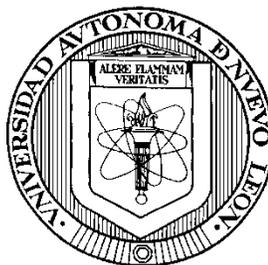


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO
SOLVENTES PARA FÁRMACOS HIDROFÍLICOS Y SU APLICACIÓN EN
PROCESOS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA**

Por

Q.C.B. MARSELA GARZA TAPIA

**Como requisito parcial para obtener el Grado de DOCTOR EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN QUÍMICA BIOMÉDICA**

ENERO, 2013

EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO SOLVENTES PARA
FÁRMACOS HIDROFÍLICOS Y SU APLICACIÓN EN PROCESOS DE MICROEXTRACCIÓN
EN FASE LÍQUIDA

Aprobación de Tesis:



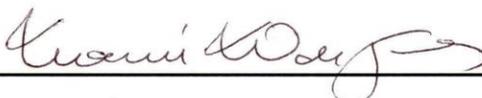
DRA. ROCÍO CASTRO RÍOS

Directora de Tesis



DR. ABELARDO CHÁVEZ MONTES

Co-Director de Tesis



DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES

Co-Directora de Tesis



DRA. MA. DE LA LUZ SALAZAR CAVAZOS

Comisión de Tesis



DRA. ROCÍO ÁLVAREZ ROMÁN

Comisión de Tesis



DR. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EVALUACIÓN DEL DESEMPEÑO DE LÍQUIDOS IÓNICOS COMO SOLVENTES
PARA FÁRMACOS HIDROFÍLICOS Y SU APLICACIÓN EN PROCESOS DE
MICROEXTRACCIÓN EN FASE LÍQUIDA**

Presentado por:

Q. C. B. MARSELA GARZA TAPIA

Este trabajo se realizó en los Laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección de la Dra. Rocío Castro Ríos y la co-dirección del Dr. Abelardo Chávez Montes y la Dra. Noemi Waksman de Torres.

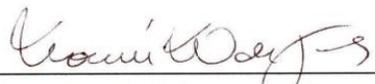
FIRMAS

DIRECTORA



Dra. Rocío Castro Ríos

CO-DIRECTORA



Dra. Noemi Waksman de Torres

CO-DIRECTOR



Dr. Abelardo Chávez Montes

ÍNDICE

	Página
Capítulo I. Introducción.....	1
1.1 Técnicas de Preparación de Muestra.....	1
1.2 Líquidos iónicos.....	3
1.3 Técnicas de Microextracción en Fase Líquida.....	7
1.3.1 Extracción líquido-líquido (LLE).....	7
1.3.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva.....	8
Capítulo 2. Justificación.....	9
Capítulo 3. Objetivos.....	10
3.1. Objetivo General.....	10
3.2. Objetivos Específicos.....	11
Capítulo 4. Material y Métodos.....	12
4.1 Equipos, materiales y reactivos.....	12
4.1.1 Equipos.....	12
4.1.2 Materiales.....	13
4.1.3 Reactivos.....	14
4.1.3.1 Líquidos iónicos.....	14
4.1.3.2 Estándares de Fármacos	15

4.1.3.3 Solventes y otros reactivos.....	16
4.2 Metodología.....	17
4.2.1. Evaluación de la miscibilidad de los líquidos iónicos.....	17
4.2.2. Desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos para el análisis de los fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos.....	18
4.2.3. Validación de los métodos cromatográficos.....	21
4.2.3.1 Linealidad.....	21
4.2.3.2 Precisión.....	22
4.2.3.3 Exactitud.....	22
4.2.3.4 Límites de detección y cuantificación.....	23
4.2.4. Determinación de solubilidad de los fármacos modelo en líquidos iónicos...	23
4.2.5. Determinación de coeficiente de partición (log P) de los fármacos modelo en sistemas bifásicos líquido iónico/agua.....	24
4.2.6. Desarrollo de métodos de microextracción líquido-líquido para los fármacos modelo, utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción.....	25
4.2.7. Desarrollo de métodos de microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME) para fármacos hidrofílicos.....	28
4.2.8. Evaluación del desempeño de los métodos de microextracción en fase líquida desarrollados.....	31
4.2.8.1 Microextracción líquido-líquido.....	31
4.2.8.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquido iónicos (MILs-DLLME).....	33
Capítulo 5. Resultados.....	34
5.1. Determinación de la miscibilidad de los líquidos iónicos.....	34

5.2. Desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos para el análisis de los fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos.....	39
5.3. Validación de los métodos cromatográfico desarrollados.....	51
5.4. Determinación de solubilidad de los fármacos modelo en líquidos iónicos.....	54
5.5. Determinación de coeficiente de partición (log P) de los fármacos modelo en sistemas bifásicos líquido iónico/agua.....	56
5.6. Desarrollo de métodos de microextracción líquido-líquido para los fármacos modelo, utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción.....	67
5.7. Desarrollo de métodos de microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME) para fármacos hidrofílicos.....	71
5.8. Evaluación del desempeño de los métodos de microextracción en fase líquida desarrollados.....	80
5.8.1. Microextracción líquido-líquido.....	80
5.8.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME).....	81
Capítulo 6. Discusión.....	82
6.1. Selección de los líquidos iónicos incluidos en el análisis.....	82
6.2. Evaluación de la miscibilidad de los líquidos iónicos.....	83
6.3. Desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos para el análisis de los fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos.....	86
6.4. Validación de los métodos cromatográficos.....	94
6.5. Determinación solubilidad fármacos hidrofílicos en líquidos iónicos inmiscibles en agua.....	95
6.6. Determinación del coeficiente de partición (Log P) para fármacos hidrofílicos en sistemas líquidos iónicos/agua.....	99

6.7 Aplicación de los líquido iónicos inmiscibles en agua como solventes de extracción en técnicas de microextracción en fase líquida.....	101
6.7.1. Microextracción líquido-líquido.....	101
6.7.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME).....	103
Capítulo 7. Conclusiones.....	106
Capítulo 8. Bibliografía.....	108

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla I. Longitudes de onda de análisis para los analitos incluidos en la investigación.....	19
Tabla II. Condiciones probadas para la optimización de los métodos cromatográficos.....	20
Tabla III. Valores de pH probados de las soluciones acuosas de cada para su los procesos de microextracción en fase líquida.....	27
Tabla IV. Líquidos iónicos miscibles e inmiscibles en agua, estudiados en esta investigación.....	35
Tabla V. Miscibilidad de líquidos iónicos en solventes orgánicos y mezclas de estos con agua.....	36
Tabla VI. Miscibilidad de líquidos iónicos inmiscibles en agua incluidos en la investigación en mezclas de Metanol y soluciones acuosas de compuestos de diferente naturaleza química.....	37
Tabla VII. Miscibilidad de líquidos iónicos inmiscibles en agua incluidos en la investigación en mezclas de acetonitrilo y soluciones acuosas de compuestos de diferente naturaleza química.....	38

Tabla VIII. Composición óptima de fase móvil y tiempos de retención para fármacos hidrofílicos en columnas de fase inversa.....	40
Tabla IX. Sistema de gradiente de HPLC utilizado para la separación de una mezcla de fármacos hidrofílicos(figura 5.3), en una columna Discovery HS F5 a un flujo de 0,2 mL/min a 40°C.....	43
Tabla X. Condiciones óptimas de separación y tiempos de retención para los fármacos hidrofílicos utilizando cromatografía de interacciones hidrofílicas; 0,4mL/min, 30°C.....	50
Tabla XI. Resumen de las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos inmiscibles en agua.....	52
Tabla XII. Resultados de los parámetros evaluados para la validación de los métodos cromatográficos desarrollados.....	53
Tabla XIII. Valores de solubilidad determinados experimentalmente para el atenolol.....	59
Tabla XIV. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el ácido acetilsalicílico.....	60
Tabla XV. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para la cafeína.....	61
Tabla XVI. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para la cimetidina.....	62
Tabla XVII. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para la hidroclorotiazida.....	63
Tabla XVIII. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para la metformina.....	64

Tabla XIX. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el paracetamol.....	65
Tabla XX. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el ranitidina.....	66
Tabla XXI. Líquidos iónicos evaluados como solventes de extracción en la microextracción líquido-líquido.....	68
Tabla XXII. Condiciones óptimas para la microextracción líquido-líquido de fármacos hidrofílicos utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción.....	71
Tabla XXIII. Líquidos iónicos inmiscibles en agua seleccionados para evaluarse como posibles solventes de extracción en la MILs-DLMME.....	72
Tabla XXIV. Miscibilidad entre líquidos iónicos inmiscibles en agua (IL-EX) y líquidos iónicos miscibles en agua (IL-DS).....	73
Tabla XXV. Formación de la nube de dispersión en la matriz de la muestra.....	74
Tabla XXVI. Líquidos iónicos evaluados como solventes de extracción y dispersante en los procesos de MILs-DLLME.....	75
Tabla XXVII. Resultados de la optimización de los parámetros para la MILs-DLLME para fármacos hidrofílicos.....	79
Tabla XXVIII. Resultados de la evaluación de la microextracción líquido-líquido utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción.....	80
Tabla XXIX. Resultados de la evaluación de la MILs-DLLME para la extracción de fármacos hidrofílicos.....	81

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Esquema general de la Microextracción líquido-líquido dispersiva.....	29
Figura 2. Cromatograma obtenido para una solución metanólica del Bis(trifluorometilfulfonil)imida de 1etil-3 metilimidazolio (1% v/v) a) columna Atlantis dC ₁₈ y b) columna Zorbax Eclipse-XDB, ambos a 220 nm.....	41
Figura 3. Cromatograma obtenido para una solución metanólica del trifluorometano sulfonato de 1-hexil-3metil imidazolio (1% v/v), fase inversa con formación de pares iónicos a) columna Atlantis dC ₁₈ y b) columna Kromasil C ₈ , ambos a 220 nm.....	41
Figura 4. Cromatograma obtenido para una mezcla de fármacos hidrofílicos (20 µg/mL) en agua (fármacos por orden de elución: L-dopa, paracetamol, famotidina, hidroclorotiazida, atenolol, ranitidina, cafeína, ácido salicílico y furosemida). Columna: Discovery HS F5, buffer de formiatos 40 mM (pH 4):metanol (Tabla IX), 0,2 mL/min, 40°C, 280 nm.....	44
Figura 5. Cromatograma obtenido para una solución metanólica de tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolio (1% v/v), condiciones cromatográficas, Tabla IX.....	45

Figura 6. Cromatograma obtenido para mezcla de fármacos hidrofílicos en metanol adicionada con tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolío (1% v/v). Condiciones cromatográficas indicadas en la Tabla IX.....	46
Figura 7. Cromatograma obtenido para mezcla de fármacos hidrofílicos en metanol.....	47
Figura 8. Cromatograma obtenido para a) una solución acuosa de nitrato de etil amonio (1% v/v); b) mezcla de fármacos hidrofílicos en agua adicionada con nitrato de etil amonio (1% v/v).....	47
Figura 9. Cromatograma de una mezcla de fármacos hidrofílicos en solución acuosa de ácido fórmico al 0,1%:metanol:tetrafluoroborato de 1-decil-3 metil imidazolío (6:3:1) utilizando las condiciones cromatográficas para la separación de la mezcla descritas en el texto.....	48
Figura 10. Cromatograma obtenido para a) solución de bis (trifluoro metil sulfonil) imida de 1-etil-3-metil imidazolío en acetonitrilo (1% v/v); b) solución de bis (trifluoro metil sulfonil) imida de butil trimetil amonio (1% v/v).....	50
Figura 11. Esquema del procedimiento para la determinación de solubilidad optimizado a microescala.....	55
Figura 12. Esquema del procedimiento para la determinación de Log P optimizado a microescala.....	57
Figura 13. Efecto del pH en la microextracción líquido-líquido del ácido acetilsalicílico utilizando al HMIM-otf y al DMP-ntf como solventes de extracción (n=2).....	69
Figura 14. Efecto del número de extracciones y el tipo de agitación en la microextracción líquido-líquido del ácido acetilsalicílico (n=2).....	70

Figura 15. Efecto del pH y la mezcla de solventes en la MILs-DLLME para la ranitidina (n=2).....	76
Figura 16. Efecto del volumen del solvente de extracción sobre el proceso de MILs-DLLME para la ranitidina (n=2).....	77
Figura 17. Efecto del volumen del solvente de dispersión sobre el proceso de MILs-DLLME para la ranitidina (n=2).....	77
Figura 18. Efecto del tiempo de extracción sobre el proceso de MILs-DLLME para la ranitidina (n=2).....	78

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

μL	Microlitro
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celcius
ACN	Acetonitrilo
AF	Ácido fórmico
BMIM-MeSO₄	Metilsulfato de 1-butil-3-metil imidazolio
BMIM-otf	Trifluorometanosulfonato de 1-butil-3-metil imidazolio.
BMIM-PF₆	Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio.
BMMIM-BF₄	Tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetil imidazolio
BuPy-BF₄	Tetrafluoroborato de 1-butil piridinio
DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva
DMIM-BF₄	Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolio.
DMIM-Br	Bromuro de 1-decil-3-metil imidazolio.

DMP-ntf	Hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil imidazolio.
EMIM-AlCl₄	Tetracloroaluminato de 1-etil-3-metil imidazolio.
EMIM-BF₄	Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil imidazolio.
EMIM-CH₃SO₃	Metanosulfonato de 1-etil-3-metil imidazolio.
EMIM-DEP	Diethylfosfato de 1-etil-3-metil imidazolio.
EMIM-ntf	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-etil-3-metil imidazolio.
EN-NO₃	Nitrato de etil amonio.
HILIC	Cromatografía de interacciones hidrofílicas
HMIM-ntf	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-hexil-3-metil imidazolio.
HMIM-otf	Triflato de 1-hexil-3-metilimidazolio.
HMIM-PF₆	Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio.
hrs	Horas
LI	Líquido iónico
Log P	Coeficiente de partición
M	Concentración molar
m	Pendiente de la recta

MeOH	Metanol
MILs-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos
mL	Mililitro
mM	Concentración milimolar
MPPIP-ntf	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-metil-1-propil piperidinio.
N1114-ntf	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de butil trimetil amonio.
N1888-ntf	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de metil trioctil amonio.
NaCl	Cloruro de sodio
OCDE	Organización para la cooperación y el desarrollo económico
OMIM-PF₆	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1,2-dimetil-3-propil imidazolio.
PMPI-ntf	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 3-metil-1-propil piridinio.
PMPL-ntf	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-metil-1-propil pirrolidinio.

R²	Coeficiente de determinación
SEt3-ntf	Bis (trifluorometil sulfonil) imida de trietil sulfonio.
TFA	Ácido triluoroacético.
t_r	Tiempo de retención
v/v	Concentración volumen/volumen

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.4 Técnicas de Preparación de Muestra.

Entre los principales problemas asociados con el análisis de muestras en el mundo real se encuentran la necesidad de procesos de extracción eficientes y selectivos, la limpieza del extracto y la preconcentración.

Además es importante considerar que es en este paso del método analítico es donde se invierte la mayor cantidad de tiempo dentro del trabajo de laboratorio y representa un paso clave para la obtención de buenos resultados [1-3].

Es por ello que a últimas fechas estos procedimientos han tomado gran importancia y se han generado importantes avances para obtener métodos más precisos, exactos, que

consuman menor cantidad de tiempo y además nos permita monitorear bajas cantidades de compuestos de interés sin importar la complejidad de la muestra en la cual estén contenidos [4].

Los procesos de extracción juegan un papel fundamental en los procesos relacionados con la preparación de la muestra, ya que estos tienen como propósito separar al analito de interés del resto de la matriz y en muchas ocasiones el concentrar al mismo previo al análisis.

Las técnicas de preparación de muestra convencionales, entre las que destaca la extracción líquido-líquido (LLE) han sido utilizadas ampliamente e incluso siguen siendo utilizadas en protocolos oficiales de algunas áreas de la química analítica. Sin embargo el uso desmedido de solventes orgánico volátiles ha prendido las alertas para observar este tipo de procesos y generar nuevo que sean más amigables con el medio ambiente [5].

Sin embargo la baja afinidad que presentan los solventes orgánico volátiles por los compuestos polares compuestos polares, altamente solubles en agua (hidrofílicos) y la baja retención que presentan en la fases estacionarias tradicionales, hace que los avances logrados no hayan contribuido de manera importante al desarrollo de procedimientos de extracción y limpieza más eficientes para analitos polares, que en conclusión terminan siendo mucho más largos, caros y con pobres eficiencias.

En resumen la preparación de la muestra ideal estaría compuesta por la pérdida mínima de la muestra y la máxima recuperación del analito, eliminación de los compuestos acompañantes con alto rendimiento, por un método sencillo, rápido y barato, por instrumentos analíticos capaces y especialmente en acuerdo con la química

"verde".

1.2. Líquido iónicos

En los siglos XX y XI, los líquidos iónicos se convirtieron en el grupo de disolventes más investigados en el mundo.

Los líquidos iónicos (LI) son sales formadas por iones muy asimétricos y de gran tamaño por lo cual presentan fuerzas atractivas catión-anión más débiles que las que se dan en las sales iónicas convencionales, lo que provoca que sean líquidos en un amplio rango de temperaturas, incluyendo la temperatura ambiente en la mayoría de los casos.

Los líquidos iónicos, poseen punto de fusión inferior a los 100° C; son compuestos incoloros o en ocasiones, con un tono amarillento que es originado por la presencia de impurezas.

Los cationes más comunes son los imidazolios di o tri sustituidos, los piridinius sustituidos, los tetralquilamonios y los tetralquifosfonios, mientras que los aniones suelen ser halogenuros, sulfatos, sulfonatos, triflatos, amidas e imidas, boratos y fosfatos. Quizá la parte más importante de un líquido iónico, sea su catión, debido a que es el responsable del comportamiento químico e impiden que se forme una estructura cristalina que afectaría directamente el punto de fusión hacia un estado elevado, tal como ocurre en una sal inorgánica [6, 7].

Las propiedades físicas de los líquidos iónicos, tales como punto de fusión, densidad, viscosidad, tensión superficial o temperatura de descomposición están relacionados con los aniones de diferentes tamaños y estructuras como por ejemplo, los de tetrafluoroborato (BF_4), alquilsulfato (R-SO_4), alquilsulfonato (R-SO_3), hexafluorofosfato (PF_6) y bis(trifluorometilsulfonil)imida (Tf_2N), que representan a los aniones más complejos; por el contrario, los aniones más sencillos con los halogenuro [8].

Entre las bondades de los líquidos iónicos, se destaca que presentan un amplio intervalo de temperaturas cuando están en estado líquido, que como ya se ha mencionado, mantienen su temperatura de fusión por debajo de 100°C e incluso, muchos de ellos son líquidos a temperatura ambiente [9].

Son compuestos que tienen una presión de vapor despreciable e incluso nula, de tal forma que a presión atmosférica, su temperatura de ebullición es muy elevada y por lo tanto de volatilidad reducida bajo estas condiciones.

Otra característica de los líquidos iónicos, es que son compuestos no inflamables y presentan una buena estabilidad térmica, es decir, su temperatura de descomposición oscila entre los 300 y 400°C . En cuanto a la viscosidad de los líquidos iónicos, esta suele estar de dos a tres órdenes más elevada de magnitud que la de los solventes convencionales, pero esta característica no normalmente no afecta la transferencia del analito de interés de la fase problema al disolvente.

Como resultado de estas propiedades los IL han sido empleados como solventes en reacciones químicas, en electroquímica, como aditivos en cromatografía líquida y electroforesis capilar, como fase estacionaria en cromatografía de gases y como solventes de extracción entre otras aplicaciones [10-13]. El gran impulso que se ha dado en años recientes a la investigación de los IL como disolventes se debe a su baja volatilidad, característica que los incluye en los denominados “solventes verdes” y que los convierte en prometedores candidatos a reemplazar a los solventes orgánicos volátiles [10,14].

De la posibilidad de combinar el catión, generalmente orgánico, voluminoso y asimétrico, con diversos aniones, ha surgido el término “disolventes de diseño”, ya que la elección de los iones determina las propiedades fisicoquímicas del IL y se convierte en una interesante herramienta para lograr un ajuste fino de las propiedades deseadas del IL. Existen muchas combinaciones posibles y por lo tanto pueden sintetizarse IL con un amplio rango de propiedades físicas y químicas. En general, el anión se utiliza para controlar la miscibilidad con el agua mientras que el catión puede determinar la hidrofobicidad o la capacidad de formar puentes de hidrógeno. Así, pueden tenerse IL de carácter ácido o básico, hidrofílicos, miscibles con el agua, inmiscibles con agua, e hidrofóbicos. (10,15, 16).

La versatilidad en las propiedades de los IL resulta de suma importancia cuando se realizan extracciones con solvente o separación de productos, ya que las solubilidades relativas de la fase de extracción y de la iónica puede ajustarse para hacer la separación lo más simple posible. Existen numerosos ejemplos de IL que son hidrofóbicos, de manera que forman sistemas bifásicos con el agua manteniendo sus

características iónicas. Esta novedosa propiedad dual hidrofobicidad-carácter iónico de los IL ha sido aprovechada para LLE. Aunque todavía falta mucha información, se ha encontrado que tanto el intercambio iónico como la partición juegan un importante papel en el proceso de extracción. Los compuestos orgánicos tienden a extraerse por el mecanismo de partición, mientras que el intercambio iónico contribuye en mayor medida a la extracción de iones metálicos [17]. Por otro lado, los IL han sido empleados en cromatografía de líquidos de alta resolución como sustitutos de las aminas en la supresión de la ionización de los grupos silanol residuales de la fase estacionaria; algunos autores sugieren que además de esta interacción del catión del IL, es probable que el anión forme pares iónicos con los analitos catiónicos [18].

En los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos de LPME y de SLE para iones metálicos, compuestos orgánicos no polares o moderadamente polares, como por ejemplo trihalometanos, benceno, tolueno, xileno, fármacos antiinflamatorios, benzofenona, diclorometano, undecano, clorobencenos, etc. [19-22] Para analitos polares ni la LPME ni la SLE resultan adecuadas cuando se emplean solventes orgánicos convencionales. Sin embargo, el redescubrimiento de los IL ha abierto la puerta al establecimiento de métodos de preparación de muestra más simples y eficientes para sustancias polares, aunque hasta ahora las aplicaciones son escasas [23].

1.3. Técnicas de Microextracción en fase líquida.

La química analítica ha evolucionando hacia políticas más respetuosas para el medio ambiente con la búsqueda de métodos de preparación de muestras con menor consumo de disolventes orgánicos tóxicos para minimizar la generación de residuos peligrosos y los riesgos para la salud de los operarios. Es aquí donde las técnicas de microextracción en general juegan un papel fundamental dentro de la química analítica debido a la importancia de los procesos de preparación de la muestra como se mencionó anteriormente.

