



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO**

---

---

---

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA**

**APLICACIÓN DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA MAGNÉTICA  
ACOPLADA A SISTEMAS DE SEPARACIÓN INSTRUMENTALES PARA  
EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE ANTIBIÓTICOS EN LECHE**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN QUÍMICA**

PRESENTA:

**Q. ISRAEL SAMUEL IBARRA ORTEGA**

DIRECTORES DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA

DR. JOSÉ MANUEL MIRANDA LÓPEZ

PACHUCA DE SOTO HGO

MAYO, 2013



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Dirección

**M. en C. Julio César Leines Medécigo**  
Director de Administración Escolar  
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
PRESENTE

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al pasante del Doctorado en Química, L. en **Q. Israel Samuel Ibarra Ortega**, quien presenta el trabajo “**Aplicación de extracción en fase sólida magnética acoplada a sistemas de separación instrumentales para el análisis de residuos de antibióticos en leche**”, después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE: Dra. María Elena Páez Hernández (AAQ)  
SECRETARIO: Dr. José Manuel Miranda López (USC-España)  
VOCAL: Dr. Fidel Pérez Moreno (AACTyM)  
SUPLENTE: Dr. Joseantonio Godoy Reyes (AAQ)

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

ATENTAMENTE  
"Amor, Orden y Progreso"  
Mineral de la Reforma, Hgo., a 29 de abril 2013

**Dr. Orlando Ávila Pozos**  
Director del ICBI  
avilap@uaeh.edu.mx



Ciudad Universitaria Carretera Pachuca – Tulancingo  
Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184  
Mineral de la Reforma, Hidalgo. México.  
Tel: (771)7172000 ext. 2230, 2231



## *Agradecimientos*

*Cuando paso la última página de este trabajo me doy cuenta de la gran cantidad de personas que han formado parte de él, ya que sin ellas este logro no habría sido posible. Mediante estas líneas quisiera expresarles mi más profundo y sincero agradecimiento.*

*Agradezco a Dios por haberme permitido alcanzar una meta más, guiando todos y cada uno de mis pasos a lo largo de mi vida, así mismo por darme las fuerzas necesarias para superar cualquier adversidad para poder lograr mis objetivos.*

*Doy gracias a mis padres María y Dagoberto por ser un pilar en mi vida, por estar siempre cerca de mí, por brindarme su apoyo y amor incondicional en cada etapa de mi vida, por sus consejos, sus regaños, pero sobre todo por sus palabras de aliento que me impulsaron a seguir adelante en todo momento y fomentar el deseo de superación.*

*A mis hermanos Yazmin y Simry por brindarme su apoyo incondicional y por su muestra de amor en todo momento.*

*De todo corazón quiero agradecer a mi flaka (Gabriela Islas) por el amor incondicional que me ha brindado a lo largo del tiempo, por ser una de las columnas más importantes en mi vida, por cada palabra de aliento, por tu tolerancia en los momentos difíciles, porque sin su apoyo este logro no habría sido posible, por enseñarme a confiar en mí y jamás darme por vencido. Gracias por todo mi flakita te amo.*

*Al Dr. José Antonio Rodríguez Ávila por darme la oportunidad de trabajar nuevamente con él, por su amistad, por su confianza, por cada llamada de atención, pero sobre todo por haber creído en mí, por transmitirme sus conocimientos y por todas y cada una de las oportunidades que me brindaste a lo largo de estos años, de verdad no tengo palabras para agradecer todo lo que hiciste por mí, un millón de gracias Pepe.*

*Al Dr. José Manuel Miranda López y a su familia Alicia y Santi por su amistad incondicional, por su apoyo, por su cariño y su eficaz labor en la realización de la presente tesis. Por aceptarme y hacerme sentir como parte de la familia durante mi estancia en Lugo, España, gracias por compartirme sus conocimientos.*

*A mis sinodales: Dra. María Elena Páez Hernández; Dr. Fidel Pérez Moreno; Dr. Joseantonio Godoy Reyes, por sus consejos y orientación, a lo largo de la realización de este trabajo, por brindarme su apoyo cada vez que lo necesite, por su tiempo dedicado, pero sobre todo gracias por su amistad.*

*A mi compañero y amigo Prisciliano, por ofrecerme su amistad, por su apoyo, por estar cuando más lo necesite, por brindarme una mano amiga en los momentos difíciles.*

*Gracias también a mis queridos compañeros de laboratorio, que me apoyaron y me brindaron su amistad, Tere, Yu, Irma, Lupita, Evelyn, Iris, Karina, Nacho, Charly, Julio y Juan Manuel.*

*A todas aquellas personas que de una u otra manera participaron en la realización de esta investigación, hago llegar mis más sinceros agradecimientos.*



Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 2 del Área Académica de Química, en el laboratorio de cromatografía y electroforesis capilar de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La investigación se realizó gracias al financiamiento del proyecto CONACYT CB-2006-61310 *“Diseño y validación de sistemas automatizados de separación magnética en flujo”*

Parte de este trabajo ha sido publicado en:

- Rodriguez, Jose A., Espinosa, Johanan., Aguilar-Arteaga, Karina., Ibarra, Israel S., Miranda, Jose M. Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis. *Microchimica Acta* 171 (2010) p. 407.
- Ibarra, Israel S., Rodriguez, Jose A., Paez-Hernandez, Maria E., Santos, Eva M., Miranda Jose M. Determination of quinolones in milk samples by using a combination of magnetic solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 33 (2012) p. 2041.
- Ibarra, Israel S., Rodriguez, Jose A., Miranda, Jose M., Vega, Marisol., Barrado, Enrique. Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. *J. Chromatography A*, 1218 (2011) p. 2196.

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

- ANQUE's International Congress of Chemical Engineering (ANQUE-ICCE, 2012) con el trabajo: *“Magnetic solid phase extraction based on silica adsorbent for the determination of sulfonamides in feed samples by High-Performance Liquid Chromatography-PDA”*
- XXV Congreso Nacional de Química Analítica (2012) con el trabajo: *“Separación de Quinolonas en leche mediante extracción en fase solida magnética”*
- XXIII Congreso Nacional de Química Analítica (2010) con el trabajo: *“Determinación de Tetraciclinas en leche mediante extracción en fase solida magnética-electroforesis capilar”*

## ÍNDICE

Índice de Figuras	i
Índice de Tablas	iii
Abreviaturas	v
Resumen	vii
<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 Historia de los Antibióticos	2
1.2 Antibióticos	3
1.2.1 Clasificación de los antibióticos	3
1.2.1.1 Clasificación según su naturaleza	3
1.2.1.2 Clasificación según el efecto de acción	4
1.2.1.3 Clasificación según el mecanismo de acción	4
1.3 Empleo de antibióticos en medicina veterinaria	6
1.4 Utilización de antibióticos como promotores de crecimiento	6
1.5 Utilización de antibióticos con fines profilácticos y terapéuticos	8
1.6 Residuos de antibióticos en alimentos de origen animal: problemática y legislación	8
1.7 Antibióticos en Leche	9
1.8 Preparación de muestras	11
1.8.1 Extracción líquido-líquido (LLE)	12
1.8.2 Extracción en fase sólida (SPE)	13
1.8.3 Extracción en fase sólida dispersiva (DSPE)	16
1.8.4 Extracción en fase sólida magnética (MSPE)	17
1.9 BIBLIOGRAFÍA	20
<b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
2.1 Objetivo general	30
2.2 Objetivos específicos	30

<b>CAPÍTULO III. SULFAMIDAS</b>	31
3.1 Historia de Sulfamidas	32
3.2 Clasificación	34
3.3 Propiedades Fisicoquímicas	34
3.4 Mecanismo de Acción	36
3.5 Métodos de análisis para la determinación de sulfamidas	37
3.5.1 Métodos espectrofotométricos	37
3.5.2 Métodos electroanalíticos	38
3.5.3 Electroforesis capilar	38
3.5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución	40
3.6 METODOLOGIA EXPERIMENTAL	44
3.6.1 Materiales y reactivos	44
3.6.2 Equipos	44
3.6.3 Tratamiento de la muestra	45
3.6.4 Síntesis de los adsorbentes magnéticos sílice-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	46
3.6.4.1 Síntesis de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	46
3.6.4.2 Obtencion de las partículas sílice-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	46
3.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
3.7.1 Separación cromatográfica	48
3.7.2 Optimización del sistema MSPE	49
3.7.3 Caracterización del adsorbente magnético óptimo	52
3.7.4 Validación y aplicación del método	54
3.8 CONCLUSIONES	58
3.9 BIBLIOGRAFÍA	59
<b>CAPÍTULO IV. QUINOLONAS</b>	64
4.1 Historia y clasificación de las Quinolonas	65
4.2 Comportamiento ácido-base	69
4.3 Análisis de quinolonas	70
4.4 Etapa de extracción	70
4.5 Métodos de análisis para la determinación de quinolonas	71

4.5.1	Métodos espectrofotométricos	71
4.5.2	Métodos espectrofluorimétricos	72
4.5.3	Métodos electroanalíticos	73
4.5.4	Cromatografía líquida de alta resolución	73
4.5.5	Electroforesis capilar	75
4.6	METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	79
4.6.1	Materiales y reactivos	79
4.6.2	Equipos	79
4.6.3	Tratamiento de la muestra	80
4.6.4	Síntesis del adsorbente	81
4.6.5	Análisis mediante Electroforesis Capilar	81
4.7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	82
4.7.1	Separación Electroforética	82
4.7.2	Optimización del método MSPE	82
4.7.3	Caracterización del adsorbente magnético óptimo	86
4.7.4	Validación y aplicación del método	90
4.8	CONCLUSIONES	94
4.9	BIBLIOGRAFÍA	95
<b>CAPÍTULO V. TETRACICLINAS</b>		<b>103</b>
5.1	Historia y clasificación de tetraciclinas	104
5.1.1	Segunda generación de tetraciclinas (semisintéticas)	106
5.2	Propiedades fisicoquímicas	107
5.3	Mecanismo de Acción	108
5.4	Métodos de análisis para la determinación de Tetraciclinas	109
5.4.1	Métodos espectrofotométricos	109
5.4.2	Métodos espectrofluorimétricos	110
5.4.3	Cromatografía de líquidos de alta resolución	110
5.4.4	Electroforesis capilar	112
5.5	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	115
5.5.1	Materiales y reactivos	115

