



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

**TESIS DE DOCTOR EN QUÍMICA**

---

Nuevas estrategias para la simplificación y  
miniaturización de sistemas analíticos. Empleo de  
nanoestructuras de carbono

**Valeria Springer**

**BAHIA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2013**

## Resumen

En el presente trabajo de Tesis se desarrollan, evalúan y proponen métodos analíticos simples, con el mayor grado de simplificación y miniaturización posible, para la determinación de residuos de antibióticos y pesticidas en muestras de alimentos y ambientales.

El interés en este tipo de analitos radica en que en los últimos años se ha incrementado el empleo de fármacos, tanto en medicina humana como veterinaria, y la aplicación de pesticidas en prácticas agrícolas. Esto ha generado cierta preocupación puesto que sus residuos pueden ocasionar daños a la salud humana. Además, su uso y control está regulado por organismos nacionales e internacionales.

Los métodos propuestos se basan en el uso de la técnica de electroforesis capilar (CE), evaluando además, diferentes estrategias para el pretratamiento de las muestras analizadas; en lo que respecta al “clean up” de las mismas y a la preconcentración de los analitos a determinar.

Se ha estudiado el empleo de nanotubos de carbono tanto en el paso de preconcentración (como material adsorbente) y en la separación electroforética (fase pseudoestacionaria).

Así, se han propuesto los siguientes métodos:

- ✓ Separación y determinación de sulfonilureas en muestras de agua de distinta procedencia, que incluye un paso de preconcentración en continuo, fuera de línea, utilizando una minicolumna empaquetada con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs).
- ✓ Análisis de muestras de leche bovina, determinando antibióticos de dos familias diferentes, empleando como solución de separación una fase pseudoestacionaria que contiene nanotubos de carbono para mejorar la eficiencia de separación. Este método incluye una preconcentración en línea (“stacking”) combinada con una fuera de línea, que también se realiza en un sistema de flujo continuo.
- ✓ Se desarrolla un método empleando líquido iónico como medio de separación y nanotubos de carbono de pared simple (SWCNTs) como fase pseudoestacionaria, para mejorar la resolución en separaciones electroforéticas. Este nuevo método se emplea para la determinación de sulfonilureas en muestras de granos.

- ✓ Se establece un método electroforético muy sencillo para la determinación de FQs en leche que incluye un paso de preconcentración, empleando un microdispositivo con MWCNTs.
- ✓ Con el objetivo de mejorar la resolución electroforética, se evaluó el uso de capilares con recubrimientos poliméricos para la determinación anterior. Se propone el acoplamiento de esta separación con la espectrometría de masas, lo cual se realiza aplicando MALDI-TOF-MS para hacer el análisis confirmatorio.
- ✓ Se implementa el acoplamiento de este último método de electroforesis capilar con espectrometría de masa, aplicando la técnica MALDI para llevar a cabo el análisis confirmatorio.

En todos los casos, se han desarrollado nuevas estrategias para llevar a cabo análisis simples y rápidos, con el mayor grado de miniaturización posible. Los resultados obtenidos han sido muy satisfactorios.

**Palabras claves:** Electroforesis capilar, Nanotubos de carbono, Técnicas de preconcentración, Antibióticos, Herbicidas.

## Abstract

In this thesis, several straightforward analytical methods are developed, evaluated and proposed with the major grade of simplification and miniaturization as possible for determining antibiotics and pesticides residues in food and environmental samples.

During the last years, the increased use of pharmaceutical compounds in human and veterinary medicine and the massive application of pesticides in agricultural practices have generated special attention due to their residues can be harmful for the human health. Moreover, the use of these analytes is regulated by national and international organizations.

The proposed methods are based on capillary electrophoresis (CE). Different strategies are developed to perform the pretreatment of analyzed samples, including both, the clean-up of samples and analytes preconcentration. Moreover, carbon nanotubes are included as sorbent material for the preconcentration step and as pseudostationary phases in the CE analysis.

