



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA DE ANÁLISIS DE NAPROXENO
EN ORINA MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE MSPE Y HPLC-FLD**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN QUÍMICA

P R E S E N T A

Q. KAREN ANGELICA ESCAMILLA LARA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA

MINERAL DE LA REFORMA, HGO., 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Instituto of Experimental and Basic Sciences

Mineral de la Reforma, Hgo., a 01 de julio de 2021

Número de control: ICBI-D/566/2021
Asunto: Autorización de impresión de tesis.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH

Por este conducto le comunico que el comité revisor asignado a la Qi. Karen Angélica Escamilla Lara, alumna de la Maestría en Química con número de cuenta 184026, autoriza la impresión del proyecto de tesis titulado "Diseño de una metodología de análisis de naxproxeno en orina mediante la combinación de MSPE y HPLC-FLD", en virtud de que se han efectuado las revisiones y correcciones pertinentes.

A continuación, se registran las firmas de conformidad de los integrantes del comité revisor,

PRESIDENTE	Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
SECRETARIO	Dra. María Elena Páez Hernández
VOCAL	Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
SUPLENTE	Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Sin otro particular reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Ottilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI



01ASU/MI



Centro del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42104
Teléfono: 771 71 720 60 ext. 2231 Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx



El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 1 y el laboratorio de cromatografía del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

- XXXIII Congreso Nacional de Química Analítica (2021), con el trabajo: “Extracción y análisis de naproxeno en muestras de orina empleando partículas magnéticas modificadas con poli-4vinilpiridina”. Saltillo, Coahuila.

Parte de este trabajo ha sido publicado en:

- Escamilla-Lara, K. A., Heredia, A. C., Peña-Alvarez, A., Ibarra, I. S., Barrado, E., y Rodríguez, J. A. (2020). Magnetic solid-phase extraction based on poly 4-vinyl pyridine for HPLC-FLD analysis of naproxen in urine samples. *Molecules*, 25(12), 2924.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada No. **745017** para realizar estudios de maestría.

AGRADECIMIENTOS

La culminación del presente trabajo me lleva a estar agradecida con la vida, con Dios por permitirme llegar a este punto de mi trayecto profesional y personal, por cuidar de mí y de las personas que me acompañan en este camino.

Gracias a mi madre Eloísa y mi hermana Wendy que siempre han creído en mis capacidades y me han apoyado cuando mis ánimos han flaqueado. Wen, gracias por externar tus dudas, contestar las mías y así aprender de este viaje que nos tocó emprender juntas, la vida.

A Gerardo, el ingeniero que ha coincidido conmigo en el momento que comenzó este proyecto, por su apoyo incondicional a nivel personal y profesional en esta etapa que no ha sido sencilla pero su presencia en mi vida me ha dado amor, alegría, fortaleza y motivación de creer siempre en mí y superar cualquier imprevisto que se atravesase durante el trayecto. Gracias por cada desayuno, tarea rescatada y momento increíble que hemos acumulado.

De manera muy especial agradezco a mi asesor, amigo y compañero en este proyecto, Dr. José Antonio, gracias por su paciencia y confianza depositada en mí aun cuando me costaba demasiado retomar las riendas de este bonito camino llamado investigación, atesoró su tiempo, conocimientos transmitidos, y consejos que me permitieron avanzar a través de cada una de las etapas de este trabajo hasta obtener lo que nosotros llamamos, un buen trabajo pandémico. Mi admiración y respeto para quien ha sido mi mentor en esta hermosa profesión, mi cariño para ese amigo que ha estado presente en diferentes etapas de mi vida siempre con una palabra de aliento.

A mis sinodales: Dra. Elena Páez, quien siempre me ha motivado a pensar de manera más crítica, quién ha brindado una mano amiga y palabras de aliento cuando fueron necesarias, por su disponibilidad y comprensión. Dr. Galán, sin duda su paciencia fue un pilar importante para mi desarrollo académico, gracias por todo su tiempo y dedicación para el presente trabajo. Dr. Israel Ibarra, gracias amigo por todas esas pláticas donde surgían dudas existenciales y profesionales y que con paciencia ayudabas a esclarecer o hacerlas más grandes según fuera el caso. Gracias por cada palabra de aliento y motivación, me permitieron respirar profundo y continuar hasta el final.

Agradezco a los amigos que he encontrado en mi camino recorrido por los laboratorios 1 y 2. Desde que inicie en esta carrera han estado ahí para brindarme una cara sonriente y un buen consejo, quiero que sepan que los quiero mucho y agradezco su compañía y asesoría, Dr. Giaan y Dra. Irma.

Ha sido un gusto compartir esta etapa con mi amigo David, enfrentamos momentos difíciles, divertidos, de tensión y esa parte de regresar a estudiar la comprendíamos mutuamente. Gracias por contribuir a la ciencia amigo, específicamente a este proyecto con tu tiempo y disposición para minimizar el caos siempre con una palabra de aliento o un chiste, pero se disminuía el pánico.

A Jorge por su paciencia y tiempo para introducirme al mundo de la cromatografía y por cada una de sus palabras y preguntas para reafirmar los conocimientos. Gracias Alexandra por tu apoyo y conocimientos compartidos.

A Zita y Lili por todo su apoyo y cariño, por ser personas solidarias y amables que gracias a su hospitalidad hicieron que esta experiencia fuera más bonita. En mí siempre encontrarán a una amiga, sé que nos faltó tiempo para consolidar la amistad.

No puedo dejar de agradecer a quienes iniciaron este camino conmigo, quienes me impulsaron a tomar la decisión, Ing. Alberto Ramírez y mi tucita, Ing. Ingrid Cerón, su apoyo fue crucial para iniciar este proyecto desde la disponibilidad para los horarios hasta el festejo planeado ya que esta por culminar, gracias por su tiempo, paciencia y sobre todo amistad y cariño. Gracias por todas sus contribuciones a este proyecto y su compañía a lo largo de estos años.

A Jennifer, esa amiga que ha prevalecido a después de 10 años y seguimos juntas en este camino, gracias por tu amor, apoyo y regaños que al final sabes que siempre serán mutuos, y ahora, ¿Qué sigue mi querida Watson?

A todas aquellas personas que colaboraron de una u otra forma en el presente trabajo hago llegar mis más sinceros agradecimientos.

Con todo mi amor a mi padre, Luis

Es difícil aceptar lo pronto que te fuiste, pero sé que allí donde estés estás bien, lejos del sufrimiento y la pena. Te extraño mucho papá y desde aquí te envío un fuerte abrazo.

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas.....	i
Lista de Figuras.....	iii
Lista de Tablas.....	iv
Resumen.....	v
I. ANTECEDENTES.....	2
I.1. Generalidades de antiinflamatorios no esteroideos	2
I.2. Clasificación de AINEs.....	3
I.2.1. De acuerdo con su estructura química	3
I.2.2. De acuerdo con su capacidad de inhibición	5
I.3. Naproxeno (Npx).....	7
I.4. Análisis de antiinflamatorios no esteroideos en muestras biológicas....	9
I.4.1. Tratamiento de muestra.....	10
I.4.2. Métodos de análisis de Npx.....	14
I.4.2.1. Espectroscopía UV-Vis.....	14
I.4.2.2. Electroquímica	15
I.4.2.3. Electroforesis capilar	16
I.4.2.4. Cromatografía.....	16
II. OBJETIVOS.....	19
II.1. Objetivo general	19
II.2. Objetivos específicos	19
III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	21
III.1. Reactivos, soluciones y equipos	21
III.2. Síntesis de sólidos magnéticos	22
III.3. Caracterización de sólidos magnéticos.....	23
III.3.1. Cálculo del número de sitios activos.....	23
III.3.2. Pruebas de retención de Npx	24
III.4. Análisis de muestras	24

IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
IV.1.	Caracterización de sólidos magnéticos	27
IV.1.1.	Caracterización química	27
IV.1.2.	Estudios de retención	30
IV.2.	Optimización de la metodología para el sistema de MSPE	33
IV.3.	Parámetros analíticos	37
IV.4.	Análisis de muestras	40
V.	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	44
VI.	BIBLIOGRAFÍA.....	47



LISTA DE ABREVIATURAS

AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
CE	Electroforesis capilar (por sus siglas en inglés)
Cm	Centímetro
COX	Ciclooxigenasa
DRx	Difracción de rayos X
DSPE	Extracción en fase sólida dispersiva (por sus siglas en inglés)
E.I.	Estándar interno
FDA	Administración de alimentos y medicamentos (por sus siglas en inglés)
FLD	Detección por Fluorescencia
FTIR	Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (por sus siglas en inglés)
GC	Cromatografía de gases (por sus siglas en inglés)
HLB	Balance hidrofílico-lipofílico (por sus siglas en inglés)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución (por sus siglas en inglés)
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (por sus siglas en inglés)
Kg	Kilogramo
KV	Kilovolt
L	Litro
LLE	Extracción líquido-líquido (por sus siglas en inglés)
LOD	Límite de detección (por sus siglas en inglés)
LU	Unidades de luminiscencia
M	Molar
mg	Miligramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
mmol	Milimol
MSPE	Extracción en fase sólida magnética (por sus siglas en inglés)
MΩ	Mega Ohm
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
Npx	Naproxeno
P4VP	Poli(4-vinilpiridina)
RSD	Desviación estándar relativa (por sus siglas en inglés)
SPE	Extracción en fase sólida (por sus siglas en inglés)
SPME	Microextracción en fase sólida (por sus siglas en inglés)

UHPLC Cromatografía de líquidos de ultra alta resolución (por sus siglas en inglés)
UV-Vis Ultravioleta visible
v Volumen
v:v Relación volumen:volumen
w/v Relación peso/volumen



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química de algunos de los AINEs más utilizados.....	4
Figura 2. Estructura química de Npx.....	8
Figura 3. Representación esquemática para el aislamiento de Npx en muestras de orina mediante MSPE.....	25
Figura 4. Patrón de difracción de rayos X para el sólido magnético C.....	28
Figura 5. Espectro de FTIR para el sólido C.....	29
Figura 6. Isotherma de adsorción de Npx sobre sólidos magnéticos modificados con 4-VP (A, B y C).....	31
Figura 7. Curva de valoración del sólido magnético con HCl como valorante.	32
Figura 8. Efecto de los factores de control sobre el proceso de extracción de Npx.....	36
Figura 9. Cromatograma obtenido del análisis de muestras de orina bajo condiciones óptimas. (a) muestra blanco, (b) Npx 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$, (c) Npx 35 $\mu\text{g L}^{-1}$. Estándar interno (E.I. 50.0 $\mu\text{g L}^{-1}$).....	39



LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de AINEs con base en su estructura química.	5
Tabla 2. Clasificación de AINEs con base en la selectividad de inhibición de COX (Beca et al., 2007).....	6
Tabla 3. Relación molar de los sólidos magnéticos sintetizados.	23
Tabla 4. Parámetros calculados para la caracterización de los sólidos magnéticos	33
Tabla 5. Matriz ortogonal obtenida durante la optimización del sistema MSPE y la respuesta para cada experimento.	35
Tabla 6. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, señal A Npx/A E.I. vs [Npx]/[E.I.].....	38
Tabla 7. Concentración de Npx determinada en muestras de orina dopadas mediante la metodología propuesta.	40
Tabla 8. Concentración de Npx determinada en muestras de orina utilizando el método propuesto.....	41
Tabla 9. Comparación del presente método con otros métodos reportados para la determinación de Npx en orina humana.....	42

RESUMEN

El ácido (S)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenacético también conocido como Naproxeno (Npx), es un fármaco que pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), posee características antiinflamatorias, antipiréticas y analgésicas que le permiten ser utilizado en padecimientos como dolor muscular, dolor de cabeza y dolor postoperatorio, entre otros. La naturaleza común y frecuente de los padecimientos donde se emplea junto con la adquisición sin prescripción médica han provocado un abuso en su consumo generando un problema de salud pública y ambiental. Una de las principales fuentes de descarga de Npx al medio ambiente es a través de la orina humana, aproximadamente un 70% de la dosis ingerida es desechada mediante la orina hacia el entorno categorizándolo como un contaminante emergente, causando daños toxicológicos a especies acuáticas y modificaciones genéticas a microorganismos como la *Escherichia coli* (Isidori et al., 2005). Es importante desarrollar metodologías que permitan separar, preconcentrar y analizar este compuesto donde la complejidad de la matriz y las concentraciones del analito no sean un obstáculo.

Dentro de las metodologías propuestas para el análisis de Npx se encuentra la extracción en fase sólida magnética (MSPE), que consiste en modificar compuestos con propiedades magnéticas y producir sólidos adsorbentes que requieren únicamente la aplicación de un campo magnético externo para la separación de la fase sólida de la matriz analítica. Es una técnica rápida, elimina pasos intermedios como la centrifugación o filtración, permite promover la selectividad del proceso de extracción a través de la incorporación de diversos compuestos a la superficie de los sólidos magnéticos.

Por lo anterior, en el presente trabajo se propone el análisis de Npx en muestras de orina mediante un sólido magnético modificado con poli(4-vinilpiridina) (P4-VP), la metodología para el análisis se basa en la combinación de MSPE-HPLC-

FLD. Los resultados obtenidos permiten concluir que el método desarrollado para la determinación de Npx es robusto, simple y rápido, emplea bajos volúmenes de muestra y disolventes, además de es una técnica prometedora para el análisis de Npx en muestras complejas.



I. ANTECEDENTES

I. ANTECEDENTES

I.1. Generalidades de antiinflamatorios no esteroideos

En la década de 1830 se llevó a cabo la separación del salicilato de su fuente natural, posterior a este acontecimiento el químico alemán Felix Hoffman en 1897 descubre una de las sustancias más trascendentes, el ácido acetilsalicílico (aspirina). La síntesis de este fármaco establece las bases para el desarrollo de una amplia familia de compuestos denominados antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales han adquirido gran importancia dentro de la industria farmacéutica (Bindu et al., 2020).