5.5.2 Equipos	115
5.5.3 Tratamiento de la muestra	116
5.5.4 Síntesis de los adsorbentes magnéticos silice-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	117
5.5.5 Análisis mediante Electroforesis Capilar	118
5.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	119
5.6.1 Caracterización de los adsorbente magnéticos	119
5.6.2 Retención y Elución de TCs en muestras de leche	121
5.6.3 Validación y aplicación del método	125
5.7 CONCLUSIONES	130
5.8 BIBLIOGRAFÍA	131
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	<b>136</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b>	Mecanismos de acción de los diferentes antibióticos.	5
<b>Figura 1.2.</b>	Formas de SPE: Jeringa, cartuchos y discos.	14
<b>Figura 1.3.</b>	Esquema de preparación de muestras mediante SPE.	14
<b>Figura 1.4.</b>	Etapas básicas de la MSPE. a) activación, b) extracción, c) aislamiento-lavado, d y e) elución	19
<b>Figura 3.1.</b>	Estructuras Químicas derivados de sulfamidas.	34
<b>Figura 3.2.</b>	Grados de ionización para Sulfamidas.	35
<b>Figura 3.3.</b>	Estructuras químicas de las SAs usadas en ese estudio.	42
<b>Figura 3.4</b>	Reacción de síntesis de magnetita.	46
<b>Figura 3.5</b>	Polimerización de sílice sobre las partículas de magnetita (polimerización en emulsión)	47
<b>Figura 3.6.</b>	Efecto de la composición del gradiente en la separación de SAs de interés. Solución (acuosa HCOOH 1%) y Solución B (HCOOH 1% en CH <sub>3</sub> CN).	49
<b>Figura 3.7.</b>	Porcentajes promedios de retención de SAs a diferentes valores de pH vs Relación del adsorbente magnético (TMFS:TMOS).	51
<b>Figura 3.8.</b>	Difractograma obtenido del análisis del adsorbente magnético óptimo.	52
<b>Figura 3.9.</b>	Espectro FTIR del adsorbente magnético obtenido bajo las condiciones óptimas.	53
<b>Figura 3.10.</b>	Cromatogramas obtenidos en el análisis de sulfamidas mediante MSPE: (A) muestra blanco, (B) muestra de leche real y (C) muestra de leche dopada (200 µg l <sup>-1</sup> ); sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ), sulfametoxipiridazina (SMPZ), sulfaclopiridazina (SCP), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX), sulfadimetoxine (SDM), sulfaquinoxalina (SQX) y estándar interno (EI).	57
<b>Figura 4.1.</b>	Estructuras básicas de los cuatro grupos de quinolonas.	66
<b>Figura 4.2.</b>	Estructuras químicas de QNs de primera generación.	67
<b>Figura 4.3.</b>	Estructuras químicas de QNs de segunda generación.	68
<b>Figura 4.4.</b>	Estructuras químicas de QNs de tercera generación.	68
<b>Figura 4.5.</b>	Estructuras químicas de QNs de cuarta generación.	69
<b>Figura 4.6.</b>	Estructuras y reacciones de disociación ácido-base de QNs.	70

<b>Figura 4.7.</b>	Proceso de separación electroforético.	75
<b>Figura 4.8.</b>	Grafico del área factible y de superficie en el diseño de experimento.	85
<b>Figura 4.9.</b>	Difractograma obtenido del análisis del adsorbente magnético óptimo.	86
<b>Figura 4.10.</b>	Espectro FTIR del adsorbente magnético obtenido bajo las condiciones óptimas.	87
<b>Figura 4.11.</b>	Microscopia Electrónica de Barrido del adsorbente magnético óptimo.	88
<b>Figura 4.12.</b>	SEM-EDS análisis elemental para del adsorbente magnético.	88
<b>Figura 4.13.</b>	Electroferogramas obtenidos en el analisis de quinolonas. : (A) muestra de leche blanco analizada mediante MSPE-CE, (B) una muestra de leche dopada ( $200 \mu\text{g l}^{-1}$ ) analizada por MSPE-CE, (C) análisis de una muestra de leche real analizada por MSPE-CE. Danofloxacino (Dan), ciprofloxacino (CIP), marbofloxacino (MAR), enrofloxacino (ENR), difloxacino (DIF), ácido oxalinico (Ac. OXA) y flumequina (FLU), y como estándar interno (EI).	93
<b>Figura 5.1.</b>	Estructura química del naftaceno y tetraciclinas de primera generación.	105
<b>Figura 5.2.</b>	Segunda generación de tetraciclinas.	106
<b>Figura 5.3.</b>	Grupos ionizables de las tetraciclinas.	107
<b>Figura 5.4.</b>	Espectro FTIR de los adsorbentes magnéticos (PTMS:TMOS) a diferentes radios molares: a) 0.5:1.0, b)1.0:1.0, c) 2.0:1.0, d) 4.0:1.0.	120
<b>Figura 5.5.</b>	(A) Microscopia electrónica de barrido y (B) Distribución de tamaño de partícula de los adsorbentes magnéticos (PTMS:TMOS) a diferentes radios molares: a) 0.5:1.0, b)1.0:1.0, c) 2.0:1.0, d) 4.0:1.0.	121
<b>Figura 5.6.</b>	Porcentajes promedios de retención de TCs a diferentes valores de pH vs Relación del adsorbente magnético (TMFS:TMOS).	123
<b>Figura 5.7.</b>	Isoterma de adsorción y análisis Scatchard.	124
<b>Figura 5.8.</b>	Electroferogramas obtenidos en el análisis de tetraciclinas mediante MSPE: (A) muestra de leche dopada ( $250 \mu\text{g l}^{-1}$ ), (B) muestra de leche real, (C) muestra de leche real por SPE-CE y (D) muestra blanco, CT, clortetraciclina, OT, oxitetraciclina, TC, tetraciclina, DT, doxiciclina, ES, estándar interno, condiciones CE: capilar de sílice fundida ( $41.7 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m I.D}$ ), electrolito soporte, fosfato de sodio 30 mM, sal disodica de EDTA 2 mM y 2-propanol 2% a pH 12.0, voltaje de separación 14 kV; inyección a 0.5 psi 5s.	128

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1.</b>	Antibióticos admitidos como aditivos en animales destinados al consumo.	7
<b>Tabla 1.2.</b>	Adsorbentes más comunes en SPE.	15
<b>Tabla 3.1.</b>	Determinación de sulfamidas en leche mediante CE.	39
<b>Tabla 3.2.</b>	Determinación de sulfamidas en leche mediante HPLC.	41
<b>Tabla 3.3.</b>	Porcentaje de retención a diferentes valores de pH vs Relación del adsorbente magnético (TMFS:TMOS).	50
<b>Tabla 3.4.</b>	Resultados del análisis Scatchard.	54
<b>Tabla 3.5.</b>	Parámetros de regresión de la curva de calibrado, área de pico (mAU) vs concentración de SAs ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en 10 ml de muestra.	55
<b>Tabla 3.6.</b>	Porcentaje de recuperación de sulfamidas y % RSD (n = 6) en muestras de leche dopadas mediante MSPE.	56
<b>Tabla 4.1.</b>	Determinación de quinolonas en leche mediante HPLC.	74
<b>Tabla 4.2.</b>	Determinación de quinolonas en leche mediante CE.	76
<b>Tabla 4.3.</b>	Estructura química general para las QNs de estudio.	78
<b>Tabla 4.4.</b>	Resultados obtenidos con el diseño Simplex-Reticular bajo las condiciones óptimas.	84
<b>Tabla 4.5.</b>	Resultados del análisis Scatchard.	89
<b>Tabla 4.6.</b>	Parámetros de regresión de la curva de calibrado, adsorbancia (mAU) vs concentración de QNs ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en 50 ml de muestra.	91
<b>Tabla 5.1.</b>	Determinación de tetraciclinas en leche mediante HPLC.	111
<b>Tabla 5.2.</b>	Determinación de tetraciclinas en leche mediante CE.	113
<b>Tabla 5.3.</b>	Porcentaje de retención (promedio y %RSD, n = 3) a diferentes valores de pH y adsorbentes magnéticos a diferentes relaciones molares (PTMS:TMOS).	122
<b>Tabla 5.4.</b>	Porcentaje de recuperación (promedio y %RSD, n = 3) in la re-extracción de TCs.	124
<b>Tabla 5.5.</b>	Limites de detección obtenidos a diferentes volúmenes de leche mediante MSPE.	125
<b>Tabla 5.6.</b>	Parámetros de regresión de la curva de calibrado, área de pico (mAU) vs concentración de TCs ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en 200 ml de muestra.	126

<b>Tabla 5.7.</b>	Porcentaje de recuperacion de tetraciclinas (TCs) y %RSD (n = 3) en muestras de leche dopadas mediante MSPE.	127
<b>Tabla 5.8.</b>	Contenido de oxitetraciclina ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en muestras de leche real obtenidas de diferentes marcas.	129

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>Ac. OXA</b>	Ácido Oxalínico
<b>AU</b>	Unidades arbitrarias
<b>C<sub>8</sub></b>	Octiltrimetoxisilano
<b>CE</b>	Electroforesis capilar
<b>CIP</b>	Ciprofloxacina
<b>CT</b>	Clortetraciclina
<b>CTAB</b>	Bromuro de cetiltrimetil amonio
<b>CTMS</b>	Clorotrimetilsilano
<b>DAN</b>	Danofloxacina
<b>DIF</b>	Difloxacina
<b>DSPE</b>	Extracción en fase sólida dispersiva
<b>DT</b>	Doxiciclina
<b>DVP</b>	Voltamperometria diferencial de pulsos
<b>ECL</b>	electroquimioluminiscencia
<b>EI</b>	Estándar interno
<b>ENR</b>	Enrofloxacina
<b>EU</b>	Unión Europea
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>FL</b>	Fluorescencia
<b>FLU</b>	FLumequina
<b>FTIR</b>	Infrarrojo con trasformada de Fourier
<b>GC</b>	Cromatografía de gases
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>LLE</b>	Extracción líquido-líquido
<b>LOD</b>	Limite de detección
<b>LOQ</b>	Limite de cuantificación
<b>m</b>	Magnetita
<b>MAR</b>	Marbofloxacina

