. Acorde a la literatura, PDMS y los alcoxisilanos pueden generar materiales elásticos con dosis elevadas de ácido debido a la formación de conglomerados ricos en alcoxisilanos conectados entre sí por cadenas de PDMS, esto puede ilustrarse en la imagen a) de la figura 11. Al aplicar presión, las flexibles cadenas de PDMS pueden contraerse y los conglomerados aproximarse entre sí; al cesar la presión, las cadenas de PDMS pueden desdoblarse y restituir la forma del material. El tamaño del conglomerado, la longitud de la cadena de PDMS, el grado de linealidad de PMDS y el volumen libre evidentemente influirán en las propiedades elásticas. Un material perdería elasticidad

conforme su estructura se alejara de la modelada por la imagen a) y se aproximara a la b) que se caracteriza por una red rígida de entrecruzante con cadenas de PDMS atrapadas.⁹⁷ Por otro lado, algunas veces los materiales sol-gel se vuelven opacos cuando ocurren separaciones de fase a nivel microscópico, debido a que si se acelera mucho la hidrólisis y la condensación de los entrecruzantes tienden a reaccionar entre ellos antes que con PDMS y a formar precipitados que quedan suspendidos en el gel por la elevación de la viscosidad durante la reacción sol-gel.⁹⁸

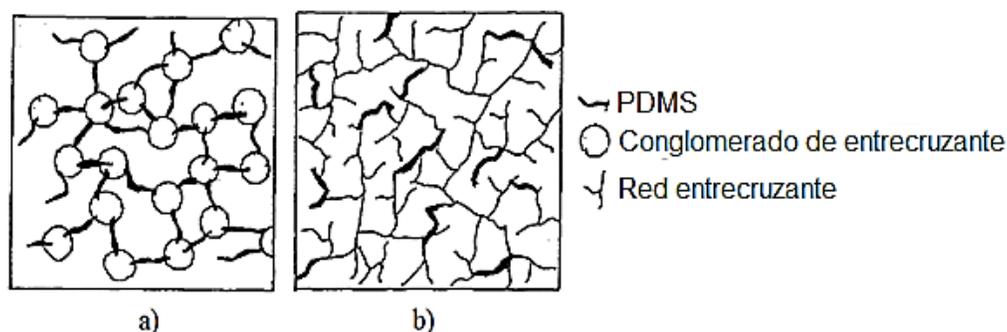


Figura 11. Modelos estructurales de materiales derivados de PDMS y organoalcoxisilanos sintetizados bajo condiciones ácidas: a) fuertes y b) moderadas.

Debe notarse que ya no se observó pérdida de volumen adicional cuando el volumen de las soluciones se redujo entre 40-42% de su volumen inicial; además, independientemente del volumen de catalizador utilizado la mezcla con mayor proporción CNPrTEOS/TEFS (relación A) envejeció ligeramente más rápido que la mezcla equimolar CNPrTEOS/TEFS (relación B) y aún más que la mezcla con menor proporción CNPrTEOS/TEFS (relación C), es decir, las soluciones con menor contenido de fenilo tendieron a gelificar un poco más rápido. Las diferencias en velocidad de envejecimiento fueron casi imperceptibles a pequeña escala, pero incrementando los volúmenes de las soluciones, por ejemplo a 20 mL, fue notable que la relación A envejeció aproximadamente 30 minutos más rápido que la solución C. En la literatura^{99,100} se ha reportado que en medio ácido el grupo fenilo (-Ph) en organotrialkoxisilanos, por efecto inductivo electroattractor y estérico, tiende a retrasar la hidrólisis e inclusive a desfavorecer la formación de la red tridimensional durante la condensación en comparación con otros sustituyentes como metilo (-CH₃) y etilo (-CH₂CH₃) que donan densidad electrónica al átomo de silicio y estabilizan el estado de transición de la hidrólisis. Debe notarse que el reactivo CNPrTEOS contiene una cadena alquílica flexible (-CH₂CH₂CH₂CN) enlazada directamente al átomo de silicio.

El tratamiento térmico aplicado a las barras recubiertas se realizó con el fin de promover condensación adicional (entrecruzamiento), evaporar residuos de disolvente y también para favorecer la salida de residuos de condensación (etanol y agua). El tratamiento térmico se realizó con una rampa de calentamiento para evitar la súbita expansión del disolvente residual retenido en el material, minimizando así la formación

de burbujas y las fracturas. A nivel macroscópico no se observaron grietas en los materiales. Burgos⁹¹ y Medina⁹² analizaron los recubrimientos PDMS-CNPrTEOS y PDMS-TEFS por SEM sin encontrar fracturas, grietas o poros, únicamente visualizaron superficies consolidadas; presumiblemente este fue el caso de los tres materiales sintetizados en la presente tesis que se desarrollaron siguiendo procedimientos similares.

Caracterización de los recubrimientos

Caracterización dimensional de los recubrimientos

En la figura 12 se pueden apreciar las barras de vidrio recubiertas con los distintos materiales sintetizados en este trabajo. El volumen de recubrimiento por barra fue $61.50 \pm 0.88 \mu\text{L}$ ($n=30$) y el espesor $1.11 \pm 0.04 \text{ mm}$ ($n=30$). Estos valores indican que, independientemente del material sintetizado, el empleo de un molde y el depósito de las soluciones viscosas envejecidas 15-16 h contribuyen a minimizar la heterogeneidad de volumen y espesor de recubrimiento en los dispositivos finales elaborados para SBSE.

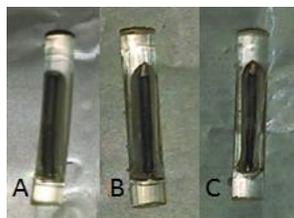


Figura 12. Barras de vidrio recubiertas con los materiales PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1).

Caracterización química por infrarrojo

En las figuras 13, 14 y 15 se presentan los espectros de infrarrojo correspondientes a los materiales A, B y C. Considerando los estudios espectroscópicos de FT-IR de Ibrahim *et al.*²⁵, se asumió la presencia de CNPrTEOS en todos los materiales por la detección de la señal del grupo ciano ($\text{C}\equiv\text{N}$) entre $2240\text{-}2260 \text{ cm}^{-1}$. Por comparación con el estudio vibracional sobre materiales sol-gel de Li *et al.*¹⁰¹ se verificó la presencia del TEFS en todos los materiales debido a la ocurrencia de las señales tipo estiramiento C-H fenilo que aparecen en el rango $3010\text{-}3080 \text{ cm}^{-1}$, la señal de estiramiento ($\text{C}=\text{C}$) de fenilo a 1592 cm^{-1} y los sobretonos en la región $1650\text{-}2000 \text{ cm}^{-1}$. Por otro lado, Ibrahim *et al.*²⁴ y Cai *et al.*¹⁰² atribuyen las señales que aparecen en el rango $2840\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ a enlaces C-H presentes en los grupos alifáticos metilo ($-\text{CH}_3$) de PDMS, sin embargo, debido a la presencia de CNPrTEOS también señales de metileno ($-\text{CH}_2-$) aparecerían en ese intervalo. La literatura¹⁰² también indica que PDMS exhibe señales tipo estiramiento Si-O-Si simétrico a 1089.2 cm^{-1} y asimétrico a 1022 cm^{-1} , de Si- CH_3 asimétrico a 800 cm^{-1} y Si-C simétrico a 702 cm^{-1} ;

no obstante, en este experimento no son fáciles de distinguir probablemente por las fuertes absorciones de fenilo tipo flexión C-H fuera ($650\text{--}900\text{cm}^{-1}$) y dentro ($990\text{--}1290\text{cm}^{-1}$) del plano del anillo que ocurren en la misma región¹⁰¹ y también por algo de ruido asociado a la técnica DRIFTS. La absorción ancha que se observa a 3485 cm^{-1} se atribuye a grupos silanol sin condensar Si-OH (3368 cm^{-1}) o agua (3390 cm^{-1}),²⁴ aunque la señal confirmatoria para agua 1675 cm^{-1} no fue distinguible.

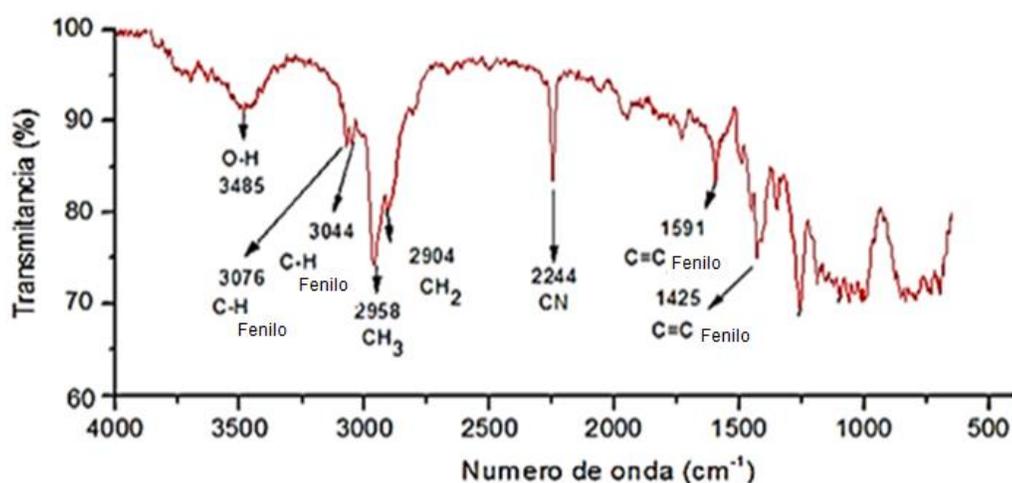


Figura 13. Espectro infrarrojo obtenido para el material con la proporción PDMS:TEFS:CNPrTEOS correspondiente a 1:1:2 (recubrimiento A).

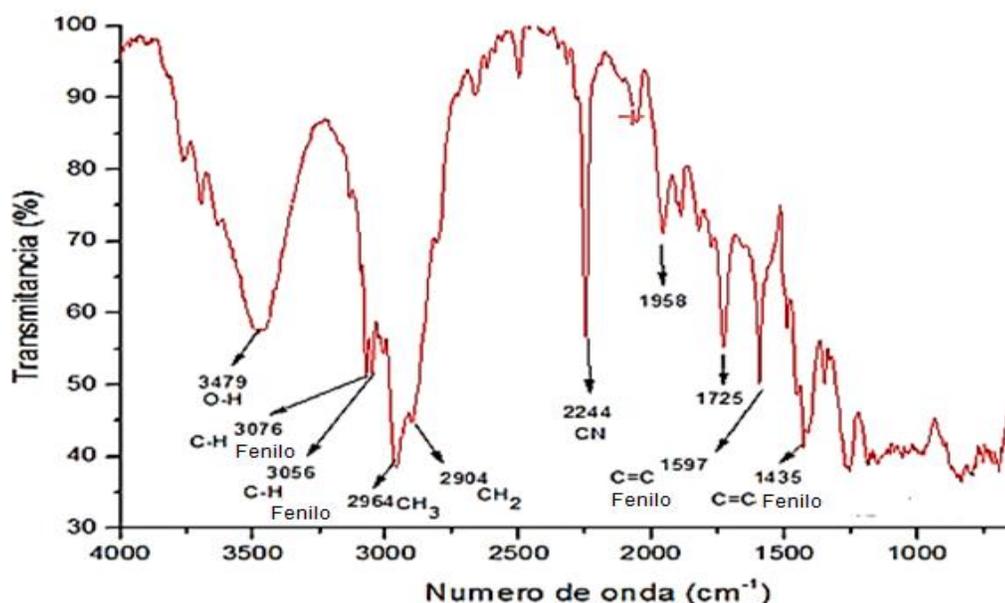


Figura 14. Espectro infrarrojo obtenido para el material con la proporción PDMS:TEFS:CNPrTEOS correspondiente a 1:1.5:1.5 (recubrimiento B).

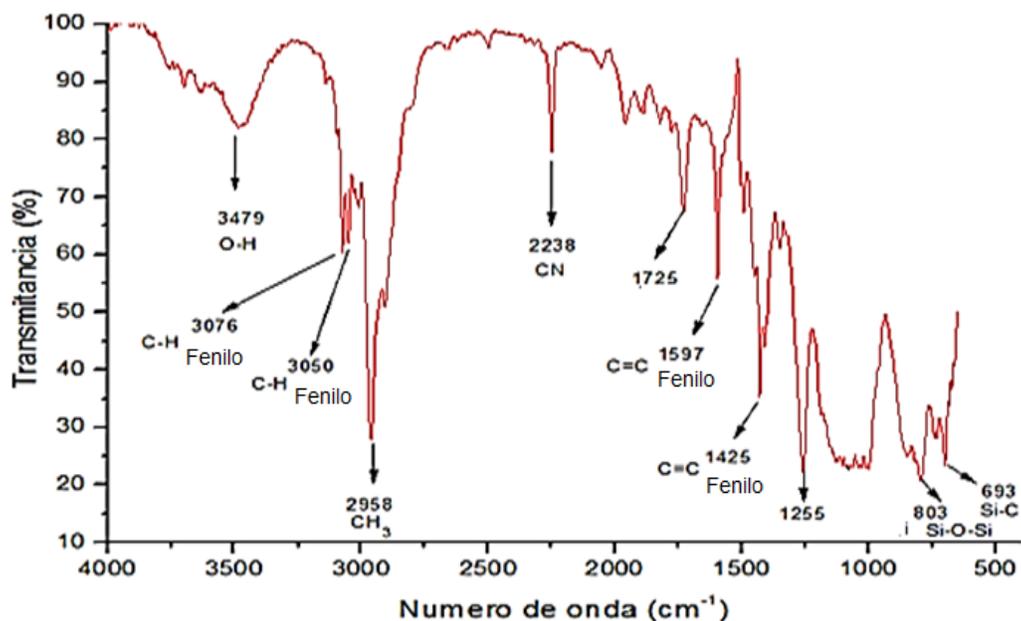


Figura 15. Espectro infrarrojo obtenido para el material con la proporción PDMS:TEFS:CNPrTEOS correspondiente a 1:2:1 (recubrimiento C).

Estabilidad ante disolventes

Para evaluar la estabilidad química de los recubrimientos se expusieron ante disolventes de diferente polaridad bajo acción de agitación vórtex (15 y 30 min) o ultrasonido (30 y 60 min). En general, los 3 materiales desarrollados experimentaron mayor pérdida de masa conforme se prolongaba la agitación. A los 15 min las mayores pérdidas de masa ocurrieron en los recubrimientos de las barras con mayor proporción CNPrTEOS/TEFS (material A) expuestos a acetona y fue 26.06%, en los recubrimientos de la mezcla equimolar CNPrTEOS/TEFS (material B) se alcanzó 23.84% al ser expuestos a acetato de etilo, y con estos disolventes el recubrimiento con menor relación CNPrTEOS/TEFS (material C) también experimentó pérdidas mayores a 11%; debe notarse que en metanol, acetonitrilo e isoctano el recubrimiento C perdió más masa que los otros recubrimientos aunque los valores registrados no superaron el 2.5%. Pasados los 30 min en todos los casos el recubrimiento con menor relación CNPrTEOS/TEFS fue el más afectado independientemente del disolvente empleado. Los resultados de los experimentos de resistencia a disolventes utilizando la agitación vórtex se resumen en la figura 16; en las imágenes de la figura 17 pueden observarse los cambios físicos de los recubrimientos después de 15 min y 30 min.

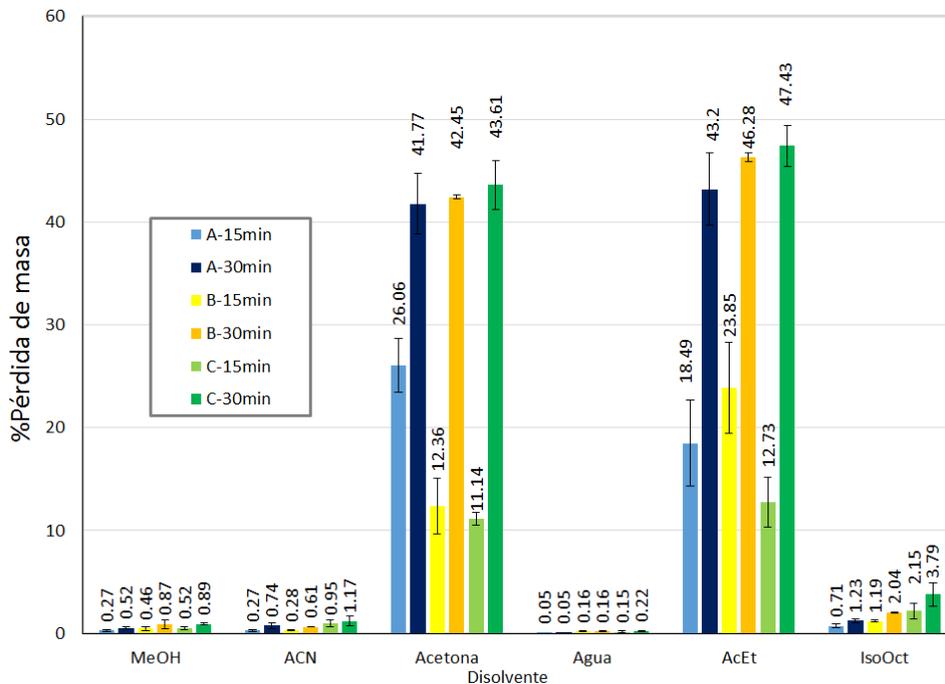


Figura 16. Resistencia ante disolventes de los recubrimientos A, B y C durante 15 y 30 minutos de agitación vórtex. Disolventes: metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), agua, acetato de etilo (AcEt) e isooctano (IsoOct).

En los disolventes más polares como agua, metanol y acetonitrilo (caracterizados por constantes dieléctricas mayores a 22)¹⁰³ la pérdida de masa de los recubrimientos fue generalmente menor al 1%, solo el recubrimiento C (CNPrTEOS/TEFS<1) experimentó una pérdida del 1.17% en acetonitrilo después de 30 min. El hinchamiento en todos los recubrimientos fue apenas notorio, no se observaron daños a simple vista después de la evaporación de los mismos.

Los disolventes no tan polares (constantes dieléctricas menores a 22) como acetona y acetato de etilo ocasionaron pérdidas de masa superiores al 10% en todos los recubrimientos pasados 15 min y mayores al 40% luego de 30 min. Las barras se hincharon notablemente con ambos disolventes y parte de su material se desprendió fácilmente con agitación vórtex. Tras evaporarse acetona o acetato de etilo las superficies lisas de los recubrimientos se volvieron rugosas y se observó una compactación de los materiales. Esto indicó que los tres recubrimientos desarrollados tuvieron afinidad por los disolventes con enlaces polares (C-O y C=O) y grupos hidrofóbicos pequeños, las moléculas de estos disolventes pese a ser más grandes que las de los disolventes más polares lograron penetrar en los recubrimientos y debilitar sus estructuras causando el desprendimiento de parte de su masa cuando se agitaron. En lo relativo a la compactación del material al evaporar el disolvente, la literatura explica que al unir cadenas de polímero durante la síntesis (independientemente del método de entrecruzamiento) siempre hay una fracción de

moléculas que no logran anclarse a la red estructural del material, éstas en presencia de un disolvente adecuado logran salir de la red del polímero hacia el seno del disolvente y las moléculas del disolvente ocupan su lugar,¹⁰⁴ dicho fenómeno justificaría el colapso del volumen del material cuando se evapora el disolvente del material hinchado ya que dejaron de estar presentes las moléculas no enlazadas en la red tridimensional que le daban soporte.



Figura 17. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de los ensayos de resistencia a disolventes con agitación vórtex durante 15 y 30 minutos.

Burgos⁹¹ también realizó ensayos de resistencia ante disolventes para el recubrimiento PDMS-CNPrTEOS (1:3), el cual resultó ser más hidrofílico que PDMS, utilizando las mismas condiciones que en el presente trabajo y reportó que también acetona y acetato de etilo fueron los disolventes que indujeron la mayor pérdida de masa. Estudios de Lee *et al.*¹⁰⁵ con PDMS indicaron que el polímero apolar se hincha más en compuestos no polares (pentano, cloroformo, tolueno, benceno, diclorometano, etc.), también reportaron que en acetato de etilo y acetona (que tienen solubilidad media y baja respectivamente en PDMS) el hinchamiento fue menor y que en metanol, acetonitrilo y agua fue despreciable; con PDMS enlazado a vidrio los autores reportaron que los compuestos no polares y hasta los medianamente polares tienden a remover el polímero.

El hecho de que el disolvente apolar isooctano hinchara apreciablemente las barras indica que logra absorberse en los tres materiales sintetizados. La literatura ha reportado que este disolvente tiende a difundirse en el PDMS comercial utilizado para SBSE, por ello, recomienda prudencia al utilizarlo para la desorción porque deja residuos en la fase que se traducen en un aumento de masa e inclusive en algunos casos han dificultado la recuperación de analitos.¹² Las interacciones de los recubrimientos híbridos con este disolvente no bastaron para inducir grandes pérdidas de masa como las registradas en acetona y acetato de etilo bajo agitación vortex; sin embargo, sí se observaron algunas grietas en los recubrimientos tras evaporarse el disolvente, especialmente si en el material la fracción de fenilo era predominante sobre la de ciano.

Los resultados de los experimentos de resistencia a disolventes utilizando ultrasonido como perturbación se resumieron con el gráfico de barras de la figura 18; los cambios físicos en los recubrimientos después de 30 min y 60 min pueden apreciarse las imágenes de la figura 19. Fue notorio que al aplicar ultrasonido se produjeron mayores pérdidas de masa en los recubrimientos en comparación con la agitación vórtex, especialmente cuando se prolonga su aplicación. La energía del ultrasonido tiende a actuar a escala microscópica mediante el fenómeno de cavitación, formando microburbujas que implotan liberando energía que daña físicamente los materiales y, además, conduciendo a un incremento de la temperatura por aumento de la movilidad de las moléculas del disolvente. El fenómeno de cavitación ocurre más fácilmente a bajas frecuencias en el orden de kHz que en MHz.¹⁰⁶

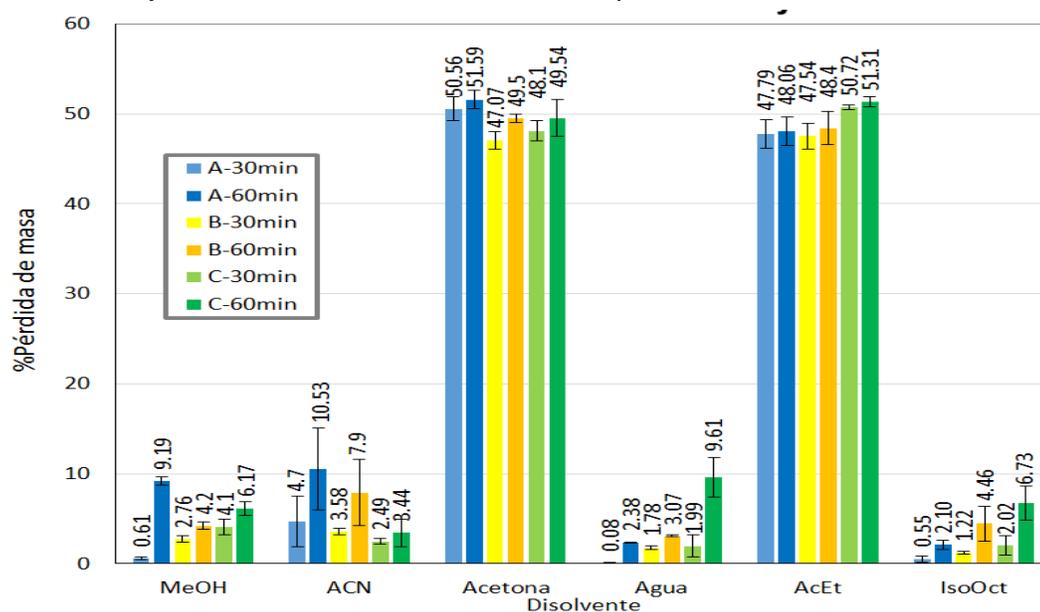


Figura 18. Resistencia ante disolventes de los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) durante 30 y 60 minutos de ultrasonificación. Disolventes: metanol (MeOH), acetonitrilo (ACN), agua, acetato de etilo (AcEt) e isooctano (IsoOct).



Figura 19. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de los ensayos de resistencia a disolventes y ultrasonificación durante 30 y 60 min.

Después de aplicar 30 min ultrasonido solo el recubrimiento A (CNPrTEOS/TEFS>1) no fue dañado apreciablemente por metanol, agua e isooctano (pérdidas de masa menores a 1%). Nuevamente las pérdidas mayores a 47% las experimentaron las barras expuestas a acetato de etilo y acetona, se notó que en acetato de etilo el recubrimiento C (CNPrTEOS/TEFS<1) perdió un poco más de masa que los otros dos recubrimientos y que en acetona fue el recubrimiento A. Las barras nuevamente se hincharon apreciablemente en acetato de etilo y acetona, observándose daños (rugosidad y fracturas) al evaporarse éstos.

Al aplicar ultrasonido por 60 min todos los recubrimientos experimentaron pérdidas de masa mayores al 2%. El recubrimiento A perdió 9% de su masa en metanol y 10.53% en acetonitrilo, el recubrimiento C 9% en agua; en metanol y acetonitrilo se observó que la superficie de los recubrimientos se volvió rugosa y también algunas grietas. Acetona y acetato de etilo provocaron pérdidas mayores de masa del 48% en todos los recubrimientos. Con isooctano el daño físico en los recubrimientos fue mayor con ultrasonido, siendo la relación C más afectada (pérdida de 6.75%) que A (pérdida de 2.10%).

Resumiendo: los ensayos de estabilidad ante disolventes indican que los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A (1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) pierden poca masa ante los disolventes polares evaluados e inclusive ante isooctano especialmente con vórtex. Si se aplica la desorción líquida se sugiere que el proceso no dure más de 60 min y evitar el uso de acetato de etilo y acetona; asimismo, conviene condiciones leves de agitación mecánica usando isooctano ya que la superficie del material se podría alterar.

Estabilidad ante pH

Prieto *et al.*¹² reportan en su revisión del estado del arte de SBSE que el proceso de extracción usando PDMS usualmente se realiza en el rango de pH 2 a 9, ello con el fin de evitar la degradación del recubrimiento comercial y prolongar su vida. En el presente trabajo las pérdidas de masa de los recubrimientos por exposición a diferente pH fueron menores al 0.5% como se muestra en la figura 20. Tras 48 horas de exposición a las disoluciones la mayor pérdida del recubrimiento A (CNPrTEOS/TEFS>1) ocurrió a pH 1 en HCl y fue 0.24%, la del recubrimiento B (CNPrTEOS/TEFS=1) ocurrió a pH 6 en HNO₃ y fue 0.22%, y la del recubrimiento C (CNPrTEOS/TEFS<1) a pH 12 en NaOH y fue 0.28%. La exposición a disoluciones de ácido nítrico, un ácido oxidante, tampoco produjo a pérdidas de masa superiores a 1% en los recubrimientos. Burgos⁹¹ reportó también pérdidas menores a 1.5% para su recubrimiento PDMS-CNPrTEOS (1:1) expuesto a las mismas condiciones de pH.

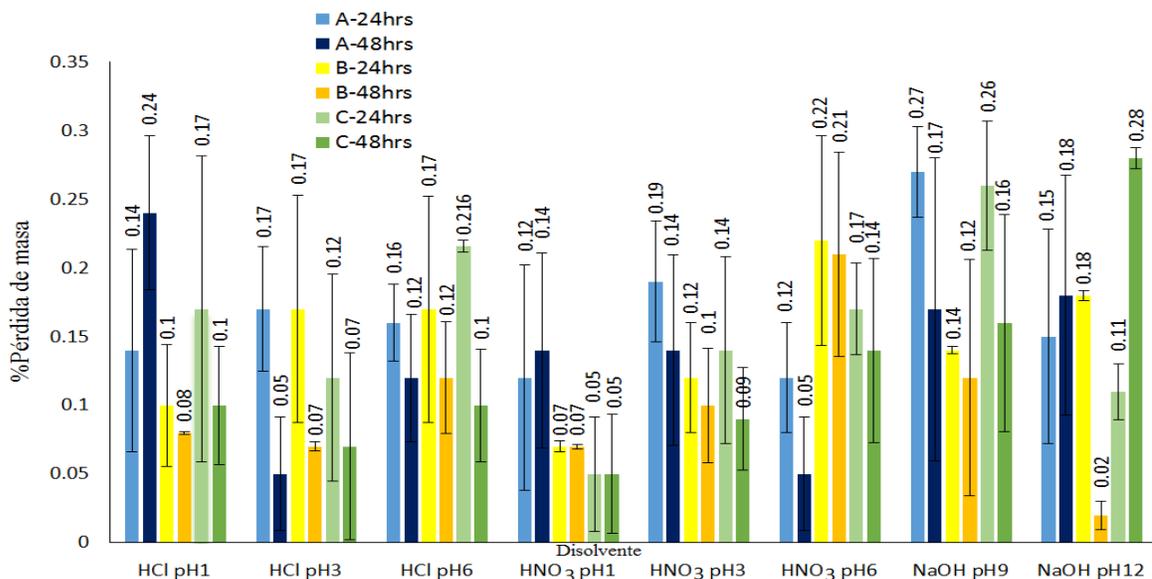


Figura 20. Resistencia ante pH de los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) luego de 24 y 48 h en condiciones ácidas (pH 1, 2 y 3) en ácido clorhídrico y ácido nítrico, y en condiciones básicas (pH 9 y 12).

No se observaron cambios macroscópicos en la superficie de los recubrimientos de las barras ni bajo el microscopio óptico luego de exponerlas a las diferentes condiciones de pH. Esto puede observarse examinando las imágenes de las barras recubiertas expuestas a disoluciones de ácido clorhídrico en la figura 21 y las de las expuestas a ácido nítrico en la figura 22, en la figura 23 se observan las expuestas a las disoluciones alcalinas de NaOH.



Figura 21. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de ser expuestas a diferentes condiciones de pH con ácido clorhídrico (HCl) por 24 y 48 h.



Figura 22. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de ser expuestas a diferentes condiciones de pH con ácido nítrico (HNO₃) durante 24 y 48 h.



Figura 23. Imágenes de las barras con los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1) antes y después de ser expuestas a diferentes condiciones de pH con hidróxido de sodio (NaOH) durante 24 y 48h.

Determinación del ángulo de contacto

El ángulo de contacto es un parámetro útil para medir la mojabilidad de una superficie por un líquido. Si el líquido es agua y la superficie es hidrofílica, el ángulo de contacto será menor a 90° y la gota tenderá a extenderse sobre la superficie. Sin embargo, conforme aumenta el carácter hidrofóbico de una superficie el ángulo de contacto tenderá a ser más grande que 90° , ello reflejará la tendencia de la gota por minimizar el área de contacto con dicha superficie.¹⁰⁷

En el presente trabajo el ángulo de contacto promedio registrado para las gotas de agua depositadas sobre placas de vidrio recubiertas con el material con mayor proporción de CNPrTEOS (recubrimiento A) fue $77.4 \pm 1.2^\circ$, para aquellas placas recubiertas con el material equimolar (recubrimiento B) fue $80.7 \pm 1.8^\circ$ y para las recubiertas con el material con mayor proporción de TEFS (recubrimiento C) fue $85.1 \pm 1.9^\circ$.

Resultó evidente que la hidrofilia superficial de los materiales sintetizados aumentó conforme más CNPrTEOS se utilizó en su preparación debido a la introducción del grupo polar ciano. El ángulo de contacto del recubrimiento A (el más hidrofílico) fue superior al reportado por Burgos⁹¹ ($75.04^\circ \pm 1.78^\circ$) para su recubrimiento PDMS:CNPrTEOS (1:3) que claramente fue más polar en comparación con el presente; sin embargo, el material A no fue tan apolar como el recubrimiento PDMS:TEOS preparado por el mismo autor⁹¹ (reporta un ángulo de contacto mayor a 90°). El ángulo de contacto del PDMS reportado en literatura (cercano a 108°)⁹³ fue aún más elevado que el de cualquiera los materiales sintetizados, ello implica que en los mismos hay grupos polares superficiales. El agua depositada sobre el vidrio con grupos silanol activos presentó ángulos de contacto inferiores a 55° , lo que confirma su

elevada hidrofilia.¹⁰⁷ La figura 24 muestra la variación del ángulo de contacto del agua con diversas superficies.

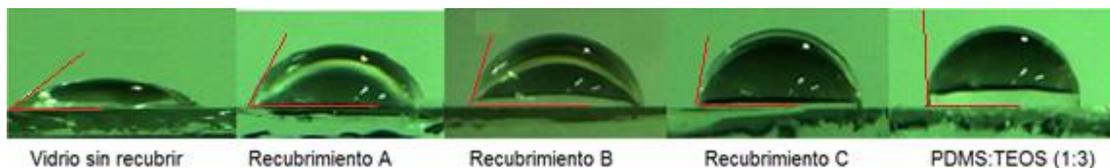


Figura 24. Variación del ángulo de contacto de una gota de agua en las superficies de los recubrimientos PDMS:TEFS:CNPrTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1).

Análisis termogravimétrico

En la figura 25 se presentan las curvas termogravimétricas de los materiales evaluados: A (18%*m/m* TEFS, 38%*m/m* CNPrTEOS, 44% *m/m* PDMS), B (28%*m/m* TEFS, 28%*m/m* CNPrTEOS, 44% *m/m* PDMS), C (38%*m/m* TEFS, 19%*m/m* CNPrTEOS, 44% *m/m* PMDS) y PDMS-TEOS (más del 50%*m/m* de PDMS).

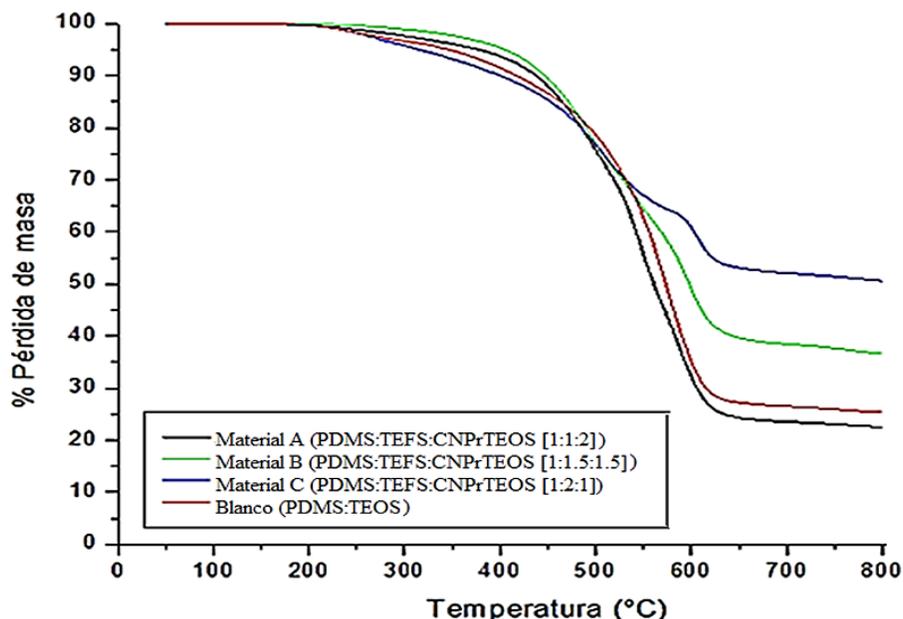


Figura 25. Curvas termogravimétricas de los materiales híbridos A (PDMS:TEFS:CNPrTEOS [1:1:2]), B (PDMS:TEFS:CNPrTEOS [1:1.5:1.5]), C (PDMS:TEFS:CNPrTEOS [1:2:1]) y el blanco hidrofóbico PDMS-TEOS.

En el termograma se puede observar que ninguno de los materiales analizados presenta pérdidas significativas de masa hasta 230°C. Por debajo de 250°C las pérdidas aún pueden asociarse a la liberación de humedad y moléculas pequeñas (etanol, TFA), pero arriba de esa temperatura el comportamiento de los materiales

comenzó a diferenciarse y las pérdidas necesariamente debieron ser por desprendimiento de residuos orgánicos.

Las temperaturas a las que los materiales perdieron el 10% de su masa inicial ($T_{10\%}$) fueron 400°C, 415°C, 435°C y 443°C respectivamente para C, PDMS-TEOS, A y B; el material C seguía perdiendo sustancias orgánicas más rápido hasta aquel punto. Con respecto a esto, debe recordarse que el material C tardó más en gelificar que los otros debido a la mayor dificultad para hidrolizar y condensar el entrecruzante TEFS que se encuentra en mayor proporción que CNPrTEOS en dicho material; por tanto, resulta probable que en el recubrimiento C quedaran varios hidroxilos activos, aunque no necesariamente expuestos a nivel superficial. En este contexto, la literatura reporta que entre 350°C-400°C el PDMS entrecruzado comenzará a liberar dimetilsiloxanos cíclicos cuando obtenga suficiente energía para plegarse sobre su propia cadena como lo muestra la figura 26 y así se perderá masa,^{108,109} sin embargo, si existen cadenas de PDMS con silanoles activos, entonces la degradación puede acelerarse por el mecanismo de retroataque (*back-biting reaction*) que implica que el hidroxilo terminal actúe como nucleófilo como se muestra en la figura 27.^{110,111}

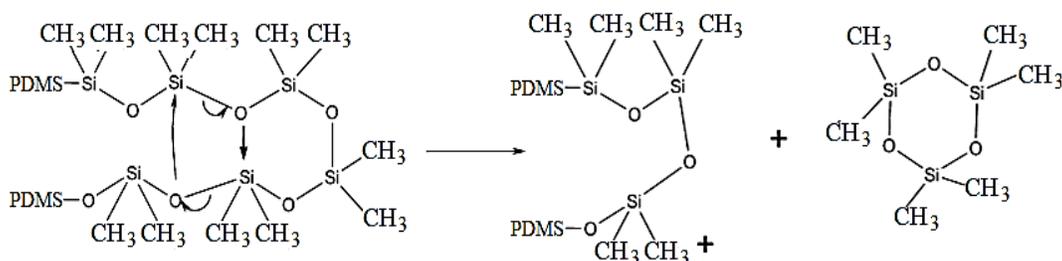


Figura 26. Descomposición de PDMS por el mecanismo de plegamiento molecular.^{108,109}

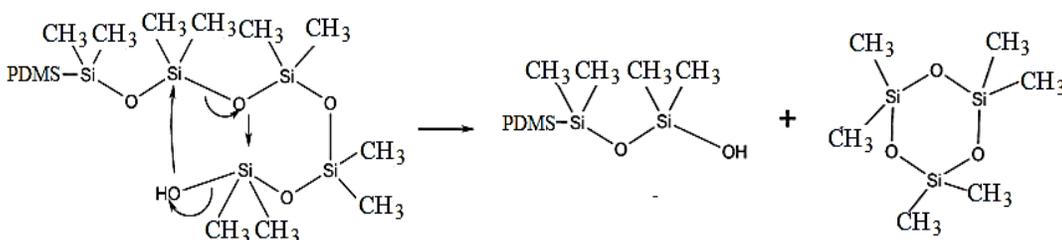


Figura 27. Descomposición de PDMS hidroxiterminal por el mecanismo de retroataque de cadena.^{110,111}

No obstante, en el estrecho intervalo 475-485°C todos los materiales perdieron aproximadamente 20% de su peso inicial, evidentemente ocurrió una desaceleración en la descomposición del material C que presenta la menor proporción CNPrTEOS/TEFS y una aceleración en las pérdidas de los otros. A estas temperaturas los materiales debieron seguir liberando oligómeros cíclicos de dimetilsiloxano acorde a la literatura.^{110,111} Sin embargo, se ha reportado que en materiales fenilados el hidroxilo

terminal del PDMS puede favorecer la liberación de fenilo como radical desde los 400°C, ello en un principio acelera la descomposición pero como los radicales libres de silicio generados se recombinan formando puentes Si-CH₂-Si o Si-O-Si entre cadenas, entonces el efecto neto es un mayor entrecruzamiento y mayor resistencia térmica a temperaturas más elevadas en comparación con PDMS sin fenilo.¹¹⁰

PDMS-TEOS había perdido 30% de su masa a 515 °C, pero los materiales con fenilo A, B y C requirieron mayor temperatura para perder esa cantidad y casi coincidieron en 530°C. Esto confirmó que el mayor contenido de fenilo en un material tiende a hacer que la pérdida global de masa sea menos pronunciada y tiende a estabilizar el material a elevadas temperaturas.

Por otro lado, Camino *et al.*¹⁰⁹ y Shi *et al.*¹¹¹ han reportado que arriba de 480°C es posible que el PDMS desprenda metano debido a que la liberación previa de oligómeros promueve que las cadenas de PDMS ganen movilidad. El desprendimiento de metano ocurre por ruptura homolítica del enlace Si-CH₃ seguida de abstracción de un protón del PDMS por este radical. Los radicales libres I y II mostrados en la figura 28 son producidos por este mecanismo bajo atmósfera inerte, y al combinarse dichos radicales aumentan el entrecruzamiento y retrasan la descomposición del material. Bajo estas condiciones también ya es factible que las cadenas de -CH₂CH₂CH₂CN se fragmenten o sean liberadas por ruptura homolítica.

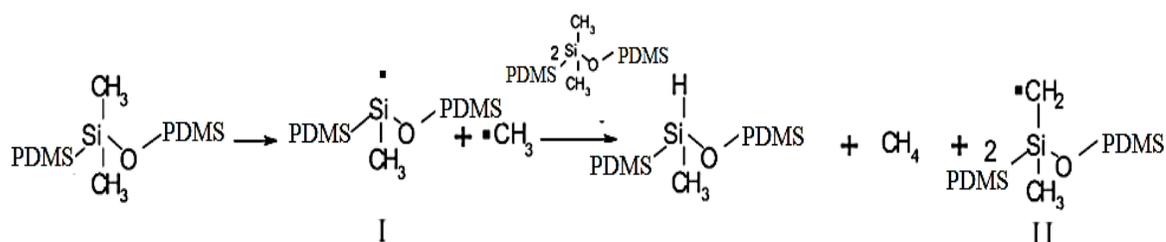


Figura 28. Formación de metano a partir de PDMS por vía radicalaria.

El material PDMS-TEOS pierde 40% de su masa a 540°C y por encima de 600°C ésta se hace más lenta tendiendo su peso a estabilizarse en 22-23%. El material A (CNPrTEOS/TEFS>1) tiene un poco de fenilo y pierde el 40% de su peso original a 590°C, arriba de 600°C su peso tiende a estabilizarse en 25-27%. El material B (CNPrTEOS/TEFS=1) pierde 40% de su masa en 565°C y deja una masa residual de 36-38%. Finalmente, el material C (CNPrTEOS/TEFS<1) que posee la mayor cantidad de fenilo pierde 40% de su peso a 600°C y tiende a dejar una masa residual de 50-52%. Los residuos que quedan al final arriba de 600°C deben ser predominantemente oxcarburos de silicio, evidentemente los materiales fenilados tienden a conservar más masa residual debido a que poseen más mecanismos de entrecruzamiento a elevada temperatura, el fenilo puede comenzar a liberarse desde 400°C y promover la termoestabilidad por acoplamiento de radicales.

De lo anterior se deduce que todos los materiales desarrollados en este trabajo son estables hasta antes de 230 °C, por lo que no se descarta que sean capaces de soportar una desorción térmica entre 180-200°C y puedan tener aplicación potencial en el análisis de analitos volátiles por CG. Los materiales desarrollados se comportaron de manera similar a los materiales PDMS-CNPrTEOS sintetizados por Ibramin *et al.*²⁵; sin embargo, los recubrimientos con fenilo del presente estudio no se descomponen en un paso simple con pérdida brusca de masa. Por otro lado, el recubrimiento PDMS-CNPrTEOS desarrollado por Burgos⁹¹ resultó más estable que los materiales de este trabajo e inclusive que los de Ibrahim *et al.*²⁵; esto ya que su polímero PDMS-CNPrTEOS solo experimenta una pérdida de masa menor a 5% hasta 200°C debida a agua, mas resulta estable hasta 400°C y de ahí se descompone en un paso único hasta 650°C dejando poca masa residual.

Evaluación de las barras de agitación recubiertas para la extracción por SBSE

Extracción de tetraciclinas

En la tabla 7 se reportan algunos parámetros importantes del método cromatográfico que se aplicó para determinar las tetraciclinas en las disoluciones acuosas y los extractos.

Tabla 7. Parámetros de interés del método cromatográfico para analizar tetraciclinas.