Thus, the following methods have been proposed:

- ✓ Separation and determination of sulfonylurea herbicides in water samples, including a continuous preconcentration step in off-line mode. A minicolumn packed with multiwall carbon nanotubes (MWCNTs) was used.
- ✓ Determination of antibiotics (belonging to different families) in bovine milk samples. Carbon nanotubes were employed as pseudostationary phases in the electrophoretic system with the aim to improve the separation. This method includes an 'in-line' preconcentration step (stacking) and an 'off-line' preconcentration step using a continuous flow system.
- ✓ A CE method with ionic liquid and single wall carbon nanotubes (SWCNTs) was developed. SWCNTs were proposed as pseudostationary phases in order to improve the electrophoretic resolution. This novel method was used for determination of sulfonylureas in grain samples.
- ✓ A simple electrophoretic method to determine FQs in milk samples is developed. A  $\mu$ -SPE step employing MWCNTs is included for analytes preconcentration.

- ✓ With the aim to improve the electrophoretic resolution and a further MALDI-TOF-MS analysis of analytes, the use of polymer-coated capillaries was considered for fluoroquinolones determination in milk samples.
- ✓ Besides, an off-line coupling between CE and MS was included by using the ionization technique MALDI with the aim to perform the accurate identification of analytes after CE-UV determination.

In all experiences, new strategies for simple and fast analyses have been proposed, aiming to develop miniaturized methodologies with satisfactory analytical performance.

**Keywords:** Capillary electrophoresis, Carbon nanotubes, Preconcentration techniques, Antibiotics, Herbicides.

## Referencias bibliográficas

1. M. Valcárcel, M.S. Cárdenas, *Automatización y miniaturización en Química Analítica*. Springer-Verlag, S.A., Barcelona, 2000.
2. B.M. Simonet, M. Valcárcel. *Microchim. Acta* 153, 2006, 1-5.
3. M. Valcárcel, B. Lendl. *Trends Anal. Chem.* 8, 2004, 527-534.
4. M. Valcárcel. *Principles of Analytical Chemistry*. Springer-Verlag, Heidelberg, 2000.
5. A. Rios, A. Escarpa, B. Simonet. *Miniaturization of Analytical Systems: Principles, Designs and Applications*. John Wiley & Sons, Ltd. 2009. ISBN: 978-0-470-06110-7
6. M. Valcárcel, S. Cárdenas. *Trends Anal. Chem.* 24, 2005, 67-74.
7. "Arne Tiselius Biography".Nobelprize.org.  
[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1948](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1948).
8. C. García-Ruiz, G. Álvarez-Llamas, A. Puerta, E. Blanco, A. Sanz-Medel, M. L. Marina. *Anal. Chim. Acta* 543 (1-2), 2005, 77-83.
9. Y. Sun, L. Liang, X. Zhao, L. Yu, J. Zhang, G. Shi, T. Zhou. *Water Res.* 43, 2009, 41-46.
10. I. S. L. Lee, M. C. Boyce, M. C. Breadmore. *Food Chem.* 133, 2012, 205-211.
11. R. Dadoo, A. O. Seto, L. A. Colón, R. N. Zare. *Anal. Chem.* 66, 1994, 303-306.
12. S. C. Beale, S. J. Sudmeier. *Anal. Chem.* 67, 1995, 3367-3371.
13. C. Horstkotter, S. Kober, H. Spahn-Langguth, E. Mutschler, G. Blaschke. *J. Chromatogr. B* 769, 2002, 107-117.
14. A. Brocke, G. Nicholson, E. Bayer. *Electrophoresis* 22, 2001, 1251-1266.
15. J. A. Olivares, N. T. Nguyen, C. R. Yonker, R. D. Smith. *Anal. Chem.* 59, 1987, 1230-1232.
16. A. Amini, S. J. Dormady, L. Riggs, F. E. Regnier, *J. Chromatogr. A* 894, 2000, 345-355.
17. L. Shastri, S. K. Kailasa, H.-F. Wu. *Talanta* 81, 2010, 1176-1182.
18. H.-Y. Wang, X. Chu, Z.-X. Zhao, X.-S. He, Y.-L. Guo. *J. Chromatogr. B* 879, 2011, 1166-1179.
19. J. Jacksén, T. Redeby, Å. Emmer. *J. Sep. Sci.* 29, 2006, 288-295.
20. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando. *Anal. Chem.* 56, 1984, 111-113.
21. S. Terabe, K. Otsuka, T. Ando. *Anal. Chem.* 57, 1985, 834-841.
22. S. Hjertén, M. Zhu. *J. Chromatogr. A* 346, 1985, 265-270.
23. J. H. Knox, I. H. Grant. *Chromatographia* 24, 1978, 135-143.
24. A. Guttman, A. S. Cohen, D. N. Heiger, B. L. Karger. *Anal. Chem.* 63, 1990, 137-141.
25. S. Iijima. *Nature* 354, 1991, 56-58.
26. Peter J. Harris, *Carbon nanotube science*, Cambridge University Press, United Kingdom, 2009.

