



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Química
Área de Química Analítica

Trabajo fin de Máster

DETERMINACIÓN ELECTROQUÍMICA DE SULFAMETOXAZOL

Autora: Ángela Iglesias García

Tutoras: M. Asunción Alonso Lomillo
Olga Domínguez Renedo

Junio de 2015

AUTORIZACIÓN DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO FIN DE
MÁSTER

CURSO: 2014/15

Dña. M. Asunción Alonso Lomillo y Dña. Olga Domínguez Renedo, directoras del trabajo fin de máster de Dña. Ángela Iglesias García, que lleva por título “Determinación electroquímica de sulfametoaxol”

Autorizan

No autorizan

A defender públicamente el trabajo mencionado.

Burgos, 17 de junio de 2015

Dña. M. Asunción Alonso Lomillo

Dña. M. Olga Domínguez Renedo

1.- Resumen	1
2.- Estado del arte.....	1
2.1.- Antibióticos	1
2.2.- Sulfonamidas	2
2.2.1.- Sulfametoxazol	2
2.3.- Efectos derivados del uso de los antibióticos.....	3
2.3.1.- Efectos en el medioambiente	3
2.3.2.- Toxicidad y resistencia antibiótica.....	4
2.4.- Monitorización de SMX en acuicultura	5
2.5.- Determinaciones analíticas de SMX	5
2.5.1.- Determinaciones electroquímicas	6
3.- Objetivo	6
4.- Experimental.....	8
4.1.-Reactivos	8
4.2.-Equipo	8
4.3.- Procedimientos de medida.....	8
4.3.1.- Medidas en un sistema de flujo continuo.....	8
4.3.2.- Medidas en gota	10
5.- Análisis y discusión de resultados	10
5.1.- Determinación de ferricianuro en el sistema de flujo continuo.....	10
5.2.- Determinación de SMX en el sistema de flujo continuo.....	11
5.3.- Determinación amperométrica de SMX en gota	13
5.4.- Determinación voltamperométrica de SMX en gota.....	14
5.4.1.- Precisión del método.....	15
5.4.2.- Capacidad de detección.....	16
5.4.3.- Veracidad del método: Determinación de SMX en muestras de agua de río y de mar	19
6.- Conclusiones.....	20
7.- Referencias.....	21

1.- RESUMEN

En la última década se ha puesto de manifiesto la necesidad de utilizar sensores desechables para la ejecución de análisis sencillos, rápidos y económicos para fines clínicos, medioambientales e industriales. En este sentido, los electrodos serigrafiados han demostrado ser dispositivos baratos y reproducibles para la determinación electroquímica de diversos analitos [1-4], como por ejemplo residuos químicos de relevancia toxicológica para la salud, incluso a nivel de trazas, lo que ha proporcionado un apoyo esencial para el análisis medioambiental y la seguridad alimentaria.

En este trabajo se propone la puesta a punto de métodos electroquímicos sencillos para la detección de sulfametoxazol (SMX), compuesto antibacteriano de tipo sulfonamida que se utiliza ampliamente en medicina y veterinaria. Su uso continuado puede producir resistencia antibiótica, generando efectos adversos tanto en el medioambiente como en la salud humana.

Por tanto, la monitorización continua de este antibiótico en distintos tipos de aguas se presenta como un atractivo procedimiento para controlar su toxicidad. En este trabajo se han desarrollado diferentes métodos electroquímicos de análisis de SMX utilizando electrodos serigrafiados, basados inicialmente en un sistema de flujo continuo. Además, teniendo en cuenta la geometría y el diseño de estos dispositivos, se propuso la realización de medidas electroquímicas en gota, lo que minimiza el volumen de los reactivos y las muestras utilizados y reduce el tiempo de medida.

2.- ESTADO DEL ARTE

2.1.- ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos son sustancias que, incluso en pequeñas concentraciones, inhiben el crecimiento y la multiplicación de bacterias y de hongos. En la actualidad no podría pensarse en el tratamiento y la prevención de numerosas enfermedades (profilaxis) sin ellos.

Las sustancias que solo influyen sobre la multiplicación de las bacterias tienen *acción bacteriostática*; si las células objetivo mueren se habla de una *acción bactericida*. El mecanismo de acción de los antibióticos se basa en el bloqueo del crecimiento de microorganismos sensibles inhibiendo la acción de una molécula, un enzima o un ácido nucleico, esencial para la multiplicación celular. A nivel molecular, implica que la molécula antibiótica puede unirse a un sitio específico de la macromolécula objetivo, formando un complejo molecular que ya no es capaz de cumplir su función original.

Algunos antibióticos son antimetabolitos, ya que actúan como inhibidores competitivos. Son estructuralmente similares a los metabolitos normales, como los aminoácidos o coenzimas, y se unen al enzima para el cual el metabolito es sustrato o cofactor, inactivándolo de ese modo [5].

La mayor parte de los antibióticos son producidos por microorganismos, sobre todo por bacterias del género *Streptomyces* y ciertos hongos, aunque también existen agentes bacterianos sintéticos, como las sulfonamidas (SAs) [6].

2.2.- SULFONAMIDAS

Las SAs, 4-amino-N-2-pirimidinilbencenosulfonamidas, son fármacos sintéticos antibacterianos de baja potencia utilizados en medicina y veterinaria (Figura 1) [7].

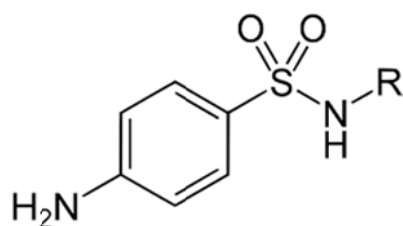


Figura 1.- Estructura química de SAs con propiedades bacteriostáticas.

Las SAs son moléculas polares con propiedades anfóteras. Su nitrógeno amino se protona a pH 2-3, mientras que el nitrógeno amido se desprotona entre pH 4.5 y 11. La mayoría son solubles en agua y se absorben ligeramente en el suelo, por lo que se extienden fácilmente en el ambiente. Son sustancias estables con una vida media de degradación superior a 1 año. Además, pueden sufrir hidrólisis alcalina, reacciones de acoplamiento con fenoles y aminas y reaccionar con el radical hidroxilo [8].

2.2.1.- Sulfametoxazol

El SMX, 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazol)benzenosulfonamida, es un compuesto derivado de la familia de las SAs (Figura 2).

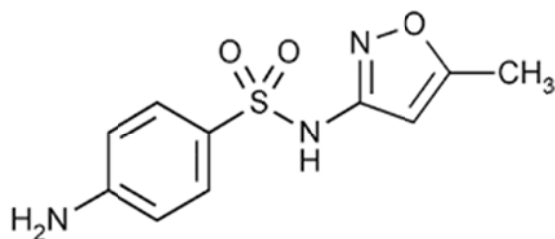


Figura 2.- Estructura química del SMX.

El SMX es un antibiótico de amplio espectro bacteriostático efectivo contra las bacterias Gram positivas y Gram negativas. Su mecanismo se basa en la unión

competitiva con el enzima dihidropteroato sintetasa, de forma que inhibe la conversión del ácido p-aminobenzoico a ácido dihidropteroico, precursor del ácido tetrahidrofólico (ácido fólico) que es esencial para la síntesis de los ácidos nucleicos. Además, esta sulfonamida bloquea el transporte a través de la membrana del ácido glutámico, otro componente esencial en la síntesis del ácido fólico [9].

2.3.- EFECTOS DERIVADOS DEL USO DE LOS ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos han desempeñado un papel importante en la mejora de la salud humana y han sido un apoyo en la producción de ganado desde la Segunda Guerra Mundial [10]. En concreto, el SMX se prescribe actualmente para tratar infecciones urinarias, y se usa en la práctica veterinaria, acuicultura y cría de ganado, tanto para el tratamiento de enfermedades infecciosas [11] como para el fomento del crecimiento, la mejora de la eficiencia de utilización del pienso y la ganancia media diaria de peso.

2.3.1.- Efectos en el medioambiente

Estudios recientes hacen referencia a la presencia ubicua de SAs en matrices acuosas, como plantas de tratamiento de aguas residuales, aguas subterráneas, aguas superficiales y sedimentos, debido fundamentalmente, como se ha mencionado anteriormente, a su carácter anfótero, su alta movilidad ambiental y su elevada persistencia (Figura 3) [12].