Antibiótico	t _R (min)	λ _{max} (nm)	LC _i (μg/L)	LD _i (μg/L)	Ecuación de calibración	R ²
Oxitetraciclina (OC)	2.47	278	3.78	1.13	A=18.862C-3.933	0.9992
Tetraciclina (TC)	2.99	278	4.70	1.41	A=15.152C-4.077	0.9997
Clortetraciclina (CT)	4.69	278	10.1	3.03	A=7.059C-0.093	0.9994
Doxitetraciclina(DT)	5.22	278	4.73	1.42	A=15.022C-1.081	0.9991

A absorbancia, C concentración, λ_{max} longitud de onda de máxima absorbancia, LC_i el límite de cuantificación instrumental, LD_i límite de detección instrumental, R² coeficiente de determinación, t_R tiempo de retención.

El perfil cromatográfico obtenido para las tetraciclinas con el método antes descrito se presenta en la figura 29. Los cromatogramas que aparecen superpuestos corresponden a varias disoluciones estándar de los antibióticos con concentraciones en el rango de 0.125 mg/L-40 mg/L.

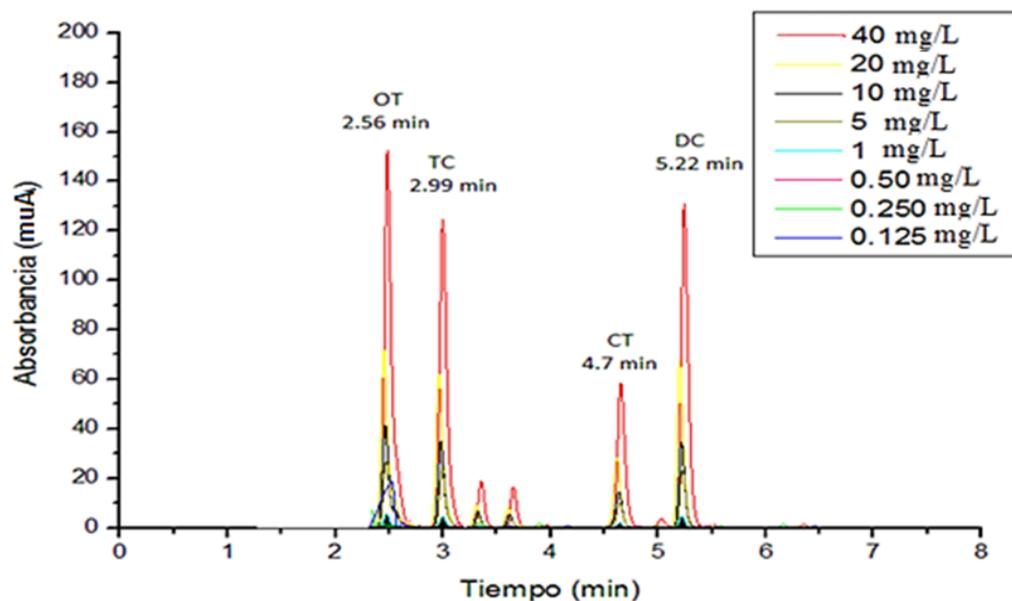


Figura 29. Perfil cromatográfico de las disoluciones estándar de las tetraciclinas.

Extracción de tetraciclinas de medio acuoso

Efecto del pH

Las tetraciclinas son compuestos que presentan un complejo equilibrio ácido-base en medio acuoso y pueden presentar varios estados de protonación,⁵⁵ por ello, el pH es una variable que es indispensable investigar para poder determinar la forma química que tendrá más afinidad por el material utilizado para su retención. Este trabajo consideró la estabilidad exhibida por las barras desarrolladas y las de los antibióticos. Se eligió explorar el intervalo de pH 2-7 (ajustado con NaOH/HCl), en éste las tetraciclinas solo experimentan epimerización y no se descomponen, pero por debajo de pH 2 se deshidratan y por arriba de pH 7 se favorece su hidrólisis alcalina.^{55,112} La velocidad de agitación durante el barrido se fijó a 250 rpm tomando como base las sugerencias reportadas en el trabajo de Burgos⁹¹ para evitar causar daños en el material y dado que ella reportó que mayores velocidades no mejoraron la extracción de compuestos furánicos apreciablemente. Burgos⁹¹ reportó una mayor influencia del tiempo de agitación que de la velocidad de agitación, por ello, la extracción se realizó por 120 min (las extracciones durante solo 30 min prácticamente no consiguieron gran retención). La barra elegida para hacer el barrido inicialmente fue la recubierta con la mezcla equimolar CNPrTEOS/TEFS (barra B).

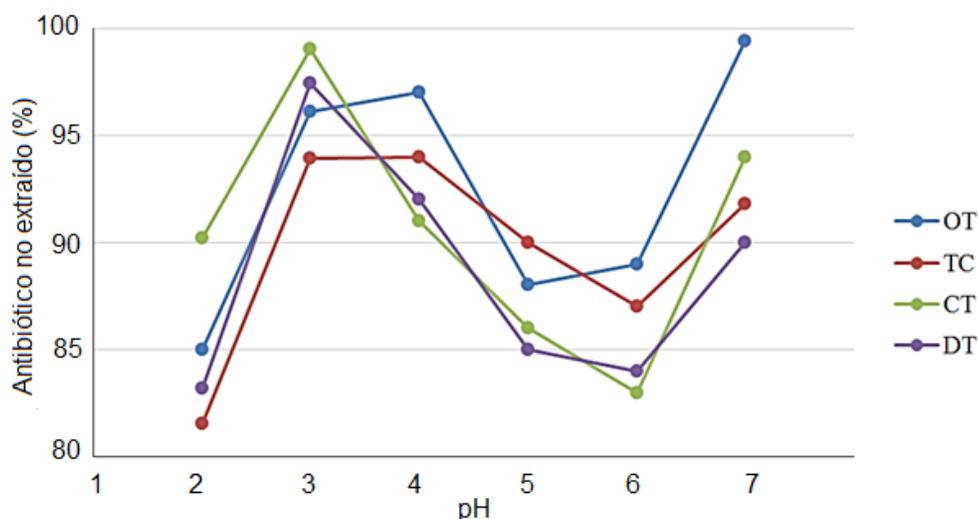


Figura 30. Porcentaje de oxitetraciclina (OT), tetraciclina (TC), clortetraciclina (CT) y doxitetraciclina (DT) en las disoluciones acuosas fortificadas (1 mg/L) luego de realizar la extracción bajo diferentes valores de pH con la barra B (250 rpm, 120 min).

La figura 30 puso en evidencia que la eficiencia de la extracción fue baja, no logró alcanzar el 20% en ningún caso. No obstante, hay que resaltar que la región más desfavorable para extraer tetraciclinas fue en el intervalo de pH 3-4; es decir, en la cercanías de sus pK_{a1} s (3-3.3) donde las formas cargadas positivamente (TC^+) no predominan sobre las switteriónicas (TC^\pm) pero tampoco son despreciables. Si se fija el pH en 2, entonces los analitos existen predominantemente en forma catiónica y su retención mejoró claramente al favorecerse interacciones con electrones del fenilo o del grupo ciano. No obstante, debe notarse que entre pH 5-6 también la extracción tiende a mejorar un poco. En ese rango dominan los switteriores y los grupos silanoles residuales del material deben estar desprotonados (acorde a la literatura están protonados en el rango pH 2-3)¹¹³; la retención podría deberse a interacciones electrostáticas. Conforme el pH se aproxima a 7 nuevamente empeora la extracción, algo que no es extraño dado que la forma aniónica de los compuestos empieza a favorecerse conforme el pH se aproxima a sus pK_{a2} s (7.5-8.0); si esto ocurre las especies ricas en electrones ($Si-O^-$, fenilo, $R-C\equiv N:$) tendrán poca afinidad por los antibióticos cargados negativamente. Resultó también notable que el comportamiento de las tetraciclinas con mayor $\log_{10}K_{OW}$ (clortetraciclina -0.68 y doxiciclina -0.02) tiende a ser similar en el rango pH 3-6.

Por otro lado, también se evaluó el desempeño de los materiales funcionalizados con ciano (PDMS-CNPrTEOS 1:3) y fenilo (PDMS-TEFS 1:3) sintetizados por Burgos⁹¹ y Medina⁹² respectivamente, pero se comportaron similar a los desarrollados en este trabajo y tampoco alcanzaron eficiencias de extracción del 20% en el rango de pH evaluado. El material PDMS-TEOS tuvo el peor desempeño de los materiales estudiados, apenas alcanzó un 7 % de extracción y también tuvo su más

baja eficiencia de extracción en las proximidades de los pKas de los compuestos; esto indicó que la mejoría en la extracción con respecto a PDMS-TEOS no fue tan marcada y que los materiales desarrollados tuvieron poca afinidad por las tetraciclinas. Ibrahim *et al.*²⁵ y Rahim *et al.*²⁶ reportaron mejores eficiencias de extracción en matrices acuosas para compuestos que denominan polares (ketoprofeno [$\log_{10}K_{OW}=3.12$], diclofenaco [$\log_{10}K_{OW}=1.56$] y naproxeno [$\log_{10}K_{OW}= 3.18$]) empleando recubrimientos sol-gel PDMS-CNPrTEOS. Sin embargo, debe notarse que los $\log_{10}K_{OW}$ de esos compuestos estudiados por los autores son mucho más altos que los de las tetraciclinas y los otros antibióticos evaluados en esta tesis, es decir, aquellos son más hidrofóbicos y, por tanto, menos afines al agua.

Efecto del modificador orgánico

Considerando la estabilidad exhibida por las barras, se evaluó el efecto del modificador orgánico sobre la eficiencia de la extracción de tetraciclinas. Adicionando 10 a 30% de etanol o acetonitrilo a la disolución de pH 2 fortificada con tetraciclinas se hicieron pruebas de extracción de éstos analitos con los materiales A (CNPrTEOS/TEFS>1), B (CNPrTEOS/TEFS=1) y PMDS-TEOS. En todos los casos se empeoró la extracción por adicionar un modificador orgánico, las concentraciones de las soluciones fortificadas se mantuvieron por encima de 0.90 mg/L aunque el proceso se prolongó hasta 120 min. La literatura reporta que un modificador orgánico (ej. metanol, acetonitrilo) añadido a la muestra acuosa puede tener un efecto positivo o negativo en la extracción de los analitos por SBSE.⁴⁹

Burgos⁹¹ reportó que para compuestos furánicos ($\log_{10}K_{OW}<1$) extraídos de agua con PDMS-CNPrTEOS en presencia de 10-50% de modificador orgánico (metanol, acetonitrilo o isopropanol) decreció la recuperación en todos los casos. En este contexto, si se observa la estructura de las tetraciclinas, se notará que éstas contienen grupos hidroxilo, amida, carbonilos y una amina cargada positivamente a pH 2, por ello, es claro que sus posibilidades para formar puentes de hidrógeno con el agua y otras sustancias son variadas. La literatura reporta que las tetraciclinas son solubles en agua pero también bastante en etanol, metanol y algo menos en acetonitrilo, tendiendo a aumentar sus solubilidades en los disolventes con la temperatura en todos los casos; probablemente se favoreció su solubilización en el medio acuoso antes que su retención en la barra.

Por otro lado, también se examinó el efecto de modificadores medianamente polares sobre la extracción de tetraciclinas (250 rpm por 120 min), esto variando de 10 a 30% v/v el contenido de acetona (o isopropanol) en solución. Sin embargo, no hubo mejora apreciable utilizando la mayor proporción CNPrTEOS/TEFS (barra A) o la proporción equimolar CNPrTEOS/TEFS (barra B) con respecto PDMS-TEOS durante las extracciones pues, en cualquier caso, la eficiencia nunca superó un 15%. En la literatura¹¹⁴ se había reportado que la solubilidad para la tetraciclina en isopropanol o acetona dentro del rango de temperatura 15.3-37.0°C era bastante inferior a la del

agua, el nivel de dilución de las tetraciclinas desfavoreció su extracción y evitó que los modificadores las desplazaran hacia el recubrimiento significativamente.

Experimentos de desorción

Antes de evaluar la desorción, se realizaron experimentos de extracción probando inicialmente el recubrimiento A (CNPrTEOS/TEFS>1) y luego el B (CNPrTEOS/TEFS=1) bajo las siguientes condiciones de operación: pH 2 (disolución de HCl o H₂C₂O₄ 20 mM), 250 rpm, 120 min y variando el contenido de modificador (isopropanol o acetona) de 0 a 30% v/v. Se realizó la desorción utilizando 500 µL de metanol durante 20 o 40 min con vórtex (o ultrasonido), pero en ningún caso se observaron picos integrables atribuibles a las tetraciclinas en los cromatogramas. Solo cuando se utilizó acetona como modificador apareció en los cromatogramas un pico intenso alrededor de 1.86 min asociado a este compuesto (acetona, $\lambda_{\text{Valor de Corte}}=340$ nm). La elección del metanol como disolvente de desorción se basó en la excelente estabilidad exhibida por las barras frente a este disolvente, y porque la literatura reportaba que luego del agua era el que mejor solubilizaba las tetraciclinas (superior al etanol y aún más que el acetonitrilo)¹¹⁴.

Diferentes mezclas de metanol y una disolución acuosa de pH 2 (ácido oxálico 20 mM o HCl) se prepararon variando el contenido de metanol en el rango 0-100% MeOH v/v y se evaluaron como disolventes de desorción; sin embargo, tampoco se lograron detectar las tetraciclinas al analizar los extractos por HPLC. Inclusive se inyectaron los extractos con 50%v/v o menos de metanol directamente (sin dilución) al HPLC pero tampoco se lograron identificar señales integrables de tetraciclinas en los cromatogramas.

Efecto salino

Se llevaron a cabo extracciones de tetraciclinas en condiciones de salinidad elevada (10-30% m/v NaCl), a 250 rpm, pH 2 (HCl), por 120 min y con las barras ciano (PDMS-CNPrTEOS 1:3), A, B, C, fenilo (PDMS-TEFS) y PDMS-TEOS. Sin embargo, al desorber con metanol, acetonitrilo o mezclas de estos disolventes con H₂C₂O₄ 0.01 M (pH 2) en ningún caso hubo respuesta cromatográfica para las tetraciclinas al analizar los extractos de desorción.

En SBSE es posible que compuestos ionizables o cargados como las tetraciclinas no se extraigan mejor al elevar la fuerza iónica debido a que las atracciones electrostáticas con los iones en solución retrasan su desplazamiento hacia la fase polimérica, dichas interacciones se han reportado en la literatura.¹¹⁵ El efecto *salting out* tiende a ser más notable para compuestos con grupos hidrofóbicos voluminosos dado que la sal introduce interacciones iónicas poco favorables, pero además desestabiliza la hidratación de los grupos hidrofílicos.²⁷

Extracción de tetraciclinas desde fase orgánica

Con la finalidad de corroborar que la funcionalización de los materiales con grupos fenilo y ciano puede favorecer la retención de las tetraciclinas, se realizó la extracción en isooctano debido a que sus moléculas son incapaces de formar enlaces del tipo puente de hidrógeno con las tetraciclinas. Las extracciones se realizaron por 120 min y con un nivel de concentración de antibióticos de 1 mg/L. Los resultados obtenidos de este análisis se presentan gráficamente en la figura 31.

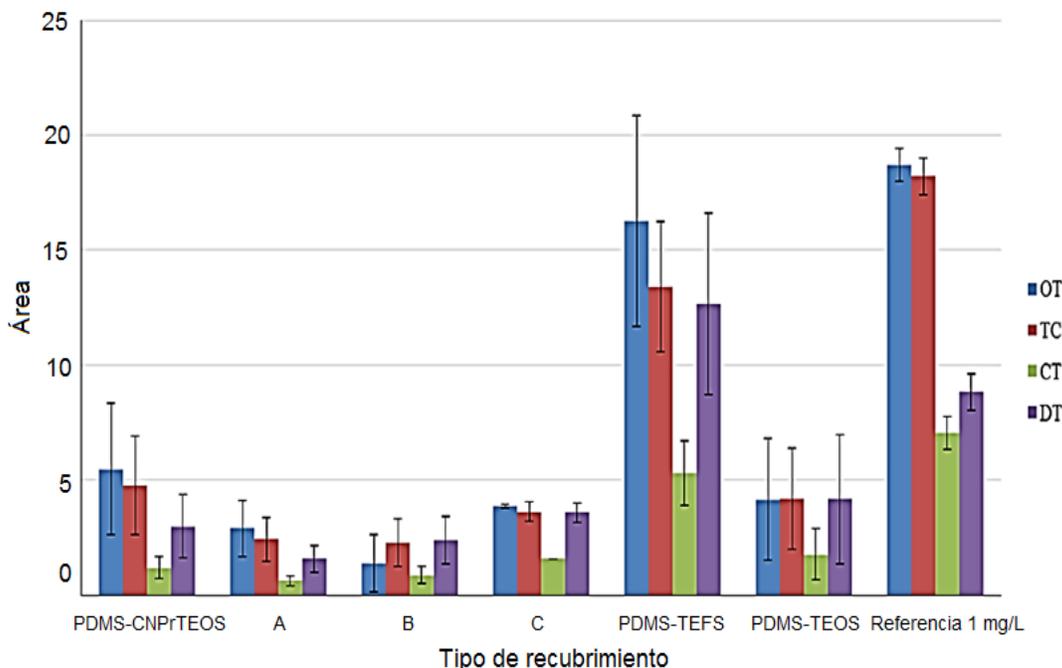


Figura 31. Antibióticos desorbidos de las barras recubiertas previamente utilizadas para extraer tetraciclinas en fase orgánica. Extracción: 2h, isooctano, fortificación: 1 mg/L. Desorción: vórtex, 40 min, 40%MeOH-60% H₂C₂O₄.

Como se puede observar en la figura 31, el material con mayor contenido de ciano pero sin fenilo (PDMS-CNPTEOS) retuvo más tetraciclinas que los materiales A (mayor razón CNPrTEOS/TEFS) y B (razón equimolar CNPrTEOS/TEFS). Esto se puede explicar como el efecto de las interacciones polares entre el material y las tetraciclinas que se incrementan cuando hay más grupos cianos. No obstante, el hinchamiento de los materiales también debió favorecer el proceso de retención, Ochiai *et al.*¹¹⁶ han reportado que un material hinchado con un disolvente en SBSE retiene más analitos porque se facilita la difusión de éstos hacia el interior del sorbente.

En los materiales PDMS-CNPTEOS, A y B ocurrió hinchamiento pero no hubo daño apreciable a nivel macroscópico en la estructura de los materiales durante la extracción e incluso después de extraer y dejar evaporar el disolvente residual. En

los materiales C (CNPrTEOS/TEFS<1), PDMS-TEFS y PDMS-TEOS el hinchamiento fue bastante apreciable y en muchos casos provocó desprendimientos de material durante la extracción, especialmente con PDMS-TEFS y PDMS-TEOS.

La mayor recuperación de analitos en el caso de PDMS-TEFS puede explicarse si se considera: el hinchamiento, ya que se acelera la difusión de analitos hacia el material durante la extracción; el desprendimiento de material, que facilita la transferencia de masa al disminuir el grosor (e igualmente la desorción posterior); el contenido de TEFS, ya que al tener grupos fenilo las interacciones π - π son más numerosas y se supera al material PDMS-TEOS donde están ausentes; y también los grupos Si-OH residuales presentes debieron contribuir mediante el establecimiento de enlaces polares con los analitos (debe recordarse que la condensación completa y el tiempo de gelificación se retrasan aumentando el contenido de TEFS por la menor reactividad de este entrecruzante en condiciones de catálisis ácida^{99,100}).

Extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol

En la tabla 8 se reportan algunos parámetros importantes del método cromatográfico que se aplicó para determinar los antibióticos sulfatiazol, sulfametoxazol, trimetoprim y cloranfenicol en los extractos de las disoluciones acuosas y medio orgánico.

Tabla 8. Parámetros del método cromatográfico utilizado para determinar sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol.

Antibiótico	t_R (min)	λ_{max} (nm)	LC ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	Ecuación de calibración	R^2
Sulfatiazol (STZ)	2.68	278	0.799	0.239	$A=89.240C-1.800$	0.9942
Trimetoprim (TMP)	3.55	278	3.40	1.02	$A=20.960C-0.870$	0.9941
Sulfametoxazol(SMX)	4.82	278	1.02	0.306	$A=69.786C-2.341$	0.9987
Cloranfenicol (CRF)	7.01	278	1.86	0.558	$A=38.347C-7.257$	0.9941

A absorbancia, C concentración, λ_{max} longitud de onda de máxima absorbancia, LC el límite de cuantificación instrumental, LD límite de detección instrumental, R^2 coeficiente de determinación, t_R tiempo de retención.

La figura 32 presenta el perfil cromatográfico de los antibióticos antes mencionados, se obtuvo por dilución de la mezcla de 1000 mg/L y utilizando como disolvente metanol y la solución buffer 0.1%v/v de HCOOH (pH 4.5) en proporción 50:50 v:v.

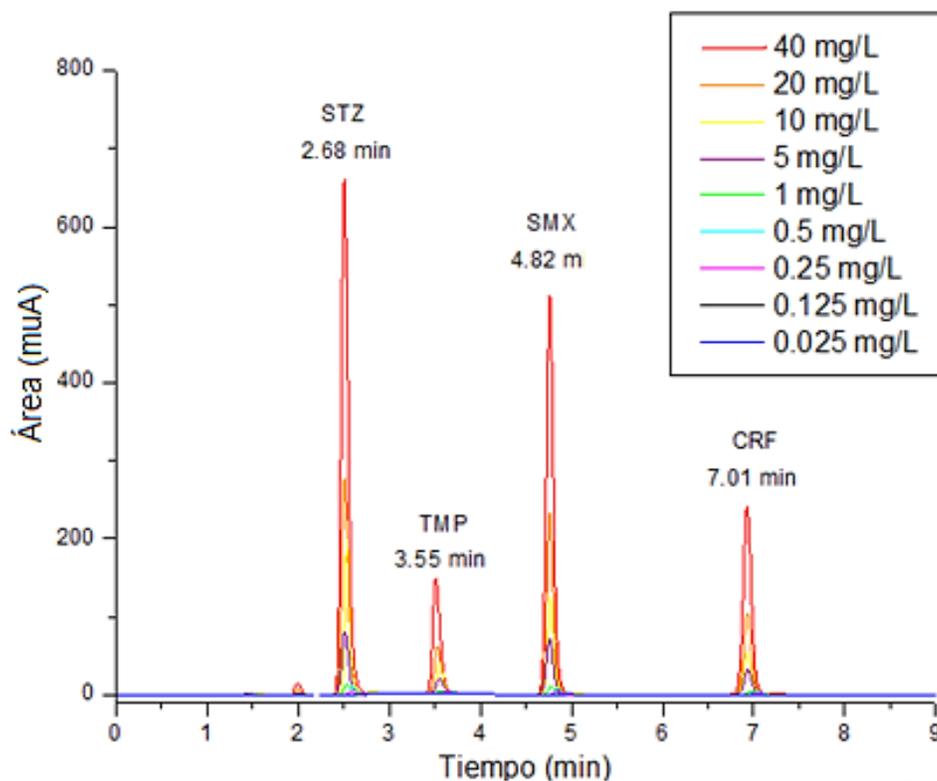


Figura 32. Perfil cromatográfico de sulfatiazol, trimetoprim, sulfametoxazol y cloranfenicol.

Extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol de medio acuoso

Efecto del tipo de recubrimiento

Se evaluaron los recubrimientos PDMS-CNP_rTEOS, A, B, C, PDMS-TEFS y PDMS-TEOS para determinar cuál tenía mayor afinidad por los antibióticos con $0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$. Las condiciones de extracción fueron: 250 rpm, 120 min y 1 mg/L de concentración de cada antibiótico en 10 mL de disolución acuosa a pH 4.5 (buffer 0.1%v/v ac. fórmico). El pH se ajustó a 4.5 para favorecer que la mayoría de las especies estuviera en forma neutra (únicamente TMP tenía carga positiva).⁶⁷ En la figura 33 se presentan los resultados de la comparación de la capacidad de extracción de los recubrimientos antes mencionados.

La figura 33 revela que el recubrimiento PDMS-CNP_rTEOS y el recubrimiento A (CNP_rTEOS/TEFS > 1) fueron los que extrajeron mayor cantidad y tipo de antibióticos con $0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$; en algunos casos se extrajo más del 20% de sulfametoxazol y sulfatiazol. Esto indica que los grupos ciano tuvieron una clara interacción con los analitos estudiados y tendieron a retenerlos. Sin embargo, ésta no fue lo suficientemente fuerte como para desplazar el equilibrio hacia el material, de modo que

la mayoría permaneció en disolución acuosa. El trimetoprim estaba cargado positivamente bajo estas condiciones de extracción, por ello, no resulta raro que conforme los recubrimientos se vuelven menos polares éste compuesto se estabilice mejor por la solvatación del agua y se extraiga poco. En la literatura se ha reportado que con la barra SBSE comercial (recubrimiento de PDMS) no se consiguieron extraer sulfamidas de medios principalmente acuosos (5% ACN) por la baja afinidad de la fase por ellas.⁷⁷

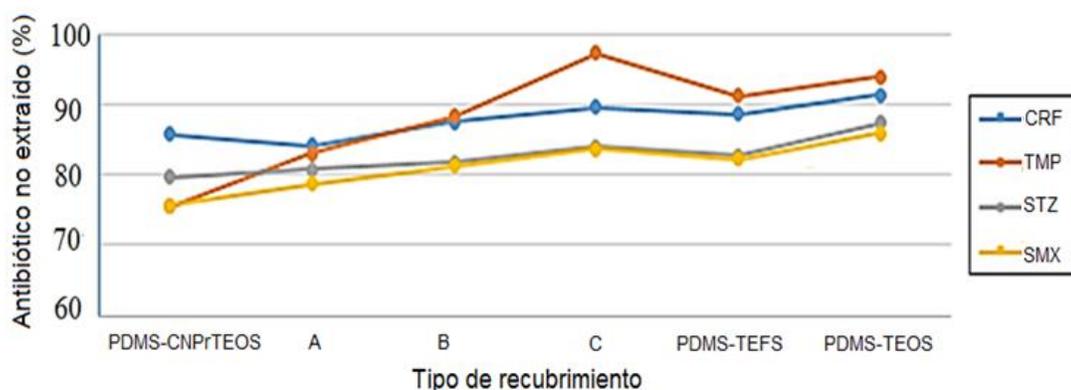


Figura 33. Concentración de la sulfatiazol (STZ), trimetoprim (TMP), sulfametoxazol (SMX) y cloranfenicol (CRF) en las disoluciones acuosas fortificadas a 1 mg/L luego de realizar la extracción (250 rpm, pH 4.5 y 120 min) con diferentes recubrimientos.

La desorción de los analitos retenidos en las barras se realizó con 500 μ L de metanol en vórtex y durante 20 minutos, luego se diluyó con el buffer de pH 4.5 y se analizó por HPLC. Tal como revela el cromatograma de la figura 34, a diferencia de las tetraciclinas sí se observaron señales y éstas fueron integrables pero el valor de las áreas fue bastante menor en comparación con las correspondientes a un estándar de 0.5 mg/L, es decir, en el extracto hubo una dilución al desorber en vez de una preconcentración porque no se desorbieron cuantitativamente los analitos de las barras. Lo evidente fue que las barras que mejor desempeño tuvieron en la extracción también fueron las que dieron señales más intensas durante la desorción. La barra con más ciano de Burgos⁹¹ liberó más trimetoprim y cloranfenicol, pero la barra A de este estudio liberó más sulfatiazol y sulfametoxazol. El grosor de los recubrimientos es un factor que pudo afectar negativamente la desorción, ya que limita la transferencia de masa; esto ha sido reportado en la literatura.⁹⁴

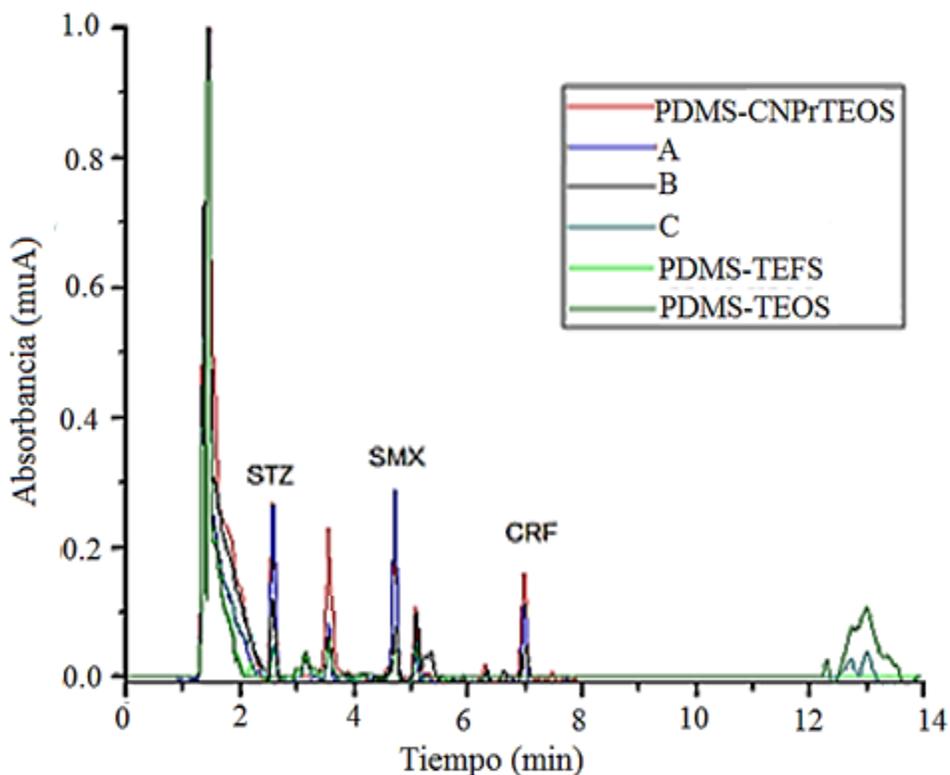


Figura 34. Cromatogramas de los extractos metanólicos obtenidos después de desorber (20 min, vórtex) los antibióticos de diferentes recubrimientos PDMS:TEFS:CNPTEOS asociados a las relaciones A(1:1:2), B(1:1.5:1.5) y C(1:2:1)

Experimentos de desorción

La desorción de los antibióticos se evaluó manteniendo constantes las condiciones de extracción: recubrimiento A (CNPTEOS/TEFS>1), fortificación de 1 mg/L, 10 mL de disolución acuosa (buffer fórmico 0.1%v/v ajustado a pH 4.5), velocidad de agitación de 250 rpm y tiempo de 120 min. Las figuras 35 y 36 presentan las gráficas de los porcentajes de desorción obtenidos por vórtex y ultrasonido respectivamente en función del porcentaje de metanol en las mezclas metanol-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) utilizadas para liberar los analitos. Se evaluaron dos tiempos de desorción: 20 y 40 min.

Posteriormente a las extracciones se examinaron las disoluciones acuosas y se reveló que las concentraciones de antibióticos habían decrecido hasta: 0.78 ± 0.02 mg/L de STZ, 0.77 ± 0.02 mg/L de TMP, 0.75 ± 0.03 mg/L de SMX y 0.80 ± 0.02 mg/L de cloranfenicol.

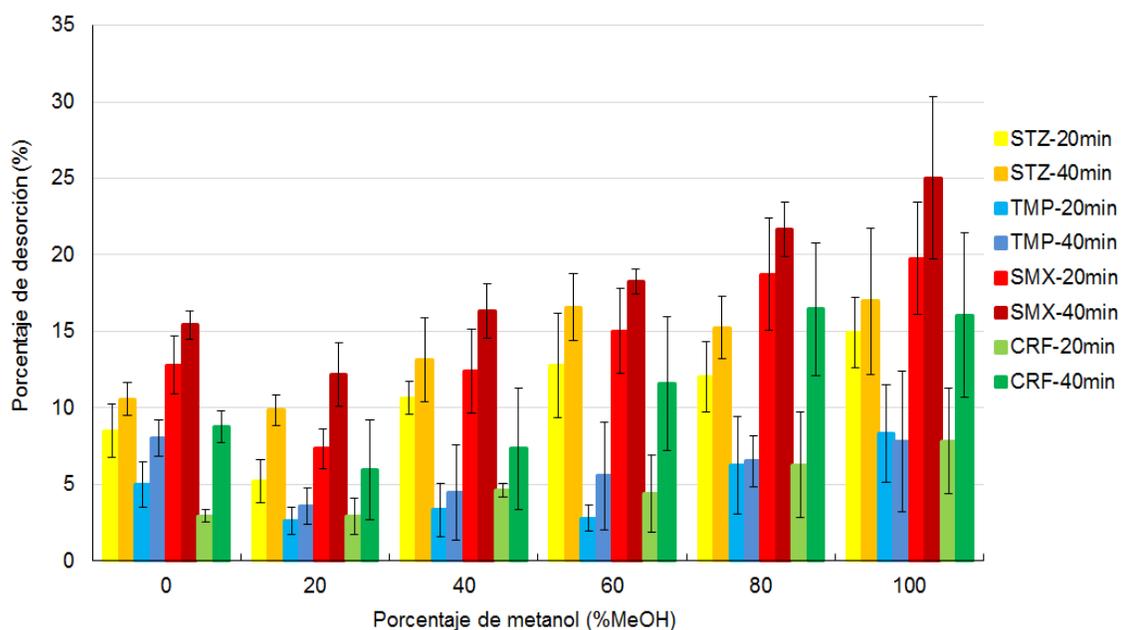


Figura 35. Porcentajes de desorción obtenidos utilizando vórtex y diferentes mezclas metanol-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) durante 20 o 40 min.

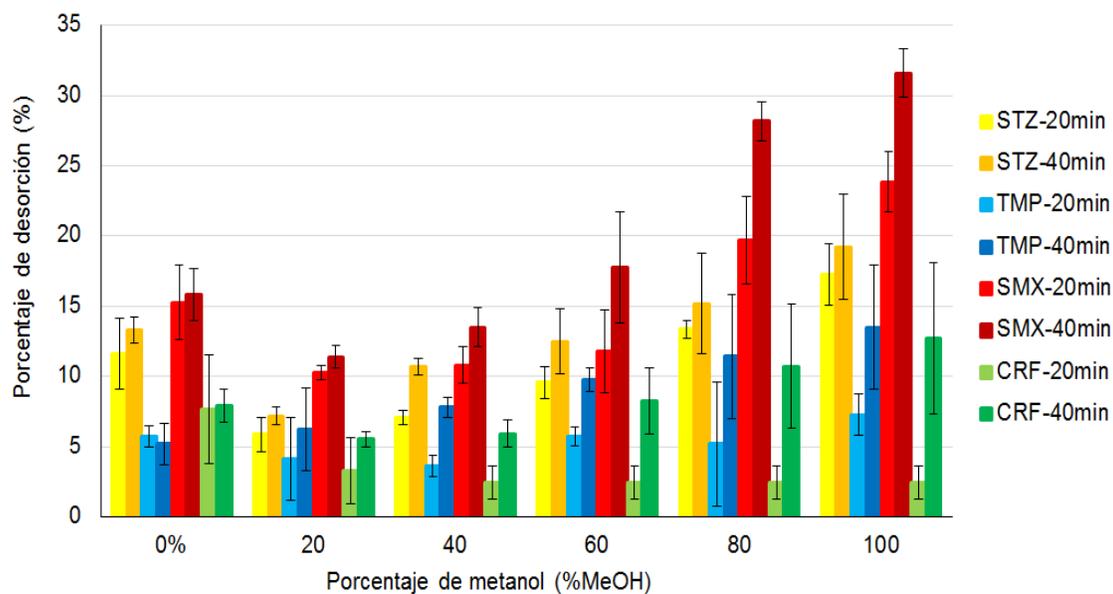


Figura 36. Porcentajes de desorción obtenidos utilizando ultrasonido y diferentes mezclas metanol-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) durante 20 o 40 min.

En los extractos de desorción metanol-buffer fórmico de las barras con mayor proporción CNPrTEOS/TEFS (recubrimiento A) no se observó preconcentración apreciable de ningún antibiótico, ello comparando sus áreas con respecto a las áreas registradas para las disoluciones acuosas fortificadas hasta 1 mg/L. Asimismo,

independientemente del tipo de desorción (vórtex o ultrasónica), se observó un incremento en el porcentaje de desorción cuando el contenido de metanol superó 40%, esto con respecto a aquellas obtenidas utilizando solo el buffer fórmico (pH 4.5) sin metanol. En general, la desorción ultrasónica tendió a ser ligeramente menos efectiva que la vórtex con bajos porcentajes de metanol, solo la superó cuando el contenido de metanol se elevó arriba de 60%. El trimetoprim fue la sustancia con las menores áreas en los extractos vórtex y no en todos los casos fue detectable, la desorción por ultrasonido fue ligeramente mejor para este analito cargado positivamente a pH 4.5.

Por otro lado, debe resaltarse que en la mayoría de los casos fueron más eficaces las desorciones con tiempos superiores a 20 min dado que se permite la difusión de los analitos hasta el disolvente durante más tiempo, evidentemente el grosor del material puede afectar negativamente la desorción si no se desorbe el tiempo suficiente.

Bajo las mismas condiciones de extracción antes descritas, se realizaron pruebas de desorción (20 o 40 min) utilizando diferentes mezclas acetonitrilo-buffer fórmico (pH 4.5) mediante vórtex (Figura 37) o ultrasonido (Figura 38). La justificante para esto fue que la literatura reportaba que el trimetoprim tiene más afinidad por acetonitrilo que por alcoholes; pero para las sulfamidas y el cloranfenicol se ha reportado más afinidad por disolventes menos polares como acetona en comparación con el agua y los alcoholes, es frecuente utilizar acetonitrilo para diluirlos o extraerlos.^{63,70,81.}

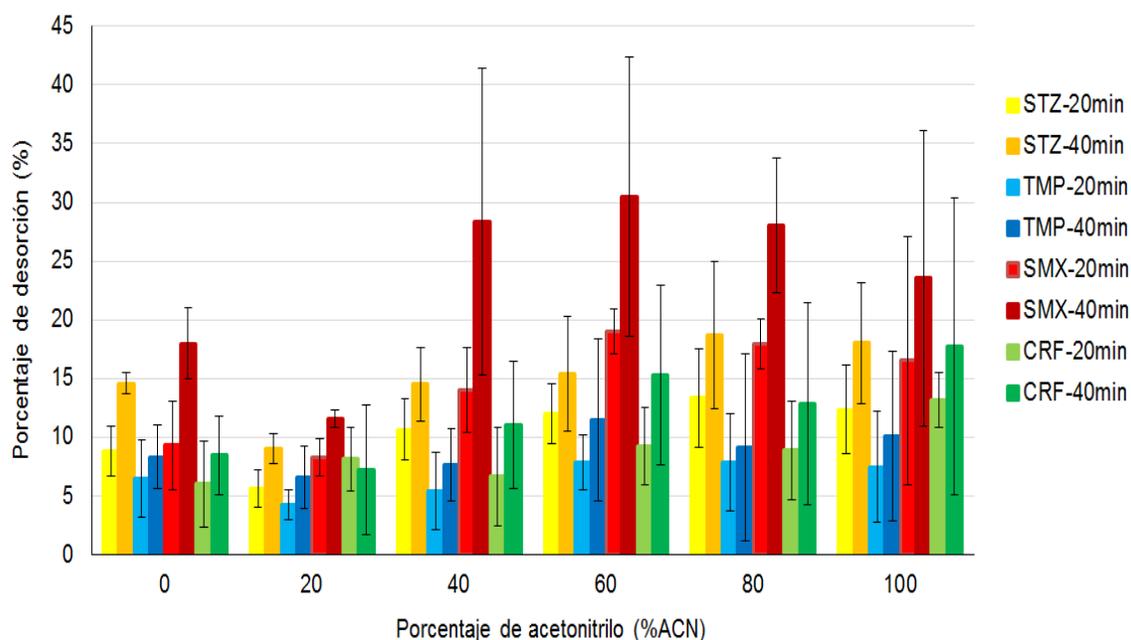


Figura 37. Porcentajes de desorción obtenidos utilizando vórtex y diferentes mezclas acetonitrilo-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) durante 20 o 40 min.

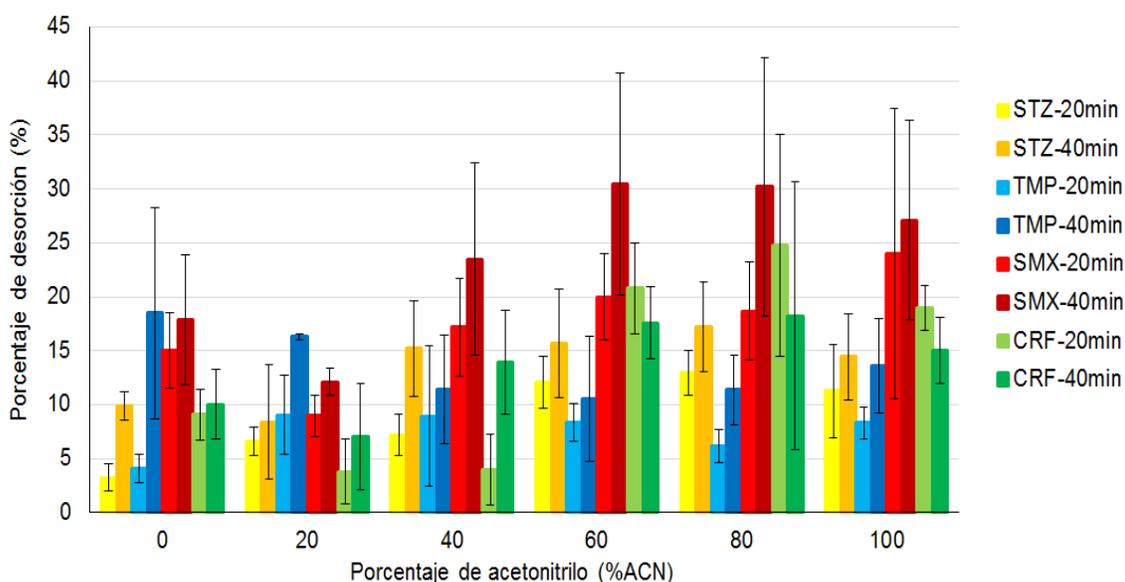


Figura 38. Porcentajes de desorción obtenidos utilizando ultrasonido y diferentes mezclas acetonitrilo-buffer fórmico 0.1%v/v (pH 4.5) durante 20 o 40 min.

Al analizar los datos resultantes de variar el contenido de acetonitrilo en el disolvente de desorción se constató nuevamente la ausencia de preconcentración significativa en el extracto con respecto a la disolución acuosa de 1 mg/L. También se observó que los valores promedio en el caso de la desorción vórtex fueron ligeramente menores que en el caso de la desorción con ultrasonido. Se registraron valores de áreas más altos en comparación con el metanol conforme se incrementó el contenido de acetonitrilo, pero con ACN se observó mayor variabilidad en los resultados y la tendencia del pico de sulfatiazol a distorsionarse en los cromatogramas.

En la literatura hay reportes de SBSE en donde un incremento de acetonitrilo no siempre mejora la extracción de sulfamidas, las propiedades particulares del material pueden influir en este aspecto.⁷⁸ El hinchamiento de PDMS puro es insignificante con metanol pero un poco mayor con ACN. Hay reportes donde se obtiene dispersión en las recuperaciones cuando una barra previamente hinchada con ACN se somete a desorción líquida con este mismo disolvente después de haber sido utilizada para extraer desde un medio acuoso analitos polares.¹¹⁷

Optimización de la extracción de antibióticos con $0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$

El uso de un diseño factorial 2^k es frecuente para la optimización de la extracción en fase acuosa, ya que permite examinar el efecto de varios factores y de todas sus posibles interacciones de manera simultánea con una sola réplica. En este trabajo para economizar tiempo y recursos se llevó a cabo el estudio del proceso de extracción SBSE utilizando un diseño factorial 2^4 , el recubrimiento con mayor proporción CNPrTEOS/TEFS (barra A) y considerando la influencia de factores como:

el tiempo de extracción (Factor A), la velocidad de agitación (Factor B), el %m/v de NaCl disuelto (Factor C) y el %v/v ACN adicionado (Factor D). Como lo ilustra la figura 39, la selección de los modificadores NaCl y ACN se realizó considerando que éstos, en un examen preliminar, mejoraron más la recuperación de antibióticos en comparación con isopropanol (IsopOH) y MeOH. Asimismo, el pH se fijó en 4.5 ya que previamente se encontró que valores por debajo o por arriba de 4.5 desfavorecía la extracción de sulfamidas, aunque el pH en el rango 8-9 favoreció mínimamente la extracción de trimetoprim (cuya molécula es neutra en ese rango de pH).