27. L. S. Ying, M. A. M. Salleh, H. M. Yusoff, S. B. A. Rashid, J. A. Razak. *J. Ind. Eng. Chem.* 17, 2011, 367-376.
28. S. Iijima. *Nature* 356, 1991, 56-58.
29. S. Iijima, T. Ichihashi. *Nature* 363, 1993, 603-605.
30. D. S. Bethune, C. H. Kiang, M. S. de Vries, G. Gorman, R. Savoy, J. Vazquez, R. Beyers. *Nature* 363, 1993, 605-607.
31. A. Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y.H. Lee, S.G. Kim, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, G. E. Scuseria, D. Tomanek, J. E. Fischer, R. E. Smalley. *Science* 273, 1996, 483-487.
32. A. G. Rinzler, J. H. Hafner, P. Nikolaev, L. Lou, S. G. Kim, D. Tomanek, P. Nordlander, D. T. Colbert, R. E. Smalley. *Science* 269, 1995, 1550-1553.
33. A. C. Dillon, K. M. Jones, T. A. Bekkendahl, C. H. Kiang, D. S. Bethune, M. J. Heben. *Nature* 386, 1997, 377-380.
34. M. A. Salam, M. S.I. Makki, M. Y. A. Abdelaal. *J. Alloy Compd.* 509, 2011, 2582-2587.
35. S. A. Kosa, G. Al-Zhrani, M. A. Salam. *Chem. Eng. J.* 181-182, 2012, 159-168.
36. L. Zhang, X. Song, X. Liu, L. Yang, F. Pan, J. Lv. *Chem. Eng. J.* 178, 2011, 26-33.
37. R. J. Chen, Y. Zhang, D. Wang, H. Dai. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 2001, 3838-3839.
38. T. Hertel, A. Hagen, V. Talalaev, K. Arnold, F. Hennrich, M. Kappes, S. Rosenthal, J. Mc. Bride, H. Ulbricht, E. Flahaut. *Nano Lett.* 5, 2005, 511-514.
39. M. F. Islam, E. Rojas, D. M. Bergey, A. T. Johnson, A. G. Yodh. *Nano Lett.* 3, 2003, 269-273.
40. M. Valcárcel, S. Cárdenas, B. M. Simonet, Y. Moliner-Martínez, R. Lucena. *Trends Anal. Chem.* 27, 2008, 34-43.
41. J. Cao, P. Li, L. Yi. *J. Chromatogr. A* 1218, 2011, 9428-9434.
42. L. M. Ravelo-Pérez, A. V. Herrera-Herrera, J. Hernández-Borges, M. A. Rodríguez-Delgado. *J. Chromatogr. A* 1217, 2010, 2618-2641.
43. A. V. Herrera-Herrera, M. A. Gonzalez-Curbelo, J. Hernandez-Borges, M. A. Rodriguez-Delgado. *Anal. Chim. Acta* 734, 2012, 1-30.
44. D. Martínez, M. J. Cugat, F. Borrull, M. Calull. *J. Chromatogr. A* 902, 2000, 65-89.
45. L. Schweitz, M. Petersson, T. Johansson, S. Nilsson. *J. Chromatogr. A* 892, 2000, 203-217.
46. P. Britz-McKibbin, D. Y. Chen. *Anal. Chem.* 72, 2000, 1242-1252.
47. J. P. Quirino, S. Terabe. *J. Chromatogr. A* 798, 1998, 251-257.
48. J. P. Quirino, S. Terabe. *Anal. Chem.* 70, 1998, 1893-1901.
49. C. Sánchez de Rivas. *Revista Química Viva* nº 2, año 5, 2006. ISSN 1666-7948.
50. P. Ball. *J. Antimicrob. Chemother.* 46, 2000, 17-24.
51. M. Martinez, P. McDermott, R. Walker. *Vet. J.* 172, 2006, 10-28.
52. J. Sousa, G. Alves, A. Fortuna, A. Falcao. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 2012, 93-129.
53. J. A. Hernández – Arteseros, J. Barbosa, R. Compañó, M. D. Prat. *J. Chromatogr. A* 945, 2002, 1-24.