<b>MRLs</b>	Límite máximo residual
<b>MS</b>	Espectroscopia de masas
<b>MSPE</b>	Extracción en fase sólida magnética
<b>OT</b>	Oxitetraciclina
<b>PABA</b>	p-aminobenzoico
<b>pKa</b>	Constante de disociación acidas
<b>PTMS</b>	Feniltrimetoxisilano
<b>QNs</b>	Quinolonas
<b>RSD</b>	Desviación estándar relativa
<b>SAM</b>	Sulfacetamida
<b>SAs</b>	Sulfamidas
<b>SCP</b>	Sulfaclopiridazina
<b>SDM</b>	Sulfadimetoxina
<b>SDZ</b>	Sulfadiazina
<b>SEM</b>	Microscopia electrónica de barrido
<b>SFX</b>	Sulfisoxasol
<b>SLD</b>	Diseño Simplex-Reticular
<b>SMPZ</b>	Sulfametoxipiridazina
<b>SMTD</b>	Sulfametoxidiazina
<b>SMX</b>	Sulfametoxazol
<b>SMZ</b>	Sulfametazina
<b>SPE</b>	Extracción en fase sólida
<b>SQX</b>	Sulfaquinoxalina
<b>STZ</b>	Sulfatiazol
<b>TC</b>	Tetraciclina
<b>TCs</b>	Tetraciclinas
<b>TEM</b>	Microscopia electrónica de transmisión
<b>TMOS</b>	Tetrametoxisilano
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-visible
<b>XRD</b>	Difracción de rayos X

## RESUMEN

El uso de antibióticos como promotores del crecimiento en animales destinados al consumo humano representa una práctica frecuente, dentro de los antibióticos más usados con esta finalidad se encuentran las sulfamidas, quinolonas y tetraciclinas. Su aplicación indiscriminada puede ocasionar que residuos de estos persistan y puedan ocasionar problemas al consumidor (alergias, problemas gastrointestinales, desarrollo de resistencias, entre otros), a causa de esta problemática se han desarrollado diversas metodologías analíticas para la determinación de residuos de estos compuestos. El análisis de estos analitos en muestras complejas, como la leche, representa un reto ya que requiere en muchas ocasiones de varias etapas de tratamiento por lo que la preparación de la muestra es un punto crítico en el análisis de residuos.

Dentro de la etapa de preparación de muestras para el análisis de residuos de antibióticos en leche se encuentran técnicas como: precipitación, filtración, centrifugación, extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida y extracción en fase sólida dispersiva. La principal desventaja de estas técnicas es que requieren una mayor manipulación de la muestra lo que puede originar la pérdida del analito.

En la búsqueda de nuevas opciones, la extracción en fase sólida magnética (MSPE) ha sido bien recibida debido a sus aplicaciones. Esta técnica se basa en la dispersión de un adsorbente magnético en una muestra líquida. Los analitos adsorbidos sobre la superficie del adsorbente magnético pueden ser aislados y eluidos mediante el uso de solventes apropiados. La propiedad más atractiva de MSPE es el aislamiento fácil de los adsorbentes magnéticos de la muestra mediante la aplicación de un campo magnético externo, minimizando la manipulación y el tiempo en el tratamiento de la muestra. Por lo que la MSPE permite la separación selectiva de compuestos orgánicos como son antibióticos que se encuentran presentes en matrices complejas.

El presente trabajo presenta alternativas de análisis basadas en el uso de MSPE acoplada a cromatografía de líquidos de alta resolución y electroforesis capilar, las cuales se aplican a la determinación de residuos de antibióticos en muestras de leche. Las metodologías propuestas son competitivas respecto a los métodos convencionales, concluyéndose que la aplicación de MSPE permite diseñar metodologías robustas, precisas y exactas que dan respuesta a los límites establecidos por las normativas internacionales.

*CAPÍTULO I*



*INTRODUCCIÓN*

## 1.1 Historia de los Antibióticos

Las bacterias fueron identificadas por primera vez en 1674 por Anton Van Leeuwenhoeck, sin embargo no se reconoció su capacidad para provocar enfermedades hasta finales del siglo XIX. Este descubrimiento realizado por Louis Pasteur inició la revolución médica moderna que desencadenó a mediados del siglo XX el desarrollo de antibióticos. En el año 1877, Pasteur y Joubert fueron algunos de los primeros investigadores en reconocer el potencial clínico de productos microbianos como agentes terapéuticos. Paul Ehrlich fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva, es decir, cuando un antibiótico afecta a un grupo determinado de microorganismos y estableció las relaciones químicas específicas entre los parásitos y medicamentos, el desarrollo de resistencia a medicamentos en los parásitos y el papel terapéutico para combatir dicha resistencia [Chambers, H.S. 1996; Madigan, M.T. 2000; Wyngaarden, J. 1994].

En 1908, Paul Gelmo realizó la síntesis de la primer antibiótico (antimicrobiano) denominado sulfamida (*p*-amino-benceno-sulfonamida), empleada como producto intermediario en la producción de colorantes azo con sulfamidas, sin embargo no fue si no hasta 1930 cuando las sulfamidas se utilizaron como agentes antimicrobianos en el tratamiento de septicemia estafilococcica. En 1928, Alexander Fleming notó los efectos de la penicilina al dejar un cultivo de estafilococo mientras vacacionaba. Fleming observó que había crecido un microorganismo y que además, este estaba atacando a las bacterias. Fleming llamó a este microorganismo penicilina. En 1941 en la llamada "Edad de Oro" Howard W. Florey y Ernst B. Chain aislaron una muestra del microorganismo de Fleming y crearon un nuevo tipo de penicilina un millón de veces más potente que la muestra original, con ello comenzó la producción de la penicilina y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos. Simultáneamente con las penicilinas, han sido descubiertos y comercializados otro tipo de antibióticos, además de modificaciones químicas a estos compuestos, con lo que se ha logrado mejorar su actividad antimicrobiana [Appleton, A. 2001; Chambers, H.S. 1996; Young, L. 1994]

El número de antibióticos ha ido en aumento a lo largo de los últimos años, particularmente de derivados de nuevas especies, o mutaciones de organismos ya anteriormente estudiados. Actualmente existen más de 2500 de antibióticos registrados, pero el número comercializado es relativamente menor. [Sanjurjo, M. 1997].

## 1.2 Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diversas especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen la proliferación de otros microorganismos originando su destrucción.

Los antibióticos muestran diferencias notables en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en sus espectros antibacterianos y en sus mecanismos de acción. Estos actúan a través de dos mecanismos principales: matando los microorganismos existentes (acción bactericida), e impidiendo su reproducción (acción bacteriostática). El antibiótico ideal interfiere en las funciones vitales de las bacterias sin afectar a las células huésped [Booth, N.H. 1987].

En la actividad de un antibiótico se tiene que tener en cuenta:

- El que un antibiótico inhiba o mate a una bacteria depende de la concentración. Para la mayoría de los antibióticos, a mayor cantidad, mayor acción lítica.
- El efecto bactericida también puede depender del tiempo. En el caso de antibióticos glucopéptidos y  $\beta$ -lactámicos, es más importante mantener constante una determinada concentración a lo largo del tiempo que emplear una concentración muy elevada y un tratamiento corto.
- Los antibióticos pueden actuar juntos de forma sinérgica, antagónica o indiferente.

### 1.2.1 Clasificación de los antibioticos

Las múltiples clasificaciones existentes presentan diferentes características y se basan en distintos criterios; por tal motivo, es difícil determinar cuál es la ideal. De ellas las más utilizadas son las que se mencionan a continuación.

#### 1.2.1.1 Clasificación por su naturaleza

Los fármacos antibacterianos se dividen en dos grupos: las drogas sintéticas o quimioterapéuticos y los antibióticos. Los primeros son aquellos obtenidos por síntesis en un laboratorio, mientras que los antibióticos son elaborados por el metabolismo propio de seres vivos. Sin embargo, el uso común a menudo ha ampliado el término antibiótico de modo que incluya todos los antibacterianos sean o no sean sintetizados por microorganismos [Chambers, H.S. 1996; Goodman, A. 1993].

## 1.2.1.2 Clasificación según el efecto de acción

Según el efecto de su acción sobre las bacterias, los antibióticos se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, dependiendo si inhiben el crecimiento u originen la lisis de bacteria, respectivamente; sin embargo esta clasificación es bastante inexacta, pues los efectos pueden variar en función del tipo de microorganismo y de la concentración del antibiótico [Alvares, J. 2002; Booth, N.H. 1987;].

## 1.2.1.3 Clasificación según el mecanismo de acción

Los antibióticos se pueden clasificar, en función de la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos [Goodman, A. 1993]. De este modo encontramos:

- **Inhibidores de la síntesis de la pared celular:** Las bacterias son microorganismos muy complejos que al entrar en contacto con los tejidos de los mamíferos necesitan mantener su integridad, para lo cual, han desarrollado una pared celular rígida. La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana generalmente tiene un efecto bactericida. La pared de las bacterias está constituida por una estructura denominada peptidoglicano, cuya síntesis se divide en tres etapas principales, cada una de éstas es inhibida por un grupo de antibióticos diferente. Los antibióticos que entran en este grupo son las penicilinas, cefalosporinas, glicopéptidos, fosfonatos, tercoplaninas y bacitracina.
- **Modificadores de la función de la membrana celular:** Compuestos que actúan de modo indirecto sobre la membrana celular del microorganismo afectado su permeabilidad y permitiendo la fuga de compuestos intracelulares. La membrana citoplásmica es fundamental para la regulación del medio intracelular de la bacteria. Esta membrana tiene una estructura particular en las bacterias y puede lesionarse por algunos productos, de esta forma, se obtiene una actividad antimicrobiana selectiva. Los antibióticos que entran en este grupo son polimixinas, colistinas, anfotericina C.
- **Inhibidores de la síntesis proteica:** dentro de este grupo de antibióticos, se dividen en aquellos que actúan alterando la funcionalidad de las subunidades ribosómicas 30S, como aminoglucósidos, aminociclitolos y tetraciclinas, y aquellos que actúan sobre la subunidad 50S, como macrolitos, lincosamidas y amfenicoles causando una inhibición reversible de la síntesis proteica y aquellos que se unen a la subunidad 30S alterando la síntesis proteica y dando lugar a la muerte celular.