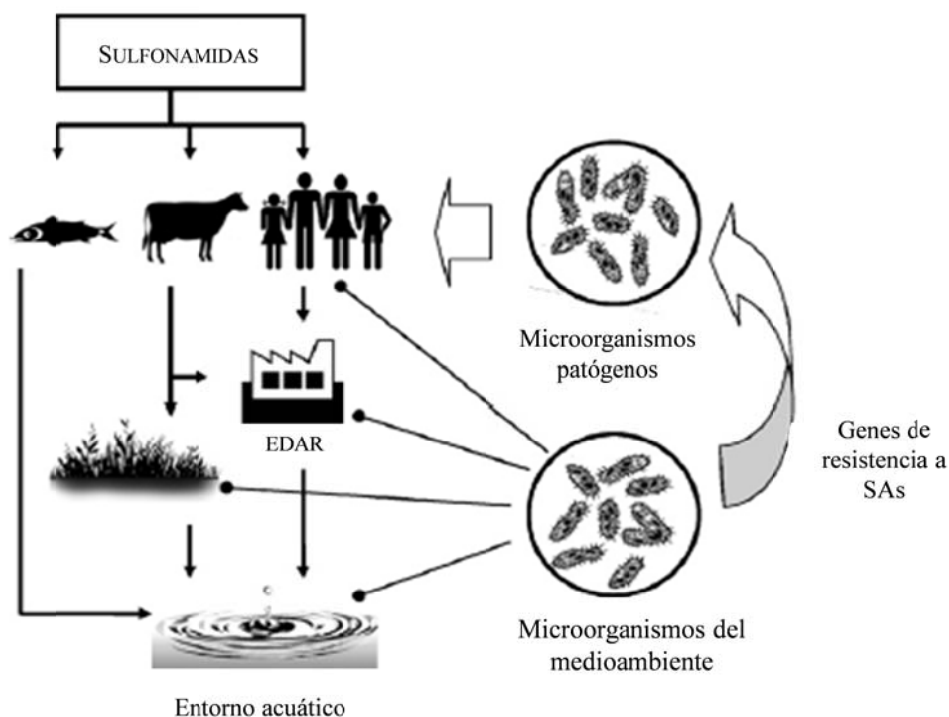


Figura 3.- Efecto de SAs en el medioambiente.

La cantidad de estos compuestos en abonos y aguas residuales provenientes de campos agrícolas e industrias farmacéuticas indica que pueden causar serios problemas para el ambiente. El potencial efecto negativo de estos antibióticos en microorganismos presentes en ecosistemas terrestres y acuáticos es alarmante [9], dado que producen la interrupción de las actividades normales de éstos [13], así como cambios en sus genotipos. Estos cambios pueden ser fácilmente transferidos, incluso a especies de otra biocenosis [9].

Algunos tipos de algas procedentes tanto de ríos como de ambientes marinos son muy sensibles a la toxicidad directa de unos pocos ng L^{-1} de SMX, reaccionando con variaciones en las actividades transcripcionales de los genes involucrados en la replicación y transcripción, así como en los genes relacionados con elementos estructurales de la membrana celular. Las actividades relacionadas con la fotosíntesis también se ven reducidas sustancialmente [10, 14].

2.3.2.- Toxicidad y resistencia antibiótica

Las SAs se pueden acumular en varios organismos a lo largo de la cadena alimentaria, dando lugar a un incremento local en los efectos tóxicos inducidos por estos fármacos [9]. Además, sus efectos tóxicos y los de otros contaminantes pueden exhibir sinergismo. Así, en los niveles de exposición ambiental, una mezcla de microcontaminantes y SMX puede inhibir el crecimiento de las células embrionarias humanas HEK293 [15]. Las concentraciones más altas permitidas de SAs en alimentos han sido establecidas en los reglamentos administrativos. Por ejemplo, la Unión Europea adoptó un máximo de concentración de SAs de $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ en piensos para animales [16].

En las poblaciones de bacterias que son sensibles a antibióticos específicos se producen intrínsecamente cepas que son resistentes a al menos un fármaco (resistencia natural). Como resultado, estas bacterias resistentes pueden sobrevivir, multiplicarse y extender esa resistencia a otras en la familia. En cuanto a la influencia actual de los antibióticos veterinarios en el ambiente, la resistencia se produce debido a una exposición repetida de las bacterias a dosis sub-letales de los mismos. Aunque la resistencia natural a las bacterias patógenas no se ha transferido entre cepas, el desarrollo de resistencia a los medicamentos por la transferencia de genes de “resistencia” entre células bacterianas pertenecientes a diferentes cepas durante un proceso de recombinación (transferencia horizontal de genes) puede haber contribuido a la difusión de especies bacterianas resistentes a los medicamentos a gran escala. Como resultado, estas cepas pueden encontrarse en los ecosistemas que teóricamente no están expuestos a la quimioterapia [9].

En este sentido, la resistencia a los antibióticos ha sido definida como una de las mayores amenazas para la salud pública y uno de los principales desafíos sanitarios del siglo XXI. Las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos se asocian con una calidad de vida reducida, con infecciones bacterianas en otras localizaciones, con una cronificación y posteriores infecciones oportunistas con microorganismos resistentes [17].

2.4.- MONITORIZACIÓN DE SMX EN ACUICULTURA

La producción de pescados y mariscos se ha incrementado sustancialmente en la última década, pasando de 10 millones a 50 millones de toneladas, lo que supone casi el 50% del consumo de especies acuáticas. Este incremento en la producción se ha visto acompañado por un aumento en la preocupación por la aparición de enfermedades en especies acuáticas. En algunos países de la Unión Europea la cantidad de antibióticos usados por tonelada de producto en el tratamiento de dichas enfermedades varía entre 40 y 100 g [18].

Si bien no se ha desarrollado ningún antibiótico para ser aplicado específicamente en acuicultura, se usan en este ámbito los desarrollados para el tratamiento de infecciones en seres humanos o animales terrestres, como el SMX. Tanto en la Unión Europea como en los EE.UU, los antibióticos en acuicultura están únicamente autorizados para tratar enfermedades y no pueden usarse como profilácticos o promotores del crecimiento. Además, en el tratamiento de enfermedades infecciosas, estos compuestos deben incorporarse en los piensos, no pudiendo ser añadidos directamente al agua.

El empleo de antibióticos en acuicultura puede suponer un impacto en la seguridad alimentaria y la salud pública, debido a:

- La emergencia y diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y la dispersión de sus genes de resistencia.
- La presencia de residuos antibióticos en los alimentos.

Las bacterias resistentes pueden causar infecciones en seres humanos por el consumo de productos de acuicultura contaminados. En referencia a la presencia de residuos antibióticos, el 59% de las notificaciones de residuos se asociaron con crustáceos (55%) y pescado (4%), según el informe de *Food and Feed Safety Alerts* (RASFF) de 2008 [17].

Por tanto, el desarrollo de métodos para la detección de SMX, y de SAs en general, es de gran importancia en este campo.

2.5.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS DE SMX

Se han desarrollado varios métodos analíticos para la separación y determinación de SMX tanto en estado puro como en diferentes tipos de muestras (fármacos, residuos de productos alimenticios y muestras biológicas de orina o tejidos). Estos métodos utilizan principalmente técnicas analíticas como HPLC [19-26], cromatografía de gases [27] y electroforesis capilar [28-38].

Sin embargo, estos procedimientos requieren tiempos de análisis elevados en términos de preparación de la muestra, como microextracción en fase sólida, además de una instrumentación compleja y operadores especializados.

Aunque las referencias sobre procedimientos de determinación electroquímica son menos abundantes, probablemente por problemas relacionados con la contaminación o desactivación de los electrodos, se han descrito los siguientes procedimientos electroquímicos como una metodología muy adecuada que puede evitar los inconvenientes mencionados.

2.5.1.- Determinaciones electroquímicas

La electroquímica analítica engloba el conjunto de métodos analíticos cualitativos y cuantitativos basados en las propiedades eléctricas de una disolución de analito cuando éste forma parte de una celda electroquímica [39]. Estos procedimientos presentan ciertas ventajas generales respecto a otro tipo de procedimientos, como la especificidad hacia un estado de oxidación particular de un elemento, bajas capacidades de detección o instrumentación relativamente económica [39]. Para la determinación de SMX se han desarrollado principalmente métodos potenciométricos [40-46], especialmente sensores de membrana selectivos de iones [42-46], y métodos voltamperométricos [47-55].

Los métodos voltamperométricos son particularmente convenientes, exactos y precisos en análisis en los que el ingrediente o sustancia activa, oxidable o reducible, puede ser determinado en presencia de excipientes inactivos. Este procedimiento, que está basado en la medida de una corriente en función de un potencial aplicado, elimina el tiempo dedicado a la extracción de las especies a determinar y las pérdidas incurridas durante el proceso, operaciones habituales en los métodos cromatográficos y fotométricos. La fiabilidad y la precisión de los métodos voltamperométricos son comparables, cuando no mejores, con los métodos mencionados [39].

En este sentido, los mecanismos de oxidación y reducción, basados en el grupo amino primario (-NH₂) y el grupo sulfonamida (-SO₂-), respectivamente, se han estudiado mediante voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) y voltamperometría de onda cuadrada (SWV) utilizando diferentes electrodos modificados (Tabla 1). En la mayor parte de la literatura se describe la oxidación del grupo -NH₂, dado que la reducción del grupo -SO₂- es muy difícil de alcanzar.

En los últimos años, se ha producido un creciente interés en el desarrollo de electrodos miniaturizados en instrumentos electroquímicos. La tecnología de serigrafiado se ha presentado como un método atractivo para la producción en masa de sensores a bajo coste. Esta tecnología presenta ventajas como flexibilidad en el diseño, automatización del proceso, buena reproducibilidad, amplia variedad de materiales y coste reducido [3, 4].