54. P. M. Vancutsem, J. G. Babish, W. S. Schwark. *Cornell Vet.* 80, 1990, 173-186.
55. H. Sumano-López, L. Gutiérrez-Olvera. *Vet. Méx.* 31, 2000, 137-145.
56. S. Cruchaga, A. Echeita, A. Aladueña, J. García-Peña, N. Frias, M. A. Usera. *Antimicrob. Chemother.* 47, 2001, 315-321.
57. H.C. Wegener. *International Conference of drug regulatory Authorities (ICDRA)*. WHO Collaborating Center, Danish Veterinary Institute, Denmark. June 2002.
58. M. A. Himelfarb, A. M. Lorenzutti, V. Martínez-Espeche, N. J. Litterio, J. C. Boggio. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias-RCCV* 1, 2007, 108-112. ISSN: 1988-2688.
59. R. Nicolish, E. Werneck-Barroso, M. Sípoli-Marques. *Anal. Chim. Acta* 565, 2006, 97-102.
60. S. Hillaert, W. Van den Bossche. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 2004, 437-440.
61. *Antibiotic Growth-Promoters in Food Animals*. <http://www.fao.org>.
62. *Uso de antimicrobianos en animales de consumo*. FAO 2004. ISSN 1014-1200.
63. *European Union (EU)*. Reglamento (CEE) No 2377/90, Junio 1990.
64. R. Injac, N. Kocevar, S. Kreft. *Anal. Chim. Acta* 594, 2007, 119-127.
65. P. Olszowy, M. Szultka, J. Nowaczyk, B. Buszewski. *J. Chromatogr. B* 879, 2011, 2542-2548.
66. N. Wangfuengkanagul, W. Siangproh, O. Chailapakul. *Talanta* 64, 2004, 1183-1188.
67. *US – EPA United State Environmental Protection Agency*. [www.epa.gov](http://www.epa.gov).
68. *Food and Agriculture Organization - FAO*, International code of conduct on the distribution and use of pesticides. Organización de Naciones Unidas (2002) Roma, Italia.
69. *International Organization for Standardization*. <http://www.iso.org>
70. *Manual para el Registro de Plaguicidas en Centroamérica*. FAO, 2011. ISBN 978-92-5-306247-8.
71. *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and Guidelines to classification*. World Health Organization, 2005. ISBN 92 4 154663 8.
72. *Ridding the world of pops: A guide to the Stockholm convention on persistent organic pollutants*. United Nations Environment Programme. Stockholm, Sweden, 2001. <http://www.pops.int>
73. SENASA Servicio Nacional de Calidad y Seguridad Agroalimentaria. <http://www.senasa.gov.ar>
74. *Seminario de Actualización Técnica: Manejo de Malezas*. INIA La Estanzuela y SRRN. Young, Río Negro, Uruguay, 2007. ISBN 978-9974-38-232-9.
75. W. Zheng, S. R. Yates, S. K. Paperniek. *J. Agric. Food Chem.* 56, 2008, 7367-7372.
76. J. Fenoll, P. Hellín, P. Sabater, P. Flores, S. Navarro. *Talanta* 101, 2012, 273-282.
77. M. Dribek, I. Le Potier, A. Rodrigues, A. Pallandre, E. Fattal, M. Taverna. *Electrophoresis* 28, 2007, 2191-2200.
78. *Official Journal of European Communities*. EU Council Directive 98/83/EC.