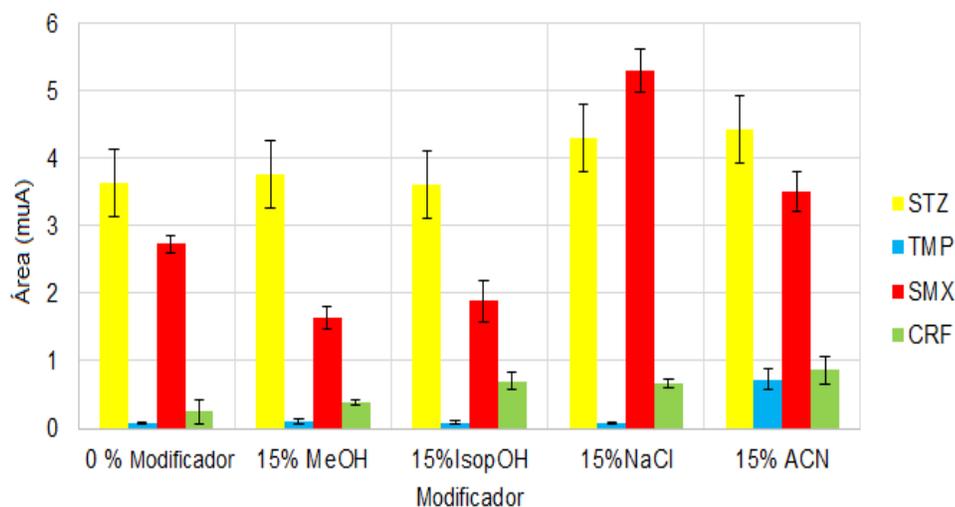


Figura 39. Efecto de diferentes modificadores sobre las áreas de antibióticos desorbidos de la barra A (relación PDMS:TEFS:CNPrTEOS de 1:1:2).

Después del procesamiento de los datos del diseño factorial 2^4 con cinco puntos centrales se planteó una demostración estadística formal de significancia de efectos de factores y sus interacciones, esto para identificar cuáles influyen considerablemente sobre la respuesta área total de antibióticos recuperados (suma total de áreas). Se evaluó la significancia de cada una de las 15 fuentes de variación y en el anexo B pueden consultarse detalles del ANOVA, sus gráficos de residuales asociados y el modelo de regresión estimado. La explicación ajustada por grados de libertad ($R^2_{ajustada}$) del modelo completo fue 84%, aceptable pese a la gran cantidad de fuentes. Sin embargo, los gráficos de residuales del anexo B confirmaron incumplimiento de los supuestos del ANOVA del modelo completo al no ajustarse a una recta de probabilidad normal, al tener diferente dispersión entre niveles de los factores (heterocedasticidad) y falta de independencia al exhibir tendencias en los gráficos de residuo contra predicho o contra el orden temporal de recolección de los datos. Montgomery¹²⁰ argumenta que la falta de ajuste puede ocurrir cuando hay muchos factores con efectos no significativos en el modelo, sugiere excluir estos términos del modelo y en caso extremo transformar matemáticamente las observaciones. El presente trabajo hizo caso de las observaciones de Montgomery

antes de analizar la variabilidad total, pero también se analizó la variabilidad de cada antibiótico por separado.

Para probar formalmente la significancia de los efectos y cumplir los supuestos del ANOVA se evaluaron varias transformaciones de la respuesta área total de antibióticos registrada (y) del diseño 2^4 , estas fueron: raíz cuadrada ($y^{1/2}$), logaritmo ($\log_{10}y$), inverso ($1/y$) y raíz cuadrada inversa ($1/y^{1/2}$). Ninguna transformación por sí sola mejoró significativamente el cumplimiento de todos los supuestos, algunas mejoraron solo la normalidad y condiciones de independencia pero no la homocedasticidad. Se logró más cumplimiento de supuestos cuando el orden de efectos de los modelos se redujo a máximo 2 (modelos sin las interacciones triples y cuádruple), bajo estas condiciones la potente transformación $1/y$ logró generar residuos que cumplieran satisfactoriamente todos los supuestos sin perder mucha varianza explicada ($R^2=87.84$, $R^2_{ajustada}=75.78$).

En el anexo C se presenta el ANOVA de la transformación $1/y$ con orden máximo de interacción 2, sus residuales asociados y la ecuación de regresión del modelo. Se probó formalmente la significancia de la velocidad ($F=13.70$, $p=0.0208$), el %NaCl ($F=51.53$, $p=0.0020$) y la interacción tiempo*velocidad ($F=15.27$, $p=0.0113$); pero el %ACN ($F=6.81$, $p=0.0595$) dejó de ser significativo con esta transformación. Las fuentes con posible mayor influencia sobre la respuesta se identifican mediante el gráfico de distribución de probabilidad normal de los efectos (los efectos significativos se apartarán de la recta) presentado en la figura 40 y con un diagrama un Pareto para efectos (útil para examinar sus signos y magnitudes) en la 41.

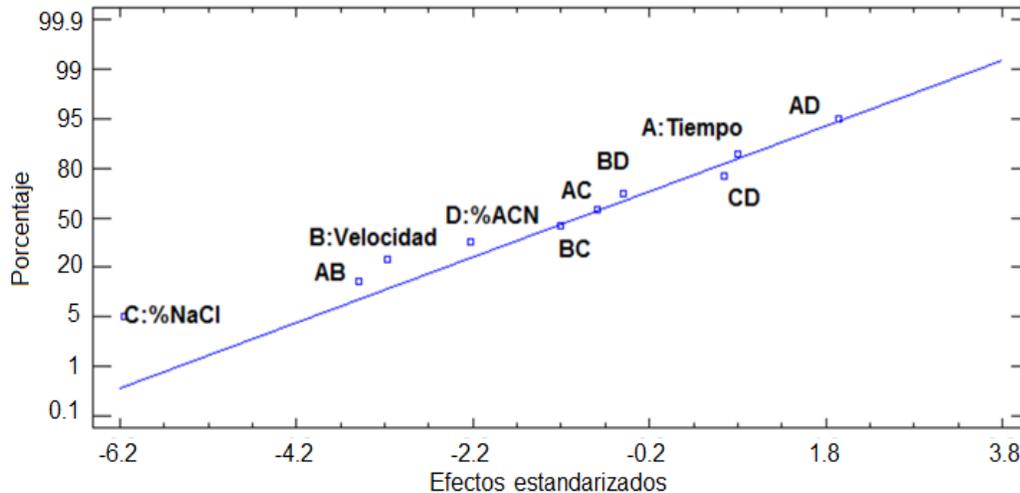


Figura 40. Gráfica de probabilidad normal para los efectos del modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción 2) sobre el inverso del área total de antibióticos recuperados ($1/\text{Área total}$).

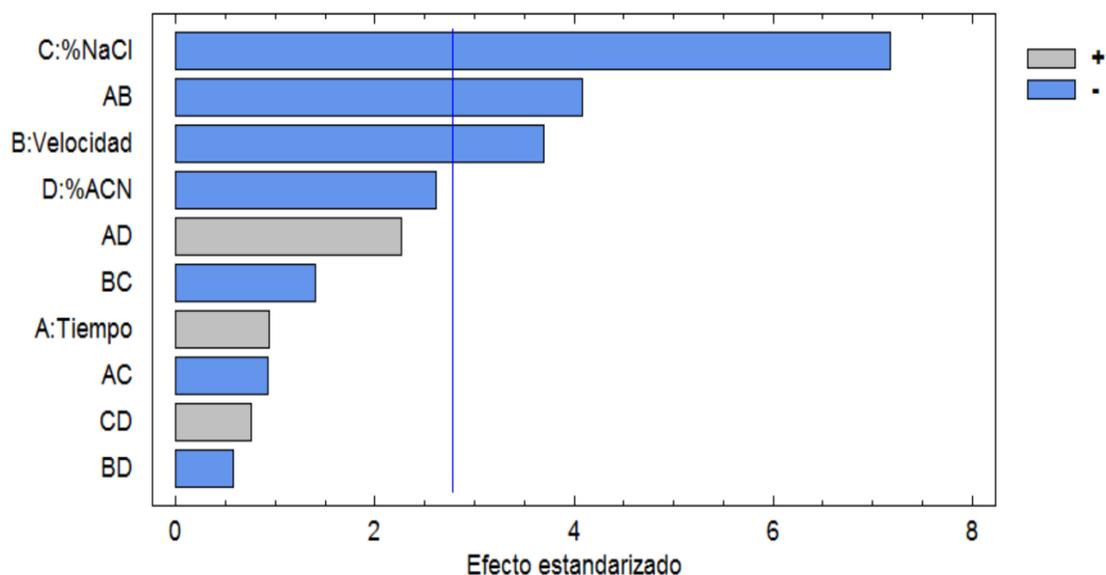


Figura 41. Diagrama de Pareto para los efectos del modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción 2) sobre el inverso del área total de antibióticos recuperados ($1/\text{Área total}$).

La figura 41 indica que el %NaCl, la velocidad y la interacción Velocidad*Tiempo afectaron positivamente a la respuesta área total sin transformación. La literatura^{120,121} sugiere examinar los gráficos de las interacciones significativas para determinar cuáles niveles de los factores elegir a fin de mejorar la respuesta, estos gráficos dan más información que las gráficas de los factores individuales que participan en ellas. Siguiendo la recomendación anterior, la examinación del gráfico de interacción de la figura 42 sugirió que conviene los niveles altos de la velocidad de agitación y del tiempo de extracción para elevar la recuperación total de antibióticos (disminuir el valor del recíproco de área total).

Por otro lado, acorde a la figura 43, el %NaCl en agua (Factor C) debería incrementarse para incrementar la respuesta no transformada. Las mejores condiciones de operación del diseño 2^4 fueron dadas por la corrida que contenía 15%NaCl, 120 min, 0% ACN y 750 rpm. Debe notarse en el diagrama de Pareto de la figura 44 que el %ACN tuvo múltiples interacciones no significativas pero con influencia negativa sobre el área total de antibióticos sin transformación (pero positiva para su recíproco), por tanto, no a todos los antibióticos les favoreció la adición de ACN.

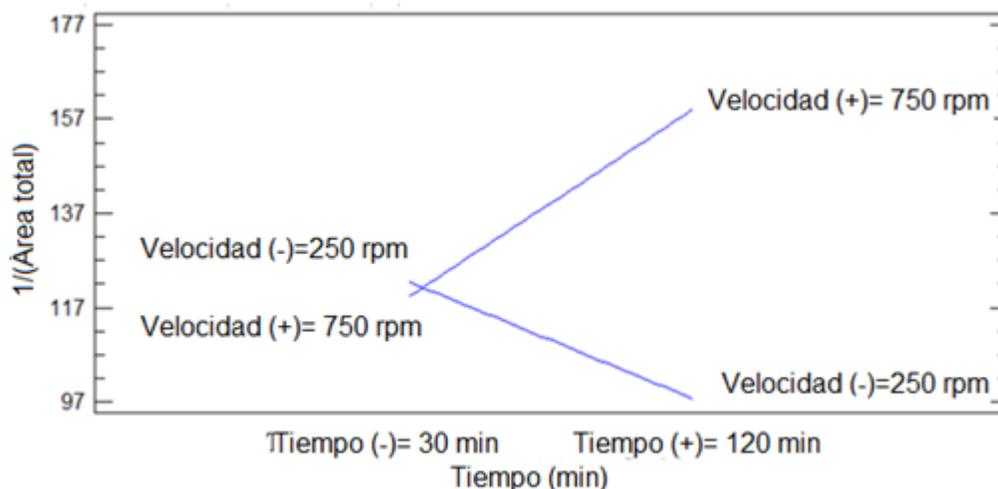


Figura 42. Gráfico de interacción tiempo*velocidad para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción 2) sobre el inverso del área total de antibióticos recuperados ($1/\text{Área total}$).

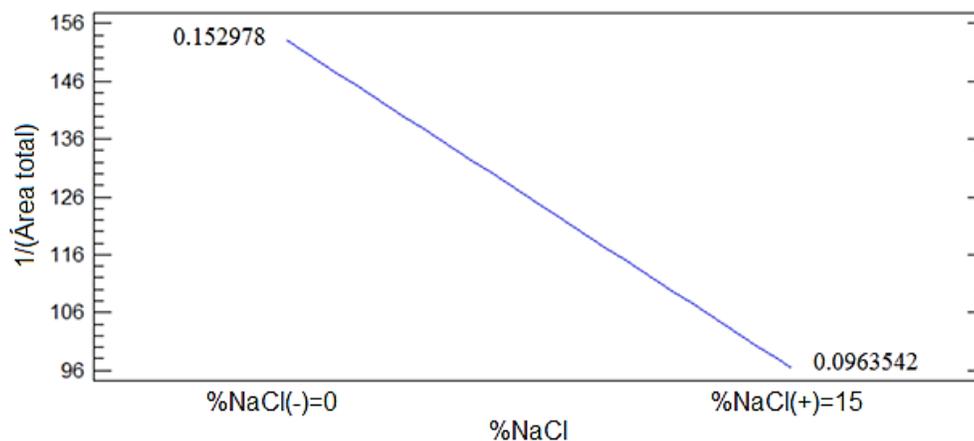


Figura 43. Gráfico de efecto individual de %NaCl para el modelo completo (máximo orden de interacción 2) del inverso del área total de antibióticos recuperados ($1/\text{Área total}$).

Por otro lado, en el caso del sulfatiazol el modelo factorial completo de 15 fuentes alcanzó una explicación alta ($R^2_{ajustada}=88.4\%$) pero hubo problemas para cumplir los supuestos de ANOVA. Esto se solucionó depurando el modelo hasta un orden máximo de interacción 2, de esta manera aún se mantuvo una explicación elevada ($R^2_{ajustada}= 85.89$) y se cumplieron los supuestos de independencia, normalidad y homocedasticidad. En el anexo D se presenta el resumen ANOVA para este modelo depurado, sus residuales asociados y el correspondiente modelo de regresión. Este ANOVA constituyó una demostración formal de la significancia de efectos para la velocidad ($F=32.44$, $p=0.0002$), el %NaCl ($F=30.88$, $p=0.0002$), el %ACN ($F=6.15$,

$p=0.0323$), la interacción tiempo*velocidad ($F=25.94$, $p=0.0005$), la interacción tiempo*%ACN ($F=13.10$, $p=0.0047$) y la interacción velocidad*%NaCl ($F=17.23$, $p=0.0020$). El gráfico de distribución de probabilidad normal de Daniel (figura 44) revela las fuentes significativas que se apartan de una recta de probabilidad normal y un diagrama de Pareto sus signos (figura 45).

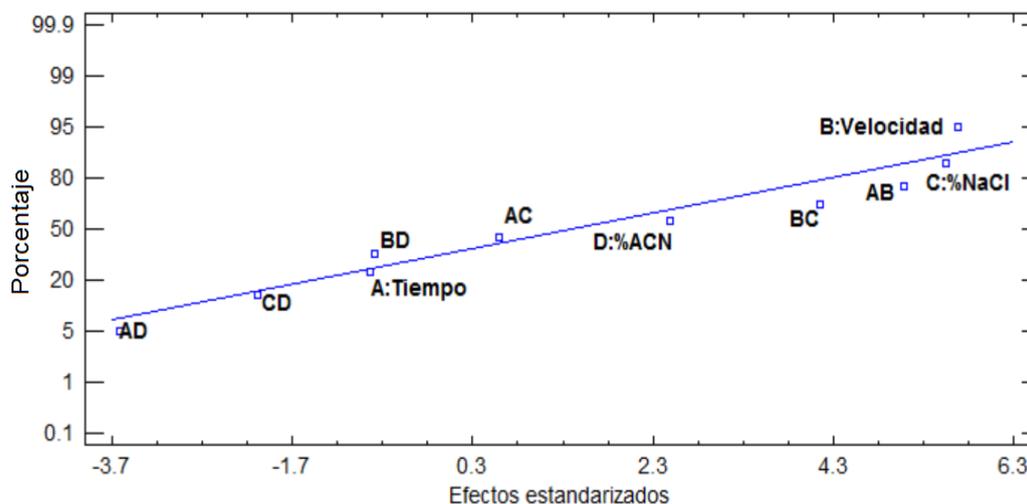


Figura 44. Gráfica de probabilidad normal para los efectos de las fuentes de variación del modelo factorial 2^4 (máximo orden de interacción: 2) sobre el área total de sulfatiazol.

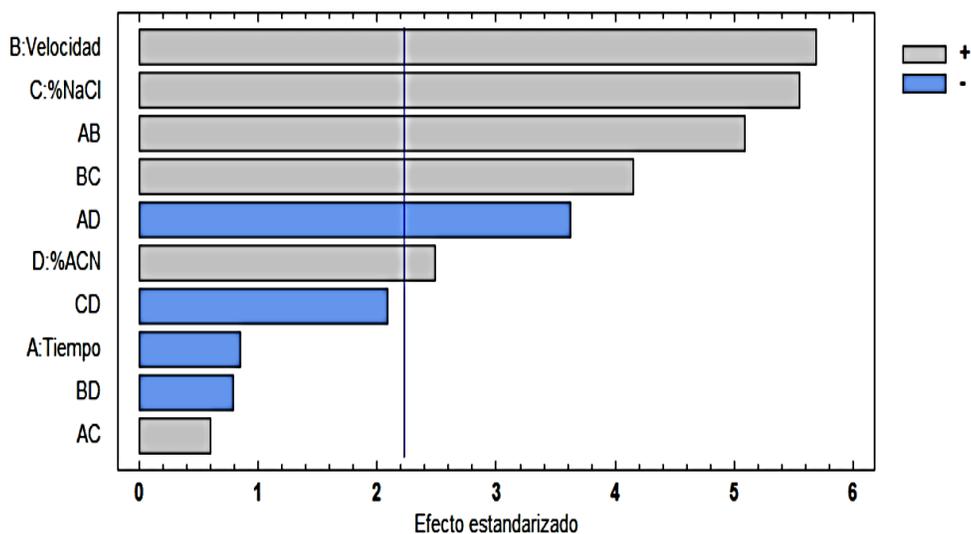


Figura 45. Diagrama de Pareto para los efectos de las fuentes de variación del modelo factorial 2^4 (máximo orden de interacción: 2) sobre el área de sulfatiazol.

Con el fin de tomar decisiones acerca de qué niveles de los factores elegir para incrementar el área del sulfatiazol, se priorizó el análisis de los efectos de las interacciones sobre los efectos individuales. La figura 46 presenta el gráfico de la interacción tiempo*velocidad (Interacción AB), la figura 47 el de la interacción tiempo*%ACN (Interacción AC) y la figura 48 el de la interacción velocidad*%NaCl (Interacción BC).

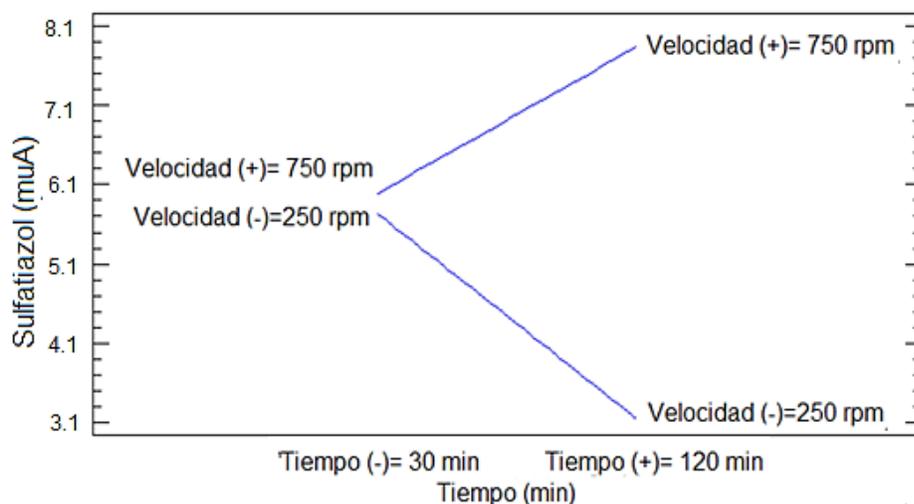


Figura 46. Gráfico de la interacción tiempo*velocidad sobre el área de sulfatiazol.

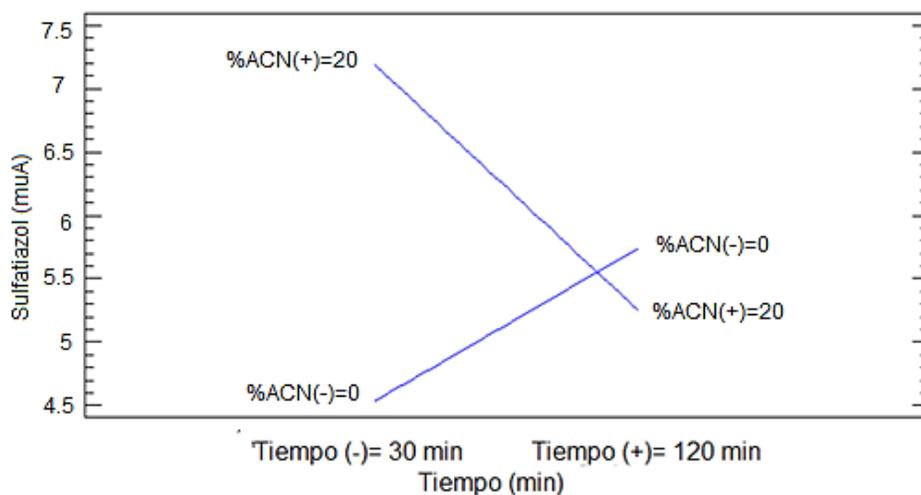


Figura 47. Gráfico de la interacción tiempo*%ACN sobre el área de sulfatiazol.

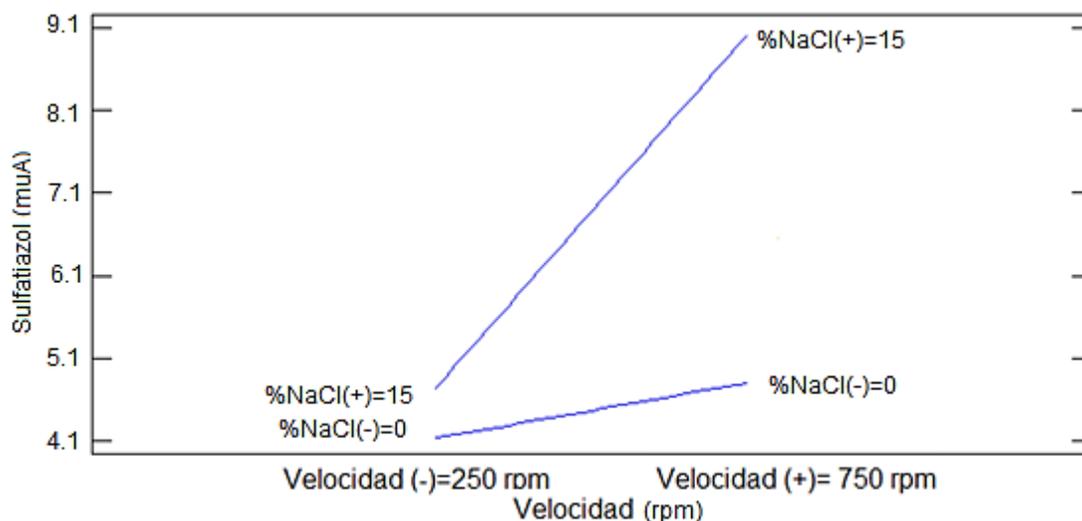


Figura 48. Gráfico de la interacción velocidad*%NaCl sobre el área de sulfatiazol.

Los gráficos anteriores muestran que para elevar el área de sulfatiazol conviene incrementar la cantidad de sal hasta 15%, la velocidad de agitación hasta 750 rpm, el tiempo hasta 120 min y mantener en 0% el acetonitrilo. Estas fueron precisamente las condiciones de la corrida que alcanzó mayor área.

El modelo depurado (máximo orden de interacción 2) para el sulfametoxazol cumplió los supuestos de ANOVA, en el anexo E se presenta su modelo de regresión en unidades codificadas y sus gráficos de residuales asociados. Al excluir las interacciones triples y la cuádruple, los supuestos de ANOVA se cumplieron. Se probó formalmente la significancia del %NaCl ($F=42.26$, $p=0.0001$), %ACN ($F=5.68$, $p=0.0384$), la interacción velocidad*%ACN ($F=5.19$, $p=0.0460$) y la interacción %NaCl*%ACN ($F=8.23$, $p=0.0167$).

El modelo depurado mantuvo una explicación alta ($R^2_{ajustada}=75.24\%$). El gráfico de distribución de probabilidad normal de efectos (figura 49) y diagrama de Pareto (figura 50) del sulfametoxazol muestran los factores e interacciones que más influyeron en la respuesta, el segundo indica que todas las fuentes consideradas ejercieron influencias positivas aunque no en todos los casos fueron significativas.

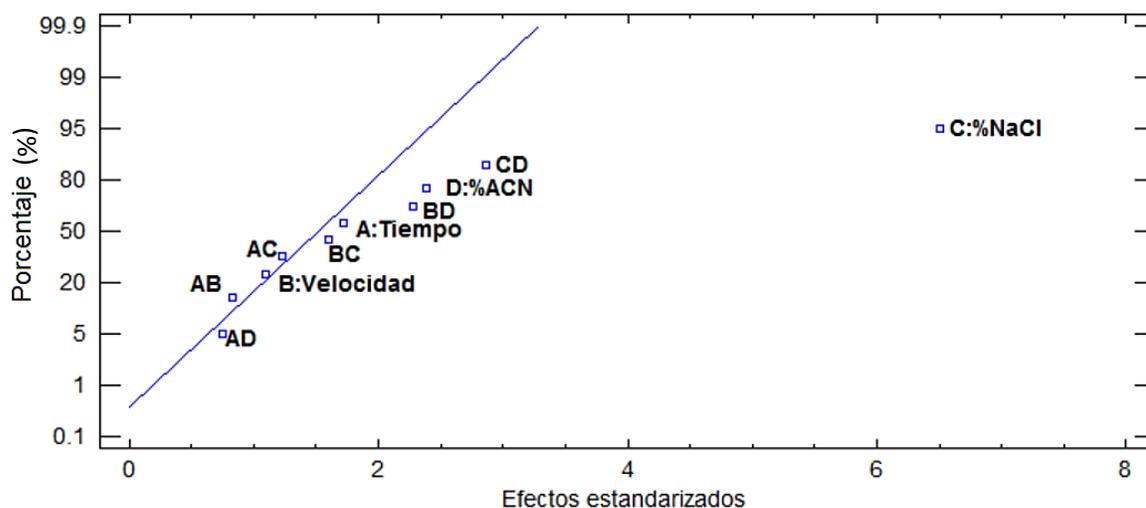


Figura 49. Gráfica de probabilidad normal para los efectos de las fuentes de variación del modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) sobre el área de sulfametoxazol.

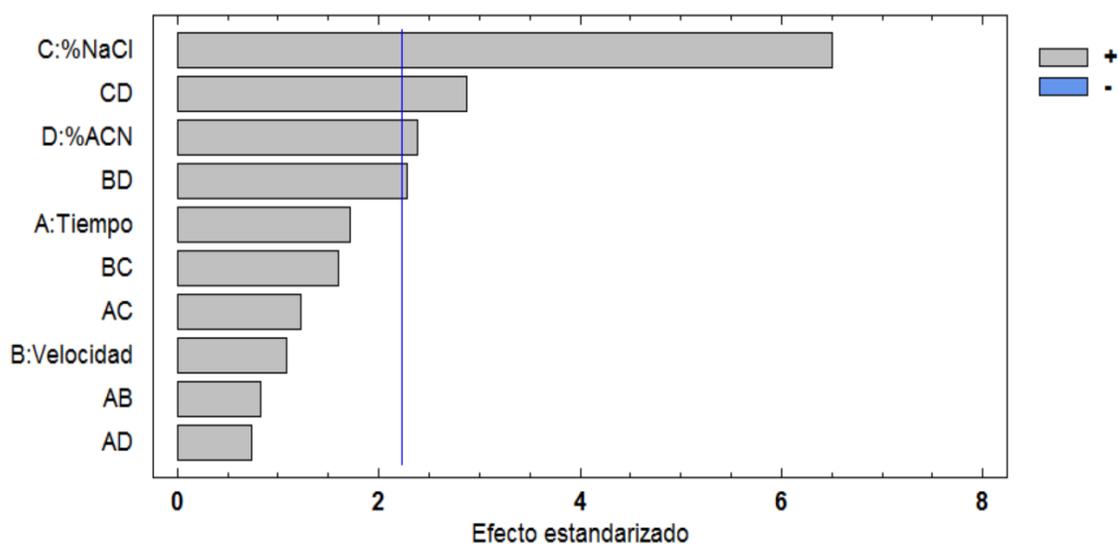


Figura 50. Diagrama de Pareto para los efectos de las fuentes de variación del modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) sobre el área de sulfametoxazol.

Para conocer los niveles de los factores que producen incremento del área de sulfametoxazol se analizaron los gráficos de interacciones BC y CD, estos se presentan en las figuras 51 y 52.

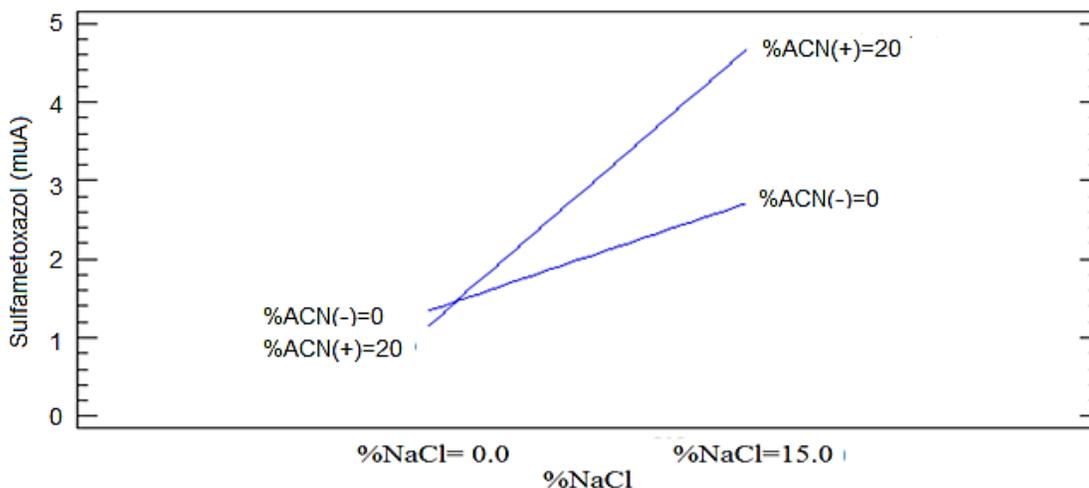


Figura 51. Gráfico de la interacción %NaCl*%ACN sobre el área de sulfametoxazol.

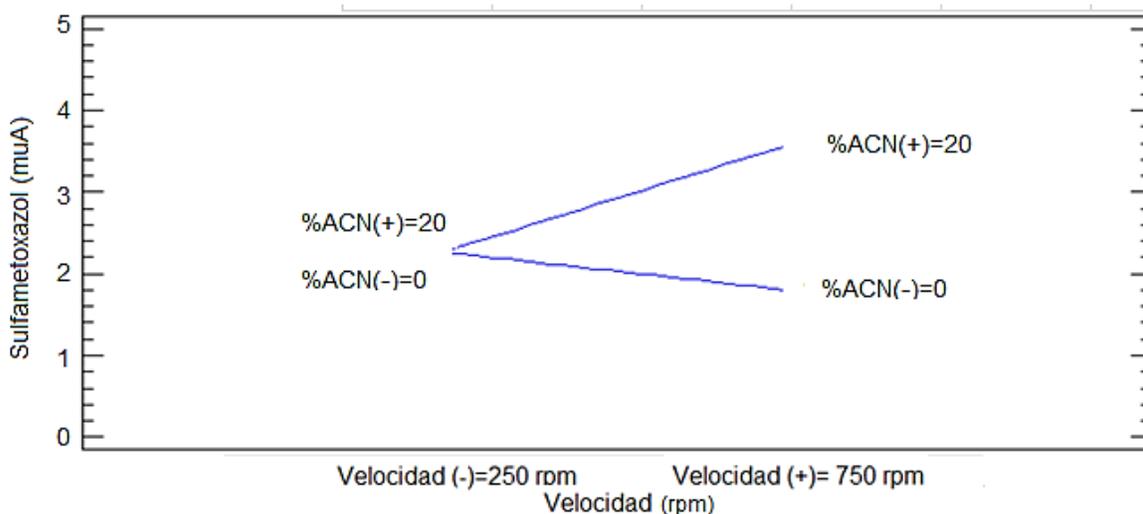


Figura 52. Gráfico de la interacción velocidad*%ACN sobre el área de sulfametoxazol.

Los gráficos anteriores revelaron que para incrementar el área del sulfametoxazol conviene elevar el %NaCl hasta 15%, el %ACN hasta un 20% y la velocidad hasta 750 rpm. Aunque el análisis mostró que el efecto del tiempo no fue significativo, la corrida con mayor valor de área para sulfametoxazol fue aquella en la que la extracción se llevó a cabo por 120 min, 20%ACN, 15% NaCl y a 750 rpm. Debe recordarse que la significancia del efecto tiempo en un factorial 2^k es la diferencia entre el promedio de las respuestas de las corridas donde este factor se fijó en nivel alto menos el promedio de aquellas donde se mantuvo en el nivel bajo.

En el caso del cloranfenicol, el análisis de varianza para el modelo factorial 2^4 completo que consideró las 15 fuentes de variación (atribuibles a factores e interacciones) y alcanzó una explicación moderada tras la corrección por grados de

libertad ($R_{ajustada}^2=75.64\%$). El ANOVA sugirió que el %NaCl fue el único factor significativo, aunque esta no pudo considerarse una demostración formal dado que hubo violaciones apreciables del supuesto de normalidad que no se pudieron evitar transformando la respuesta o descartando interacciones triples y cuádruples sin perder bastante explicación. El resumen del ANOVA 2^4 completo, los gráficos de residuales, los gráficos de Daniel y el de Pareto se pueden consultar en el anexo F. En cada corrida las áreas del cloranfenicol fueron bajas y ninguna superó 2 uA, el modelo completo se ajustó más al ruido del experimento aunque fue claro que el %NaCl tuvo mayor varianza explicada en comparación con otras fuentes. La corrida con mayor área fue la asociada a 120 min, 250 rpm, 15%NaCl y 20% ACN. Resumiendo: no se logró mejoría apreciable en ningún caso para la extracción del cloranfenicol, salvo cuando se agregó sal y fue mínima la mejora.

Finalmente, en el caso del trimetoprim las áreas obtenidas en todas las corridas experimentales fueron aún menores que en el caso del cloranfenicol y ninguna superó 1.5 uA; este analito estuvo cargado positivamente bajo las condiciones del experimento y eso previsiblemente dificultó su extracción de fase acuosa. El ANOVA del modelo factorial completo para área de trimetoprim alcanzó un 65% de explicación luego de la corrección por grados de libertad. No pudo considerarse una demostración formal de la significancia de efectos de factores e interacciones dado que no se cumplieron los supuestos de homocedasticidad y normalidad sin importar la transformación evaluada. De todas maneras dicho análisis completo (o el depurado hasta un orden 2) no sugirió que hubiera efectos significativos de algún factor o interacción. El ANOVA, sus residuales, la recta de probabilidad normal de efectos y el diagrama de Pareto se presentan en el anexo G. Dos corridas tuvieron las mayores áreas y en ambas se fijó velocidad de 750 rpm y tiempo de 120 min, pero en una se fijó 20%ACN y 15%NaCl mientras que la otra 0% de ambos.

Globalmente se puede concluir que el área total tras la desorción líquida aumenta incrementando el tiempo (120 min), la sal (%15 NaCl) y la velocidad de agitación (750 rpm). La recuperación de sulfamidas a pH 4.5 es favorecida por la adición de sal, el tiempo y la velocidad de agitación; las moléculas de estos compuestos se encuentran bajo estas condiciones en forma neutra. El %ACN favorece la recuperación de sulfametoxazol pero no de sulfatiazol. En el caso del cloranfenicol, el antibiótico más hidrofóbico y no ionizable, solo la adición de sal fue favorable aunque con mínimo incremento de áreas. Finalmente, en el caso del trimetoprim la carga positiva que porta a pH 4.5 dificulta su recuperación y aún modificando los niveles de diferentes factores no hubo mejoría apreciable en sus áreas tras la desorción líquida.

Método del ascenso más pronunciado

Se intentó mejorar las condiciones experimentales de extracción de antibióticos totales mediante el método del ascenso más pronunciado. Se utilizó como punto de partida un modelo de primer orden obtenido de la depuración del modelo completo de 16 factores y se emplearon variables codificadas, este modelo se presenta en la ecuación 6. Las ecuaciones de 2 a la 5 presentan las relaciones para convertir las variables de escala natural (ξ) a codificada (x) considerando el punto central del diseño 2^4 .

$$y = 8.721 + 0.026x_1 + 1.286x_2 + 2.032x_3 + 0.714x_4 \dots \text{Ec. 6}$$

La explicación del modelo anterior fue de aproximadamente 70%, algo justificable dado que, como se había comentado antes, hubo interacciones significativas entre los factores. La prueba de ajuste a este modelo no reveló curvatura significativa por términos cuadráticos puros ($x_1^2, x_2^2, x_3^2, x_4^2$) con $\alpha=0.05$, por lo que no fue justificable descartar el modelo de primer orden e intentar ajustar uno de segundo orden corriendo un diseño factorial central compuesto 2^4 con puntos estrellas. La variable con mayor influencia fue el %NaCl y, por ello, se decidió que el tamaño del incremento de esta variable (tamaño del “paso”) para avanzar en la trayectoria de ascenso más pronunciado fuera de $\Delta\xi_3=1.5\%$ (en unidades codificadas $\Delta x_3=0.026$); considerando los coeficientes β de la ecuación anterior esto se tradujo en incremento de tiempo $\Delta\xi_1=1.18$ min ($\Delta x_1=0.026$), velocidad $\Delta\xi_2=30$ rpm ($\Delta x_2=0.12$) y %ACN $\Delta\xi_4=0.62\%$ ($\Delta x_4=0.0622$). El punto de partida fue el punto central del diseño ($\xi_1=75$ min, $\Delta\xi_2= 500$ rpm, $\xi_3 =7.5\%$ NaCl y $\xi_4=10\%$ ACN). Los cambios en la respuesta obtenidos por este método se resumen en la tabla 9.

Tabla 9. Resultados del método del ascenso más pronunciado.

	Tiempo (min)	Velocidad (rpm)	%NaCl	%ACN	STZ (uA)	TMP (uA)	SMX (uA)	CRF (uA)	Total (uA)
	$\xi_1(x_1)$	$\xi_2(x_2)$	$\xi_3(x_3)$	$\xi_4(x_4)$					
Cambio(Δ)	1.18	30.05	1.5	0.62					
Origen	75	500	7.5	10	1.35	0.2	4.6	1.06	7.21
Origen+ Δ	76	530	9	10.6	5.15	0.31	3.7	1.24	10.4
Origen+2 Δ	77	560	10.5	11.2	3.58	0.15	3.22	0.81	7.76
Origen+3 Δ	79	590	12	11.9	0.92	<0.1	2.91	0.61	4.44
Origen+4 Δ	80	620	13.5	12.5	0.89	<0.1	4.13	1.11	6.13
Origen+5 Δ	81	650	15	13.1	1.06	<0.2	3.25	0.82	5.13
Origen+6 Δ	82	680	16.5	13.7	0.95	0.15	4.62	1.12	6.84
Origen+7 Δ	83	710	18	14.4	0.95	0.13	5.24	0.82	7.14
Origen+8 Δ	84	740	19.5	15.0	0.97	0.14	6.093	1.44	8.503

En la tabla anterior puede constatarse que el área total de antibióticos se incrementa hasta 10 uA con 9% NaCl, 76 min y 530 rpm; luego disminuye un poco y después nuevamente tiende a incrementarse a partir de 15%NaCl. Es claro que estos cambios son controlados por las áreas de los 2 analitos que más se extraen (sulfatiazol y sulfametoxazol). Cuando se incrementa la fuerza iónica por arriba de 9% NaCl deja de favorecerse la extracción de sulfatiazol (más polar que sulfametoxazol), pero conforme continúa incrementándose la fuerza iónica el área total se eleva por causa del sulfametoxazol que experimenta efecto salino y tiende a abandonar el seno de la disolución por ser más hidrofóbico. Debe notarse que si se quiere extraer sulfatiazol en mayor cantidad, hay que incrementar el tiempo de extracción hasta 120 min para compensar que la fuerza iónica de la solución ralentiza su difusión hacia el material (por interacciones con la atmósfera iónica del disolvente); esto ya lo había sugerido el diseño factorial 2^4 completo. El cloranfenicol también tiende a presentar algún efecto salino que favorece su extracción aunque muy pequeño, pero no fue evidente dicho efecto en el caso de trimetoprim.

Por otro lado, se repitió el experimento del ascenso más pronunciado pero sin incluir el ACN para verificar si su efecto era marcado sobre las áreas y para evitar diluir la muestra. Estos resultados se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Resultados del método del ascenso más pronunciado sin adición de acetonitrilo.

	Tiempo (min)	Velocidad (rpm)	%NaCl	%ACN	STZ (uA)	TMP (uA)	SMX (uA)	CRF (uA)	Total (uA)
	$\xi_1(x_1)$	$\xi_2(x_2)$	$\xi_3(x_3)$	$\xi_4(x_4)$					
Cambio(Δ)	1.18	30.05	1.5	0					
Origen	75	500	7.5	0	2.98	<0.1	2.67	0.34	5.99
Origen+ Δ	76	530	9	0	5.3093	0.2	1.76	0.29	7.5593
Origen+2 Δ	77	560	10.5	0	2.55	<0.1	1.97	0.3	4.82
Origen+3 Δ	79	590	12	0	2.67	<0.1	2.95	0.35	5.97
Origen+4 Δ	80	620	13.5	0	1.79	<0.1	3.0471	0.17	5.0071
Origen+5 Δ	81	650	15	0	1.68	<0.1	2.98	0.27	4.93
Origen+6 Δ	82	680	16.5	0	1.75	0.15	4.33	0.4	6.63
Origen+7 Δ	83	710	18	0	1.96	<0.1	4.61	0.52	7.09
Origen+8 Δ	84	740	19.5	0	2.05	0.16	4.89	0.56	7.66

Como se puede apreciar en la tabla anterior, nuevamente se observó que el efecto salino arriba de 9%NaCl mejoró la respuesta para el sulfametoxazol y que tendió a empeorar la respuesta para el sulfatiazol. No obstante, debe notarse que al remover el acetonitrilo la respuesta disminuyó ligeramente para el SMX, algo predecible dado que el diseño factorial 2^4 había sugerido que este disolvente favorecía su extracción; sin embargo, la ausencia de acetonitrilo tendió a favorecer la extracción de STZ como

el diseño 2^4 había predicho por ausencia de la interacción negativa entre tiempo*ACN. Entonces resultó evidente que si se remueve ACN inicialmente disminuirá la respuesta para SMX, pero esto se compensará por el incremento del efecto salino y además no se desfavorecerá al STZ con el incremento de tiempo. No obstante, no se continuó la optimización ya que las respuestas fueron relativamente bajas por las limitaciones de la afinidad del material para con los analitos y por consideraciones prácticas del tiempo de extracción y %NaCl. Además, no se presentó curvatura significativa de segundo orden que sugiriera la proximidad a un máximo, un mínimo o un punto silla. La superficie de respuesta fue semejante a un plano con alguna inclinación, ésta producto de las interacciones con el tiempo más que por efectos cuadráticos (x_1^2 , x_2^2 , x_3^2 , x_4^2). La figura 53 muestra una aproximación de la superficie graficada contra las variables de mayor influencia.