3.- OBJETIVO

El objetivo principal de este trabajo de investigación ha sido el desarrollo y puesta a punto de un sensor serigrafiado para la detección y cuantificación electroquímica del antibiótico SMX en distintos tipos de aguas.

Tabla 1.- Determinaciones voltamperométricas de SMX.

Técnica electroquímica	Electrodo	Medio	Potencial de pico (V)	Señal voltamperométrica registrada	Rango de concentración (μM)	Capacidad de detección (μM)	Ref.
SWV	Diamante dopado con boro	Etanol + tampón fosfato, pH 6.0	+ 1.1	Oxidación	6.1 – 60.1	1.1	[48]
DPV	Diamante dopado con boro	Tampón Britton-Robinson, pH 7.0	+ 0.9	Oxidación	3.9 – 39.4	14.4	[49]
DPV	Diamante dopado con boro	Tampón Britton-Robinson, pH 7.0	+ 0.9	Oxidación	3.9 – 31.6	0.1	[52]
DPV	Pasta de carbono	KCl + tampón fosfato, pH 6.0	+ 0.9	Oxidación	0.0014 – 0.0012	0.0004	[53]
DPV	Pasta de carbono	Tampón fosfato, pH 6.0	- 0.1	Oxidación	0.01 – 10000	0.0015	[51]
SWV	Carbono vitrificado	Tampón Britton-Robinson, pH 6.3	+ 1.1	Oxidación	650.0 – 3500.0	400.0	[47]
DPV	Carbono vitrificado	Tampón fosfato, pH 8.0	+ 0.7	Oxidación	50.0 – 10000.0	50.0	[50]
SWV	Carbono vitrificado	Tampón fosfato, pH 6.0	+ 1.0	Oxidación	55.0 – 395.0	8.5	[55]
DPV	Composite de parafina	Tampón Britton-Robinson, pH 7.0	+ 0.9	Oxidación	0.1 – 0.7	0.024	[54]

4.- EXPERIMENTAL

4.1.-REACTIVOS

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico. Para la preparación de disoluciones acuosas se utilizó agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EE.UU.).

Como fase móvil y electrolito de soporte se utilizaron disoluciones tampón 100 mM de KH_2PO_4 y 100 mM de KCl (Merck, Darmstadt, Germany), excepto en el proceso de optimización. Se empleó una disolución 1 M de NaOH (JT Baker, Deventer, Países Bajos) para ajustar los valores de pH.

Las disoluciones de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (Merck, Darmstadt, Alemania) y de SMX (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) se prepararon disolviendo la cantidad adecuada de estos reactivos en electrolito de soporte.

4.2.-EQUIPO

Las medidas electroquímicas se realizaron con un potenciostato PalmSens® (PalmSens® Instruments BV, Houten, Países Bajos).

Tanto el sistema de flujo continuo como los electrodos serigrafiados empleados en todas las medidas fueron facilitados por DropSens S.L. (Parque Tecnológico de Asturias, Llanera, Asturias, España). Los dispositivos serigrafiados constaban de un electrodo de referencia de Ag (Ag SPE) y un electrodo auxiliar y de trabajo de carbono.

El pH de las disoluciones fue medido mediante un pHmetro Crison Modelo 2002 (Barcelona, España).

4.3.- PROCEDIMIENTOS DE MEDIDA

Se realizaron medidas electroquímicas utilizando electrodos serigrafiados tanto en un dispositivo de flujo continuo como en gota, con el fin de determinar su viabilidad en el análisis en continuo de aguas.

4.3.1.- Medidas en un sistema de flujo continuo

El dispositivo de flujo continuo consta de una bomba peristáltica que recoge e impulsa el electrolito de soporte o fase móvil hacia una celda (Figura 4). El grosor de los tubos de PVC que conectan la bomba con las secciones de inyección y la potencia de la bomba pueden ser regulados para conseguir diferentes velocidades de flujo.

La celda consiste en un dispositivo de metacrilato, cuya transparencia permite la visualización de burbujas u otras irregularidades sobre el electrodo que puedan

afectar en la calidad de las señales obtenidas. Presenta una ranura en la que se inserta el electrodo serigrafiado y un anillo de goma en forma circular que limita el volumen depositado sobre éste. El flujo de entrada es perpendicular a la superficie del electrodo, mientras que el de salida forma un ángulo de unos 45°. Dicho electrodo va conectado al potencióstato.

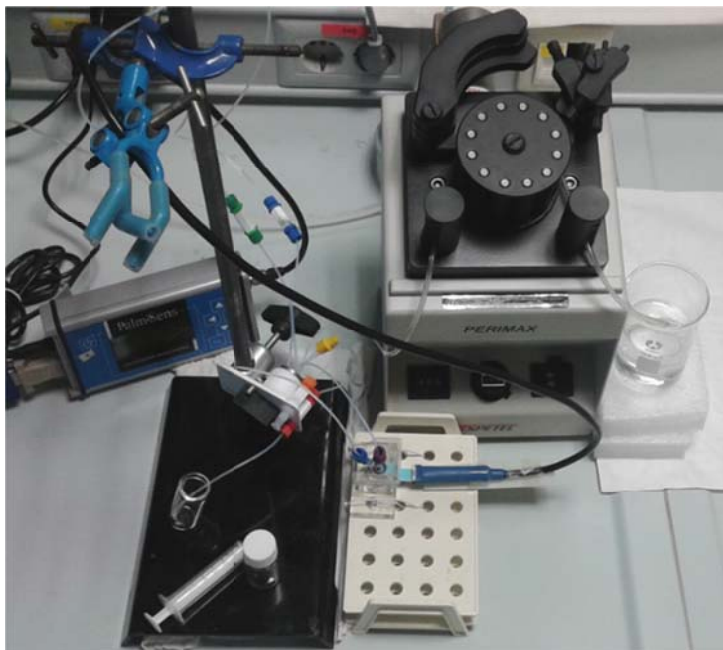


Figura 4.- Imagen del sistema de flujo en continuo.

Inicialmente se puso a punto el método de medida con esta celda de flujo utilizando como identificativo la intensidad de los picos de oxidación de disoluciones de $K_3[Fe(CN)_6]$ de distinta concentración, utilizando distintos electrodos serigrafiados.

En el modo de carga del inyector, la fase móvil proveniente de la bomba pasa directamente en continuo por la celda que contiene el dispositivo serigrafiado. Al aplicar un potencial de + 0.3 V vs Ag SPE, se registra la intensidad correspondiente a la línea base. En esta disposición, se carga un volumen de la disolución de ferricianuro mediante una jeringa, que queda retenido en el bucle de inyección.

Cuando se registra una línea base estable, se cambia el inyector a la posición de inyección, abriéndose una válvula que hace pasar la disolución de analito directamente a la celda, registrándose la corriente correspondiente al proceso redox. Tanto la fase móvil como la disolución de analito se recogen a la salida de la celda.

Una vez caracterizado este sistema, se registraron de forma análoga los amperogramas de disoluciones de SMX de varias concentraciones, aplicando en este caso un potencial de + 0.9 V vs Ag SPE, excepto para el proceso de optimización.

4.3.2.- Medidas en gota

Para la realización de las medidas amperométricas se depositó una gota de 100 μL de la disolución correspondiente de electrolito de soporte o del antibiótico sobre los dispositivos. En la figura 5 se muestra la imagen del dispositivo serigráfico utilizado, en la que se distingue la gota de 100 μL de electrolito de soporte sobre los electrodos de referencia, trabajo y auxiliar.

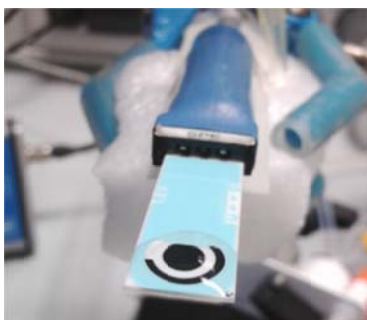


Figura 5.- Imagen de la determinación en gota.

Los distintos cronoamperogramas se registraron de este modo al aplicar un potencial de + 0.7 V vs Ag SPE, excepto para el proceso de optimización.

En el caso de medidas voltamperométricas de onda cuadrada, se registró la intensidad al hacer un barrido de potencial entre + 0.4 V y + 1.4 V, con una amplitud de modulación (E_{step}) de + 0.025 V, una amplitud del impulso (E_{pulse}) de + 0.008 V y una frecuencia de 10 Hz.

5.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1.- DETERMINACIÓN DE FERRICIANURO EN EL SISTEMA DE FLUJO CONTINUO

Para poner a punto el método, se realizaron medidas de disoluciones de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, ya que es un sistema electroquímico ampliamente conocido. Se registraron amperogramas haciendo inyecciones por triplicado o cuádruplicado de disoluciones de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ en el rango de concentraciones de 10^{-6} M hasta 10^{-2} M, aplicando un potencial de + 0.3 V vs Ag SPE (Figura 6).