1.3.1 Extracción líquido-líquido (LLE)

Es una técnica versátil y clásica en preparación de muestras. LLE se basa en el establecimiento de un equilibrio de distribución de los analitos entre dos fases inmiscibles, una acuosa y la otra orgánica. Si la constante de equilibrio de distribución es lo suficientemente grande, la extracción cuantitativa de los analitos puede llevarse a cabo en un solo paso. Pero la mayoría de los LLEs son en varios pasos. La facilidad de operación y simplicidad del método son las ventajas de LLE. Pero desventajas importantes tales como el consumo de grandes volúmenes de disolventes costosos y tóxicos, formación de emulsión en la interfase de las dos fases, separaciones difíciles de fase y finalmente el factor de concentración bajo, ha conducido a los químicos analíticos a introducir métodos alternativos para LLE, disminuyendo el volumen del disolvente de extracción a escala de microlitros conocida

como microextracción en fase líquida (LPME) [24,25].

1.3.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva.

La **microextracción líquido-líquido dispersiva** (*dispersive liquid-liquid microextraction*, **DLLME**) se basa en el uso de un sistema ternario de solventes. En este método, el solvente de extracción y el solvente dispersante son inyectados rápidamente en la muestra formando una solución turbia. La dispersión del solvente extractante en la muestra acuosa incrementa la transferencia de los analitos entre las fases inmiscibles, que son finalmente separadas por centrifugación [24,26-27]].

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Debido a las dificultades que presentan los compuestos polares para su extracción durante los procesos convencionales en los laboratorios de Química Analítica, es necesario el desarrollo de nuevas estrategias que permitan hacer más eficientes estos procesos.

Basados en su gran potencial como medios de reacción y como solventes, es posible pensar que los líquidos iónicos constituyen una buena alternativa para la extracción de compuestos de elevado carácter hidrofílico.

Además, su combinación con las nuevas técnicas de microextracción permitirá el desarrollo de procedimientos químicos más limpios y amigables con el medio ambiente.

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

Evaluar diversos líquidos iónicos como solventes para fármacos hidrofílicos y estudiar su desempeño en técnicas de microextracción en fase líquida.

3.2. Objetivos Específicos

1. Determinar la miscibilidad de los líquidos iónicos en agua, solventes orgánicos y mezclas.
2. Desarrollar métodos por Cromatografía de Líquidos para la determinación de los analitos modelo incluidos en la investigación en presencia de líquidos iónicos.
3. Caracterizar las propiedades disolventes de los líquidos iónicos para fármacos hidrofílicos y seleccionar los más adecuados para las técnicas de Microextracción líquido-líquido y Microextracción líquido-líquido dispersiva.
4. Optimizar procedimientos de Microextracción Líquido-Líquido para fármacos hidrofílicos presentes en soluciones acuosas utilizando líquidos iónicos como solventes.
5. Optimizar procedimientos de Microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME) para fármacos hidrofílicos presentes en soluciones acuosas.

CAPÍTULO 4

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Equipos, materiales y reactivos

4.1.1 Equipos

- Balanza analítica (AND, GR-120).
- Balanza semianalítica, (AND, GX-200).
- Baño de ultrasonido (Branson, Bransonic 3510).
- Bomba de vacío (Modelo SA55NXGTE-4870).
- Centrífuga con control de temperatura (Thermo Scientific, IEC Centra CL3).
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Hewlett Packard Serie 1100, equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, inyector automático, controlador de temperatura de columna y detector UV de longitud de onda variable.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución Waters Alliance 2695 con sistema desgasificador en línea, automuestreador Waters, sistema de bombeo

cuaternario, controlador de temperatura para columna y detector de arreglo de diodos.

- Cronómetro.
- Incubadora (DAIGGER, Combi-SVI2DX).
- Plataforma de agitación (VWR International, Nutating mixer).
- Potenciómetro (Hach, SensION pH).
- Purificador de agua (Elga, Pure Lab UHQII).
- Vortex (Barnstead International, Thermolyne 37600).

4.1.2 Materiales

- Columna Atlantis dC₁₈ (2,1 x 150 mm, 3 µm; Waters).
- Columna Atlantis HILIC Silica (2,1 x 150 mm, 5 µm; Waters).
- Columna Discovery HS F5 (2,1 x 150 mm, 3 µm; Supelco).
- Columna Kromasil C₈, (2,1 x 150 mm, 5 µm; Phenomex).
- Columna Luna CN⁻ (2,0 x 150 mm, 3 µm; Phenomenex).
- Columna Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (2,1 x 150 mm, 5 µm; Agilent).
- Espátulas.
- Frascos para reservorios para fase móvil de 500 mL (Schott Duran).
- Gradilla para tubos de ensayo.
- Insertos cónicos de vidrio de 150 µL con resortes al fondo (Agilent).
- Matraces de aforación 5, 10, 25, 50, 250 y 500 mL (Pyrex).
- Membranas de nylon 47mm, 0,45µm (Pall Company).
- Microjeringas Hamilton de 10, 25, 100 y 500 µL.
- Pipetas automáticas 20-200 µL y 200-1000µL (Eppendorf).

- Pipetas volumétricas de 1, 2, 4, 5 y 15 mL.
- Probetas 250 y 500 mL.
- Puntillas para pipeta automática.
- Sistema de filtración rápida (Millipore).
- Termómetro -20°C a 110°C (Brannan).
- Tubos cónicos con tapa de rosca de 5 mL (Kimble Chase).
- Tubos de ensayo de vidrio 13 x 100.
- Viales de encapsulado con inserto fijo 12 x 32 mm (Agilent Technologies)
- Viales de vidrio ambar de 15 y 40 mL, tapón rosca y septum de PTFE/silicón.
- Viales de vidrio de 2 mL con tapón de rosca y septum de PTFE/silicón.
- Viales MicroV de encapsulado 12 x 32 mm (Agilent Technologies)

4.1.3 Reactivos

4.1.3.1 Líquidos iónicos

- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1,2-dimetil-3-propil imidazolio, 99 %, lolitec.
- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-etil-3-metil imidazolio, 99 %, lolitec.
- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-hexil-3-metil imidazolio, 99 %, lolitec.
- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-metil-1-propil piperidinio, 99 %, lolitec.
- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-metil-1-propil pirrolidinio, 99 %, lolitec.
- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 3-metil-1-propil piridinio, 99 %, lolitec.
- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de butil trimetil amonio, 99 %, lolitec.
- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de dietil metil sulfonio, 99 %, lolitec.
- Bis (trifluorometil sulfonil) imida de metil trioctil amonio, 99 %, lolitec.
- Bromuro de 1-decil-3-metil imidazolio, >98 %, lolitec.

- Dietilfosfato de 1-etil-3-metil imidazolio, >98 %, lolitec.
- Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio, 99 %, lolitec.
- Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio, 99 %, lolitec.
- Hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil imidazolio, 99 %, lolitec.
- Metanosulfonato de 1-etil-3-metil imidazolio, 99 %, lolitec.
- Metilsulfato de 1-butil-3-metil imidazolio, ≥ 97 % (HPLC), Aldrich Chemistry.
- Nitrato de etil amonio, >97 %, lolitec.
- Tetracloroaluminato de 1-etil-3-metil imidazolio, ≥ 95 %, Aldrich Chemistry.
- Tetrafluoroborato de 1-butil piridinio, 99 %, lolitec.
- Tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetil imidazolio, 99 %, lolitec.
- Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolio, >98 %, lolitec.
- Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil imidazolio, >98 %, lolitec.
- Triflato de 1-hexil-3-metilimidazolio, 99 %, lolitec.
- Trifluorometanosulfonato de 1-butil-3-metil imidazolio, 99 %, lolitec.

4.1.3.2 Estándares de Fármacos

- 3,4-Dihidroxi-L- fenilalanina (L-Dopa), Fluka Analytical.
- Ácido acetilsalicílico, $\geq 99,0$ %, Sigma.
- Ácido salicílico, $\geq 99,0$ %, Sigma.
- Cafeína, Sigma-Aldrich.
- Clorhidrato de 1,1-dimetilbiguanadina (Metformina), 97 %, Aldrich Chemistry.
- Clorhidrato de ranitidina, Sigma.
- Furosemida, Sigma.
- Hidroclorotiazida, Sigma-Aldrich.
- Paracetamol 99,0 %, Sigma-Aldrich.

- R-Atenolol 99,0 %, Aldrich Chemistry

4.1.3.3 Solventes y otros reactivos.

- Acetonitrilo grado HPLC, J.T. Baker.
- Ácido acético, 99,8 %, Fluka
- Ácido fórmico, 99 %, Merck.
- Ácido trifluoroacético, 99 %, Sigma-Aldrich.
- Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey.
- Fosfato de sodio, 99,5 %, CTR.
- Fosfato diácido de sodio 99,2 %, Productos Químicos Monterrey.
- Fosfato monoácido de sodio dihidratado, 99,6 %, CTR.
- Hidróxido de amonio, 25 %, Sigma-Aldrich.
- Metanol grado HPLC, J.T. Baker.
- Octanol.

4.2 Metodología

4.2.1. Evaluación de la miscibilidad de los líquidos iónicos.

Para evaluar la miscibilidad de los líquidos iónicos se tomó como base el protocolo establecido por la ASTM [28], el cual consiste en preparar una mezcla del solvente problema en 10 volúmenes de agua o el solvente con el que se quiera determinar la miscibilidad, es decir, 25 mL del solvente problema se mezclan con el solvente en el que se requiere determinar la miscibilidad hasta un volumen total de 250 mL, un recipiente transparente para una mejor observación y comparación. Posteriormente la mezcla debe agitarse, dejarse reposar y compararse contra un blanco del solvente mayoritario. Si después de 30 minutos de haber puesto en contacto ambos solventes no se observan diferencias entre el blanco y la muestra problema, se considera que los solventes son miscibles entre sí; en caso contrario, los solventes serán considerados como inmiscibles.

En este trabajo todas las técnicas utilizadas para la determinación de propiedades fisicoquímicas (miscibilidad, solubilidad y coeficiente de partición) fueron implementadas a microescala, debido al gran número de pruebas que habrían de realizarse y con el fin de disminuir los costos y la generación de residuos. La adaptación para cada una de las técnicas se describirá detalladamente en los apartados correspondientes del capítulo 5.

Inicialmente, se evaluó la miscibilidad de los 24 líquidos iónicos con el agua. Para aquellos que resultaron inmiscibles, se evaluó la miscibilidad con solventes orgánicos

como metanol y acetonitrilo, así como mezclas de estos con agua o soluciones acuosas de ácido fórmico 1 %, ácido trifluoracético 1 % o NaCl 1 %.

4.2.2. Desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos para el análisis de los fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos.

Para el desarrollo de los métodos cromatográficos se trabajó con un cromatógrafo de líquidos 2695 (Waters, U.S.A.) equipado con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, inyector automático, horno de columna y detector de arreglo de diodos. También se usó un equipo HP serie 1100 (Hewlett-Packard, U.S.A.) con desgasificador en línea, bomba cuaternaria, inyector automático, horno de columna y detector de UV de longitud de onda variable. Para la optimización de las condiciones cromatográficas se emplearon soluciones acuosas, metanólicas o en acetonitrilo de los analitos a una concentración de 20 ppm, así como de los líquidos iónicos a una concentración 1 % v/v, de acuerdo al solvente de la fase móvil empleada. En todos los casos el volumen de inyección fue de 10 μ L. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. Las longitudes de onda empleadas en el análisis de cada uno de los analitos se presentan en la tabla I.

Tabla I. Longitudes de onda empleadas para la determinación de los analitos incluidos en la investigación.

Analito	Longitud de onda (nm)	Analito	Longitud de onda (nm)
Ácido acetilsalicílico	254	Furosemida	280
Ácido salicílico	280	Hidroclorotiazida	280
Atenolol	280	L-dopa	280
Cafeína	254	Metformina	220
Cimetidina	220	Paracetamol	254
Famotidina	280	Ranitidina	280

En el desarrollo de este trabajo se evaluaron la cromatografía en fase inversa en su modalidad clásica y de formación de pares iónicos, así como, la cromatografía de interacciones hidrofílicas. En la tabla II se presentan las condiciones de trabajo evaluadas durante la optimización de los métodos cromatográficos, incluyendo las columnas utilizadas, los solventes empleados en las fases móviles así como las temperaturas a las que se realizaron los procesos de separación.

Tabla II. Condiciones evaluadas durante la optimización de los métodos cromatográficos.

Tipo de cromatografía	Columna	Fase móvil	Flujo (mL/min)	Temperatura (°C)
Fase inversa clásica	Atlantis dC ₁₈	<ul style="list-style-type: none"> • Buffer de Formiatos 100mM pH3 : Metanol 	0,15	40
	Zorbax Eclipse XDB C ₁₈	<ul style="list-style-type: none"> • Buffer de Formiatos 100mM pH4 : Metanol • Buffer de Acetatos 40mM pH4: Acetonitrilo 	0,20	30
	Discovery HS F5	<ul style="list-style-type: none"> • Buffer de Formiatos 40mM pH4: Metanol 	0,20 y 0,15	40
Fase inversa con formación de pares iónicos	Atlantis dC ₁₈	<ul style="list-style-type: none"> • TFA (20mM, en buffer de formiatos 100mM, pH4): Metanol 	0,15	40
	Kromasil C ₈	<ul style="list-style-type: none"> • HFBA (20mM, en buffer de formiatos 100mM, pH4): Metanol. 	0,20	30
Interacciones hidrofílicas	Atlantis HILIC Silica	<ul style="list-style-type: none"> • Acetonitrilo:buffer de Acetatos (250mM, pH 5) 	0,40	30
	Luna CN			

Como parte del proceso de optimización, se realizaron diversas pruebas variando la proporción de los componentes de la fase móvil. En el caso de la cromatografía en fase inversa, en las dos modalidades empleadas, la proporción de fase acuosa fue siempre igual o mayor al 50 %, mientras que para la cromatografía de interacciones hidrofílicas, el contenido de acetonitrilo se mantuvo siempre por arriba del 85 %.

Todas las fases móviles utilizadas durante la investigación fueron filtradas con membranas de nylon (47 mm, 0,45 µm; Pall Company, USA) y desgasificadas en baño de ultrasonidos por 15 minutos. Las fases móviles acuosas fueron preparadas con agua desionizada obtenida con un equipo Pure Lab UHQII, Elga II (Veolia).

4.2.3. Validación de los métodos cromatográficos.

Los métodos desarrollados para los diferentes analitos fueron validados considerando las recomendaciones de la IUPAC [29] y la ICH [30]. Los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

Para la validación de los métodos se prepararon soluciones madre de cada analito con una concentración de 1000 µg/mL, en acetonitrilo; a partir de ellas fueron preparadas las soluciones de trabajo en un rango de concentraciones de 5 a 80 ppm en la fase móvil correspondiente al método optimizado para cada analito.

4.2.3.1 Linealidad

Para la construcción de las curvas de calibración por estándar externo, se prepararon estándares de cada uno de los fármacos a 5 niveles de concentración (5, 10, 20, 40 y 80 ppm) por triplicado. Para establecer la relación entre el área del pico cromatográfico y la concentración del analito, se realizó un análisis de regresión lineal, se obtuvo la ecuación de la recta y se evaluaron los coeficientes de correlación y determinación. El análisis de datos se realizó utilizando el programa Excel 2007 de Microsoft.

4.2.3.2 Precisión

La precisión fue evaluada calculando la desviación estándar relativa en porcentaje de los factores de respuesta (FR) de los estándares de calibración, de acuerdo a lo señalado en las ecuaciones 1 y 2.

$$FR = \frac{\text{Área de la señal}}{\text{Concentración}} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\% DER = \frac{s_{FR}}{\bar{x}_{FR}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.}$$

donde:

% DER= Desviación estándar relativa en porcentaje

s_{FR} = Desviación estándar de los factores de respuesta

\bar{x}_{FR} = Media de los factores de respuesta

4.2.3.3 Exactitud

Se evaluó analizando la correlación entre la concentración calculada para los estándares de calibración y su concentración real. Para ello, se calculó la concentración de los estándares utilizando la ecuación de la recta obtenida para la curva de calibración y se realizó un análisis de regresión por mínimos cuadrados, evaluando los coeficientes de correlación y determinación así como el valor de la pendiente de la recta.

4.2.3.4 Límites de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se determinaron considerando una relación Señal/Ruido de 3 y de 10, respectivamente.

4.2.4. Determinación de solubilidad de los fármacos modelo en líquidos iónicos.

Para la determinación de la solubilidad de los analitos en líquidos iónicos, se tomó como referencia el “*método del matraz (Flask method)*” recomendado por la Organización para el Comercio y el Desarrollo Económico [31].

Con la finalidad de realizar la determinación de la solubilidad a microescala, se emplearon viales de inserto fijo de 300 μL , pesando directamente en cada uno de ellos la cantidad de fármaco requerido para obtener una solución sobresaturada. La solubilidad fue determinada para cada uno de los fármacos en los líquidos iónicos inmiscibles en agua que se encuentran enlistados en la tabla IV. Como control para esta prueba, se realizó en paralelo y bajo las mismas condiciones experimentales, la determinación de solubilidad de los fármacos en agua y los valores obtenidos se compararon con los reportados en la literatura. Para la adición del volumen necesario de solvente (líquido iónico o agua) se utilizaron microjeringas de 500 μL . Una vez preparada la mezcla, los viales fueron colocados en un baño de ultrasonidos y posteriormente en agitación constante, a temperatura controlada dentro de una incubadora. Después del tiempo de incubación los viales fueron centrifugados, la solución saturada se separó del sólido remanente y el contenido de fármaco se cuantificó en una alícuota de la solución por cromatografía de líquidos, con los métodos

desarrollados y validados previamente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, tomándose la prueba como satisfactoria si los coeficientes de variación entre los dos ensayos era \leq al 15%.

4.2.5. Determinación de coeficiente de partición (log P) de los fármacos modelo en sistemas bifásicos líquido iónico/agua.

La determinación experimental de los valores de log P en el clásico sistema bifásico octanol/agua, es comúnmente realizada mediante el “*método del matraz en agitación (Shake-Flask method)*” recomendado por la OCDE [32], por lo cual se tomó como referencia para la determinación de este en los sistemas líquido iónico/agua.

Al igual que la solubilidad y la miscibilidad, la determinación del coeficiente de partición fue adaptada y realizada a microescala, para lo cual fueron empleados Viales MicroV de 1.5 mL. En cada uno de ellos, empleando microjeringas, se añadieron volúmenes iguales de agua y líquido iónico, los viales se colocaron en una plataforma de agitación y se incubaron a temperatura constante para su saturación. Una vez transcurrido el tiempo de agitación, se dejaron en reposo bajo las mismas condiciones de temperatura, para la separación de las fases. Posteriormente, los viales se centrifugaron y las fases saturadas fueron separadas mediante el uso de microjeringas.

A la fase acuosa, se le añadió el volumen necesario de una solución 0.1 M del fármaco de análisis de tal forma que la concentración final del fármaco en la fase acuosa previamente saturada con líquido iónico fuera 0.01 M. El volumen de la solución del fármaco en la fase acuosa saturada fue dividido en tres viales para realizar la

determinación por triplicado. A cada vial, se adicionó un volumen igual de líquido iónico previamente saturado y las mezclas se agitaron primero en vórtex y posteriormente en la plataforma de agitación a temperatura controlada. Los viales se centrifugaron, las fases se separaron y se tomó una alícuota de cada una de ellas para ser cuantificada mediante los métodos de HPLC, desarrollados previamente.

De igual forma fue determinado experimentalmente el coeficiente de partición en el sistema Octanol/agua, como control de la prueba así como para la comparación de este con los resultados de los diferentes Log P de los sistemas Líquido iónico/agua.

4.2.6. Desarrollo de métodos de microextracción líquido-líquido para los fármacos modelo, utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción.

Cómo se mencionó anteriormente la microextracción líquido-líquido no es más que la miniaturización de la extracción líquido-líquido convencional.

En el presente trabajo se optimizaron las condiciones de extracción, para lo cual se consideraron cuatro variables: líquido iónico de extracción, pH de la muestra, número de extracciones y tipo de agitación. En los experimentos, tanto el volumen de la muestra y del solvente de extracción como el tiempo de agitación del proceso de extracción se mantuvieron constantes.

El estudio de los parámetros que afectan la eficiencia de la microextracción líquido-líquido se realizó utilizando soluciones acuosas de los estándares de los fármacos hidrofílicos incluidos en la investigación, preparados de forma individual a una concentración

de

40 $\mu\text{g/mL}$, fungiendo dichos estándares como nuestra muestra en los procesos de extracción.

En viales micro V, fueron colocados 150 μL de la solución del fármaco y se añadió un volumen igual del líquido iónico (solvente de extracción). Se agitó durante 5 minutos para posteriormente llevar a centrifugación durante 10 min a 3500 rpm a una temperatura de 25°C.

Después de la centrifugación, las fases fueron separadas y una alícuota de la fase correspondiente al líquido iónico se diluyó en el solvente adecuado para su introducción al cromatógrafo de líquidos y la cuantificación del analito, empleando los métodos cromatográficos desarrollados previamente.

El primer paso para el desarrollo de los métodos por microextracción líquido-líquido, fue la selección del solvente de extracción. Los solventes probados fueron los dos líquidos iónicos cuyos valores de $\text{Log } P_{\text{liq. iónico/agua}}$ resultaron más favorables para cada uno de los fármacos, los cuales se enlistan en la tabla XXI.

A la par con la elección del líquido iónico de extracción se evaluó el efecto del pH de la muestra. Para ello, las soluciones de los fármacos fueron preparadas en soluciones de pH controlado o amortiguadoras, cuyos pH's fueron establecidos de tal forma que permitieran evaluar la eficiencia de la extracción de los analitos tanto en su forma ionizada como en su forma neutra de acuerdo a los valores pKa de cada uno de ellos. Así mismo, se evaluó la eficiencia de la extracción de los analitos preparados en agua desionizada sin control de pH. En la tabla III se muestran los valores de pH probados para la extracción de cada uno de los analitos.

Tabla III. Valores de pH de las soluciones acuosas de cada evaluados durante la optimización de los procedimientos de microextracción líquido-líquido.

Analito	pH		
	2	4,5	N.C:
Ácido Acetilsalicílico	2	4,5	N.C:
Cimetidina	4,5	8	N.C.
Metformina	8	13,3	N.C:
Ratidina	1,3	13,3	N.C.
Cafeína	8	13,3	N.C.
Hidroclorotiazida	4,5	13,3	N.C.
Paracetamol	8	13,3	N.C.

N.C.: solución acuosa del fármaco sin control de pH

Una vez seleccionados el líquido iónico de extracción y el pH de la solución de la muestra, se evaluaron el número de extracciones y el tipo de agitación del sistema de extracción; siendo una y dos extracciones el número de extracciones, así como, agitación en vórtex y agitación en plataforma los tipos de agitación probados en todos los casos. Durante la optimización, todos los experimentos se realizaron por duplicado y la selección de las condiciones óptimas fue hecha en base a la intensidad de respuesta de los analitos y la precisión.

4.2.7. Desarrollo de métodos de microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME) para fármacos hidrofílicos.

Durante el desarrollo de los métodos por MILs-DLLME se optimizaron las condiciones de extracción, evaluando las siguientes variables: líquido iónico de extracción (solvente de extracción), líquido iónico dispersante (solvente de dispersión), volumen del solvente de extracción y del solvente dispersante, pH de la muestra y tiempo de extracción. En todos los experimentos se mantuvo constante el volumen de la muestra.

Al igual que en la microextracción líquido-líquido, para el estudio de los parámetros que afectan la eficiencia de la extracción se emplearon en soluciones acuosas de los estándares de los analitos individuales a un nivel de concentración de 40 µg/mL.