- **Inhibidores de la síntesis o función de los ácidos nucleídos:** Estos pueden actuar mediante tres mecanismos: interfiriendo la replicación de ADN, impidiendo la transcripción o inhibiendo la síntesis de metabolitos esenciales. Entre estos fármacos se encuentran las quinolonas y rifamicinas.
- **Antibióticos que antagonizan rutas metabólicas:** Por ejemplo, fármacos que interfieren en la síntesis del ácido fólico como sulfamidas y trimetopimas.

En la Figura 1.1 se muestran los lugares de acción de los diferentes tipos de antibióticos [Lehninger, A.L. 1995].

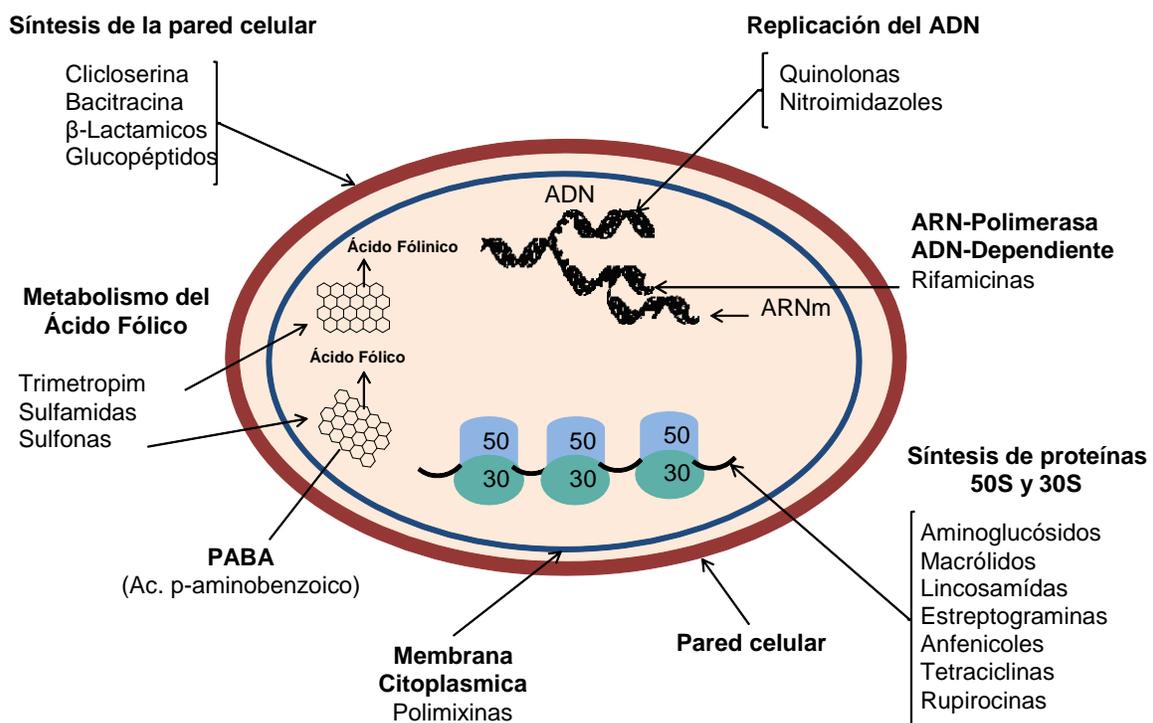


Figura 1.1. Mecanismos de acción de los diferentes antibióticos.

### **1.3 Empleo de antibióticos en veterinaria**

Los antibióticos se empezaron a utilizar en veterinaria poco después de su aplicación en medicina humana. Hoy en día la gran variedad de antibióticos existentes permiten el tratamiento de enfermedades infecciosas que afectan tanto a animales de compañía como a los destinados al consumo humano, permitiendo mantener la salud de la población.

El empleo de antibióticos en animales de compañía tiene fines terapéuticos y profilácticos, mientras que en animales productores de alimentos también se pueden utilizar como promotores del crecimiento añadiéndolos en dosis subterapéuticas durante periodos de tiempo prolongados [Madrigal, C.U. 2000].

### **1.4 Utilización de antibióticos como promotores de crecimiento**

Los antibióticos se utilizan ampliamente como aditivos en el alimento y el agua en animales destinados a la producción de alimentos. La adición de antibióticos en alimentos en pequeñas dosis aumenta el ritmo de crecimiento del animal. Se creó que la forma en que promueven el crecimiento se debe a la eliminación de organismos causantes de infecciones subclínicas, a la reducción de sustancias tóxicas que retardan el crecimiento como el amoníaco, y a la menor destrucción y competencia por nutrientes en el tracto gastrointestinal por parte de los microorganismos. Como consecuencia existe una mayor capacidad de adaptación de los animales a los cambios de alimentación y a la administración de enfermedades causadas por el transporte y los cambios de medio ambiente, con lo cual se logran mayores ganancias de peso con menor cantidad de alimento consumido en menores periodos de tiempo [Dibner, J.J. 2005; Eyssen, H. 1963].

El aumento en el crecimiento se describe como una interacción compleja de factores nutritivos, fisiológicos, microbianos y patológicos. Esta respuesta es distinta para cada especie animal aún y cuando pertenezcan a la misma especie, es distinta según la raza, la edad de los animales, las condiciones ambientales o el tipo de alimentación. El índice de conversión del alimento y el índice de crecimiento suelen aumentar conforme aumenta la dosis del antibiótico. Sin embargo el efecto de los antibióticos es más notorio cuando se presentan casos de poca higiene, ya que los antibióticos actúan frente a agentes infecciosos.

No obstante, es posible diferenciar el efecto estimulante del crecimiento ejercido por los antibióticos del efecto que tienen como preventivos de enfermedades, sobre todo cuando se trata de antibióticos que no se absorben en el intestino [Dibner 2005; Eyssen, H. 1963; Visek, W.J. 1978].

De manera simultánea el empleo de antibióticos en zootecnia origina ventajas medioambientales, ya que una mayor productividad permite una reducción significativa del número de animales necesarios para alimentar una determinada población. Un menor número de animales implica una menor carga para el medio ambiente como resultado menor producción de metano y menores concentraciones de nitrógeno y de fósforo en el estiércol y por tanto menor contaminación en agua.

Sin embargo la utilización de antibióticos como aditivos en alimentos de consumo animal, como promotores de crecimiento, puede originar varios inconvenientes. Pueden inducir la resistencia a los antibióticos en los microorganismos, tanto en bacterias que producen infecciones zoonóticas como en las bacterias patógenas que actúan como reservorios de plásmidos para las bacterias dotadas de mayor grado de virulencia, dejando residuos de antibióticos en alimentos producidos por dichos animales [Visek, W.J. 1978].

Con el fin de evitar problemas de inducción de resistencias o de residuos en los alimentos, algunas autoridades sanitarias tanto internacionales como de diversos países han establecido listas de antibióticos (Tabla 1.1) que pueden ser utilizados como aditivos en la alimentación animal [B.O.E 1988; Butaye, P. 2003; Ortega, E. 1988; Walton, J.R. 1983].

**Tabla 1.1.** Antibióticos admitidos como aditivos en animales destinados al consumo.

<b>Antibiótico</b>	<b>Animal Productor</b>
Bacitracina de zinc	Aves, Ternera, Cordero, Cerdo
Espiramicina	Aves, Ternero, Cordero, Cerdo
Virginiamicina	Aves, Ternero, Cordero, Cerdo, Ganado vacuno
Flavofosfolipol	Aves, Ternero, Cordero, Cerdo, Ganado vacuno
Fosfato de tilosina	Cerdo
Monensina sódica	Ganado vacuno
Avoparcina	-
Sanilomicina sódica	Cerdo
Avilamicina	Aves, Cerdo

## **1.5 Utilización de antibióticos con fines profilácticos y terapéuticos**

La producción animal a gran escala ha favorecido el desarrollo de productos que protegen la salud de los animales. Por razones económicas y medioambientales, muchas formas de producción animal suponen un gran número de animales en un espacio reducido. En esta situación, las infecciones subclínicas pueden dañar seriamente la productividad de la explotación, ya que en un momento dado, pueden alcanzar proporciones clínicas y afectar rápidamente a todos los animales.

Sin embargo, el tratamiento de manera individual para cada animal es prácticamente imposible; es por ello que es de importancia la adición de antibióticos y otros medicamentos al alimento del animal, para prevenir enfermedades. Tras la administración de antibióticos en veterinaria, es necesario respetar un plazo de espera o periodo de supresión antes de utilizar todo producto de consumo proveniente del animal como la carne, leche, huevos o cualquier producto de origen animal, para que el antibiótico haya sido eliminado totalmente y no queden residuos o que estos se encuentren por debajo de un límite máximo admisible [Chambers, H.S. 1996; Madrigal, C.U. 2009; Walton, J.R. 1983].

## **1.6 Residuos de antibióticos en alimentos de origen animal: problemática y legislación**

La utilización de antibióticos en animales destinados al consumo humano proporciona innegables ventajas, ya que permite una mejora en la producción. Los beneficios alcanzan al consumidor, que encuentra disponibles con mayor facilidad proteínas de origen animal. Sin embargo, existe la posibilidad de que residuos de dichos compuestos (o sus metabolitos) persistan en el animal y por tanto pasen a la cadena de alimentación humana, originando una serie de riesgos que implican problemas de índole sanitaria (toxicidad y aparición de resistencias), problemas tecnológicos y analíticos.