En el sistema de flujo continuo existe una gran dependencia entre la señal amperométrica registrada y variables como la velocidad de flujo o la composición de la disolución en estudio. Por tanto, se realizaron diferentes experiencias modificando los valores de estas variables experimentales, empleando disoluciones 100 mM de KCl o tampón 100 mM KH_2PO_4 con KCl 100 mM a pH=7.4 como fase móvil, y velocidades de flujo de 1.4, 1.6 y 1.8 mL min^{-1} .

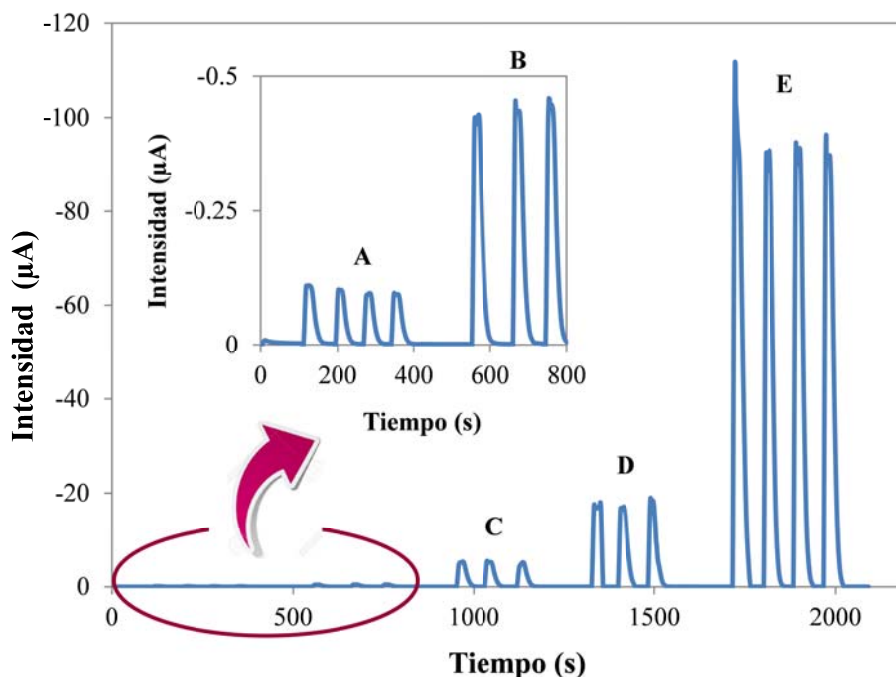


Figura 6.- Amperograma registrado para inyecciones sucesivas de disoluciones 10^{-6} M (A), 10^{-5} M (B), 10^{-4} M (C), 10^{-3} M (D) y 10^{-2} M (E) de $K_3[Fe(CN)_6]$, en 100 mM de KH_2PO_4 y 100 mM de KCl, pH = 7.4, aplicando un potencial de +0.3 V vs Ag SPE.

Las mejores señales se registraron en tampón 100 mM KH_2PO_4 con KCl 100 mM a pH=7.4 como fase móvil, empleándolo también para la preparación de las distintas disoluciones. De hecho, cuando la disolución de analito se preparó directamente en agua Milli-Q, se produjeron perturbaciones en el medio que se tradujeron en la aparición de una deriva de la línea base.

En cuanto a la velocidad de flujo, se observó un ensanchamiento indeseable de pico a 1.4 mL min^{-1} , y un consumo excesivo de reactivos a 1.8 mL min^{-1} , por lo que se decidió tomar como óptima la velocidad de 1.6 mL min^{-1} .

5.2.- DETERMINACIÓN DE SMX EN EL SISTEMA DE FLUJO CONTINUO

El comportamiento electroquímico del antibiótico SMX en distintos electrodos se analizó amperométricamente utilizando el sistema de flujo optimizado para el ferricianuro. En ese caso, se optimizaron además variables experimentales que influyen directamente en la intensidad de la señal registrada para SMX, como la concentración del tampón fosfato utilizado en la preparación de la fase móvil y el potencial aplicado.

Se realizaron inyecciones sucesivas de disoluciones de SMX de distintas concentraciones en el rango de 10^{-6} M a 10^{-2} M empleando como fase móvil disoluciones 50 mM ó 100 mM de tampón H_2KPO_4 con 100 mM de KCl, a pH=8, y aplicando potenciales de + 0.2, + 0.4, + 0.5, + 0.7 y + 0.9 V vs Ag SPE (Figura 7).

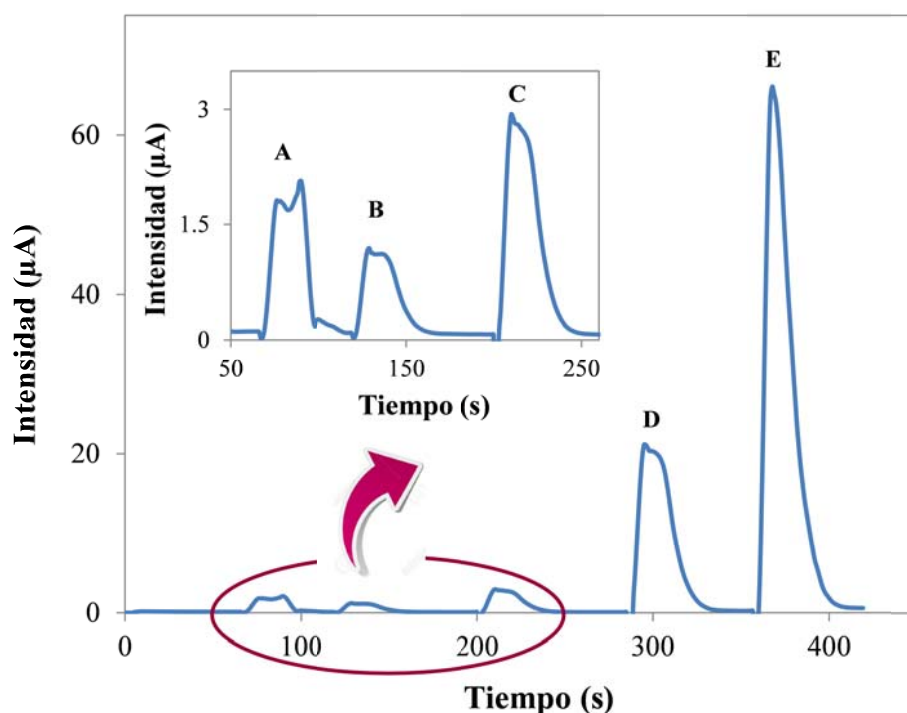


Figura 7.- Amperograma registrado para inyecciones sucesivas de disoluciones 10^{-6} M (A), 10^{-5} M (B), 10^{-4} M (C), 10^{-3} M (D) y 10^{-2} M (E) de SMX, en 100 mM de KH_2PO_4 y 100 mM de KCl, pH = 8, aplicando un potencial de + 0.9 V vs Ag SPE.

Desafortunadamente, las señales de oxidación obtenidas fueron poco definidas por lo que no se consideraron adecuadas para relacionarlas cuantitativamente con la concentración de SMX. Con el objetivo de aumentar la sensibilidad hacia este analito, se decidió modificar el electrodo de trabajo con nanopartículas de Au (AuNPs) depositadas electroquímicamente.

La síntesis de AuNPs se realizó de acuerdo con el método desarrollado por Majid et al. [56], que consiste simplemente en un proceso de electrodeposición a partir de una disolución 0.1 mM de HAuCl_4 preparada en H_2SO_4 0.5 M, aplicando un potencial constante de + 0.18 V durante el proceso de electrodeposición [57]. El tiempo óptimo para que se produjera la deposición de las AuNPs sobre los electrodos serigrafados de carbono se determinó teniendo en cuenta los picos redox registrados en los voltamperogramas cíclicos de una disolución 50 mM de H_2SO_4 , en el rango de potencial de 0 a + 1.5 V, a 0.1 V s^{-1} , con los electrodos modificados.

En dichos voltamperogramas se observa un pico de reducción a + 0.5 V vs Ag SPE, cuya intensidad aumenta con el tiempo de deposición de AuNPs, y un pico de oxidación a + 1.0 V vs Ag SPE que aparece únicamente para tiempos de deposición superiores a 10 s (Figura 8). Este pico de oxidación sugiere un comportamiento de “macro” electrodo de oro, es decir, la formación de un film de oro sobre la superficie del electrodo [58]. Por lo tanto, se eligió un tiempo de 10 s para la electrodeposición de las AuNPs.