El mecanismo de acción de estos fármacos consiste principalmente en la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX), encargada de la conversión del ácido araquidónico en prostaciclina, prostaglandinas E2 y tromboxanos. La COX se encuentra en dos isoformas; ciclooxigenasa-1 (COX-1) y ciclooxigenasa-2 (COX-2) (Dvorakova y Landa, 2017). La COX-1 es una enzima presente en la mayor parte de los tejidos, responsable de la producción de prostaglandinas involucradas en la citoprotección gástrica, agregación plaquetaria y autorregulación de flujo sanguíneo, también es posible encontrarla en células amnióticas y fetales. Por otra parte, la producción de la COX-2 es inducida por células inflamatorias cuando son lesionadas o infectadas (Pountos et al., 2011).

Los AINEs constituyen un grupo amplio de compuestos químicamente heterogéneos con propiedades analgésicas, antipiréticas, antiinflamatorias y preventivas frente a infartos al miocardio (Bácsi et al., 2016), son indicados en padecimientos como artritis reumatoide, osteoartritis, pericarditis, fiebre, dismenorrea, en general se venden sin prescripción médica en grandes cantidades para dolor de cabeza y musculoesquelético (Gunter et al., 2017).

Los AINEs son uno de los grupos de fármacos más utilizados a nivel mundial con un consumo superior a los 30 millones de personas diariamente, no obstante, la

venta sin prescripción médica, hábitos de automedicación y el aumento de la población provocan el incremento en su consumo año tras año (Bielsa-Fernández et al., 2020) generando un problema ambiental y de salud pública.

Estudios realizados en la última década muestran que los AINEs más vendidos en la zona de Mineral de la Reforma-Pachuca, Hidalgo son ácido acetil salicílico, diclofenaco, ibuprofeno, paracetamol y en primer lugar de ventas sin prescripción médica se encuentra el naproxeno (Npx) (Rodríguez-Anaya et al., 2015) con una estimación cercana a los 30 kilogramos totales del fármaco por año. Mientras que en países como Alemania o Finlandia predomina el consumo de ibuprofeno, en México el Npx encabeza la lista al ser mayor la cantidad consumida por persona anualmente en comparación con otros medicamentos (Siemens et al., 2008).

I.2. Clasificación de AINEs

A partir del descubrimiento de la aspirina la industria farmacéutica ha desarrollado una amplia cantidad de compuestos químicos con propiedades características de los AINEs. Este grupo de fármacos puede clasificarse de diferentes maneras, las categorías que se emplean de manera recurrente son principalmente en función a su estructura química y a la capacidad de inhibición de la enzima ciclooxigenasa en sus dos isoformas.

I.2.1. De acuerdo con su estructura química

La estructura general de un AINEs típico se compone de dos partes, una formada por el ácido carboxílico unido a la segunda integrada por un grupo aromático como se muestra en la Figura 1. Modificaciones en cualquiera de los dos grupos químicos mencionados han permitido desarrollar una amplia variedad de fármacos.

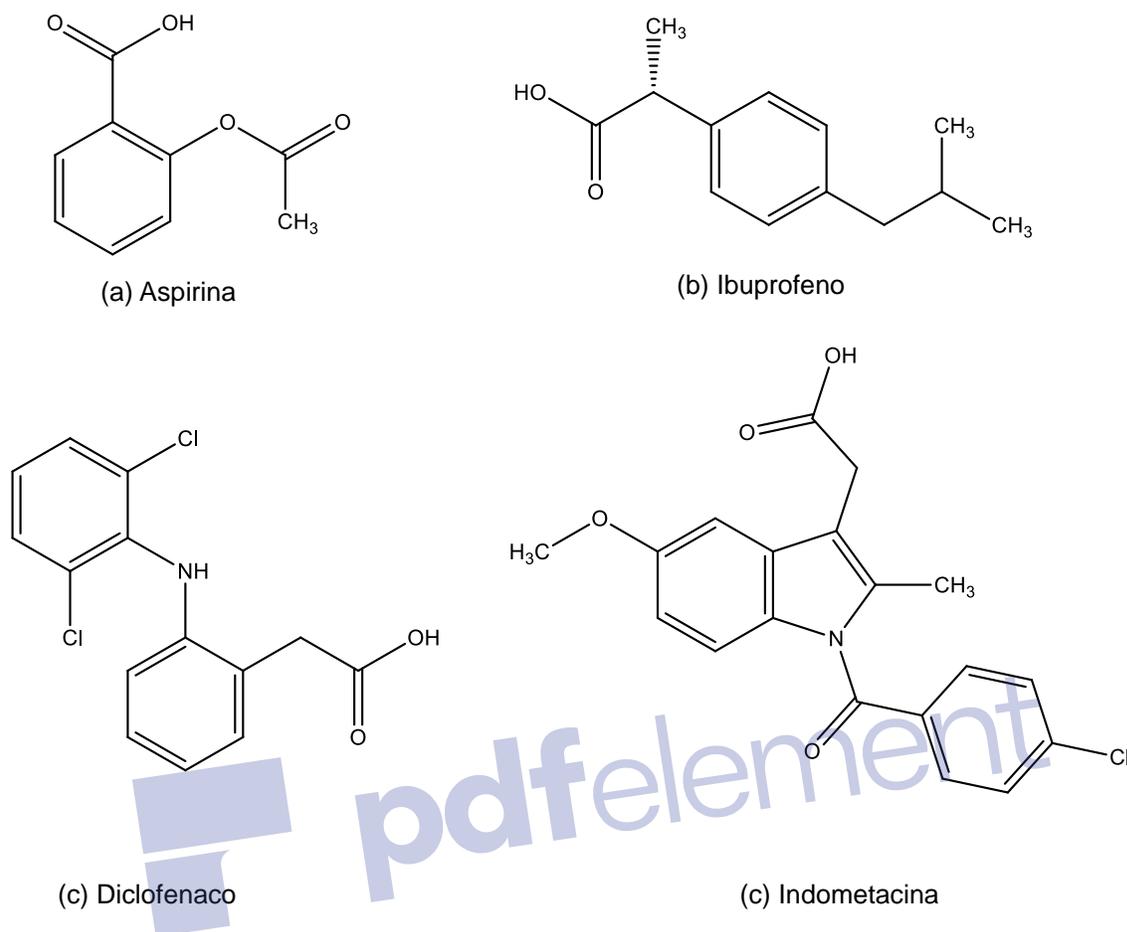


Figura 1. Estructura química de algunos de los AINEs más utilizados (Mehanna, 2003).

Esta familia de compuestos también se utiliza en padecimientos con dolores de intensidad leve o moderada como dolores odontológicos o dismenorrea. La Tabla 1 muestra una clasificación con base en la estructura química y ejemplos de los fármacos más comunes que se encuentran dentro de cada categoría (Setién, J. M. P., 2007).

Tabla 1. Clasificación de AINEs con base en su estructura química.

Grupo químico	Fármacos
Salicilato	Aspirina, Diflunisal, Fosfosal
Derivados del ácido acético	Diclofenaco, Ketorolaco, Aceclofenaco, Tolmetin, Indometazina
Derivados del ácido arilpropiónico	Naproxeno, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Flurbiprofeno
Pirazolonas	Metamizol magnésico, Propifenazona, Feprazona, Oxipizona.
Derivados del ácido N-arilantranílico	Ácido meclofenamínico, Ácido mefenamínico
Derivado de sulfonanilida	Nimesulida
Derivado de naftilalcanona	Nabumetona
Derivados oxicam	Lomoxicam, Meloxicam, Piroxicam, Tenoxicam
Derivados de paraaminofenoles	Paracetamol

Uno de los objetivos importantes de esta clasificación es poder identificar los compuestos que se comportan de manera similar (misma categoría) en caso de ser necesario el cambio del fármaco prescrito por la presencia de hepatotoxicidad o algunos otros efectos secundarios (Meunier y Larrey, 2018).

1.2.2. De acuerdo con su capacidad de inhibición

Dado que el mecanismo de acción de los AINEs es mediante la inhibición de la enzima COX en cualquiera de sus formas posibles, se pueden clasificar en selectivos y no selectivos o también llamados clásicos.

Los AINEs no selectivos son responsables de inhibir ambas enzimas, COX-1 y COX-2, mientras que los selectivos se encargan de bloquear únicamente la COX-2 (Joice et al., 2018). En la Tabla 2 se muestra una recopilación de fármacos representativos de ambos grupos.

Tabla 2. Clasificación de AINEs con base en la selectividad de inhibición de COX (Beca et al., 2007)

Selectividad	Fármacos
Relativamente selectivo para COX-1	Aspirina, Indometacina, Sulindaco, Piroxicam, Tolmetín
Equipotentes para ambas enzimas	Naproxeno, Flurbiprofeno, Diclofenaco, Nabumetona
Altamente selectivo para COX-2	Nimesulida, Celecoxib, Etoricoxib.

La síntesis de compuestos selectivos permite la inhibición de la COX-2 disminuyendo la respuesta inflamatoria del organismo sin alterar la producción de la COX-1 quien se encarga de la protección gastrointestinal, con esto lo que se busca es disminuir los efectos secundarios sobre la salud de los pacientes. A pesar de que se han logrado sintetizar AINEs selectivos, debido a su costo y disponibilidad se prefiere los AINEs clásicos para aliviar padecimientos con dolor e inflamación (Divins, 2014).

Su campo de aplicación ha convertido a los AINEs en uno de los grupos de medicamentos más empleados a nivel mundial con una participación entre el 5% y 10% de los medicamentos prescritos por año (Wongrakpanich et al., 2018) sumado al consumo por venta libre. Entre los fármacos no selectivos más consumidos se encuentra el Npx, ibuprofeno y diclofenaco (Al-Khateeb et al., 2017).

I.3. Naproxeno (Npx)

El ácido (S)-6-metoxi- α -metil-2-naftalenacético también conocido como Npx es un fármaco que pertenece al grupo de los antiinflamatorios no esteroideos. Su estructura química le permite actuar como antiinflamatorio, analgésico y antipirético, por esta razón se utiliza para tratar numerosos padecimientos; entre estos podemos mencionar: artritis reumatoide, osteoartritis, lesión traumática aguda y en el tratamiento para profilaxis. Además, se emplea en cuadros clínicos menos complejos como el dolor agudo (migraña), cefalea tensional, dolor posparto, dolor posoperatorio y una variedad de procedimientos ginecológicos.

Molecularmente, el Npx (Figura 2) es un AINEs derivado del ácido propiónico que presenta valores de log P de 3.18 y pKa 4.2. Dentro de su estructura cuenta con grupos cromóforos y un grupo naftaleno que le permite ser detectado mediante espectroscopía UV-Vis y espectrofluorometría.

Al ser parte de los AINEs cuenta con la farmacodinámica característica del grupo; su función principal es inhibir la producción de ciclooxigenasa bloqueando la conversión del ácido araquidónico a prostaglandinas proinflamatorias presentes en diversos fluidos y tejidos biológicos, entre ellos la mucosa gástrica, el líquido sinovial, la orina y la sangre. Al ser un antiinflamatorio no esteroideo no selectivo es capaz de inhibir la enzima ciclooxigenasa en sus dos isoformas mostrando una mayor selectividad frente a la COX-1 (Jahnavi et al., 2019).

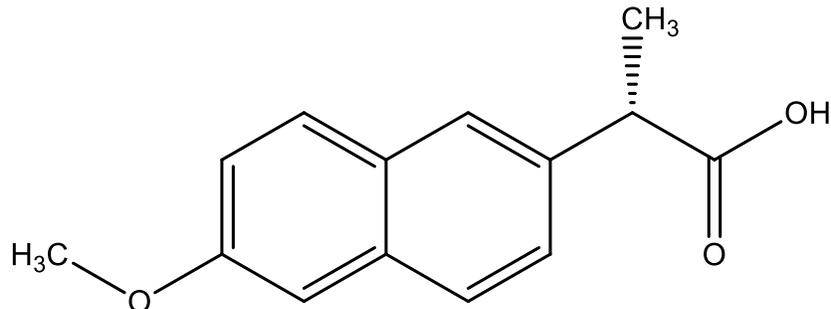


Figura 2. Estructura química de Npx.

Dentro de las ventajas del Npx se encuentra su facilidad y rapidez de absorción junto con una larga duración de acción, cuenta con una vida media promedio de 17 horas para Npx y su principal metabolito; 6-O-desmetil-naproxeno (Anttila et al., 1980), tiene la capacidad de unirse fuertemente a las proteínas plasmáticas y posee buena difusión en el líquido sinovial (Wojcieszynska y Guzik, 2020).

El fármaco se encuentra en dos presentaciones: en su forma ácida (compuesto neutro) y como sal de sodio. Del mismo modo, existen dos formas de administrar este medicamento, oral y rectal, la única diferencia entre estas dos formas es la velocidad de absorción; el Npx sódico se disuelve primero en el jugo gástrico en comparación con la especie ácida; la cual a valores de pH altamente ácidos como son los del jugo gástrico (Karadas et al., 2020), se mantiene en su forma neutra y poco soluble.

A pesar de su estabilidad y eficacia en una gran variedad de tratamientos, se han evaluado los posibles efectos adversos al suministrar Npx como tratamiento; entre ellos se reportan: infarto del miocardio, accidente cerebrovascular, insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, hipertensión arterial, inhibición plaquetaria, sangrado, ulceración y perforación (Batlouni, 2010).