79. *Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable*. Ley 24051. Decreto 831. Anexo II, Tabla I. Niveles guía de calidad de agua para fuentes de agua de bebida.
80. C. R. Powley, P. A. de Bernard. *J. Agric. Food Chem.* 46, 1998, 514-519.
81. Q. Zhou, W. Wang, J. Xiao. *Anal. Chim. Acta* 559, 2006, 200-206.
82. E. T. Furlong, M. R. Burkhardt, P. M. Gotes, S. L. Werner, W. A. Battaglin. *Sci. Total Environ.* 248, 2000, 135-146.
83. Z. L. Chem, R. S. Kookana, R. Naidu. *Chromatographia* 52, 2000, 142-146.
84. S. L. Sunderland, P. W. Sanrelmann, T. A. Baughmann. *Weed Sci.* 39, 1991, 296-298.
85. Q. Zhou, J. Xiao, W. Wang. *Anal. Sci.* 23, 2007, 189-192.
86. C. Carrillo-Carrión, R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel. *Analyst* 132, 2007, 551-559.
87. J. C. Miller, J. N. Miller. *Estadística para química analítica*. Segunda edición. Addison-Wesley iberoamericana, Barcelona, 1993.
88. C. Stathakis, E. A. Arriaga, N. J. Dovichi. *J. Chromatogr. A* 817, 1998, 233-238.
89. C. Nilson, S. Nilson. *Electrophoresis* 27, 2006, 76-83.
90. Y. Moliner-Martínez, S. Cárdenas, B. Simonet, M. Valcárcel. *Electrophoresis* 30, 2009, 169-175.
91. B. Suárez, B. Simonet, S. Cárdenas, M. Valcárcel. *Electrophoresis* 28, 2007, 1714-1722.
92. B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy. *J. Chromatogr. A* 1161, 2007, 132-145.
93. S. L. Jr. Simpson, J.P. Quirino, S. Terabe. *J. Chromatogr. A* 1184, 2008, 504-541.
94. Y. Moliner-Martínez, S. Cárdenas, M. Valcárcel. *J. Chromatogr. A* 1167, 2007, 210-216.
95. J. P. Quirino, S. Terabe. *J. Chromatogr. A* 791, 1997, 225 - 267.
96. European Union (EU) - Commission Regulation, 37/2010, *Off. J. Eur. Commun.* L15, 2010, 1-72.
97. P. Su, N. Liu, M. Zhu, B. Ning, M. Liu, Z. Yang, X. Pan, Z. Gao. *Talanta* 85, 2011, 1160 - 1165.
98. L. Vera-Candioti, A. C. Olivieri, H. C. Goicoechea. *Talanta* 82, 2010, 213-221.
99. Y. Li, Z. Zhang, J. Li, H. Li, Y. Chen, Z. Liu. *Talanta* 84, 2011, 690 - 695.
100. M. C. Vargas Mamani, F.G. Reyes-Reyes, S. Rath. *Food Chem.* 117, 2009, 545 - 552.
101. S. M. Santos, M. Henriques, A. C. Duarte, V. I. Esteves. *Talanta* 71, 2007, 731-737.
102. C. Ho, D. W. M. Sin, H. P. O. Tang, L. P. K. Chung, S. M. P. Siu. *J. Chromatogr. A* 1061, 2004, 123 - 131.
103. S. Carda-Broch, A. Berthod, D.W. Armstrong. *Anal Bioanal. Chem.* 375, 2003, 191-199.
104. J. L. Anderson, D. W. Armstrong, G. T. Wei. *Anal. Chem.* 78, 2006, 2892-2902.
105. D. R. MacFarlane, M. Forsyth, P. C. Howlett, J. M. Pringle, J. Sun, G. Annat, W. Neil, E. I. Izgorodina. *Acc. Chem. Res.* 40, 2007, 1165-1173.
106. Y. Xu, J. Li, E. Wang. *J. Chromatogr. A* 1207, 2008, 175-180.