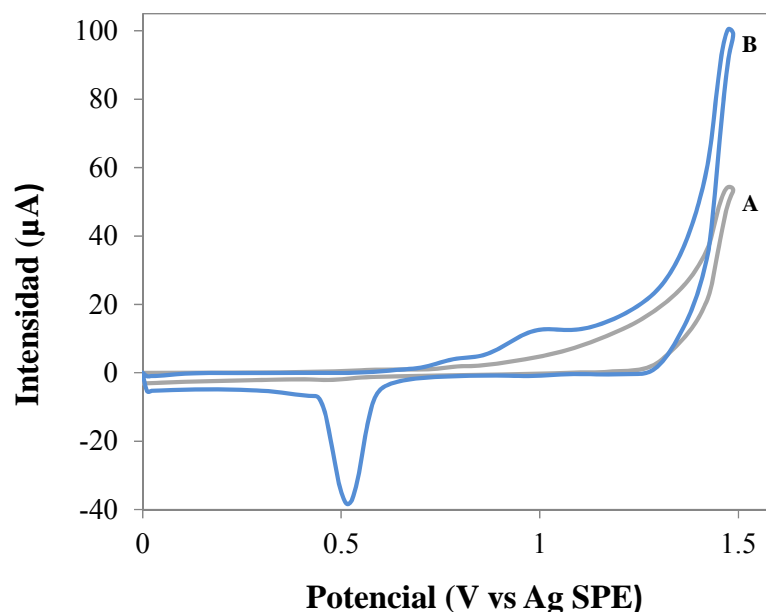


Figura 8.- Voltamperogramas cíclicos obtenidos en H_2SO_4 50 mM utilizando los electrodos serigrafados modificados con AuNPs generadas empleando diferentes tiempos de electrodeposición 0 s (A) y 30 s (B). Velocidad de barrido, $0.1 V s^{-1}$.

Con estos electrodos modificados se estudió nuevamente el comportamiento electroquímico del SMX. Los resultados no fueron lo suficientemente satisfactorios como para poder emplearlos definitivamente en el estudio del antibiótico. Los picos de oxidación registrados fueron en la mayoría de los casos muy anchos, lo que dificultó su cuantificación, por lo que se propuso el desarrollo de un método alternativo de medida.

5.3.- DETERMINACIÓN AMPEROMÉTRICA DE SMX EN GOTA

La metodología electroquímica basada en la utilización de una gota del electrolito de soporte, o del analito objeto de estudio disuelto en electrolito de soporte, para cubrir los electrodos de trabajo, referencia y auxiliar, presenta mayor simplicidad y rapidez que la anteriormente descrita. Además, la determinación en gota no tiene el inconveniente del gran volumen de reactivos consumido, ya que no es necesario aportar una fase móvil continuamente como en el sistema de flujo, ni es necesario sumergir los electrodos en el electrolito de soporte como ocurre en las medidas en celda.

Para determinar el potencial óptimo al que tiene lugar la reacción redox del antibiótico, se realizaron diferentes cronoamperogramas de una disolución 10^{-4} M de SMX a +0.5, +0.6, +0.7, +0.8 y +0.9 V vs Ag SPE en electrolito de soporte pH 8. La mayor intensidad de oxidación leída a los 100 s fue la registrada a +0.7 V vs Ag SPE, por lo que se tomó como potencial óptimo de medida para análisis posteriores.

En estas condiciones experimentales, se realizaron diferentes curvas de calibrado en los rangos de concentraciones de SMX de 10^{-6} M a 10^{-2} M, de 10^{-9} M a

10^{-7} M y de 10^{-7} M a 10^{-4} M para estudiar la sensibilidad de los electrodos (Figura 9). Desafortunadamente, las señales de intensidad no mostraban una dependencia lineal con la concentración en todos los casos, por lo que los resultados obtenidos mediante este método cronoamperométrico no pudieron considerarse tampoco satisfactorios.

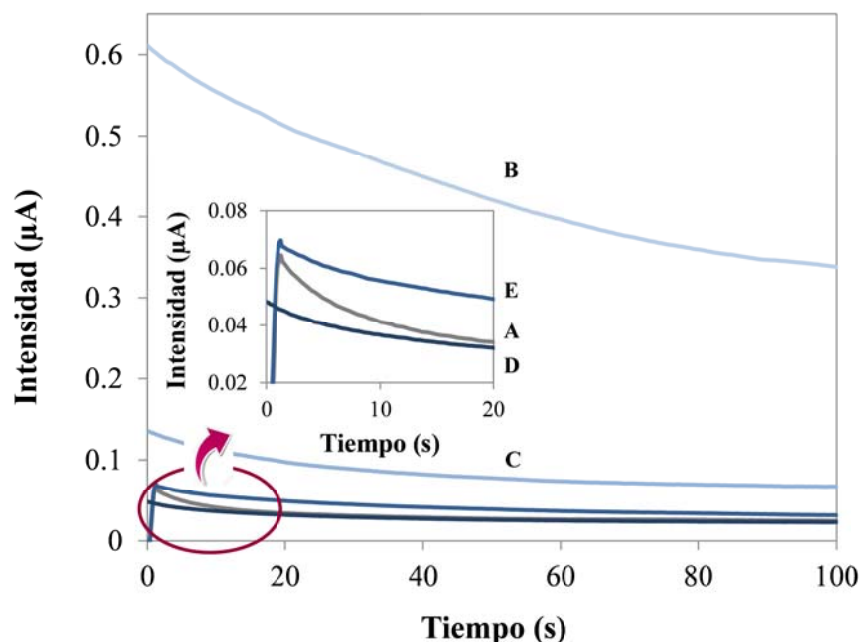


Figura 9.- Cronoamperogramas registrados en electrolito de soporte pH = 8 (A), y en disoluciones de SMX de concentración 10^{-4} M (B), 10^{-5} M (C), 10^{-6} M (D) y 10^{-7} M (E), aplicando un potencial de +0.7 V vs Ag SPE.

5.4.- DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE SMX EN GOTA

En vista de los resultados obtenidos se estudió el comportamiento de disoluciones de SMX, en el rango de concentración de 10^{-7} M a 10^{-2} M, mediante SWV utilizando electrodos serigrafiados. Se observó un pico de oxidación claramente definido en torno a + 0.7 V vs Ag SPE, correspondiente a la oxidación del grupo amino del analito (Figura 10).

De esta manera se registraron diferentes curvas de calibrado que se utilizaron para validar este método de análisis de SMX.

La validación de un método analítico se define como el proceso basado en estudios sistemáticos de laboratorio, mediante el cual se pone de manifiesto que dicho método posee unas características de funcionamiento adecuadas para la aplicación que se le quiere dar. Dichas características de funcionamiento se determinan a través de parámetros de calidad como la precisión, la capacidad de detección y la veracidad [59].

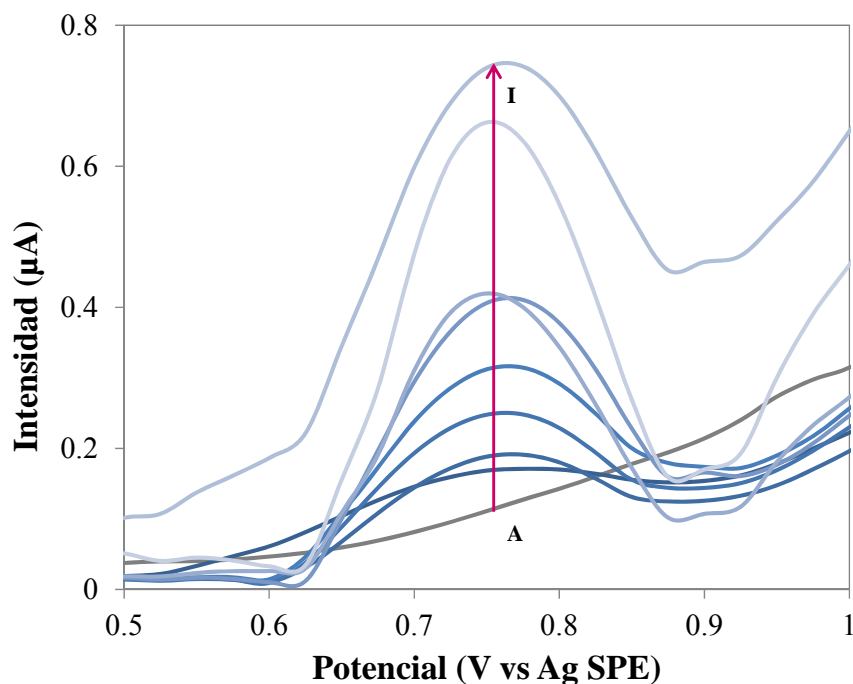


Figura 10.- Voltamperogramas de onda cuadrada registrados en electrolito de soporte $pH = 8$ (A), y en disoluciones de SMX de concentración $5 \mu M$ (B), $7.5 \mu M$ (C), $10 \mu M$ (D), $12.5 \mu M$ (E), $15 \mu M$ (F), $17.5 \mu M$ (G), $20 \mu M$ (H) y $25 \mu M$ (I), aplicando un potencial de $+ 0.7 V$ vs Ag SPE.

5.4.1.- Precisión del método

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en unas condiciones bien definidas. Así pues, evalúa la dispersión de los resultados que se obtienen al realizar réplicas de medidas sobre una misma muestra. Se expresa estadísticamente a través de la desviación estándar, bien en términos absolutos bien en términos relativos. En general, la desviación estándar aumenta con la concentración mientras que la desviación estándar relativa (RSD) disminuye, es decir, se estabiliza a concentraciones elevadas.