Otra problemática asociada a este fármaco es su baja solubilidad en agua (25 mg L^{-1}), bajo esta característica quedan sujetas su biodisponibilidad y bioequivalencia (Rocha-Alcaraz et al., 2019). En los últimos años se ha registrado la acumulación del compuesto en el medio ambiente, se sabe que una de las principales fuentes de descarga de Npx al medio ambiente es mediante los desechos humanos, valores superiores al 90% de la dosis ingerida se excretan a través de la orina y generan un aumento de la cantidad del fármaco depositado en el entorno (Falany et al., 2005). Los sistemas de tratamiento de aguas no son capaces de eliminar en su totalidad este tipo de sustancias ya que se enfocan principalmente en la eliminación de sólidos y microorganismos patógenos (Peña-Álvarez y Castillo-Alanís, 2015). Se reportaron cantidades significativas de Npx en agua tratada y agua potable ($17\text{-}131 \text{ ng L}^{-1}$), estudios han revelado que el consumo constante del compuesto aún en concentraciones traza puede provocar riesgos a la salud importantes (Ghauch et al., 2015).

Estudios recientes en muestras de aguas residuales demuestran que la presencia de Npx es mayor en comparación a otros fármacos como ibuprofeno o triclosán. Además, se confirmó que la concentración del fármaco en aguas residuales urbanas es mayor que en aguas de abastecimiento municipal, es decir, la principal fuente de emisión de Npx hacia las aguas residuales es el consumo humano (Peña-Álvarez y Castillo-Alanís, 2015; Manzo et al., 2014).

I.4. Análisis de antiinflamatorios no esteroideos en muestras biológicas

Para determinar, identificar y cuantificar un fármaco la metodología debe permitir diferenciar el fármaco de otros componentes presentes en la matriz analítica, el procedimiento consiste en la recolección y almacenamiento de la muestra, la preparación de ésta, separación e identificación y, por último, la cuantificación.

La elección del método dependerá de la naturaleza de la muestra y las características del compuesto, sin embargo, una de las consideraciones más

importantes en función a las cantidades reportadas del compuesto debe ser la detección de niveles bajos de concentración del fármaco (Sultan et al., 2005).

1.4.1. Tratamiento de muestra

La elección de la técnica para el tratamiento de la muestra se basa generalmente en las siguientes características: la composición de la muestra, naturaleza del analito, el objetivo del análisis y la técnica analítica utilizada (Persona et al., 2015). La determinación de AINEs comprende varias etapas: la preconcentración del fármaco, separación y cuantificación, que generalmente involucra un método cromatográfico (Aguilar-Arteaga et al., 2010).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es la técnica analítica más popular para determinar esta familia de compuestos en muestras ambientales y biológicas gracias a su alta reproducibilidad, buena resolución y fácil automatización. A pesar de las ventajas que proporcionan los métodos cromatográficos han tenido que ser complementados con estrategias de preconcentración debido a que los AINEs tanto en el medio ambiente, alimentos y muestras biológicas se encuentran a nivel trazas lo que dificulta su determinación y cuantificación. Por lo tanto, un buen pretratamiento de la muestra nos permite retirar el analito de la matriz compleja y enriquecerlo previo a su análisis instrumental (Fan et al., 2014).

La extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE) son las estrategias preferidas para la separación de fármacos presentes en matrices biológicas, con la finalidad de disminuir la cantidad de solventes orgánicos utilizados la SPE ha cobrado un interés y desarrollo superior a la LLE.

La SPE es una técnica simple y rápida que requiere cantidades bajas de solventes orgánicos, utilizada para la limpieza y preconcentración de muestras ambientales y biológicas. Esta metodología consiste en disolver los analitos en una matriz líquida y hacerlos pasar a través de una fase extractante en estado sólido; posterior a la extracción los compuestos retenidos se eluyen empleando disolventes con mayor

afinidad al analito en comparación a la matriz original (Meucci et al., 2014). Entre las fases sólidas utilizadas destacan los cartuchos de octadecilsilano (C₁₈) y HLB (N-vinilpirrolidona y divinilbenceno), lo cual comprobó un buen comportamiento de la fase extractante con metanol como solvente de activación y elución para la preconcentración de AINEs (Milanetti et al., 2019).

Con el objetivo de compensar algunas limitaciones de la SPE, se ha propuesto el uso de técnicas derivadas como la microextracción en fase sólida (SPME). Esta variante de la SPE emplea un mínimo volumen de solventes orgánicos y permite ser acoplada a técnicas instrumentales sensibles para obtener una disminución en los límites de detección. Esta técnica ha dado la pauta para el empleo de diversos materiales porosos, ejemplo de ello, las fibras de acetato de celulosa que mediante la inmersión directa a la muestra permiten una separación sencilla, sensible y amigable con el medio ambiente, sin embargo, la estabilidad de la fase extractante es una desventaja sobre la que se continúa trabajando (Aqda et al., 2018).

A pesar de las grandes ventajas que ofrecen las técnicas anteriores no son lo suficientemente efectivas cuando de niveles de concentración traza se trata, por ello es necesario desarrollar nuevas metodologías con mayor selectividad y sensibilidad. Lo anterior permite el desarrollo de la extracción en fase sólida dispersiva (DSPE), la cual se caracteriza por el empleo de materiales adsorbentes en escala nanométrica aumentando considerablemente el área de contacto entre la superficie adsorbente y el analito (Ghorbani et al., 2019).

No obstante, pese a todas las mejoras que se realizaron a los procesos de extracción, la complejidad de matrices como sangre u orina requieren incrementar la selectividad y sensibilidad del método.

La opción más recurrida en los últimos años para favorecer el proceso de extracción es la modificación de la superficie extractante incorporando una fase magnética dando lugar a la extracción en fase sólida magnética, MSPE por sus siglas en inglés (Andrade-Eiroa et al., 2016); esto facilita la separación empleando un campo magnético externo, evitando etapas intermedias como la filtración o centrifugación.

I.4.1.1. Características de la MSPE

La MSPE es un método rápido, simple y reproducible que se basa en la adición de partículas magnéticas modificadas a la solución o suspensión que contiene el analito; el compuesto queda adsorbido en la fase magnética que es separada de la solución mediante la aplicación de un campo magnético externo. Posteriormente el analito es eluido del adsorbente y recuperado para su análisis (Safarikova y Safarik, 1999).

Dentro de las ventajas de la MSPE se encuentran la miniaturización del sistema, la preconcentración del analito incrementando la sensibilidad del método, bajos consumos de solvente orgánico, la capacidad de trabajar con grandes volúmenes de muestra sin exponerla a contaminación o largos tiempos de análisis, no es necesario acondicionar o empaquetar las partículas magnéticas, mayor superficie de contacto al propiciar una dispersión completa del adsorbente en la muestra, además de la facilidad para recuperar la fase extractante únicamente con un imán (Bagheri et al., 2019).

Las partículas magnéticas también conocidas como partículas núcleo-coraza se componen de un núcleo magnético principalmente magnetita (Fe_3O_4), cubierto por una capa de compuestos que confieren una mayor selectividad en el proceso de extracción y protección al núcleo magnético; entre los recubrimientos evaluados están los de base carbón, base sílice y polímeros (Aguilar-Arteaga et al., 2010).

La síntesis de partículas magnéticas cubiertas con *sílice* se puede llevar a cabo de dos formas: a) por deposición de sílice a partir de una solución de ácido silícico, b) por el método sol-gel; que consiste en producir sílice a partir de hidrólisis y condensación del alcoxi-silano, este último ha sido preferido al permitir tener control sobre el tamaño de partícula (Montemayor et al., 2004). Este tipo de partículas se han empleado en la determinación de diversos contaminantes emergente como es el caso de AINEs en muestras de agua tratada obteniendo porcentajes de recuperación superiores al 80% (Moliner-Martínez et al., 2011).

Al recubrir las partículas magnéticas empleando un compuesto derivado de *carbón* como el óxido de grafeno se obtienen compuestos con una adecuada área superficial y estructura de poros bien definida. Para sintetizar estos compuestos es necesario dispersar una cantidad de óxido de grafeno en agua, posteriormente se incorpora a la mezcla los compuestos que permiten la síntesis de la magnetita ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeCl_3 y NH_3) bajo condiciones de temperatura y pH adecuadas. Su alta capacidad de absorción y su eficiencia de extracción permiten que estas partículas proporcionen límites de detección en el intervalo de 70-300 ng L^{-1} para fármacos como el Npx, ibuprofeno y diclofenaco en muestras de orina humana (Asgharinezhad y Ebrahimzadeh, 2016).

Las propiedades magnéticas de las partículas empleadas en MSPE pueden decrecer en función de diversos factores como el tamaño de partícula o pH de trabajo (Sun et al., 1998). De todas las modificaciones que se le pueden realizar a las partículas magnéticas se prefiere el uso de *polímeros* orgánicos ya que han demostrado un aumento en la protección del núcleo magnético y reusabilidad del adsorbente, además de permitir la incorporación de una amplia variedad de grupos funcionales en su superficie (Rafighi et al., 2018).

La cubierta polimérica generalmente consta de tres componentes: 1) el monómero base, encargado de la protección al núcleo, 2) el monómero funcional, responsable de incrementar la selectividad en el proceso de extracción y 3) monómero entrecruzante con la función de mejorar las propiedades mecánicas del polímero. Entre los monómeros funcionales estudiados para la extracción de moléculas como la de Npx se encuentran aquellos que contienen un átomo de nitrógeno con un par de electrones libres; ejemplo de ello son la amidoamina (Madrakian et al., 2013), pirrol (Bagheri et al., 2018) y anilina (Rafighi et al., 2018).

El presente trabajo propone la síntesis de un sólido magnético modificado con poli(4-vinilpiridina) (P4VP) el cual puede interactuar de dos formas con el analito: una interacción ácido-base con el Npx gracias al carácter básico del monómero

(Kempe y Mosbach, 1994) e interacciones de tipo π - π entre los anillos del grupo naftaleno de Npx y el anillo aromático de P4VP (Li et al., 2020).

1.4.2. Métodos de análisis de Npx

Una vez que se ha conseguido extraer el fármaco de la matriz analítica el siguiente paso es identificarlo y cuantificarlo, para ello se emplean diversas técnicas de análisis instrumental. En la siguiente sección se realiza una breve descripción de algunos métodos propuestos para el análisis de fármacos en muestras biológicas.

1.4.2.1. Espectroscopía UV-Vis

Uno de los primeros métodos que se utilizaron en la determinación y cuantificación de Npx fue la espectrofotometría de absorción molecular. Es una técnica rápida y sencilla que permite obtener los espectros de análisis en un tiempo inferior a un minuto (Válcarcel y Cardenas, 2000).

Posterior a la separación del analito de su matriz original el procedimiento a seguir es realizar un barrido de 200 a 400 nm en las condiciones de análisis seleccionadas para determinar la longitud de onda máxima para el analito y obtener la mejor cuantificación. Esta técnica se ha evaluado en diversas matrices biológicas, por ejemplo, en la determinación de Npx y sus metabolitos en orina humana. Esta metodología requiere una compleja extracción que involucra solventes orgánicos como el cloroformo y etanol. El máximo de absorción fue determinado en 232 nm con un límite de detección de 3 mg L^{-1} (Abdel-Moety et al., 1988).

EL análisis de Npx en suero sanguíneo, requiere de una extracción líquido-líquido con hexano-alcohol isoamílico para poder analizarlo mediante espectrofotometría UV-Vis. A pesar de que se detectan cantidades inferiores a 10 mg L^{-1} , el método no logra eliminar la interferencia de otros fármacos presentes en la muestra (Holzbecher et al., 1979).

A pesar de ser una técnica sencilla y económica, el límite de detección (LOD) que se puede obtener por espectrofotometría de UV-Vis no es lo suficientemente adecuado para determinar de manera confiable el analito, generalmente en el orden de trazas. Otra gran desventaja es la baja capacidad de eliminar el efecto matriz, es decir, otros compuestos semejantes en estructura química pueden absorber la energía en la misma región que el Npx afectando la cuantificación (Eddaif et al., 2019; Etminan et al., 2019).

1.4.2.2. Electroquímica

De acuerdo con su estructura química, el Npx es un material electro-activo que puede ser fácilmente oxidado para analizarse mediante métodos electroquímicos. Uno de los electrodos más recurridos para la determinación de Npx en muestras biológicas es el electrodo de pasta de carbono; gracias a las características de su superficie pueden obtenerse límites de detección con un intervalo de 3.7-19 μM para AINEs en muestras biológicas (Guzmán-Hernández et al., 2016).

Para incrementar la sensibilidad de este electrodo se han realizado modificaciones en su superficie, por ejemplo, la incorporación de partículas de oro y polianilina. Para su determinación mediante voltamperometría cíclica y diferencial de pulsos la muestra requiere centrifugación y dilución con el electrolito soporte. Se sabe que el protón ácido de la molécula no interfiere con el proceso de oxidación. La mejor respuesta se obtiene a un pH de trabajo de 7.0 alcanzándose un LOD de 0.016 nM (Afzali et al., 2019).

Otra modificación que se le ha realizado al electrodo de pasta de carbono es la incorporación de óxido de níquel a la superficie para su análisis mediante voltamperometría cíclica, cronoamperometría y voltamperometría de onda cuadrada. La muestra requiere un tratamiento semejante al que se menciona en el párrafo anterior. El pH de trabajo que se establece es neutro y se obtiene un LOD de 0.12 μM (Beitollahi y Yoonesar, 2016).

A pesar de que este tipo de técnicas ofrecen límites de detección bajos, la naturaleza del método requiere exponer el analito al medio ambiente, esto afecta a moléculas que se pueden degradar en presencia de luz o temperatura, como el Npx, otra desventaja de este método es la pasivación del electrodo debida a la posibilidad de que el analito se adhiera a la superficie del electrodo.

1.4.2.3. Electroforesis capilar

Otra metodología de separación y análisis para AINEs en muestras biológicas es la electroforesis capilar (CE). Por las características del equipo y la complejidad de la matriz analítica se requiere que la muestra sea sometida a un proceso de separación del analito de la muestra.