El consumo de alimentos de origen animal que contiene residuos de antibióticos puede producir los mismos efectos perjudiciales que si los antibióticos se administraran de forma directa en una dosis equivalente. Los efectos tóxicos en general son poco probables, ya que los residuos se encuentran en los alimentos en pequeñas cantidades, pero en ciertos individuos pueden producir reacciones alérgicas.

Uno de los principales efectos desde un punto de vista sanitario es el desarrollo de resistencias bacterianas, la cual se puede extender de un microorganismo a otro pasando de los animales al hombre.

La ruta principal por la que pueden transmitirse las bacterias resistentes de los animales al hombre es el contacto directo con los animales que se encuentran en tratamiento con algún tipo de antibiótico o el consumo de alimentos de origen animal que contenga residuos de los mismos.

Otra vía de transmisión de mayor importancia es el consumo o manipulación de productos de origen animal tal y como son: leche, huevos y carne, las cuales pueden contener flora resistente a antibióticos. La leche generalmente se pasteuriza y aunque es poco probable que contenga bacterias resistentes, sin embargo puede contener residuos de antibióticos como resultado de la exposición a tratamientos terapéuticos o al empleo de los mismos con fines de promotores del crecimiento [Dibner, J.J. 2005; Errecalde, J.O. 2005; Vipin, K.A. 1992].

## **1.7 Antibióticos en Leche**

El uso de medicamentos veterinarios, y concretamente aquellos de tipo antiinfeccioso, representa una práctica muy frecuente en la crianza y explotación de ganado, que resulta necesaria para el mantenimiento de un nivel productivo económico.

Actualmente, existe una gran variedad de antibióticos empleados en el tratamiento de enfermedades que afectan, tanto a los animales con fines de compañía como a los destinados a la producción de alimentos para consumo humano. Los antibióticos se emplean en la industria ganadera de forma terapéutica, profiláctica y como promotores del crecimiento, como el uso de antibióticos en el tratamiento de la mastitis de las vacas lecheras. En el caso del ganado lechero, el tratamiento de estos animales se lleva a cabo con agentes antimicrobianos que presentan efectos positivos que se contrarrestan con el hecho de que pueden aparecer residuos de estos antibióticos en muestras de leche, incluso varios días después de finalizar el tratamiento [Shahani, K.M. 1986].

La presencia de estas sustancias antimicrobianas en leche puede originar ciertas consecuencias desde el punto de vista toxicológico y tecnológico. Es por ello que los programas de control se dedican a controlar la presencia de residuos de estas sustancias antimicrobianas, ya que influyen directamente en la calidad del mismo [Mol, H. 1975].

El control de la presencia de residuos de antibióticos en la leche se encuentra regulado por normativas internacionales que establecen la detección de residuos de antibióticos empleados con fines veterinarios en productos de origen animal destinados al consumo humano. Además se especifica que la leche destinada al consumo humano no ha de presentar residuos de antibióticos por encima de los Límites Máximos de Residuos permitidos (LMRs) [Food and Drug Administration

Reg. 207 1998; Commission Regulation (EU) No. 281/96 1999; Commission Regulation (EU) No 508/99 1999; Commission Regulation (EU) No 37/2010 2010].

Para establecer un control de residuos de antibióticos es necesario conocer la causa de su presencia en la leche y cuáles son las sustancias que se emplean con mayor frecuencia, ya que el uso de estos puede variar entre distintas zonas. Adicionalmente se debe tener conocimiento de otros factores que puedan influenciar las características de los métodos empleados en su detección.

La leche es un producto de alto consumo con un elevado valor nutritivo es considerado un alimento de gran importancia. Por este motivo se han desarrollado diversos procesos para su control higiénico-sanitario [Shahani, K.M. 1986].

Algunos antibióticos como las tetraciclinas, quinolonas, sulfamidas, penicilinas, estreptomina, son usados en el tratamiento de enfermedades infecciosas así como para mejorar el rendimiento productivo del ganado, lo que ha provocado su aplicación indiscriminada. Sin embargo residuos de estos antibióticos pueden inhibir el desarrollo de la flora microbiana que ha podido contaminar un alimento, de esta forma cuando se realiza un análisis bacteriológico puede pasar desapercibida la presencia de agentes patógenos; debido a ello se podría permitir la comercialización de un alimento potencialmente peligroso o de mala calidad bacteriológica, cuyos agentes patógenos se desarrollan una vez que la manipulación del efecto inhibidor de los antibióticos se haya disipado [Sawant, A.A. 2005; Zwald, A.G. 2004].

Todos estos problemas han ocasionado que ciertas instituciones como en la Unión Europea, Codex alimentarius y la Food and Drug Administration (FDA) hayan establecido normativas necesarias para garantizar la seguridad, eficacia y calidad de todos los alimentos de origen animal destinados al consumo humano [Codex Alimentarius ALINORM 89/31, Appendix VI 1989; Food and Drug Administration Reg. 207 1998; Commission Regulation (EU) No. 281/96 1999; Commission Regulation (EU) No 508/99 1999; Commission Regulation (EU) No 37/2010 2010].

Desde el punto de vista de la química analítica, el análisis de estos analitos representa un reto ya que la matriz de trabajo es compleja y se requiere en muchas ocasiones de varias etapas durante el tratamiento de las mismas como la precipitación de proteínas y la pre-concentración. De forma paralela el uso de técnicas de separación y análisis son la alternativa más utilizada para éste fin, sin embargo la etapa de la preparación de la muestra es el punto crítico en el análisis de residuos.

## 1.8 Preparación de muestras

El desarrollo de una metodología analítica para la determinación de residuos de antibióticos en muestras de alimentos de origen animal se encuentra influenciado por una serie de etapas independientes, sin embargo una de las etapas de importancia en un proceso analítico resulta ser la preparación de muestras la cual puede repercutir directamente en el resultado analítico. Esta etapa se basa en la obtención de una muestra adecuada para su análisis a partir de una muestra real, la cual consiste en disminuir la concentración de las sustancias encontradas en muestras de alimentos de origen animal con excepción del analito. Una típica preparación de muestras implica principalmente de un cambio en el entorno químico de la muestra, en el conocimiento de las propiedades físicas y químicas de las especies, así como de la concentración del analito, la cantidad de muestra y la detección del sistema [Ávila, M. 2001; Chena, Y. 2008; Delgado-Zamarreño, M.M. 2012; Moats, W.A. 1995].

Cuando se emplean sistemas de detección fisicoquímicos, es necesario realizar un procedimiento de limpieza exhaustivo y extracción para separar los compuestos de interés de sustancias que se encuentran presentes dentro de la matriz antes de su detección.

La etapa de limpieza puede no ser necesaria en el caso de los análisis microbiológicos e inmunoquímicos, ya que para ello solo es necesaria la homogenización de la muestra en medio acuoso para su análisis. Los sistemas de detección son usualmente independientes del tamaño de la muestra, ya que en muchos casos es suficiente una gota o una pequeña porción de tejido para llevar a cabo un análisis.

En la etapa de preparación de muestra se incluyen todas las técnicas que involucran la manipulación de la muestra para la separación de los analitos de la matriz analítica, su aislamiento libre de interferencia que pueda encontrarse presente en la matriz antes de su identificación y cuantificación. Los métodos de preparación de muestras de leche durante el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de residuos de antibióticos pueden ser variados. La elección de las etapas depende de las características físico-químicas que presenta cada especie de antimicrobianos. La etapa de pretratamiento incluye procedimientos como: precipitación, filtración, centrifugación, mientras que la etapa de pre-concentración involucra sistemas de extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE) y extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) [Botsoglou, N.A. 2001; Ridgway, K. 2007; Santos, S.M. 2007; Zhang, Y. 2013].

La leche es un alimento complejo en su composición, desde un punto de vista físico-químico, es un sistema coloidal constituido por una solución acuosa que contiene principalmente lactosa, sales y otros elementos en estado de disolución; las proteínas que la conforman se encuentran en un estado de suspensión, mientras que las grasas se encuentran emulsificadas. Dependiente de las características de los analitos, éstos pueden formar parte de la fase acuosa o de la fase lipídica. Adicionalmente la interacción de los mismos con las proteínas condiciona el uso de etapas adicionales en el pretratamiento, lo que se relaciona con la constante de afinidad analito-proteína [McCarthy, O.J. 2002; Park, Y.K. 2007; Raynal-Ljutovac, K. 2008; Singh, H. 2011].

Uno de los procedimientos más utilizados en el análisis de leches incluye la precipitación de proteínas disminuyendo el valor del pH o adicionando disolventes orgánicos como metanol o acetonitrilo. En el caso de analitos hidrosolubles se aísla la fase líquida para su tratamiento, mientras que para el caso de analitos liposolubles se analiza la fase sólida. La separación de ambas fases se realiza de manera convencional mediante filtración o centrifugación, siendo la última la más utilizada debido a que se obtienen mejores recuperaciones en el análisis de trazas. [Park, Y.K. 2007; Singh, H. 2011]

Debido a que en el presente proyecto se analizan antibióticos hidrosolubles, a continuación se presentan las técnicas de preconcentración más utilizadas en el análisis de estos analitos en muestras de leche.

## **1.8.1 Extracción líquido-líquido (LLE)**

La LLE es uno de los procedimientos más empleados en el pretratamiento de muestras. Esta técnica se basa en el reparto del analito entre dos solventes inmiscibles: uno de los líquidos es un solvente acuoso (suero lácteo) mientras que el otro es un solvente orgánico. La LLE es considerada una técnica relativamente rápida, simple y flexible ya que se puede aplicar a diversos tipos de matrices, desde componentes con una elevada polaridad hasta no polares y puede presentar un asilamiento selectivo [Koltho, I.M. 1969; Valcárcel, M. 1988].