Es recomendable distinguir entre unas condiciones de mínima variación de los factores de influencia y unas condiciones de máxima variación de los mismos sobre la precisión, lo que se conoce como condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad. Las condiciones de repetibilidad son aquellas en las que las medidas se realizan aplicando el mismo método a un mismo material, con los mismos equipos y reactivos, el mismo operador y en un intervalo corto de tiempo, generalmente una sesión de trabajo. Cuando las medidas se obtienen con el mismo método, sobre las mismas muestras, pero con reactivos, equipos, condiciones ambientales y operadores distintos se habla de condiciones de reproducibilidad [59]. En este caso, el factor más influyente en el procedimiento desarrollado para distinguir entre ambos índices es el dispositivo serigrafiado utilizado para realizar las medidas voltamperométricas.

Por otra parte, para estimar la repetibilidad del procedimiento se realizaron varias curvas de calibración en el rango de concentración de 5 μM a 25 μM de SMX, utilizando durante todas las medidas el mismo electrodo serigrafiado. Los parámetros de calibrado y la desviación típica, fueron óptimamente evaluados. Con el objetivo de detectar la existencia de puntos anómalos, se utilizó el programa PROGRESS [60], que evalúa el intervalo lineal y la presencia de datos anómalos mediante una regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS) y una vez eliminados estos del conjunto de calibración, construye nuevamente con los restantes puntos una recta de calibración mediante una regresión en mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Esta regresión OLS proporciona una correcta valoración de la pendiente (sensibilidad) y del término independiente del calibrado, siendo ambos importantes para juzgar la calidad del calibrado y a partir de ésta, la del método analítico.

En la tabla 2 se muestran los parámetros de calibración obtenidos con los distintos métodos de regresión utilizados para el cálculo de la repetibilidad, que en términos de RSD asociada a las pendientes de las rectas de calibración construidas en el rango de concentración de 5 a 25 μM , fue de 5.9 % para $n = 3$.

A su vez se estimó la reproducibilidad del procedimiento, para lo que se realizaron varias curvas de calibración en el mismo rango de concentración de SMX, utilizando distintos dispositivos serigrafiados. Los parámetros de calibrado y la desviación típica, fueron también óptimamente evaluados.

En la figura 11 se muestran los puntos experimentales y las rectas de calibración construidas a partir de ellos, una vez eliminados los puntos anómalos, en los diferentes calibrados realizados con distintos electrodos serigrafiados. La tabla 3 recoge los parámetros de calibración correspondientes obtenidos con los distintos métodos de regresión. La reproducibilidad de este método en términos de RSD asociada a las pendientes de las rectas de calibración, construidas en el rango de concentración de 5 a 25 μM , fue de 4.6 % para $n = 7$.

5.4.2.- Capacidad de detección

Se define la capacidad de detección como la concentración o la cantidad de analito derivada de la medida más pequeña y que puede detectarse con una certeza razonable mediante un determinado procedimiento analítico [59].

Es muy habitual analizar componentes de muestras a niveles bajos de concentración. En estos casos, hay que discriminar entre muestras en las que se detecta analito y muestras en las que no. Además, una vez detectado el analito, se ha de fijar un límite a partir del que poder estimar cuantitativamente y de forma fiable su concentración.

A menor ruido y mayor sensibilidad del método, mayor será también la capacidad de discriminación entre el blanco y las muestras o patrones a baja concentración [59].

Tabla 2.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la repetibilidad del método.

Parámetros de calibración	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	6	6	5
Pendiente	23.5	23.8	23.8
Término independiente	-72.3	-74.0	-70.7
Coef. de determinación (R ²)	0.990	0.997	0.999
Desviación estándar residual	18.0	-	6.5
Nº de datos	6	6	6
Pendiente	21.6	21.6	21.6
Término independiente	-60.2	-56.6	-60.2
Coef. de determinación (R ²)	0.998	0.996	0.998
Desviación estándar residual	5.8	-	5.8
Nº de datos	5	5	5
Pendiente	21.5	20.9	21.5
Término independiente	-85.0	-79.6	-85.0
Coef. de determinación (R ²)	0.999	0.999	0.999
Desviación estándar residual	2.8	-	2.8

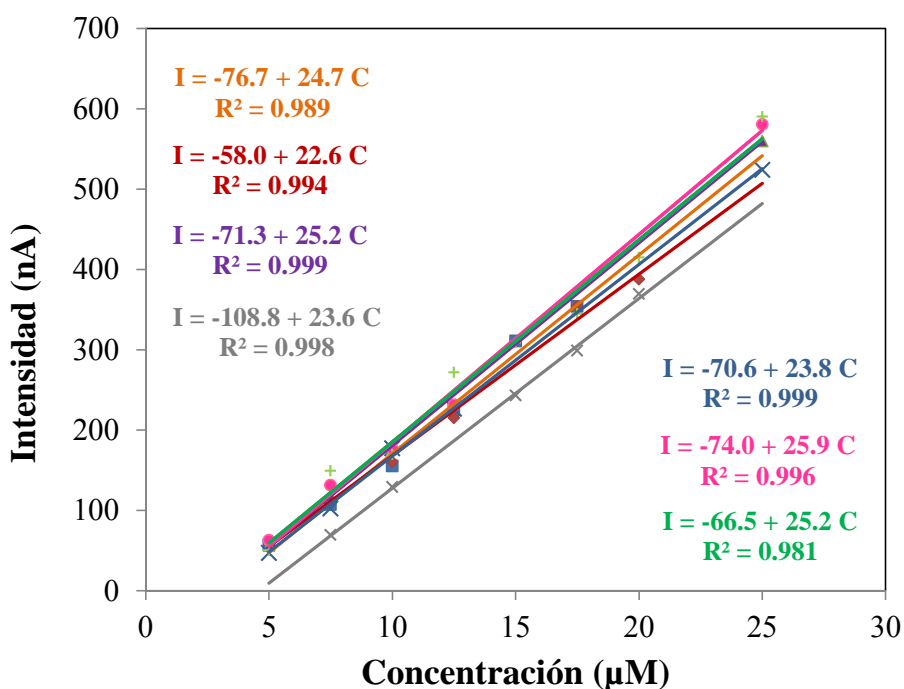


Figura 11.- Rectas de calibrado para el cálculo de la reproducibilidad del método.

Tabla 3.- *Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la reproducibilidad del método.*

Parámetros de calibración	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	6	6	6
Pendiente	24.7	23.7	24.7
Término independiente	-76.7	-66.6	-76.7
Coef. de determinación (R^2)	0.989	0.994	0.989
Desviación estándar residual	13.0	-	13.0
Nº de datos	8	8	6
Pendiente	24.6	21.9	22.6
Término independiente	-75.3	-54.1	-58.0
Coef. de determinación (R^2)	0.987	0.995	0.994
Desviación estándar residual	19.8	-	11.1
Nº de datos	6	6	4
Pendiente	25.4	25.2	25.2
Término independiente	-66.4	-71.8	-71.3
Coef. de determinación (R^2)	0.993	0.999	0.999
Desviación estándar residual	17.2	-	1.7
Nº de datos	7	7	5
Pendiente	24.3	23.2	23.6
Término independiente	-108.2	-104.4	-108.8
Coef. de determinación (R^2)	0.989	0.998	0.998
Desviación estándar residual	19.2	-	5.0
Nº de datos	6	6	5
Pendiente	23.4	23.8	23.8
Término independiente	-72.3	-74.0	-70.7
Coef. de determinación (R^2)	0.991	0.997	0.999
Desviación estándar residual	18.0	-	6.5
Nº de datos	5	5	5
Pendiente	25.9	22.5	25.9
Término independiente	-74.0	-48.7	-74.0
Coef. de determinación (R^2)	0.996	0.999	0.996
Desviación estándar residual	14.4	-	14.4
Nº de datos	8	8	8
Pendiente	25.2	24.3	25.2
Término independiente	-66.5	-68.6	-66.5
Coef. de determinación (R^2)	0.981	0.973	0.981
Desviación estándar residual	24.9	-	24.9

Dado que todas las medidas experimentales están siempre sujetas a errores, será necesario recurrir siempre a criterios estadísticos y de probabilidad. Al determinar la presencia o la ausencia de analito en una muestra se han de evitar dos tipos de errores [59]:

- Los falsos positivos (α), denominados errores de tipo α , que consisten en dictaminar la presencia de analito cuando en realidad la muestra no lo contiene.
- Los falsos negativos (β), denominados errores de tipo β , en los que se determina que no hay analito cuando en realidad la muestra lo contiene.

Este procedimiento analítico fue también caracterizado mediante su capacidad de detección, teniendo en cuenta α y β [61, 62]. En el cálculo de este índice de calidad también se precisaron regresiones validadas entre la concentración y la señal analítica, construidas en el rango de 5 a 25 μM [63, 64].