Entre las estrategias que se han estudiado para la separación del analito acopladas con CE se encuentra la microextracción por gota suspendida y las membranas líquidas soportadas fabricadas por diferentes polímeros, entre ellos polipropileno y poliamida, materiales que permiten trabajar con diversos electrolitos de trabajo (tetraborato de sodio anhidro 40mM, acetato de amonio 30Mm y acetato de sodio 30mM) para establecer valores de pH de trabajo superiores a 4.2 y que el Npx tenga presente al grupo carboxilato. El voltaje de trabajo se encuentra entre 15 y 25 KV obteniendo LOD de 0.02 a 1.0 mg L⁻¹ empleando detectores UV-Vis (García-Vázquez et al., 2016; Pantůčková y Kubáň, 2017; Román-Hidalgo et al., 2020).

1.4.2.4. Cromatografía

Uno de los métodos instrumentales más empleado en el análisis de fármacos es la cromatografía, la cual permite separar, identificar y cuantificar el analito en una sola etapa.

El análisis de Npx se puede llevar a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases (GC); sin embargo, se sabe que el Npx presenta dos regiones de descomposición térmica, una en el intervalo de 150-

170 °C y otra entre 210-280°C. Para evitar la degradación del analito se prefiere desarrollar el análisis mediante HPLC (Zayed et al., 2017).

En la última década se ha desarrollado una extensa cantidad de análisis de Npx mediante HPLC y variaciones de la técnica como ultra cromatografía de líquidos de alta solución (UHPLC). Se utiliza la cromatografía en fase inversa empleando principalmente columnas C₁₈ acondicionadas con temperaturas en un intervalo de 20-40°C. Debido a la baja solubilidad del analito en agua la fase móvil se compone de una mezcla metanol-agua, siendo el solvente orgánico el componente en mayor proporción (superior al 60%). Estos instrumentos se acoplan a detectores UV-Vis o fluorescencia (FLD) para la detección del analito y obtener un LOD comprendido entre 0.001-0.3 µg L⁻¹ (Martinez-Sena et al., 2016; Hajmohammadi y Hemmati, 2017; Asadi et al., 2016).

Para utilizar cualquiera de las técnicas antes mencionadas es necesario un adecuado tratamiento de la muestra y a pesar de que representa una etapa más dentro del proceso analítico nos permite no solo limpieza de la muestra si no la preconcentración de los analitos. Debido a la importancia del análisis Npx en diferentes matrices analíticas, el presente trabajo propone los siguientes objetivos.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

II.1. Objetivo general

Diseñar una metodología de análisis de naproxeno en orina mediante la combinación de MSPE-HPLC-FLD basada en el uso de partículas de magnetita modificadas con poli(4-vinilpiridina).

II.2. Objetivos específicos

- 1.-Sintetizar partículas de magnetita modificadas con poli(4-vinilpiridina) y caracterizarlas utilizando técnicas instrumentales que permitan determinar la composición química.
- 2.-Diseñar y optimizar una metodología analítica basada en la combinación de MSPE-HPLC con detector de fluorescencia útil en la cuantificación de naproxeno.
- 3.-Validar la metodología desarrollada en muestras de orina conforme al protocolo establecido en normativas internacionales.

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

III.1. Reactivos, soluciones y equipos

El agua utilizada en todos los experimentos es desionizada procedente de un sistema Milli-Q con una resistividad superior a 18.0 MΩ·cm.

Para obtener la magnetita se emplearon $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2SO_4 grado reactivo, agua desionizada y una solución de NaOH 6M para ajustar el pH durante la síntesis. La oxidación parcial se realizó haciendo burbujear una corriente de aire.

La cubierta polimérica se sintetizó a partir de las siguientes sustancias grado reactivo: dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA), polisorbato 80 (tween 80), acrilato de metilo (MA), 4-vinilpiridina (4-VP) y persulfato de amonio (APS).

Se preparó una solución estándar de Npx de 1000 mg L^{-1} disolviendo el fármaco en su forma neutra con metanol, ambos componentes son grado reactivo. Esta solución madre se almacenó en un frasco ámbar a 4°C hasta un mes.

Para las pruebas de retención se utilizaron soluciones de ácido clorhídrico (HCl) para ajustar el valor de pH entre 1.0 y 3.0. La fuerza iónica se ajustó adicionando cloruro de sodio (NaCl) y se empleó metanol como eluyente.

La caracterización de los sólidos sintetizados se realizó mediante difracción de rayos X utilizando un difractómetro INEL Equinox 2000 con una radiación $\text{CoK}\alpha$, $\lambda=1.7890100 \text{ \AA}$. Los patrones fueron recuperados con ángulo inicial ($2\theta^\circ$) 20; ángulo final ($2\theta^\circ$) 70 con incrementos de 0.02° ($2\theta^\circ$).

Las mediciones de pH se realizaron con un potenciómetro marca Oakton pH510-series. Se utilizó un espectrómetro marca Perkin Elmer, modelo GX para el análisis de espectroscopía infrarrojo en un rango de $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$; las muestras fueron preparadas y analizadas en pastillas de KBr.

El análisis de Npx mediante HPLC se llevó a cabo en un equipo Agilent Technologies 1260 Infinity, equipado con una columna Agilent Zorbax ODS

Analytical 4.6 x 250 mm, 5- μ m. Las señales analíticas se obtuvieron empleando un detector de fluorescencia a longitudes de onda de excitación y emisión de 271 nm y 356 nm, respectivamente. La fase móvil empleada constó de 70% metanol y 30% solución acuosa de ácido acético al 1% (v:v) a un flujo de 0.8 mL min⁻¹. El volumen de inyección fue de 20 μ L. Para disminuir el error asociado al tratamiento de la muestra y el volumen de inyección se utilizó ácido 1-naftalenacético como estándar interno (E.I.). El equipo se controló mediante el software Agilent OpenLAB.

III.2. Síntesis de sólidos magnéticos

Se sintetizaron tres sólidos magnéticos (A, B y C) en dos etapas usando las proporciones que se muestran en la Tabla 3. La primera etapa consistió en la obtención de un núcleo de magnetita mediante el método de precipitación y oxidación parcial (Ibarra et al., 2014). La síntesis se desarrolló de la siguiente manera: se disolvieron 3.6 g de FeSO₄·7H₂O en 100 mL de agua desionizada; la temperatura de la mezcla se elevó a 60°C y se agitó constantemente. El pH de la solución se ajustó a 10.0 \pm 0.2 adicionando NaOH 6M, incorporando una corriente de aire constante. Transcurridos 40 minutos aproximadamente, la solución se observó de color negro, aspecto característico de la formación de Fe₃O₄.

El sólido obtenido se separó de la fase líquida colocando un campo magnético externo en la parte exterior del matraz, y se lavó 5 veces con 25.0 mL de agua desionizada. La fase magnética obtenida se dispersó en 100.0 mL de una solución de Tween 80 al 0.5% (w/v) y se colocó en agitación durante 10 minutos a 75 °C.

La segunda etapa consistió en la síntesis de la fase extractante utilizando el método de polimerización en emulsión adicionando los monómeros a la suspensión de magnetita/emulsificante en el siguiente orden: MA, EGDMA y 4-VP.

Una vez adicionados los monómeros se agregaron 5.0 mL (gota a gota) de una solución de persulfato de amonio al 1.4%, dejando la mezcla en agitación constante

durante una hora. Concluida la síntesis se separó el sólido magnéticamente, se lavó con agua desionizada hasta su neutralización y se secó a 60°C durante 12 horas. Los sólidos secos se trituraron en un mortero de Ágata y se almacenaron en un frasco ámbar hasta su uso.

Tabla 3. Relación molar de los sólidos magnéticos sintetizados.

Sólido	Magnetita (mmol)	4-VP (mmol)	MA (mmol)	EGDMA (mmol)
A	3.0	0.3	0.3	5.0
B	6.0	0.3	0.3	5.0
C	12.0	0.3	0.3	5.0

III.3. Caracterización de sólidos magnéticos

III.3.1. Cálculo del número de sitios activos

La cantidad de sitios activos de 4-VP en los sólidos magnéticos sintetizados se determinó mediante una valoración ácido-base de acuerdo con la siguiente metodología: se mezclaron 50.0 mg de sólido magnético con 10.0 mL de una solución de NaOH 0.01M con agitación magnética constante. Se registró el pH inicial de la mezcla y las variaciones por adiciones de 0.5 mL de la solución valorante (HCl 0.01 M) hasta completar la valoración. El registro potenciométrico presentó dos puntos de equivalencia, el primero corresponde a la valoración de NaOH en exceso y segundo al grupo piridina disponible en la superficie de los sólidos para la extracción.

El número de sitios activos ($\text{mmol}_{\text{HCl}} \cdot \text{Kg}^{-1}$) se calculó a partir de la diferencia entre los volúmenes de gasto (mL) de los dos puntos de equivalencia utilizando la siguiente expresión:

$$\text{mmol}_{\text{HCl}} \cdot \text{Kg}^{-1} = \frac{(v_2 - v_1)(M_{\text{HCl}})}{m_{\text{sólido}}} \quad \text{Ec. 1}$$

Donde: M_{HCl} representa la molaridad de ácido clorhídrico; v_1 y v_2 son los volúmenes (mL) donde se observan los puntos de equivalencia; $m_{sólido}$ es la masa de sólido (Kg) empleada en el análisis.

III.3.2. Pruebas de retención de Npx

La capacidad de adsorción de cada uno de los sólidos se evaluó mediante las isotermas de adsorción a valores de pH de 2.0, 4.0 y 6.0 (ajustando con HCl 0.01 M y NaOH 0.01 M). Para el análisis de retención se colocaron 10 mg de los sólidos en tubos de polipropileno y se adicionaron 2.0 mL de una solución acuosa de Npx (20.0-100.0 mg L⁻¹), la mezcla se agitó durante 30 minutos. A continuación, se aisló el sólido magnéticamente colocando un imán de neodimio en la parte externa del tubo, se reservó la fase líquida para ser analizada mediante espectroscopía de UV-Vis a una longitud de onda de 232 nm. La cuantificación de Npx no retenido se realizó mediante interpolación en la línea de calibrado construida con soluciones estándar del fármaco (0.25-3.5 mg L⁻¹) preparadas en solución acuosa ajustada al pH de trabajo.

III.4. Análisis de muestras

Se analizaron 4 muestras de 10 mL de orina de personas sanas, las cuales se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

La metodología propuesta (Figura 3) involucra las siguientes etapas: a) 10.0 mg de sólido magnético C se activaron con 1.0 mL de metanol seguido de un lavado con 1.0 mL de agua desionizada; b) 1.0 mL de muestra de orina se diluyó a 10.0 mL con una solución compuesta por HCl 1×10^{-3} M, NaCl 1.0 M y el E.I. en una concentración 50 µg L⁻¹, y se añadió al sólido magnético activado; c) la mezcla se agitó mecánicamente durante 30 minutos; d) se separaron las fases utilizando un imán

de neodimio reservando la fase sólida; e) la fase sólida se lavó con 1.0 mL de agua desionizada con la finalidad de eliminar cualquier compuesto que no sea de interés para la prueba y pudiera haber quedado retenido en la fase extractante, posteriormente se añadió 3.0 mL de metanol y se agitó por 1 minuto para eluir el analito; f) finalmente se separaron las fases magnéticamente y la fase líquida se evaporó, reconstituyendo el residuo con 0.5 mL de metanol, el cual se reservó para su análisis mediante HPLC-FLD.

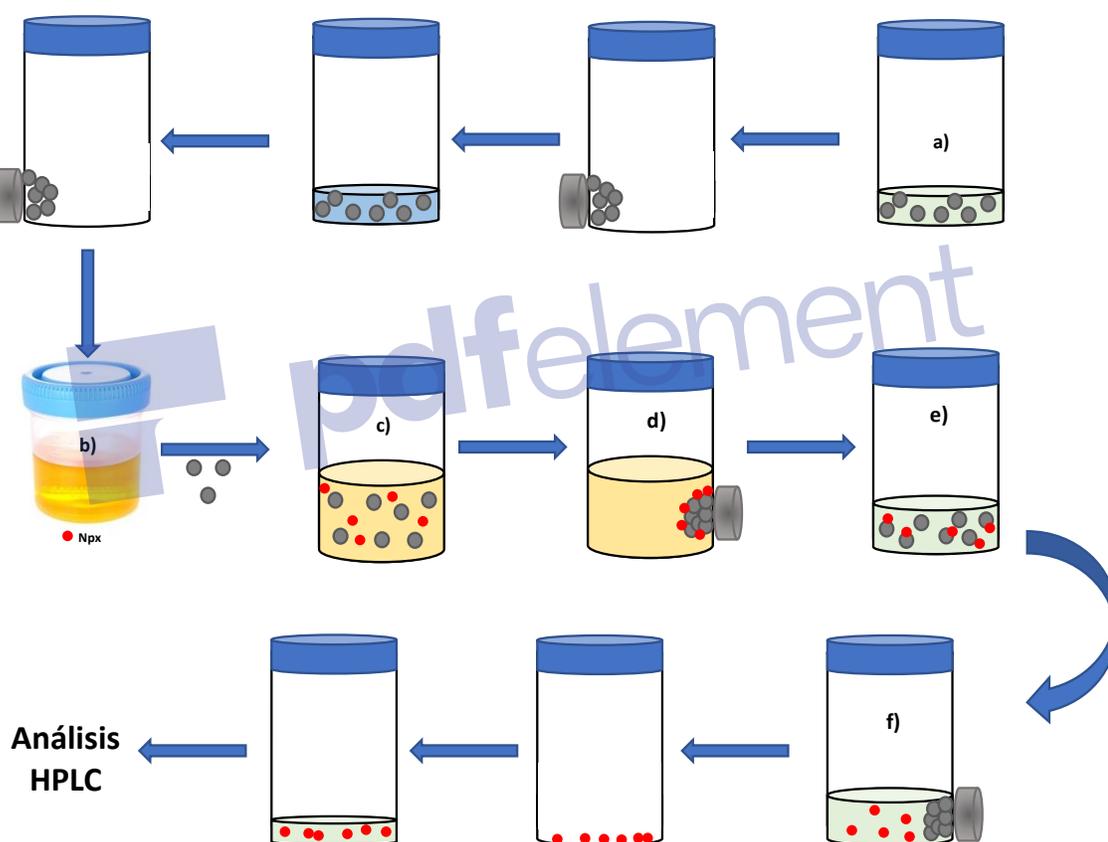


Figura 3. Representación esquemática para el aislamiento de Npx en muestras de orina mediante MSPE.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1. Caracterización de sólidos magnéticos

IV.1.1. Caracterización química

Para determinar la composición química de los sólidos magnéticos se requieren técnicas instrumentales que proporcionen información relacionada con los elementos o compuestos presentes en el sólido; para el presente trabajo se utilizaron las siguientes:

- a) la difracción de rayos X (DRx) permite identificar las fases cristalinas presentes en los sólidos a partir de los datos cristalográficos que definen a un material. En función a la síntesis realizada es posible encontrar óxidos de hierro como la maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$) y magnetita (Fe_3O_4). Al realizar el análisis de los sólidos A, B y C se observó un perfil semejante para todas las muestras. La Figura 4 muestra el patrón de difracción de rayos X para el sólido magnético C. En esta figura se observa un pico ancho alrededor de un ángulo de 15° , la señal se identificó como “o” y se le relaciona con la presencia de material amorfo. Las señales marcadas como “*” (2θ : 30.1° , 35.5° , 37.0° , 43.1° , 57.0° y 62.6°) corresponden a las líneas de difracción características de Fe_3O_4 (Liu y Kim, 2009).