En LLE a menudo se aplica para aislar los analitos de interés en un solvente orgánico y posteriormente se preconcentran las sustancias extraídas mediante la evaporación del solvente. Sin embargo si se emplean técnicas como cromatografía en fase inversa para su análisis, los analitos requieren una etapa de cambio de fase para poder ser inyectados a la fase polar que fluye a través de la columna cromatográfica [Valcarcel, M. 1988].

Los métodos oficiales establecen el solvente de extracción adecuado para un determinado analito, en el caso principalmente del análisis de residuos de antibióticos generalmente se utilizan solventes no polares como hexano, diclorometano, acetato de etilo, cloroformo o mezclas de ellos; en algunos casos se requiere del control de pH en la fase acuosa cuando los analitos presentan propiedades ácido-base. Algunos solventes orgánicos con bajo peso molecular como: alcoholes, cetonas, aldehídos y acetonitrilo resultan ser inadecuados en una LLE debido a que son miscibles en la fase acuosa.

Existen diversas maneras de hacer más selectivas las LLE entre las cuales destacan: la adición de sales inorgánicas, el pH de la fase acuosa y la formación de pares iónicos [Horwitz, W. 2005].

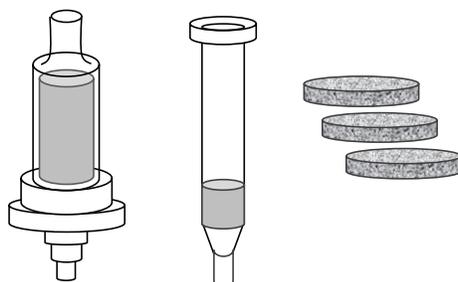
## 1.8.2 Extracción en fase sólida (SPE)

La SPE es una técnica desarrollada a mediados de los años 70 como alternativa a la LLE. Hoy en día es la técnica de preparación de muestra más utilizada. Con la SPE se consigue concentrar y purificar los analitos mediante su retención en una fase sólida o una fase líquida inmovilizada sobre un adsorbente sólido, para su posterior elución mediante la adición de un solvente adecuado [Fritz, J.S. 2000; Liska, I. 2000; Wachob, G.D. 1983]. La SPE ofrece una serie de ventajas relevantes sobre las técnicas de extracción convencionales entre las que se destacan:

- Baja manipulación de la muestra
- Técnica relativamente rápida
- Elevada eficiencia de concentración
- Menor consumo de solventes en comparación con LLE
- Ausencia de emulsiones
- Posibilidad de automatización
- Versatilidad en el tipo de adsorbentes utilizados

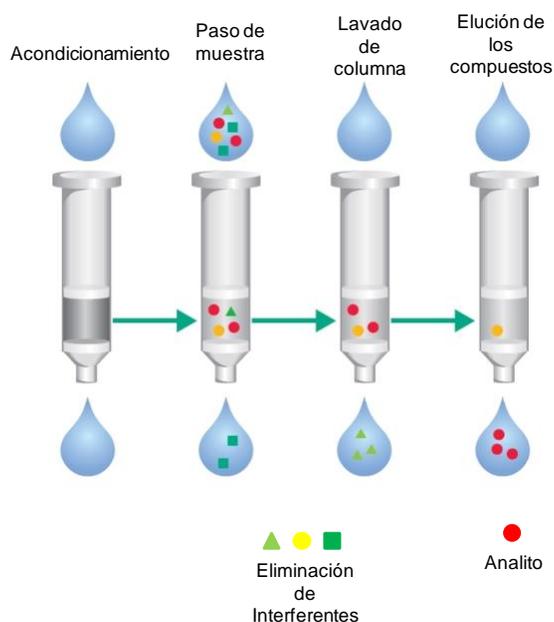
El adsorbente de extracción en SPE está dispuesto en tres posibles formas: en forma de discos, cartuchos y jeringas (Figura 1.2). El primero se utiliza principalmente para concentrar grandes volúmenes de muestras (2 a 4 l), permitiendo flujos de paso del líquido muy elevados debido a la escasa resistencia al paso de muestra que poseen, mientras que los cartuchos y jeringas pueden ser fácilmente integrados en sistemas en línea, generalmente cromatografía de líquidos.

De este modo, la manipulación de la muestra es mínima, aunque los volúmenes concentrados son inferiores a los empleados en las aplicaciones fuera de línea.



**Figura 1.2.** Formas de SPE: Jeringa, cartuchos y discos.

El proceso de concentración de la muestra en SPE consta de las siguientes etapas básicas (Figura 1.3): a) acondicionamiento de la fase estacionaria, b) paso de la muestra a través del material adsorbente, c) lavado y d) elución.



**Figura 1.3.** Esquema de preparación de muestras mediante SPE.

Los cartuchos de SPE son fabricados de polipropileno o polietileno con la finalidad de eliminar la adsorción irreversible de los analitos en su superficie, son rellenos con partículas porosas con un diámetro de 40  $\mu\text{m}$ .

Las más comunes son las de sílices enlazadas, polímeros de tipo estireno-divinilbenceno, carbón grafitado, silicato de magnesio, sílica gel y óxidos de aluminio (Tabla 1.2) [Hennion, M.C. 2000; Leon-Gonzalez, M.D. 2000; Liska, I. 2000; Poole, C.F. 2000].

**Tabla 1.2.** Adsorbentes más comunes en SPE.

Adsorbente	Tipo de fase	Estructura
Octadecilsilano (C <sub>18</sub> )	Inversa	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>
Octilsilano (C <sub>8</sub> )	Inversa	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>
Fenilsilano	Inversa	-Si-Ph
Sílice	Normal	-Si-OH
Cianopropil	Normal	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CN
Diolsilano	Normal	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -CHOH-CH <sub>2</sub> OH
SCX	Intercambio Iónico	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
SAX	Intercambio Iónico	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N <sup>+</sup> CH <sub>3</sub>
CBA	Intercambio Iónico	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -COO <sup>-</sup>
Amberlita XAD-2	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
Bond Elut ENV+	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
Isolute ENV+	Polimérica	Poliestireno-divinilbenceno
Oasis HLB	Polimérica	Divinilbenceno-vinilpirrolidona

Hoy en día existen una gran cantidad de adsorbentes con características polares, no polares o intercambio iónico; estos son diseñados para ser empleados en fase normal, fase inversa e intercambio iónico respectivamente. La SPE permite un alto grado de selectividad a través del uso de adsorbentes adecuados o con una apropiada combinación de una serie de ellos, los cuales por sus características mejoran la selectividad de la extracción [Fritz, J.S. 1999; Pesek, J.J. 2000; Pichon, V. 1996; Poole, C.F. 2000; Thurman, E.M. 1998].

Dentro de las aplicaciones encontradas para los analitos estudiados, la SPE es una de las técnicas de pre-concentración de muestras de mayor empleo en la actualidad. Por ejemplo en la pre-concentración de antibióticos en alimentos, los cartuchos más empleados son sílices funcionalizadas y materiales poliméricos (C18, Oasis HLB) [Tang, Q. 2009; Vera-Candioti, L. 2010; Zhou, J. 2009].

Sin embargo, en años recientes se han empleado adsorbentes con características de polaridad mixta (Oasis MAX-MCX) para la extracción conjunta de ciertos antibióticos. Los solventes comúnmente usados en la elución de estos analitos son acetato de etilo, acetona, metanol y acetonitrilo [Lara, F.J. 2006; Koesukwiwat, U. 2007].

El uso de algunas de estas técnicas usualmente requieren del empleo de solventes tóxicos e inflamables, así mismo en muchos casos se requieren del uso de grandes volúmenes de solventes y por tanto: suelen ser costosos, conllevan a una extensa manipulación de la muestra ya que son métodos de extracción laboriosos lo cual puede originar la pérdida de los analitos de interés. Durante los últimos años se han desarrollado alternativas de extracción y limpieza que permitan una mayor interacción entre la fase sólida y la muestra, con la finalidad de incrementar la precisión y exactitud del método así como en su rendimiento [Hyun-hee, C. 2009; Wang, L. 2012].

### **1.8.3 Extracción en fase sólida dispersiva (DSPE)**

La extracción en fase sólida magnética (DPSE) ha sido una técnica novedosa desde su aparición en el año de 1989. Esta técnica ha sido aplicada en la preparación y extracción de residuos de sustancias químicas en matrices complejas como son algunos alimentos. La DSPE consiste en la adición de un adsorbente sólido (sílice y polímeros) de manera directa a la muestra líquida, para posteriormente dispersarlo mediante agitación de la mezcla. Esta metodología favorece el contacto entre el adsorbente y los analitos de interés [Fagerquist, C.K. 2005; Posyniak, A. 2005; Plössl, F. 2006].

El adsorbente empleado es derivatizado previamente produciendo la unión de una fase orgánica en la superficie del adsorbente con grupos alquílicos. Dicho proceso favorece un incremento en la afinidad entre el adsorbente y los analitos de interés proporcionando un mayor rendimiento en la extracción de los mismos y un menor tiempo de tratamiento. Posteriormente a la etapa de extracción se lleva a cabo la separación de la fase sólida presente en dicha suspensión por lo que se requiere de una etapa adicional como una filtración o centrifugación. El sedimento separado de la fase líquida es tratado con un solvente adecuado para eluir los analitos retenidos [Chafer-Pericas, C. 2013; Diez, C. 2006; Silva, C.L. 2012].

El uso de la DSPE posee la ventaja de ser considerado como un método de extracción y limpieza a microescala. La DSPE permite disminuir los límites de detección (LOD), emplear una menor cantidad de disolventes orgánicos durante el tratamiento de la muestra, minimizando costos en el tratamiento

de muestras comparando con otras técnicas clásicas como son LLE y SPE [Diez, C. 2006; Posyniak, A. 2005; Silva, C.L. 2012].

La principal desventaja de la DSPE es el aislamiento de la fase sólida, sin embargo recientemente se han evaluado el uso de adsorbentes compuestos que mejoren la separación entre ambas fases. El uso de adsorbentes paramagnéticos ha permitido mejorar el aislamiento de la fase sólida mediante la aplicación de un campo magnético externo, dando lugar a una nueva variante de DSPE denominada extracción en fase sólida magnética (MSPE).