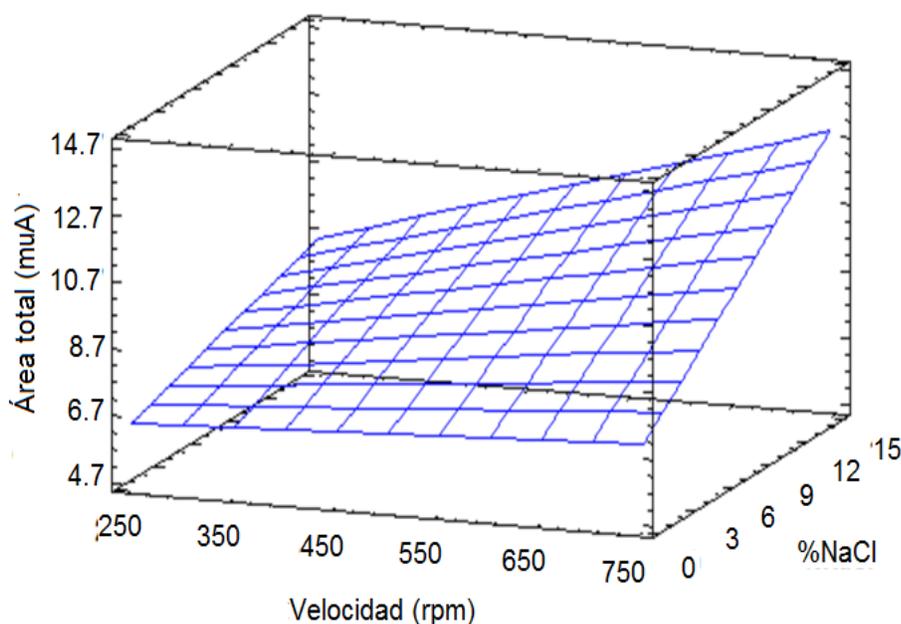


Figura 53. Superficie de respuesta graficada para los factores velocidad y %NaCl de un diseño factorial 2^4 .

Efecto de la estructura química

Finalmente, se realizó un último experimento en el cual se examinó el desempeño de todos los materiales evaluados bajo las condiciones de extracción sugeridas por el *screening*. En la figura 54 se corroboró que PDMS-CNPrTEOS y el material con la mayor proporción CNPrTEOS/TEFS (recubrimiento A) tendieron a tener mejor desempeño nuevamente, especialmente en lo que respecta a retener sulfatiazol y sulfametoxazol en parte por tener más grupos ciano que los otros recubrimientos.

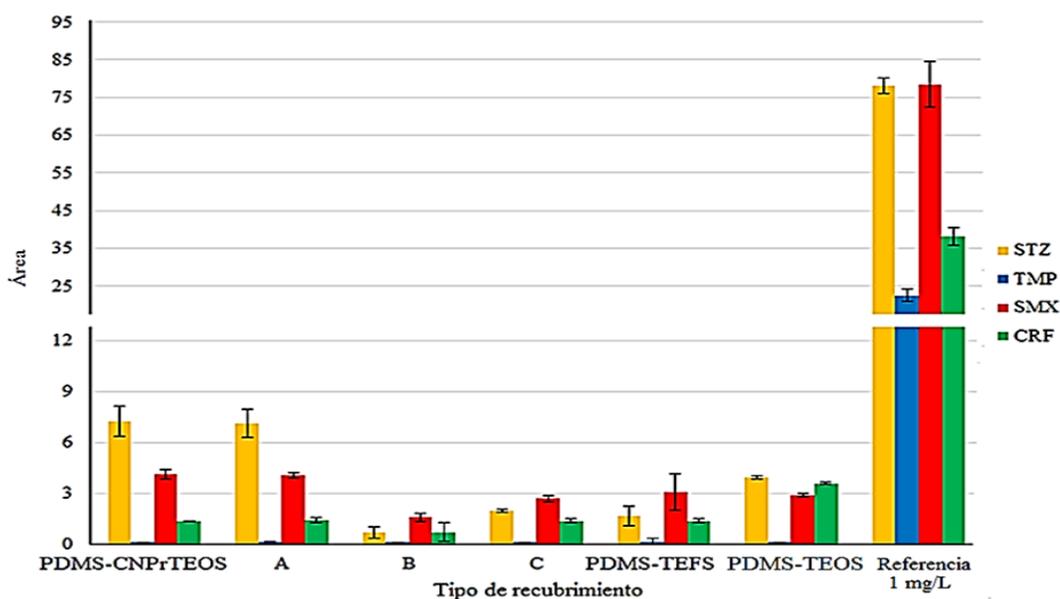


Figura 54. Extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{ow} < 1.2$ de medio acuoso a un nivel de concentración de 1 mg/L. Extracción: pH 4.5, 2h, 15% NaCl, 750 rpm. Desorción: 40% MeOH-60% HCOOH pH 4.5.

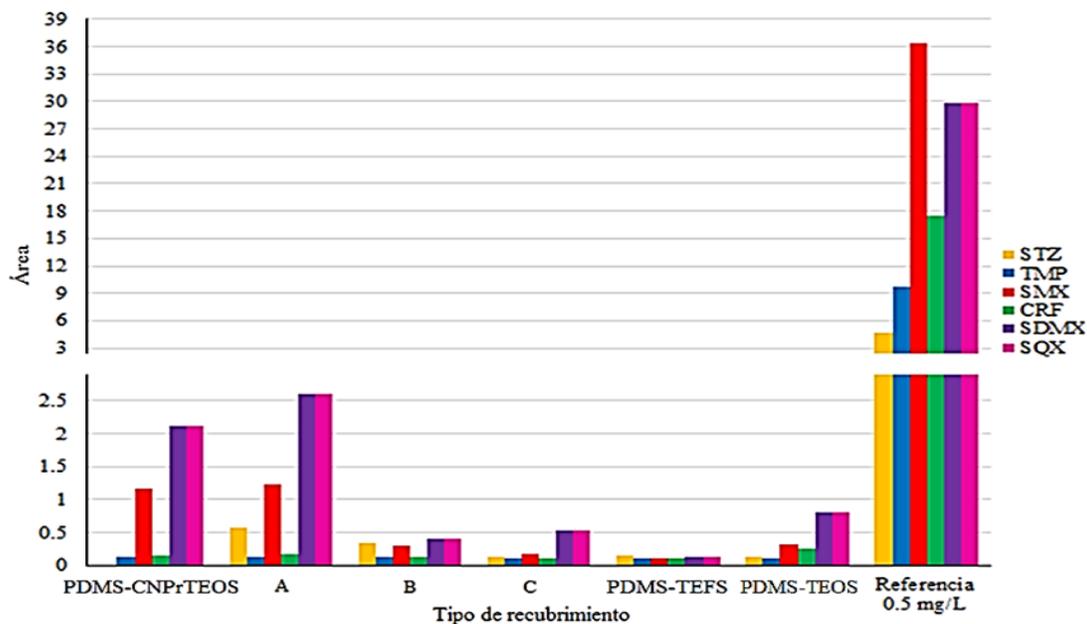


Figura 55. Extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{ow} < 2$ de medio acuoso a un nivel de concentración de 0.5 mg/L. Extracción: pH 4.5, 2h, 9% NaCl, 750 rpm. Desorción: 40% MeOH-60% HCOOH pH 4.5.

En general, se puede concluir que la preconcentración de analitos a 0.50 mg/L fue muy baja (incluso más que a 1 mg/L), aunque aún fueron detectables las sustancias por HPLC-DAD. En este contexto, fue destacable que los resultados aportan evidencia de que la adición de grupos ciano a PDMS aumentó de alguna manera la afinidad del material por analitos relativamente polares, las áreas de antibióticos registradas para los recubrimientos PDMS-CNPTEOS y A superaron aquellas para PDMS-TEOS. Finalmente, también fue apreciable que las sulfamidas se recuperaron más fácilmente que otros analitos como trimetoprim (cargado positivamente) o cloranfenicol, especialmente si son menos polares que sulfatiazol y sulfametoxazol.

Extracción de sulfamidas, trimetoprim y cloranfenicol de medio orgánico

Se realizaron extracciones de sulfatiazol (STZ), trimetoprim (TMP), sulfametoxazol (SMX) y cloranfenicol (CRF) en fase orgánica (isooctano) fortificada con 1 mg/L de cada antibiótico, utilizando materiales a base de PDMS pero con diferente contenido de fenilo y ciano. La desorción se realizó con un 40% de MeOH para evitar dilución posterior. El desempeño de los 6 materiales se muestra en la figura 56

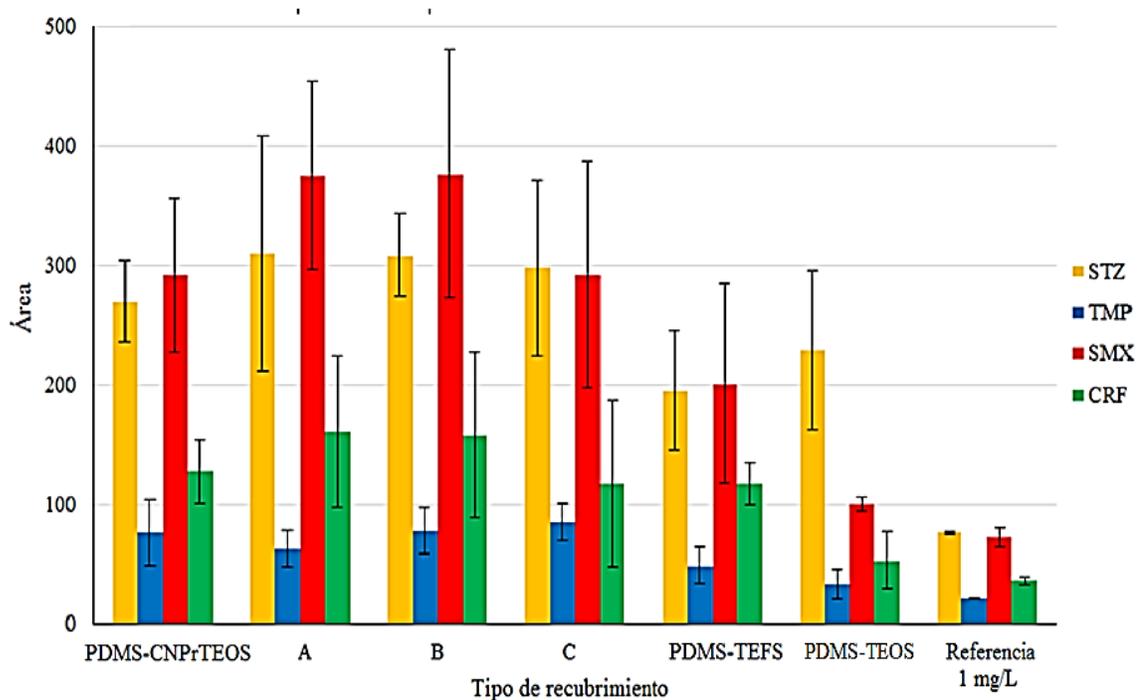


Figura 56. Extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{ow} < 1.2$ desde isooctano a un nivel de concentración de 1 mg/L. Desorción: 40% MeOH, 60% HCOOH pH 4.5.

La figura anterior reveló que con respecto a 1 mg/L hubo preconcentración utilizando cualquiera de los materiales (tabla 11), aunque también algo de variabilidad en las áreas debida al medio orgánico y a diferencias estructurales entre los materiales.

Tabla 11. Factores de preconcentración promedio (n=3) respecto a 1 mg/L obtenidos por SBSE en medio orgánico para antibióticos con $0 < \log_{10}K_{OW} < 1.2$.

Tipo de material	STZ	TMP	SMX	CRF
PDMS-CNPrTEOS	3.5	3.5	4.0	3.5
A	3.6	2.8	5.2	4.5
B	4.0	4.6	5.2	4.4
C	3.5	3.8	4.0	3.0
PDMS-TEFS	2.6	2.3	2.8	3.0
PDMS-TEOS	3.0	1.2	1.4	1.5
Valor máximo	4.0	4.6	5.2	4.5

La tabla anterior muestra que bajo las condiciones de extracción evaluadas los materiales PDMS-TEFS-CNPrTEOS fueron los que tuvieron mejor desempeño, especialmente la mezcla con mayor proporción CNPrTEOS/TEFS (recubrimiento A) y la mezcla equimolar CNPrTEOS/TEFS (recubrimiento B). Esto sugiere que para retener analitos polares aromáticos como sulfamidas conviene materiales con ambos grupos funcionales, siendo ciano más efectivo que fenilo. Evidentemente el hinchamiento de los materiales también debió contribuir a la difusión de los analitos hacia los materiales, ya que una vez dentro podrían estabilizar sus grupos funcionales polares mediante interacciones con ciano y fenilo; además, su acceso al material debió facilitarse más que en el caso de las tetraciclinas dado que son de menor tamaño. En el caso de la barra recubierta con PDMS-CNPrTEOS, el hinchamiento tendió a ser menor en algunos casos y, por tanto, la difusión de los analitos debió ser menor en comparación con los materiales que se hincharon más, ello podría explicar porque preconcentró ligeramente menos que las barras con recubrimientos A y B con el mismo tiempo de extracción.

Debido a la variabilidad observada en los datos obtenidos para la extracción de estos 4 compuestos en isooctano a un nivel de 1 mg/L, se aplicó un análisis de varianza bifactorial (*two-way* ANOVA) para evaluar si el tipo de material (PDMS-CNPrTEOS, A, B, C, PDMS-TEFS y PDMS-TEOS), el tipo de antibiótico (STZ, TMP, SMX y CRF) y la interacción material-antibiótico tuvieron efectos significativos sobre la variable dependiente transformada (área de pico cromatográfico). Se trabajó con la raíz cuadrada del área de pico ($\sqrt{\text{área}}$) debido al incumplimiento de los supuestos de normalidad e igualdad de varianzas cuando se aplicó el ANOVA a la variable original. La tabla resumen de ANOVA para esta prueba y sus gráficos de residuales asociados se presentan en el anexo H. Para la raíz cuadrada del área hubo diferencias debidas a los materiales ($F=25.38$, $P<0.0001$), los antibióticos ($F=157.20$, $P<0.0001$) y a combinaciones de material-antibiótico ($F=2.37$, $P=0.0061$) con $\alpha=0.05$.

El análisis *pos hoc* de diferencia mínima significativa LSD ($\alpha=0.05$) aplicado a las medias de los materiales reveló que, sin importar el antibiótico, es de destacar que

$\sqrt{\text{área}}$ resultó significativamente menor con PDMS-TEOS y PDMS-TEFS que con los demás materiales. Esto puede observarse gráficamente en la figura 57, pero adicionalmente el anexo H incluye las medias relacionadas con esta imagen, sus intervalos y los grupos homogéneos que pueden formarse con las mismas por no presentar diferencia estadística.

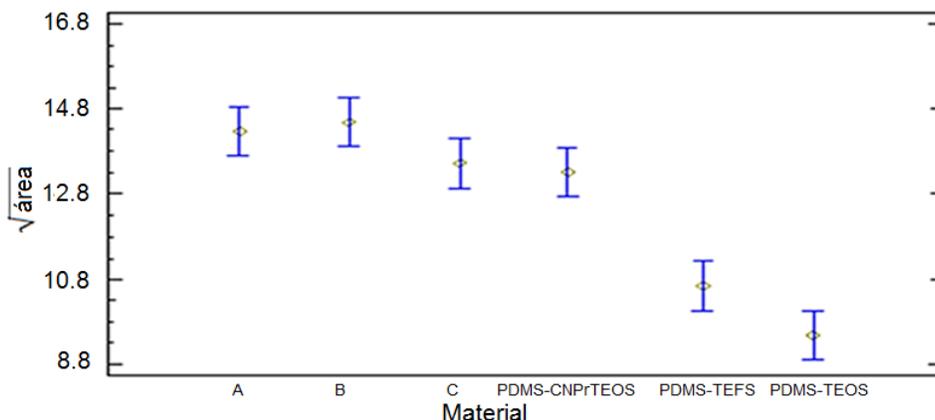


Figura 57. Comparación del área (transformada con raíz cuadrada, $\sqrt{\text{área}}$) entre materiales con intervalos de confianza del 95% para las medias con la prueba LSD.

Por otro lado, el análisis *pos hoc* de diferencia mínima significativa LSD ($\alpha=0.05$) aplicado a las medias de los antibióticos reveló que, sin importar el material, las medias de STZ y SMX resultaron significativamente mayores con respecto a los otros dos antibióticos. Esto puede observarse gráficamente en la figura 58, y en el anexo H se incluyen las medias relacionadas con esta imagen, sus intervalos y los grupos homogéneos que pueden formarse con los promedios de los antibióticos que no difirieron significativamente.

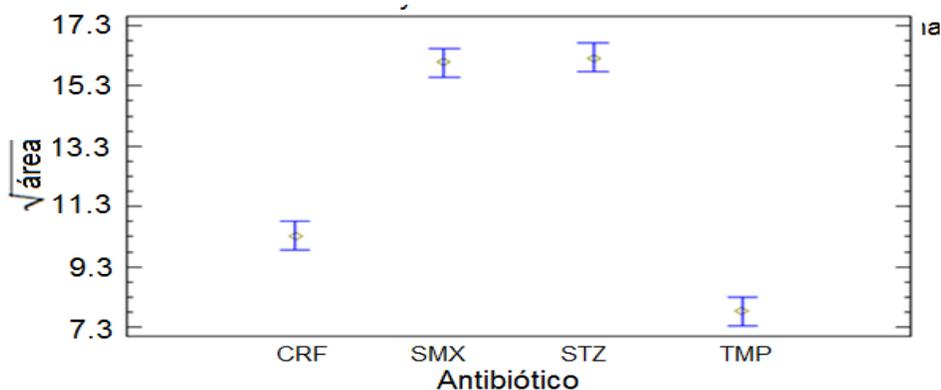


Figura 58. Comparación del área (transformada con raíz cuadrada, $\sqrt{\text{área}}$) entre antibióticos con intervalos de confianza del 95% para las medias con la prueba LSD.

Finalmente, el análisis *pos hoc* de diferencia mínima significativa LSD ($\alpha=0.05$) en la comparación de los antibióticos dentro de cada material mostró que: 1) en los materiales A (CNPrTEOS/TEFS>1), B (CNPrTEOS/TEFS=1) y PDMS-CNPrTEOS el área resultó significativamente mayor para SMX y STZ con respecto a los otros dos antibióticos, no difirió entre SMX y STZ, y se guardó la relación (SMX-STZ)>CRF>TMP; 2) Con C (CNPrTEOS/TEFS<1) y PDMS-TEFS, resultó mayor para SMX y STZ con respecto a los otros dos antibióticos, no difirió entre SMX y STZ ni entre CRF y TMP, y se guardó la relación (SMX-STZ)>(CRF-TMP); y 3) Con PDMS-TEOS, resultó significativamente mayor para STZ respecto a los otros tres antibióticos, para SMX fue mayor en comparación a CRF y TMP, y no difirió entre CRF y TMP. La relación que se obtuvo fue STZ>SMX>(CRF-TMP). Los resultados pueden observarse gráficamente en la figura 59, pero en el anexo H pueden consultarse las medias asociadas a la imagen, sus intervalos y los grupos homogéneos que pueden formarse con los promedios de las combinaciones material-antibiótico que no difirieron significativamente.

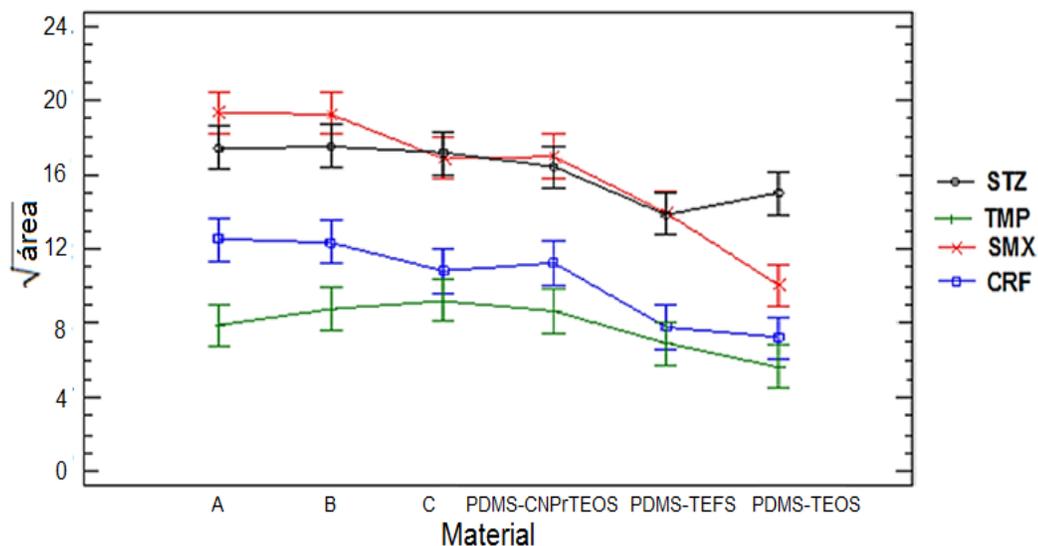


Figura 59. Comparación del área (transformada con raíz cuadrada) entre combinaciones material-antibiótico con intervalos de confianza (95%) para medias con LSD.

El experimento anterior se repitió pero con modificaciones, la primera de ellas fue que se fijó un nivel más bajo de concentración de antibióticos en isooctano (0.50 mg/L) y la segunda fue que se agregaron dos antibióticos menos polares ($1.2 < \log_{10} K_{ow} < 2.0$): sulfadimetoxina y sulfaquinaxolina. Los resultados se pueden apreciar gráficamente en la figura 60.

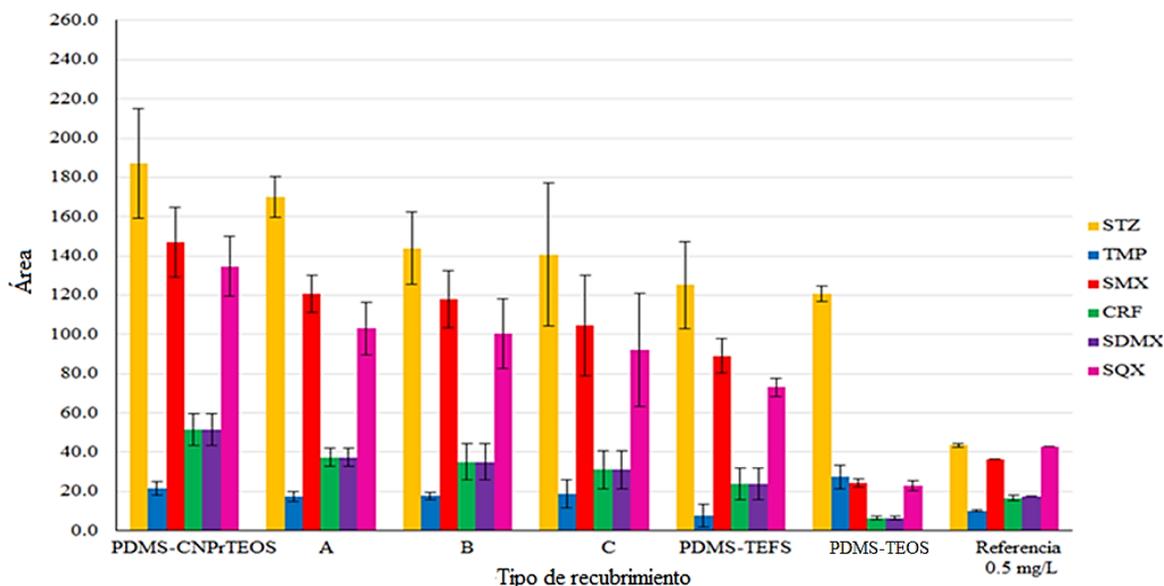


Figura 60. Extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{OW} < 2.0$ de isooctano a un nivel de concentración de 0.50 mg/L. Desorción: 40% MeOH, 60% HCOOH pH 4.5.

En la tabla 12 se presentan los factores de preconcentración registrados para la extracción realizada a un nivel de concentración de 0.50 mg/L.

Tabla 12. Factores de preconcentración respecto a 0.50 mg/L obtenidos por SBSE en medio orgánico para antibióticos con $0 < \log_{10} K_{OW} < 2.0$.

	STZ	TMP	SMX	CRF	SDMX	SQX
PDMS-CNP/TEOS	4.3	2.1	4.1	3.1	3.0	3.2
A	3.9	1.7	3.3	2.3	2.1	2.4
B	3.3	1.8	3.2	2.1	2.0	2.4
C	3.2	1.9	2.9	1.9	1.8	2.2
PDMS-TEFS	2.9	0.8	2.4	1.4	1.4	1.7
PDMS-TEOS	2.6	2.7	0.7	0.4	0.4	0.5
Máximo	4.3	2.7	4.1	3.1	3.0	3.2

Un análisis estadístico formal también se realizó para este experimento nuevamente utilizando un ANOVA bifactorial (*two-way ANOVA*) sobre la transformación de la respuesta raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) para cumplir con los supuestos del análisis. La tabla resumen del ANOVA y sus gráficos de residuales asociados se presentan en el anexo I. El análisis reveló que $\sqrt{\text{área}}$ difirió significativamente entre materiales ($F=80.15$, $P<0.0001$), antibióticos ($F=326.07$, $P<0.0001$) y entre combinaciones de material-antibiótico ($F=7.43$, $P<0.0001$).

El análisis *pos hoc* de diferencia mínima significativa LSD ($\alpha=0.05$) aplicado a las medias de los materiales reveló que, sin importar el tipo de antibiótico, la $\sqrt{\text{área}}$ resultó significativamente menor con PDMS-TEOS y PDMS-TEFS respecto a los demás materiales, pero también mayor con PDMS-CNPTEOS en comparación con los otros cinco materiales. Esto puede observarse gráficamente en la figura 61, además el anexo I incluye los datos estadísticos más relevantes de este análisis así como los grupos homogéneos que pueden formarse con las medias de los materiales que no difirieron significativamente.

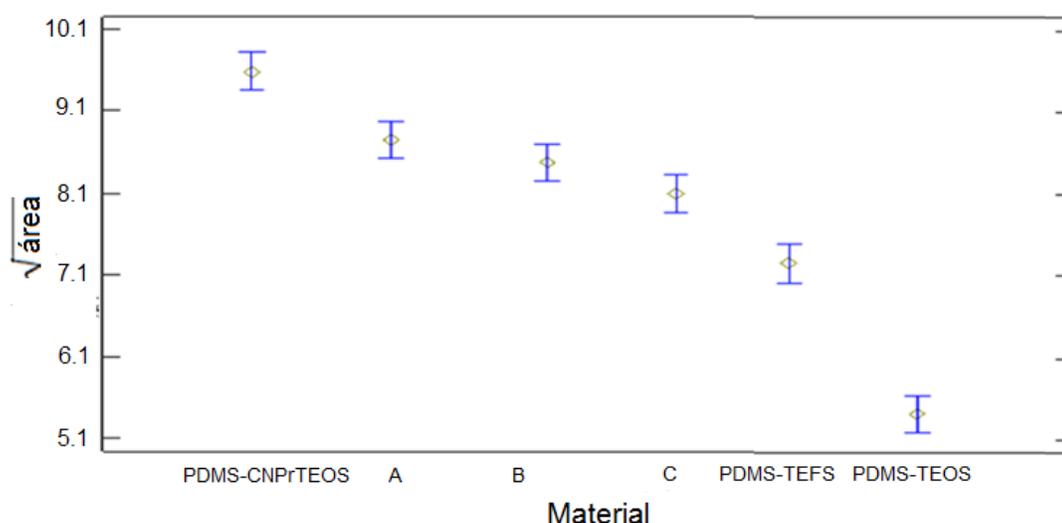


Figura 61. Comparación entre medias raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) de los materiales con la prueba LSD ($\alpha=0.05$) para antibióticos ($0 < \log_{10}K_{OW} < 2$) extraídos de medio orgánico.

En este análisis resultó evidente que el incremento del contenido de ciano en los materiales se tradujo en mayor extracción de antibióticos, esta tendencia fue incluso más evidente que a un nivel de concentración de 1.0 mg/L. En el caso particular del material PDMS-CNPTEOS (0% fenilo), probablemente por su menor hinchamiento (señal potencial de mayor entrecruzamiento) tuviera grupos ciano menos accesibles de manera rápida para los analitos; de tal forma que si la concentración en solución era de 1 mg/L, entonces se ocuparon pronto esas zonas de interacción más accesibles y se tardó en preconcentrar en la misma magnitud que otros materiales más hinchados, pero al disminuir la concentración de analitos era menos probable que se saturaran esos sitios de interacción con ciano y entonces se reveló que este material tenía más grupos polares afines a los analitos sin que se enmascarara esto por efecto de la difusión facilitada por hinchamiento. El incremento en la retención por difusión facilitada por hinchamiento con disolvente ha sido reportado por Ochiai *et al.*¹¹⁶

En lo que respecta al tipo de antibiótico, el análisis *pos hoc* LSD ($\alpha=0.05$) reveló que, sin importar el material, todas las medias para antibióticos difirieron significativamente y que la relación de magnitudes de las mismas fue la siguiente: $TMP < CRF < SQX < SDMX < SMX < STZ$. Esto puede observarse gráficamente en la figura 62 y alternativamente el anexo I incluye los datos estadísticos más relevantes en este análisis y los grupos homogéneos que pueden formarse con las medias de los antibióticos.

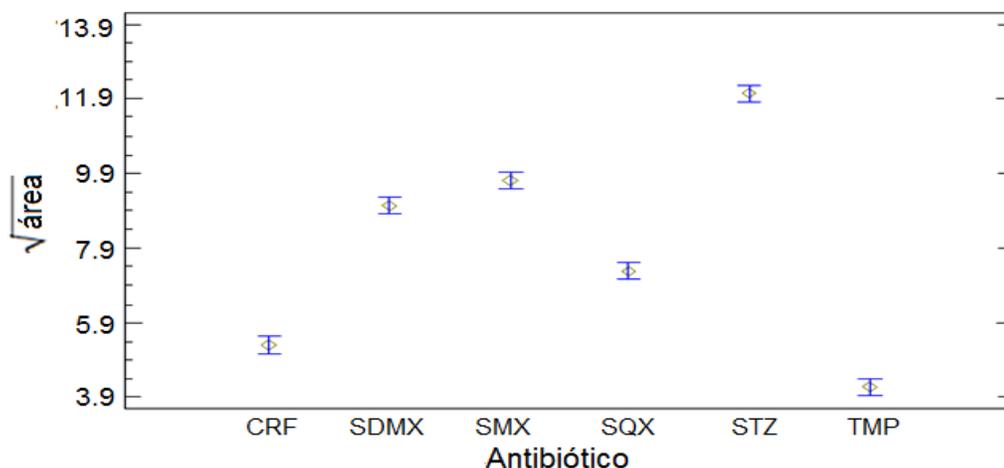


Figura 62. Comparación entre medias raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) de los antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$) con la prueba LSD ($\alpha=0.05$) para la extracción en medio orgánico.

Finalmente, en la comparación *pos hoc* LSD ($\alpha=0.05$) material-antibiótico se encontró que en los materiales A ($\text{CNPrTEOS/TEFS} > 1$), B ($\text{CNPrTEOS/TEFS} = 1$), C ($\text{CNPrTEOS/TEFS} < 1$), PDMS-CNPrTEOS y PDMS-TEFS ocurrió que el área de STZ resultó significativamente mayor comparada con los otros cinco antibióticos; SMX y SDMX no difirieron, y se dio la relación $STZ > (SMX - SDMX) > SQX > CRF > TMP$. Por otro lado, en PDMS-TEOS resultó significativamente mayor el área para STZ con respecto a los otros cinco antibióticos, no hubo diferencia entre TMP, SMX, SDMX y SQX, y se dio la siguiente relación $STZ > (TMP - SMX - SDMX - SQX) > CRF$. Las medias y sus intervalos de confianza al 95% pueden observarse gráficamente en la figura 63, y en el anexo I se incluyen los datos estadísticos más relevantes de este análisis así como los grupos homogéneos que pueden formarse con las medias las combinaciones material-antibiótico.

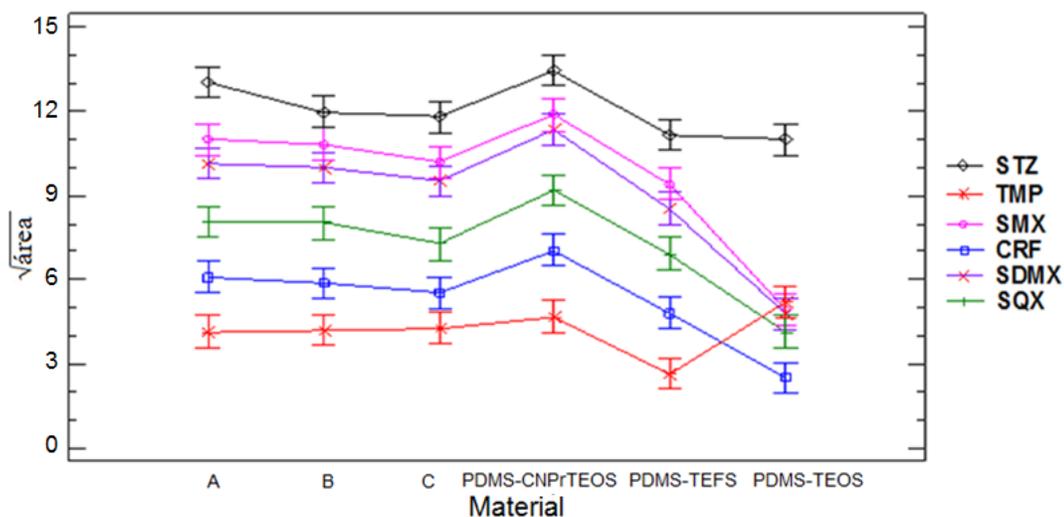


Figura 63. Comparación entre medias raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) de las combinaciones material-antibiótico ($0 < \log_{10}K_{OW} < 2$) con LSD ($\alpha=0.05$) para la extracción en medio orgánico.

En resumen, entre los recubrimientos desarrollados a partir de PDMS modificado con TEFS y CNPrTEOS, el material A (38%*m/m* CNPrTEOS y 18%*m/m* TEFS) fue el mejor para la extracción en medio acuoso de antibióticos con respecto a B, C, PDMS-TEFS y PDMS-TEOS que tienen menos grupos ciano. Sin embargo, en promedio el material A apenas fue mejor que PDMS-CNPrTEOS; lo que revela que si el contenido de CNPrTEOS es menor a 38%, entonces la extracción de analitos polares con $\log_{10}K_{OW} < 2$ decrecerá porque el grupo fenilo por si solo ayuda muy poco en la retención. Si se incrementan los grupos fenilo en el material, evidentemente la retención de analitos con estructuras menos polares y anillos aromáticos resultará favorecida.

La sorción de antibióticos con PDMS, acorde a la literatura¹¹⁸, suele llevarse a cabo por un mecanismo predominantemente adsorptivo y menos absorptivo. En el presente estudio la base estructural hidrofóbica de PDMS contribuyó a limitar la retención de compuestos polares en medio acuoso a pesar de la introducción de grupos funcionales como ciano y fenilo. La solubilidad de las moléculas de antibióticos en los polímeros híbridos debió resultar importante dada la posible ausencia de poros en los mismos; por ello, debieron haber grupos polares en los antibióticos estudiados no suficientemente estabilizados o en conflicto con la matriz basada en PDMS, impidiendo que el equilibrio se desplace hacia la retención en los polímeros híbridos desarrollados.

En el caso de las tetraciclina en medio acuoso, tanto su tamaño como su gran polaridad debieron influir en contra de su absorción eficiente utilizando híbridos de PDMS. El tamaño molecular y la forma de los antibióticos son factores que suelen

afectar su retención dado que la difusión en un polímero se ralentiza cuando las moléculas son grandes,¹¹⁹ pero en este estudio la solubilidad tuvo un efecto aún más determinante. Vaes *et al.*¹¹⁹ han reportado que moléculas poco polares de gran tamaño como HAPs son retenidas por PDMS por el mecanismo de retención adsorptivo. Burgos⁹¹ también pudo retener HAPS con su polímero PDMS-CNPrTEOS, nuevamente las interacciones hidrofóbicas con el polímero favorecieron la retención de estos compuestos pese a su tamaño.

En lo relativo a la desorción, se ha reportado que el grosor de un recubrimiento es una limitante para que ocurra una efectiva transferencia de masa, reducirlo usualmente incrementa la eficiencia de la desorción; sin embargo, debe vigilarse no perder eficiencia de extracción dado que ésta aumenta con mayor volumen de fase sorbente.⁹⁴

En medio orgánico la variabilidad solo permitió reconocer que, de entre los materiales con ciano y fenilo, A y B fueron los que más frecuentemente tendieron a extraer mayor cantidad de analitos con $0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$ en comparación con PDMS-TEFS y PDMS-TEOS; en el caso del material PDMS-CNPrTEOS hubo diferencia en su desempeño respecto al material A cuando se realizó la extracción con diferentes niveles de fortificación del medio orgánico con antibióticos. Debe notarse que cualquier diferencia en el grado de entrecruzamiento de un polímero afecta el hinchamiento de los materiales en medio orgánico, se asocia con grupos Si-OH activos e influye en la velocidad con la que los analitos penetran al material para interactuar con los grupos ciano no tan accesibles. Considerando lo anterior, se puede decir que un mayor contenido de ciano otorga una ventaja al material en lo relativo a retención de compuestos polares en medio orgánico, pero otros factores pueden influir e incrementar la retención en materiales con menos contenido de ciano. Durante las extracciones se observó que los materiales se fracturaron e hincharon menos cuando el contenido de CNPrTEOS fue superior a 20%*m/m* (este fue el caso de los recubrimientos PDMS-CNPrTEOS, A y B), esta fue otra razón para incorporar el entrecruzante.

CONCLUSIONES

Mediante la síntesis sol-gel catalizada por ácido (TFA 95%v/v) se elaboraron a temperatura ambiente (20-25°C) tres materiales homogéneos y transparentes a partir de PDMS, TEFS y CNPrTEOS, esto fijando la proporción PDMS:TEFS:CNPrTEOS en los valores 1:1:2 (material A), 1:1.5:1.5 (material B) y 1:2:1 (material C).

El análisis infrarrojo por DRIFT de la superficie de los recubrimientos sintetizados demostró la presencia de grupos funcionales polares como ciano ($-C\equiv N$) e hidroxilo ($-OH$), así como de grupos no polares como fenilo ($-Ph$) y metilo ($-CH_3$).

La fuerza mecánica aplicada en las pruebas de estabilidad ante disolventes fue capaz de inducir pérdidas de masa en los recubrimientos, pero si fueron significativas o no dependió más del tipo de disolvente en el que estuvieron sumergidos. En tiempos comparables y con el mismo disolvente el ultrasonido produjo mayores pérdidas de masa con respecto a vórtex.

Los disolventes más polares (agua, metanol y acetonitrilo) tras 30 min no resultaron capaces de promover pérdidas de masa significativas en los recubrimientos bajo agitación vórtex; con ultrasonido solo metanol y agua produjeron pérdidas de masa despreciables. Los disolventes medianamente polares como acetato de etilo y acetona prácticamente removieron los recubrimientos con agitación vórtex (>15 min) o ultrasonido (>30min). El disolvente apolar isoctano indujo alteraciones en las superficies de los recubrimientos, pero con mínimas pérdidas de masa (<7 m/m%).

Los recubrimientos desarrollados resultaron estables ante disoluciones acuosas ácidas (pH 1, 3 y 6) y básicas (pH 9 y 12) por 48 horas, éstos perdieron menos de 0.5% m/m de su masa original.

La introducción de CNPrTEOS, TEFS y la presencia de grupos hidroxilo ($-OH$) en los materiales sintetizados contribuyó a disminuir el ángulo de contacto del agua en sus superficies y con ello su hidrofobicidad con respecto a PDMS.

El análisis termogravimétrico demostró que los recubrimientos desarrollados fueron estables hasta 230°C.

La extracción de tetraciclinas en medio acuoso utilizando los materiales PDMS-CNPrTEOS, A y B mejoró mínimamente con respecto a PDMS-TEFS y PDMS-TEOS, las eficiencias de extracción fueron bajas (<20%) aunque se modificó el pH (rango: 2-7), la proporción de modificadores orgánicos (10-30% acetona, 2-propanol, acetonitrilo o etanol) en disolución y la fuerza iónica. No hubo pre-concentración en los extractos tras la desorción con mezclas MeOH- $H_2C_2O_4$ (20 mM).

Las mejores condiciones para desorber la mayoría de los analitos con $0 < \log_{10} K_{OW} < 1.2$ fueron 40 min de ultrasonido y 100% metanol, asociándose a porcentajes de desorción entre 10-35% y a menor variabilidad respecto a acetonitrilo.

La extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{ow} < 2$ en disolución acuosa (pH 4.5) utilizando los materiales PDMS-CNPTEOS y A fue mejor con respecto a las fases B, PDMS-TEFS y PDMS-TEOS; pero aún se obtuvieron eficiencias de extracción debajo de 30% aunque se modificó el pH (rango: 2-7) o la proporción de modificadores orgánicos (10-30% acetona, 2-propanol, acetonitrilo o etanol) en disolución.

El ANOVA del diseño factorial 2^4 permitió identificar que en medio acuoso la velocidad de agitación, el %NaCl, la interacción tiempo*velocidad y la interacción velocidad*%NaCl son factores que influyen en la extracción de antibióticos con $0 < \log_{10} K_{ow} < 2$. Conviene elevar el tiempo a 120 min, la agitación hasta 750 rpm y la sal hasta 15%*m/v*.

El ANOVA del diseño factorial 2^4 para cada antibiótico reveló que en medio acuoso: 1) adicionar acetonitrilo a la disolución acuosa desfavorece la recuperación de sulfatiazol conforme se incrementa el tiempo de extracción (>30 min), pero favorece la de sulfametoxazol especialmente con 15%NaCl y 750 rpm; 2) para retener sulfatiazol conviene elevar la velocidad hasta 750rpm y la sal hasta 5%*m/v*, pero si se adiciona sal es crítico elevar el tiempo de extracción (>75 min); 3) ningún factor estudiado ayuda a recuperar más trimetoprim; y 4) la recuperación del cloranfenicol mejoró mínimamente adicionando sal.

Aplicando la metodología de optimización del método del ascenso más pronunciado se concluyó que debido a la baja afinidad de los antibióticos con $0 < \log_{10} K_{ow} < 1.2$ presentes en fase acuosa, no se mejoró la recuperación hasta lograr preconcentraciones mayores a 1 variando el tiempo, la velocidad, %NaCl y %ACN.

Los materiales tuvieron la capacidad de extraer tetraciclinas de un medio orgánico, aunque los factores de pre-concentración fueron inferiores a uno.

En la extracción en medio orgánico influyeron el tipo de material, el tipo de antibiótico y la combinación material-antibiótico. Los materiales con ciano extrajeron antibióticos polares del tipo sulfamida, diaminopiridina y cloranfenicol en mayor medida que PDMS-TEOS y PDMS-TEFS. Hubo mayor afinidad por las sulfamidas pero los factores de pre-concentración para todos los antibióticos estuvieron entre 3 y 5.

Durante la extracción en medio orgánico disminuir el contenido de CNPTEOS por debajo de 28%*m/m* redujo la estabilidad mecánica de los materiales y promovió el hinchamiento por el disolvente orgánico.

REFERENCIAS

1. Ramos, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques, *J. Chromatogr. A* **2011**, 1221, 84-98.
2. Neng, N.R.; Silva, A. R. M.; Nogueira, J. M. F. Adsorptive micro-extraction techniques—Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217, 7303–7310.
3. Mitra, S. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. John Wiley & Sons: New Jersey, USA, 2003, 125-131.
4. Kabir, A.; Furton, K.; Kenneth, G.; Malik, A. Innovations in sol-gel microextraction phases for solvent-free sample preparation in analytical chemistry, *Trends Anal. Chem.* **2013**, 45, 197–218.
5. Fan, W.; Mao, X.; He, M.; Chen, B.; Hu, B. Development of novel sol-gel coatings by chemically bonded ionic liquids for stir bar sorptive extraction-application for the determination of NSAIDS in real samples, *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 28, 7261–7273.
6. Yu, C.; Hu, B. Sol-gel polydimethylsiloxane/poly(vinylalcohol)-coated stir bar sorptive extraction of organophosphorus pesticides in honey and their determination by large volume injection GC, *J. Sep. Sci.* **2009**, 32, 147–153.
7. Dagherir, R.; Drogui P. Tetracycline antibiotics in the environment: a review, *Environ. Chem. Lett.* **2013**, 11, 209–227.
8. He, M.; Chen B.; Hu B. Recent developments in stir bar sorptive extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, 406, 2001–2026.
9. Baltussen E.; Sandra P.; David F.; Cramers C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles. *J. Microcolumn.* **1999**, 11(10), 737–747.
10. Arthur, C. L.; Pawlizyn, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fiber. *Anal. Chem.* **1990**, 62, 2145–2148.
11. Seethapathy, S.; Gorecki, T. Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: a review. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 750, 48–62.