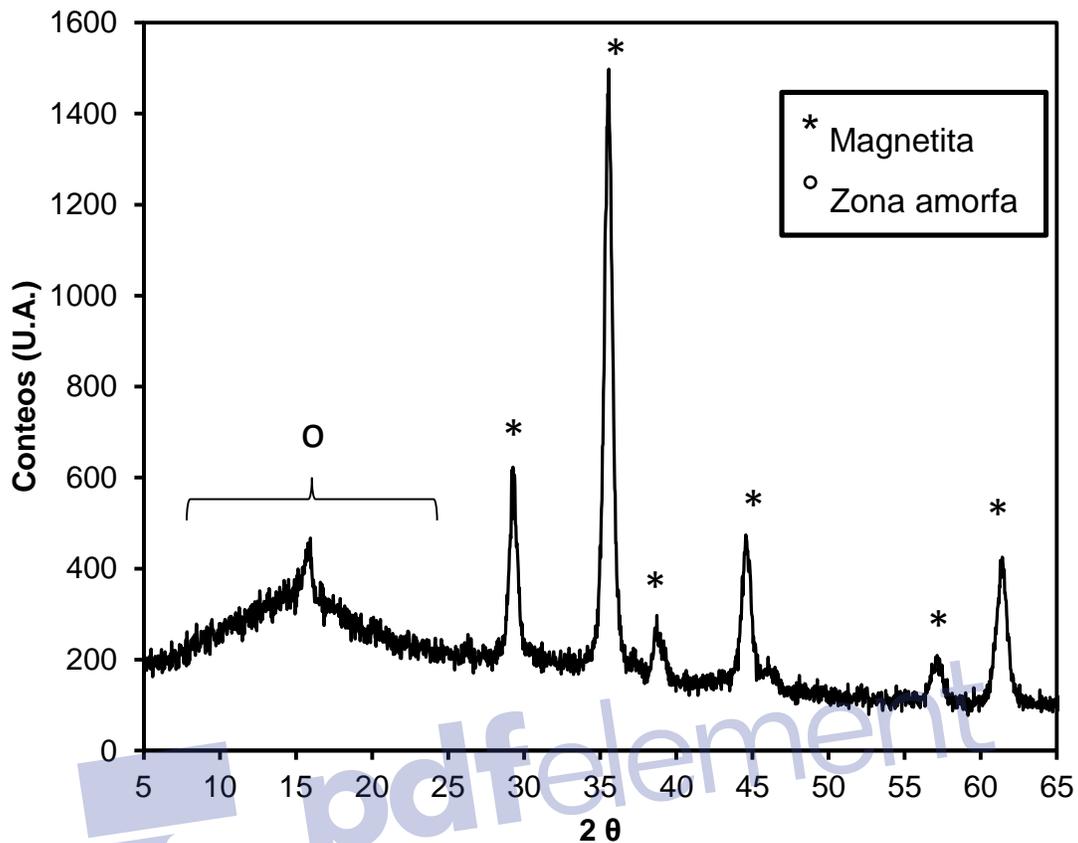


Figura 4. Patrón de difracción de rayos X para el sólido magnético C.

Con base a los resultados obtenidos se sabe que el sólido cuenta con dos estructuras independientes; se atribuye la parte amorfa a la cubierta polimérica y la fase cristalina al núcleo magnético.

- b) mediante espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se confirmaron los compuestos presentes a partir de la energía de vibración característica de sus enlaces. Los tres sólidos se comportaron de manera similar durante este análisis, la Figura 5 muestra el espectro de infrarrojo para el sólido C; se observa una banda de vibración en 571 cm^{-1} característica del enlace Fe-O, las señales entre $3250\text{-}3750\text{ cm}^{-1}$ corresponden al estiramiento

del enlace O-H (Bagheri et al., 2017), en 2960 cm^{-1} se observa la vibración de los grupos $-\text{CH}_2-$, $-\text{CH}_3$, alrededor de 1730 cm^{-1} se ubica la banda correspondiente al grupo carbonilo y en 1654 cm^{-1} se observa la vibración de estiramiento del enlace $-\text{C}=\text{N}-$ característico del anillo de piridina (Sahiner e Ilgin, 2010).

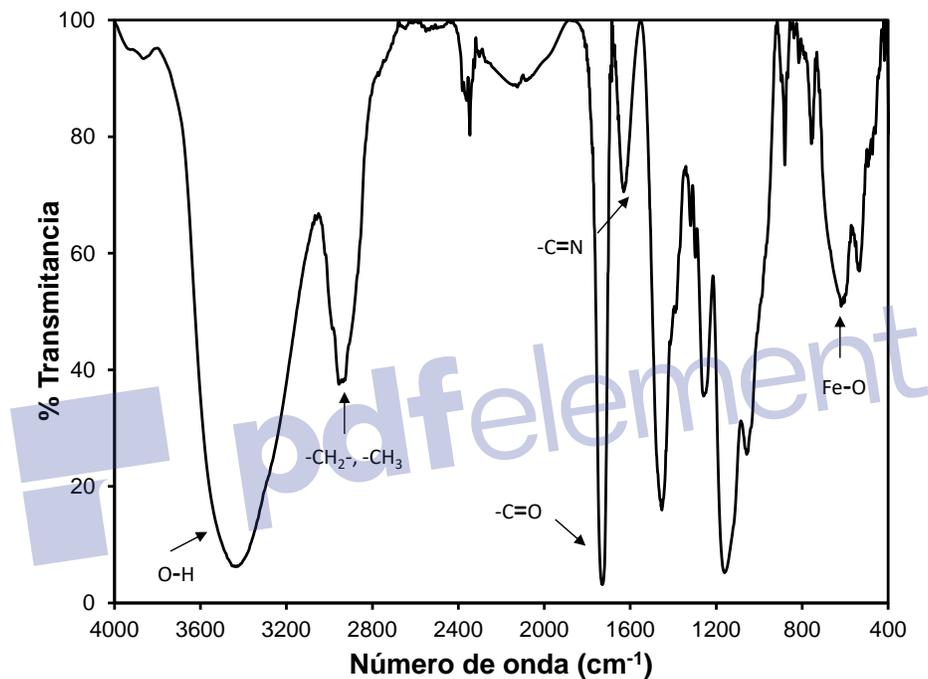


Figura 5. Espectro de FTIR para el sólido C.

La banda característica para Fe-O confirma la existencia de magnetita, la señal que corresponde al grupo carbonilo se atribuye a la presencia de este grupo en los monómeros EGDMA y MA y finalmente la banda que corresponde a la presencia del monómero funcional (4-VP) característica de la vibración de $-\text{C}=\text{N}-$.

IV.1.2. Estudios de retención

En el presente trabajo se evaluó la capacidad adsorbente de cada uno de los sólidos magnéticos sintetizados mediante pruebas de retención de Npx estableciendo distintos valores de pH de trabajo (2.0, 4.0 y 6.0), sin embargo, no se observó retención significativa del fármaco a valores de pH superiores a 4.0. La disminución de la adsorción de Npx en función al pH se puede atribuir a una repulsión de cargas negativas entre el anión de Npx y las cargas negativas OH^- que comienzan a adherirse a la superficie de la magnetita conforme se incrementa el valor de pH de la solución. Por otra parte, se ha reportado que a valores de pH superiores a 3.0 se incrementa la agregación de partículas magnéticas causando una disminución en la dispersión de las partículas (Rutnakornpituk et al., 2011).

La isoterma de adsorción es la herramienta comúnmente utilizada para cuantificar la capacidad de adsorción de un sólido; mediante su aplicación es posible cuantificar la cantidad de analito adherido a la superficie del adsorbente.

La isoterma se construye graficando la concentración de Npx al equilibrio en solución (mmol L^{-1}) contra la concentración del fármaco adherido en la fase sólida (mmol Kg^{-1}), los resultados para los sólidos A, B y C se muestran en la Figura 6 a un pH de trabajo de 2.0.

Analizando los resultados obtenidos para los tres sólidos se observa que el sólido C retiene una mayor cantidad de Npx en comparación a los otros dos compuestos.

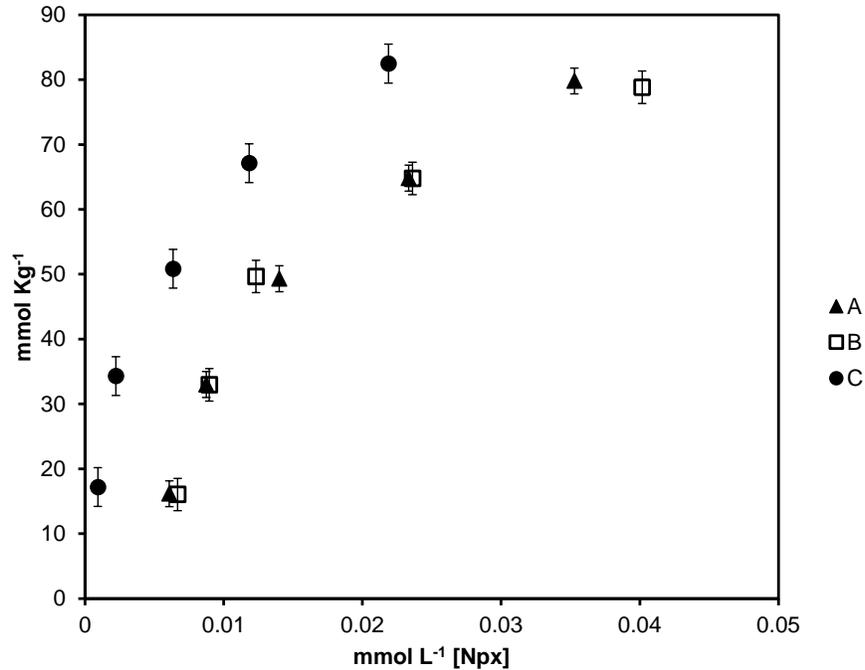
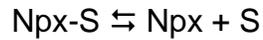


Figura 6. Isotherma de adsorción de Npx sobre sólidos magnéticos modificados con 4-VP (A, B y C).

El valor de la constante de afinidad de cada sólido se estimó a partir de las isothermas de adsorción y la aplicación del gráfico de Scatchard que se ajusta a la siguiente ecuación:

$$\frac{[Npx-S]}{[Npx]} = \frac{Q_{max}}{K_d} - \frac{[Npx-S]}{K_d} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde [Npx-S] (mmol Kg⁻¹) corresponde al Npx adsorbido en el sólido (S), [Npx] (mmol L⁻¹) es la concentración del fármaco en solución al equilibrio. Los datos se ajustan a una línea recta de acuerdo con la ecuación 2., donde Q_{max} es la cantidad máxima de Npx que puede ser adsorbida y K_d es la constante de disociación calculada a partir de la pendiente de la recta (-1/K_d) para el siguiente equilibrio:



Ec. 3

Los valores de K_d se pueden observar en la Tabla 4; en todos los casos el valor estimado se encuentra en el intervalo de 1×10^{-7} y 1×10^{-4} M, los cuales son adecuados para procesos de retención y elución (Ibarra et al., 2011). De los tres sólidos el que presenta una mayor afinidad hacia Npx es el sólido C.

El comportamiento de los sólidos magnéticos es similar a los valores de K_d en la estimación de sitios activos de P4VP (se expresan como $\text{mmol}_{\text{HCl}} \text{Kg}^{-1}$), cuyo análisis se llevó a cabo mediante una valoración ácido-base (Figura 7). En la Tabla 4 se puede observar que a medida que se incrementa la cantidad de grupos activos aumenta la capacidad de adsorción de los sólidos.