### **1.8.4 Extracción en fase sólida magnética (MSPE)**

La Extracción en fase sólida magnética (MSPE) es una de las técnicas de extracción con más desarrollo en los últimos años. Su origen surge a partir de la combinación de la extracción en fase sólida dispersiva y las separaciones magnéticas; fue descrita por primera ocasión por Safarikova en 1999, donde desarrolló el aislamiento de colorantes orgánicos mediante el empleo de un adsorbente de ftalocianina de cobre unida a magnetita silanizada y carbón vegetal magnético [Safarikova, M. 1999]. A partir de este reporte se han diseñado nuevas metodologías de separación aplicadas a la determinación de diversos analitos en muestras complejas [Safarik, I. 1999; Safarik, I. 2006].

La principal ventaja de esta técnica es que los adsorbentes empleados son dispersados en la muestra, favoreciendo el contacto entre los analitos y la fase sólida. Los adsorbentes utilizados mediante MSPE son diversos y con características más específicas que otras técnicas como SPE y DSPE. Adicionalmente éstos pueden ser aislados de la matriz analítica con mayor facilidad sin originar alguna pérdida del analito y ser reutilizados para análisis posteriores, haciendo de la MSPE una técnica robusta que permite disminuir el tiempo de tratamiento de la muestra [Safarikova, M. 1999; Aguilar-Arteaga, K. 2010; Sasaki, T. 2011].

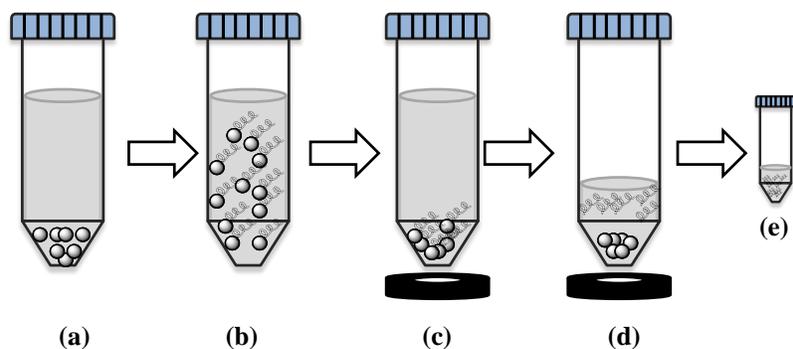
En años recientes, la MSPE se ha enfocado al desarrollo de adsorbentes que posean propiedades magnéticas con la finalidad de ayudar en la preconcentración de diversos analitos. La mayoría de estos adsorbentes magnéticos combinan elevadas superficies de contacto, por lo que estos pueden ser aislados fácilmente de la matriz analítica mediante la aplicación de un campo magnético externo así como su empleo en volúmenes elevados de muestra.

De manera general, los adsorbentes empleados en MSPE se encuentran compuestos por dos fases. Una fase magnética compuesta principalmente por minerales de hierro u óxidos de hierro como magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) y una segunda fase formada por diversos materiales, entre los cuales se encuentran polímeros orgánicos, inorgánicos y otros óxidos metálicos. Los materiales que se han aplicado principalmente son sílices modificadas ( $\text{C}_{18}$ ,  $\text{C}_8$  y grupos fenilo), polímeros molecularmente impresos y recientemente nanotubos de carbono y grafeno [Aguilar-Arteaga, K. 2010; Meng, J. 2011; Sasaki, T. 2011; Tang, H. 2012; Zhang, X. 2011].

Los adsorbentes más utilizados son los derivados de sílices funcionalizadas, la preparación del adsorbente magnético se realiza de manera convencional a través de la polimerización de monómeros funcionalizados de silicio en presencia de monómeros entrecruzantes y la fase magnética. La cadena alquílica presente en el monómero es la encargada de la interacción con los analitos contenidos en la muestra y por tanto contribuyen en el proceso de una extracción selectiva. Las interacciones principales involucran la biocompatibilidad, fisorción, quimisorción y reconocimiento de forma [Zhang, X. 2011; Aguilar-Arteaga, K. 2010].

Las fases presentes en los adsorbentes magnéticos pueden presentar diversas formas, entre la cual se destacan la tipo core-shell como la morfología más frecuente, esta se caracteriza porque su centro es formado por la fase magnética, mientras que el recubrimiento está compuesto por monómeros polimerizados de diferente naturaleza u otros materiales. Sin embargo la morfología que presentan dichos adsorbentes se puede ver influenciado por el método de síntesis empleado, tiempo de reacción, temperatura del sistema, catalizador, así como la calidad de los reactivos empleados [Dodi, G. 2012; Hong, R.Y. 2008; Yi-Ran, C. 2011].

Usualmente el empleo de diversas metodologías de extracción y limpieza en la obtención de antibióticos en muestras de alimentos como LLE, SPE y DSPE requieren de técnicas adicionales como filtración o centrifugación que pueden originar una pérdida de del analito y por consiguiente una disminución de la precisión y exactitud del método. Es por ello que el uso de los sólidos magnéticos es una alternativa para el aislamiento y la preconcentración de diferentes especies químicas. Las etapas básicas del uso de la MSPE involucran la a) activación, b) extracción, c) aislamiento-lavado y d y e) elución, las cuales se representan en la Figura. 1.4.



**Figura 1.4.** Etapas básicas de la MSPE. a) activación, b) extracción, c) aislamiento-lavado, d y e) elución.

La MSPE ha demostrado una serie de ventajas tales como: disminución del tiempo de tratamiento de la muestra, disminución del uso de solventes, así como el fácil manejo de muestras de alto volumen. La metodología ha sido aplicada al análisis de contaminantes orgánicos, antibióticos, anti-inflamatorios, pesticidas así como en el aislamiento de células que están presentes en diferentes matrices [Aguilar-Arteaga, K. 2010; Meng, J. 2011; Šafařík, I. 2002; Zhang, X. 2011].

Una vez elegida la técnica de tratamiento de la muestra, se debe seleccionar la técnica de análisis. Para el análisis de varias especies se utiliza de manera convencional técnicas de separación instrumentales como cromatografía de gases (GC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar (CE). Las características de los antibióticos limitan su aplicación a las dos últimas, por lo que el presente trabajo pretende evaluar la combinación de la MSPE con HPLC y CE en el análisis de residuos de antibióticos en muestras de leche. El diseño de dichas metodologías contribuye al desarrollo de estrategias de análisis de residuos en muestras complejas.

## 1.9 BIBLIOGRAFÍA

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

**Aguilar-Arteaga, K.**, Rodriguez, J.A., Barrado, E. Magnetic solids in analytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta*, 674 (2010) p. 157.

**Alvares, J.**, Artigas, A., Belda, F.J., Bonet, B., Caparros, T. Cuidados críticos y emergencias. *Castello, Madrid, ed. Aran* (2002) p. 1363.

**Appleton A.** Bacterial Resistance. A worldwide problem. *Clin. Lab. Intern.* 25 (2001) p. 22.

**Ávila, M.**, Zougagh, M., Escarpa, A., Ríos, A. Determination of sudan dyes in food samples using supercritical fluid extraction-capillary liquid chromatography. *J. Supercritical. Fluids* 55 (2011) p. 977.

**B.O.E.** Orden de 23 de marzo de 1988 por la que se dictan normas relativas a los aditivos en la alimentación de los animales. *Boletín Oficial del Estado* N° 92 (1988)

**Booth N.H.**, Macdonald L.E. *Farmacología y terapéutica veterinaria*, Vol. 11. Ed. Acribia. Zaragoza, España (1987) p. 125.

**Botsoglou, N.A.**, Fletouris, D.J. Drug residues in foods, *Pharmacology, food safety, and analysis*. ed Marcel Dekker, Inc. New York (2001) p. 569.

**Butaye, P.**, Devriese, L.A., Haesebrouck, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2003) p. 175.

**Chambers H.S.**, Merle A.S. Fármacos antimicrobianos, consideraciones generales. Ed. Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª Edición. Ed. Mexico: Mc Graw-Hill interamericana Editores S.A. de C.V (1996) p. 1095.

**Cháfer-Pericás, C.**, Balaguer, A., Maquieira, A., Puchades, R. Dispersive solid-phase extraction and immunoassay with internal reference calibration using fatty acid-coated inorganic fluorescent nanoparticles. *Anal. Biochem.* 432 (2013) p. 31.

**Chena, Y.**, Guoa, Z., Wang, X., Qiu, C. Review: Sample preparation. *J. Chrom. A.* 1184 (2008) p. 191.

**Codex Alimentarius.** Report of the third session of the codex committee on residues of veterinary drugs in foods. ALINORM 89/31 (1989) Appendix VI.

**Commission Regulation (EU) No. 281/96.** *Off. J. Eur. Commun.* L37 (1999) p. 9.

**Commission Regulation (EU) No 508/1999.** *Off. J. Eur. Commun.* L60 (1999) p. 16.

**Commission Regulation (EU) No 37/2010.** *Off. J. Eur Commun.* 20.1. (2010) L 151.

**Defilló B.** *Farmacología Médica; Drogas esenciales antiinfecciosos.* (1985) p. 14.

**Delgado-Zamarreño, M:M.**, Pérez-Martín, L., Bustamante-Rangel, M., Carabias-Martínez, R. A modified QuEChERS method as sample treatment before the determination of isoflavones in foods by ultra-performance liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 100 (2012) p. 320.

**Dibner, J.J,** Richards, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Sci.* 84 (2005) p. 634.

**Díez, C.**, Traag, W.A., Zommer, P., Marinero, P., Atienza, J. Comparison of an acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" method with classical multi-residue methods for the extraction of herbicide residues in barley samples. *J. Chromatogr. A.* 1131 (2006) p.11.

**Dimitrios, J.**, Fletouris, J.E., Psomas, S., Botsoglou, N.A. Trace Analysis of Oxytetracycline and Tetracycline in Milk by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 38 (1998) p. 1913.