12. Prieto, A.; Basauria, O.; Rodilb, R.; Usobiagaa, A.; Fernández, L. A.; Etxebarria, N.; Zuloaga, O. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J. Chromatogr. A.* **2009**, 1217(16), 2642-2666.
13. Florencio Nogueira, J. M. Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly. *Trends Anal. Chem.* **2015**, 71, 214–223.
14. Nogueira, J. M. F. Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: a review on SBSE and related techniques. *Anal. Chim. Acta.* **2012**, 757, 1–10.
15. Liu, W. M.; Wang, H. M.; Guan, Y. F. Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol-gel technology. *J. Chromatogr A.* **2004**, 1045(1–2), 15–22.
16. Liu, W.; Hu Y.; Zhao J.; Xu, Y.; Guan, Y. Determination of organophosphorus pesticides in cucumber and potato by stir bar sorptive extraction. *J Chromatogr A.* **2005**, 1095(1–2), 1–7.
17. Yu, C.H.; Li, X.; Hu, B. Preparation of sol-gel polyethylene glycol-polydimethylsiloxane-poly(vinyl alcohol)-coated sorptive bar for the determination of organic sulfur compounds in water. *J Chromatogr A.* **2008**, 1202(1), 102–106.
18. Yu, C. H.; Hu, B. Sol-gel polydimethylsiloxane/poly(vinylalcohol)-coated stir bar sorptive extraction of organophosphorus pesticides in honey and their determination by large volume injection G.C. *J. Sep. Sci.* **2009**, 32(1), 147–153.
19. Yu C. H.; Hu B. Novel combined stir bar sorptive extraction coupled with ultrasonic assisted extraction for the determination of brominated flame retardants in environmental samples using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A.* **2007**, 1160(1–2), 71–80.
20. Yu C. H.; Yao Z. M.; Hu B. Preparation of polydimethylsiloxane/beta-cyclodextrin/divinylbenzene coated "dumbbell-shaped" stir bar and its application to the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic sulfur heterocycles compounds in lake water and soil by high performance liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 641(1–2), 75–82.
21. Hu, Y.; Zheng, Y.; Zhu, F.; Li G. Sol-gel coated polydimethylsiloxane/ β -cyclodextrin as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction and its application to analysis of estrogens and bisphenol A. *J. Chromatogr. A.* **2007**, 1148(1), 16–22.

22. Duan, J. K.; Li, X.; Yu, C. H.; Hu B. Headspace stir bar sorptive extraction combined with GC-ICP-MS for the speciation of dimethylselenide and dimethyldiselenide in biological samples. *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, 24(3), 297–303.
23. Lan, L.; Hu, B.; Yu, C. pH-resistant titania hybrid organic inorganic coating for stir bar sorptive extraction of drugs of abuse in urine samples followed by high performance liquid chromatography-ultraviolet visible detection. *J. Chromatogr. A.* **2010**, 1217(45), 7003–7009.
24. Ibrahim, W. A. W.; Ismail, W. N. W.; Keyon, A. S. A.; Sanagi, M. M. Preparation and characterization of a new sol–gel hybrid based tetraethoxysilane-polydimethylsiloxane as a stir bar extraction sorbent materials *J. Sol–Gel Sci. Technol.* **2011**, 58, 602–611.
25. Ibrahim, W. A. W.; Keyon, A. S. A.; Prastomo, N.; Matsuda, A. Synthesis and characterization of polydimethylsiloxanecyanopropyltriethoxysilane- derived hybrid coating for stir bar sorptive extraction *J. Sol–Gel Sci. Technol.* **2011**, 59, 128–134.
26. Rahim, M.A.; Ibrahim, W.A.; Ramli, Z., Sangui, M.M. New functionalised sol-gel hybrid sorbent coating for stir bar sorptive extraction of selected non-steroidal anti inflammatory drugs in human urine samples. *Malaysian J. Anal. Sci.*, **2015**, 19 (3): 481 – 492
27. Yu, C.; Hu, B. C18-coated stir bar sorptive extraction combined with high performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry for the analysis of sulfonamides in milk and milk powder. *Talanta* **2012**, 90, 77– 84.
28. Xu, J.; Chen B.; He, M.; Hu, B. Analysis of preservatives with different polarities in beverage samples by dual-phase dual stir bar sorptive extraction combined with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr A.* **2013**; 1278, 8-15.
29. Huang, X. J.; Yuan, D. X. Preparation of stir bars for sorptive extraction based on monolithic material. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1154, (1–2), 152–157.
30. Huang, X.J.; Yuan, D. X.; Huang, B. L. Determination of steroid sex hormones in urine matrix by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and liquid chromatography with diode array detection. *Talanta* **2008**, 75(1), 172–177.
31. Huang, X. J.; Qiu, N. N.; Yuan, D. X. Direct enrichment of phenols in lake and sea water by stir bar sorptive extraction based on poly (vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1194(1), 134–138.

32. Huang, X.; Lin, J.; Yuan, D.; Hu, R. Determination of steroid sex hormones in wastewater by stir bar sorptive extraction based on poly(vinylpyridine-ethylene dimethacrylate) monolithic material and liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216(16), 3508–3511.
33. Huang, X. J.; Qiu N. N.; Yuan D. X.; Huang B. L. A novel stir bar sorptive extraction coating based on monolithic material for apolar, polar organic compounds and heavy metal ions. *Talanta* **2009**, 78(1), 101-106.
34. Huang, X. J.; Qiu N. N.; Yuan D. X.; Lin Q. M. Sensitive determination of strongly polar aromatic amines in water samples by stir bar sorptive extraction based on poly(vinylimidazole-divinylbenzene) monolithic material and liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216(20), 4354–4360.
35. Huang, X.J.; Lin, J. B.; Yuan D. X. A new anionic exchange stir bar sorptive extraction coating based on monolithic material for the extraction of inorganic anion. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217(30), 4898–4903.
36. Huang, X. J.; Qiu N. N.; Yuan, D. X.; Lin, Q. M. Preparation of a mixed stir bar for sorptive extraction based on monolithic material for the extraction of quinolones from wastewater. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217(16), 2667–2673.
37. Luo, Y. B.; Ma, Q. A.; Feng, Y. Q. Stir rod sorptive extraction with monolithic polymer as coating and its application to the analysis of fluoroquinolones in honey sample. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217(22), 3583–3589.
38. Zhu, X. L.; Cai J. B.; Yang, J.; Su, Q. D.; Gao, Y. Films coated with molecular imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos. *J. Chromatogr. A* **2006**, 1131(1–2),37–44
39. Zhu, X. L.; Zhu, Q. S. Molecular imprinted nylon-6 stir bar as a novel extraction technique for enantioseparation of amino acids. *J. Appl. Polym. Sci.* **2008** 109(4), 2665–2670.
40. Hu, Y.; Li, J.; Hu, Y.; Li, G. Development of selective and chemically stable coating for stir bar sorptive extraction by molecularly imprinted technique. *Talanta* **2010**, 82(2),464–470.
41. Xu, Z. G.; Hu, Y. F.; Hu, Y. L.; Li, G. K. Investigation of ractopamine molecularly imprinted stir bar sorptive extraction and its application for trace analysis of β 2-agonists in complex samples. *J. Chromatogr. A* **2010**, 1217(22), 3612–3618.

42. Yang L.; Zhao, X.; Zhou, J. Selective enrichment and determination of nicosulfuron in water and soil by a stir bar based on molecularly imprinted polymer coatings. *Anal Chim Acta* **2010**, 670(1–2), 72–77.
43. Lambert J. P.; Mullett, W. M.; Kwong, E.; Lubda, D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1075(1–2), 43–49.
44. Guan, W.; Wang, Y. J.; Xu, F.; Guan, Y. F. Poly(phthalazine ether sulfone ketone) as novel stationary phase for stir bar sorptive extraction of organochlorine compounds and organophosphorus pesticides. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1177(1), 28–35.
45. Melo, L. R.; Nogueira, A. M.; Lancas, F. M.; Queiroz, M. E. C. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction an liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. *Anal. Chim. Acta* **2009**, 633(1), 57–64.
46. Esmail, B.; Ali, M.; Roghoieh, G. An Electropolymerized Pyrrole-based Coating for Stir Bar Sorptive Extraction of Btex from Water Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chin. J. Chem.* **2012**, 30, 557–562.
47. Neng, N. R.; Pinto, M. L.; Pires J.; Marcos, P. M.; Nogueira, J. M. F. Development, optimisation and application of polyurethane foams as new polymeric phases for stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1171(1–2), 8–14.
48. Portugal, F. C. M.; Pinto, M. L.; Nogueira, J. M. F. Optimization of polyurethane foams for enhanced stir bar sorptive extraction of triazinic herbicides in water matrices. *Talanta* **2008**, 77(2), 765–773.
49. Silva, A. R. M.; Portugal, F. C. M.; Nogueira, J. M. F. Advances in stir bar sorptive extraction for the determination of acidic pharmaceuticals in environmental water matrices Comparison between polyurethane and polydimethylsiloxane polymeric phases. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1209(1–2), 10–16.
50. Wen, J.; Wilkes, G. L. Organic/Inorganic Hybrid Network Materials by the Sol-Gel Approach *Chem. Mater.* **1996**, 8(8), 1667-1681.
51. Walcarius, A.; Collinson, M. M. Analytical Chemistry with Silica Sol-Gels: Traditional Routes to New Materials for Chemical Analysis. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2009**, 2, 121–143.

52. Walzak, M. J.; Davidson, R.; Biesinger M. The Use of XPS, FTIR, SEM/EDX, Contact Angle, and AFM in the Characterization of Coatings. *J. Mater. Eng. Perform.* **1998**, 7(8), 317-323.
53. Bley, O.; Siepmann, J.; Bodmeier, R. Characterization of moisture-protective polymer coatings using differential scanning calorimetry and dynamic vapor sorption. *J Pharm Sci.* **2009**, 98(2), 651-64.
54. Raidmond B. Seymour, Charles E. Carraher, Jr. *Introducción a la Química de los Polímeros*. 2ª reimpresión. Ed. Reverté. 2002.
55. Anderson, C. R.; Rupp, H. S.; Wu, W. H. Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography *J. Chromatogr. A* **2005**, 1075, 23–32.
56. Du, D.; Wu, Y.; Kang, D.; Wang, H.; Huang, C.; Li, Y. Determination of Tetracyclines in water by ethyl acetate–ionic Liquid Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and High-performance Liquid Chromatography. *Anal. Lett.* **2014**, 47, 1783–1795.
57. Wen, W. H.; Huanga, T. C.; Huangb, J. J.; Hsueb, J. H.; Chuangc, H. Y. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216, 2263–2269.
58. Jia, A.; Xiao, Y.; Hu, J.; Asami, M.; Kunikane, S. Simultaneous determination of tetracyclines and their degradation products in environmental waters by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J. of Chromatogr. A*, **2009**, 1216, 4655–4662.
59. Liu, M.; Li, Y.; Lin, S.; Dong, X. Determination of tetracycline residues in lake water by on-line coupling of molecularly imprinted solid phase extraction with high performance liquid chromatography. *Anal. Methods* **2014**, 6, 9446-9452
60. Yang, X.Q.; Yang, C.X.; Yan, X.P. Zeolite imidazolate framework-8 as sorbent for on-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in water and milk samples. *J. Chromatogr A.*, **2013**, 1304, 28– 33.
61. Lindsey, M. E.; Meyer, M.; Thurman, E. M. Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4640-4646.

62. Caminati, G.; Puggelli, M. Europium in phospholipid nanoscaffolds for the photophysical detection of antibiotic traces in solution. In: *Europium: Compounds Production and Applications.*; Ed. Moreno, L. M. Nova Science Publishers: Italia, Florencia **2011**, 204-228.
63. Schwarz, S.; Kehrenberg, C.; Doublet, B.; Cloeckaert, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, **2004**, 28, 519–542.
64. Guidi, L.R.; Silva, L.M.H.; Fenandes, C.; Engeseth, N.J.; Gloria, M.B.A. LC-MS/MS determination of chloramphenicol in food of animal origin in Brazil. *Scientia Chromatographica* **2015**; 7(4):287-295.
65. Aresta, A.; Bianchi, D.; Calvano, C.D.; Zamboni, C.G. Solid phase microextraction—Liquid chromatography (SPME-LC) determination of chloramphenicol in urine and environmental water samples. Solid phase microextraction *J Pharm Biomed Anal.* **2010**, 53(2), 440-444.
66. Wang, T.; Tong, J.; Sun, M.; Chen, L. Fast and selective extraction of chloramphenicol from soil by matrix solid-phase dispersion using molecularly imprinted polymer as dispersant *J Sep Sci.* **2011**, 34 (15), 1886–1892.
67. Babic, S.; Horvat, A.J.M.; Mutavdz'ic' Pavlovic', D.; Kastelan-Macan, M. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends Anal. Chem.* **2007**, 26 (11), 1061.
68. A. Regosz, T. Pelplifiska, P. Kowalski and Z. Thiel Prediction of solubility of sulfonamides in water and organic solvents based on the extended regular solution theory. *Int. J. of Pharmaceut.* **1992**, 88, 437-444.
69. Sanli, S.; Altun, Y.; Sanli, S.; Alsancak, G.; Beltrán, J. K. Solvent Effects on pK_a values of Some Substituted Sulfonamides in Acetonitrile–Water Binary Mixtures by the UV-Spectroscopy Method. *J. Chem. Eng. Data* **2009**, 54 (11), 3014–3021.
70. Hanaee, J.; Jouyban, A.; Dastmalchi, S.; Adibkia, H.; Mirzazadeh, A.; Barzegarjalali, M. Solubility prediction of sulfonamides at various temperatures using a single determination. *DARU* **2005**, 13(2), 37-45.
71. Barana, W.; Adameka, E.; Ziemianska, J.; Sobczak, A. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health. *J. Hazard. Mater.* **2011**, 196, 1–15.

72. Mauger, J.W.; Paruda, A. N.; Gerraughty, R.J. Solubilities of sulfadiazine, sulfisomidine, and sulfadimethoxine in several normal alcohols. *J. Pharmaceu. Sci.* **1972**, 61(1), 94–97.
73. Zhang, C.L.; Wang, F.L.; Wang, Y. Solubilities of Sulfadiazine, Sulfamethazine, Sulfadimethoxine, Sulfamethoxydiazine, Sulfamonomethoxine, Sulfamethoxazole, and Sulfachloropyrazine in Water from (298.15 to 333.15) K. *J. Chem. and Eng. Data* **2007**, 52(5), 1563-1566.
74. O'Neil, M.J. *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. 13a ed.; Ed. Merck; USA: 2001; pp. 1593.
75. Dmitrienko, S.G.; Kochuk, V.; Apyari, V. V.; Tolmacheva, V.; Zolotov, Y. A. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection – A review. *Anal. Chim. Acta* **2014**, 850, 6–25.
76. Balakrishnan, V.K.; Terry, K.A., Toito, J. Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods. *J. Chromatogr A.* **2006**, 1131, 1–10.
77. Huang, X.; Chen, L.; Yuan, D. Development of monolith-based stir bar sorptive extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry method for sensitive determination of ten sulfonamides in pork and chicken samples. *Anal Bioanal Chem* **2013**, 405:6885–6889.
78. Qui, N.; Yuan, D. Simple and sensitive monitoring of sulfonamide veterinary residues in milk by stir bar sorptive extraction based on monolithic material and high performance liquid chromatography analysis. *J. Chromatogr A.*, 2009, 1216, 8240–8245.
79. Xu Z., Song C., Hu Y., Li G. Molecularly imprinted stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography for trace analysis of sulfa drugs in complex samples. *Talanta* **2011**, 85, 97-103.
80. Straub, J.O. An Environmental Risk Assessment for Human-Use Trimethoprim in *European Surface Waters. Antibiotics* **2013**, 2, 115-162.
81. Yin, D.; Liu, M.; Fu, H.; Shu, G.; Zhou, J.; Qing, X.; Wu, W. Solubility of Trimethoprim in Selected Pure Solvents and (Water +Ethanol/2-Propanol) Mixed-Solvent Systems. *J. Chem. Eng. Data* **2016**, 61 (1), 404–411.

82. Forti, A. F.; Multari, M.; Di, S.L.; Scortichini G. Determination of some sulfonamides and trimethoprim in chicken, fish muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Vet Ital.* **2004**, 40(2):11-21.
83. Pereira A.V.; Cass, Q.B. High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in bovine milk using an on-line clean-up column. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **2005**; 826(1-2):139-46.
84. Biswas, A.K.; Rao, G.S.; Kondaiah, N.; Anjaneyulu, A.S.R.; Malik, J.K. Simple Multiresidue Method for Monitoring of Trimethoprim and Sulfonamide Residues in Buffalo Meat by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55 (22), 8845–8850
85. Soto-Chinchilla, J.J.; García-Campaña, A.M.; Gámiz-Gracia, L. Analytical methods for multiresidue determination of sulfonamides and trimethoprim in meat and groundwater samples by CE-MS and CE-MS/MS. *Electrophoresis.* **2007**, 28(22):4164-72.
86. Vargas Mananí, M.C.; Reyes Reyes, F.G.; Rath, S. Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chemistry* **2009**, 117, 545–552.
87. Gutiérrez Tolentino, R.; Noa Pérez, M.; Díaz González, G.; Vega y León, S.; González López, M.; Prado Flores, G. Determination of the presence of 10 antimicrobial residues in mexican pasteurized milk. *INCI* [online] **2005**, 30(5), 291-294.
88. Lindsey, M. E.; Meyer, M.; Thurman, E. M. Analysis of Trace Levels of Sulfonamide and Tetracycline Antimicrobials in Groundwater and Surface Water Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 4640-4646.
89. Fernandez-Torres, R.; Olias Consentino, M.; Bello López, M.A.; Callejón Mochón, M. Simultaneous determination of 11 antibiotics and their main metabolites from four different groups by reversed-phase high-performance liquid chromatography–diode array–fluorescence (HPLC–DAD–FLD) in human urine samples. *Talanta* **2010**, 81, 871–880.
90. Peng, X.; Tan, J.; Tang, C.; Yu, Y.; Wang, Z. Multiresidue determination of fluoroquinolone, sulfonamide, trimethoprim, and chloramphenicol antibiotics in urban waters in china. *Environ. Toxicol. Chem.* **2008**, 27(1), 73-79.

91. Burgos Tan, M. J. *Desarrollo y evaluación de un recubrimiento polimérico para su aplicación potencial en la extracción por sorción en barra de agitación*. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, Mérida. Marzo 2016.
92. Medina Cetina, S. A. *Síntesis y caracterización de polímeros híbridos para su aplicación potencial en la extracción con barras de agitación*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, Mérida. Mayo 2016.
93. Liu, L.; Sheardown, H. Glucose permeable poly (dimethyl siloxane) poly (N-isopropyl acrylamide) interpenetrating networks as ophthalmic biomaterials. *Biomaterials* **2005**, 26, 233-244.
94. Namera, A.; Saito T. Recent advances in unique sample preparation techniques for biological and environmental analysis. En *Recent Advances in Analytical Techniques* Volume 1, Rahman, A; Ozkan, S.A.; Ahmed, R. Ed. Bentham: Sharjah: 2017, pp. 36.
95. Vo Duy, S.; Fayad, P.B.; Barbeau, B.; Prévost, M.; Sauvé, S. Using a novel sol-gel stir bar sorptive extraction method for the analysis of steroid hormones in water by laser diode thermal desorption/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Talanta*. 2012, 101, 337–345
96. Brinker, C.; Scherer, G. *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of sol-gel processing*. San Diego CA. Academic Press 1990.
97. Mackenzie, J.D.; Chung, Y.J.; Hu, Y. Rubbery ormosils and their applications, *J. of Non-Cryst. Solids* **1992**, 147&148, 271-279
98. Wu, L.Y.L.; Tan G.H.; Zeng X.T. Synthesis and Characterization of Transparent Hydrophobic Sol Gel Hard Coatings. *J. Sol-Gel Sci. Tech.* **2006**, 38, 85–89.
99. Izumi, K.; Tanaka, H.; Uchida, Y. Hydrolysis of trifunctional alkoxy silanes and corrosion resistance of steel sheets coated with alkoxy silane-derived films. *J. Mat. Sci. Lett.* **1993**, 12, 724-727.
100. Loy, D. A.; Baugher, B. M.; Baugher, C. R.; Schneider, D. A.; Kamyar R. Substituent Effects on the Sol-Gel Chemistry of Organotrialkoxysilanes *Chem. Mater.* **2000**, 12, 3624-3632.
101. Li, Y.S.; Wang, Y.; Ceesay, S. Vibrational spectra of phenyltriethoxysilane, phenyltrimethoxysilane and their sol-gels. *Spectrochimica Acta Part A.* **2009**, 7, 1819–1824.

102. Cai, D.; Neyer, A.; Kuckuk, R.; Heise, H. M. Raman, mid-infrared, near-infrared and ultraviolet–visible spectroscopy of PDMS silicone rubber for characterization of polymer optical waveguide materials. *J. Mol. Struct.* **2010**, 976, 274–281.
103. Anslyn, E. V. Dougherty, D. A. *Modern Physical Organic Chemistry*. 1a ed.; University Science Books: Sausalito (USA), 2006, 147.
104. Nandi, S.; Winter, H. Swelling Behavior of Partially Cross-Linked Polymers: A Ternary System. *Macromolecules* **2005**, 38, 4447-4455.
105. Lee, J. N.; Park, C.; Whitesides, G. M. Solvent Compatibility of Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Devices. *Anal. Chem.* **2003**, 75, 6544-6554.
106. Santos, H.M.; Lodeiro, C.; Capelo-Martínez. The Power of Ultrasound. *Ultrasound in Chemistry: Analytical Applications*. Capelo-Martínez, J.L. Ed. WILEY-VCH: Weinheim **2009**; pp. 1-14.
107. Bracco, G.; Holst, B. *Surface Science Techniques*. 1a ed. Springer: New York, 2013; pp. 3-34.
108. Camino, G.; Lomakinb, S.M.; Lazzari, M. Polydimethylsiloxane thermal degradation Part 1. Kinetic aspects. *Polymer* **2001**, 42, 2395-2402. Grassie N., MacFarlane I.G. The thermal degradation of polysiloxanes I. *Eur Polym J* **1978**, 14, 875-884.
109. Camino, G.; Lomakinb, S.M.; Lazzari, M. Polydimethylsiloxane thermal degradation Part 2. The degradation mechanism. *Polymer* **2002**, 43, 2011-2015.
110. Grassie N., MacFarlane I.G., Francey K.F. The thermal degradation of polysiloxanes II. *Eur Polym J* **1979**, 15, 415-422.
111. Shi, Y.; Gao, X.; Zhang, D.; Lui, Y.; Huang, G. Synthesis and thermal properties of modified room temperature vulcanized (RTV) silicone rubber using polyhedral oligomeric silsesquioxane (POSS) as a cross linking agent. *RSC Adv.* **2014**, 4, 41453-41460.
112. Munther Abdul-Jaleel Mohammed-Ali. Stability Study of Tetracycline Drug in Acidic and Alkaline Solutions by Colorimetric Method. *J. Chem. Pharmaceu. Research* **2012**, 4(2):1319-1326.
113. Harris, D. C. *Análisis Químico Cuantitativo*. 3ª ed.; Ed. Reverté; California: 2007; pp. 611.

114. Varanda, F.; Pratas de Melo, M. J.; Caco, A. I.; Dohrn, R.; Makrydaki, F.A.; Voutsas, F.; Tassios, D.; Marrucho, I.M. Solubility of Antibiotics in Different Solvents. 1. Hydrochloride Forms of Tetracycline, Moxifloxacin, and Ciprofloxacin. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2006**, 45, 6368-6374.
115. Ahmed, H.M.; Jee, R.D. The acidity solubility constants of tetracyclines in aqueous solutions. *Anal. Chim. Acta* **1984**, 166, 329-333.
116. Ochiai, N.; Sasamoto, K.; David, F.; Sandra P. Solvent-assisted stir bar sorptive extraction by using swollen polydimethylsiloxane for enhanced recovery of polar solutes in aqueous samples: Application to aroma compounds in beer and pesticides in wine *J Chromatogr A.* **2016**, 1455, 45-56.
117. André De Villiers, A.; Vanhoenacker, G.; Lynen, F. ; Pat. S. Stir bar sorptive extraction-liquid desorption applied to the analysis of hop-derived bitter acids in beer by micellar electrokinetic. *Electrophoresis.* **2004**, 25(4-5), 664-9.
118. García Guadarrama, B. *Determinación de los coeficientes de solubilidad, difusión y permeabilidad de gases en polímeros mediante la técnica de decaimiento de la presión.* Tesis de Maestría. Universidad Iberoamericana. México D. F. 2007.
119. Vaes, H.J.; Mayer, P.; Oomen, A.G.; Hermens, J.L.; Tolls, J. Comments on "Adsorption versus Absorption of Polychlorinated Biphenyls onto Solid-Phase Microextraction Coatings". *Anal. Chem.* **2000**, 639-641.
120. Montgomery, D.C. *Diseño y análisis de experimentos.* 2ª ed.; Ed. Limusa-Wiley.; Arizona: 2003; pp. 218-276.
121. Gutierrez Pulido, H.; De la Vara Salazar, R. *Análisis y diseño de experimentos.* 2ª ed.; Ed. McGraw Hill; pp. 166-220.
122. Daniel, W. W. *Bioestadística: base para el análisis de ciencias de la salud.* 4ª ed.; Ed. Limusa-Wiley; pp. 204-211, 295-316.
123. Marqués Dos Santos, J. M. *Estadística Básica: un enfoque no paramétrico.* UNAM. pp. 40-45.
124. Guisande González, C. *Tratamiento de datos.* Universidad de Vigo. 2006. Ed. Diaz de Santos. pp. 56-58.

ANEXOS

Anexo A. Diseño experimental y análisis estadístico.

Diseño factorial general

El estudio de un proceso como SBSE requiere determinar cuál es la influencia y la magnitud de varios factores sobre una respuesta como puede ser la cantidad de analito extraído para luego optimizar el proceso y encontrar las mejores condiciones de operación. En el diseño experimental a los valores que puede adquirir cada factor se les llama niveles (o tratamientos), si el investigador controla el factor puede elegir estos niveles (efectos fijos) y aplicar las conclusiones de su investigación solo a esas condiciones; por otro lado, también podrían elegirse aleatoriamente los niveles (efectos aleatorios) de un conjunto más grande de valores buscando mayor generalidad de sus conclusiones, pero implica mayor rigidez en el cumplimiento de supuestos estadísticos que no siempre se consigue o es inviable en la práctica.¹²⁰⁻¹²²

Los diseños factoriales son muy eficientes ya que permiten evaluar la influencia de varios factores y sus interacciones de manera simultánea, implicando el menor número de corridas experimentales posible y un ahorro de recursos. En un diseño factorial se dice que los factores están cruzados ya que, por ejemplo, si se estudian un factor A con a niveles y un factor B con b niveles, entonces una sola réplica del diseño a través de ab corridas experimentales ya contempla las ab combinaciones de los niveles de los factores.^{120,121}

El efecto de un factor A se representa por una letra mayúscula "A" y puede definirse como el cambio en la respuesta debida al cambio de nivel del factor. Si la diferencia en la respuesta entre los niveles de un factor A no es la misma cuando se mide en diferentes niveles de otro factor B, entonces existe un efecto "AB" debido a la interacción de éstos. La interacción puede ser de diferente orden dependiendo si ocurre entre dos (orden 2), tres (orden 3) o más factores.^{120,121}

En los diseños factoriales de efectos fijos la respuesta observada (y) se modela como una combinación de la gran media de las observaciones (μ), los efectos de factores individuales (α_i, β_j, \dots , etc.), los efectos de todas las posibles interacciones entre ellos (dobles, triples, etc.) y el error aleatorio (ϵ).¹²⁰ Para un diseño factorial con solo dos factores A y B con efectos α_i (niveles $i=1, \dots, a$) y β_j (niveles $j=1, \dots, b$) respectivamente solo podría haber una interacción doble AB con efecto $(\alpha\beta)_{ij}$, entonces cada observación queda descrita acorde al modelo efectos fijos de la ecuación 7:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk} \dots \dots \dots \text{Ec. 7}$$

En los diseños factoriales, con la finalidad de descubrir si los factores o interacciones son fuentes de variación con efectos significativos, se recurre al análisis de varianza (ANOVA), pero se requieren al menos dos réplicas del diseño ($n \geq 2$). Este

análisis inicialmente estima la variabilidad total como una suma de cuadrados (SC_{Total}), la cual puede descomponerse en variabilidad no explicada atribuida al error aleatorio puro (SC_{Error}) y en variabilidad explicada por el modelo factorial ($SC_{Modelo\ factorial}$) como lo muestra la ecuación 8.

$$SC_{Total} = SC_{Modelo\ factorial} + SC_{Error} \dots \dots \dots Ec. 8$$

La $SC_{Modelo\ factorial}$ puede descomponerse a su vez en sumas de cuadrados asociadas a los factores e interacciones considerados como fuentes de variabilidad. Por ejemplo, para un diseño bifactorial la variabilidad total se descompone como lo indica la ecuación 9.

$$SC_{Modelo\ Bifactorial} = SC_{Modelo\ bifactorial} + SC_{Error} = (SC_A + SC_B + SC_{AB}) + SC_{Error} \dots \dots \dots Ec. 9$$

Si un factor tiene un efecto significativo en la respuesta (y), entonces su varianza en alguno de sus niveles resultará significativamente mayor que la atribuible al error aleatorio puro (que se asume constante en todos niveles). Probar la hipótesis nula de igualdad de varianzas entre niveles del factor resulta equivalente a probar la de igualdad de las medias entre los niveles; un factor con efecto significativo llevará al rechazo de ambas. En este contexto, debe notarse que la suma de cuadrados (SC) de un factor u otra fuente de variación dividida por sus grados de libertad se convierte una estimación insesgada e independiente de la varianza (σ) llamada cuadrado medio (CM). De manera operacional, la significancia se comprueba cuando el valor de la razón F calculada para una fuente de variación ($F = CM_{Fuente\ de\ variación} / CM_{Error}$) resulta mayor que un valor crítico F (especificado para un nivel de confianza $[\alpha]$ acorde a una distribución de Fisher y considerando los grados de libertad asociados a $CM_{Fuente\ de\ variación}$ y CM_{Error}), entonces se concluye que la evidencia estadística sustenta que la fuente de variación (factor, interacción u otra) tiene un efecto significativo y diferente de cero sobre la respuesta. Equivalentemente si se considera el valor de probabilidad consignada (llamada p-valor) atribuida a la razón F, entonces el efecto de la fuente resulta significativo cuando su p-valor es menor que el nivel de confianza considerado (α). El p-valor es la probabilidad de que el valor de F sea más pequeña que su valor crítico a un nivel de confianza α cuando la hipótesis nula sea verdadera.^{120,121} La tabla 13 presenta el resumen ANOVA para un diseño bifactorial con modelo de efectos fijos.

Tabla 13. Análisis de varianza para un diseño bifactorial con modelo de efectos fijos.

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (G.I.)	Cuadrado medio (CM)	Razón F
Factor A	SC_A	a-1	$CM_A = SC_A / (a-1)$	$F = CM_A / CM_{Error}$
Factor B	SC_B	b-1	$CM_B = SC_B / (b-1)$	$F = CM_B / CM_{Error}$
Interacción AB	SC_{AB}	(a-1)(b-1)	$CM_{AB} = SC_{AB} / (a-1)(b-1)$	$F = CM_{AB} / CM_{Error}$
Error (residual)	SC_{Error}	ab(n-1)	$CM_{Error} = SC_{Error} / ab(n-1)$	
Total	SC_{Total}	abn-1	Criterio de significancia: $F > F_{crítico}(\alpha, G.I.\ num, G.I.\ denom)$	

Para un modelo bifactorial la suma de cuadrados total se calcula acorde con la ecuación 10 para n réplicas, a niveles del factor A, b niveles del factor B y la gran suma total de los valores de las observaciones del diseño (y...).

$$SC_{Total\ bifactorial} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^b \sum_{k=1}^n y_{ijk}^2 - \frac{(y_{...})^2}{abn} \dots\dots\dots Ec. 10$$

La descomposición de la SC_{Total} para un modelo bifactorial (o incluso para más factores) puede realizarse de manera automatizada con varios paquetes estadísticos de software como Minitab y Statgraphics, reduciendo así el trabajo del investigador. Detalles teóricos de esta descomposición y el cálculo de SC_A , SC_B , SC_{AB} y SC_{Error} son tratados por Montgomery¹²⁰, Gutierrez¹²¹ y Daniel¹²² con mayor profundidad.

Otra ventaja de los diseños factoriales es que los datos recolectados permiten generar modelos de regresión mediante el método de mínimos cuadrados, los cuales son capaces de proporcionar valores predictivos de la respuesta (\hat{y}) para una determinada combinación de niveles de factores. En los modelos de regresión unos coeficientes de regresión (β) estimados acompañan a las variables que representan a los factores en su escala original (ξ_i) y otros al producto de esas variables para considerar la influencia de las interacciones entre factores. Las fuentes con mayores efectos sobre la respuesta tendrán coeficientes β_i grandes y las no significativas valores próximos a cero, el coeficiente β_0 es la gran media de todos los datos experimentales (μ). En el caso de un modelo bifactorial con interacción significativa, el modelo de regresión quedaría como en la ecuación 11, siendo ξ_1 la variable del factor A y ξ_2 la variable del factor B.¹²⁰

$$\hat{y} = \beta_0 + \beta_1 \xi_1 + \beta_2 \xi_2 + \beta_{12} \xi_1 \xi_2 \dots\dots\dots Ec. 11$$

Para cada modelo factorial particular deben calcularse los residuales (ϵ) asociados a cada una las observaciones experimentales (y). El residual de una observación (y) representa la variabilidad no explicada por el modelo para aquella, básicamente es la diferencia entre el valor experimental de la respuesta y el predicho por el modelo ($\epsilon=y-\hat{y}$) bajo esas condiciones.^{120,121} La necesidad de hacer esto en cada ANOVA factorial se debe a que la descomposición de la variabilidad total (SC_{Total}) en varios términos es puramente algebraica y se necesita sustentar que los datos no violan los supuestos básicos del ANOVA. Estos supuestos se explican a continuación.

El ANOVA supone que los residuales se distribuyan de manera normal, independiente, con media cero ($\mu=0$) y que hay homocedasticidad (varianza constante pero desconocida $\sigma=cte$) en todos los niveles de los factores; esto es necesario para que el ANOVA sea confiable y constituya sea una prueba exacta de significancia. Se considera que los residuales representan a la varianza no explicada por el modelo y, por tanto, éste no debe poder predecir su comportamiento. También es requerida la independencia de los residuales, es decir, su comportamiento tampoco deberían estar

asociado a la magnitud de los valores predichos o al orden de recolección de los datos de una manera evidente.^{120,121}

En los modelos de efectos fijos las desviaciones de la normalidad moderadas son tolerables por la robustez de la prueba F. Las desviaciones de la normalidad de los residuos impactan en una menor potencia de ANOVA para encontrar diferencias significativas. Con un histograma de los residuales podría examinarse directamente la distribución normal, aunque es más útil una gráfica de probabilidad normal donde se espera que la mayoría de los residuales caiga sobre una línea recta pronóstico de comportamiento normal.^{118,119} La prueba de normalidad de Anderson-Darling se ha reportado como más potente en comparación con otras como la χ^2 de Pearson y la de Kolmogorov-Smirnov cuando hay datos aberrantes o extremos (*outliers*); aunque la prueba de Shapiro-Wilk da resultados comparables cuando la muestra es pequeña ($n < 30$).^{123,124}

Si se grafican los residuales (ϵ) contra los valores predichos \hat{y} por el modelo, el gráfico deberá mostrar una distribución aleatoria y sin estructura para los residuos. Esta gráfica puede revelar una varianza no constante. Por ejemplo, un aumento de varianza de las observaciones cuando incrementa la magnitud de las observaciones revelaría un error constante por ruido experimental (los residuos se distribuyen como un cono o megáfono), pero violaciones al supuesto de normalidad también podrían producir el efecto porque las varianzas sesgadas son función de la media.^{120,121}

Existen varias pruebas de homocedasticidad pero destacan la de Barlett y la de Levene. La primera pierde potencia cuando no hay normalidad y esencialmente determina si hay heterocedasticidad en k grupos independientes cuando el estadístico χ^2_{exp} excede un valor crítico de la distribución χ^2 (asociado un nivel de confianza α para $k-1$ grados de libertad). El test de Levene analiza el valor absoluto de las diferencias entre cada dato experimental con la mediana (o a veces la media) de su grupo.^{123,124}

Por otro lado, una violación del supuesto de independencia de los residuales con respecto al orden de temporal de recolección de datos revela si los residuos tienden a aumentar o disminuir conforme el tiempo pasa. Aleatorizar las corridas de un diseño factorial es una manera eficaz para evitar este problema potencialmente serio. Una gráfica de residuales contra tiempo además de revelar tendencias igualmente permite identificar cuando la varianza no es constante si los residuales tienden a dispersarse más o menos con el tiempo.^{120,121}

Diseños factoriales 2^k

Dentro de los diseños factoriales los del tipo 2^k son de especial interés, éstos contemplan el estudio de k factores (cuantitativos o cualitativos), ${}_k C_2$ interacciones de dos factores, ${}_k C_3$ interacciones de tres factores, ..., y una interacción de k factores. Cada factor sólo tiene dos niveles que se denominan arbitrariamente como "alto" y "bajo", igualmente es frecuente denotar el nivel alto simbólicamente como "+ o +1" y el

bajo como “- o -1”. No obstante, considerar solo dos niveles por factor implica suponer la linealidad de la respuesta en el rango elegido para los niveles de los factores, esto usualmente se cumple pero puede ser evaluado con una prueba de curvatura si se adicionan puntos centrales al diseño (corridas donde cada factor se fija con valores intermedios [0] a sus niveles alto [+] y bajo [-]).^{120,121}

En el modelo factorial 2^4 de efectos fijos para cuatro factores (A, B, C y D) mostrado en la ecuación 12 cada observación se considera integrada por la gran media de todas las observaciones del diseño (μ), las contribuciones estimadas de los efectos de factores ($\alpha_i, \beta_j, \gamma_k, \delta_l$), los efectos de las interacciones entre ellos ($(\alpha\beta)_{ij}, (\alpha\gamma)_{ik}, \dots$, etc.) hasta orden 4 y el error aleatorio (ϵ_{ijklm}).¹²⁰

$$y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_l + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\delta)_{il} + (\beta\gamma)_{jk} + (\beta\delta)_{jl} + (\gamma\delta)_{kl} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + (\alpha\beta\delta)_{ijl} + (\alpha\gamma\delta)_{ikl} + (\beta\gamma\delta)_{jkl} + (\alpha\beta\gamma\delta)_{ijkl} + \epsilon_{ijklm} \dots \text{Ec. 12}$$

En el caso del diseño 2^4 se tienen 4 factores (A, B, C, D), cada uno con dos niveles (+, -), por tanto, 16 corridas experimentales resultan de las combinaciones de sus niveles (véase la tabla 14). La notación para las corridas utiliza letras minúsculas con el fin de indicar cuando un factor está en su nivel alto, por ejemplo, en la corrida “a” el factor A está en su nivel alto y todos los demás en sus niveles bajos, mientras que en la corrida “abcd” todos los factores están en su nivel alto. Cuando todos los factores están en el nivel bajo, entonces la corrida se denota (1).^{120,121}

Tabla 14. Corridas experimentales para una sola réplica del diseño factorial 2^4 .

Notación de corrida	Niveles de los factores				Respuesta observada
	A	B	C	D	
(1)	-	-	-	-	$Y_{(1)}$
a	+	-	-	-	Y_a
b	-	+	-	-	Y_b
ab	+	+	-	-	Y_{ab}
c	-	-	+	-	Y_c
ac	+	-	+	-	Y_{ac}
bc	-	+	+	-	Y_{bc}
abc	+	+	+	-	Y_{abc}
d	-	-	-	+	Y_d
ad	+	-	-	+	Y_{ad}
bd	-	+	-	+	Y_{bd}
abd	+	+	-	+	Y_{abd}
cd	-	-	+	+	Y_{cd}
acd	+	-	+	+	Y_{acd}
bcd	-	+	+	+	Y_{bcd}
abcd	+	+	+	+	Y_{abcd}

El efecto de un factor A en un diseño 2^k replicado n veces se calcula intuitivamente como una diferencia de promedios: el promedio de las respuestas donde

el factor está en el nivel alto (+) menos el promedio de las respuestas donde se fijó el nivel bajo (-). Bajo este esquema el cálculo de los efectos de los factores es sencillo, pero en el caso de las interacciones no es tan evidente qué respuestas sumar o restar. Si se definen unas magnitudes llamadas contrastes (C) para cada factor (o interacción), sus efectos pueden estimarse en cada caso particular acorde a la ecuación 13.

$$\text{Efecto del factor (o interacción)} = \frac{\text{Contraste del factor (o interacción)}}{2^{k_n}} \dots \text{Ec. 13}$$

Como lo muestra la ecuación 14, un contraste resulta de combinar las 2^k respuestas del diseño (y_i) multiplicadas por sus respectivos coeficientes de contraste (a_i). Los coeficientes a_i solo pueden valer +1 o -1, mediante tablas estadísticas fáciles de generar se puede conocer qué valor tendrán dependiendo del efecto que se desee estimar y, por tanto, se sabrá cuáles respuestas sumar o restar en cada caso. La suma de los coeficientes en un contraste siempre es cero $\sum a_i = 0$ (ortogonalidad).¹²⁰

$$C = \sum_{i=1}^n a_i y_i \dots \text{Ec. 14}$$

Acorde a los coeficientes de la tabla 15, el contraste para un factor A (C_A) en un diseño 2^4 se calcularía sumando las respuestas de las corridas donde A estuvo en su nivel alto y restándoles aquellas donde estuvo en el bajo (ecuación 15).¹²⁰

$$C_A = y_a + y_{ab} + y_{ac} + y_{ad} + y_{abc} + y_{abd} + y_{abcd} - y_{(1)} - y_b - y_c - y_{bc} - y_d - y_{bd} - y_{cd} - y_{bcd} \dots \text{Ec. 15}$$

Tabla 15. Coeficientes de los contrastes para los efectos en un diseño factorial 2^4 .