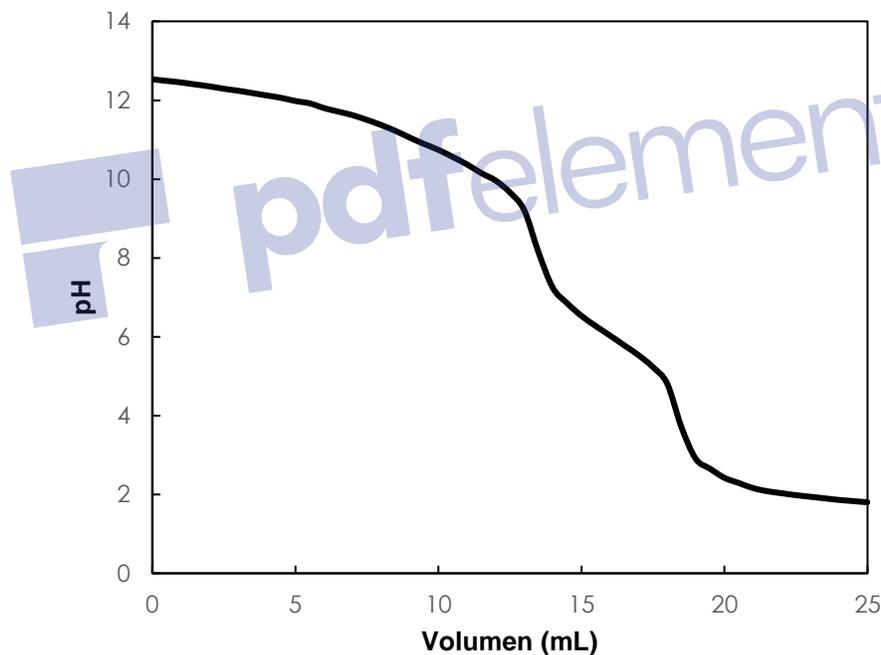


Figura 7. Curva de valoración del sólido magnético con HCl como valorante.

La información recopilada se atribuye a las cargas presentes en el sistema: a valores de pH bajos la superficie de la magnetita (Illés y Tombácz, 2006) y de la P4VP (Rutnakornpituk et al., 2011) están cargadas positivamente; en consecuencia,

la fuerza de repulsión de cargas promueve la dispersión de las partículas y la exposición de los sitios de piridina para interactuar con el Npx.

En resumen, la cantidad de magnetita incorporada en el sólido C es mayor, lo que produce un incremento en el número de sitios activos de P4VP y en la afinidad sólido-analito.

Tabla 4. Parámetros calculados para la caracterización de los sólidos magnéticos

Sólido	Kd (X10 ⁻⁶ M)	Sitios activos (mmol _{HCl} Kg ⁻¹)	Qmax (mmol Kg ⁻¹)
A	24.5±0.1	700 ± 3	79.8±1.0
B	20.4±0.1	500 ± 2	78.8±5.7
C	3.5±0.1	1200 ± 4	82.5±1.4

Los resultados muestran una moderada capacidad de adsorción que puede deberse a la baja relación molar de P4VP presente en los sólidos. Considerando que la P4VP es soluble en agua, un incremento en la concentración del monómero funcional produciría una disminución tanto de la protección del núcleo magnético como de la capacidad de adsorción.

IV.2. Optimización de la metodología para el sistema de MSPE

En función a los resultados del apartado anterior se determinó que el sólido C es el que se utilizará en los siguientes experimentos; posterior a esta elección se procede a la optimización del sistema de extracción.

El proceso de retención-elución de Npx puede ser afectado por diversas variables. Con la finalidad de optimizar las condiciones involucradas en el sistema se realizó un diseño de experimentos Taguchi, el cual es un diseño experimental robusto que permite evaluar las variables de control que tienen influencia significativa sobre el sistema (Rodríguez et al., 2010).

Una de las ventajas más importantes de esta técnica es que proporciona información útil desarrollando un mínimo número de experimentos, se utilizan matrices de arreglo ortogonal donde las columnas (factores) y las filas (experimentos) son ordenadas de tal forma que sea posible visualizar la combinación de factores en sus distintos niveles para cada experimento (Roy, 2001).

La optimización del sistema requiere cinco etapas básicas:

1. La identificación de la variable de salida que se desea optimizar.
2. La identificación y selección de los factores que afectan al sistema.
3. La selección de la matriz ortogonal adecuada y de los niveles adecuados para los factores seleccionados.
4. El análisis de los resultados y la determinación de las condiciones óptimas.
5. Realización del experimento en las condiciones óptimas seleccionadas para confirmar los resultados.

En el presente trabajo la variable de respuesta seleccionada para optimizar fue la siguiente: Área Npx/Área E.I., obtenidas a partir del análisis cromatográfico.

Las variables de control involucradas se seleccionaron en función a referencias previas, determinándose las siguientes: la composición del sólido magnético, [NaCl] añadida (M), volumen metanol (mL) empleado en la elución y el valor de pH de la muestra (Aresta et al., 2005).

De acuerdo con el diseño experimental de Taguchi el arreglo ortogonal que permite el análisis de cuatro factores requiere evaluar las variables en tres niveles, dando como resultado una matriz ortogonal $L_9(3^4)$.

Los ensayos se realizaron empleando una muestra de orina dopada con $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$ de Npx y E.I. La matriz de diseño y los resultados obtenidos se muestran en

la Tabla 5. La concentración final se determinó mediante HPLC-FLD interpolando en una curva de calibración con soluciones estándar de Npx ($5.0\text{-}60.0 \mu\text{g L}^{-1}$) y una concentración de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ de E.I.

Tabla 5. Matriz ortogonal obtenida durante la optimización del sistema MSPE y la respuesta para cada experimento.

Experimento	S	NaCl (M)	VM (mL)	pH	[Área Npx]/[Área E.I.]
1	A	0.5	1	1	0.97
2	A	1.0	2	2	0.56
3	A	1.5	3	3	1.58
4	B	0.5	2	3	0.98
5	B	1.0	3	1	0.82
6	B	1.5	1	2	4.90
7	C	0.5	3	2	0.94
8	C	1	1	3	2.15
9	C	1.5	2	1	0.60

S-sólido, VM-volumen de metanol

La Figura 8 muestra el efecto de los factores sobre la variable de salida, siendo el pH la variable que más contribuye al sistema (41.11%), seguida del volumen de metanol con 23.3%, la concentración de cloruro de sodio adicionada con 19.64% y finalmente la variable que menos contribuye es la composición del sólido con 15.99%.

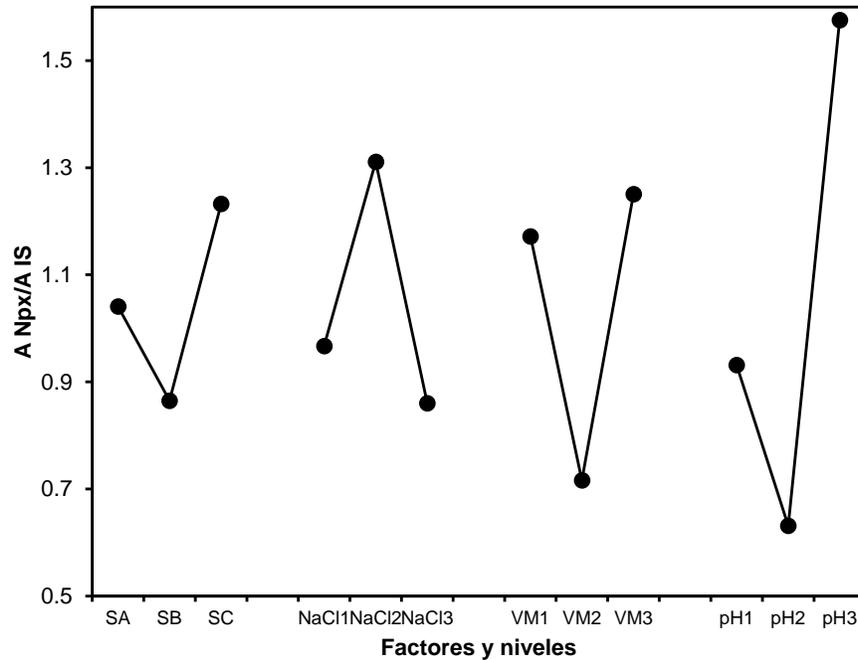


Figura 8. Efecto de los factores de control sobre el proceso de extracción de Npx

El diseño experimental confirma los resultados obtenidos en los experimentos de adsorción; el sólido magnético más adecuado para el proceso de MSPE es el C. Adicionalmente, en el sólido seleccionado la concentración de magnetita es mayor lo que favorece la recuperación del mismo mediante la separación magnética.

La adición de una mayor cantidad de NaCl incrementa la fuerza iónica; reduciendo la solubilidad de los compuestos hidrófobos favoreciendo el paso del analito hacia la fase extractante (Sarafraz-Yazdi et al., 2012). La adición de sales al sistema también se conoce como “efecto salino” y en el presente trabajo se evaluó adicionando diferentes concentraciones de NaCl al sistema (0.5, 1.0 y 1.5 M). Los resultados muestran que al incrementar la concentración de NaCl se promueve la retención de Npx. Sin embargo, cuando la [NaCl] es 1.5 M, existe una competencia de adsorción entre los iones cloruro y el analito, lo que produce un efecto negativo en la retención del fármaco (Ayazi y Matin, 2016). Las señales más altas se obtuvieron cuando se adicionó NaCl 1.0 M, por ello se establece como valor óptimo.

El valor de pH es una variable importante en procesos de extracción de sustancias con propiedades ácido-base. La extracción de Npx se favorece cuando el fármaco se encuentra en su forma neutra, para ello es necesario ajustar el pH de la muestra debajo del valor del pKa del analito. El valor óptimo de pH se estableció en 3.0; bajo estas condiciones la P4VP se encuentra con carga positiva lo que disminuye las posibles interacciones ácido-base con el analito, sin embargo, la presencia de múltiples unidades aromáticas unidas al adsorbente favorece la interacción con moléculas planas que poseen anillos aromáticos (Nagai et al., 2018). Los resultados demuestran que la presencia del anillo naftaleno en la estructura de Npx incrementa la afinidad hacia el sólido mediante interacciones de tipo $\pi - \pi$. Por otra parte, el valor de pH de trabajo disminuye la degradación del núcleo magnético en comparación a los otros dos valores estudiados (pH=1.0 y 2.0) al ser menos agresivo, esto favorece la reusabilidad del sólido (Sun et al., 1998).

Para elegir el disolvente de elución se consideró su polaridad (debe ser menos polar que la matriz analítica) y su capacidad de disolver al analito. Diversas metodologías han demostrado que el metanol es un buen eluyente debido a la solubilidad del fármaco, su polaridad inferior respecto a matrices acuosas y además por ser un componente de la fase móvil en el análisis cromatográfico (Mafra et al., 2018). Fue seleccionado un volumen de 3.0 mL de eluyente para los ensayos de separación.

IV.3. Parámetros analíticos

Bajo las condiciones óptimas, sólido C, concentración de NaCl 1.0 M, pH=3.0 y 3.0 mL de metanol como eluyente, se construyó la curva de calibrado utilizando soluciones estándar de orina dopadas con 5.0, 10.0, 20.0, 30.0, 40.0, 50.0 y 60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Npx. La línea de calibrado muestra una dependencia lineal entre la señal medida y la concentración del fármaco presente de la solución estándar. La Tabla 6 muestra los parámetros de regresión lineal de la curva de calibrado.

Tabla 6. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, señal A Npx/A E.I. vs [Npx]/[E.I.]

Parámetro	Valor
Raíz cuadrada de la varianza residual, s_c	0.08
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$	0.02 \pm 0.06
Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$	14.87 \pm 0.75
Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.05-60.0
Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.02
Límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$)	0.05
Coefficiente de determinación R^2	0.99

El límite de detección y el límite de cuantificación se calcularon de acuerdo con los criterios de la FDA, como $3.3 \cdot s_c / b_1$ y $10 \cdot s_c / b_1$, donde s_c es la raíz cuadrada de la varianza residual de la curva estándar, y b_1 es la sensibilidad analítica.

Para validar el límite de cuantificación, una muestra de orina dopada con 0.05 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Npx se analizó por triplicado y se obtuvo una recuperación promedio del 104.1% con una precisión del 6.9% expresada como desviación estándar relativa (%RSD, n = 3).

En la Figura 9 se muestran los cromatogramas obtenidos a partir del análisis de tres muestras de orina: una libre de Npx denominada “blanco” (Figura 9a) y dos muestras dopadas con 0.05 y 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ del fármaco (Figura 9b y 9c respectivamente). En la imagen se puede observar que la metodología MSPE-HPLC-FLD propuesta en el presente trabajo permite la extracción y análisis de Npx en matrices biológicas complejas y su cuantificación a niveles de concentración por debajo de los $\mu\text{g L}^{-1}$.