En tubos cónicos, se colocaron 5 mL de la solución del fármaco y con la ayuda de una microjeringa se inyectó rápidamente a la muestra, una mezcla del solvente de extracción y del solvente dispersante. Los tubos se agitaron suavemente y se llevaron a centrifugación una vez cumplido el tiempo de extracción, es decir, el tiempo transcurrido entre la introducción de la mezcla de solventes a la muestra y la centrifugación de la misma; el proceso de centrifugación se realizó por 15 min a 3500 rpm, a una temperatura de 25°C.

Después de la centrifugación, la fase correspondiente al líquido iónico situada al fondo del tubo cónico se separó del resto de la muestra y se diluyó en un solvente adecuado para su introducción al cromatógrafo de líquidos, con el fin de cuantificar el contenido del analito utilizando los métodos cromatográficos desarrollados previamente. En la figura 1 se muestra un esquema general de la microextracción líquido-líquido dispersiva.

Para la optimización de los métodos de MILs-DLLME fue necesario seleccionar en primer lugar tanto el solvente de extracción como el dispersante, en este caso ambos fueron líquidos iónicos. Para la DLLME el solvente de extracción debe ser inmisible en la muestra, mientras que el solvente dispersante debe ser miscible tanto en la muestra como en el solvente de extracción. Así pues, los líquidos iónicos evaluados como solventes de extracción para cada uno de los fármacos fueron incluidos considerando su afinidad por el analito, es decir, se incluyeron aquellos cuyo valor de $\text{Log } P_{\text{liq. iónico/agua}}$ es mayor y que cumplen con los requisitos experimentales para este tipo de microextracción; en la tabla XXI se enlistan los líquidos iónicos evaluados.

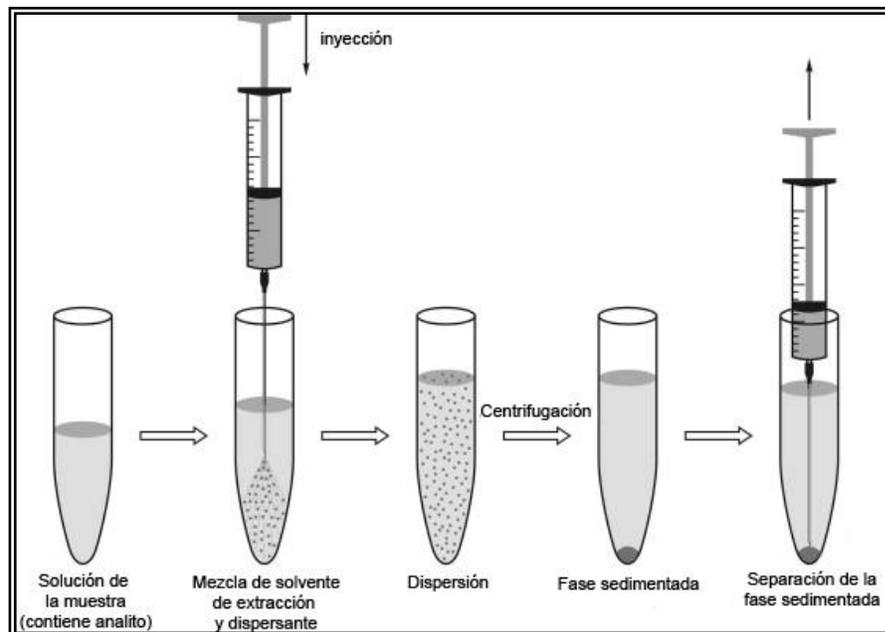


Figura 1. Esquema de la microextracción líquido-líquido dispersiva.

Por otro lado, como posibles solventes dispersantes fueron tomados en cuenta los líquidos iónicos que resultaron miscibles en agua (tabla IV), descartando aquellos que a temperatura ambiente tenían alguna formación de cristales; los líquidos iónicos incluidos en esta parte del estudio se muestran en la tabla XXV

Para la selección tanto del solvente de extracción como del dispersante fue necesario determinar la miscibilidad entre los distintos candidatos. La miscibilidad entre líquidos iónicos se realizó siguiendo el esquema general de las pruebas de miscibilidad de la ASTM [28] y que se describen en la sección 4.2.1 de este capítulo adaptada a la microescala (sección 5.1), modificando únicamente los volúmenes de cada uno de los solventes. De tal forma que, considerando la relación de volúmenes que comúnmente se emplea en los procesos de DLLME (2 referencias), en este caso la mezcla de solventes estuvo constituida por 200 μL del líquido iónico miscible en agua y 50 μL del líquido iónico inmisible en agua. Además, se prepararon un blanco de agua y uno de octanol/agua como control de comparación para determinar la miscibilidad o inmiscibilidad entre los líquidos iónicos.

Una vez determinada la miscibilidad entre los líquidos iónicos (tabla XXV) y definidos los que se evaluarían como solvente de extracción y de dispersión, fue necesario seleccionar las mezclas de líquidos iónicos miscibles entre sí que fueran capaces de formar la nube de dispersión al ser inyectadas en la muestra. Para ello, una mezcla de 200 y 50 μL del líquido iónico miscible e inmisible en agua, respectivamente, fue inyectada a una muestra blanco de 5 mL de agua contenida en tubos cónicos.

Teniendo en cuenta la miscibilidad entre los líquidos iónicos y la capacidad de la mezcla de los mismos para formar la nube de dispersión, se eligieron dos parejas de

líquido iónico de extracción-líquido iónico dispersante para ser evaluadas en el proceso de extracción, para cada fármaco.

A la par de la elección de la mezcla de líquido iónicos de extracción y dispersante, se evaluó el efecto del pH de la muestra, para lo cual las soluciones de los fármacos fueron preparadas en soluciones amortiguadoras o soluciones de pH controlado, de la misma forma y a los mismos valores de pH que en el caso de la microextracción líquido-líquido (tabla III). Así mismo, se evaluó la eficiencia de extracción de los analitos preparados en agua desionizada sin control de pH.

Habiendo seleccionado la pareja de solvente de extracción y dispersión, así como el pH de la solución de la muestra, se evaluaron los siguientes parámetros: volumen de líquido iónico de extracción (30, 50 y 70 μL), el volumen de líquido iónico dispersante (100, 250 y 500 μL) y el tiempo de extracción (3 y 5 min). Durante la optimización, todos los experimentos se realizaron por duplicado y la selección de las condiciones óptimas fue hecha en base a la recuperación y la reproducibilidad.

4.2.8. Evaluación del desempeño de los métodos de microextracción en fase líquida desarrollados.

4.2.8.1 Microextracción líquido-líquido

Para la evaluación del desempeño los métodos de microextracción líquido-líquido desarrollados, se realizaron extracciones por triplicado de estándares acuosos de 40 $\mu\text{g/mL}$ de los fármacos bajo las condiciones óptimas.

La eficiencia de la extracción se evaluó con el porcentaje de recuperación (% R) y la precisión de las extracciones.

La recuperación se calculó mediante la comparación de la cantidad de analito en la fase extractante y la cantidad del mismo en la muestra inicial, utilizando la ecuación 3

$$\% R = \left(\frac{\text{Cantidad de analito en la fase extractante}}{\text{Cantidad de analito en la muestra inicial}} \right) \times 100 \quad \text{Ecuación 3.}$$

La precisión se evaluó calculando la desviación estándar relativa en porcentaje de las respuestas obtenidas (áreas) de cada uno de los estándares extraídos por medio de la ecuación 4.

$$\% DER = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.}$$

donde:

$\% DER$ = Desviación estándar relativa en porcentaje

s = Desviación estándar

\bar{x} = Media

4.2.8.2 Microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquido iónicos (MILs-DLLME)

Para la evaluación del desempeño de la microextracción líquido-líquido dispersiva, se realizaron extracciones por triplicado de estándares acuosos de 40 µg/mL de los fármacos, bajo las condiciones de extracción óptimas.

Para evaluar la eficiencia de la extracción, se consideraron tanto la precisión como el factor de enriquecimiento (EF) de las extracciones, utilizando para este último la ecuación 5.

$$EF = \frac{\text{Concentración en la fase extractante}}{\text{Concentración original de la muestra}}$$

Ecuación 5.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1. Determinación de la miscibilidad de los líquidos iónicos.

Para evaluar la miscibilidad y tomando como referencia la relación de volúmenes de 1:10 indicada por la ASTM [28], se probó inicialmente con 50 μL de líquido iónico y llevando hasta un volumen total de 500 μL con el solvente a evaluar. Sin embargo, estos volúmenes no resultaron adecuados por lo que se incrementó el volumen total a 1mL, con un volumen de líquido iónico en la mezcla de 100 μL .

Por otra parte, además de los 30 min de contacto recomendados por la ASTM para evaluar la miscibilidad, se decidió mantener en reposo la mezcla por un período de tiempo igual a temperatura controlada (25°C), previo a su comparación con el blanco.

Una vez establecidas las condiciones para el trabajo a microescala, se determinó la miscibilidad con el agua de los 24 líquidos iónicos enlistados en el apartado 4.1.3.1. resultando 14 de ellos inmiscibles en agua. Los resultados se muestran en la tabla IV.

Tabla IV. Resultados obtenidos en la evaluación de la miscibilidad de los líquidos iónicos con el agua.

Líquidos iónicos	
Inmiscibles con el agua	Miscibles con el agua
<ul style="list-style-type: none"> • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1,2-dimetil-3-propil imidazolio. • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-etil-3-metil imidazolio. • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-hexil-3-metil imidazolio. • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-metil-1-propil piperidinio. • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1-metil-1-propil pirrolidinio. • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 3-metil-1-propil piridinio. • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de butil trimetil amonio. • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de metil trioctil amonio. • Bis (trifluorometil sulfonil) imida de trietil sulfonio. • Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio. • Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio. • Hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil imidazolio. • Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolio. • Triflato de 1-hexil-3-metilimidazolio. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bromuro de 1-decil-3-metil imidazolio. • Dietilfosfato de 1-etil-3-metil imidazolio. • Metanosulfonato de 1-etil-3-metil imidazolio. • Metilsulfato de 1-butil-3-metil imidazolio. • Nitrato de etil amonio. • Tetracloroaluminato de 1-etil-3-metil imidazolio. • Tetrafluoroborato de 1-butil-2,3-dimetil imidazolio. • Tetrafluoroborato de 1-butil piridinio. • Tetrafluoroborato de 1-etil-3-metil imidazolio. • Trifluorometanosulfonato de 1-butil-3-metil imidazolio.

A los 14 líquidos iónicos que resultaron inmiscibles en agua se les realizaron pruebas de miscibilidad en acetonitrilo y metanol, así como en diferentes mezclas de estos con agua (tabla 5.2). Además se probó la miscibilidad de estos mismos líquidos iónicos en mezclas de los solventes orgánicos con ácido fórmico 1%, ácido trifluoracético 1% y NaCl 1% cuyos resultados se explican en la tabla VI y VII

Tabla V. Miscibilidad de líquidos iónicos con solventes orgánicos y mezclas de estos con agua.

Líquido iónico	Metanol	Acetonitrilo	Agua:Metanol (90:10)	Agua:Metanol o ACN (50:50)
BMIM-PF₆	M	M	I	I
EMIM-ntf	M	M	I	M
HMIM-ntf	M	M	I	I
HMIM-PF₆	M	M	I	I
HMIM-otf	M	M	M	M
OMIM-PF₆	M	M	I	I
DMP-ntf	M	M	I	I
PMPI-ntf	M	M	I	I
N1114-NTF	M	M	I	I
N1888-NTF	M	M	I	I
PMPL-ntf	M	M	I	I
MPPIP-ntf	M	M	I	I
SEt3-ntf	M	M	I	M
DMIM-BF₄	M	M	I	M

M. Miscilbes, I. Inmiscibles.

Tabla VI. Miscibilidad de líquidos iónicos inmiscibles en agua con mezclas de metanol y soluciones acuosas de compuestos de diferente naturaleza química.

Líquido iónico	AF 0,1 % : MeOH: IL (6:3:1)	AF 0,1 % : MeOH (50:50)	TFA 0,1 % : MeOH : IL (6:3:1)	TFA 0,1 % : MeOH (50:50)	NaCl 0,1%:MeOH:IL (6:3:1)	NaCl 0,1%:MeOH (50:50)
BMIM-PF ₆	I	M	I	I	I	I
EMIM-ntf	I	M	I	M	I	M
HMIM-ntf	I	I	I	I	I	I
HMIM-PF ₆	I	I	I	M	I	I
HMIM-otf	M	M	M	M	M	M
OMIM-PF ₆	I	I	I	I	I	I
DMP-ntf	I	I	I	I	I	I
PMPI-ntf	I	I	I	I	I	I
N1114-NTF	I	I	I	I	I	I
N1888-NTF	I	I	I	I	I	I
PMPL-ntf	I	I	I	I	I	I
MPPIP-ntf	I	I	I	I	I	I
SEt3-ntf	I	M	I	I	I	I
DMIM-BF ₄	M	M	M	M	M	M

M. Miscilbes, I. Inmiscibles.

Tabla VII. Miscibilidad de líquidos iónicos inmiscibles en agua con mezclas de acetonitrilo y soluciones acuosas de compuestos de diferente naturaleza química.

Líquido iónico	TFA 0,1 % : ACN : IL	TFA 0,1 % : ACN	NaCl 0,1 % : ACN : IL	NaCl 0,1 % : ACN
	(6:3:1)	50:50	(6:3:1)	50:50
BMIM-PF₆	I	I	I	I
EMIM-ntf	I	I	I	I
HMIM-ntf	I	I	I	I
HMIM-PF₆	I	I	I	I
HMIM-otf	M	M	M	M
OMIM-PF₆	I	I	I	I
DMP-ntf	I	I	I	I
PMPI-ntf	I	I	I	I
N1114-NTF	I	I	I	I
N1888-NTF	I	I	I	I
PMPL-ntf	I	I	I	I
MPPIP-ntf	I	I	I	I
SEt3-ntf	I	I	I	I
DMIM-BF₄	M	M	M	M

M. Miscilbes, I. Inmiscibles

5.2. Desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos para el análisis de los fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos

Para la separación de los líquidos iónicos de los fármacos hidrofílicos se probaron diferentes modos cromatográficos tales como: fase inversa, par iónico y de interacciones hidrofílicas. Así mismo, se evaluó el desempeño en la separación de diferentes columnas dentro de los tipos de cromatografía anteriormente mencionados, de tal forma que primeramente se establecieron las mejores condiciones cromatográficas para cada uno de los analitos y posteriormente se evaluó el comportamiento de los líquidos iónicos en los diferentes sistemas cromatográficos.

Las primeras pruebas cromatográficas para los fármacos hidrofílicos se hicieron utilizando cromatografía en fase inversa, tomando como referencia métodos ya descritos en la bibliografía (bibliografías de fármacos, carpeta fármacos España).

Las columnas empleadas inicialmente fueron una columna Atlantis dC₁₈ (Waters) y una Zorbax Eclipse XDB C₁₈ (Agilent), las cuales fueron evaluadas utilizando fases móviles de diferente composición en modo isocrático (tabla II) para la separación de los estándares de los fármacos hidrofílicos de forma individual. Se seleccionó como fase móvil óptima, aquella que nos proporcionó mayores tiempos de retención, así como la mejor forma de las señales cromatograficas. Los resultados de esta evaluación se encuentran resumidos en la tabla VIII, mientras que en el Anexo I se muestran los cromatogramas obtenidos para cada uno de los fármacos.

Tabla VIII. Tiempos de retención para los fármacos hidrofílicos en columnas de fase inversa, utilizando como fase móvil buffer de formiatos (100 mM, pH 4):Metanol, 40°C, 0,15 mL/min (Atlantis) y 30°C, 0,2mL/min (XDB).

Analito	Composición de la fase móvil	Atlantis dC₁₈ t_r (min)	Zorbax XDB C₁₈ t_r (min)
Ácido acetilsalicílico	70:30	11,12	5,84
Ácido salicílico	70:30	8,87	4,37
Atenolol	80:20	7,19	3,21
Cafeína	70:30	9,68	4,17
Cimetidina	80:20	7,97	3,45
Metformina	90:10	4,24	2,24
Hidroclorotiazida	80:20	5,25	2,60
Paracetamol	70:30	5,83	2,85

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas óptimas para cada analito, se estudió el comportamiento de los líquidos iónicos en estos sistemas mediante el análisis de soluciones metanólicas (1% v/v) de cada uno de ellos. Sin embargo, en ambas columnas la mayoría de los líquidos iónicos mostraron señales en el rango correspondiente a los tiempos de retención de los fármacos incluidos en el estudio. En la figura 2 se muestra como ejemplo, el cromatograma obtenido para uno de los líquidos iónicos en las condiciones óptimas de análisis para la cafeína y el paracetamol.

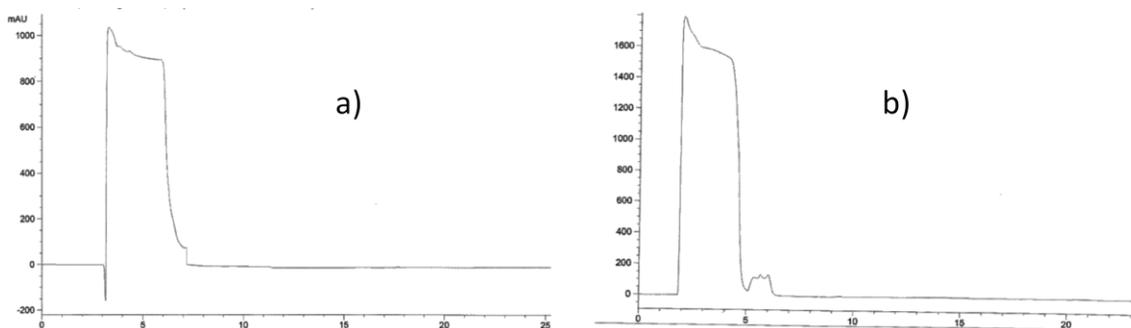


Figura 2. .Cromatograma obtenido para una solución metanólica del Bis(trifluorometilfulfonil)imida de 1etil-3 metilimidazolio (1% v/v) a) columna Atlantis dC₁₈ y b) columna Zorbax Eclipse-XDB, ambos a 220 nm.

Considerando estos resultados, se probó la cromatografía de fase inversa con formación de pares iónicos, utilizando la misma columna Atlantis dC₁₈ y una columna Kromasil C₈, con TFA y HFBA, respectivamente, como reactivos para la formación de pares iónicos. (Figura 3).

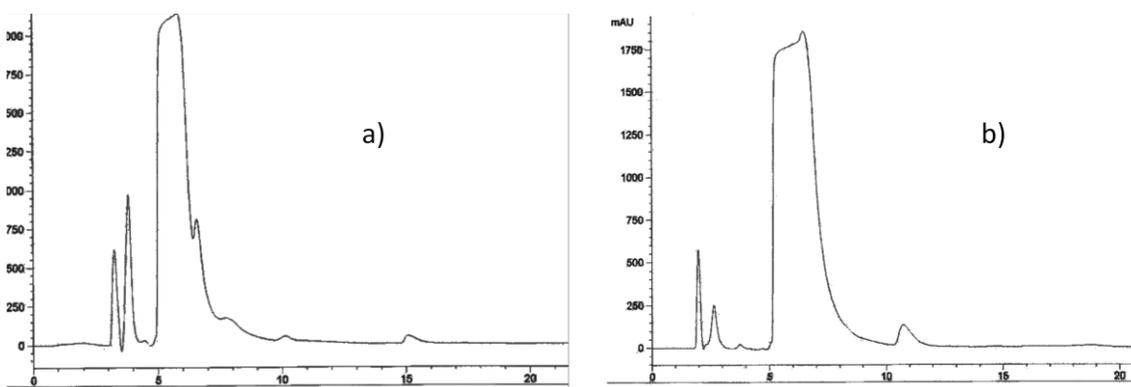


Figura 3. Cromatograma obtenido para una solución metanólica del trifluorometano sulfonato de 1-hexil-3metil imidazolio (1% v/v), utilizando fase inversa con formación de pares iónicos a) columna Atlantis dC₁₈ y b) columna Kromasil C₈, ambos a 220 nm.

Una vez lograda la adecuada retención de los analitos en fase inversa, se buscó desarrollar un método mediante el cual una mezcla de nuestros analitos pudiera ser analizada; probando diferentes programas de gradiente para la columna Atlantis dC₁₈, sin embargo no fue posible separar a los diferentes fármacos entre sí.

Debido a la incapacidad de los fármacos para ser separados en la columna Atlantis dC₁₈, se decidió probar una nueva columna de fase inversa con propiedades distintas a las anteriores que nos permitiera separar a nuestros analitos, la columna seleccionada para esto fue una Discovery HS F5.

Con la columna Discovery HS F5 fueron probados diferentes sistemas de gradiente (Anexo II) utilizando como fase móvil mezcla de Buffer de Formiatos 40 mM (pH4) y Metanol, así como diferentes velocidades de flujo. De tal forma que fue posible diseñar un gradiente adecuado para la separación de la mezcla de 10 de los analitos modelo, dicha separación se muestra en la figura 4. Sin embargo, en esta figura solo se observan 9 señales cromatográficas, ya que la metformina solo absorbe a 230nm mientras que cromatograma de dicha figura se presenta a una longitud de onda de 280nm, el tiempo de retención de la metformina en en la separación cromatográfica es de 3,54 min (Anexo II), así mismo, el sistema de gradiente se encuentra detallado en la tabla IX.

Tabla IX. Sistema de gradiente de HPLC utilizado para la separación de una mezcla de fármacos hidrofílicos(figura 5.3), en una columna Discovery HS F5 a un flujo de 0,2 mL/min a 40°C.