Corrida	A	B	AB	C	AC	BC	ABC	D	AD	BD	ABD	CD	ACD	BCD	ABCD
(1)	-1	-1	+1	-1	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
a	+1	-1	-1	-1	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
b	-1	+1	-1	-1	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	-
ab	+1	+1	+1	-1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
c	-1	-1	+1	+1	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	-
ac	+1	-1	-1	+1	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
bc	-1	+1	-1	+1	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+
abc	+1	+1	+1	+1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
d	-1	-1	+1	-1	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-
ad	+1	-1	-1	-1	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
bd	-1	+1	-1	-1	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+
abd	+1	+1	+1	-1	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
cd	-1	-1	+1	+1	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+
acd	+1	-1	-1	+1	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
bcd	-1	+1	-1	+1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
abcd	+1	+1	+1	+1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

El ANOVA aplicado a un diseño factorial 2^k nuevamente descompone la variabilidad total (SC_{Total}) entre el modelo factorial ($SC_{Modelo\ factorial}$) y el error aleatorio puro (SC_{Error}). En concreto, para un diseño factorial 2^4 el término $SC_{Modelo\ factorial}$ se descompone en 15 términos asociados a los 4 factores y sus interacciones acorde a la ecuación 16.^{120,121}

$$SC_{Modelo\ 2^4} = SC_A + SC_B + SC_C + SC_D + SC_{AB} + SC_{AC} + SC_{BC} + SC_{AD} + SC_{BD} + SC_{CD} + SC_{ABC} + SC_{ABD} + SC_{ACD} + SC_{BCD} + SC_{ABCD} \dots \text{Ec. 16}$$

Por tanto, un ANOVA para el diseño 2^4 permite probar la significancia de los efectos de 15 fuentes de variación mediante la razón F que compara las estimaciones de sus varianzas (CM_{Fuente}) con la varianza residual no explicada por el modelo y asociada al error (CM_{Error}).^{120,121}

Tabla 16. Resumen del análisis de varianza para un diseño 2^4

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón F
A	SC_A	1	$CM_A = SC_A / 1$	$F = CM_A / CM_{Error}$
B	SC_B	1	$CM_B = SC_B / 1$	$F = CM_B / CM_{Error}$
C	SC_C	1	$CM_C = SC_C / 1$	$F = CM_C / CM_{Error}$
D	SC_D	1	$CM_D = SC_D / 1$	$F = CM_D / CM_{Error}$
AB	SC_{AB}	1	$CM_{AB} = SC_{AB} / 1$	$F = CM_{AB} / CM_{Error}$
AC	SC_{AC}	1	$CM_{AC} = SC_{AC} / 1$	$F = CM_{AC} / CM_{Error}$
AD	SC_{AD}	1	$CM_{AD} = SC_{AD} / 1$	$F = CM_{AD} / CM_{Error}$
BC	SC_{BC}	1	$CM_{BC} = SC_{BC} / 1$	$F = CM_{BC} / CM_{Error}$
BD	SC_{BD}	1	$CM_{BD} = SC_{BD} / 1$	$F = CM_{BD} / CM_{Error}$
CD	SC_{CD}	1	$CM_{CD} = SC_{CD} / 1$	$F = CM_{CD} / CM_{Error}$
ABC	SC_{ABC}	1	$CM_{ABC} = SC_{ABC} / 1$	$F = CM_{ABC} / CM_{Error}$
ABD	SC_{ABD}	1	$CM_{ABD} = SC_{ABD} / 1$	$F = CM_{ABD} / CM_{Error}$
ACD	SC_{ACD}	1	$CM_{ACD} = SC_{ACD} / 1$	$F = CM_{ACD} / CM_{Error}$
BCD	SC_{BCD}	1	$CM_{BCD} = SC_{BCD} / 1$	$F = CM_{BCD} / CM_{Error}$
ABCD	SC_{ABCD}	1	$CM_{ABCD} = SC_{ABCD} / 1$	$F = CM_{ABCD} / CM_{Error}$
Error puro	SC_{Error}	$2^k(n-1)$	$CM_{Error} = SC_A / [2^k(n-1)]$	
Total	SC_{total}	$n2^k-1$	Criterio de significancia: $F > F_{crítico}(\alpha, g.L. num, g.L. denom)$	

La variabilidad total puede estimarse de manera sencilla para un diseño factorial 2^4 como se muestra en la ecuación 17. Básicamente implica una sumatoria cuádruple que se extiende considerando el número de réplicas del diseño ($r=1, \dots, n$), la suma de todas las respuestas (y_{ijkl}) y los niveles de cada factor A ($i=1,2$), B ($j=1,2$), C ($k=1,2$) y D ($l=1,2$).^{120,121}

$$SC_{Total\ para\ un\ diseño\ 2^4} = \sum_{i=1}^2 \sum_{j=1}^2 \sum_{k=1}^2 \sum_{l=1}^2 \sum_{r=1}^n y_{ijklr}^2 - \frac{(y_{\dots})^2}{2^4 n} \dots \text{Ec. 17}$$

La suma de cuadrados atribuida a un factor (o interacción) $SC_{\text{Factor (o interacción)}}$ puede calcularse con el contraste del efecto, el total 2^k de corridas del diseño y las n réplicas del mismo. La ecuación 18 ilustra este cálculo.^{120,121}

$$SC_{\text{Factor (o interacción)}} = \frac{(\text{Contraste del factor o interacción})^2}{2^{k_n}} \dots \text{Ec. 18}$$

El enfoque general para analizar un diseño factorial 2^k implica seis etapas. En la primera etapa se estiman los efectos de las fuentes de variación, analizándose sus signos y magnitudes para establecer preliminarmente cuáles factores e interacciones afectan significativamente la respuesta y cómo fijar las condiciones para optimizar el proceso. En un segundo paso se forma un modelo de regresión inicial con todos los factores e interacciones. En el tercer paso se evalúa formalmente la significancia de los factores e interacciones. El cuarto paso consiste en refinar el modelo eliminando términos que no resulten significativos y conservar solo los significativos, esto es válido siempre que la variabilidad explicada por el modelo ($R^2 = SC_{\text{modelo}}/SC_{\text{Total}}$) no sea muy baja ($R^2 < 0.70$). El paso cinco implica verificar los supuestos y adecuación del modelo examinando el comportamiento de los residuales. El último paso consiste en interpretar las gráficas de efectos principales, interacciones, mapas de contorno o superficies de respuesta.^{120,121}

Una sola réplica del diseño 2^k se suele llamar diseño factorial no replicado y supone el menor número de corridas experimentales posibles para estudiar los k factores manteniendo un diseño factorial completo de 2^k observaciones. Si se pretende hacer un análisis de varianza para encontrar los factores significativos debe notarse que un diseño sin réplicas no permite estimar el cuadrado medio del error puro (CM_{error}) por falta de grados de libertad (se recomienda que posea mínimo 4). Sin embargo, si se supone que los efectos de interacciones triples y superiores no son significativos (principio de efectos esparcidos), entonces pueden combinarse sus cuadrados medios para estimar el del error. Una alternativa sugerida por Daniel implica examinar una gráfica de probabilidad normal de los efectos; los efectos que son insignificantes (media próxima a cero y varianza común σ) tenderán a aproximarse a la línea recta de esta gráfica y los efectos de factores significativos se alejarán notablemente, de esta forma el cuadrado medio del error puede construirse con los términos no significativos. Finalmente, también es posible obtener una estimación del cuadrado medio del error al adicionar suficientes puntos centrales para ganar grados de libertad para el error.^{120,121}

Para los diseños factoriales 2^k también puede calcularse un modelo de regresión que proporcione un valor de la respuesta predicha \hat{y} para las condiciones de cualquier corrida experimental. En el modelo de regresión nuevamente cada variable se multiplica por su respectivo coeficiente de regresión (β_i), siendo necesario notar que β_0 es precisamente la media (μ) de todas las observaciones del diseño 2^k y que el valor de un coeficiente β para un factor o interacción es precisamente la mitad del efecto. La influencia de las interacciones como AB nuevamente quedaría especificada por el

producto de las variables de los factores individuales. Además, es más frecuente que el modelo contenga las variables codificadas (x_i) en vez de en unidades naturales (ξ_i).¹²⁰

Para convertir los niveles de los factores de su escala original (ξ) a la escala codificada (x) simplemente se les resta el promedio de los niveles y se divide entre la diferencia que existe entre el valor promedio y el nivel alto o bajo. Por ejemplo, si el factor A es temperatura con niveles en escala natural de 30°C (nivel bajo) y 40 °C (nivel alto), su promedio es 35°C (nivel central) y la diferencia es 5°C; entonces con la relación $x_1=(\xi_1-35)/5$ se puede pasar la temperatura de su escala natural ($\xi_{bajo}=30^\circ\text{C}$, $\xi_{centro}=35^\circ\text{C}$ y $\xi_{alto}=40^\circ\text{C}$) a la codificada ($x_{bajo}=-1$, $x_{centro}=0$ y $x_{alto} = +1$).¹²⁰

Un modelo de regresión para un diseño factorial 2^k donde los k factores y todas sus posibles interacciones dobles resultan significativas (es infrecuente que resulten significativas las interacciones triples o superiores) quedaría como la ecuación 15.¹²⁰

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \dots \dots \dots \text{Ec. 19}$$

Superficies de respuesta

La metodología de superficie de respuesta es una colección de técnicas matemáticas y estadísticas que se aplican en la modelación de un proceso influenciado por varios factores, esto con la finalidad de realizar una optimización y determinar cuáles son las condiciones que llevan a la respuesta deseada.¹²⁰

En esta metodología se considera que la respuesta (y) de un proceso es función de varios factores $f(x_1, \dots, x_n)$ y del ruido o error observado (ε).¹²⁰

$$y = f(x_1, \dots, x_2) + \varepsilon \dots \dots \dots \text{Ec. 20}$$

A la respuesta esperada se denota por E(y) y a la función utilizada como modelo para estimarla se le denomina superficie de respuesta (η) y es una función de varios factores x_i .¹²⁰

$$E(y) = \eta = f(x_1, \dots, x_2) \dots \dots \dots \text{Ec. 21}$$

Una superficie de respuesta puede representarse tridimensionalmente considerando sólo dos factores con grandes efectos contra la respuesta, el resultado es un gráfico tridimensional. En la figura 64 se ha graficado el valor esperado del rendimiento de una reacción contra los factores temperatura (x_1) y presión (x_2), claramente se observa que existe una combinación de niveles de temperatura (x_1) y presión (x_2) que maximizan el rendimiento. Si mantiene constante la respuesta rendimiento en la superficie de respuesta y se proyecta sobre el plano x_1x_2 se obtiene una línea de contorno, si se repite el procedimiento a varias alturas de la gráfica tridimensional se genera un mapa de líneas de contornos que en la figura 64 consta de círculos concéntricos en torno al punto y_0 .¹²⁰

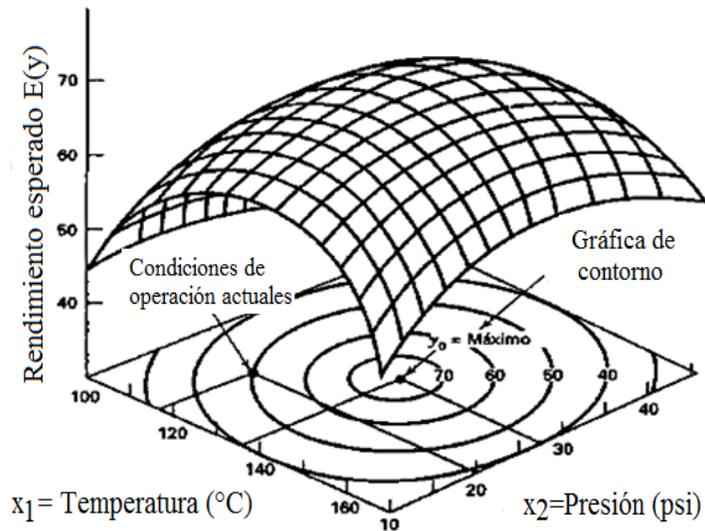


Figura 64. Superficie de respuesta tridimensional donde se indica el rendimiento esperado de una reacción contra los factores temperatura (x_1) y presión (x_2).

En la mayoría de los casos no se conoce la forma en que la respuesta dependerá de las variables independientes, por ello, como una aproximación inicial se recomienda utilizar un modelo polinomial lineal sencillo de primer orden como el de la ecuación 22 para intentar explicar el comportamiento de la respuesta al menos en un dominio de valores x_i .¹²⁰

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 \dots + \beta_k x_k + \varepsilon \dots \dots \dots \text{Ec. 22}$$

Si hay curvatura en el sistema, entonces debe usarse un polinomio de orden superior, tal como el modelo de segundo orden de la ecuación 23.¹²⁰

$$\hat{y} = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \dots \dots \dots \text{Ec. 23}$$

Dado que las regiones de valores x_i que se exploran son pequeñas usualmente uno o ambos de los modelos anteriores suele constituir suficiente aproximación para la respuesta del sistema; es evidente que modelar la verdadera relación funcional en el espacio completo de las variables requeriría una expresión polinomial compleja.¹²⁰

El método de regresión por mínimos cuadrados se utiliza para estimar los coeficientes de regresión β de los modelos. Se necesitan diseños concretos para evaluar el ajuste del sistema a un modelo de superficie, estos son los llamados diseños de superficie de respuesta y permiten investigar de la manera más eficaz posible cómo se comporta la respuesta cuando se modifican los niveles de los factores en un intervalo reducido de valores. Cuando el modelo obtenido por regresión logra ajustarse

al comportamiento de los datos en un grado satisfactorio, dicho modelo constituye una aproximación de la relación funcional real de la respuesta con las variables independientes y, por tanto, analizar el modelo ajustado equivale a analizar el sistema real en la zona bajo estudio.¹²⁰

La metodología de superficie de respuesta es secuencial, frecuentemente se aplica un diseño inicial en una zona de la superficie alejada de las condiciones óptimas de operación del proceso, en esa zona no óptima la curvatura es mínima y un modelo de primer orden debería ajustarse bien. Posteriormente, el objetivo es llevar rápida y eficazmente al investigador por la trayectoria que conduce hacia la vecindad de las condiciones óptimas, en esa nueva zona el ajuste a un modelo de primer orden ya no debería ser satisfactorio; por ello, una vez que se alcance esa región óptima se debe cambiar el diseño y evaluar el ajuste a un modelo de segundo orden. Si el modelo de segundo orden resulta mejor para la región del óptimo, entonces dicho modelo debería permitir localizar las mejores condiciones de operación del sistema. En la figura 65 se presenta una representación ilustrativa de la metodología de superficies de respuesta.¹²⁰

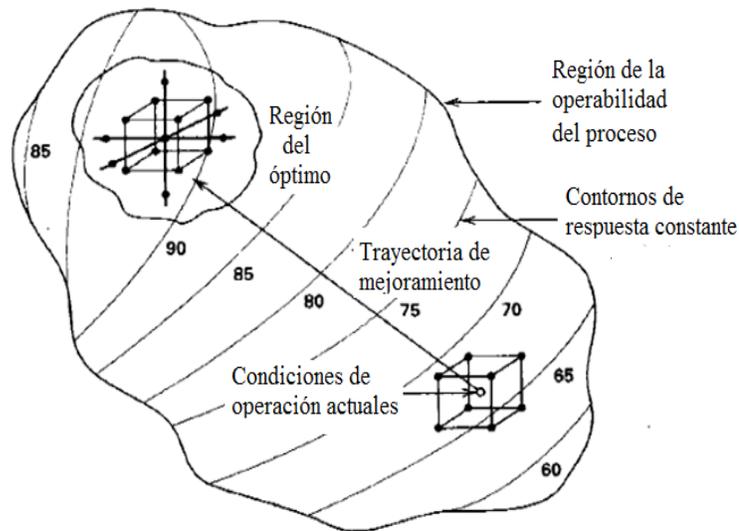


Figura 65. Ilustración del carácter secuencial de la metodología de superficie de respuesta.

Método del ascenso más pronunciado

El método del ascenso más pronunciado es un procedimiento para moverse secuencialmente de manera rápida y eficaz, sobre la trayectoria de máximo incremento de la respuesta, desde una región no óptima hacia una región que contenga las condiciones que optimizan el proceso. Para ello, inicialmente se utilizan las condiciones de operación actuales del proceso y con un diseño experimental factorial 2^k (con mínimo 5 réplicas del punto central del diseño) es posible evaluar el ajuste de la

respuesta al modelo de primer orden (ecuación 22). Si el ajuste es satisfactorio, entonces se obtendrá un mapa de contornos para la respuesta predicha consistente de líneas paralelas. En la figura 66 claramente se ha indicado la trayectoria de ascenso más pronunciado mediante una recta que inicia desde el centro del diseño, siendo siempre normal a la superficie ajustada.¹²⁰

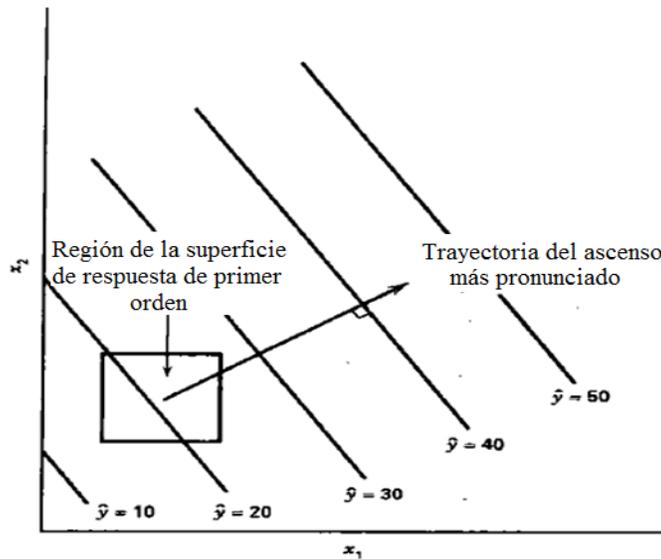


Figura 66. Superficie de respuesta de primer orden y trayectoria del ascenso más pronunciado.

Antes de explorarse la trayectoria de ascenso más pronunciado deberá evaluarse el ajuste a un modelo de primer orden. La adición de puntos centrales al diseño factorial 2^k permiten al investigador: 1) estimar el cuadrado medio del error con una sola réplica del diseño 2^k , 2) verificar las interacciones y 3) verificar los efectos cuadráticos (curvatura).¹²⁰

Al hacer el ajuste a un modelo de primer orden la suma de cuadrados total (SC_{Total}) se divide esencialmente en dos términos: la suma de cuadrados del modelo de primer orden (SC_{modelo}) que representa la variabilidad atribuida a los k factores (x_1, \dots, x_k) y la suma de cuadrados residual ($SC_{residual}$) que contendrá las variabilidad atribuida a las interacciones entre los factores (x_1x_2, x_1x_3, \dots , etc.), a los efectos cuadráticos puros (x_1^2, \dots, x_k^2) y al error puro. La ecuación 24 ilustra esta descomposición.¹²⁰

$$SC_{Total} = SC_{Modelo} + SC_{Residual} = SC_{Modelo} + (SC_{Cuadrática} + SC_{Interacciones} + SC_{Error}) \dots \dots \dots Ec.24$$

La suma de cuadrados de la curvatura ($SC_{Curvatura}$) se calcula sencillamente con la ecuación 25 considerando el número de corridas del diseño factorial (n_F), el número de réplicas del punto central (n_C), el promedio de las respuestas de las corridas factoriales (\bar{y}_F) y el promedio de las respuestas para las réplicas del punto central (\bar{y}_C).¹²⁰

$$SC_{\text{Curvatura}} = \frac{n_F n_C (\bar{y}_F - \bar{y}_C)^2}{n_F + n_C} \dots \text{Ec. 25}$$

La suma de cuadrados del error (SC_{Error}) se estima utilizando las corridas centrales acorde a la ecuación 26.¹²⁰

$$SC_{\text{Error}} = \sum_{i=1}^{i=n_C} y_i^2 - \frac{(\sum_{i=1}^{n_C} y_i)^2}{n_C} \dots \text{Ec. 26}$$

El CM_{Error} se calcula dividiendo SC_{Error} entre $n_C - 1$ grados de libertad. Para calcular los cuadrados medios de otras fuentes de variación (factor, interacción o curvatura) se asociará un grado de libertad a cada una. Nuevamente la razón F ($CM_{\text{Fuente de variación}}/CM_{\text{Error}}$) se utiliza para determinar la significancia de un factor a un nivel de confianza α cuando $F > F_{\text{Crítico}}(\alpha, \text{g.l. num.}, \text{g.l. denom.})$.¹²⁰

El tamaño del “avance o paso” sobre la trayectoria de ascenso más pronunciado lo determina el investigador con su experiencia o consideraciones prácticas, este incremento será proporcional a los coeficientes de regresión β_i del modelo de primer orden ($y = \beta_0 + \beta_1 x_1, \dots, \beta_k x_k$). Si en el modelo de regresión de primer orden la variable x_1 fue la que tuvo mayor influencia sobre la respuesta (el mayor valor absoluto de coeficiente β), entonces el tamaño del paso se expresa como un incremento de esa variable en unidades codificadas (Δx_1); el aumento en otras variables se determina con las razones de los coeficientes de regresión de manera que $\Delta x_2 = (\beta_2 / \beta_1) * \Delta x_1$, $\Delta x_3 = (\beta_3 / \beta_1) * \Delta x_1, \dots$, etc. Esta dependencia de manera general se puede expresar como la ecuación 27:¹²⁰

$$\Delta x_i = \frac{\beta_i}{\beta_j} \Delta x_j \quad i \neq j \quad i = 1, 2, \dots, k \dots \text{Ec. 27}$$

Es importante recordar que los incrementos obtenidos con la ecuación anterior están en unidades codificadas (Δx_i), es necesario traducirlos a incrementos de variables naturales ($\Delta \xi_i$) para poder realizar los experimentos.¹¹⁸

Se conducen experimentos sobre la trayectoria de ascenso más pronunciado partiendo desde el centro del diseño inicial ($x_1 = x_2 = \dots = x_k = 0$), en cada experimento se modificarán los niveles de los factores y deberá observarse hasta cuál experimento deja de observarse un incremento adicional en la respuesta. Entonces se define una nueva región de exploración definiendo nuevos niveles para los factores con centro en las condiciones del experimento que mostró el último incremento en la respuesta. En ese nuevo centro puede aplicarse otro diseño factorial 2^k con puntos centrales para determinar el ajuste a un modelo de primer orden en esa nueva región y, si todavía hay un ajuste, se determina una nueva trayectoria de ascenso más pronunciado. El proceso continuará hasta que ya no haya un ajuste a un modelo de primer orden y la curvatura sea significativa, entonces se ajustará un modelo de segundo orden para intentar modelar la curvatura en esa región que debería estar cerca de la región óptima.¹²⁰

Un diseño para evaluar el ajuste de superficies a un modelo segundo orden es el diseño central compuesto. Este diseño es esencialmente un diseño factorial 2^k que consta de las 2^k corridas factoriales (n_F) en un diseño no fraccionado, pero se adicionan n_c corridas centrales y $2k$ corridas axiales (o estrella). Con este diseño es posible examinar informalmente, mediante gráficas de contornos, si la región óptima explorada contiene un punto estacionario que podría ser punto máximo, un punto mínimo o un punto silla (máximo en una dirección y mínimo en otra); esto se ilustra en los gráficos de contorno considerando que los valores de x_1, \dots, x_k en ese punto harán que las derivadas parciales con respecto a esas variables simultáneamente sean cero ($\partial y / \partial x_1 = \dots = \partial y / \partial x_k = 0$).¹²⁹⁻¹²² La figura 67 representa algunas de estas situaciones.

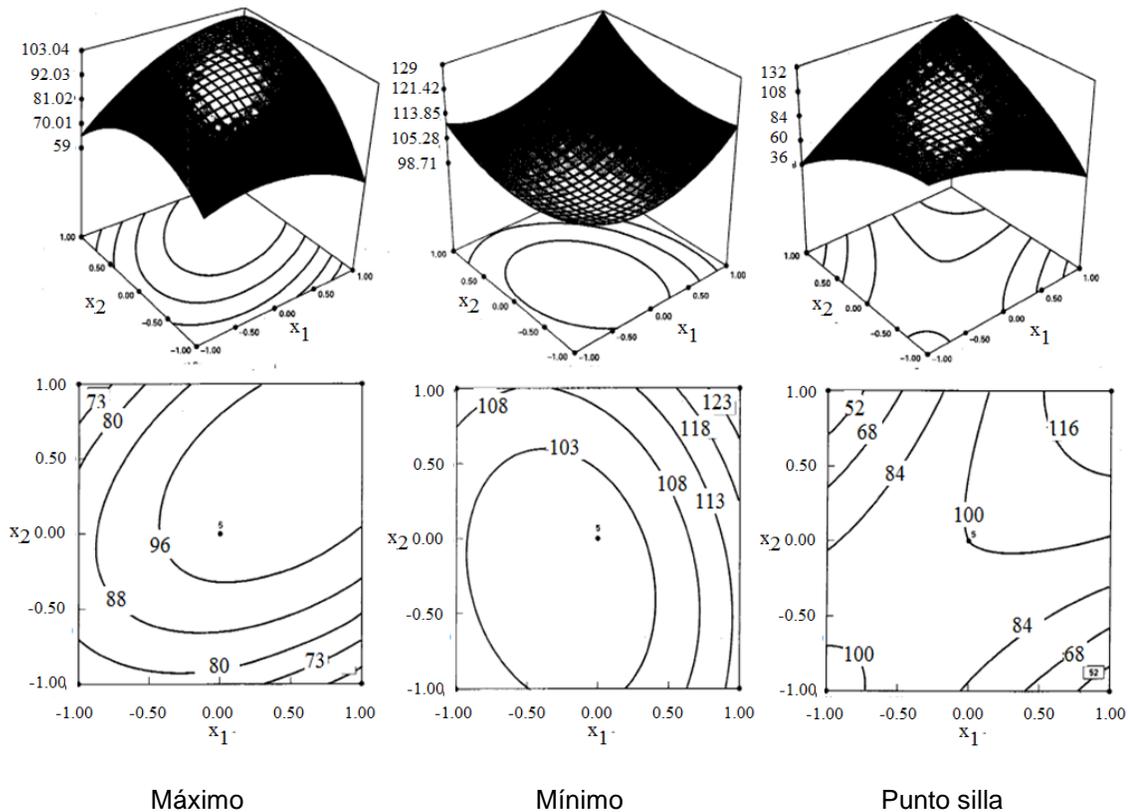


Figura 67. Algunos mapas de contornos posibles para superficies ajustadas a modelos de segundo orden.

Los mapas de contorno pueden ayudar a caracterizar qué tipo de punto estacionario se tiene de manera sencilla, pero existen procedimientos matemáticos más formales como el análisis canónico para casos más complejos que impliquen muchas variables; éste involucra una transformación de las variables independientes x_i a otras w_i en un nuevo sistema de coordenadas tomando el punto estacionario como centro e implicando rotar los ejes del nuevo sistema para que sean paralelos a los de la superficie ajustada de segundo orden. La magnitud y signos de unas constantes λ_i determina la naturaleza del punto.¹²⁰⁻¹²²

Anexo B. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 completo para área total de antibióticos.

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) del factorial 2^4 para los antibioticos totales.

Fuente	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de libertad (g.l.)	Cuadrado Medio (CM)	Razón F	p-valor
A:Tiempo	0.0324	1	0.0324	0.03	0.8729
B:Velocidad	25.7049	1	25.7049	22.47	0.0051
C:%NaCl	64.883	1	64.883	56.72	0.0007
D:%ACN	7.7284	1	7.7284	6.76	0.0483
AB	17.4724	1	17.4724	15.27	0.0113
AC	2.26503	1	2.26503	1.98	0.2184
AD	3.5721	1	3.5721	3.12	0.1375
BC	14.478	1	14.478	12.66	0.0163
BD	0.01	1	0.01	0.01	0.9291
CD	0.027225	1	0.027225	0.02	0.8834
ABC	0.216225	1	0.216225	0.19	0.6819
ABD	0.1296	1	0.1296	0.11	0.7501
ACD	0.483025	1	0.483025	0.42	0.5445
BCD	0.616225	1	0.616225	0.54	0.4959
ABCD	0.511225	1	0.511225	0.45	0.5334
Error total	5.71951	5	1.1439		
Total	143.849	20			

*Las fuentes de variación con efectos posiblemente significativos sobre el área total de antibióticos tienen un p-valor<0.05

La ecuación 28 es el modelo regresión generado para la respuesta antibióticos totales con variables codificadas (x_1 =tiempo, x_2 = velocidad, x_3 = %NaCl y x_4 =%ACN).

$$\hat{y} = 8.721 + 0.026x_1 + 1.286x_2 + 2.032x_3 + 0.714x_4 + 1.064x_1x_2 + 0.395x_1x_3 - 0.454x_1x_4 + 0.933x_2x_3 + 0.006x_2x_4 - 0.060x_3x_4 + 0.097x_1x_2x_3 + 0.071x_1x_2x_4 + 0.155x_1x_3x_4 - 0.178x_2x_3x_4 - 0.160x_1x_2x_3x_4 \dots \dots \dots \text{Ec. 28}$$

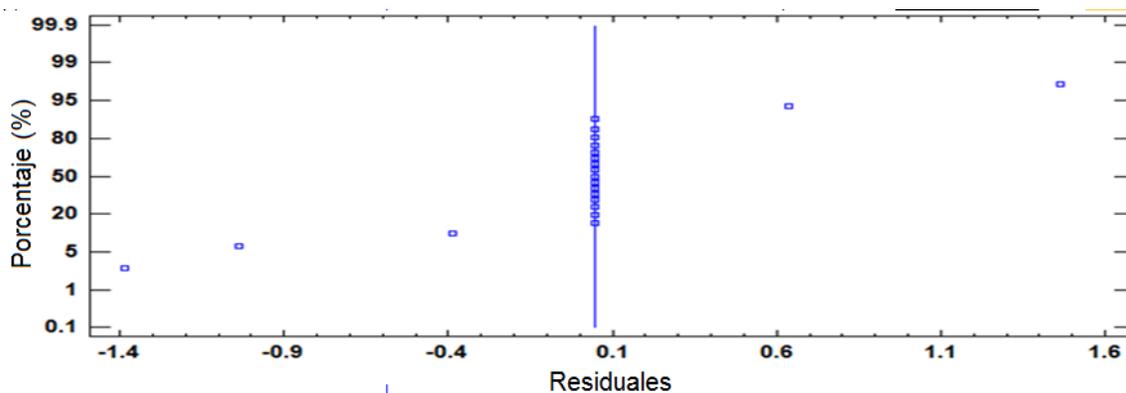


Figura 68. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.

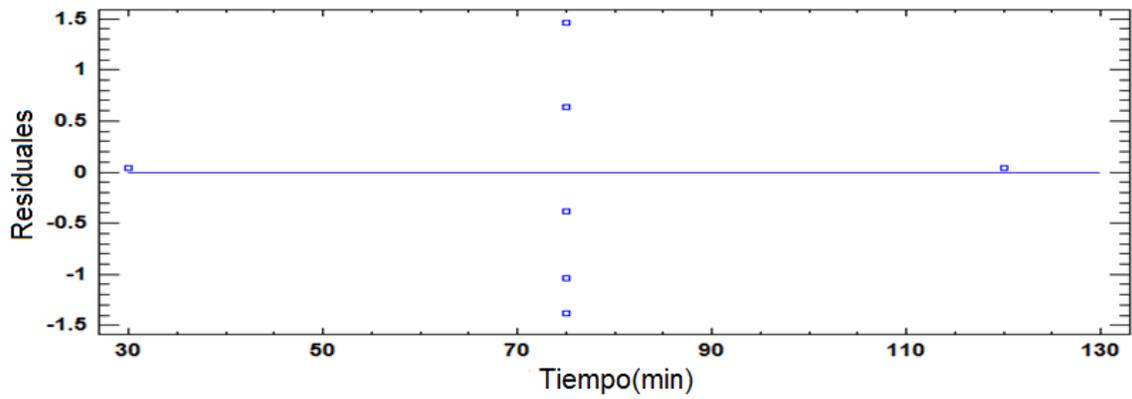


Figura 69. Residuales contra tiempo para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.

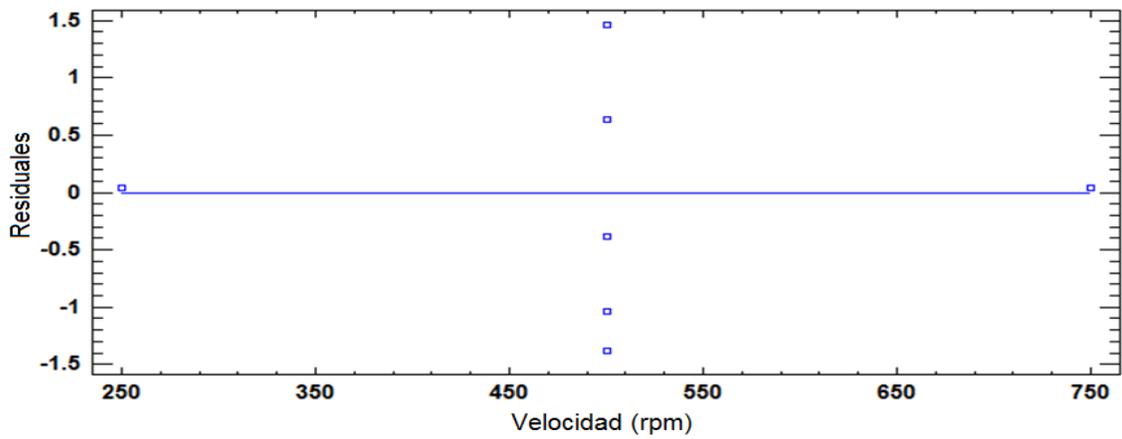


Figura 70. Residuales contra velocidad para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.

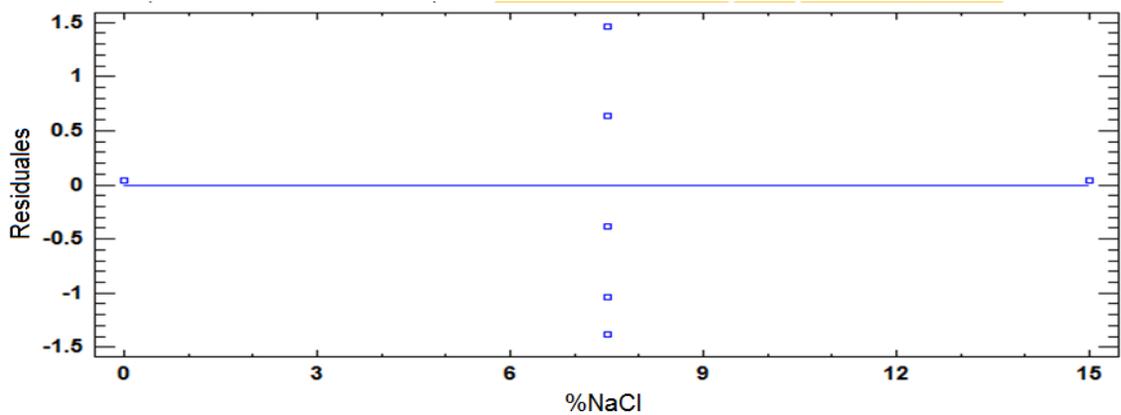


Figura 71. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.

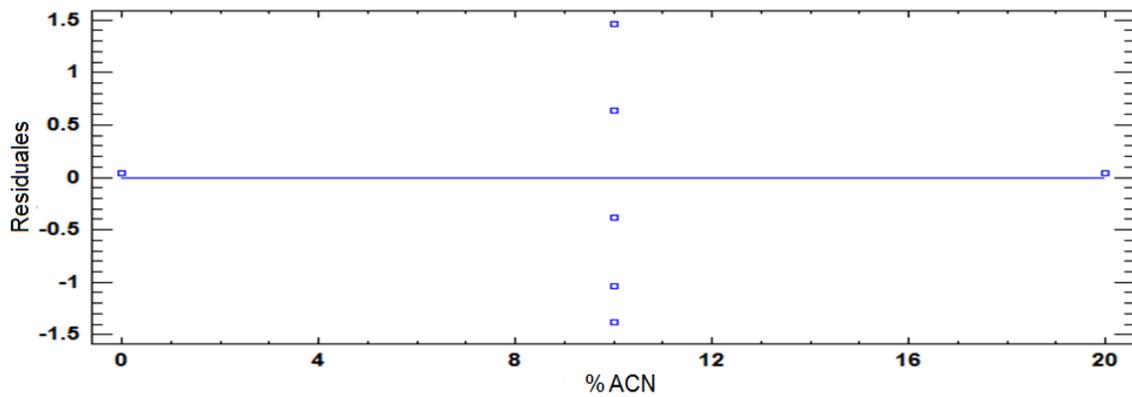


Figura 72. Residuales contra %ACN para el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.

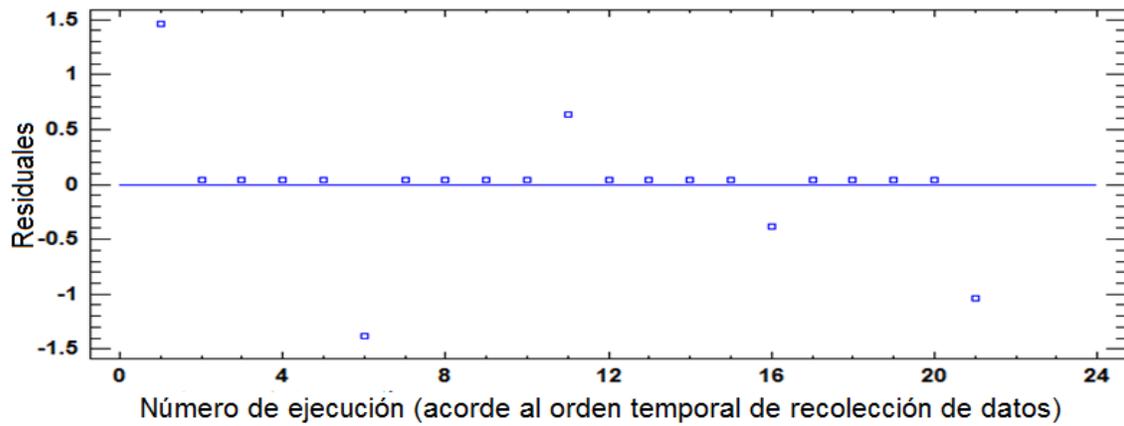


Figura 73. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial completo 2^4

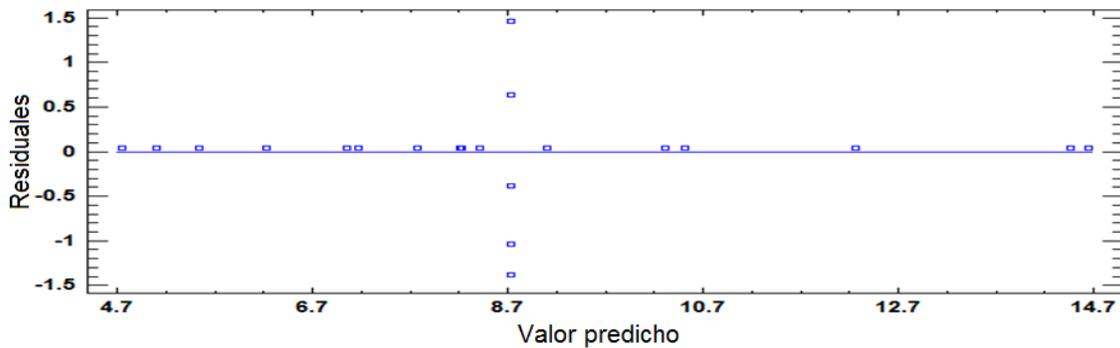


Figura 74. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial completo 2^4 ajustado a la respuesta antibióticos totales.

Anexo C. Análisis estadístico del modelo factorial 2⁴ depurado (orden máximo de interacción: 2) para el inverso del área total de antibióticos.

Tabla 18. Análisis de varianza para antibióticos totales con transformación de respuesta tipo recíproca (1/y) para el área total de antibióticos.

Fuente	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de libertad (g.l.)	Cuadrado Medio (CM)	Razón F	p-valor
A:Tiempo	0.0002203	1	0.0002203	0.89	0.4001
B:Velocidad	0.00340891	1	0.00340891	13.70	0.0208
C:%NaCl	0.0128251	1	0.0128251	51.53	0.0020
D:%ACN	0.00169394	1	0.00169394	6.81	0.0595
AB	0.00414641	1	0.00414641	16.66	0.0151
AC	0.000212981	1	0.000212981	9.86	0.4073
AD	0.00127305	1	0.00127305	5.12	0.0865
BC	0.000493509	1	0.000493509	1.98	0.2319
BD	0.0000814539	1	0.000081453	0.33	0.5979
CD	0.000140556	1	0.000140556	0.56	0.4941
Error puro	0.000995512	4	0.000248878		
Total	0.0278869	20			

*Las fuentes de variación con efectos significativos sobre el recíproco del área total de antibióticos tienen un p-valor<0.05.

La ecuación 29 es el modelo regresión generado para el recíproco respuesta antibióticos totales (1/y) con variables codificadas(x₁=tiempo, x₂= velocidad, x₃= %NaCl y x₄=%ACN).

$$1/y = 0.1246 + 3.71 \times 10^{-3} x_1 - 0.0146 x_2 - 0.02831 x_3 - 0.1029 x_4 - 0.0161 x_1 x_2 - 0.00365 x_1 x_3 + 8.92 \times 10^{-3} x_1 x_4 - 5.55 \times 10^{-3} x_2 x_3 - 2.26 \times 10^{-3} x_2 x_4 + 2.96 \times 10^{-3} x_3 x_4 \dots \dots \dots \text{Ec. 29}$$

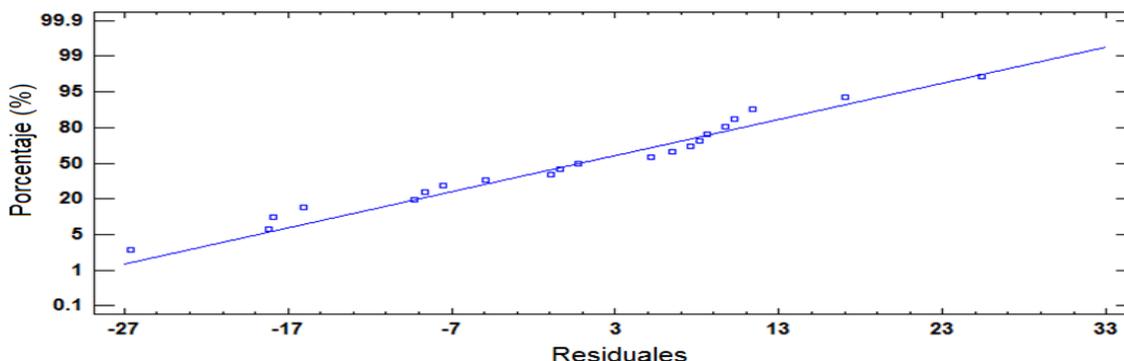


Figura 75. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2⁴ (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.

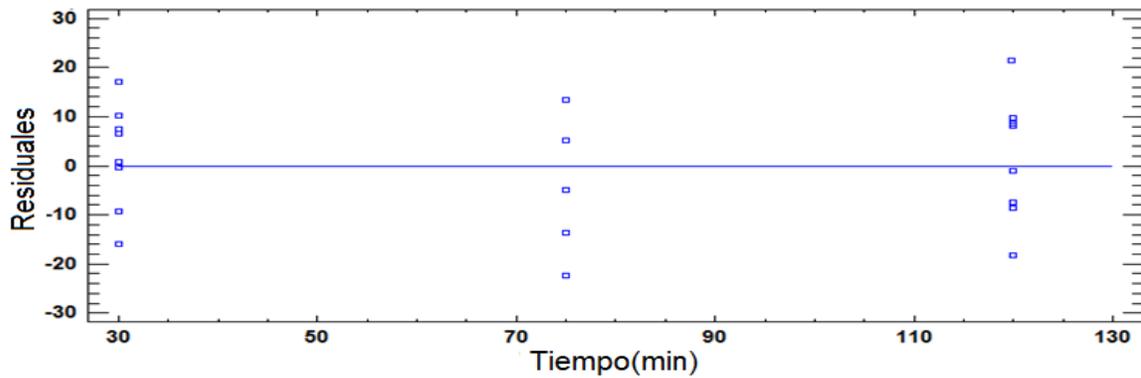


Figura 76. Residuales contra tiempo para el modelo factorial completo 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales $1/y$.

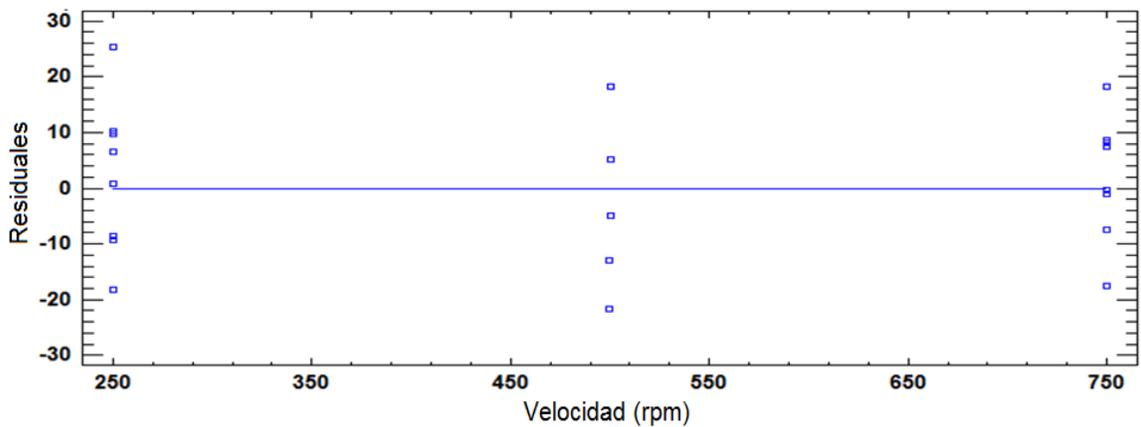


Figura 77. Residuales contra velocidad para el modelo factorial completo 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales $1/y$.

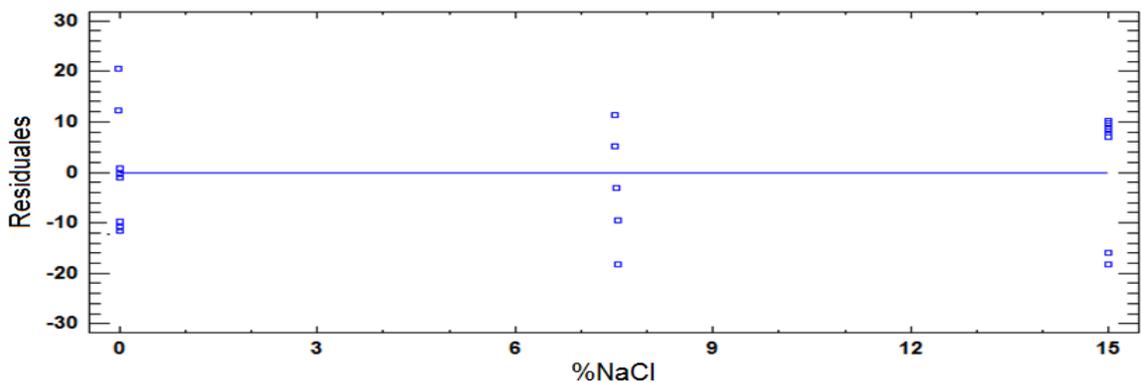


Figura 78. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial completo 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales $1/y$.