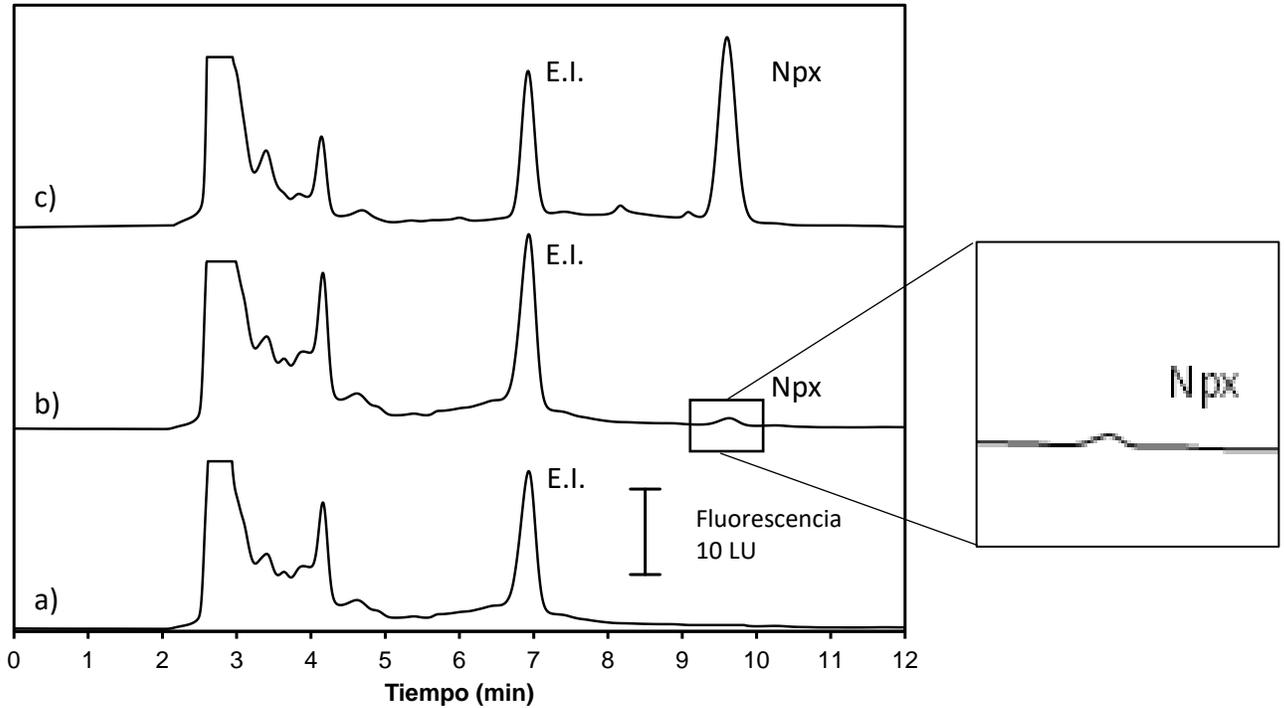


Figura 9. Cromatograma obtenido del análisis de muestras de orina bajo condiciones óptimas. **(a)** muestra blanco, **(b)** Npx $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$, **(c)** Npx $35 \mu\text{g L}^{-1}$. Estándar interno (E.I. $50.0 \mu\text{g L}^{-1}$).

La precisión se evaluó en términos de repetitividad y reproducibilidad (3 días), la concentración de Npx fue determinada por interpolación en la curva de calibración antes mencionada. Los resultados de precisión se muestran en la Tabla 7 como % RSD y en todos los casos los valores fueron inferiores al 5.0%. La exactitud del método propuesto fue investigada mediante la recuperación de Npx en muestras de orina enriquecidas expresada como:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{[Npx]_{calculada}}{[Npx]_{agregada}} * 100 \quad \text{Ec. 4}$$

Se pueden apreciar factores de recuperación aceptables en todos los ensayos.

Tabla 7. Concentración de Npx determinada en muestras de orina dopadas mediante la metodología propuesta.

[Npx] adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Npx] calculada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Repetitividad (%RSD, n=3)	Reproducibilidad (%RSD, n=3)	% Recuperación
5.0	4.9	2.2	3.7	98.0
30.0	30.2	1.6	1.9	100.7
50.0	49.7	1.5	2.1	99.4

IV.4. Análisis de muestras

La metodología basada en la combinación de MSPE con HPLC-FLD se empleó para analizar 4 muestras de orina (2 hombres, 2 mujeres) dopadas con 15 y 35 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Npx; los resultados se muestran en la Tabla 8. Las muestras fueron analizadas por triplicado antes y después de ser dopadas. Los valores de desviación estándar relativa (%RSD, n=3) en todos los casos son menores al 5.0%. La exactitud del método se evaluó a partir del % de recuperación promedio, $98.6 \pm 1.6\%$. Los valores estimados de precisión y exactitud son adecuados, lo que significa que la metodología propuesta es adecuada para el análisis de Npx en orina (Shamsayei et al., 2018).

Tabla 8. Concentración de Npx determinada en muestras de orina utilizando el método propuesto.

Muestra	[Npx]adicionada ($\mu\text{g L}^{-1}$)	[Npx]encontrada ($\mu\text{g L}^{-1}$, %RSD, n=3)	[Npx]total teórica ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Recuperación
H1	0	8.2(1.9)		
	15.0	22.1(1.7)	23.2	95.3
	35.0	42.7(1.3)	43.2	98.8
H2	0	7.8(2.0)		
	15.0	23.1(2.0)	22.8	101.3
	35.0	42.0(0.7)	42.8	98.1
M1	0	6.0(2.5)		
	15.0	20.3(2.3)	21.0	96.7
	35.0	40.7(2.7)	41.0	99.3
M2	0	1.3(4.6)		
	15.0	16.4(1.9)	16.3	100.6
	35.0	35.7(1.3)	36.3	98.3

M-mujer, H-hombre

La Tabla 9 muestra una comparación entre los resultados obtenidos por el método propuesto y otros reportados para la determinación de Npx en orina humana. El método propuesto en este trabajo presenta límites de detección competitivos con la ventaja adicional de disminuir el tiempo de análisis al emplear fase adsorbente magnética que se separa de forma rápida de la matriz. Por otra parte, el uso de volúmenes de muestra y eluyente inferiores le proporciona una ventaja adicional.

Tabla 9. Comparación del presente método con otros métodos reportados para la determinación de Npx en orina humana.

Método	Sistema de detección	LOD (μgL^{-1})	RSD (%)	Volumen muestra (mL)	Volumen reconstitución (mL)	Referencia
MMOF-SPME ^a	HPLC-UV	0.03	<4.7	5.0	2.0	[Mirzajani et al., 2019]
LDH-PS- μ SPE ^b	HPLC-UV	5.0	<7.4	0.25	0.2	[Seidi, S., y Sanàti, S. E. (2019)]
MFA- μ SPE ^c	HPLC-UV	2.0	<6.7	50.0	5.0	[Bagheri et al., 2016]
VASEME ^d	HPLC-FLD	0.9×10^{-3}	<10.1	3.0	-	[Asadi et al., 2015]
MIP-SPE ^e	FLD	2.0	<1.0	40.0-100.0	2.0	[Madrakian et al., 2013]
MSPE	HPLC-FLD	0.02	<5.2	1.0	3.0	Método propuesto

^a Microextracción en fase sólida utilizando fibras formadas por nanocompuestos magnéticos y estructuras metalorgánicas.

^b Microextracción en fase sólida mediante sorbentes empacados de doble capa de hidróxido.

^c Microextracción en fase sólida asistida por campo magnético.

^d Microextracción con tensoactivo mejorada mediante emulsificación asistida por vórtice.

^e Extracción en fase sólida mediante polímero molecularmente impreso.

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

- En el presente trabajo se sintetizaron tres sólidos magnéticos modificados con P4VP para la extracción y análisis de Npx.
- El sólido C con una composición 2.1:1 relación molar de magnetita:monómeros posee mayor afinidad para Npx (capacidad máxima 82.5 mmolKg^{-1}) con un mayor número de sitios activos de P4VP disponibles en comparación con los sólidos A y B.
- La adsorción de Npx depende del pH de la solución. Para que se favorezca el proceso de extracción el analito debe estar en su forma neutra, $\text{pH} < \text{pKa}$ (4.2).
- Se optimizaron las condiciones para el proceso de retención-elución de Npx en muestras de orina, la mejor respuesta se obtuvo con el sólido C, utilizando 10 mg de adsorbente, adicionando una concentración de NaCl 1.0 M, a un $\text{pH}=3.0$ y utilizando 3.0 mL de metanol como eluyente.
- La metodología propuesta para la determinación de Npx es robusta, simple y rápida, emplea bajos volúmenes de muestra y disolventes, además de ser una técnica prometedora para el análisis de Npx en muestras complejas.
- En función a sus características, esta técnica cuenta con ventajas como la obtención de límites de detección competitivos con los descritos en otras metodologías y la disminución de tiempos y costos durante el análisis.

- Como una etapa posterior a las pruebas realizadas se propone la evaluación de interferentes para determinar la selectividad del método en muestras de orina, por limitantes de tiempo no fue posible realizarlas.
- La metodología desarrollada en el presente trabajo podría emplearse para el análisis de otros AINEs en muestras de orina además del Npx y determinar si es una alternativa para su separación y cuantificación.
- Las partículas sintetizadas compuestas por magnetita y P4VP podrían ser empleadas en un sistema de liberación de fármacos controlada; una vez retenido el Npx sobre los sólidos magnéticos se podría evaluar su mecanismo de liberación en el interior de un organismo vivo con el objetivo de minimizar la ingesta diaria de este fármaco.



VI. BIBLIOGRAFÍA

VI. BIBLIOGRAFÍA

Abdel-Moety, E. M., Al-Obaid, A. M., Jado, A. I., y Lotfi, E. A. (1988). Coupling of TLC and UV-measurement for quantification of naproxen and its main metabolite in urine. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 13(4), 267-271

Afzali, M., Jahromi, Z., y Nekooie, R. (2019). Sensitive voltammetric method for the determination of naproxen at the surface of carbon nanofiber/gold/polyaniline nanocomposite modified carbon ionic liquid electrode. *Microchemical Journal*, 145, 373-379.

Aguilar-Arteaga, K., Rodriguez, J. A., Miranda, J. M., Medina, J., y Barrado, E. (2010). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion-HPLC. *Talanta*, 80(3), 1152-1155.

Aguilar-Arteaga, K., Rodriguez, J. A., y Barrado, E. (2010). Magnetic solids in analytical chemistry: a review. *Analytica Chimica Acta*, 674(2), 157-165.

Al-Khateeb, L. A., Hakami, W., y Salam, M. A. (2017). Removal of non-steroidal anti-inflammatory drugs from water using high surface area nanographene: kinetic and thermodynamic studies. *Journal of Molecular Liquids*, 241, 733-741.

Andrade-Eiroa, A., Canle, M., Leroy-Cancellieri, V., y Cerdà, V. (2016). Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *Trends in Analytical Chemistry*, 80, 641-654.

Anttila, M., Haataja, M., y Kasanen, A. (1980). Pharmacokinetics of naproxen in subjects with normal and impaired renal function. *European journal of clinical pharmacology*, 18(3), 263-268.

Aqda, T. G., Behkami, S., y Bagheri, H. (2018). Porous eco-friendly fibers for on-line micro solid-phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs from urine and plasma samples. *Journal of Chromatography A*, 1574, 18-26.

Aresta, A., Palmisano, F., y Zambonin, C. G. (2005). Determination of naproxen in human urine by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39(3-4), 643-647.

Asadi, M., Dadfarnia, S., Shabani, A. M. H., y Abbasi, B. (2016). Hollow fiber liquid phase microextraction method combined with high-performance liquid chromatography for simultaneous separation and determination of ultra-trace amounts of naproxen and nabumetone in cow milk water, and biological samples. *Food Analytical Methods*, 9(10), 2762-2772.

Asadi, M., Shabani, A. M. H., Dadfarnia, S., y Abbasi, B. (2015). Vortex-assisted surfactant-enhanced emulsification microextraction based on solidification of floating organic drop combined with high performance liquid chromatography for

determination of naproxen and nabumetone. *Journal of Chromatography A*, 1425, 17-24.

Asgharinezhad, A. A., y Ebrahimzadeh, H. (2016). Poly (2-aminobenzothiazole)-coated graphene oxide/magnetite nanoparticles composite as an efficient sorbent for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in urine sample. *Journal of Chromatography A*, 1435, 18-29.

Ayazi, Z., y Matin, A. A. (2016). Development of carbon nanotube-polyamide nanocomposite-based stir bar sorptive extraction coupled to HPLC-UV applying response surface methodology for the analysis of bisphenol a in aqueous samples. *Journal of Chromatographic Science*, 54(10), 1841-1850.

Bácsi, I., Viktória, B., Kókai, Z., Gonda, S., Novák, Z., Nagy, S. A., y Vasas, G. (2016). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on cyanobacteria and algae in laboratory strains and in natural algal assemblages. *Environmental Pollution*, 212, 508-518.

Bagheri, A. R., Ghaedi, M., Asfaram, A., Bazrafshan, A. A., y Jannesar, R. (2017). Comparative study on ultrasonic assisted adsorption of dyes from single system onto Fe₃O₄ magnetite nanoparticles loaded on activated carbon: experimental design methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 294-304.

Bagheri, A. R., Arabi, M., Ghaedi, M., Ostovan, A., Wang, X., Li, J., y Chen, L. (2019). Dummy molecularly imprinted polymers based on a green synthesis strategy for magnetic solid-phase extraction of acrylamide in food samples. *Talanta*, 195, 390-400.

Bagheri, H., Khanipour, P., y Asgari, S. (2016). Magnetic field assisted μ -solid phase extraction of anti-inflammatory and loop diuretic drugs by modified polybutylene terephthalate nanofibers. *Analytica Chimica acta*, 934, 88-97.

Bagheri, H., Roostaie, A., y Baktash, M. Y. (2014). A chitosan-polypyrrole magnetic nanocomposite as μ -sorbent for isolation of naproxen. *Analytica Chimica Acta*, 816, 1-7.

Batlouni, M. (2010). Antiinflamatorios No Esteroides: Efectos Cardiovasculares, Cerebrovasculares y Renales. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 538-546.

Beca, T., Hernández, G., y Bascones, A. (2007). AINEs como tratamiento coadyuvante de la enfermedad periodontal. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 19(2), 101-113.

Beitollahi, H., y Yoonesar, R. (2016). Fabrication of a novel electrochemical nanosensor for voltammetric determination of naproxen. *Analytical and Bioanalytical Electrochemistry*, 8, 29.

Bielsa-Fernández, M. V., Tamayo-de la Cuesta, J. L., Lizárraga-López, J., Remes-Troche, J. M., Carmona-Sánchez, R., Aldana-Ledesma, J. M., y Flores-Rendón, R. (2020). Consenso mexicano sobre diagnóstico, prevención y tratamiento de la gastropatía y enteropatía por antiinflamatorios no esteroideos. *Revista de Gastroenterología de México*, 85(2), 190-206.