Tiempo (min)	Composición de la fase móvil	
	% Buffer de Formiatos (40mM, pH 4)	% Metanol
0	90	10
5	90	10
6	70	30
12	62	38
16	62	38
18	35	65
23	35	65
24	90	10
34	90	10

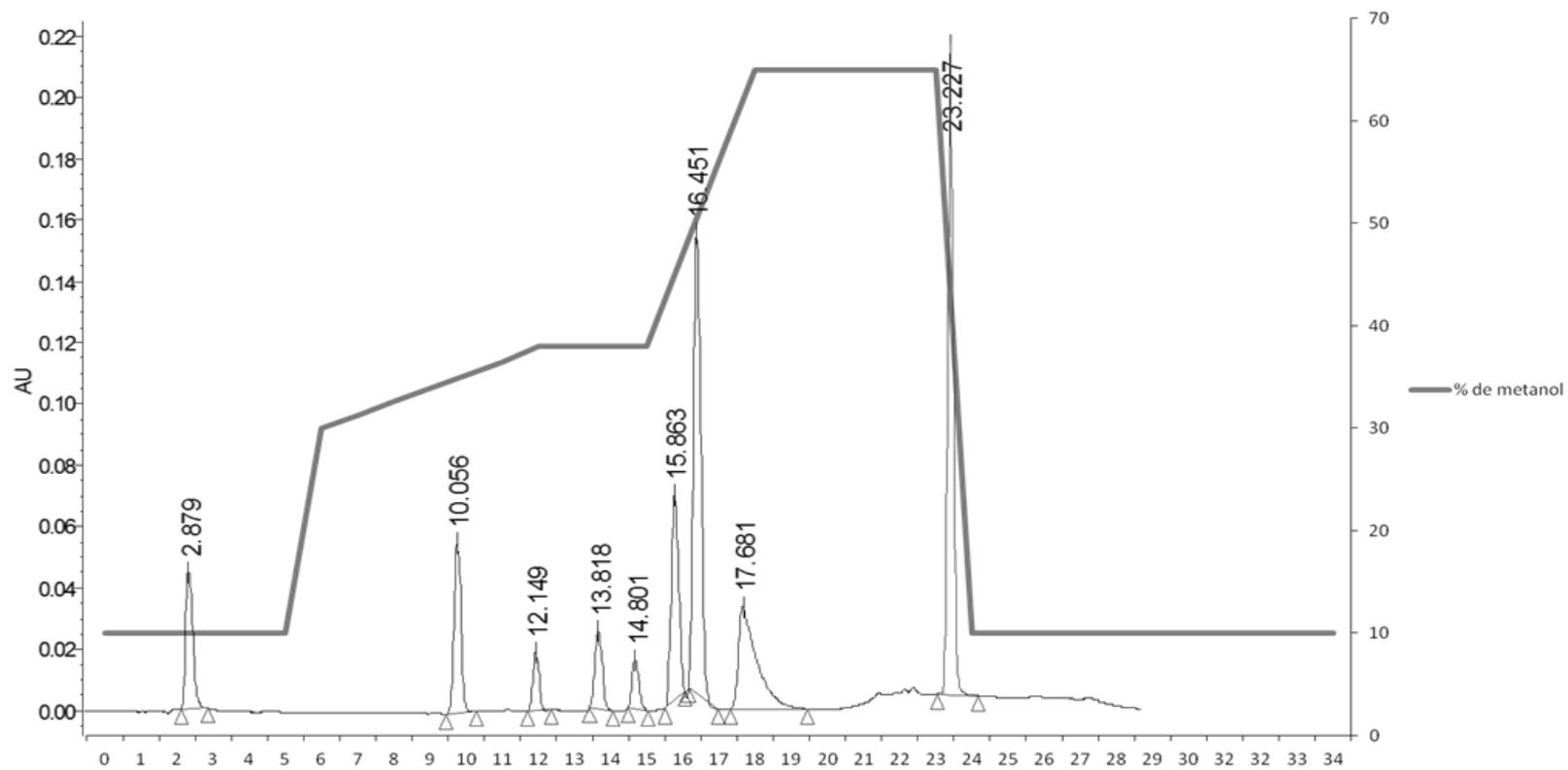


Figura 4. Cromatograma obtenido para una mezcla de fármacos hidrofílicos (20µg/mL) en agua (fármacos por orden de elución: L-dopa, paracetamol, famotidina, hidroclorotiazida, atenolol, ranitidina, cafeína, ácido salicílico y furosemida). Columna: Discovery HS F5, buffer de formiatos 40mM; (pH 4):metanol (Tabla IX), 0,2 mL/min, 40°C, 280 nm.

Al igual que en el caso de los métodos desarrollados para la separación de los estándares de fármacos de forma individual, era necesario estudiar el comportamiento de los líquidos iónicos al introducirlos al sistema cromatográfico mediante el método diseñado para la separación de la mezcla. De tal forma que se inyectaron soluciones metanólicas de los diferentes líquidos iónicos, observando que para la mayoría de ellos no se presentan señales que interfieran con la separación de los analito. En la figura 5 se presenta el cromatograma del tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio, como ejemplo de estos experimentos.

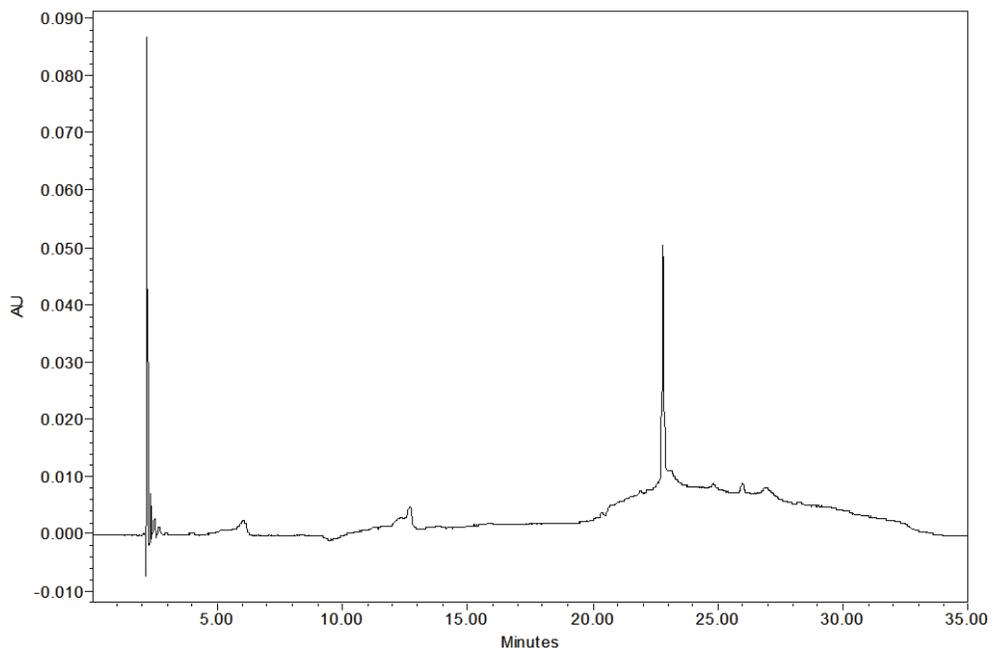


Figura 5. Cromatograma obtenido para una solución metanólica de tetrafluoroborato de 1-decil-3-metilimidazolio (1% v/v), condiciones cromatográficas Tabla IX.

Teniendo en cuenta estos resultados se adicionó a la solución metanólica del líquido iónico la mezcla de los fármacos, esto para observar la separación en presencia del líquido iónico (figura 6): Sin embargo se produjo una pérdida de resolución y la deformación de las señales cromatográficas.

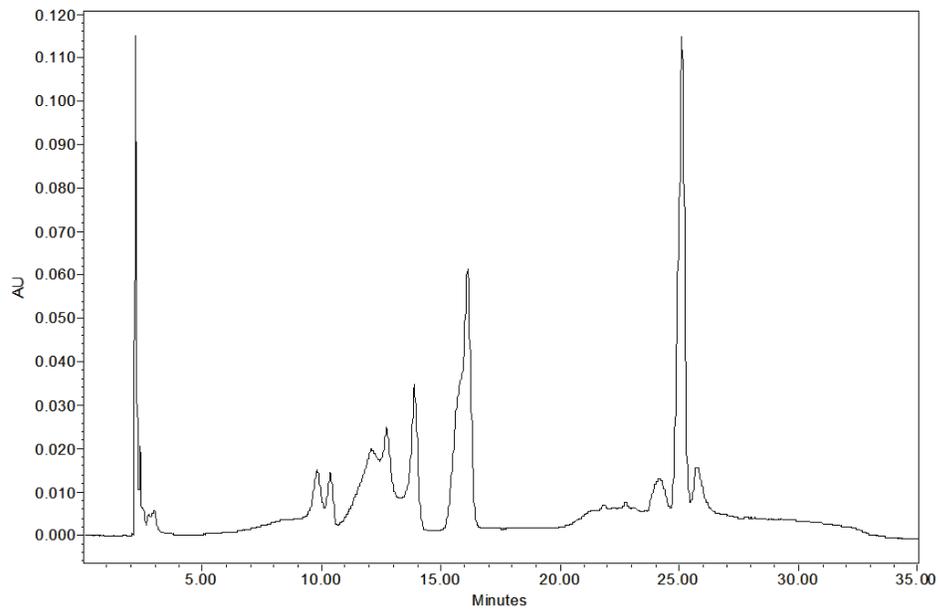


Figura 6. Cromatograma obtenido para mezcla de fármacos hidrofílicos en metanol adicionada con tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolio (1% v/v). Condiciones cromatográficas indicadas en la tabla IX.

Al observar las modificaciones sufridas por las señales cromatográficas se buscó evidenciar la razón por la que dichas modificaciones ocurrían, por lo que se inyectó la mezcla de los fármacos en solución metanólica sin presencia del líquido iónico, así como la mezcla en solución acuosa adicionada con un líquido iónico miscible en agua y

el cual no presentaba señales cromatográficas que interfirieran con nuestro analito. En las figuras 7 y 8 se muestran los cromatogramas correspondientes a estas pruebas.

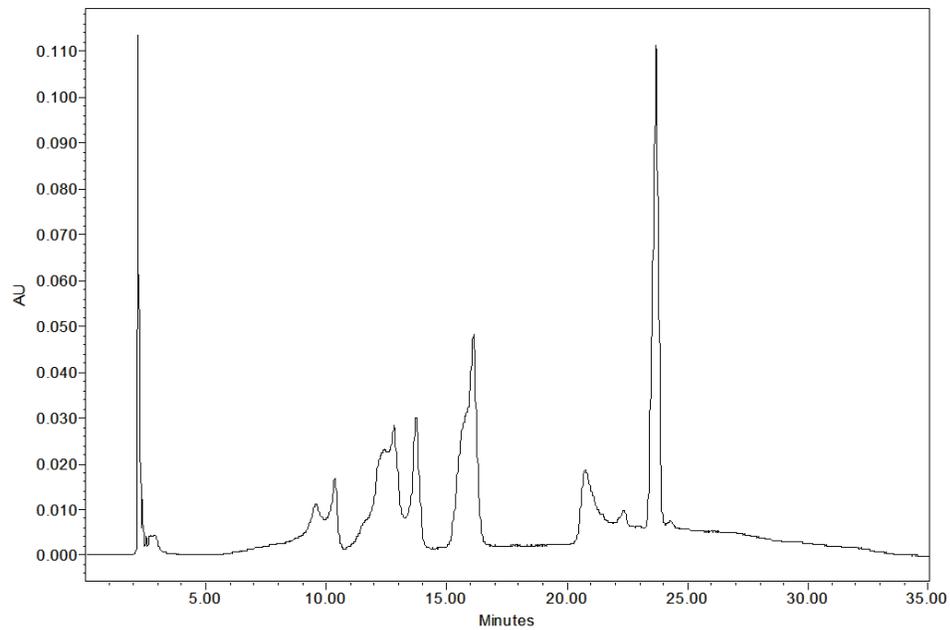


Figura 7. Cromatograma obtenido para mezcla de fármacos hidrofílicos en metanol.

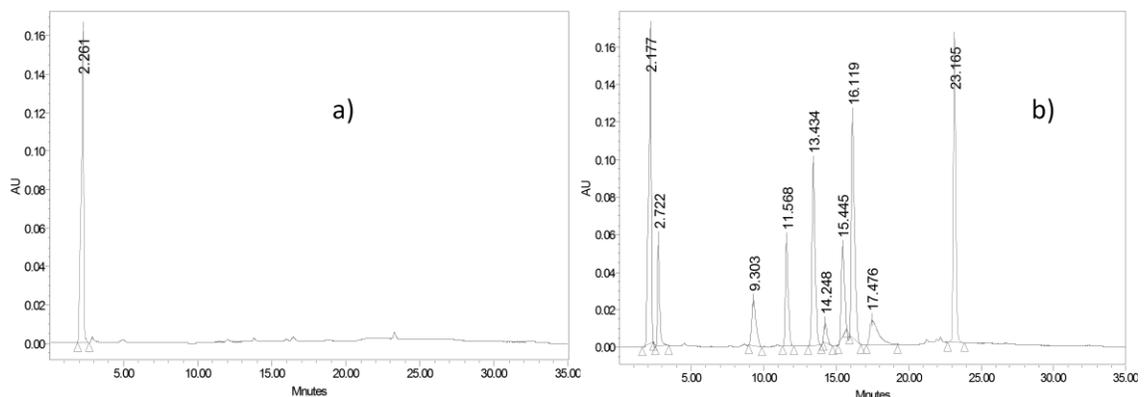


Figura 8. Cromatograma obtenido para a) una solución acuosa de nitrato de etil amonio (1% v/v); b) mezcla de fármacos hidrofílicos en agua adicionada con nitrato de etil amonio (1% v/v).

Como puede observarse en los cromatogramas anteriores es en las soluciones metanólicas con o sin líquido iónico de la mezcla de fármacos donde se presenta la disminución en la resolución y la deformación de las señales cromatográficas (lo mismo ocurre si la mezcla es preparada en acetonitrilo, Anexo III), no así en aquellas donde dicha mezcla se encuentra en solución acuosa con o sin líquido iónico.

Se realizaron pruebas de miscibilidad para los líquidos iónicos inmiscibles en agua de tal forma que la matriz que los contuviera a ellos y a la mezcla de fármacos tuviera un elevado contenido acuoso (tablas 4 y 5), un ejemplo de ello se muestra en la figura 9.

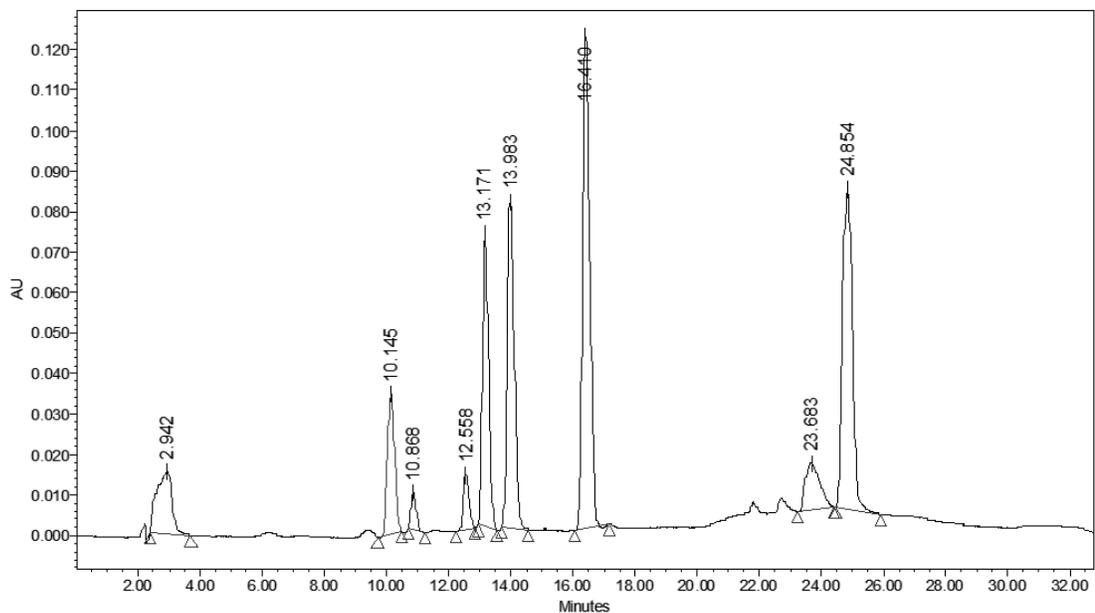


Figura 9. Cromatograma de una mezcla de fármacos hidrofílicos en solución acuosa de ácido fórmico al 0,1%:metanol:tetrafluoroborato de 1-decil-3 metil imidazolio (6:3:1) utilizando las condiciones cromatográficas para la separación de la mezcla descritas en el texto.

En el cromatograma se observa que bajo las condiciones en las que se logra miscibilizar la mezcla de fármacos y líquido iónico en una matriz con alto contenido acuoso, las señales no presentan modificaciones significativas en su forma. Sin embargo, los tiempos de retención se ven modificados, además de que no es posible resolver la señal del líquido iónico de la señal de la L-dopa (señal 2,94min) y el orden de elución de la hidroclorotiazida, atenolol y ranitidina (figura 4), se ve modificado; de tal forma que el orden de elución en la figura 9 es como sigue: atenolol, ranitidina, hidroclorotiazida, 12,56, 13,17 y 13,98 min respectivamente.

Considerando los problemas mencionados anteriormente para la introducción de los analitos adicionadas con líquidos iónicos en soluciones de solventes orgánicos en los métodos desarrollados anteriormente en las diferentes modalidades y columnas de fase inversa, se evaluó la cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC). Las columnas evaluadas en este tipo de cromatografía fueron una Atlantis HILIC Silica y una Luna CN⁻, las cuales no presentaron diferencias significativas en la retención de los analitos.

En la tabla X se presentan los resultados de las condiciones óptimas y los tiempos de retención para cada uno de los fármacos, en esta misma tabla se indican los líquidos iónicos con los cuales no se logró la separación entre ellos y los fármacos.

Para la mayoría de los líquidos iónicos fue satisfactoria la separación de estos de las señales de los analitos, ya que en general los líquidos iónicos no presentaron retención o si la presentan se encuentra fuera de los tiempos de elución de nuestros analitos (figura 10).

Tabla X. Condiciones óptimas de separación y tiempos de retención para los fármacos hidrofílicos utilizando cromatografía de interacciones hidrofílicas; 0,4mL/min, 30°C.

Analito	Columna	Fase móvil Buffer de acetatos (250mM, pH 5):ACN	t _r (min)	Líquidos iónicos con los que no se logró la separación
Metformina	Atlantis HILIC	15:85	4,28	EMIM-ntf, PMPI-ntf
Atenolol	Atlantis HILIC	10:90	4,55	BMIM-PF ₆ , PMPI-ntf, DMP-ntf
Cimetidina	Luna CN	5:95	2,32	N1888-ntf
Ácido acetilsalicílico	Atlantis HILIC	5:95	5,19	N1888-ntf
Ranitidina	Luna CN	15:85	4,34	EMIM-ntf, PMPI-ntf, DMP-ntf, OMIM-PF ₆ , DMIM-BF ₄

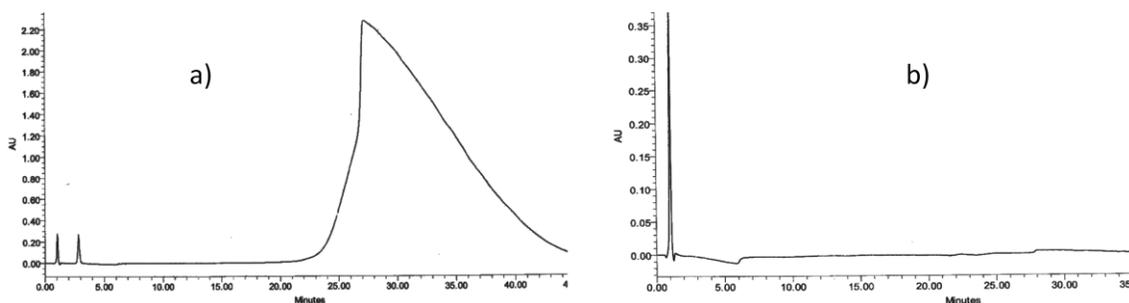


Figura 10. Cromatograma obtenido para a) solución de bis (trifluoro metil sulfonil) imida de 1-etil-3-metil imidazolio en acetonitrilo (1% v/v); b) solución de bis (trifluoro metil sulfonil) imida de butil trimetil amonio (1% v/v).

Sin embargo para el resto de los fármacos hidrofílicos utilizados en este trabajo y que no se encuentran enlistados en la tabla 5.7, HILIC no resultó adecuada debido a que estos compuestos presentan una retención muy baja con tiempos menores a 1,5 min, eluyendo prácticamente en el tiempo muerto.

5.3. Validación de los métodos cromatográfico desarrollados

Una vez encontradas las condiciones óptimas para la separación de los fármacos hidrofílicos, se continuó con la validación de los métodos para 8 analitos que serían analizados de forma individual, siendo seleccionados entre estos 8 analitos los 5 cuyos métodos fueron optimizados por HILIC y 3 más por fase inversa inicialmente (ácido acetilsalicílico, cafeína y paracetamol). En la tabla XI se resumen las condiciones cromatográficas óptimas para estos 8 fármacos y cuyos métodos fueron validados

En Anexo IV se muestran las gráficas de la recta correspondientes a la curvas de calibración para los 8 analitos, mientras que en la tabla XII se resumen los resultados de la validación para cada uno de los métodos para la identificación de los fármacos hidrofílicos.

Tabla XI. Resumen de las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos inmiscibles en agua.

Analito	Columna	Fase móvil	Flujo (mL/min)	T°	λ
Ácido acetilsalicílico	Atlantis HILIC	5:95 (2)	0,4	30°C	254nm
Atenolol	Atlantis HILIC	10:90 (2)	0,4	30°C	280nm
Cafeína	Atlantis dC ₁₈	70:30 (1)	0,15	40°C	280nm
Cimetidina	Luna CN ⁻	5:95 (2)	0,4	30°C	220nm
Hidroclorotiazida	Atlantis dC ₁₈	80:20 (1)	0,15	40°C	280nm
Paracetamol	Atlantis dC ₁₈	70:30 (1)	0,15	40°C	254nm
Ranitidina	Luna CN ⁻	15:85 (2)	0,4	30°C	280nm

(1) Buffer de acetatos 40mM pH4 : ACN.

(2) Buffer de acetatos 250mM pH 5 : ACN

Tabla XII. Resultados de los parámetros evaluados para la validación de los métodos cromatográficos desarrollados.

Analito	Linealidad (r²)	Precisión (% DER)	Exactitud	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Ácido acetilsalicílico	0,999	1,67	r ² =0,999 m= 1,008	0,83	2,52
Atenolol	0,999	4,3	r ² =0,999 m= 1	0,84	2,55
Cafeína	0,998	3,03	r ² =0,998 m= 1	0,59	1,79
Cimetidina	0,999	4,20	r ² =0,999 m= 1	0,32	0,97
Hidroclorotiazida	0,999	6,65	r ² =0,998 m= 0,996	0,29	0,88
Paracetamol	0,999	1,95	r ² =0,999 m= 1	0,98	2,98
Ranitidina	0,999	3,47	r ² =0,999 m= 1,007	0,25	0,78

5.4. Determinación de solubilidad de los fármacos modelo en líquidos iónicos

Para implementar el procedimiento a microescala para la determinación de la solubilidad se tomó como base la metodología descrita por método del matraz [31]. Inicialmente se pesaron 10 mg de fármaco y se añadieron 100 μ L de líquido iónico, sin embargo debido a la viscosidad de los líquidos iónicos no se lograba una agitación adecuada por lo que se optó por aumentar el volumen de líquido iónico, además de la cantidad de fármaco para las pruebas. Por ello, se colocaron 20 mg de fármaco en un microvial de inserto fijo y se le añadieron 250 μ L de líquido iónico o de agua desionizada (control).

Debido a los resultados obtenidos por los primeros experimentos, cuyos coeficientes de variación fueron muy altos, se incluyó una etapa de agitación en baño de ultrasonido antes del período de agitación, así como, aumentar el tiempo de agitación de 24 hrs propuesto por la OCDE a 48 hrs.

Transcurrido este tiempo, los viales se centrifugaron a 3500 rpm a 25°C por 5 minutos, para posteriormente separar las soluciones saturadas de líquido iónico o el agua saturado del sólido de fármaco remanente.

Se tomó una alícuota de las soluciones de cada uno para así cuantificar el contenido del analito en los diferentes líquidos iónicos y en el agua empleando los métodos optimizados y validados previamente. En la figura 11 se presenta el diagrama del procedimiento implementado a microescala.