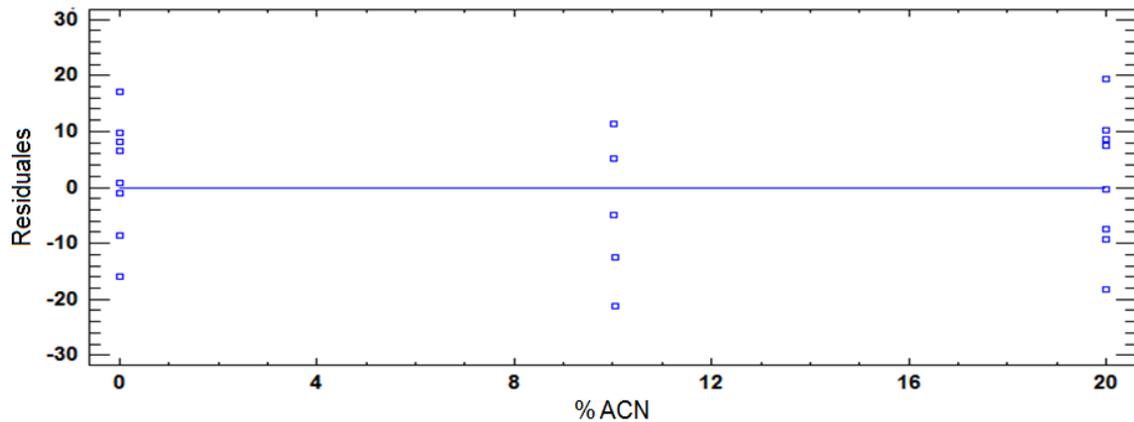


Figura 79. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.

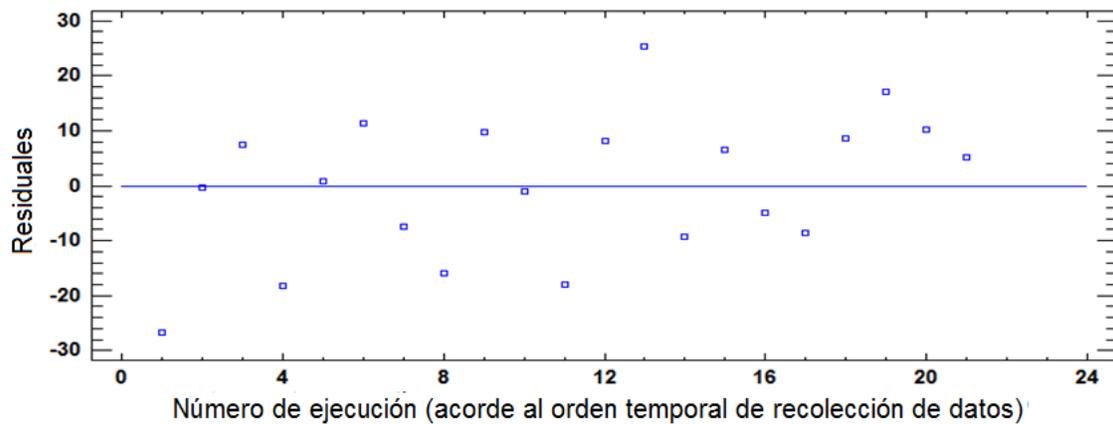


Figura 80. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.

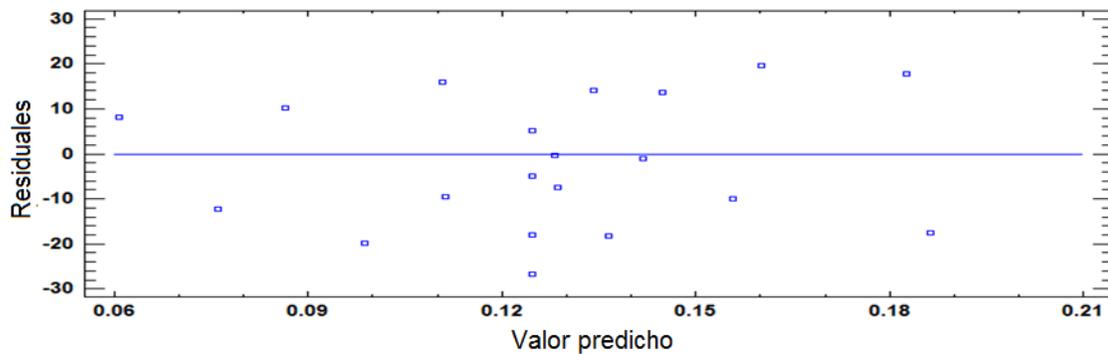


Figura 81. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado al recíproco de la respuesta antibióticos totales 1/y.

Anexo D. Análisis estadístico del modelo factorial 2⁴ depurado (orden máximo de interacción: 2) para analizar la extracción de sulfatiazol.

Tabla 19. Análisis de varianza para sulfatiazol con máximo orden de interacción 2.

Fuente	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de libertad (g.l.)	Cuadrado Medio (CM)	Razón F	p-valor
A:Tiempo	0.538389	1	0.538389	0.72	0.4172
B:Velocidad	24.3913	1	24.3913	32.44	0.0002
C:%NaCl	23.2204	1	23.2204	30.88	0.0002
D:%ACN	4.63864	1	4.63864	6.17	0.0323
AB	19.5033	1	19.5033	25.94	0.0005
AC	0.266514	1	0.266514	0.35	0.5648
AD	9.85175	1	9.85175	13.10	0.0047
BC	12.951	1	12.951	17.23	0.0020
BD	0.470939	1	0.470939	0.63	0.4470
CD	3.26254	1	3.26254	4.34	0.0639
Error (Residuo)	7.51834	10	0.751834		
Total	106.613	20			

*Las fuentes de variación con efectos significativos sobre el área de sulfatiazol tienen un p-valor<0.05

La ecuación 30 es el modelo regresión generado para el recíproco respuesta sulfatiazol con variables codificadas(x_1 =tiempo, x_2 = velocidad, x_3 = %NaCl y x_4 =%ACN).

$$\hat{y}=5.682+-0.183x_1+1.235x_2+1.205x_3+0.538x_4+1.104x_1x_2+0.129x_1x_3-0.785x_1x_4+0.90x_2x_3-0.172x_2x_4-0.452x_3x_4.....Ec. 30$$

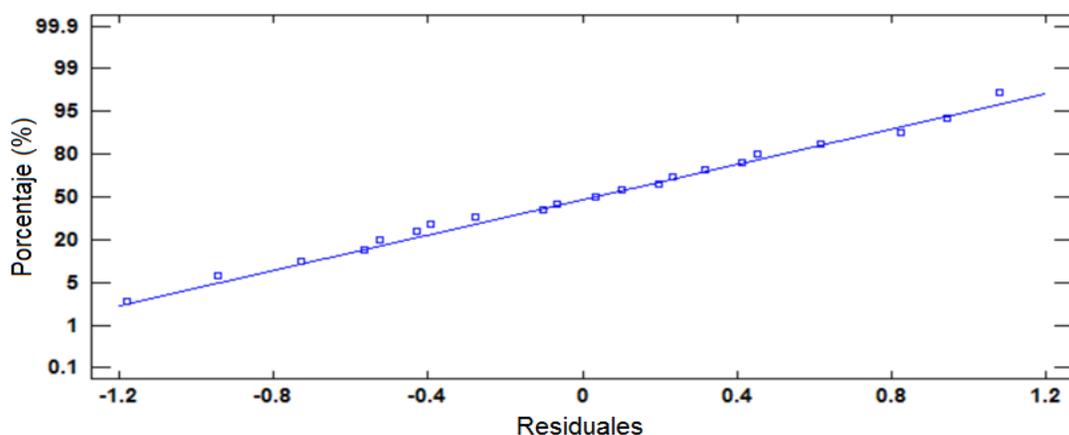


Figura 82. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2⁴ (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfatiazol.

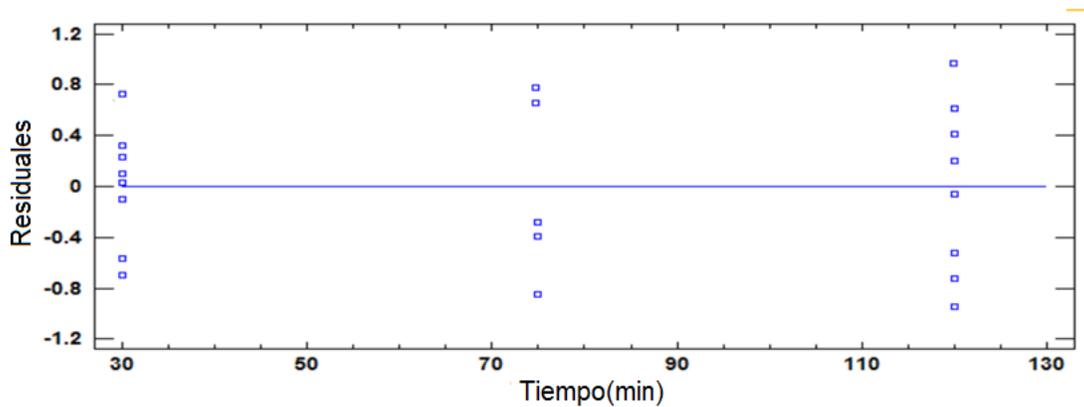


Figura 83. Residuales contra tiempo para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfatiazol.

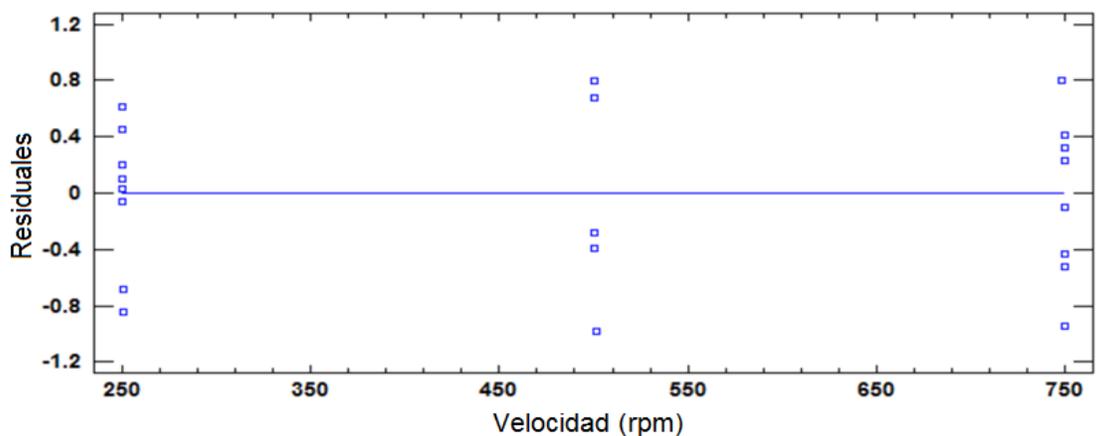


Figura 84. Residuales contra velocidad para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfatiazol.

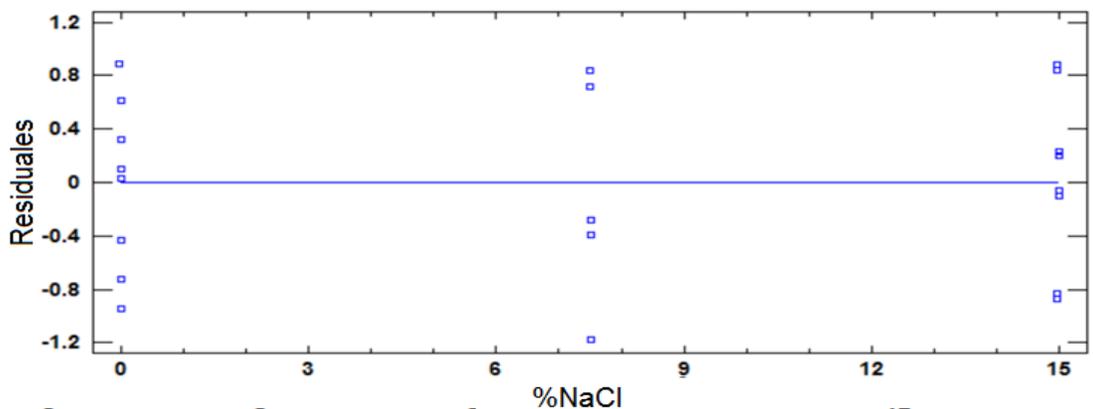


Figura 85. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfatiazol.

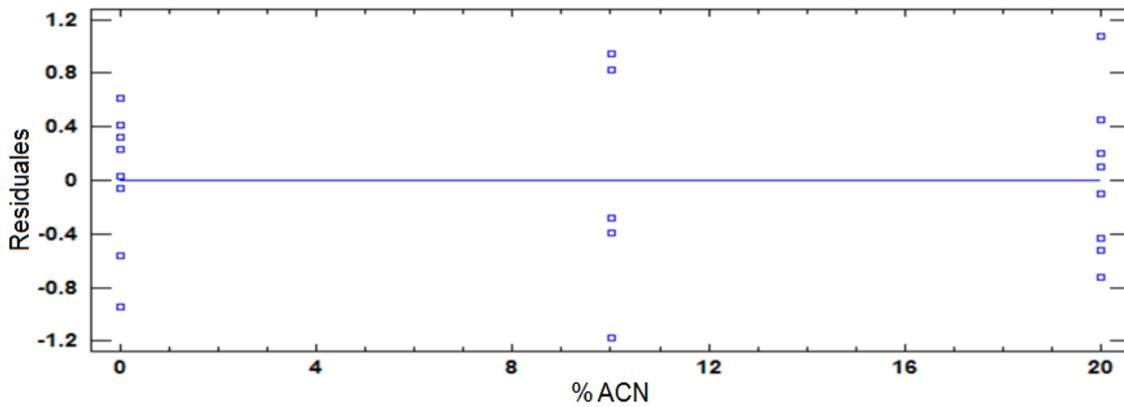


Figura 86. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfatiazol.

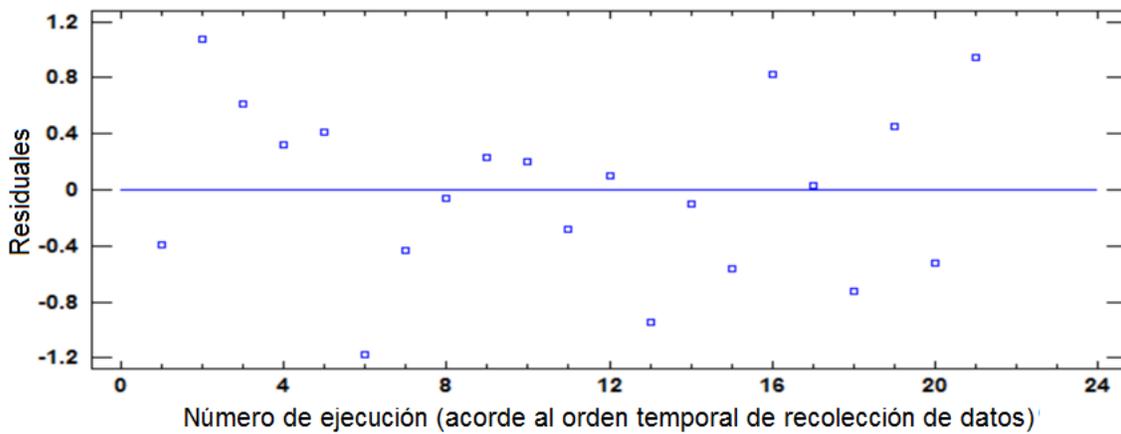


Figura 87. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfatiazol.

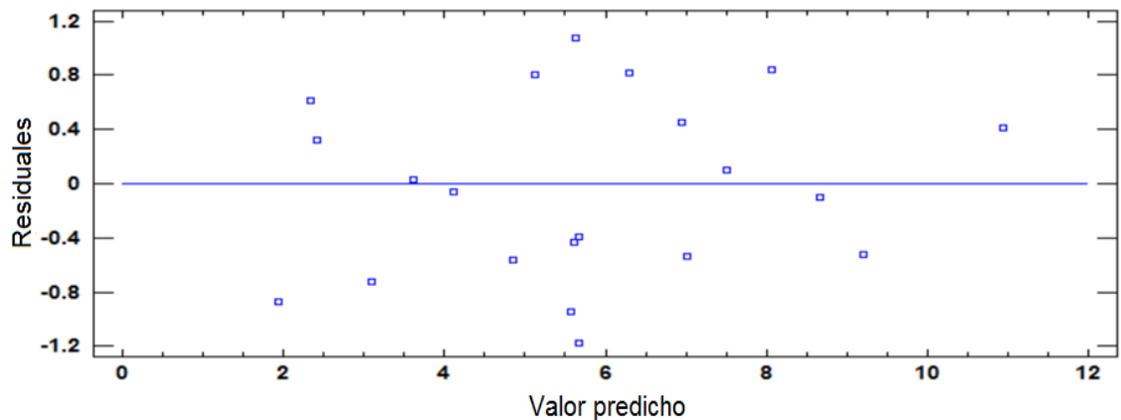


Figura 88. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfatiazol.

Anexo E. Análisis estadístico del modelo factorial 2⁴ depurado (orden máximo de interacción: 2) para analizar la extracción de sulfametoxazol.

Tabla 20. Análisis de varianza para sulfametoxazol con máximo orden de interacción 2.

Fuente	Suma de Cuadrados (SC)	de Grados de libertad (g.l.)	de Cuadrado Medio (CM)	Razón F	p-valor
A:Tiempo	1.67703	1	1.67703	2.96	0.1162
B:Velocidad	0.6724	1	0.6724	1.19	0.3017
C:%NaCl	23.961	1	23.961	42.26	0.0001
D:%ACN	3.22203	1	3.22203	5.68	0.0384
AB	0.390625	1	0.390625	0.69	0.4259
AC	0.8464	1	0.8464	1.49	0.2498
AD	0.3136	1	0.3136	0.55	0.4742
BC	1.45203	1	1.45203	2.56	0.1406
BD	2.94123	1	2.94123	5.19	0.0460
CD	4.6656	1	4.6656	8.23	0.0167
Error total	5.67043	10	0.567043		
Total (corr.)	45.8124	20			

*Las fuentes de variación con efectos significativos sobre el área de sulfametoxazol tienen un p-valor<0.05

La ecuación 31 es el modelo regresión generado para el recíproco respuesta sulfametoxazol con variables codificadas(x_1 =tiempo, x_2 = velocidad, x_3 = %NaCl y x_4 =%ACN).

$$y=2.555+0.324x_1+0.205x_2+1.224x_3+0.449x_4+0.159x_1x_2+0.230x_1x_3+0.14x_1x_4+0.301x_2x_3+0.429x_2x_4+0.540x_3x_4\text{.....Ec. 31}$$

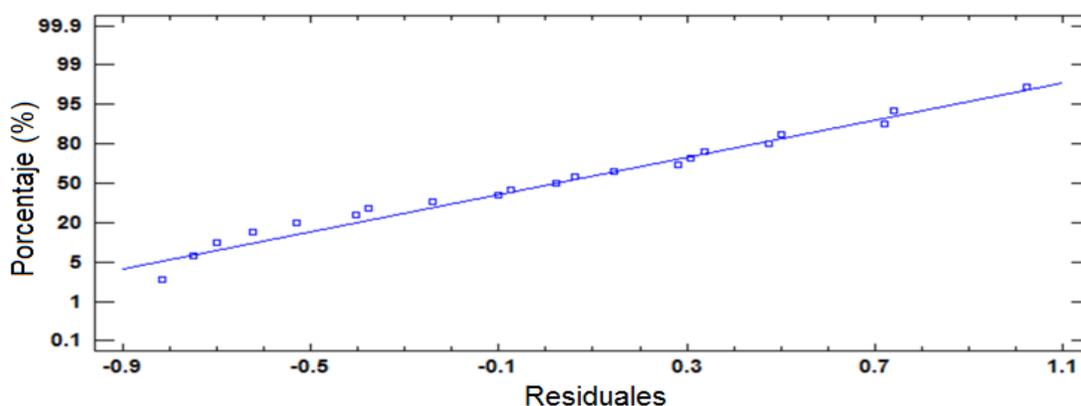


Figura 89. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2⁴ (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfametoxazol.

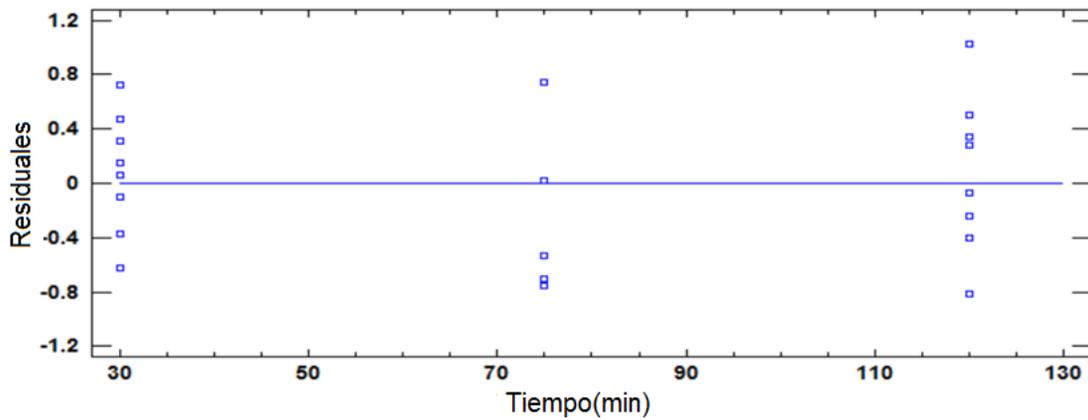


Figura 90. Residuales contra tiempo para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfametoxazol.

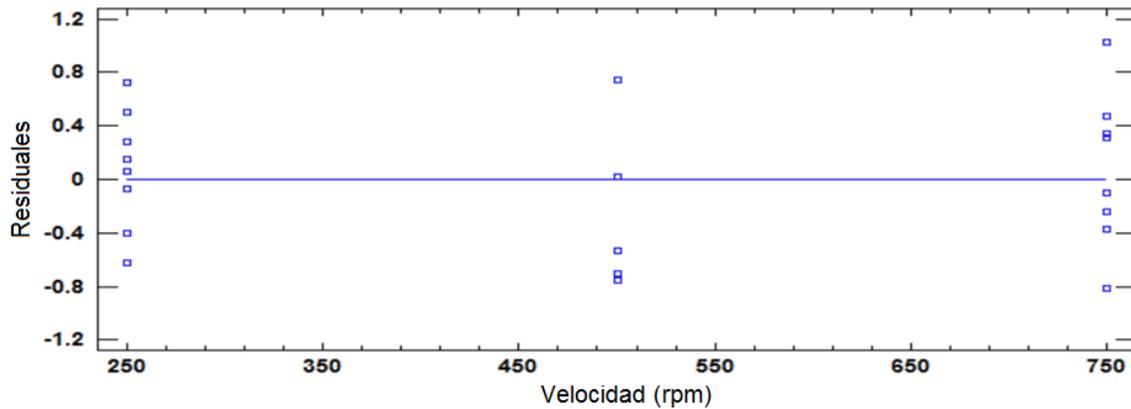


Figura 91. Residuales contra velocidad para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfametoxazol.

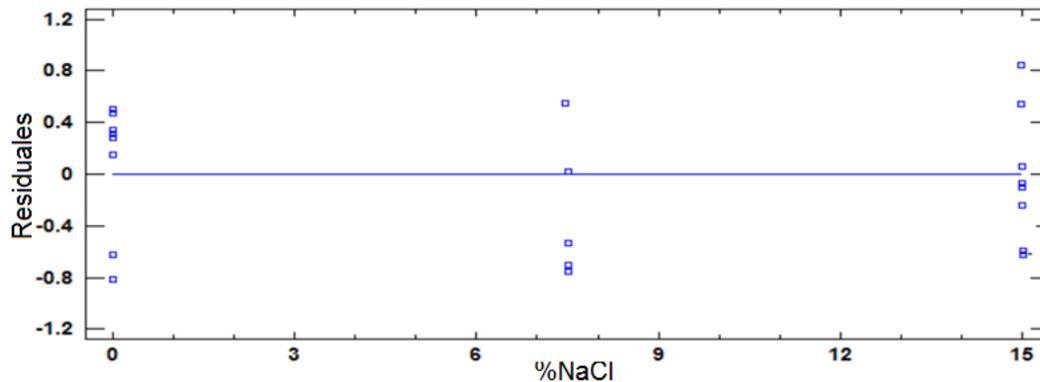


Figura 92. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfametoxazol.

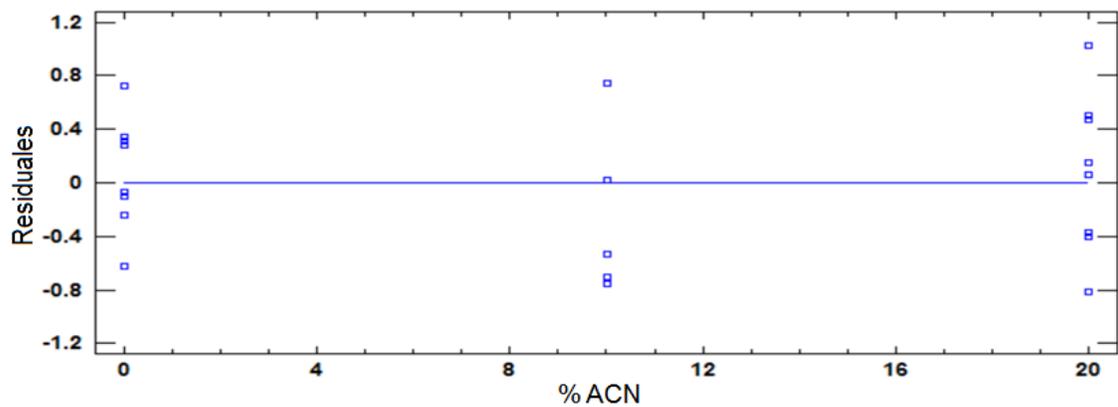


Figura 93. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado la respuesta sulfametoxazol.

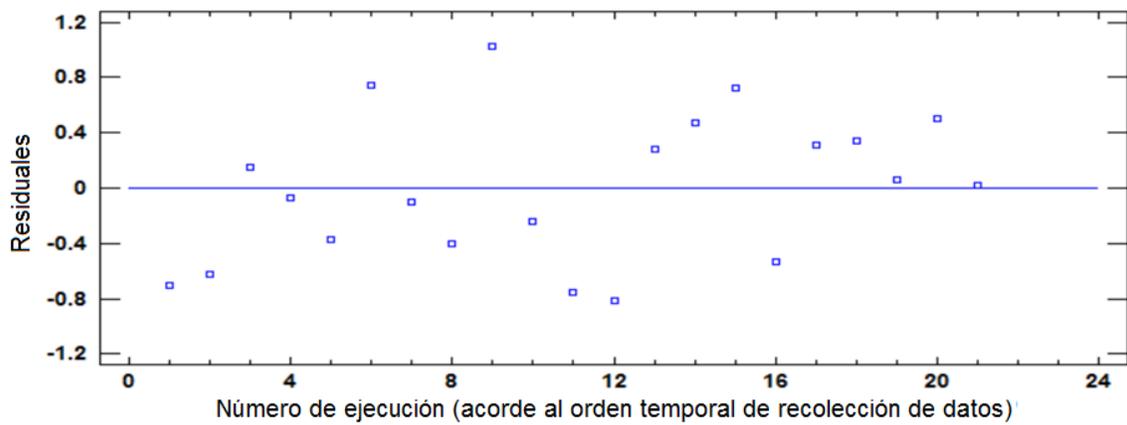


Figura 94. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfametoxazol.

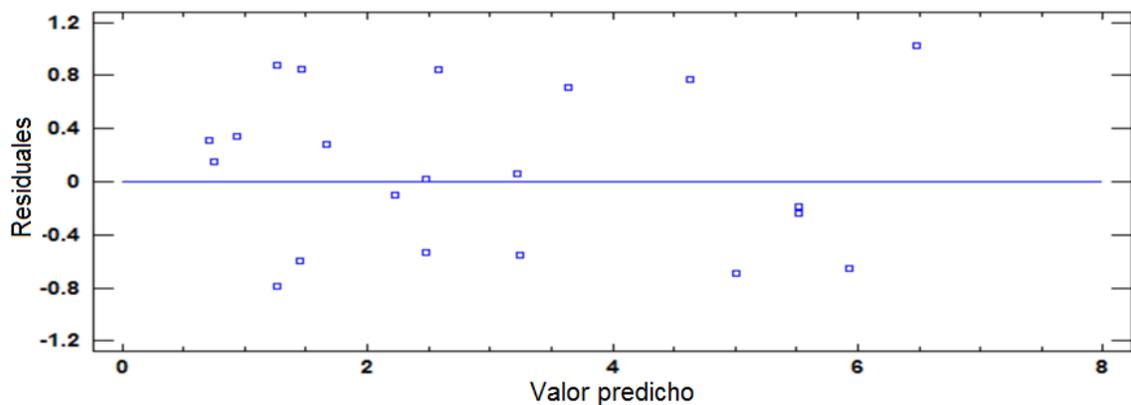


Figura 95. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta sulfametoxazol.

Anexo F. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 completo para analizar la extracción de cloranfenicol.

Tabla 21. Análisis de varianza completo para el área de cloranfenicol.

Fuente	Suma de Cuadrados (SC)	de Grados de libertad (g.l.)	de Cuadrado Medio (CM)	Razón F	p-valor
A:Tiempo	0.087025	1	0.087025	3.40	0.1243
B:Velocidad	0.0729	1	0.0729	2.85	0.1521
C:%NaCl	0.235225	1	0.235225	9.20	0.0290
D:%ACN	0.01	1	0.01	0.39	0.5591
AB	0.0025	1	0.0025	0.10	0.7671
AC	0.015625	1	0.015625	0.61	0.4697
AD	0.0289	1	0.0289	1.13	0.3363
BC	0.0004	1	0.0004	0.02	0.9053
BD	0.093025	1	0.093025	3.64	0.1147
CD	0.0961	1	0.0961	3.76	0.1102
ABC	0.0324	1	0.0324	1.27	0.3113
ABD	0.093025	1	0.093025	3.64	0.1147
ACD	0.0324	1	0.0324	1.27	0.3113
BCD	0.099225	1	0.099225	3.88	0.1059
ABCD	0.126025	1	0.126025	4.93	0.0771
Error total	0.127806	5	0.0255612		
Total (corr.)	1.15258	20			

*Las fuentes de variación con efectos significativos sobre el área de cloranfenicol tienen un p-valor < 0.05

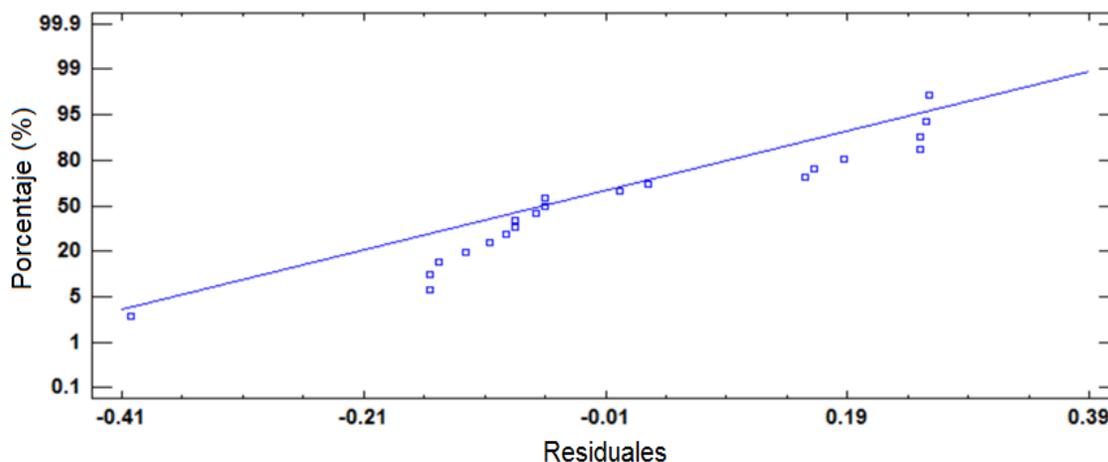


Figura 96. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.

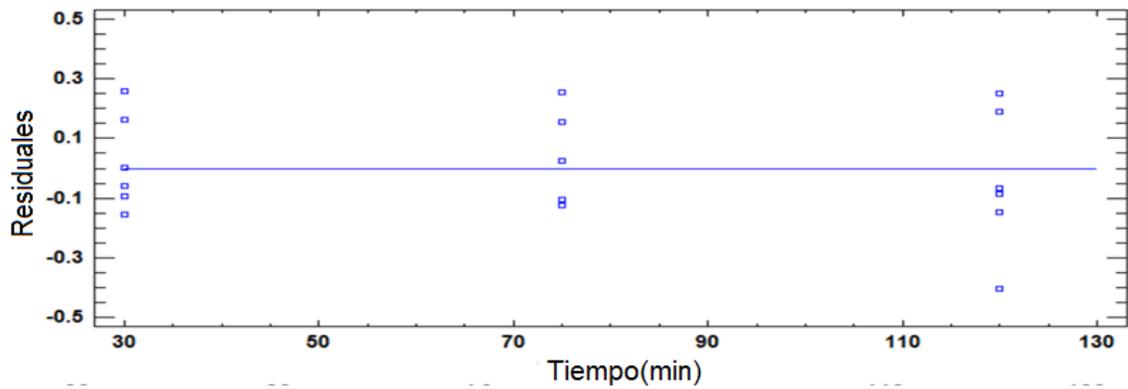


Figura 97. Residuales contra tiempo para el modelo factorial 2⁴ ajustado a la respuesta cloranfenicol.

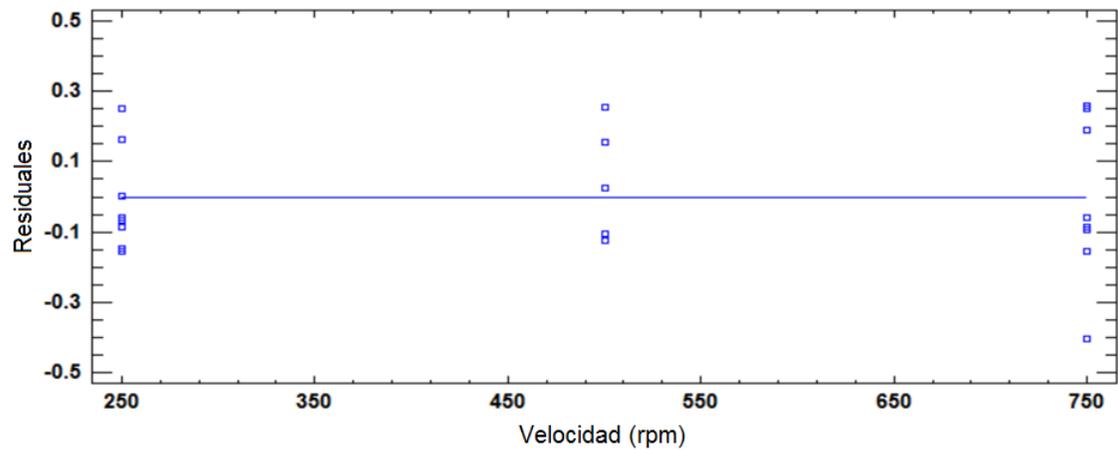


Figura 98. Residuales contra velocidad para el modelo factorial 2⁴ ajustado a la respuesta cloranfenicol.

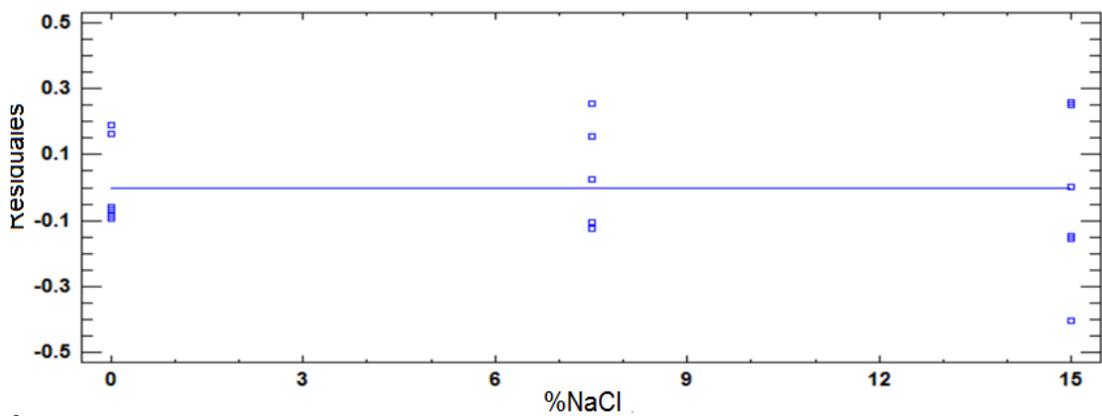


Figura 99. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial 2⁴ ajustado a la respuesta cloranfenicol.

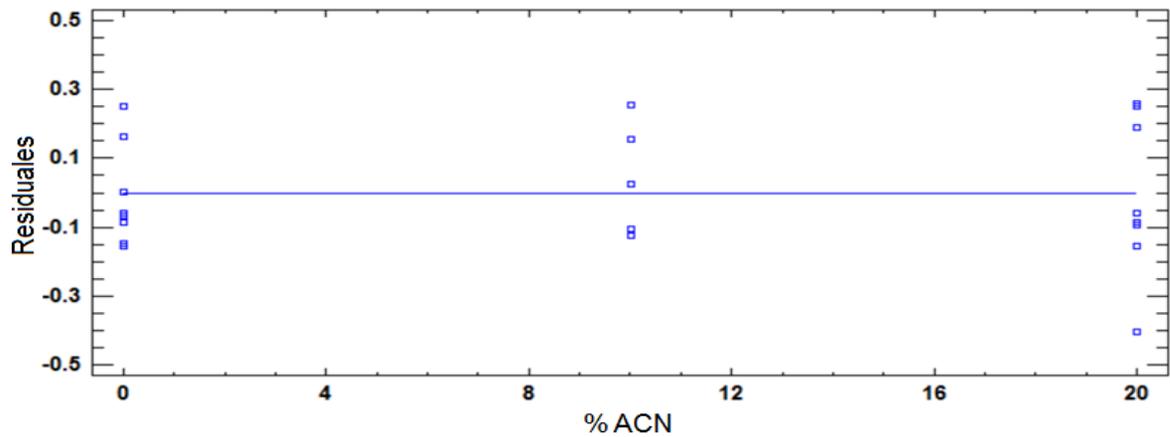


Figura 100. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.

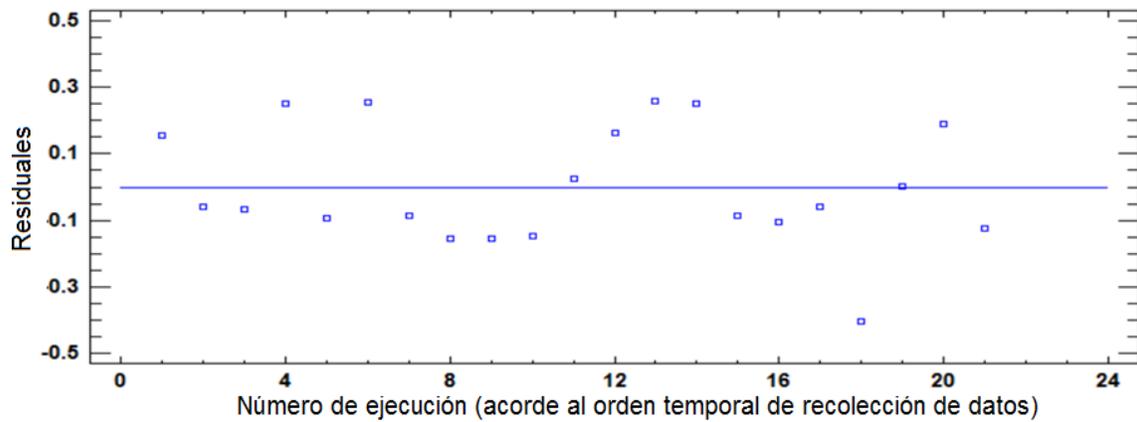


Figura 101. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta cloranfenicol.

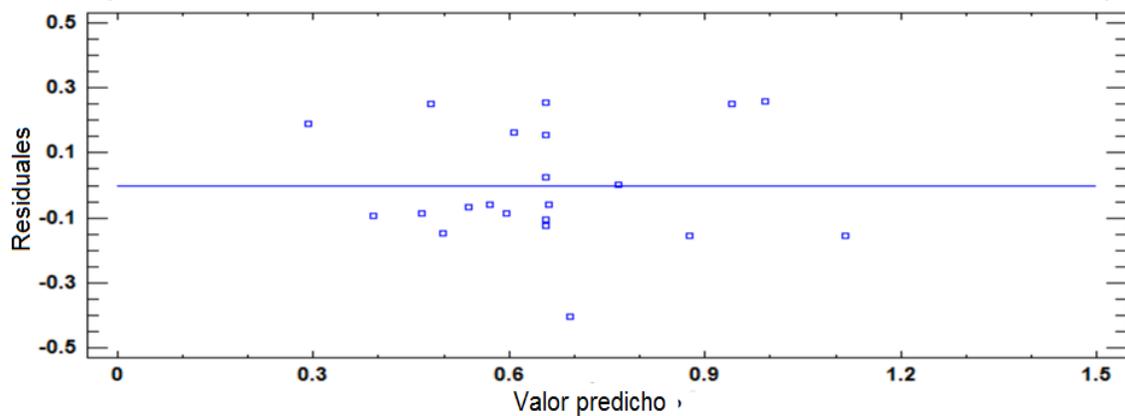


Figura 102. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 a la respuesta cloranfenicol.

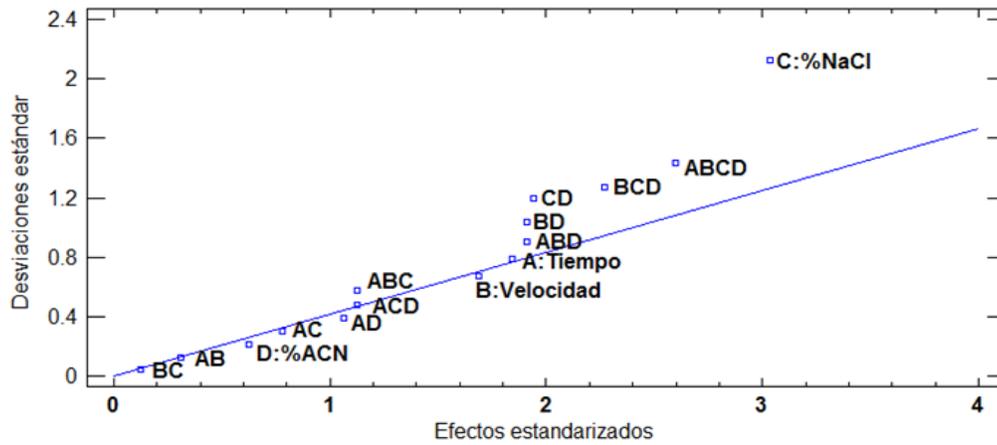


Figura 103. Gráfico de distribución de probabilidad normal para los efectos del diseño factorial 2^4 completo sobre el área del cloranfenicol.