107. M. Borissova, M. Vaheer, M. Koel, M. Kaljurand. *J. Chromatogr. A* 1160, 2007, 320 – 325.
108. C. Nilsson, B. Brinbaum, S. Nilsson. *Electrophoresis* 32, 2011, 1141-1147.
109. S. Kang, N. Chang, Y. Zhao, C. Pan. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2011, 9776–9781.
110. V. Springer, A.G. Lista. *Talanta* 83, 2010, 126-129.
111. S. Qi, S. Cui, X. Chen, Z. Hu. *J. Chromatogr. A* 1059, 2004, 191–198.
112. S. Qi, Y. Li, Y. Deng, Y. Cheng, X. Chen, Z. Hu. *J. Chromatogr. A* 1109, 2006, 300-306.
113. Y. Guibiao, Z. Wei, C. Xin, P. Canping, J. Shuren. *Chin. J. Anal. Chem.* 34(9), 2006, 1207–1212.
114. European Union legislation. Regulation (EC). *Maximum pesticide limits for food products for human consumption and animal feedingstuffs*. No 396/2005.
115. European Commission DG-SANCO: *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residue Analysis in Food and Feed*. Document No. SANCO/10684/2009, 1 January 2010.
116. A. Brown. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 19, 1996, 1-14.
117. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Code of Federal Regulation. *Food and Drugs* 6, Part 556, 2006.
118. C.-E. Lin, Y. -Jr Deng, W.-S. Liao, S.-W. Sun, W.-Y. Lin, C.-C. Chen. *J. Chromatogr. A* 1051, 2004, 283-290.
119. H. H. See, M. Marsin Sanagi, W. A. W. Ibrahim, A. A. Naim. *J. Chromatogr. A* 1217, 2010, 1767-1772.
120. Y. Cai, G. Jiang, J. Liu, Q. Zhou. *Anal. Chem.* 75, 2003, 2517-2521.
121. C. Fierens, S. Hillaert, W. Van den Bossche. *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 22, 2000, 763-772.
122. M. Ferdig, A. Kaleta, T. D. Thanh Vo, W. Buchberger. *J. Chromatogr. A* 1047, 2004, 305-311.
123. Q. Xia, Y. Yang, M. Liu. *Spectrochim. Acta A, Mol. Biomol. Spectrosc.* 96, 2012, 358-364.
124. M.Y. Piñero, R. Garrido-Delgado, R. Bauza, L. Arce, M. Valcárcel. *Electrophoresis* 33, 2012, 2978-2986.
125. I. Maia Toaldo, G. Zandonadi Gamba, L. Almeida Picinin, G. Rubensam, R. Hoff, M. Bordignon-Luiz. *Talanta* 99, 2012, 616-624.
126. R. Gottardo, A. Polettini, D. Sorio, J.P. Pascali, F. Bortolotti, E. Liotta, F. Tagliaro. *Electrophoresis* 29, 2008, 4078-4087.
127. R. Kaufmann. *J. Biotechnol.* 41, 1995, 155-175.
128. L. Sleno, D. A. Volmer. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 2005, 1928-1936.
129. C. P. Mullens, S. R. Anugu, W. Gorski, S.B.H. Bach. *Int. J. Mass Spectrom.* 308, 2011, 311-315.
130. A. P. Kafka, T. Kleffmann, T. Rades, A. McDowell. *Int. J. Pharm.* 417, 2011, 70-82.

131. C. W. Huck, R. Bakry, L. A. Huber, G. K. Bonn. *Electrophoresis* 27, 2006, 2063-2074.
132. Q. Liu, F. Lin, R. A. Hartwick. *J. Chromatogr. Sci.* 36, 1997, 126-130.
133. E. Cordova, J. Gao, G. M. Whitesides. *Anal. Chem.* 69 (1997) 1370-1379.
134. K. Takh-Novik, M. Józán, I. Hermeecz, G. Szász. *Int. J. Pharm.* 79, 1992, 89-96.