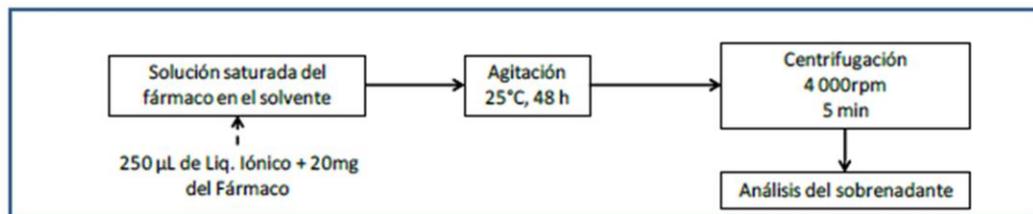


Figura 11. Esquema del procedimiento para la determinación de solubilidad optimizado a microescala.

Una vez optimizado e implementado el método para la determinación de la solubilidad a microescala, se realizaron los experimentos necesarios para determinar esta propiedad fisicoquímica a los 8 fármacos para los cuales fueron validados los métodos cromatográficos. De tal forma que a cada uno de estos fármacos se le determinó su solubilidad con cada uno de los 14 líquidos iónicos inmiscibles en agua involucrados en el estudio, además de la determinación de su solubilidad en agua mediante el mismo procedimiento como control de referencia.

Cada una de las pruebas se realizó y se inyectaron en el cromatógrafo de líquidos por duplicado, y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener la cantidad de fármaco solubilizada en el solvente (líquido iónico o agua), así como el coeficiente de variación de la determinación, en las tablas XIII a la XX se muestran los valores de solubilidad de cada uno de los fármacos resultantes de dichas pruebas, los valores de las casillas sombreadas corresponde a los de los líquidos iónicos en los que se presentó mayor solubilidad.

5.5. Determinación de coeficiente de partición (log P) de los fármacos modelo en sistemas bifásicos líquido iónico/agua.

Tomando como base el método de matraz en agitación para la determinación del Log P, propuesto por la OCDE [32], fueron optimizadas las condiciones para adaptar dicho procedimiento a microescala.

Para la saturación de las fases inicialmente se evaluó un volumen de 400 μL de cada una de las fases, sin embargo este volumen no fue adecuado para la posterior realización de las pruebas de partición entre las fases, por lo que se decidió aumentar el volumen a 600 μL de cada uno de los solventes involucrados en el sistema de partición líquido iónico/agua u octanol/agua, este último por ser considerado un sistema de referencia, dicho volumen nos proporcionó la cantidad necesaria de cada una de las fases para poder realizar la determinación del coeficiente de partición por triplicado.

Para esta saturación de fases, las mezclas de los solventes se sometieron a una agitación suave durante 24 horas a 25 °C, para posteriormente dejarlos en reposo por 24 horas a la misma temperatura. Una vez transcurrido el tiempo de reposo se llevaron los viales a centrifugación durante 5 minutos a una velocidad de 3500 rpm a 25°C.

Después de la centrifugación se separaron las fases, utilizando la fase acuosa para la preparación de las soluciones de los diferentes fármacos a una concentración 0,01M. Con la solución acuosa preparada se mezclaron 150 μL de está y 150 μL de

la fase de líquido iónico saturada u octanol saturado, los viales se sometieron a agitación en vórtex y a una agitación suave a 25°C ambas por 5 minutos.

Posteriormente, se incluyó de nueva cuenta una etapa de centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos a 25°C. Finalmente se separaron las fases, tomando una alícuota de cada una de ellas para ser cuantificado el contenido de fármaco por HPLC. En la figura 12 se presenta el diagrama del procedimiento para el Log P implementado a microescala.

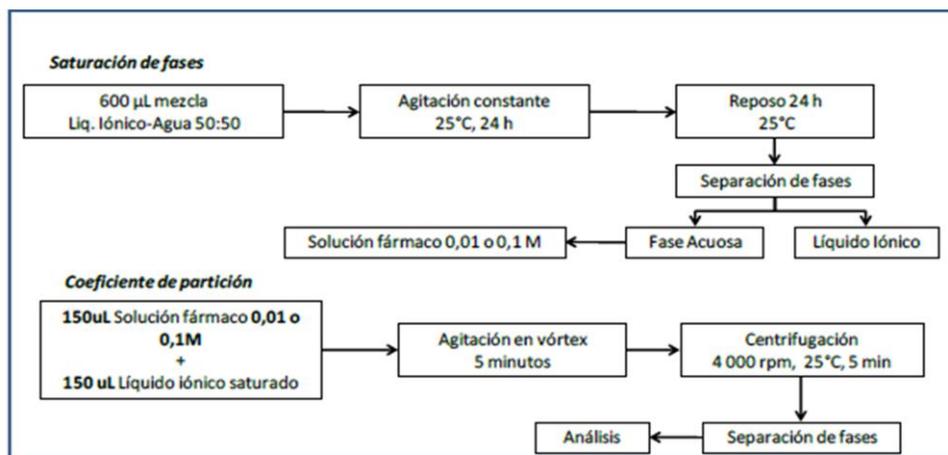


Figura 12. Esquema del procedimientos para la determinación de Log P optimizado a microescala.

En el caso del coeficiente de partición, este fue determinado para 7 de los fármacos cuyos métodos cromatográficos fueron validados, debido a la falta de distribución del estándar de dicho fármaco por parte del fabricante. Por lo cual fue posible obtener el valor del Log P para cada uno de estos 7 analitos en los sistemas líquido

iónico/agua, cuya separación analito-líquido iónico nos permitió cuantificar la concentración de estos en cada una de las fases; además, de la determinación del valor del Log P en el clásico sistema octanol/agua.

Cada una de las pruebas se realizó por triplicado; y se realizaron los cálculos correspondientes para obtener los valores del coeficiente de partición, en las tablas XIV a la XX se muestran los valores de Log P de los diferentes fármacos en los diferentes sistemas bifásicos, siendo los mejores valores de Log P para los sistemas líquido iónico/agua los que se presentan en las celdas sombreadas.

Tabla XII. Valores de solubilidad determinados experimentalmente para el atenolol.

	Solubilidad (mg/mL)	% DER
Agua	18,44	6,9
Líquido iónico:		
BMIM-PF₆	N.R.	-
EMIM-ntf	6,02	6,8
HMIM-ntf	5,58	21
HMIM-PF₆	4,54	15
HMIM-otf	17,20	3,7
OMIM-PF₆	4,75	5,2
DMP-ntf	N.R.	-
PMPI-ntf	N.R.	-
N1114-ntf	6,10	23,2
N1888-ntf	9,17	10,2
PMPL-ntf	2,54	3,9
MPPIP-ntf	11,07	20,5
SEt3-ntf	6,84	1,88
DMIM-BF₄	52,8	14,2

N.R. Separación cromatográfica no resuelta.

Tabla XIV. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el ácido acetilsalicílico.

	Solubilidad mg/mL	% DER	Log P oct/agua	% DER
Agua	3,54	14,7	0,98	5,2

Líquido iónico	Solubilidad mg/mL	% DER	Log P LI/agua	% DER
BMIM-PF₆	20,72	4,3	0,84	8,5
EMIM-ntf	16,71	5	0,60	11,1
HMIM-ntf	34,09	3,3	0,63	6,6
HMIM-PF₆	15,19	7,6	1,43	3,5
HMIM-otf	38,53	5,4	1,79	4,0
OMIM-PF₆	9,35	6,2	1,47	2,4
DMP-ntf	31,00	15,8	1,65	8,0
PMPI-ntf	27,18	12,1	1,68	7,0
N1114-ntf	14,52	8,8	1,10	8,2
N1888-ntf	N.R.	-	N.R.	-
PMPL-ntf	28,55	4,6	1,39	3,8
MPPIP-ntf	22,88	17,3	1,59	1,5
SEt3-ntf	32,90	1,9	0,88	9
DMIM-BF₄	27,33	4,3	1,65	0,3

N.R. Separación no resuelta.

Tabla XV. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el cafeína.

	Solubilidad (mg/mL)	% DER	Log P oct/agua	% DER
Agua	>80	-	-0,23	5.5

Líquido iónico	Solubilidad (mg/mL)	% DER	Log P LI/agua	% DER
BMIM-PF₆	31,80	22,2	0,25	7.5
EMIM-ntf	43,45	32,4	0,27	13,4
HMIM-ntf	25,57	3	0,16	5,4
HMIM-PF₆	30,56	3	0,37	6,5
HMIM-otf	28,69	6,3	0,27	11,1
OMIM-PF₆	27,59	4,3	0,31	14,6
DMP-ntf	22,94	5,8	-0,06	31,0
PMPI-ntf	39,43	14,2	0,12	35,3
N1114-ntf	24,35	2,2	0,28	8,7
N1888-ntf	N.R.	-	N.R.	N.R.
PMPL-ntf	21,25	40,4	-0,17	15,2
MPPIP-ntf	17,23	29,4	-0,10	47,2
SEt3-ntf	48,32	0,1	-0,02	16,3
DMIM-BF₄	45,24	4,6	0,35	5,6

N:R. Separación no resuelta.

Tabla XVI. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el cimetidina.

	Solubilidad mg/mL	% DER	Log P oct/agua	% DER
Agua	2,88	8,5	-0,23	4,0

Líquido iónico	Solubilidad mg/mL	% DER	Log P LI/agua	% DER
BMIM-PF₆	1,42	6,5	0,13	8,6
EMIM-ntf	1,18	16,0	0,26	6,6
HMIM-ntf	0,98	2,9	-0,20	7,8
HMIM-PF₆	0,93	17,1	0,09	28,1
HMIM-otf	6,51	9,7	0,56	13,5
OMIM-PF₆	1,40	38,2	0,01	15,8
DMP-ntf	0,80	9,8	-0,09	23,8
PMPI-ntf	1,74	3,3	0,40	3,3
N1114-ntf	0,63	2,2	-0,20	8,7
N1888-ntf	N.R.	-	N.R.	-
PMPL-ntf	0,66	5,7	-0,17	16,6
MPPIP-ntf	0,83	18,4	-0,18	46,6
SEt3-ntf	1,95	7,4	0,05	23,5
DMIM-BF₄	5,27	14,7	-0,85	14,6

N.R. Separación no resuelta.

Tabla XVII. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el hidroclorotiazida.

	Solubilidad mg/mL	% DER	Log P oct/agua	% DER
Agua	0,24	14,6	-0,06	2,5

Líquido iónico	Solubilidad mg/mL	CV	Log P LI/agua	CV
BMIM-PF₆	5,84	10,6	1,02	13,3
EMIM-ntf	6,80	3,8	0,90	12,2
HMIM-ntf	4,18	17,2	1,00	5,1
HMIM-PF₆	2,08	13,5	0,85	13,6
HMIM-otf	54,35	14,5	1,29	2,4
OMIM-PF₆	1,92	0,9	0,98	21,0
DMP-ntf	5,39	2,9	1,26	3,6
PMPI-ntf	N.R.	-	N.R.	-
N1114-ntf	3,17	34,5	0,90	3,6
N1888-ntf	N.R.	-	N.R.	-
PMPL-ntf	4,68	1,2	1,12	0,6
MPPIP-ntf	3,60	21,6	1,16	4,2
SEt3-ntf	5,82	0,7	1,22	1,5
DMIM-BF₄	20,58	12,4	2,10	2,5

N.R. Separación no resuelta.

Tabla XVIII. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el metformina.

	Solubilidad (mg/mL)	% DER	Log P oct/agua	% DER
Agua	123,80	13,6	-2,4	9,6

Líquido iónico	Solubilidad (mg/mL)	% DER	Log P LI/agua	% DER
BMIM-PF₆	5,13	14,9	-0,57	16,6
EMIM-ntf	N.R.	-	N.R.	-
HMIM-ntf	0,74	8,6	-0,95	4,7
HMIM-PF₆	0,99	2,9	-0,58	5,5
HMIM-otf	15,88	9,7	0,12	7,6
OMIM-PF₆	0,79	5,7	-1,39	5,4
DMP-ntf	0,54	0,7	-0,34	4,0
PMPI-ntf	N.R.	-	N.R.	-
N1114-ntf	1,12	19	-0,28	9,7
N1888-ntf	0,06	5	-0,52	16,7
PMPL-ntf	0,41	8,6	-0,36	10,7
MPPIP-ntf	0,92	51,3	-0,38	21,1
SEt3-ntf	0,58	6,3	0,04	14,7
DMIM-BF₄	5,61	11	-0,47	13,3

N.R. Separación no resuelta.

Tabla XIX. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el paracetamol.

	Solubilidad (mg/mL)	% DER	Log P oct/agua	% DER
Agua	11,25	2,4	-0,28	3,1

Líquido iónico	Solubilidad (mg/mL)	% DER	Log P LI/agua	% DER
BMIM-PF₆	6,12	6,1	0,37	13,1
EMIM-ntf	7,47	4,5	0,36	13,6
HMIM-ntf	8,54	9,3	0,20	9,6
HMIM-PF₆	8,36	22,2	0,27	4,2
HMIM-otf	60,29	14,8	1,22	8,1
OMIM-PF₆	11,50	3,0	0,05	26,9
DMP-ntf	7,40	8,3	0,22	20,7
PMPI-ntf	N.R.	-	N.R.	-
N1114-ntf	4,65	2,4	0,07	5,5
N1888-ntf	3,91	24,9	-0,73	12,3
PMPL-ntf	8,46	26,5	0,22	22,7
MPPIP-ntf	8,90	9,4	0,29	23,9
SEt3-ntf	9,35	2,2	0,39	14,9
DMIM-BF₄	56,07	12,7	1,07	1,5

N.R. Separación no resuelta.

Tabla XX. Valores de solubilidad y Log P determinados experimentalmente para el ranitidina.

	Solubilidad (mg/mL)	% DER	Log P oct/agua	% DER
Agua	>100	-	-1,86	20,4

Líquido iónico	Solubilidad (mg/mL)	% DER	Log P LI/agua	% DER
BMIM-PF₆	4,95	24,7	0,72	11,9
EMIM-ntf	N.R.	-	N.R.	-
HMIM-ntf	1,46	1,6	-0,12	18,3
HMIM-PF₆	1,71	20,1	0,43	14,5
HMIM-otf	1,95	9,3	0,63	12,2
OMIM-PF₆	N.R.	-	N.R.	-
DMP-ntf	N.R.	-	N.R.	-
PMPI-ntf	N.R.	-	N.R.	-
N1114-ntf	1,50	8,8	0,79	7,2
N1888-ntf	0,35	65,6	-0,16	1,1
PMPL-ntf	11,34	14,1	0,72	1,9
MPIP-ntf	0,71	5,7	0,61	4,1
SEt3-ntf	17,76	10,1	1,14	9,2
DMIM-BF₄	N.R.	-	N.R.	-

N.R. Separación no resuelta.

5.6. Desarrollo de métodos de microextracción líquido-líquido para los fármacos modelo, utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción.

Los resultados obtenidos de la caracterización de los líquidos iónicos como disolventes para los fármacos hidrofílicos, fueron la base para la elección de aquellos que serían evaluados como solventes de extracción en las técnicas de microextracción en fase líquida.

Para la microextracción líquido-líquido, los 2 líquidos iónicos que presentaron mayores valores de log P, fueron seleccionados para ser evaluados en las extracciones de los fármacos cuyo método cromatográfico fue desarrollado y validado mediante el uso de cromatografía de interacciones hidrofílica. Mientras que en el caso de la cafeína, hidroclorotiazida y paracetamol (análisis por cromatografía de fase inversa clásica), los líquidos iónicos evaluados como solventes de extracción fueron el HMIM-otf y el DMIM-BF₄, los cuales fueron seleccionados por su capacidad de miscibilizarse en mezclas de alto contenido acuoso y no necesariamente por ser los que mejores valores de Log P presentaron para dichos analitos.

En la tabla XXI. se muestran los líquidos iónicos seleccionados para la evaluación como solventes de extracción en la microextracción líquido-líquido, para cada uno de los analitos, mientras que el resto de las condiciones evaluadas: pH de la solución de la muestra, número de extracciones y tipo de agitación se describieron en el apartado 4.2.6.

Tabla XXI. Líquidos iónicos evaluados como solventes de extracción en la microextracción líquido-líquido.

Analito	LI extracción		
	HMIM-otf	PMPI-ntf	DMP-ntf
Ácido Acetilsalicílico	HMIM-otf	PMPI-ntf	DMP-ntf
Cimetidina	HMIM-otf	PMPI-ntf	
Metformina	HMIM-otf	SEt3-ntf	
Ranitidina	N1114-ntf	SEt3-ntf	
Cafeína	HMIM-otf	DMIM-BF ₄	
Hidroclorotiazida	HMIM-otf	DMIM-BF ₄	
Paracetamol	HMIM-otf	DMIM-BF ₄	

El volumen de la muestra y del solvente de extracción permaneció constante en 150 μ L para cada una de las fases, y los primeros parámetros optimizados en la extracción fueron el líquido iónico y el pH de la solución, seleccionando como condición óptima aquella que proporcionó la mejor recuperación y precisión para la extracción. En la figura 13 se muestran como ejemplo las gráficas correspondientes a la evaluación de estos dos parámetros para el ácido acetilsalicílico. Todas las extracciones fueron realizadas por duplicado.

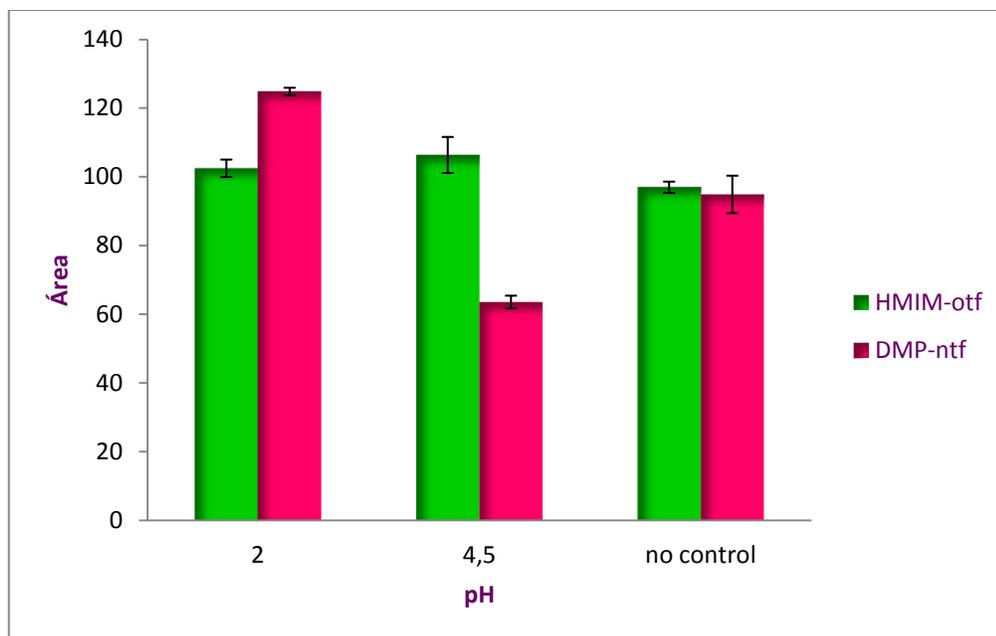


Figura 13. Efecto del pH en la microextracción líquido-líquido del ácido acetilsalicílico utilizando al HMIM-otf y al DMP-ntf como solventes de extracción (n=2).

Una vez seleccionado el líquido iónico y el pH óptimo para la extracción (DMP-ntf y 2 respectivamente en el caso del AAS), se ensayaron el número de extracción y el tipo de agitación, seleccionando de igual forma los que proporcionaron mayor recuperación y mejor precisión. En la figura 14 se muestran las gráficas de un ejemplo de la optimización de estas condiciones.

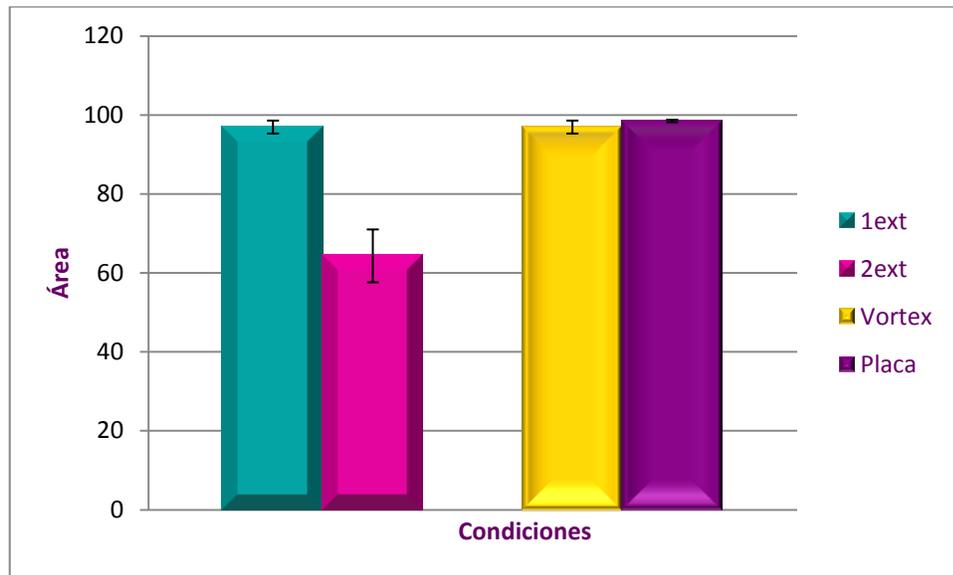


Figura 14. Efecto del número de extracciones y el tipo de agitación en la microextracción líquido-líquido del ácido acetilsalicílico (n=2).

En el anexo V se presentan los gráficos correspondientes a la optimización de las variables que afectan la microextracción líquido-líquido para cada uno de los analitos estudiados; mientras que en la tabla XXII, se resumen las condiciones obtenidas como óptimas para cada uno de los fármacos en este tipo de microextracción.

Tabla XXII. Condiciones óptimas para la microextracción líquido-líquido de fármacos hidrofílicos utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción.

Analito	LI extracción	pH	No. extracciones	Tipo de agitación
Ácido Acetilsalicílico	DMP-ntf	2	1	Placa
Cafeína	DMIM-BF ₄	N.C.	1	Vortex
Cimetidina	PMPI-ntf	N.C.	1	Placa
Hidroclorotiazida	HMIM-otf	4,5	1	Vortex
Metformina	HMIM-otf	8	1	Vortex
Paracetamol	DMIM-BF ₄	8	1	Vortex
Ranitidina	SEt3-ntf	1,3	1	Placa

N.C. pH no controlado

5.7. Desarrollo de métodos de microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME) para fármacos hidrofílicos

En el caso de la Microextracción líquido-líquido dispersiva la elección de los líquido iónico de extracción para ser evaluados como solventes de extracción, se basó inicialmente en el valor de Log P que cada uno de los fármacos presentó con los líquidos iónicos, por lo que se eligieron aquellos líquidos iónicos que presentaran mayor frecuencia de mejores valores de Log P para los fármacos estudiados, excepto el HMIM-otf, seleccionando 7 de ellos para ser evaluados como posibles solventes de extracción para la MILs-DLLME, los cuales se enlistan en la tabla XXIII.

Tabla XXIII Líquidos iónicos inmiscibles en agua seleccionados para evaluarse como posibles solventes de extracción en la MILs-DLMME.