El valor mínimo de concentración detectable calculado mediante el programa DETARCHI [63, 64], $1.5 \pm 0.1 \mu\text{M}$ ($\alpha = \beta = 0.05$; $n = 3$), fue menor que el valor del primer estándar utilizado para construir las curvas de calibrado 5 μM . Por lo tanto, desde un punto de vista analítico, este último valor se estimó como capacidad de detección del método [65].

5.4.3.- Veracidad del método: Determinación de SMX en muestras de agua de río y de mar

La veracidad de un método analítico se puede demostrar de diversas formas, siendo las más utilizadas el empleo de materiales de referencia certificados, la comparación con un método de referencia o el análisis de muestras manufacturadas con un contenido de analito conocido [59, 66].

En este caso, se analizó el contenido de SMX en aguas enriquecidas de río y de mar mediante interpolación en las curvas de calibrado construidas utilizando los sensores serigrafados [67]. Para ello, se registró la señal de oxidación de los dos tipos de muestras enriquecidas, siguiendo el procedimiento de medida descrito anteriormente (Figura 12).

La tabla 4 muestra los buenos resultados obtenidos con este procedimiento en términos de RSD y de intervalo de confianza para la media, lo que confirma la veracidad del procedimiento en este tipo de análisis.

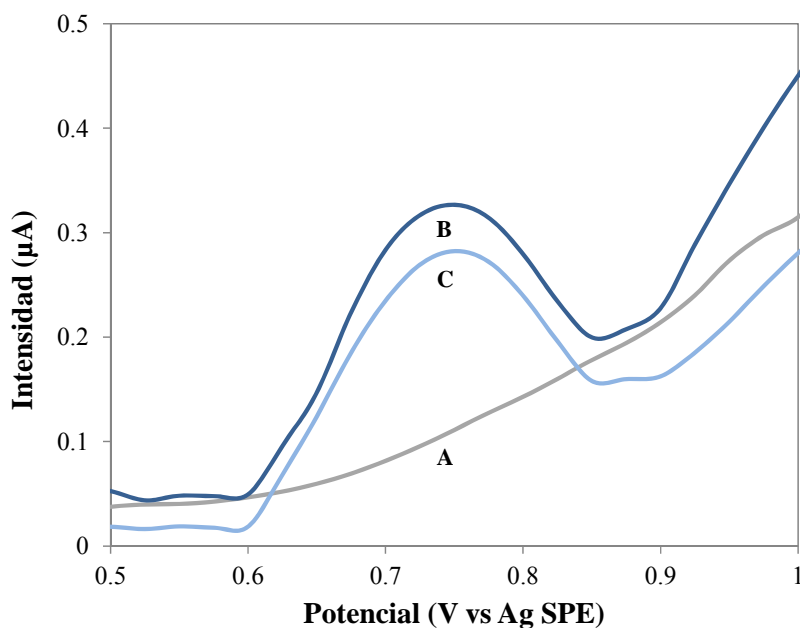


Figura 12.- Voltamperogramas de onda cuadrada registrados en electrolito de soporte $pH = 8$ (A), en muestras enriquecidas de agua de río (B) y de agua de mar (C), aplicando un potencial de $+ 0.7 V$ vs Ag SPE.

Tabla 4.- RSD e intervalo de confianza para la media de los valores de SMX obtenidos en las muestras de agua de río y de mar.

Tipo de muestra	Concentración de SMX en las muestras enriquecidas (μM)	Concentración de SMX detectada (μM)	RSD (%)	Intervalo de confianza al 95% para la media
Agua de río	30	32.8	10.9	29.2 ± 3.6
		26.6		
		28.1		
Agua de mar	30	28.6	4.0	29.0 ± 1.3
		28.1		
		30.3		

6.- CONCLUSIONES

Con los datos recogidos en este trabajo se puede concluir que:

- El empleo de sensores serigrafiados de carbono supone una técnica sencilla, reproducible, repetible y económica para la detección electroquímica de SMX en distintos tipos de aguas.
- La realización de medidas electroquímicas en gota se ha presentado como una atractiva alternativa al sistema en flujo continuo, ya que minimiza los volúmenes de reactivos y muestras utilizados y reduce el tiempo de medida.
- El procedimiento voltamperométrico desarrollado en gota, basado en el uso de electrodos serigrafiados de carbono, se caracteriza por valores de capacidad de detección del orden de los descritos en la bibliografía, en los que se utilizan electrodos con complejas modificaciones, lo que pone de manifiesto la gran utilidad de estos sencillos dispositivos.

7.- REFERENCIAS

- [1] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications*, Talanta, 73 (2007) 202.
- [2] M. Albareda-Sirvent, A. Merkoci, S. Alegret, *Configurations used in the design of screen-printed enzymatic biosensors. A review*, Sensors and Actuators B-Chemical, 69 (2000) 153.
- [3] J.M. Cooper, A.E.G. Cass, *Biosensors: a practical approach*, Oxford University Press, Oxford, 2004.
- [4] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, in: R. Comeaux, P. Novotny (Eds.), *Biosensors: Properties, Materials and Applications (Biotechnology in Agriculture, Industry and Medicine)*, Nova Publishers, Hauppauge NY, 2009, p. 1.
- [5] G. Lancini, F. Parenti, G.G. Gallo, *Antibiotics : A multidisciplinary approach*, Plenum Press, New York and London, 1995.
- [6] J. Koolman, K.H. Röhm, *Bioquímica : texto y atlas*, Médica Panamericana, Buenos Aires, 2012.
- [7] L. Fotouhi, A.B. Hashkavayi, M.M. Heravi, *Electrochemical behaviour and voltammetric determination of sulphadiazine using a multi-walled carbon nanotube composite film-glassy carbon electrode*, Journal of Experimental Nanoscience, 8 (2013) 947.
- [8] P. Sukul, M. Spiteller, in: G.W. Ware (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, Vol 187 (Reviews of Environmental Contamination and Toxicology)*, 2006, p. 67.
- [9] W. Baran, E. Adamek, J. Ziemianska, A. Sobczak, *Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health*, Journal of Hazardous Materials, 196 (2011) 1.
- [10] A.C. Johnson, V. Keller, E. Dumont, J.P. Sumpter, *Assessing the concentrations and risks of toxicity from the antibiotics ciprofloxacin, sulfamethoxazole, trimethoprim and erythromycin in European rivers*, Science of The Total Environment, 511 (2015) 747.

- [11] P. Drillia, S.N. Dokianakis, M.S. Fountoulakis, M. Kornaros, K. Stamatelatu, G. Lyberatos, *On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole*, Journal of Hazardous Materials, 122 (2005) 259.
- [12] R. Hirsch, T. Ternes, K. Haberer, K.L. Kratz, *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*, Science of The Total Environment, 225 (1999) 109.
- [13] J. Lian, Z. Qiang, M. Li, J.R. Bolton, J. Qu, *UV photolysis kinetics of sulfonamides in aqueous solution based on optimized fluence quantification*, Water Research, 75 (2015) 43.
- [14] C.H. Johansson, L. Janmar, T. Backhaus, *Toxicity of ciprofloxacin and sulfamethoxazole to marine periphytic algae and bacteria*, Aquatic Toxicology, 156 (2014) 248.
- [15] F. Pomati, S. Castiglioni, E. Zuccato, R. Fanelli, D. Vigetti, C. Rossetti, D. Calamari, *Effects of a Complex Mixture of Therapeutic Drugs at Environmental Levels on Human Embryonic Cells*, Environmental Science & Technology, 40 (2006) 2442.
- [16] COMMISSION REGULATION (EU) No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin.
- [17] E.M. Álvarez Fernández, *Prevalencia de bacterias resistentes a antibióticos en productos avícolas: influencia de diferentes factores y consecuencias para la seguridad alimentaria*, Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria - Universidad de León (2013).
- [18] *The World Health Report*, World Health Organization (2006).
- [19] W.M.M. Mahmoud, N.D.H. Khaleel, G.M. Hadad, R.A. Abdel-Salam, A. Haiß, K. Kümmerer, *Simultaneous determination of 11 sulfonamides by HPLC–UV and application for fast screening of their aerobic elimination and biodegradation in a simple test*, CLEAN – Soil, Air, Water, 41 (2013) 907.
- [20] Y. Li, J. Han, Y. Yan, B. Chen, G. Zhang, Y. Liu, C. Sheng, *Simultaneous extraction and determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in water samples and aquaculture products using [Bmim]BF₄/(NH₄)₃C₆H₅O₇ aqueous two-phase system coupled with HPLC*, Journal of the Iranian Chemical Society, 10 (2013) 339.
- [21] Z. Zhou, J.Q. Jiang, *Simultaneous detection of sulfamethoxazole, diclofenac, carbamazepine, and bezafibrate by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection*, Journal of Applied Spectroscopy, 81 (2014) 273.
- [22] V. Goulas, T. Anisimova Andreou, C. Angastinioti Moditi, O. Tzamaloukas, *A rapid HPLC method for the determination of sulphonamides and trimethoprim in feed premixes*, Journal of Animal and Feed Sciences, 23 (2014) 185.
- [23] L. Jank, R.B. Hoff, F.J.d. Costa, T.M. Pizzolato, *Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 94 (2014) 1013.
- [24] J. Rossmann, S. Schubert, R. Gurke, R. Oertel, W. Kirch, *Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC–MS/MS*, Journal of Chromatography B, 969 (2014) 162.