Bindu, S., Mazumder, S., y Bandyopadhyay, U. (2020). Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: a current perspective. *Biochemical Pharmacology*, 180, 114147.

Corredor Acuña, J. y Echeverría Echeverría, F. (2012). Preparación y evaluación mediante oxidación cíclica a 700°C de recubrimientos electrodos ni-p y ni-p-magnetita. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, 31(1), 107-120.

Divins, M. J. (2014). Antiinflamatorios. *Farmacia Profesional*, 28(5), 19-22.

Dvorakova, M., y Landa, P. (2017). Anti-inflammatory activity of natural stilbenoids: A review. *Pharmacological Research*, 124, 126-145.

Eddaif, L., Shaban, A., y Telegdi, J. (2019). Sensitive detection of heavy metals ions based on the calixarene derivatives-modified piezoelectric resonators: A review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 99(9), 824-853.

Etminan, A., Uzunović, A., Topčagić, A., Žero, S., Dizdar, M., Klepo, L., y Tahirović, I. (2019). Quantification of Active Substances in Some Drugs Using by Derivative UV/Vis spectroscopy. In *International Conference on Medical and Biological Engineering*. Springer, Cham., 553-557.

Falany, C. N., Ström, P., y Swedmark, S. (2005). Sulphation of o-desmethylnaproxen and related compounds by human cytosolic sulfotransferases. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 60(6), 632-640.

Fan, W., Mao, X., He, M., Chen, B., y Hu, B. (2014). Development of novel sol-gel coatings by chemically bonded ionic liquids for stir bar sorptive extraction-application for the determination of NSAIDS in real samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(28), 7261-7273.

Food and Drug Administration. Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Recuperado de: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/q2-r1-validation-analytical-procedures-text-and-methodology> (acceso 15 Junio 2020).

García-Vázquez, A., Borrull, F., Calull, M., y Aguilar, C. (2016). Single-drop microextraction combined in-line with capillary electrophoresis for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in urine samples. *Electrophoresis*, 37(2), 274-281.

Ghorbani, M., Aghamohammadhasan, M., Shams, A., Tajfirooz, F., Pourhassan, R., Khosravi, S. R. B., y Jampour, A. (2019). Ultrasonic assisted magnetic dispersive solid phase microextraction for preconcentration of two nonsteroidal anti-inflammatory drugs in real water, biological and milk samples employing an experimental design. *Microchemical Journal*, 145, 1026-1035.

Ghauch, A., Tuqan, A. M., y Kibbi, N. (2015). Naproxen abatement by thermally activated persulfate in aqueous systems. *Chemical Engineering Journal*, 279, 861-873.

Gunter, B. R., Butler, K. A., Wallace, R. L., Smith, S. M., y Harirforoosh, S. (2017). Non-steroidal anti-inflammatory drug-induced cardiovascular adverse events: a meta-analysis. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 42(1), 27-38.

Guzmán-Hernández, D. S., Martínez-Cruz, M. A., Ramírez-Silva, M. T., Romero-Romo, M., Corona-Avendaño, S., Mendoza-Huizar, L. H., y Palomar-Pardavé, M. (2016). Simultaneous electrochemical quantification of naproxen, acetaminophen and diclofenac using a bare carbon paste electrode. *Analytical Methods*, 8(44), 7868-7872.

Hajmohammadi, M. R., y Hemmati, M. (2017). Vortex-assisted inverted dispersive liquid-liquid microextraction of naproxen from human plasma and its determination by high-performance liquid chromatography. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 36(3), 107-114.

Holzbecher, M., Ellenberger, H. A., Marsh, J. M., y Boudreau, S. (1979). An ultraviolet spectrophotometric procedure for the routine determination of naproxen. *Clinical biochemistry*, 12(2), 66-67.

Ibarra, I. S.; Rodriguez, J. A.; Miranda, J. M.; Vega, M., y Barrado, E. (2011). Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography. A*, 1218(16), 2196-2202.

Ibarra, I. S.; Miranda, J. M.; Rodriguez, J. A.; Nebot, C., y Cepeda, A. (2014). Magnetic solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of sulphonamides in milk samples. *Food Chemistry*, 157, 511-517.

Illés, E., y Tombácz, E. (2006). The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 295(1), 115-123.

Isidori, M., Lavorgna, M., Nardelli, A., Parrella, A., Previtera, L., y Rubino, M. (2005). Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products. *Science of the Total Environment*, 348(1-3), 93-101.

- Jahnavi, K., Reddy, P. P., Vasudha, B., y Narender, B. (2019). Non-steroidal anti-inflammatory drugs: an overview. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 9(1-s), 442-448.
- Joice, M., Vasileiadis, G. I., y Amanatullah, D. F. (2018). Non-steroidal anti-inflammatory drugs for heterotopic ossification prophylaxis after total hip arthroplasty: a systematic review and meta-analysis. *The Bone and Joint Journal*, 100(7), 915-922.
- Karadaş, C., Fisher, A., y Kara, D. (2020). The effects of gastric juice acidity on bioaccessibility of some elements in selected foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 90, 103485.
- Kempe, M., y Mosbach, K. (1994). Direct resolution of naproxen on a non-covalently molecularly imprinted chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 664(2), 276-279.
- Li, Y., Wang, Y., He, L., Meng, L., Lu, H., y Li, X. (2020). Preparation of poly (4-vinylpyridine)-functionalized magnetic Al-MOF for the removal of naproxen from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*, 383, 121144.
- Liu, X.-M., y Kim, J.-K. (2009). Solvothermal synthesis and magnetic properties of magnetite nanoplatelets. *Materials Letters*, 63(3-4), 428-430.
- Madrakian, T., Ahmadi, M., Afkhami, A., y Soleimani, M. (2013). Selective solid-phase extraction of naproxen drug from human urine samples using molecularly imprinted polymer-coated magnetic multi-walled carbon nanotubes prior to its spectrofluorometric determination. *Analyst*, 138(16), 4542-4549.
- Mafra, G., Spudeit, D., Brognoli, R., Merib, J., y Carasek, E. (2018). Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. *Journal of Chromatography B*, 1102, 159-166.
- Manzo, V., Honda, L., Navarro, O., Ascar, L., y Richter, P. (2014). Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from wastewater samples by rotating-disk sorptive extraction. *Talanta*, 128, 486-492.
- Martinez-Sena, T., Armenta, S., de la Guardia, M., y Esteve-Turrillas, F. A. (2016). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water and urine using selective molecular imprinted polymer extraction and liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 131, 48-53.
- Meucci, V., Minunni, M., Vanni, M., Sgorbini, M., Corazza, M., e Intorre, L. (2014). Selective and simultaneous determination of NSAIDs in equine plasma by HPLC with molecularly imprinted solid-phase extraction. *Bioanalysis*, 6(16), 2147-2158.

Meunier, L., y Larrey, D. (2018). Recent advances in hepatotoxicity of non steroidal anti-inflammatory drugs. *Annals of Hepatology*, 17(2), 187-191.

Mehanna, A. S. (2003). NSAIDs: Chemistry and Pharmacological Actions. *American Journal of Pharmaceutical Education*, 67(2), 63.

Milanetti, E., Carlucci, G., Olimpieri, P. P., Palumbo, P., Carlucci, M., y Ferrone, V. (2019). Correlation analysis based on the hydropathy properties of non-steroidal anti-inflammatory drugs in solid-phase extraction (SPE) and reversed-phase high performance liquid chromatography (HPLC) with photodiode array detection and their applications to biological samples. *Journal of Chromatography A*, 1605, 360351.

Mirzajani, R., Kardani, F., y Ramezani, Z. (2019). Preparation and characterization of magnetic metal-organic framework nanocomposite as solid-phase microextraction fibers coupled with high-performance liquid chromatography for determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in biological fluids and tablet formulation samples. *Microchemical Journal*, 144, 270-284.

Moliner-Martínez, Y., Ribera, A., Coronado, E., y Campíns-Falcó, P. (2011). Preconcentration of emerging contaminants in environmental water samples by using silica supported Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for improving mass detection in capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2276-2283.

Montemayor, S., Torres, J. y García Cerda, L. (2004). Uso de una resina polimérica en la formación de nanopartículas magnéticas dentro de una matriz de sílice. *Superficies y Vacío*, 21-24.

Nagai, K., Shibata, T., Shinkura, S., y Ohnishi, A. (2018). Poly (4-vinylpyridine) based novel stationary phase investigated under supercritical fluid chromatography conditions. *Journal of Chromatography A*, 1572, 119-127.

Pantůčková, P., y Kubáň, P. (2017). In-line coupling of supported liquid membrane extraction to capillary electrophoresis for simultaneous analysis of basic and acidic drugs in urine. *Journal of Chromatography A*, 1519, 137-144.

Peña-Álvarez, A., y Castillo-Alanís, A. (2015). Identificación y cuantificación de contaminantes emergentes en aguas residuales por microextracción en fase sólida-cromatografía de gases-espectrometría de masas (MEFS-CG-EM). *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 18(1), 29-42.

Persona, K., Madej, K., Knihnicki, P., y Piekoszewski, W. (2015). Analytical methodologies for the determination of benzodiazepines in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, 239-264.

Pountos, I., Georgouli, T., Bird, H., y Giannoudis, P. V. (2011). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 3, 19.

Rafighi, P.; Yaftian, M. R., y Haghghi, B. (2018). Magnetic nanofibrous polyaniline nanocomposite for solid-phase extraction of naproxen from biological samples prior to its spectrofluorimetric determination. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 15(6), 1209-1221.

Rocha-Alcaraz, M. F., Torres-Sánchez, E. D., Torres-Jasso, J. H., Yáñez-González, A. Y., Reyna-Villela, M. Z., Rojas-Bravo, D., y Salazar-Flores, J. (2019). In vitro dissolution characteristics of patent, generic and similar brands of naproxen in various dissolution media. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 18(6), 1155-1160.

Rodríguez-Anaya, A., Octavio-Aguilar, P., y Gaytán-Oyarzún, J. C. (2015). Consumo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos en Pachuca, Hidalgo. *Salud Pública de México*, 57, 365-366.

Rodriguez, J. A., Espinosa, J., Aguilar-Arteaga, K., Ibarra, I. S., y Miranda, J. M. (2010). Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis. *Microchimica Acta*, 171(3-4), 407-413.

Román-Hidalgo, C., Dvořák, M., Kubáň, P., Martín-Valero, M. J., y Bello-López, M. Á. (2020). Direct capillary electrophoresis analysis of basic and acidic drugs from microliter volume of human body fluids after liquid-phase microextraction through nano-fibrous membrane. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 412(1), 181-191.

Roy, R.K. (2001). *Desing of experiments using the Taguchi approach*. Cánada: John Wiley and Sons.

Rutnakornpituk, B., Wichai, U., Vilaivan, T., y Rutnakornpituk, M. (2011). Surface-initiated atom transfer radical polymerization of poly (4-vinylpyridine) from magnetite nanoparticle. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(12), 6847-6857.

Safarikova, M. y Safarik, I. (1999). Magnetic solid-phase extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194(1-3), 108-112.

Sahiner, N. e Ilgin, P. (2010). Multiresponsive polymeric particles with tunable morphology and properties based on acrylonitrile (AN) and 4-vinylpyridine (4-VP). *Polymer*, 51, 3156-3163.

Sarafraz-Yazdi, A., Amiri, A., Rounaghi, G., y Eshtiagh-Hosseini, H. (2012). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in water samples by solid-phase microextraction based sol-gel technique using poly (ethylene glycol) grafted multi-walled carbon nanotubes coated fiber. *Analytica Chimica Acta*, 720, 134-141.

Setién, J. M. P. (2007). Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). ¿Dónde estamos y hacia donde nos dirigimos? (Primera parte). *Científica dental: Revista Científica de Formación Continuada*, 4(3), 29-38.

Seidi, S., y Sanàti, S. E. (2019). Nickel-iron layered double hydroxide nanostructures for micro solid phase extraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, followed by quantitation by HPLC-UV. *Microchimica Acta*, 186(5), 1-7.

Shamsayei, M., Yamini, Y., Asiabi, H., y Safari, M. (2018). On-line packed magnetic in-tube solid phase microextraction of acidic drugs such as naproxen and indomethacin by using Fe₃O₄@SiO₂@layered double hydroxide nanoparticles with high anion exchange capacity. *Microchimica Acta*, 185(3), 1-10.

Siemens, J., Huschek, G., Siebe, C., y Kaupenjohann, M. (2008). Concentrations and mobility of human pharmaceuticals in the world's largest wastewater irrigation system, Mexico City-Mezquital Valley. *Water Research*, 42(8-9), 2124-2134.

Sultan, M., Stecher, G., Stoggl, W. M., Bakry, R., Zaborski, P., Huck, C. W., y Bonn, G. K. (2005). Sample pretreatment and determination of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical formulations and biological samples (blood, plasma, erythrocytes) by HPLC-UV-MS and μ -HPLC. *Current Medicinal Chemistry*, 12(5), 573-588.

Sun, Z. X.; Su, F. W.; Forsling, W., y Samskog, P. O. (1998). Surface characteristics of magnetite in aqueous suspension. *Journal of Colloid and Interface Science*, 197(1), 151-159

Wojcieszynska, D., y Guzik, U. (2020). Naproxen in the environment: its occurrence, toxicity to nontarget organisms and biodegradation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1-9.

Varcárcel Cases, M. y Gómez Hens, A. (1988). Técnicas analíticas de separación. España: Reverté.

Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., y Rangaswami, J. (2018). A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging and Disease*, 9(1), 143.

Zayed, M. A., Hawash, M. F., El-Desawy, M., y El-Gizouli, A. M. (2017). Investigation of naproxen drug using mass spectrometry, thermal analyses and semi-empirical molecular orbital calculation. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(3), 351-359.