Líquidos iónicos inmiscibles
Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 1,2-dimetil-3-propil imidazolio.
Bis (trifluorometil sulfonil) imida de 3-metil-1-propil piridinio.
Bis (trifluorometil sulfonil) imida de butil trimetil amonio.
Bis (trifluorometil sulfonil) imida de trietil sulfonio.
Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metil imidazolio.
Hexafluorofosfato de 1-metil-3-octil imidazolio.
Tetrafluoroborato de 1-decil-3-metil imidazolio.

Los líquidos iónicos evaluados como posibles solventes de dispersión fueron aquellos que en las pruebas de miscibilidad resultaron miscibles en agua y que se muestran en la tabla IV, excepto el BMIM-BF₄ y el EMIM-AlCl₄.

Debido a la necesidad de que el solvente dispersante debe ser miscible con la matriz de la muestra y el solvente de extracción, fue necesario determinar la miscibilidad entre los líquidos iónicos miscibles e inmiscibles en agua seleccionados como posibles solventes de dispersión y extracción respectivamente.

En la tabla XXIV se presentan los resultados de las pruebas de miscibilidad entre líquidos iónicos.

Tabla XXIV. Miscibilidad entre líquidos iónicos inmiscibles en agua (LI-EX) y líquidos iónicos miscibles en agua (LI-DS).

LI-EX \ LI-DS	BMIM-otf	DMIM-Br	EMIM-CH ₃ SO ₃	EMIM-BF ₄	BMMIM-BF ₄	BuPy-BF ₄	EMIM-DEP
BMIM-PF ₆	M	M	M	M	M	M	M
OMIM-PF ₆	M	I	M	M	M	M	M
DMP-ntf	M	M	M	M	M	M	M
PMPI-ntf	M	M	M	M	M	M	M
N1114-ntf	M	I (s)	M	M	I	I	M
SEt3-ntf	M	I (s)	M	M	M	M	M
DMIM-BF ₄	M	M	M	M	M	M	M

M. Miscibles, I. Inmiscibles, (s) Formación de sólido.

De acuerdo a los resultados los líquidos iónicos seleccionados para evaluar como posibles solventes dispersantes, fueron los tres que tienen como catión al EMIM, mientras que entre los líquidos iónicos de extracción se descartó al OMIM PF₆ por su dificultad para ser manipulado.

Habiendo elegido las mezclas de líquidos iónicos miscibles entre ellos, fue necesario determinar cuáles de estas al ser inyectadas en la muestra eran capaces mediante el solvente dispersante, de generar la nube de dispersión en la matriz de la muestra. En la tabla XXV se muestran los resultados de estas pruebas tras la inyección de los líquidos iónicos en la matriz de la muestra.

Tabla XXV Formación de la nube de dispersión en la matriz de la muestra.

LI-EX \ LI-DS	EMIM-CH₃SO₃	EMIM-BF₄	EMIM-DEP
BMIM-PF₆	✓	X	X
DMP-ntf	✓	X	X
PMPI-ntf	✓	X	X
N1114-ntf	✓	✓	X
SEt3-ntf	✓	X	X
DMIM-BF₄	X	✓	X

✓Formación de nube de dispersión, X no se generó la nube de dispersión.

Basados en su capacidad de miscibilizarse entre ellos, así como, para formar la nube de dispersión y su afinidad frente a cada uno de los analitos de acuerdo al valor de log P que estos presentan, los líquidos iónicos seleccionados para ser evaluados como solventes de extracción y solvente dispersante se presentan en la tabla XXVI.

Tabla XXVI . Líquidos iónicos evaluados como solventes de extracción y dispersante en los procesos de MILs-DLLME.

Analito	LI extracción		LI dispersante	
Ácido Acetilsalicílico	DMP-ntf	PMPI-ntf	EMIM- CH ₃ SO ₃	
Cafeína	SEt3-ntf	DMIM-BF ₄	EMIM- CH ₃ SO ₃	EMIM- BF ₄
Cimetidina	PMPI-ntf	SEt3-ntf	EMIM- CH ₃ SO ₃	
Hidroclorotiazida	DMIM-BF ₄	DMP-ntf	EMIM- CH ₃ SO ₃	EMIM- BF ₄
Metformina	SEt3-ntf	DMP-ntf	EMIM- CH ₃ SO ₃	
Paracetamol	SEt3-ntf	DMIM-BF ₄	EMIM- CH ₃ SO ₃	EMIM- BF ₄
Ranitidina	N1114-ntf	SEt3-ntf	EMIM- CH ₃ SO ₃	EMIM- BF ₄

Los valores de pH evaluados para la muestra fueron los mismos que para la microextracción líquido-líquido y que se encuentran detallados en la tabla III, los volúmenes evaluados fueron 30, 50 y 70 μ L y 100, 250 y 500 μ L para el líquido iónico de extracción y de dispersión respectivamente. Los tiempos de extracción probados fueron 3 y 5 min.

Primeramente se seleccionaron el tipo de LI-extractante, LI-dispersante y el pH de la solución de la muestra, eligiendo como óptimas aquellas condiciones que presentaron mayor recuperación y precisión. En las figura 15 se muestran a manera de ejemplo las gráficas de los efectos de las cada una de las variables sobre la recuperación de los analitos para el caso de la ranitidina. Mientras que en el apéndice se observan las gráficas para el resto de los analitos.

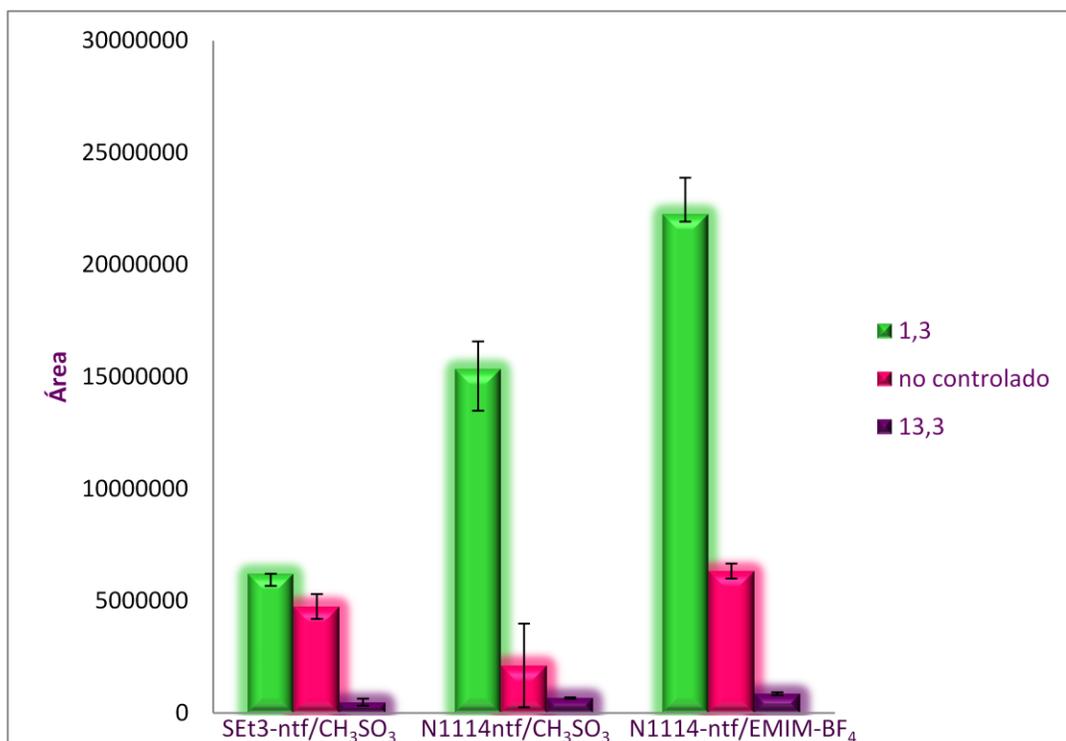


Figura 15 Efecto del pH y la mezcla de solventes en la MILs-DLLME para la ranitidina (n=2).

Una vez elegidas estas condiciones se seleccionaron el volumen del solvente de extracción y dispersión, fijando el volumen de uno, mientras se variaba el volumen del otro para encontrar el valor óptimo, en las figuras 16 y 17 se muestran los resultados de estos experimento.

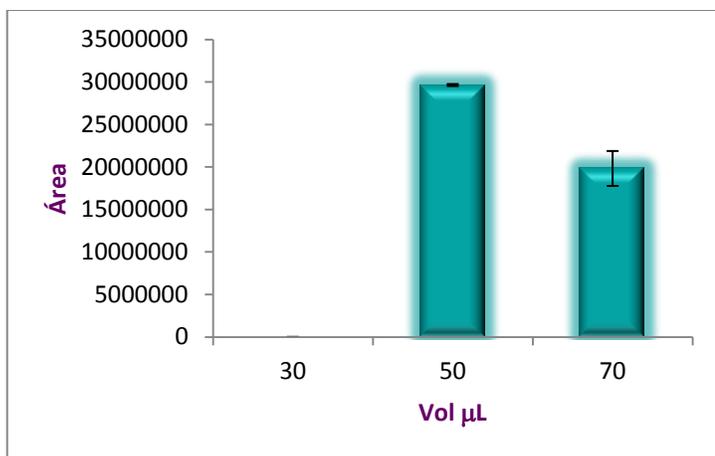


Figura 16. Efecto del volumen del solvente de extracción sobre el proceso de MILS-DLLME para la ranitidina (n=2).

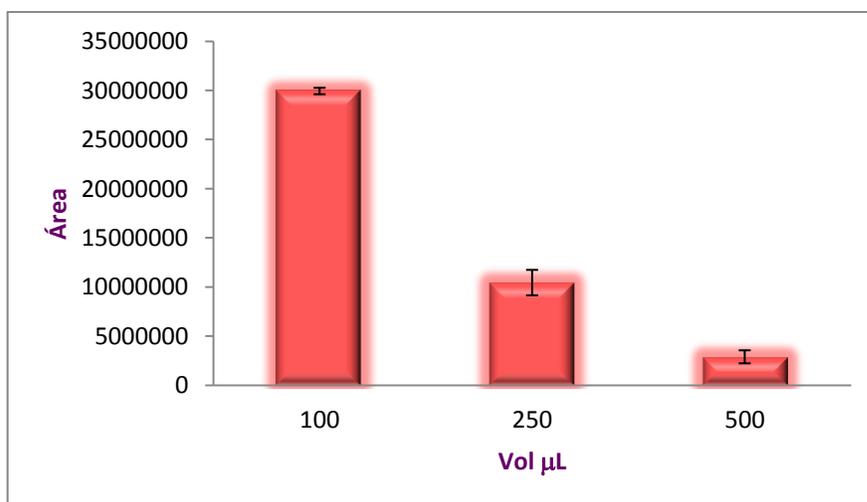


Figura 17. Efecto del volumen del solvente de dispersión sobre el proceso de MILS-DLLME para la ranitidina (n=2).

De igual forma fueron seleccionados aquellos volúmenes cuya recuperación y precisión fueron mejores.

Finalmente se evaluó el efecto del tiempo de la extracción, variada entre 3 y 5 min (figura 5.18)

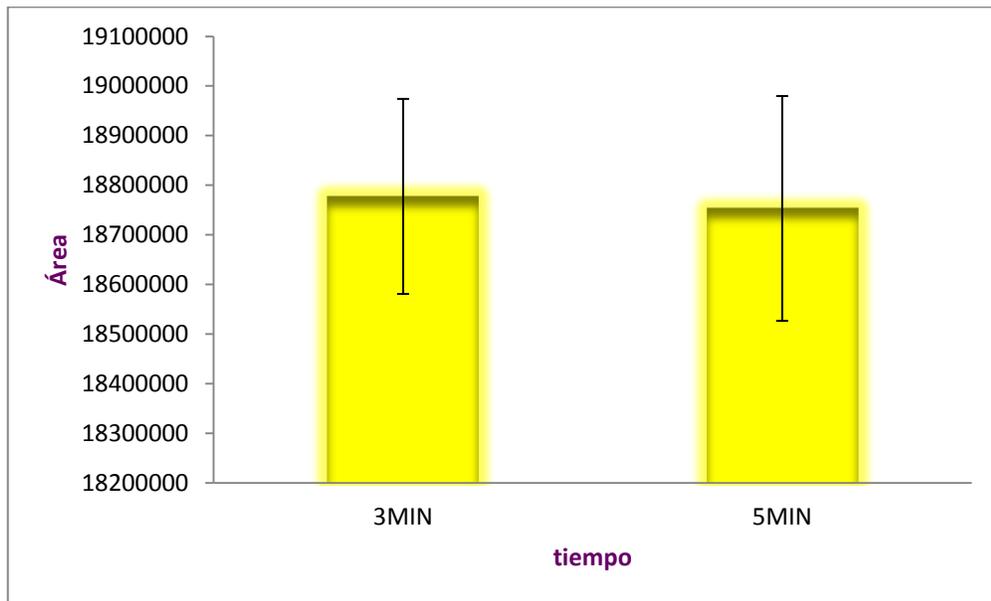


Figura 18. Efecto del tiempo de dispersión sobre el proceso de MILs-DLLME para la ranitidina (n=2).

Al igual que en el caso de los efectos del pH y la mezcla de solventes las gráficas correspondientes a los efectos de los volúmenes de los solventes y el tiempo de extracción se muestran en el apéndice x, para el resto de los analitos.

En la tabla XXVII se resumen las condiciones seleccionadas como óptimas para la MILs-DLLME de los analitos involucrados en el estudio.

Tabla XXVII. Resultados de la optimización de los parámetros para la MILs-DLLME para fármacos hidrofílicos.

Analito	LI-EX	LI-DS	pH	Vol. LI-EX	Vol. LI-DS	Tiempo (min)
Ácido Acetilsalicílico	PMPI-ntf	EMIM-CH ₃ SO ₃	2	50	250	3
Cafeína	DMIM-BF ₄	EMIM-BF ₄	N.C.	70μL	100μL	3
Cimetidina	SEt3-ntf	EMIM-CH ₃ SO ₃	N.C	50	100	3
Hidroclorotiazida	DMIM-BF ₄	EMIM-BF ₄	4,5	30μL	100μL	5
Metformina	NO FUE POSIBLE RECUPERARLA					
Paracetamol	DMIM-BF ₄	EMIM-BF ₄	N.C.	50μL	100μL	5
Ranitidina	N1114-ntf	EMIM-BF ₄	1,3	50μL	100μL	3

N.C. pH no controlado

5.8. Evaluación del desempeño de los métodos de microextracción en fase líquida desarrollados

5.8.1. Microextracción líquido-líquido.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas para la extracción de cada uno de los analitos mediante la microextracción líquido-líquido, estas fueron evaluadas realizando el análisis por triplicado de la extracción, calculando la eficiencia de la extracción como porcentaje de recuperación y la precisión de las extracciones.

En la tabla XXVIII se observan los resultados de la evaluación de cada uno de los procesos de microextracción líquido-líquido.

Tabla XXVIII. Resultados de la evaluación de la microextracción líquido-líquido utilizando líquidos iónicos como solventes de extracción.

Analito	% de recuperación	% DER
Ácido acetilsalicílico	78,74	7,08
Cafeína	54,06	2,68
Cimetidina	50,43	1,72
Hidroclorotiazida	88,84	4,95
Metformina	38,40	1,48
Paracetamol	76	3,71
Ranitidina	106,18	7,47

5.8.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME).

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para la MILs-DLLME esta fue evaluada para cada uno de los analitos, mediante extracciones por triplicado, de las cuales fue calculada la concentración del analito en la fase recuperada y la precisión de las mismas, así como el factor de enriquecimiento (EF) de la extracción.

En la tabla XXIX se enlistan los resultados de dicha evaluación para la extracción de los fármacos hidrofílicos involucrados.

Tabla XXIX. Resultados de la evaluación de la MILs-DLLME para la extracción de fármacos hidrofílicos.

Analito	MILs-DLLME ($\mu\text{g/mL}$)	% DER	Factor de enriquecimiento
Ranitidina	1382,8	5,1	34,6
Cafeína	95,9	4,6	2,4
Hidroclorotiazida	1583,9	10,9	39,6
Paracetamol	230,6	11,4	5,8
Ácido Acetilsalicílico	373,1	7,3	9,3
Cimetidina	92,7	4,6	2,3
Metformina	SIN RECUPERACIÓN		SIN RECUPERACIÓN

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

6.1. Selección de los líquidos iónicos incluidos en el análisis.

Siendo el objetivo de nuestro estudio el evaluar la capacidad solvente de diferentes líquidos iónicos frente a fármacos hidrofílicos ($\log P < 1,3$), era muy importante la selección de los líquidos iónicos que serían involucrados en el estudio. Al no ser uno de nuestros objetivos la síntesis de estos compuestos, la disponibilidad en el mercado del tipo de líquidos iónicos con las características requeridas no debería ser una limitante.

Tomando en cuenta la principal aplicación, que les daríamos a estos una vez caracterizadas sus propiedades disolventes (solventes de extracción en las microextracciones en fase líquidas), era necesario contar con líquidos iónicos que fueran inmiscibles en agua y cuya temperatura de fusión fuera menor a 30 °C, esto con la finalidad de mantenerlos en estado líquido a temperatura ambiente. Sin embargo, los datos proporcionados por las diferentes casas comerciales, así como las hojas de seguridad de los líquidos iónicos, en la mayoría de los casos no especificaban su miscibilidad con el agua, o diferían entre ellas. Por este motivo, su disponibilidad y su temperatura de fusión fueron las características principales para la selección de ellos, y determinar experimental la miscibilidad con el agua de los líquidos iónicos adquiridos.

6.2. Evaluación de la miscibilidad de los líquidos iónicos.

Las tendencias de la química analítica moderna, a la miniaturización de las técnicas se ha convertido en parte importante de nuestro grupo de trabajo, esto con la finalidad de disminuir tiempos, costos y la generación de residuos químicos. Es por estos motivos que además de desarrollar métodos de microextracción, todas las demás técnicas aplicadas durante esta investigación, cuya finalidad era definir características de las propiedades solventes de los líquidos iónicos fueron adaptadas a la microescala.

Tal es el caso de la técnica para la determinación de miscibilidad de líquidos iónicos, para la cual nos basamos en el protocolo sugerido por la ASTM [28] donde el volumen total propuesto es de 250 mL de la mezcla de disolventes con una relación de 1:10

entre ellos. En nuestro caso los costos generados al requerir 25 mL de cada líquido iónico para una sola prueba era muy elevado, tomando además en cuenta la generación de residuos en volumen que hubiera representado realizar solo estas pruebas.

Por lo tanto decidimos disminuir el volumen de la prueba al menor volumen que nos permitiera observar adecuadamente la miscibilidad entre el líquido iónico y el solvente con el cual la estuviéramos determinándola, respetando la relación 1:10 marcada en el protocolo de la ASTM, de tal forma que el primer volumen probado fue de 50 μL de líquido iónico en un volumen total de 500 μL de mezcla, sin embargo este volumen no nos permitía observar con claridad el volumen de líquido iónico en el vial; por lo que se aumentó el volumen a 100 μL en un volumen total de 1 mL.

Se pusieron en contacto durante 30 min como lo establece el protocolo de la ASTM, a 25°C, después de esto decidimos dejar 30 min en reposo a la misma temperatura, para observar claramente si había o no una separación de fases o turbidez al comparar con el blanco de solvente.

Habiendo adaptado a microescala la técnica para la determinación de miscibilidad, todos los líquidos iónicos se pusieron en contacto con el agua para determinar su miscibilidad con esta, no teniendo problemas para su observación. Sin embargo en el caso de dos líquidos iónicos se tuvo dificultad debido a que a pesar de que los reportes de su temperatura de fusión es mucho menor que la temperatura ambiente el metilsulfato de 1-butil-3-metilimidazolio [33] y el tetracloroaluminato de 1-etil-3-metilimidazolio, mostraban formación de cristales o sólido de la sal, por lo que fue necesario ponerlos en el baño de ultrasonido para generar un poco de temperatura y tenerlos totalmente líquidos, ambos líquidos iónicos resultaron miscibles en agua.

Finalmente de los 24 líquidos iónicos a los que se les determinó la miscibilidad en agua, 14 de ellos resultaron inmiscibles en esta y fueron los seleccionados para la caracterización de sus propiedades solventes.

Para los líquidos iónicos inmiscibles en agua, cuya propiedad de inmiscibilidad nos permitió emplearlos en las técnicas de microextracción en fase líquida, sin embargo para introducirlos en los sistemas cromatográficos, fue necesario probar su miscibilidad en solventes orgánicos (co-solventes); de tal forma que pudieran tenerse en una mezcla homogénea que pudiera inyectarse en el cromatógrafo de líquidos.

Todos los líquidos iónicos inmiscibles en agua, resultaron miscibles en metanol y acetonitrilo.

Sin embargo, como se discutirá más adelante la proporción elevada de agua en la fase móvil resulta problemática para la introducción de los líquidos iónicos en los sistemas de cromatografía líquida, por lo que fue necesario investigar mezclas de solución acuosa:solvente orgánico, que favorecieran este proceso; no obstante, como se observa en las tabla 5.2 solo 4 de los 14 líquidos iónicos pudieron ser miscibilizados en las mezclas probadas de agua con metanol o acetonitrilo.

Buscando aumentar la miscibilidad de estos compuestos y teniendo en cuenta sus propiedades iónicas, se probó adicionar compuestos ácidos (ácido fórmico y TFA) y cloruro de sodio, para intentar favorecer la miscibilidad de estos en mezclas con elevado contenido acuoso.

Sin embargo la adición de estos compuestos no favoreció considerablemente la miscibilidad de estos, ya que además de los 4 líquidos iónicos miscibles en mezclas de agua:metanol o acetonitrilo, solo 2 líquidos más pudieron ser miscibilizado en alguna de las demás mezclas probadas.

De tal forma que la mezcla de solventes que fue capaz de miscibilizar mayor número de líquidos iónicos (5 en total) fue la constituida por ácido fórmico 0,1%:metanol (50:50), mientras que la mezcla TFA 0,1%:metanol (50:50) fue la única capaz de miscibilizar al hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metil imidazolio.

6.3. Desarrollo de métodos por cromatografía de líquidos para el análisis de los fármacos hidrofílicos en presencia de líquidos iónicos.

La determinación de fármacos es de gran importancia desde el punto de vista clínico [34,35], legal [36, 37] y/o medioambiental [38, 39].

Diversas técnicas han sido utilizadas para su análisis, como la cromatografía de gases (GC) [40] cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [41] y de ultra alta eficacia (UHPLC) [43], entre otras. Siendo la GC la que ofrece la mayor capacidad, aunque, no es útil para compuestos termolábiles, altamente polares, o no volátiles [38, 43]. Por lo cual las técnicas de cromatografía líquida resultan atractivas para analizar este tipo de compuestos.

La cromatografía de fase inversa, es el modo más utilizado en la cromatografía líquida, las fases estacionarias clásicas son hidrófobas y retienen analitos no polares eficazmente, sin embargo, para analitos polares se requieren condiciones altamente acuosas, que pueden causar daño a las columnas C₈ o C₁₈ convencionales [34].

En nuestro trabajo inicialmente se evaluó la separación con 2 columnas: una Atlantis dC₁₈ y una Zorbax Eclipse-XDB C₁₈.