- [25] A. Garcia-Rodríguez, E. Sagristà, V. Matamoros, C. Fontàs, M. Hidalgo, V. Salvadó, *Determination of pharmaceutical compounds in sewage sludge using a standard addition method approach*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 94 (2014) 1199.
- [26] H. Zhao, M. Ding, Y. Gao, W. Deng, *Determination of sulfonamides in pork, egg, and chicken using multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction sorbent followed by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Journal of AOAC International, 97 (2014) 1481.
- [27] B. Chiavarino, M. Elisa Crestoni, A. Di Marzio, S. Fornarini, *Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection*, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 706 (1998) 269.
- [28] T. You, X. Yang, E. Wang, *Determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole by capillary electrophoresis with end-column electrochemical detection*, Analyst, 123 (1998) 2357.
- [29] D. Teshima, K. Otsubo, K. Makino, Y. Itoh, R. Oishi, *Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by capillary zone electrophoresis*, Biomedical Chromatography, 18 (2004) 51.
- [30] C. Qing-Cui, T. Xiu-Hui, J. Lian-Mei, Z. Wen-Jun, Y. Jian-Nong, *Determination of effective ingredients in compound sulfamethoxazole tablets by capillary electrophoresis with amperometric detection*, Chinese Journal of Analytical Chemistry, 36 (2008) 292.
- [31] R.B. Hoff, F. Barreto, T.B.L. Kist, *Use of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to screen and liquid chromatography–tandem mass spectrometry to confirm sulfonamide residues: Validation according to EU 2002/657/EC*, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 8254.
- [32] M.U. Farooq, P. Su, Y. Yang, *Applications of a novel sample preparation method for the determination of sulfonamides in edible meat by CZE*, Chromatographia, 69 (2009) 1107.
- [33] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, C. Neusüss, F. Alés-Barrero, *Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 3372.
- [34] S.E. Gibbons, C. Wang, Y. Ma, *Determination of pharmaceutical and personal care products in wastewater by capillary electrophoresis with UV detection*, Talanta, 84 (2011) 1163.
- [35] Y. Li, Y. Cui, B. Jia, H. Wang, C. Liu, Y. Qi, *Capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking for rapid and sensitive determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole*, Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 67 (2012) 768.
- [36] F. Tong, Y. Zhang, F. Chen, Y. Li, G. Ma, Y. Chen, K. Liu, J. Dong, J. Ye, Q. Chu, *Hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for trace analysis of sulfonamide compounds*, Journal of Chromatography B, 942–943 (2013) 134.
- [37] I.S. Da Silva, D.T.R. Vidal, C.L. Do Lago, L. Angnes, *Fast simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole by capillary zone electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection*, Journal of Separation Science, 36 (2013) 1405.

- [38] H. Sun, H. Qi, H. Li, *Development of capillary electrophoretic method combined with accelerated solvent extraction for simultaneous determination of residual sulfonamides and their acetylated metabolites in aquatic products*, Food Analytical Methods, 6 (2013) 1049.
- [39] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Thomson Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, 2007.
- [40] P.B. Issopoulou, *Analysis of various very slightly water soluble drugs in micellar medium: II. Potentiometric and visual determination of SMX in pure form*, Fresenius Journal of Analytical Chemistry, 354 (1996) 378.
- [41] M.M. Abdul Kamal Nazer, T.K. Shabeer, P. Riyazuddin, *Indirect potentiometric titration of sulphamethoxazole in the presence of trimethoprim in co-trimazole tablets using copper based mercury film electrode*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 49 (2001) 278.
- [42] S.A.A. Almeida, A.M. Heitor, L.C. Sa, J. Barbosa, M. da Conceicao, B.S.M. Montenegro, M.G.F. Sales, *Solid contact PVC membrane electrodes based on neutral or charged carriers for the selective reading of anionic sulfamethoxazole and their application to the analysis of aquaculture water*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 92 (2012) 479.
- [43] S.A.A. Almeida, F.T.C. Moreira, A.M. Heitor, M.C.B.S.M. Montenegro, G.G. Aguilar, M.G.F. Sales, *Sulphonamide-imprinted sol-gel materials as ionophores in potentiometric transduction*, Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 31 (2011) 1784.
- [44] S.A.A. Almeida, E. Arasa, M. Puyol, C.S. Martinez-Cisneros, J. Alonso-Chamarro, M.C.B.S.M. Montenegro, M.G.F. Sales, *Novel LTCC-potentiometric microfluidic device for biparametric analysis of organic compounds carrying plastic antibodies as ionophores: Application to sulfamethoxazole and trimethoprim*, Biosensors & Bioelectronics, 30 (2011) 197.
- [45] M. Arvand, F. Alirezanejad, *Sulfamethoxazole-imprinted polymeric receptor as ionophore for potentiometric transduction*, Electroanalysis, 23 (2011) 1948.
- [46] S.A.A. Almeida, L.A.A.N.A. Truta, R.B. Queiros, M.C.B.S.M. Montenegro, A.L. Cunha, M.G.F. Sales, *Optimizing potentiometric ionophore and electrode design for environmental on-site control of antibiotic drugs: Application to sulfamethoxazole*, Biosensors & Bioelectronics, 35 (2012) 319.
- [47] T.A.M. Msagati, J.C. Ngila, *Voltammetric detection of sulfonamides at a poly(3-methylthiophene) electrode*, Talanta, 58 (2002) 605.
- [48] C.D. Souza, O.C. Braga, I.C. Vieira, A. Spinelli, *Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode*, Sensors and Actuators B: Chemical, 135 (2008) 66.
- [49] L.S. Andrade, R.C. Rocha-Filho, Q.B. Cass, O. Fatibello-Filho, *Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode*, Electroanalysis, 21 (2009) 1475.
- [50] S. Issac, K.G. Kumar, *Voltammetric determination of sulfamethoxazole at amultiwalled carbon nanotube modified glassy carbon sensor and its application studies*, Drug Testing and Analysis, 1 (2009) 350.

- [51] R. Joseph, K. Girish Kumar, *Differential pulse voltammetric determination and catalytic oxidation of sulfamethoxazole using [5,10,15,20-tetrakis (3-methoxy-4-hydroxy phenyl) porphyrinato] Cu (II) modified carbon paste sensor*, Drug Testing and Analysis, 2 (2010) 278.
- [52] L. Santos Andrade, R. Cardozo Rocha-Filho, Q. Bezerra Cass, O. Fatibello-Filho, *A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of SMX and trimethoprim by DPV on a boron-doped diamond electrode*, Analytical Methods, 2 (2010) 402.
- [53] M. Arvand, R. Ansari, L. Heydari, *Electrocatalytic oxidation and differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole using carbon nanotube paste electrode*, Materials Science and Engineering: C, 31 (2011) 1819.
- [54] I. Cesarino, V. Cesarino, M.R.V. Lanza, *Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim*, Sensors and Actuators B: Chemical, 188 (2013) 1293.
- [55] G.N. Calaça, C.A. Pessoa, K. Wohnrath, N. Nagata, *Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry*, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6 (2014) 438.
- [56] E. Majid, S. Hrapovic, Y.L. Liu, K.B. Male, J.H.T. Luong, *Electrochemical determination of arsenite using a gold nanoparticle modified glassy carbon electrode and flow analysis*, Analytical Chemistry, 78 (2006) 762.
- [57] O. Dominguez Renedo, M.J. Arcos Martinez, *Anodic stripping voltammetry of antimony using gold nanoparticle-modified carbon screen-printed electrodes*, Analytica Chimica Acta, 589 (2007) 255.
- [58] X. Dai, O. Nekrassova, M.E. Hyde, R.G. Compton, *Anodic stripping voltammetry of arsenic(III) using gold nanoparticle-modified electrodes*, Analytical Chemistry, 76 (2004) 5924.
- [59] Á. Ríos Castro, M.C. Moreno Bondi, B.M. Simonet Suau, *Técnicas espectroscópicas en química analítica*, Síntesis, Madrid, 2012.
- [60] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, *Robust regression and outlier detection*, Wiley, New York, 1989.
- [61] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, *Compendium of Analytical Nomenclature, 3rd ed*, Port City Press Inc, Baltimore, 2000.
- [62] ISO11843, Capability of detection (Part I 1997 and Part II 2000) Genève.
- [63] R. Cela, M. Blanco, *Avances en quimiometría práctica*, Universidade, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Santiago de Compostela, 1994.
- [64] L. Sarabia, M.C. Ortiz, *Detarchi - A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection*, Trac-Trends In Analytical Chemistry, 13 (1994) 1.
- [65] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A*, Biosensors & Bioelectronics, 25 (2010) 1333.
- [66] ISO 5725: 1994 (Reviewed in 2013), Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.
- [67] D.C. Harris, R. Balahura, *Análisis químico cuantitativo*, Reverté, Barcelona, 2001.