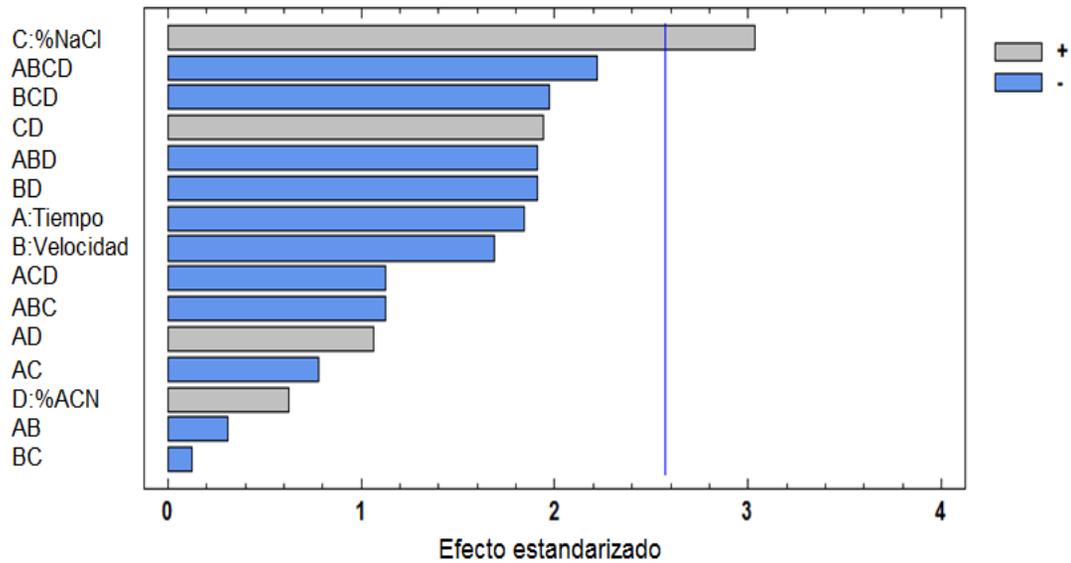


Figura 104. Gráfico de Pareto del diseño factorial 2^4 completo sobre el área del cloranfenicol.

Anexo G. Análisis estadístico del modelo factorial 2^4 completo para analizar la extracción de trimetoprim.

Tabla 22. Análisis de varianza completo para trimetoprim.

Fuente	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de libertad (g.l.)	Cuadrado Medio (CM)	Razón-F	p-valor
A:Tiempo	0.003025	1	0.003025	1.93	0.2374
B:Velocidad	0.0004	1	0.0004	0.25	0.6403
C:%NaCl	0.003025	1	0.003025	1.93	0.2374
D:%ACN	0.002025	1	0.002025	1.29	0.3195
AB	0.004225	1	0.004225	2.69	0.1763
AC	0.0025	1	0.0025	1.59	0.2756
AD	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
BC	0.003025	1	0.003025	1.93	0.2374
BD	0.000025	1	0.000025	0.02	0.9057
CD	0.0	1	0.0	0.00	1.0000
ABC	0.0004	1	0.0004	0.25	0.6403
ABD	0.0036	1	0.0036	2.29	0.2045
ACD	0.003025	1	0.003025	1.93	0.2374
BCD	0.0004	1	0.0004	0.25	0.6403
ABCD	0.000625	1	0.000625	0.40	0.5623
Falta de ajuste	0.000077142	1	0.00007714	0.05	0.8354
Error (Residual)	0.00628	4	0.00157		
Total (corr.)	0.0326571	20			

*Las fuentes de variación con efectos significativos sobre el área de trimetoprim tienen un p-valor<0.05.

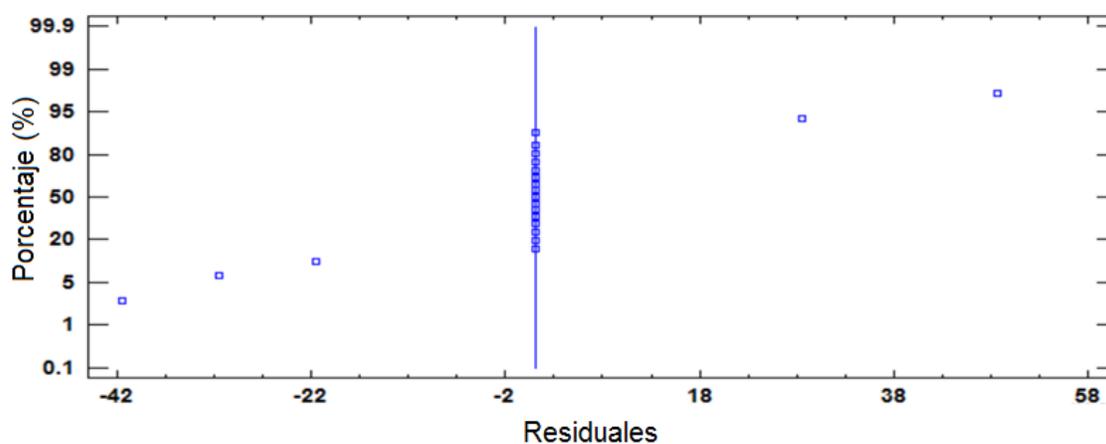


Figura 105. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo factorial 2^4 (orden máximo de interacción: 2) ajustado a la respuesta trimetoprim.

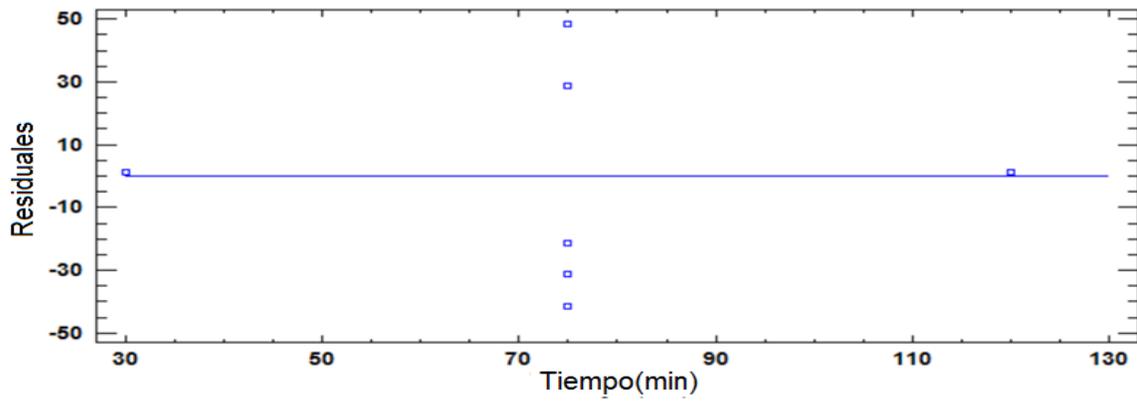


Figura 106. Residuales contra tiempo para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.

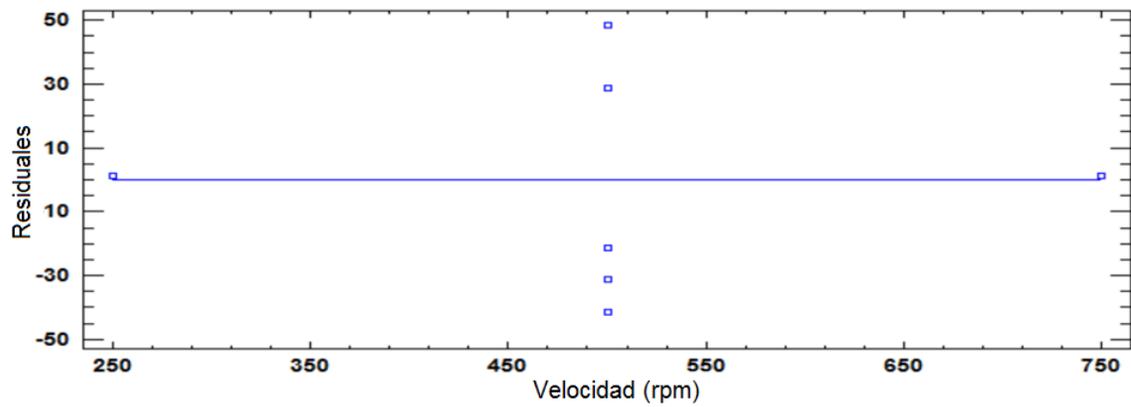


Figura 107. Residuales contra velocidad para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.

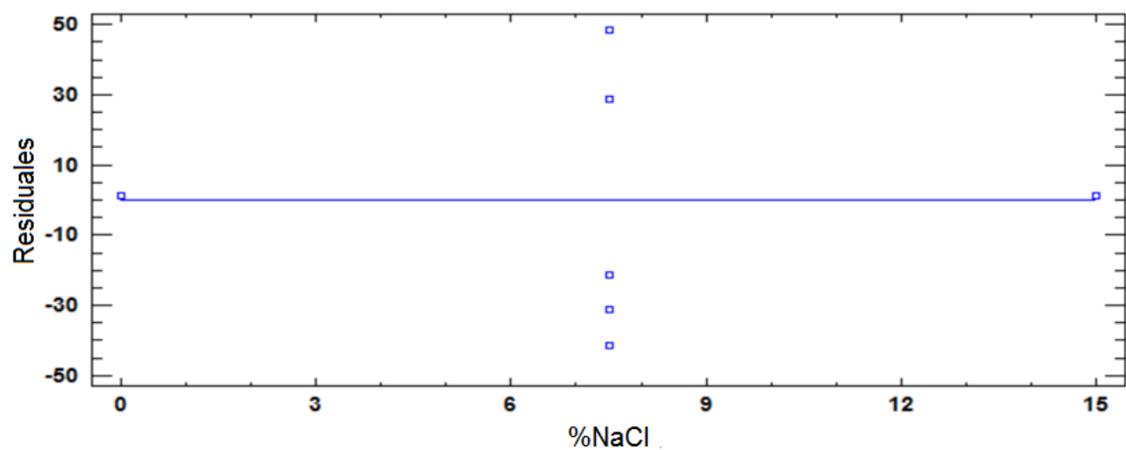


Figura 108. Residuales contra %NaCl para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.

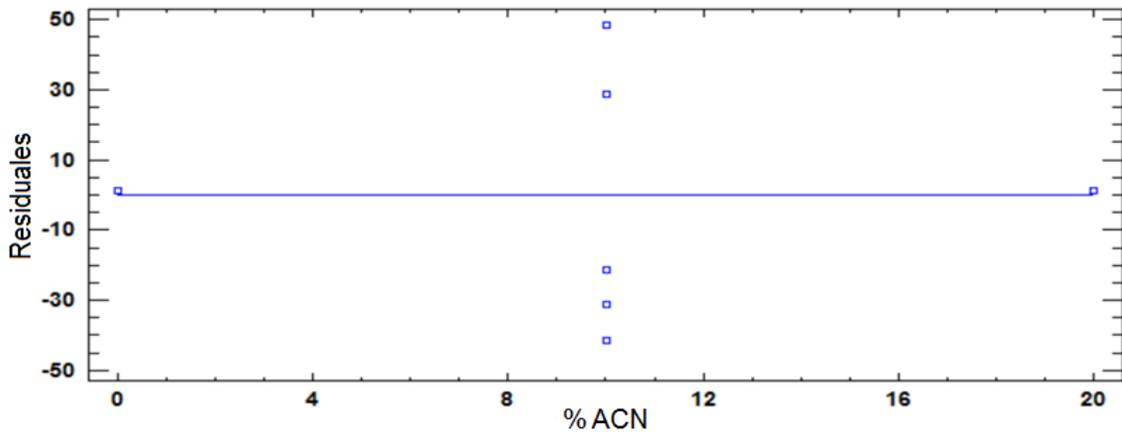


Figura 109. Residuales contra %ACN para el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.

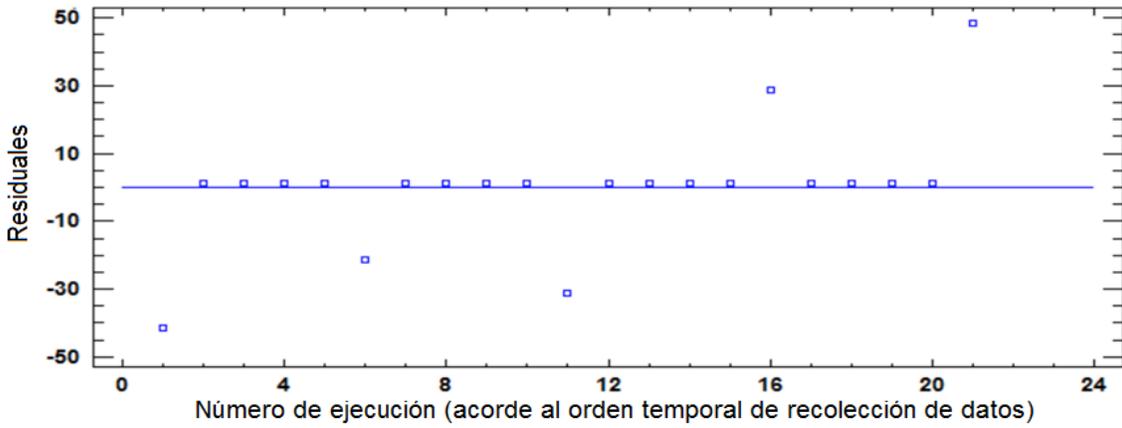


Figura 110. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo factorial ajustado a la respuesta trimetoprim.

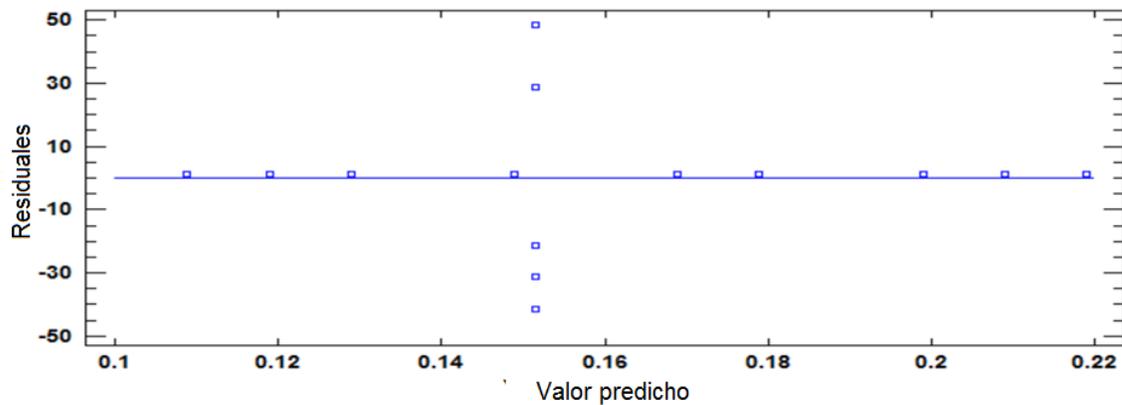


Figura 111. Residuales contra valor predicho por el modelo factorial 2^4 ajustado a la respuesta trimetoprim.

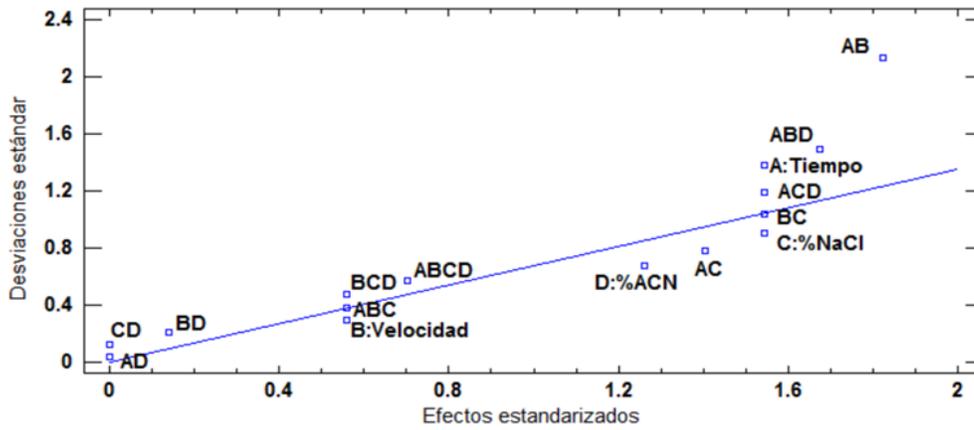


Figura 112. Gráfico de distribución de probabilidad normal para los efectos del diseño factorial 2^4 completo sobre el área del trimetoprim.

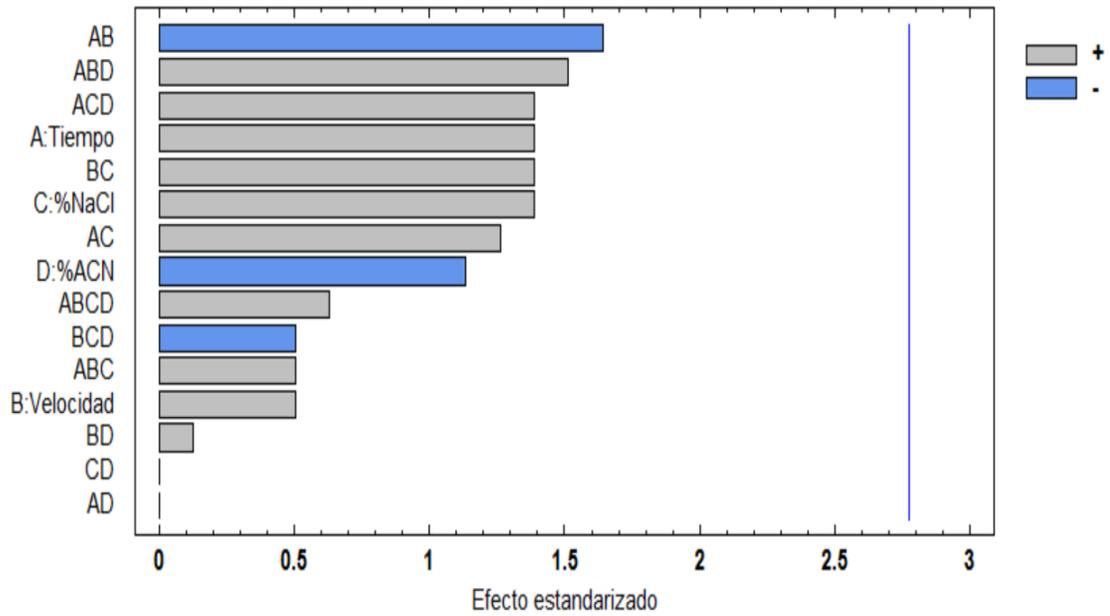


Figura 113. Gráfico de Pareto para los efectos del diseño factorial 2^4 completo sobre el área del trimetoprim.

Anexo H. Análisis de estadístico de la extracción de antibióticos polares ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 1.2$) desde medio orgánico.

Tabla 23. Análisis de varianza bifactorial completo para raíz cuadrada del área de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 1.2$) extraídos en medio orgánico por SBSE.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de libertad (g.l.)	Cuadrado Medio (CM)	Razón-F	p-valor
A:Material	428.119	5	85.6238	25.38	0.0000
B:Antibiótico	1591.11	3	530.37	157.20	0.0000
AB	119.782	15	7.98545	2.37	0.0061
Error (Residual)	323.896	96	3.37392		
Total	2462.91	119			

*Las fuentes de variación con efectos significativos sobre la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ tienen un p-valor < 0.05

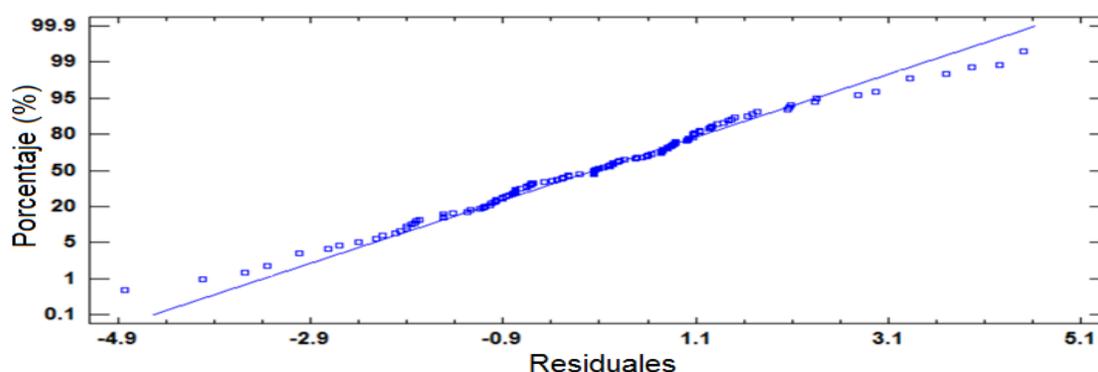


Figura 114. Distribución de probabilidad normal de residuales para el modelo bifactorial de la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 1.2$).

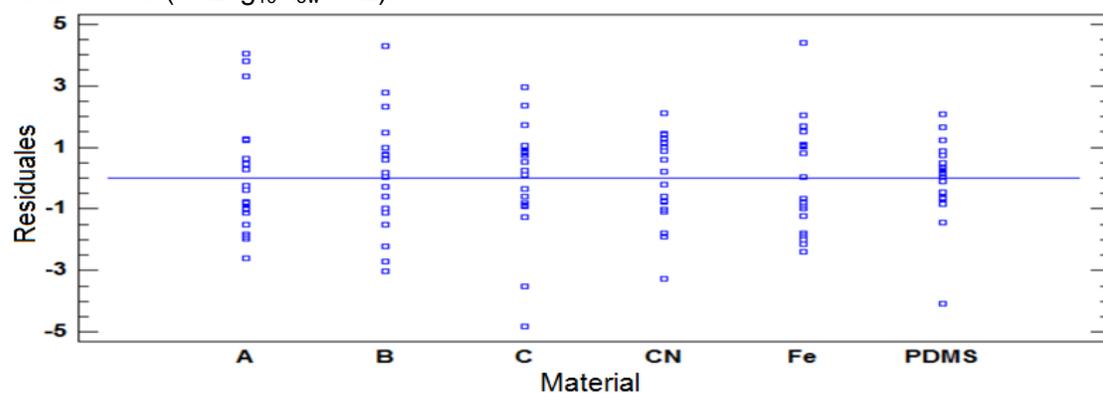


Figura 115. Residuales contra material para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 1.2$).

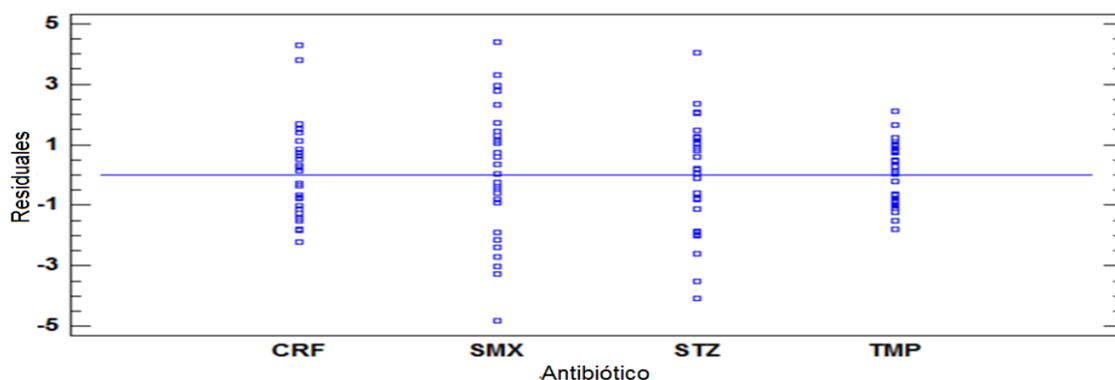


Figura 116. Residuales contra antibiótico para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 1.2$).

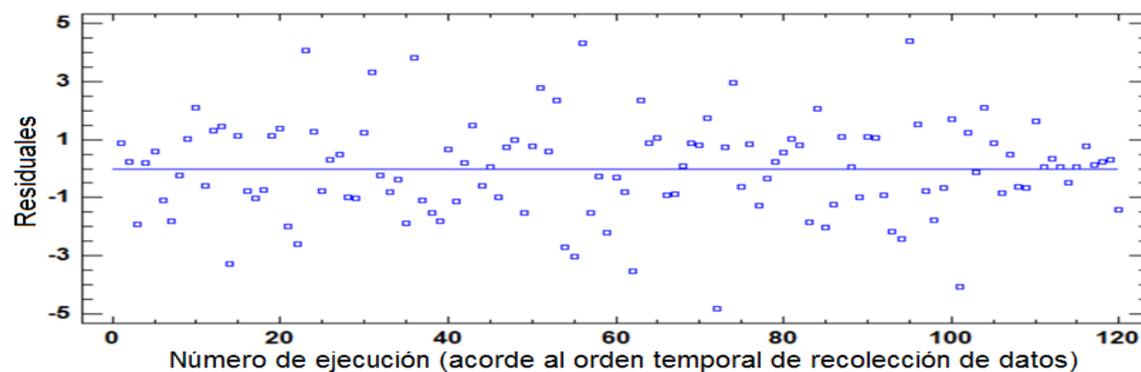


Figura 117. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 1.2$).

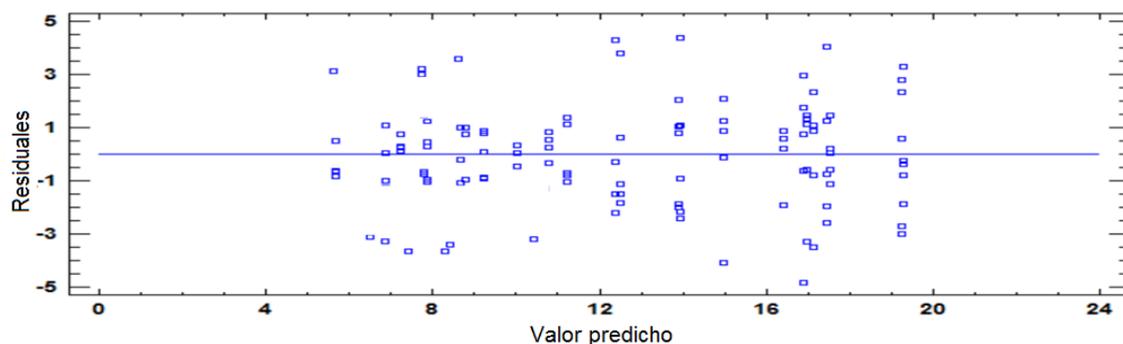


Figura 118. Residuales contra valor predicho para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 1.2$).

Tabla 24. Comparación de medias raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre materiales para la extracción en medio orgánico de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$).

Material	n	Media \pm Desviación estándar	Subgrupos homogéneos de medias*
PDMS-TEOS	20	9.47165 \pm 3.8499	a
PDMS-TEFS	20	10.6272 \pm 3.8224	b
PDMS- CNPrTEOS	20	13.3198 \pm 3.8508	c
C	20	13.5081 \pm 4.0658	cd
A	20	14.2829 \pm 4.9636	cd
B	20	14.4852 \pm 4.6546	d

* Promedios con distinta letra difieren (p-valor<0.05), prueba LSD ($\alpha=0.05$).

Tabla 25. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 1.2$) para la extracción en medio orgánico.

Material	n	Media \pm Desviación estándar	Subgrupos homogéneos de medias*
TMP	30	7.84222 \pm 1.6269	a
CRF	30	10.3220 \pm 2.6113	b
SMX	30	16.0657 \pm 3.9245	c
STZ	30	16.2334 \pm 2.2791	c

* Promedios con distinta letra difieren (p-valor<0.05), prueba LSD ($\alpha=0.05$).

Tabla 26. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre grupos material-antibiótico ($0 < \log_{10}K_{OW} < 1.2$) para la extracción en medio orgánico.

Material-(Antibiótico)	n	Media \pm Desviación estándar	Grupos homogéneos de medias*
A-SMX	5	19.3033 \pm 1.9561	a
A-STZ	5	17.4524 \pm 2.7053	a
A-CRF	5	12.5118 \pm 2.3293	b
A-TMP	5	7.86425 \pm 0.9861	c
B-SMX	5	19.2673 \pm 2.7410	a
B-STZ	5	17.5353 \pm 0.9811	a
B-CRF	5	12.3653 \pm 2.5437	b
B-TMP	5	8.77284 \pm 1.1591	c
(PDMS-CNP Γ TEOS)- SMX	5	16.9840 \pm 2.0163	a
(PDMS-CNP Γ TEOS)-STZ	5	16.4071 \pm 1.0981	a
(PDMS-CNP Γ TEOS)-CRF	5	11.2332 \pm 1.1616	b
(PDMS-CNP Γ TEOS)-TMP	5	8.65502 \pm 1.5729	c
C-STZ	5	17.1415 \pm 2.2580	a
C-SMX	5	16.8805 \pm 3.0010	a
C-CRF	5	10.7976 \pm 0.8359	b
C-TMP	5	9.21290 \pm 0.8694	b
(PDMS-TEFS) -SMX	5	13.9513 \pm 2.8113	a
(PDMS-TEFS) -STZ	5	13.8801 \pm 1.8311	a
(PDMS-TEFS)-CRF	5	7.79903 \pm 1.5256	b
(PDMS-TEFS)-TMP	5	6.87853 \pm 1.1020	b
(PDMS-TEOS)-STZ	5	14.9838 \pm 2.4084	a
(PDMS-TEOS)-SMX	5	10.0078 \pm 0.2951	b
(PDMS-TEOS)-CRF	5	7.22533 \pm 0.8305	c
(PDMS-TEOS)-TMP	5	5.66977 \pm 1.0544	c

* Promedios con distinta letra difieren (p-valor<0.05), prueba LSD ($\alpha=0.05$).

Anexo I. Análisis de estadístico de la extracción de antibióticos polares ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 2$) desde medio orgánico.

Tabla 27. Análisis de varianza bifactorial completo para raíz cuadrada del área de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 2$).

Fuente de variación	Suma de Cuadrados (SC)	Grados de libertad (g.l.)	Cuadrado Medio (CM)	Razón-F	p-valor
A:Material	188.898	5	37.7795	80.15	0.0000
B:Antibiótico	768.459	5	153.692	326.07	0.0000
AB	87.528	25	3.50112	7.43	0.0000
Error (Residual)	33.9371	72	0.471349		
Total	1078.82	107			

*Las fuentes de variación con efectos significativos sobre la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ tienen un p-valor < 0.05 .

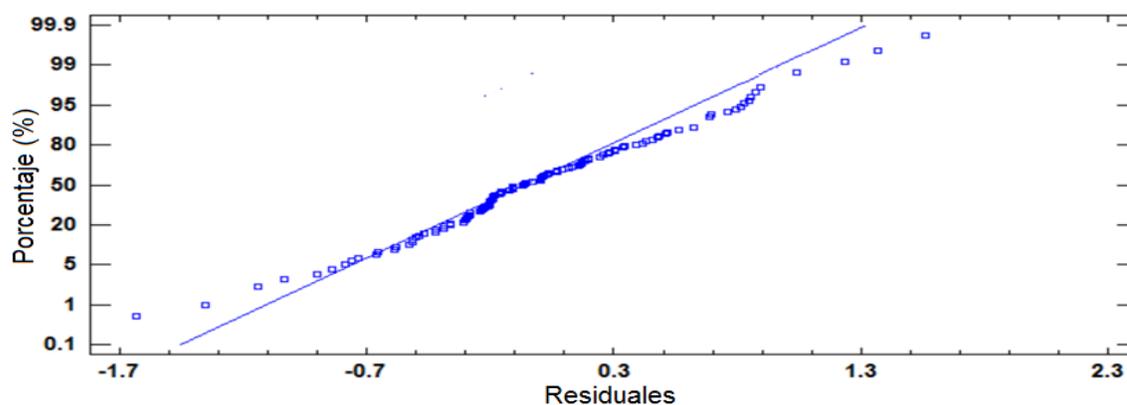


Figura 119. Distribución de probabilidad normal de residuos para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 2$).

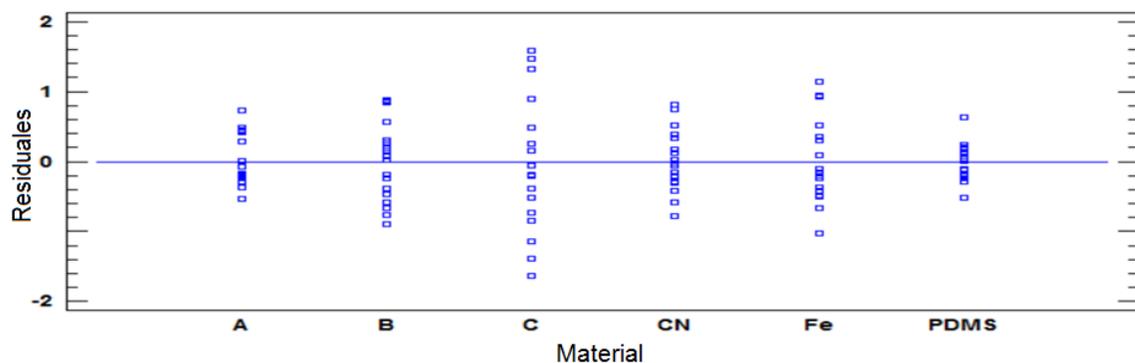


Figura 120. Residuales contra material para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \text{Log}_{10}K_{ow} < 2$).

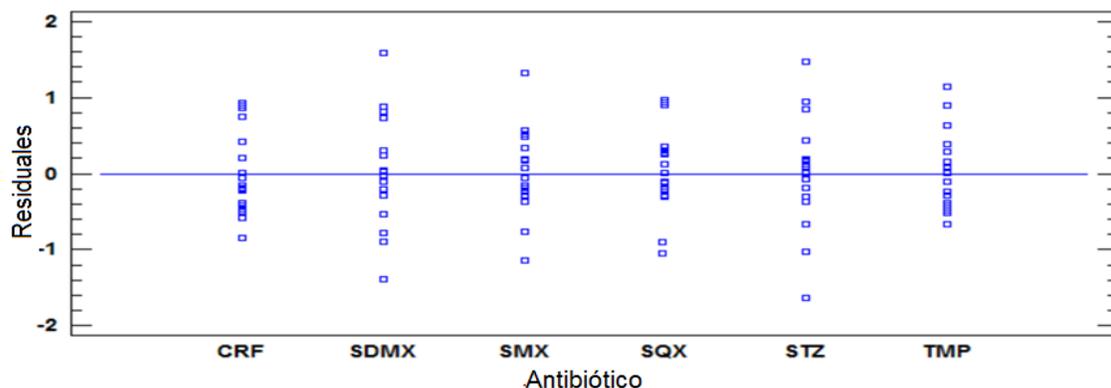


Figura 121. Residuales contra antibiótico para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \log_{10} K_{ow} < 2$).

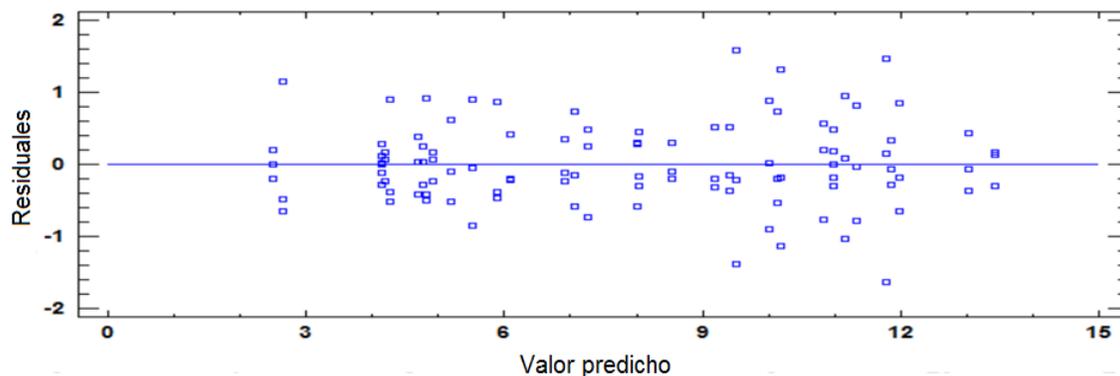


Figura 122. Residuales contra valor predicho para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \log_{10} K_{ow} < 2$).

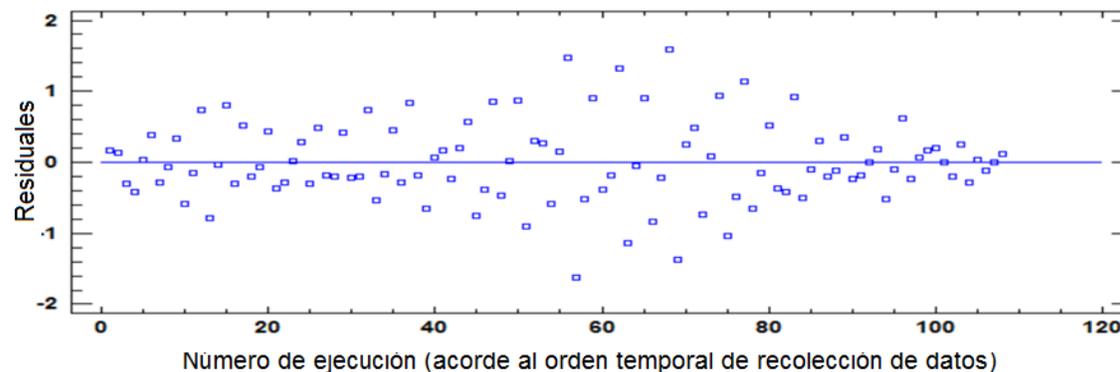


Figura 123. Residuales contra orden temporal de recolección de datos para el modelo bifactorial ajustado a la respuesta $\sqrt{\text{área}}$ obtenido para la extracción en fase orgánica de antibióticos ($0 < \log_{10} K_{ow} < 2$).

Tabla 28. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre materiales para la extracción de antibióticos ($0 < \log_{10} K_{OW} < 2$) en medio orgánico.

Material	n	Media \pm Desviación estándar	Grupos homogéneos de medias*
PDMS-TEOS	20	5.4226 \pm 2.7295	a
PDMS-TEFS	20	7.2515 \pm 2.9917	b
C	20	8.0919 \pm 2.8871	c
B	20	8.4834 \pm 2.8881	cd
A	20	8.7407 \pm 3.1052	d
PDMS-CNP _r TEOS	20	9.5904 \pm 3.1032	e

* Promedios con distinta letra difieren (p-valor<0.05), prueba LSD ($\alpha=0.05$).

Tabla 29. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre antibióticos ($0 < \text{Log}_{10} K_{OW} < 2$) para la extracción en medio orgánico.

Antibiótico	n	Media \pm Desviación estándar	Grupos homogéneos de medias*
TMP	18	4.1929 \pm 0.9515	a
CRF	18	5.3171 \pm 1.5657	b
SQX	18	7.2624 \pm 1.6499	c
SDMX	18	9.0466 \pm 2.2594	d
SMX	18	9.6992 \pm 2.3900	e
STZ	18	12.0623 \pm 1.1664	f

* Promedios con distinta letra difieren (p-valor<0.05), prueba LSD ($\alpha=0.05$).

Tabla 30. Comparación de raíz cuadrada de área ($\sqrt{\text{área}}$) entre grupos material-antibiótico ($0 < \text{Log}_{10}K_{OW} < 2$) para la extracción en medio orgánico.

Material-Antibiótico	n	Media \pm Desviación estándar	Grupos homogéneos de medias*
A-STZ	3	13.0339 \pm 0.40099	a
A-SMX	3	10.9800 \pm 0.42177	b
A-SDMX	3	10.1297 \pm 0.65511	b
A-SQX	3	8.04567 \pm 0.40104	c
A-CRF	3	6.10385 \pm 0.35988	d
A-TMP	3	4.15074 \pm 0.28648	e
B-STZ	3	11.9795 \pm 0.76666	a
B-SMX	3	10.8353 \pm 0.68190	b
B-SDMX	3	9.99492 \pm 0.88726	b
B-SQX	3	8.01899 \pm 0.50360	c
B-CRF	3	5.88674 \pm 0.74456	d
B-TMP	3	4.1851 \pm 0.20591	e
C-STZ	3	11.7878 \pm 1.55969	a
C-SMX	3	10.1823 \pm 1.24119	b
C-SDMX	3	9.51543 \pm 1.49491	b
C-SQX	3	7.26844 \pm 0.64396	c
C-CRF	3	5.52219 \pm 0.87075	d
C-TMP	3	4.27524 \pm 0.78325	e
(PDMS-CNP _r TEOS)-STZ	3	13.4281 \pm 0.26295	a
(PDMS-CNP _r TEOS)-SMX	3	11.8547 \pm 0.31364	b
(PDMS-CNP _r TEOS)-SDMX	3	11.3351 \pm 0.79847	b
(PDMS-CNP _r TEOS)-SQX	3	9.17429 \pm 0.44551	c
(PDMS-CNP _r TEOS)-CRF	3	7.05985 \pm 0.67665	d
(PDMS-CNP _r TEOS)-TMP	3	4.69056 \pm 0.40364	e
(PDMS-TEFS)-STZ	3	11.1552 \pm 0.99108	a
(PDMS-TEFS)-SMX	3	9.41693 \pm 0.46057	b
(PDMS-TEFS)-SDMX	3	8.53807 \pm 0.26820	b
(PDMS-TEFS)-SQX	3	6.92081 \pm 0.30597	c
(PDMS-TEFS)-CRF	3	4.82526 \pm 0.79710	d
(PDMS-TEFS)-TMP	3	2.65256 \pm 0.99293	e
(PDMS-TEOS)-STZ	3	10.9894 \pm 0.18200	a
(PDMS-TEOS)-TMP	3	5.20292 \pm 0.57828	b
(PDMS-TEOS)-SMX	3	4.92575 \pm 0.21333	b
(PDMS-TEOS)-SDMX	3	4.76651 \pm 0.26558	b
(PDMS-TEOS)-SQX	3	4.14612 \pm 0.12062	b
(PDMS-TEOS)-CRF	3	2.50467 \pm 0.19989	c

* Promedios con distinta letra dentro de cada Material-Antibiótico difieren ($P < 0.05$), prueba LSD ($\alpha = 0.05$).

Anexo J. Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
AcEt	Acetato de etilo
ADS	Alquil diol silica
ANOVA	Análisis de varianza
AFM	Microscopía de fuerza atómica
AMPS	Ácido 2-acrilamido-2-metilpropano sulfónico
APTMS	Aminopropiltrimetoxisilano
β -CD	β -ciclodextrina
CE	Electroforesis capilar
CM	Cuadrado medio
CNPrTEOS	3-cianopropiltriethoxisilano
CRF	Cloranfenicol
CTC	Clortetraciclina
CW	Carbowax
CW-TMP	Carbowax templado
DAD	Detector de arreglo de diodos
DC	Doxiciclina
DCM	Diclorometano
DI	Diámetro interno
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMSe	Dimetilselenio
DMDSe	Dimetildiselenio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRIFTS	Espectroscopía de infrarrojo de reflexión difusa
DVB	Divinilbenceno
EDMA	Etilendimetacrilato

EGDMA	Etilenglicol dimetacrilato
GC	Cromatografía de gases
G.L.	Grados de libertad
HFME	Microextracción con fibra hueca
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
IsoOct	Isooctano
LCi	Límite de cuantificación instrumental
LD	Desorción líquida
LDi	Límite de detección instrumental
LSD	Diferencia mínima significativa
MAA	Ácido metacrílico
MAOE	Octilmetacrilato
MAPS	3-(metacriloxi)propiltrimetoxisilano
MASE	Éster metacrilato ácido esteárico
MeOH	Metanol
META	Cloruro de metacrilato oxi etil trimetil amonio
MIBK	Metilisobutilcetona
MIP	Polímeros con impresión molecular
Mn	Peso molecular en número
MS	Espectrómetro de masas
MS/MS	Espectrómetros de masas acoplados en tándem
MTMS	Metiltrimetoxisilano
NSAIDs	Medicamentos no esteroideos antiinflamatorios
OCMA	Octadecil metacrilato
OCPs	Plaguicidas organoclorados
OTC	Oxitetraciclina
OPP	Plaguicidas organofosforados

PA	Poliacrilamida
PAHs	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PASHs	Policiclos aromáticos heterocíclicos azufrados
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS-OH	Polidimetilsiloxano hidroxí terminal
PEG	Polietilenglicol
PMHS	Polimetilhidrosilano
PPESK	Poli(Ftalazinona eter sulfona cetona)
PPY	Polipirrol
PVA	Alcohol polivinílico
PVC	Policloruro de vinilo
RAM	Materiales de acceso restringido
SBSE	Extracción por sorción en barra de agitación
SC	Suma de cuadrados
SDME	Microextracción líquido-líquido en gota suspendida
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción sólida dispersiva
SPDME	Microextracción sólida dispersiva
SDMX	Sulfadimetoxina
SMX	Sulfametoxazol
STZ	Sulfatiazol
SQX	Sulfaquinaxolina
TC	Tetraciclina
TD	Desorción térmica
TEFS	Feniltrietoxisilano
TEOS	Tetraetoxisilano
TFA	Ácido trifluoroacético

TGA	Análisis termogravimétrico
TMFS	Trimetilfenilsilano
TMP	Trimetoprim
TRIM	Trimetilopropano trimetacrilato
TSO	Aceite de silicona hidroxilado terminado
UV	Ultravioleta
VIDVB	Vinilimidazol divinilbenceno
VOS	Compuestos orgánicos azufrados volátiles
VPMB	Poli(vinilftalimida-co-N,N metilenbisacrilamida)
VPDE	Poli(vinilpiridina-co-etilendimetacrilato)
VP	Vinilpiridina
VPL	Vinilpirrolidona.