La primera de estas dos columnas está formada por una fase estacionaria de fase inversa (a base de sílice) y está preparada para trabajar con fases móviles de alto contenido acuoso (AQ), , sin embargo, la información acerca de la naturaleza de los grupos no es totalmente conocida, por lo que es difícil predecir su aplicabilidad específica a compuestos polares [45].

Por su parte, la columna Zorbax Eclipse-XDB C₁₈, se distingue por su capacidad de trabajo en un amplio rango de pH (2 a 9) proporcionando picos cromatográficos más simétricos, principalmente para compuestos de tipo básico debido a la desactivación de los grupos silanol [45].

Durante la optimización de las condiciones cromatográficas en ambas columnas se utilizaron diferentes fases móviles, cuyas diferencias fueron la fuerza iónica (concentración), así como el pH. Inicialmente las fases probadas fueron el buffer de formiatos (100 mM, pH's 3 y pH 4); si bien con ambas fases era posible retener a los analitos y no se observaba una diferencia importante en los tiempos de retención de la mayoría de ellos, a pH 3 el ácido acetilsalicílico y el ácido salicílico mostraban tiempos de retención elevados, mayores a 20 min, lo que provocaba un ensanchamiento en las señales cromatográficas, como puede verse en la tabla 5.5 que a manera de ejemplo presenta los resultados obtenidos con la columna Atlantis dC18, que fue la seleccionada debido a que proporcionó los mayores tiempos de retención para todos los analitos. Por esta razón la mezcla del buffer de formiatos 100 mM de pH 4 fue elegida como fase móvil. La proporción de la fase móvil fue variada, eluyendo siempre a los analitos de forma isocrática, de tal manera que se encontró la composición de fase móvil que nos proporcionó una buena retención de los fármacos hidrofílicos, así como una buena forma de las señales cromatográficas.

En cuanto a la fase constituida por el buffer de acetatos (40 mM, pH 4):acetonitrilo, fue utilizada principalmente porque al desarrollar los métodos de HILIC, la solución amortiguadora utilizada tenía como fracción acuosa un buffer constituido por el par acético:acetato, y utilizar un buffer compuesto por el mismo par en todos los métodos cromatográficos constituía una mejor alternativa en cuanto tiempo y uso de reactivos en el laboratorio. De la misma forma, el acetonitrilo se convirtió en el solvente orgánico utilizado en todas las fases móviles. Esta fase móvil si bien modificó los tiempos de retención que se habían obtenido en la optimización hecha con la fase móvil de Buffer de formiatos (100 mM, pH4):Metanol, funcionó eficientemente para la separación de los fármacos hidrofílicos de tal forma que la proporción de solvente acuoso:solvente orgánico en la fase móvil fue la misma que para la fase móvil utilizada inicialmente.

Una vez optimizadas las condiciones para la retención de los fármacos hidrofílicos, era sumamente importante observar el comportamiento que los líquidos iónicos presentaban en los sistemas cromatográficos; ya que, al utilizar a los líquidos iónicos como solventes de extracción tendríamos contenidos en ellos a nuestros analitos, por lo que era necesario que las señales generadas por los primeros (puesto que por su estructura son capaces de absorber en la región de UV) no interfirieran en la identificación y cuantificación del compuesto de interés. Se han publicado investigaciones sobre las interacciones que presentan los líquidos iónicos con diferentes fases estacionarias y sus posibles mecanismos de retención, destacando la separación de estos mediante RP-HPLC [46,47]de igual cabe mencionar que existen reportes que describen la separación de líquidos iónicos de otro tipo de compuestos (al ser usados como solventes de extracción), sin embargo la mayoría de ellos son para analitos no polares o moderadamente polares como pesticidas y compuestos

aromáticos, entre otros [49-52], siendo escasos los reportes para analitos polares o hidrofílicos [49,51].

Sin embargo, en nuestro caso al emplear la cromatografía de fase inversa clásica, tanto con la columna Atlantis dC₁₈, como con la Zorbax Eclipse-XDB C₁₈, observamos que la mayoría de los líquidos iónicos presentan señales en zonas que coinciden con los tiempos de retención de los fármacos, como se puede observar en las figura 2

Tomando en cuenta las propiedades iónicas de estos compuestos, se utilizó la cromatografía de pares iónicos con la finalidad de tratar de retener más a los líquidos iónicos y así resolver sus señales de las de los fármacos. Sin embargo, este tipo de cromatografía tampoco resultó eficiente para la separación, ya que al igual que en la fase inversa muchos líquidos iónicos presentaron señales en el rango de elución de los fármacos.

Son varios factores los que hacen que se presenten las señales que observamos en las figuras 2 y 3. en estos dos tipos de cromatografía. Primeramente la longitud de onda a la que se adquirió el cromatograma es de 220 nm, en la cual debido a su estructura la mayoría de los líquidos iónicos presentan una amplia absorción, a diferencia de algunas longitudes de onda de análisis donde los líquidos iónicos presentan una baja absorción. Esta longitud de onda fue utilizada para poner de manifiesto la retención de los líquidos iónicos en el sistema cromatográfico y no cometer el error de tomar como parte de la intensidad de la señal de nuestro analito, la generada por el líquido iónico a alguna otra longitud de onda de análisis si su señal se encuentra solapada con la de nuestro compuesto de interés.

Cómo veremos más adelante otro de los factores que influye de forma importante en la amplitud de la señal del líquido iónico es la matriz metanólica en la que fue

miscibilizado para su inyección en el HPLC, ya que si bien algunos líquidos iónicos si presentan una mayor retención en los sistemas de fase inversa, al ser miscibilizados en matrices con porcentajes de agua mayores al 50%, es posible observar una señal mucho más angosta, a la observada en estos cromatogramas.

Estudios han demostrado que la proporción elevada de agua en la fase móvil resulta problemática para la miscibilidad de ciertos líquidos iónicos, principalmente aquellos con aniones del tipo bis(trifluorometil sulfonil) imida [53] y que nosotros pudimos observar al realizar las pruebas de miscibilidad en mezclas con contenido acuoso, ya que solo dos de nueve líquidos iónicos cuyo anión es del tipo bis(trifluorometil sulfonil) imida pudieron ser miscibilizados.

Otro de los factores que influye es la concentración, ya que la cantidad de líquido iónico presente en la matriz de la muestra, ya que la intensidad de la señal de este puede competir con la de nuestro analito de tal forma que si la concentración de este es muy baja, podría pasar prácticamente desapercibido en el cromatograma, además de que nosotros observamos durante nuestro trabajo, que dicha concentración puede tener efectos sobre el tiempo de retención del resto de los analitos.

Cabe mencionar que muchos de los trabajos en donde los líquidos iónicos forman parte de la matriz que es inyectada a los sistemas cromatográficos no mencionan si estos producen alguna modificación en las separaciones cromatográficas o generan alguna otra dificultad en el sistema para la adecuada identificación y cuantificación de los analitos, incluso muchos de los reportes no presentan cromatogramas. Nosotros hemos encontrado variaciones en los tiempos de retención y en la intensidad de la respuesta en el análisis de compuestos hidrofílicos en presencia de ILs como se mencionó anteriormente. Este comportamiento ha sido reportado también por Berton y colaboradores en el 2012 [54] que, indican que durante el empleo de líquidos iónicos

como solventes de extracción, observaron una variación importante en la retención del analito cuando la muestra contenía el líquido iónico empleado.

Como en todo estudio en el que se analizan compuestos con características químicas semejantes o aplicaciones similares, en nuestro caso fármacos hidrofílicos; siempre resulta interesante el tener un método que nos permita analizar simultáneamente dichas sustancia. Por este motivo se buscó desarrollar un método que nos permitiera el análisis de una mezcla de nuestros analitos en estudio.

Sin embargo utilizando la columna Atlantis dC₁₈ no fue posible desarrollar un sistema de gradiente que nos permitiera la separación de la mezcla en cuestión, debido a la semejanza en los tiempos de retención que presentaban nuestros analitos.

Debido a dicha incapacidad, se probó una columna de fase inversa Discovery HS F5 cuya fase estacionaria posee grupos pentafluorofenilos. De acuerdo con el fabricante, esta columna proporciona mayores tiempos de retención para analitos con valores de Log P <2.5, así como una mayor eficiencia en la separación de compuestos que en columnas C₁₈ presentan tiempos de retención muy semejantes. Gracias a estas características fue posible diseñar un sistema de gradiente que permitiera la separación simultánea de 10 de los fármacos hidrofílicos involucrados en el estudio, como se mostró en la figura 4.

De igual forma que en el caso de las columnas de fase inversa evaluadas inicialmente, fue necesario evaluar el comportamiento de los líquidos iónicos en la separación de la mezcla de los analitos. Por lo que se inyectaron los líquidos iónicos en solución metanólica en el sistema cromatográfico siguiendo el sistema de gradiente desarrollado. Si bien muchos de ellos no presentaron señales que pudieran interferir con la identificación y cuantificación de nuestros analitos, al inyectar la mezcla se

fármacos y líquido iónico en solución metanólica, para favorecer la miscibilidad de este último, como se muestra en la figura 6 las señales cromatográficas pierden resolución y se deforman.

Sin embargo al inyectar solo la mezcla de fármacos en solución metanólica, y no en solución acuosa como se hizo durante la optimización del gradiente de elución, se observó que el efecto era el mismo, por lo que pudimos concluir que posiblemente no se trataba necesariamente de un efecto producido únicamente por el líquido iónico, sino que la amplia diferencia entre la matriz inyectada y la fase móvil era en parte o totalmente responsable del efecto que estábamos observando. Lo anterior pudo ser evidenciado al adicionar a la mezcla acuosa de los estándares de los fármacos un líquido iónico miscible en agua cuya señal no interfería con la de nuestros analitos, observando que la resolución y la forma de los picos es similar a la de la mezcla sin adicionar líquido iónico.

Por este motivo surgió la necesidad de determinar la miscibilidad de los líquidos iónicos de nuestro interés en mezclas que contuvieran una elevada proporción de fase acuosa para semejar la fase móvil del sistema cromatográfico y así evitar el efecto de matriz.

Una vez realizadas las pruebas con mezclas de elevado contenido acuoso que miscibilizaron a algunos de los líquidos iónicos; la mezcla de estándares de los fármacos, adicionada con líquido iónico fueron inyectadas en el HPLC. Si bien el efecto de la matriz de la muestra ya no se presentó, se observaron otros efectos como modificación en los tiempos de retención, incluso modificaciones en el orden de elución como se describió para la figura 9, lo que nos hace suponer que el líquido iónico tiene efectos sobre el equilibrio de partición entre el analito y la fase estacionaria; lo cual tiene una razón lógica tomando en cuenta que estos compuestos han sido utilizados

como modificadores de fase móviles [55-58] y también como parte estructural de nuevas fases estacionarias [57.-59)

Considerando los problemas ocasionados por la matriz para la inyección de la muestra, y las pocas o nulas opciones para tener miscibles a nuestros líquidos iónicos de interés era necesario buscar una opción que nos ofreciera oportunidades frente a estos inconvenientes.

La alternativa seleccionada para ser evaluada, fue la denominada por Alpert en 1990 como cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC), la cual consiste en el uso de fases estacionarias polares en combinación con fases móviles con un alto contenido de un disolvente orgánico miscible en agua (principalmente acetonitrilo), sugiriendo que el disolvente con mayor fuerza de elución es el agua y el mecanismo de retención es la partición [60]. Sin embargo, se ha demostrado en diferentes condiciones experimentales que en las separaciones por HILIC están implicados diferentes tipos de mecanismos de retención, presentando una buena retención para compuestos hidrofílicos [43].

Tomando en cuenta su capacidad para separar compuestos hidrofílicos [61], además de el uso de fases móviles con un elevado contenido de solvente orgánico nos ofreció grandes ventajas para el análisis de los analitos en presencia de líquidos iónicos inmiscibles en agua por HPLC, evitando el efecto de la matriz mencionado con anterioridad

Las columnas evaluadas no mostraron diferencia importante en cuanto a los tiempos de retención de los analitos, logrando desarrollar 5 métodos por este tipo de cromatografía para algunos de nuestros analitos, ya que el resto presentaban tiempos de retención cercanos al tiempo muerto.

6.4. Validación de los métodos cromatográficos

Para la validación de cada uno de los métodos desarrollados se evaluaron la linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación.

Se prepararon soluciones estándares de cada uno de los fármacos por triplicado a 5 niveles de concentración entre 5 y 80 ppm para la construcción de las curvas de calibración. La ecuación de la recta se obtuvo por regresión con el método de mínimos cuadrados y todos los métodos resultaron lineales con valores de $R^2 > 0.99$. La precisión se evaluó con la desviación estándar relativa de los factores de respuesta de los estándares de calibración, siendo en todos los casos menores al 5%. La exactitud fue establecida evaluando la correlación entre la concentración calculada y la real de los estándares de calibración, obteniendo valores de $r^2 > 0,99$ y $m \approx 1$ para todos los analitos. Finalmente los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron calculados considerando una relación señal/ruido de 3 y 10, respectivamente, y los valores obtenidos variaron en un intervalo de 0.25-0.84 ppm para el LOD y 0.78-2.55 ppm para el LOQ. Si bien estos límites de detección se encuentran por encima de algunos reportados en la literatura, es importante destacar que no se han encontrado reportes donde se involucren la cuantificación de estos en presencia de líquidos iónicos por HPLC y para muchos de estos analitos ya se cuentan métodos de cuantificación utilizando detectores de masas, lo que les brinda una mayor sensibilidad para el análisis [34-36, 38, 40, 42].

6.5. Determinación solubilidad fármacos hidrofílicos en líquidos iónicos inmiscibles en agua.

Si bien el método del matraz propuesto por la OECD [31] para la determinación de solubilidad no establece un volumen determinado de solvente para la realización de la prueba, nosotros decidimos realizar la técnica a microescala

Además, de acuerdo al protocolo mencionado la pruebas preliminares implican el usar volúmenes desde 0,1 mL hasta 100 mL de agua para la determinación de la solubilidad de las sustancias en esta. Sin embargo, el número de pruebas y costo que esto implicaba, estaba fuera del alcance de nuestra investigación, por lo que se establecieron cantidades del soluto (fármaco hidrofílico) y de solvente (líquido iónico) que nos permitiera observar claramente el remanente de sólido después del tiempo de agitación y con ello la saturación del solvente.

20 mg de fármaco y 250 μ L de líquido iónico fueron las cantidades mínimas óptimas que nos permitieron observar con claridad la interacción entre los estándares sólidos y los líquidos iónicos y nos facilitó la separación entre el estándar sólido y el líquido saturado al término de la prueba.

La etapa de agitación en baño de ultrasonido se incluyó para facilitar el contacto entre el sólido y el líquido iónico. Otra de las modificaciones hechas fue el aumentar el tiempo de agitación de 24 a 48 hrs, ambos cambios fueron realizados debido a que la viscosidad de los líquidos iónicos dificultaba el contacto entre estos y los sólidos de los estándares, además, que los coeficientes de variación de las pruebas, sin la agitación en el ultrasonido y con agitación por 24 hrs, eran mayores al 15% en la mayoría de las

primeras pruebas realizadas, que de acuerdo al protocolo de la OCDE una variación mayor a este porcentaje, hace a la prueba menos confiable.

Utilizando el método a microescala optimizado para la determinación de solubilidad se determinó la solubilidad para los 8 fármacos hidrofílicos seleccionados, sin embargo, esto solo fue posible con los líquidos iónicos cuya señal cromatográfica no interfería en la cuantificación del analito.

Para establecer la solubilidad de la cafeína, metformina y ranitidina en agua, fue necesario modificar el método establecido ya que para estos fármacos la solubilidad fue superior a la relación masa/volumen base de 80 mg/mL utilizada inicialmente en nuestros experimentos. A pesar de las modificaciones, en el caso de la cafeína y la ranitidina solo fue posible estimar un valor superior a una relación masa/volumen, por dificultades presentadas durante la determinación práctica de esta constante.

Observando cada caso particularmente, tenemos que para el atenolol fue posible determinar su solubilidad en 11 de los 14 líquidos iónicos involucrados en el estudio, de los cuales tres no cumplen con una variación menor al 15% sugerida por la OCDE (el N1114-ntf , HMIM-ntf, MPPIP-ntf). Siendo la solubilidad en agua nuestro control de comparación, el rango de solubilidad reportado en la literatura para el atenolol en agua va de 0,43 a 26,5 mg/mL [62,63] este rango incluye datos experimental y predictivos, con lo que podemos observar que la solubilidad determinada experimentalmente a microescala, se encuentra dentro de este margen de valores. Además teniendo en cuenta lo anterior, al menos fue posible encontrar un líquido iónico en el que la solubilidad del atenolol fue superior a la solubilidad en agua por nosotros, así como también mayor al valor más alto reportado en la literatura [62], este resultado es el correspondiente a la solubilidad del atenolol en el DMIM-BF₄ de 52,8 mg/mL .

La solubilidad reportada en agua para el ácido acetilsalicílico se encuentra en un rango de 1,46 a 4,6 mg/mL [62,63] muy semejante determinado en nuestro estudio. En este caso los 13 líquidos iónicos en los cuales pudo ser determinada la solubilidad (excepto N1888-ntf) tienen mayor capacidad solvente que el agua en un rango de 9,35 mg/mL en el OMIM-PF₆ a 38,53 mg/mL en el HMIM-otf .

En el caso de la cafeína, los datos reportados por el Drug Bank [63] para su solubilidad en agua varían entre 11 y 22 mg/mL, muy por debajo del valor determinado por nosotros, cabe mencionar, que desconocemos bajo que método fue determinado el valor práctico de la solubilidad en agua y a que temperatura ya que en dicha base de datos no se menciona. En base a los resultados obtenidos, la cafeína no presenta mayor solubilidad en ninguno de los líquidos iónicos respecto al valor determinado en agua; sin embargo, comparado con los valores de solubilidad en agua de la cafeína reportado en la literatura solo dos de los 13 líquidos iónicos en los cuales se determinó dicha propiedad tienen menor capacidad solvente respecto al agua, destacando además que esos dos líquidos (PMPL-ntf y MPPIP-ntf) presentaron una variación mayor al 15% en su determinación.

Tanto para la cimetidina como para el paracetamol los líquidos iónicos que mejor solubilizaron a estos fármacos fueron el HMIM-otf y el DMIM-BF₄, en el caso de la cimetidina estos fueron los únicos dos líquidos iónicos con mejor solubilidad respecto a la del agua, mientras que para el paracetamol el OMIM- PF₆ también presentó una capacidad solvente ligeramente mayor que la del agua. Para ambos fármacos el valor experimental determinado para su solubilidad en agua se encuentra dentro del rango de valores reportados en la literatura 0,8-1mg/mL y 0,1-14mg/mL para la cimetidina y paracetamol respectivamente [62-63].

Para la hidroclorotiazida el valor determinado para su solubilidad en agua se encuentra por debajo de lo reportado en la literatura que va desde 0,7 hasta 2,24 mg/mL, aún con dicha diferencia, podemos decir que los líquidos iónicos presentan mayor capacidad para solubilizar a la hidroclorotiazida que el agua ya que si lo comparamos con el valor experimental obtenido para el agua todos los líquidos iónicos lo superas y si lo comparamos con el máximo valor reportado para esta propiedad en 10 de los 12 líquidos en la que fue determinada, su solubilidad es mayor a esta.

En cambio para la metformina y la ranitidina no podemos decir que los líquidos iónicos tuviera una mejor capacidad solvente ya que en ambos casos al presentarse como clorhidratos su solubilidad es muy elevada, por encima de los 100mg/mL para ambas, incluso hay reportes para la ranitidina de solubilidades semejantes a los 660mg/mL. En estos casos no fue posible encontrar ningún líquido iónico que solubilizara a estos fármacos en mayor cantidad que el agua, siendo los de mayor capacidad solvente el HMIM-otf y el SEt3-ntf los de mayor capacidad para la metformina y ranitidina respectivamente.

Resumiendo lo anterior, de acuerdo a los resultados obtenidos, tanto para la cafeína, metformina y ranitidina no fue posible encontrar un líquido iónico en el cuál su solubilidad fuera mayor que su solubilidad en agua, sin embargo, para la cafeína, en muchos de los líquidos iónicos se presenta un mayor valor de solubilidad que el valor máximo de solubilidad en agua reportado en la literatura.

El líquido iónico en el que los fármacos presentaron mejor solubilidad fue en general el HMIM-otf, seguido del DMIM-BF₄, los cuales son los líquidos iónicos que mayor número de ocasiones fueron uno de los 2 mejores disolventes para los fármacos.

En general los líquidos iónicos cuyo catión es la bis (trifluorometil sulfonil) imida fueron los que mayor variación dentro de las pruebas presentaron, siendo el MPPIP-ntf el que mayor número de ocasiones tuvo una variación superior al 15% sugerida por la OECD. Por otra parte el N1888-ntf fue el líquido iónico en el que se pudo determinar la solubilidad de un menor número de fármacos, debido a que su señal cromatográfica interfería con la de nuestros analitos.

6.5. Determinación del coeficiente de partición (Log P) para fármacos hidrofílicos en sistemas líquidos iónicos/agua.

Al igual que en el caso de la determinación de solubilidad, el protocolo del matraz en agitación de la OECD no establece volúmenes específicos para su realización, por lo que denominamos adaptación a microescala por los volúmenes en el orden de microlitros empleados.

Si bien algunos autores han propuesto técnicas a "microescala" los volúmenes empleados aunque sean bajos sigue siendo en el orden de mililitros [64,65].

En este caso inicialmente se pensó en un volumen para la saturación de fase 400 μL , para utilizar 100 μL en cada uno de los replicados, sin embargo la separación de las fases de 100 μL en cada uno de los replicados era muy complicado e impreciso, por lo que se decidió aumentar el volumen a 150 μL de cada fase para los sistemas bifásicos y saturar 600 μL de cada fase una de las fases.

Se determinó el valor del Log P de 7 analitos en los sistemas líquido iónico/agua, además, de la determinación del valor del Log P en el clásico sistema octanol/agua, para cada uno de ellos

Al igual que en la solubilidad la determinación experimental del coeficiente de partición en el sistema octanol/agua, nos sirvió de referencia con lo reportado en la literatura.

En el caso de los resultados obtenidos a excepción de la cafeína el resto de los analitos muestran diferencias entre los valores obtenidos experimentalmente a los reportados en la literatura [62,63,67], cabe mencionar que en muchos de los casos el rango de los valores de Log P es muy amplio, además que la mayoría de ellos son valores obtenidos a partir de predicciones y los que reportan como determinados experimentalmente no especifica la metodología seguida.

Respecto a los valores obtenidos experimentalmente para los sistemas líquidos iónicos en todos los casos la mayoría de los sistemas líquido iónico/agua tuvieron un valor mayor que el del sistema octanol/agua, es decir que el analito tiene mayor afinidad por el líquido iónico que por el agua. El ácido acetilsalicílico fue el analito para el cual menor número de sistemas líquido iónico/agua tuvieron un valor superior al determinado en el sistema octanol/agua, en cambio para la cafeína, hidroclorotiazida, metformina y ranitidina todos los sistemas bifásico líquido iónicos/agua presentaron un mejor valor de Log P que el del octanol/agua.

Por otra parte no en todos los casos los líquidos iónicos en los que se presentó mejor solubilidad fueron los que obtuvieron un coeficiente de partición mejor que el resto. Siendo el HMIM-otf el líquido iónico cuyo sistema bifásico presentó más afinidad para un número mayor de analitos.

Es importante mencionar que este líquido iónico tiende a captar agua, por lo que fue necesario tomar en cuenta esta condición para la corrección de volumen, antes de poner en contacto las fases saturadas para la partición del analito entre estas. Razón por la cual, a pesar de tener mejores coeficientes de partición que otros líquidos iónico, decidimos no incluirlo como posible solvente de extracción en la MILs-DLLME.

6.7. Aplicación de los líquidos iónicos inmiscibles en agua como solventes de extracción en técnicas de microextracción en fase líquida.

6.7.1. Microextracción líquido-líquido.

Como se mencionó anteriormente los líquidos iónicos que mayores valores de log P, fueron los seleccionados para ser evaluados en las microextracciones en fase líquida, sin embargo para el caso de los fármacos cuyo análisis se realiza por fase inversa, se utilizaron los líquidos iónicos evaluados como solventes de extracción fueron el HMIM-otf y el DMIM-BF₄, los cuales fueron seleccionados por su capacidad de miscibilizarse en mezclas de alto contenido acuoso y no necesariamente por ser los que mejores valores de Log P presentaron para dichos analitos, esto debido a lo comentado anteriormente sobre el efecto del solvente de la muestra, ya que a diferencia de las pruebas de solubilidad y Log P donde las concentraciones en el líquido iónico eran bastante altas y donde la menor dilución del líquido iónico fue de 1:40. En el caso de las técnicas de microextracción, se busca diluir lo menos posible a los analitos

recuperados para una obtener una buena respuesta motivo por el cual la dilución hecha previa al análisis debería ser la menor dilución posible, por lo cual fue necesario contar con un líquido iónico que pudiera miscibilizarse con mayor facilidad.

En el caso del ácido acetilsalicílico se probaron 3 líquidos iónicos de extracción debido a que el PMPI-ntf mostraba una señal tan intensa que no permitía cuantificar la recuperación, al igual que sucedió con el paracetamol y la cafeína con el HMIM-otf. En el caso de todos los analitos el pH en el que se encontraban en su forma ionizada favoreció la extracción, en el caso de la cafeína y la cimetidina donde el pH no fue controlado, tenemos que la cafeína bajo estas condiciones se encuentra ionizada ya que su pka es de 10.4 [63] y la cimetidina tiene presenta a ambas especies ya que su pka es de 6,8 [63] similar al pH del agua; sin embargo en estos casos no se encontró diferencia significativa entre la recuperación al utilizar pH 8 y pH 4 respectivamente donde sabemos que los analitos se encuentran totalmente ionizados, además que la variación fue menor al realizar la extracción en agua, motivos por los que se seleccionó como óptimo el trabajar sin control de pH, además que esto también ayuda a la preparación de menos reactivos para el análisis.

La recuperaciones obtenidas para los 7 analitos fue mayor al 38,4% en todos los casos, con coeficientes de variación menores al 7,5%, si bien existen reportes donde los porcentajes de recuperación para algunos de estos analitos son semejantes por técnicas como SPE [38,39], los volúmenes de muestra requeridos , tiempo de extracción y/o solventes utilizados para la elución de los analitos de la fase sólida, convierten a nuestro método en una mejor opción, la cuál sería mucho mayor aún si compararamos con métodos de extracción líquido-líquido convencionales donde los volúmenes de solventes orgánicos volatiles utilizados eran mucho mayores.

6.7.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva con mezcla de líquidos iónicos (MILs-DLLME).

Como se mencionó anteriormente la elección de los líquidos iónicos de extracción, se basó en el valor del Log P que cada uno de los fármacos presentó con los líquidos iónicos, por lo que aquellos que presentaron mejores valores de log P para la mayoría de los fármacos fueron elegidos inicialmente, excepto el HMIM-otf, debido a la afinidad que presenta por el agua y que fue observada anteriormente, esto con la finalidad de tener la menor cantidad de pérdida posible de líquido iónico de extracción durante el proceso.

Para los posibles solventes de dispersión los líquidos iónicos miscibles en agua fueron elegidos inicialmente, excluyendo al BMIM-BF₄ y al EMIM-AlCl₄ por la formación de sólido descrito en el apartado 6.2.2.

Debido a la necesidad de que el solvente dispersante debe ser miscible con la matriz de la muestra y el solvente de extracción, se determinó la miscibilidad entre los líquidos iónicos miscibles e inmiscibles en agua seleccionados como posibles solventes de dispersión y extracción respectivamente.

Cuatro de los líquidos iónicos miscibles en agua, resultaron miscibles con la totalidad de los líquidos iónicos inmiscibles en agua, 3 cuyo catión es el 1-etil-3-metil imidazolio y el BMIM-otf; siendo los 3 cuyo catión es el mismo los seleccionados para las prueba de formación de la nube de dispersión con la finalidad de observar que diferencias mostraban al solo variar estructuralmente en la parte del anión.

Además con la prueba de miscibilidad entre líquidos iónicos se puso de manifiesto que al estar en contacto entre ellos existe intercambio entre los iones, ya que en el caso del

bromuro de 1-decil-3-metil imidazolio al ponerse en contacto con 2 de los líquidos iónicos forma un sólido

En cuanto a los líquidos iónicos de extracción se descartó al OMIM PF₆ por su dificultad para ser manipulado ya que es

Teniendo los resultados de la miscibilidad entre líquido iónicos, se determinó cuales mezclas eran capaces, de generar la nube de dispersión en la matriz de la muestra.

De tal forma que el dietil fosfato de 1-etil-3-metil imidazolio no fue capaz de generar la nube de dispersión al estar en contacto con los líquidos iónicos de extracción, por lo que fueron los otros dos solventes los seleccionados como solventes dispersantes, según el líquido iónico que fungiera como solvente de extracción.

Parte importante de la DLLME se basa en la adecuada elección de los solventes involucrados, por este motivo, basados en su capacidad de miscibilizarse entre ellos, así como, para formar la nube de dispersión y su afinidad frente a cada uno de los analitos de acuerdo al valor de log P, los líquidos iónicos fueron seleccionados para ser evaluados como solventes de extracción y solvente dispersante

Cada una de las condiciones seleccionadas como óptimas fue basada en obtener la mayor recuperación y precisión dentro del proceso de extracción, los efectos en el pH fueron los mismo mostrados en la microextracción líquido-líquido, donde para todos los analitos, el pH para tener la forma no ionizada fue la que mejores recuperaciones nos brindó, para la mayoría de los casos el volumen del LI de extracción fue de 50µL y el del LI de dispersión fue de 100µL, predominando de la misma forma el tiempo de extracción de 3 minutos en la mayoría de los casos. En el caso de los líquidos iónicos de extracción y dispersión no se observó una tendencia para ninguno de ellos.

La MILs-DLLME fue evaluada calculando la concentración del analito en la fase recuperada y la precisión de las mismas, así como el factor de enriquecimiento (EF) de la extracción.

Como se observa en los resultados la concentración en la fase recuperada es bastante alta en términos de concentración, importante a destacar son los factores de enriquecimiento lo cual resulta importante tomando en cuenta el volumen total de la muestra de la que proviene el analito (5mL), mientras que el líquido iónico recuperado está en un promedio de 20 μ L, disminución de volumen significativamente importante.

Si comparamos con reportes de otros tipos de DLLME, realizadas para algunos de estos compuestos, como es el caso del paracetamol y la cafeína, tenemos que para el primero el factor de preconcentración logrado con nuestro método es mejor que los reportados por Yao C. y col en el 2011 [51], cuyo rango de factores de enriquecimiento se encuentra entre 0,1 y 2,0, mientras que para nosotros es de 5,8; en el caso de la cafeína nuestro factor de enriquecimiento también es mayor que los reportados por ellos, excepto cuando utilizan el tris (pentafluoroetil) trifluorofosfato de 1-(6-amino-hexil)- 1-metil pirrolidinio cuyo factor de enriquecimiento es bastante elevado alrededor de 100.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

Se desarrollaron métodos por HPLC, lineales, precisos y exactos, para la determinación de fármacos hidrofílicos ($\log P < 1,3$) en presencia de líquidos iónicos inmiscibles en agua. Siendo la cromatografía en modo HILIC la que proporciona mayores ventajas gracias a la composición que presentan las fases móviles utilizadas.

Se implementaron procesos a microescala para la determinación de solubilidad y coeficiente de partición, siendo estos reproducibles y los resultados obtenidos mediante ellos, comparables con los reportados en la literatura

Se caracterizaron las propiedades solventes de algunos líquidos iónicos inmiscibles en agua para fármacos hidrofílicos como analitos modelo, mediante la determinación de la solubilidad y el coeficiente de partición.

Se desarrollaron métodos de microextracción líquido-líquido y MILs-DLLME para la extracción de los fármacos hidrofílicos modelo. Aunque ambas técnicas resultaron simples, reproducibles y sensibles, la MILs-DLLME es más ventajosa gracias a su capacidad de preconcentrar a estos analitos.

Se demostró que los líquidos iónicos presentan un buen desempeño como solventes de extracción para fármacos hidrofílicos en métodos de microextracción en fase líquida, por lo que pueden ser considerados como una buena alternativa a los solventes convencionales.

CAPÍTULO 8

BIBLIOGRAFÍA

1. Wardencki W., Curylo J. y Namiesnik J., Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Vol. 70, No. 2, 275-288 (2007)
2. Díaz-Morales NE, Garza-Ulloa HJ, Castro-Ríos R, Ramirez-Villarreal EG, Barbarín-Castillo JM, Salazar-Cavazos M, Waksman-de Torres N. A comparison of the performance of two chromatographic and three extraction techniques for the analysis of PAHS in sources of drinking water. Journal of Chromatographic Science, Vol.45, No. 2, 57-62 (2007).
3. Guillot S., Kelly M.T., Fenet H., Larroque M., Evaluation of solid-phase microextraction as an alternative to the official method for the analysis of organic micro-pollutants in drinking water. Journal of Chromatographic A, Vol. 1101, 46-52 (2006).

4. Tankiewicz M., Fenik J. y Biziuk M. Solventless and solvent-minimized sample preparation techniques for determining currently used pesticides in water samples: A review. Talanta, Vol. 86, 8 – 22 (2011).
5. Sousa J, Alves G. y Fortuna A. Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. Analytical Bioanalytical Chemistry, Vol. 403, 93-129 (2012).
6. He Y, Shen X. Interaction between β -cyclodextrin and ionic liquids in aqueous solutions investigated by a competitive method using a substituted 3H-indole probe. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. Vol 197. 253–259 (2008) .
7. Holomb R, Martinelli A, Albinsson I, Lassègues JC, Johansson P, et al. Ionic liquid structure: the conformational isomerism in 1-butyl-3-methyl-imidazolium tetrafluoroborate ([bmim][BF₄]. Journal of Raman Spectroscopy, Vol. 39, No.8, 793–805 (2008).
8. Bittner B., Wrobel R J., Milchert E. Physical properties of pyridinium ionic liquids. J. Chem. Thermodynamics. Vol 55. 159–165 (2012).

9. Wilkes J.S., Properties of ionic liquid solvents for catalysis. J. Mol. Catal. Vol 214. 11-17 (2004).
10. Baker G.A., Baker S.N., Pandey S., Bright F.V., An analytical view of ionic liquids, The Analyst, Vol. 130, 800-808 (2005).
11. Xiaohua X., Liang Z., Xia L., Shengxiang J., Ionic liquids as additives in high performance liquid chromatography: Analysis of amines and the interaction mechanism of ionic liquids, Analytica Chimica Acta, Vol. 519, 207-211 (2004).
12. Pandey S. Analytical applications of room-temperature ionic liquids: A review of recent efforts, Analytica Chimica Acta, Vol. 556, No.1, 38-45 (2006).
13. Stepnowski, P., Application of Chromatographic and Electrophoretic Methods for the Analysis of Imidazolium and Pyridinium Cations as Used in Ionic Liquids, International Journal of Molecular Sciences, Vol. 7, 497-509 (2006).
14. Binnemans, K., Ionic Liquids Crystals, Chemical Reviews, Vol. 105, 4148-4204 (2005).
15. Absalan G, Akhond M, Sheikhan L., Extraction and high performance liquid chromatographic determination of 3-indole butyric acid in pea plants by using imidazolium-based ionic liquids as extractant, Talanta, Vol. 77, 407-411 (2008).

16. Davis, J.H., Fox, P.A., From curiosities to commodities: ionic liquids begin the transition, Chemical Communications, 1209-1212 (2003).

17. Huddleston J.G., Visser A.E., Reichert W.M., Willauer H.D., Broker G.A., Rogers R.D., Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation, Green Chemistry, Vol. 3, 156-164 (2001).

18. Earle, M, Seddon, KR, Ionic liquids. Green solvents for the future, Pure and Applied Chemistry, Vol. 72, 1391–1398 (2000).

19. Aguilera-Herrador E, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M., Ionic liquid-based single-drop microextraction/gas chromatographic/mass spectrometric determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene isomers in waters. Journal of Chromatography A, Vol. 1201, No.1, 106-111 (2008).

20. Cruz-Vera M, Lucena R, Cárdenas S, Valcárcel M., Ionic liquid-based dynamic liquid-phase microextraction: application to the determination of anti-inflammatory drugs in urine samples, Journal of Chromatography A, Vol. 1202, No. 1, 1-7 (2008).

21. Vidal L, Chisvert A, Canals A, Salvador A, Sensitive determination of free benzophenone-3 in human urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis, Journal of Chromatography A, Vol. 1174, 95-103 (2007).
22. Aguilera-Herrador E, Lucena R, Cardenas S, Valcárcel M., Direct coupling of ionic liquid based single-drop microextraction and GC/MS. Analytical Chemistry, Vol. 80, No. 3, 793-800 (2008).
23. Basheer C, Alnedhary AA, Madhava Rao BS, Balasubramanian R, Lee HK., Ionic liquid supported three-phase liquid-liquid-liquid microextraction as a sample preparation technique for aliphatic and aromatic hydrocarbons prior to gas chromatography-mass spectrometry., Journal of Chromatography A, Vol. 1210, No. 1, 19-24 (2008).
24. Yazdi AS, Razavi N, Yazdinejad SR., Separation and determination of amitriptyline and nortriptyline by dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography flame ionization detection., Talanta, Vol. 75, No. 5, 1293-1299 (2008).
25. Cheng DH, Chen XW, Shu Y, Wang JH., Selective extraction/isolation of hemoglobin with ionic liquid 1-butyl-3-trimethylsilylimidazolium hexafluorophosphate (BtmsimPF₆), Talanta, Vol. 75, No. 5, 1270-1278 (2008).

26. Berijani S., Assadi Y., Anbia M., Milani Hosseini M.R., Aghaee E., Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water., Journal of Chromatography A, Vol. 123, No.1, 1-9 (2006).
27. Fattahi N., Assadi Y., Hosseini M.R., Jahromi E.Z., Determination of chlorophenols in water samples using simultaneous dispersive liquid-liquid microextraction and derivatization followed by gas chromatography-electron-capture detection., Journal of Chromatography A, Vol. 1157, 23-29 (2007).
28. ASTM International . Standard test method for water miscibility of water-soluble solvents D1722. Aprobado el 1o de junio de 2009.
29. Michael Thompson, Stephen L. R. Ellison y Roger Wood. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). Pure and Applied Chemistry 74,(835–855) 2002.
30. International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH Harmonised tripartite guideline 2005.
31. OECD. Test No. 105: Water Solubility, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing (1995).

32. OECD. Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1, OECD Publishing (1995).
33. Fernández A., Torrecilla J.S., García J. y Rodríguez F. Thermophysical Properties of 1-Ethyl-3-methylimidazolium Ethylsulfate and 1-Butyl-3-methylimidazolium Methylsulfate Ionic Liquids. Journal of Chemical and Engineering Data, Vol. 52, No. 5, 1979-1983 (2007).
34. Dong L., Huang Junxiong. Determination of atenolol in human plasma by pseudo reversed phase liquid chromatography- tandem mass spectrometry. Chromatographia, Vol. 64, 583-586 (2006).
35. Suenami K., Lim L.W., Takeuchi T., Sasajima Y., Sato K., Takekoshi Y, Kanno S. Rapid and simultaneous determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in human plasma by LC-MS with solid-phase extraction. Analytical Bioanalytical Chemistry, Vol. 384, 1501-1505 (2006).
36. Boleda M:R., Huerta-Fontela M., Ventura F., Galcerán M.T. Evaluation of the presence of drugs of abuse in tap waters. Chemosphere, Vol. 84, No. 11, 1601-1607 (2011).
37. Iglesias Y., Fente C.A., Vázquez B., Franco C., Cepeda A. Determination of dexamethasone in bovine liver by chemiluminescence high-performance liquid chromatography. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Vol 47, 4275-4279 (1999).

38. Kasprzyk-Hordern B., Dinsdale R.M., Guwy A.J. Multiresidue methods for the analysis of pharmaceuticals, personal care products and illicit drugs in surface water and wastewater by solid phase extraction and ultra performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical Bioanalytical Chemistry*, Vol. 391, 1293-1308 (2008).
39. Togola A., Budzinski H. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, Vol 1177, 150-158 (2008).
40. Verenitch S.S., Lowe C.J., Mazumder A., Determination of acidic drugs and caffeine in municipal wastewaters and receiving waters by gas chromatography-ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1116, 193-203 (2006).
41. Ramos Payán M, Bello López MA, Fernández-Torres R, Pérez Bernal JL, Callejón Mochón M., HPLC determination of ibuprofen, diclofenac and salicylic acid using hollow fiber-based liquid phase microextraction (HF-LPME). *Analytical Chimica Acta.*, Vol. 653, No. 2, 184-190 (2009).
42. Gracia-Lor E., Sancho J.V., Hernández F., Simultaneous determination of acidic, neutral and basic pharmaceuticals in urban wastewater by ultra high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A.*, Vol 1217, No. 5, 622-632 (2010).

43. Lurie I.S., Li L., Toske S.G., Hydrophilic interaction chromatography of seized drugs and related compounds with sub 2 μ m particle columns, , Journal of Chromatography A., Vol. 1218, No. 52, 9336-9344 (2011).
44. Li Y., Xie X.,Lee M.L. ,Chen J., Preparation and evaluation of hydrophilic C18 monolithic sorbents for enhanced polar compound retention in liquid chromatography and solid phase extraction, Journal of Chromatography A., Vol 1218, No. 48, 8608-8616 (2011).
45. Agilent Technologies. Guía de selección de columnas Agilent ZORBAX para HPLC,<http://www.chem.agilent.com/library/selectionguide/public/59895992eslowres.pdf>, fecha de última consulta: Enero 2013.
46. Nichthauser J., Stepnowski P., Retention mechanism of selected ionic liquids on a pentafluorophenylpropyl polar phase: investigation using RP-HPLC, Journal of Chromatography Science., Vol. 47, No. 3, 247-253 (2009).
47. Stepnowski P., Nichthauser J., Mroziak W., Buszewski B., Usefulness of pi...pi aromatic interactions in the selective separation and analysis of imidazolium and pyridinium ionic liquid cations, Analytical Bioanalytical Chemistry., Vol. 385, No. 8, 1483,1491 (2006).

48. Wang X., Xu Q., Cheng C., Zhao R., Rapid Determination of DDT and Its Metabolites in Environmental Water Samples with Mixed Ionic Liquids Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Prior to HPLC-UV, Chromatographia, Vol. 75, 1081-1085 (2012).
49. Mizuuchi H., Jaitely V., Murdan S., Florence A.T., Room temperature ionic liquids and their mixtures: potential pharmaceutical solvents. European Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 33, 326-331 (2008).
50. Bai H., Zhou Q., Xie G., Xiao J., Enrichment and sensitive determination of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites with temperature controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction prior to high performance liquid phase chromatography, Analytical Chimica Acta. Vol 651, No 1, 64-68 (2009).
51. Yao C., Li T., Twu P., Pitner W.R., Anderson J.L., Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid-liquid microextraction using functionalized ionic liquids, Journal of Chromatography A, Vol. 1218, No. 12, 1556-1566 (2011).
52. He L., Luo X., Xie H., Wang C., Jiang X., Lu K., Ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water sample, Analytical Chimica Acta, Vol 655, 52-59 (2009).

53. Lamouroux C., Foglia G., Le Rouzo G., How to separate ionic liquids: use of hydrophilic interaction liquid chromatography and mixed mode phases, Journal of Chromatography A., Vol 1218, No. 20, 3022-3028 (2011).
54. Berton P., Monasterio R.P., Wuilloud R.G., Selective extraction and determination of vitamin B12 in urine by ionic liquid-based aqueous two-phase system prior to high-performance liquid chromatography, Talanta., Vol. 97, 521-526, (2012).
55. Cruz-Vera M., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M., Combined use of carbon nanotubes and ionic liquid to improve the determination of antidepressants in urine samples by liquid chromatography, Analytical Bioanalytical Chemistry., Vol 391, No. 4, 1139-1135 (2008).
56. Herrera-Herrera A.V., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado M.A., Ionic liquids as mobile phase additives for the high-performance liquid chromatographic analysis of fluoroquinolone antibiotics in water samples, Analytical Bioanalytical Chemistry., Vol 392, 1439-1446 (2008).
57. Van Meter D.S., Oliver N.J., Carle A.B., Dehm S., Ridgway T.H., Stalcup A.M., Characterization of surface-confined ionic liquid stationary phases: impact of cation and anion identity on retention, Analytical Bioanalytical Chemistry., Vol. 393, No. 1, 283-294 (2009).

58. Sun P., Armstrong D.W., Ionic liquids in analytical chemistry, Analytical Chimica Acta., Vol 66, No. 1, 1-16 (2010).
59. Wang Y., Zhu T., Row K.H.J., Preparation and evaluation of silica-based ionic liquid-modified stationary phase for HPLC..Chromatographie Science., Vol 48, No. 8, 690-693 (2010).
60. Kalafut P., Kučera R., Klimeš J., The influence of a carbon layer deposited on a zirconia surface on the retention of polar analytes in an organic rich mobile phase, Journal of Chromatography A., Vol. 6, 1232-1242, (2012).
61. Ikegami K., Tomomatsu K., Takubo H., Horie K., Tanaka N., Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography. Journal of Chromatography A, 1184 (2008) 474–503.
62. Kasim N.A., Whitehouse M., Ramachandran C., Bermejo M., Lennerna H., Hussain A.S., Junginger E., Stavchansky S.A., Midha K. K., Shah V.P., Amidon G.L. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification, Molecular Pharmaceutics, Vol. 1, No. 1, 85-96 (2004).

63. DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs. Knox C, Law V, Jewison T, Liu P, Ly S, Frolkis A, Pon A, Banco K, Mak C, Neveu V, Djoumbou Y, Eisner R, Guo AC, Wishart DS. <http://www.drugbank.ca/drugs>.
Última revisión: julio 2012.
64. Berthod A., Carda-Broch S.. Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods. Journal of Chromatography A, Vol.1037, 3–14 (2004).
65. Sonnenberger D.C., Ferroni E.L., Visible Spectrophotometric determination of the partition coefficient of methyl violet. Journal of Chemical Education, Vol. 66, No.1 (1989).