**Dodi, G.**, Doina Hritcu, G.L., Marcel, I.P. Core-shell magnetic chitosan particles functionalized by grafting: Synthesis and characterization. *Chem. Eng J.* 203 (2012) p. 130.

**Errecalde, J.O.** Uso de antimicrobianos en animales de consumo. *FAO producción y sanidad animal.* 162 (2004) p.1.

**Eyssen, H.**, Somer, P. The mode of action of antibiotics in stimulating growth of chicks. *J Exp Med.* 117 (1963) p. 127.

**Fagerquist, C.K.**, Lightfield, A.R., Lehotay, S.J. Confirmatory and quantitative analysis of  $\beta$ -lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 77 (2005) p. 1473.

**Fritz, J.S.** Analytical solid-phase extraction, Wiley-VCH, New York (1999) p. 264.

**Goodman, A.**, Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Editorial Médica Panamericana, México D.F. (México), 1993.

**Hennion, M.C.** Graphitized carbons for solid-phase extraction. *J. Chromatogr A.* 885 (2000) p. 73.

**Hong, R.Y.**, Zhang, S.Z., Di, G.Q., Li, H.Z., Zheng, Y., Ding, J., Wei, D.G. Preparation, characterization and application of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ZnO core/shell magnetic nanoparticles. Mater Res. Bull, 43 (2008) p. 2457.

**Horwitz, W.**, Latimer, G.W. Official methods of analysis of AOAC International. 18 Ed. AOAC INT, Maryland USA (2005) p. 4.

**Hyun-Hee, C.**, Jung-Bin, L., Yun-Hee, C., Kwang-Geun, L. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. Food Chem. 113 (2009) p. 297.

**Koesukwiwat, U.**, Siripastr, J., Natchanun, L. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. J. Chromatogr. A. 1140 (2007) p. 147.

**Koltho, I.M.**, Sandell, E.B., Meehan, E.J., Bruckenstein, S. Quantitative chemical analysis, 4th ed., Macmillan, New York, (1969) p. 335.

**Lara, F.J.**, Garcia-Campana, A.M., Ales-Barrero, F., Bosque-Sendra, J.M., Garcia-Ayuso, L.E. Multiresidue method for the determination of quinolone antibiotics in bovine raw milk by capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry. Anal. Chem. 78 (2006) p. 7665.

**Lehninger, A.L.**, Nelson, D.L., Cox, M.M. Principios de bioquímica, Ed. Omega, Barcelona (España), 1995.

**Leon-Gonzalez, M.D.**, Perez-Arribas, L.V. Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration. J. Chromatogr. A 902 (2000) p. 3.

**Liska, I.** Fifty years of solid-phase extraction in water analysis-historical development and overview. J. Chromatogr. A, 885 (2000) p. 3.

**Madigan M.T.**, Martinko J., Dunlap P.V. Clark D.P. Biology of microorganisms. 8ª edition (2009)

**Madrigal, C.U.** Farmacología y manejos de productos veterinarios. ed. EUNED, San José, Costa Rica. (2000) p. 3.

**McCarthy, O.J.** Milk | Physical and physico-chemical properties of milk. Encyclopedia of Dairy Sciences 2ª ed (2002) p. 467.

**Meng, J.**, Shi, C., Wei, B., Yu, W., Deng, C., Zhang, X. Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C@PANI magnetic microspheres for the extraction and analysis of phenolic compounds in water samples by gas chromatography–mass spectrometry. J. Chromatogr. A. 1218 (2011) p. 2841.

**Moats, W.A.**, Harik-Khan, R. Rapid HPLC Determination of Tetracycline Antibiotics in Milk. J. Agric. Food Chem. 43 (1995) p. 931.

**Mol, H.** Antibiotics and milk. ed. Balkema (1975)

**Ortega, E.**, Arellano, G., Morales, M. Empleo de antibióticos en alimentos para animales y sus consecuencias sobre la salud pública. Rev. Invest. Clín. 40 (1988) p. 423.

**Park, Y.K.**, Juarez, M., Ramos, M., Haenlein, G.F.W. Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. Small Ruminant. Res. 68 (2007) p. 88.

**Pesek, J.J.**, Matyska, M.T. SPE sorbents and formats, solid-phase extraction; Principles, techniques, and applications, Marcel Dekker, New York (2000) p. 19.

**Pichon, V.**, Cau dit Coumes, C., Chen, L., Guenu, S., Hennion, M.C. Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides. J. Chromatogr. A. 737 (1996) p. 25.

**Poole, C.F.**, Guanatilleka, A.D., Sethuraman, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A.* 885 (2000) p 17.

**Posyniak, A.**, Zmudzki, J., Mitrowska, K. Dispersive solid-phase extraction for the determination of sulfonamides in chicken muscle by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1087 (2005) p. 259.

**Plössl, F.**, Giera, M., Bracher, F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *J. Chromatogr. A.* 1135, (2006) p. 19.

**Raynal-Ljutovac, K.**, Lagriffoul, G., Paccard, G.I., Chilliard Y. Composition of goat and sheep milk products: An update. *Small Ruminant. Res.* 79 (2008) p. 57.

**Ridgway, K.**, Lalljie, S.P., Smith, R.M. Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *J. Chromatogr. A.* 1153 (2007) p. 36.

**Šafařík, I.**, Šafaříková, M. Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J. Chromatogr. B.* 722 (1999) p. 33.

**Šafařík, I.**, Šafaříková, M. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. *Water Res.* 36 (2002) p. 196.

**Šafaříková, M.**, Šafařík, I. Magnetic solid-phase extraction. *J. Magn. Magn. Mater.* 194 (1999) p 108.

**Santos, S.M.**, Henriques, M., Duarte, A.C., Esteves, V.I. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta.* 71 (2007) p. 731.

**Sanjurjo M.** La penicilina, pionera de la era de los antibióticos. *Educación Química.* 8 (1997) p. 68.

**Sasaki, T.**, Tanaka, S. Adsorption behavior of some aromatic compounds on hydrophobic magnetite for magnetic separation. *J. Hazard Mater.* 196 (2011) p. 327.

**Sawant, A.A.**, Sordillo, L.M., Jayarao, B.M. A survey on antibiotic usage in dairy herds in Pennsylvania. *J. Dairy Sci.* 88 (2005) p. 2991.

**Shahani, K.M.**, Whalen, P.J. Significance of Antibiotics in Foods and Feeds. *Agricultural uses of antibiotics* 8 (1986) p. 88.

**Silva, C.L.**, Haesen, N., Câmara, J.S. A new and improved strategy combining a dispersive-solid phase extraction-based multiclass method with ultra high pressure liquid chromatography for analysis of low molecular weight polyphenols in vegetables. *J. Chromatogr. A.* 1260 (2012) p. 154.

**Singh, H.** Milk protein products; Functional properties of milk proteins. *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 2<sup>nd</sup> Ed. (2011) p. 887.

**Tang, H.**, Zhu, L., Yu, C., Shen, X. Selective photocatalysis mediated by magnetic molecularly imprinted polymers. *Sep. Purif. Technol.* 95 (2012) p. 165

**Tang, Q.**, Yang, T., Tan, X., Luo, J. Simultaneous determination of fluoroquinolone antibiotic residues in milk sample by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) p. 4535.

**Thurman, E.M.**, Mills, M.S. *Solid-phase extraction: Principles and practice*, Wiley, New York 47 (1998) p. 344.

**United States Food and Drug Administration (FDA), Fed. Reg.** 207 63 (1998) p. 57245.

**Valcárcel, M.**, Gómez, A. *Técnicas analíticas de separación*. Ed. Reverté, S. A. (1988) p. 209.

**Vera-Candiotti, L.**, Olivieri, A.C., Goicoechea, H.C. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. *Talanta* 82 (2010) p. 213.

**Vipin, K.A.** Analysis of antibiotics/Drug residues in food products of animal origin. Ed. Plenum Press, New York (1992).

**Visek, W.J.** The mode of growth promotion by antibiotics. *J. Anim. Sci.* 46 (1978) p. 1447.

**Wachob, G.D.**, Wells, M.J.M.  $O\alpha$ -line multistage extraction chromatography for ultra selective herbicide. *Liq. Chromatogr. HPLC Mag.* 1 (1983) p 428.

**Wang, L.**, Wu, J., Wang, Q., He, C., Zhou, L., Wang, J., Pu, Q. Rapid and sensitive determination of sulfonamide residues in milk and chicken muscle by microfluidic chip electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) p. 1613.

**Walton, J.R.** Modes of action of growth promoting agents. *Vet. Res. Commun.* (1983) p.1.

**Wyngaarden. J.**, Lloyd, H.S., Bennet, J. Tratado de medicina interna. ed. México, DF: Nueva Editorial Interamericana (1994) p. 1859.

**Young, L.** Tratamiento antimicrobiano. En: Wyngaarden, J., Lloyd, H.S., Bennett, J., eds. Cecil: tratado de Medicina Interna. 19 ed. México, DF; Nueva Editorial Interamericana. (1994) p. 1859.

**Yi-Ran, C.**, Chao, H., Ying-Lin, Z., Li, Y., Xiao-Ming, G., Xin-Xiang, Z. Synthesis of orientedly bioconjugated core/shell  $Fe_3O_4@Au$  magnetic nanoparticles for cell separation. *Talanta* 85 (2011) p. 1246.

**Zhang, Y.**, Liu, H., Zhang, X., Lei, H., Bai, L., Yang, G. On-line solid phase extraction using organic-inorganic hybrid monolithic columns for the determination of trace  $\beta$ -lactam antibiotics in milk and water samples. *Talanta* 104 (2013) p. 17.

**Zhang, X.**, Hongyun, N., Yuanyuan, P., Yali, S., Yaqi, C. Modifying the surface of  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$  magnetic nanoparticles with  $\text{C}_{18}/\text{NH}_2$  mixed group to get an efficient sorbent for anionic organic pollutants. *J. Colloid. Interf. Sci.* 362 (2011) p. 107.

**Zhou, J.**, Xue, X., Li, Y., Zhang, J., Chen, F., Wu, L., Chen, L., Zhao, J. Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chem.* 115 (2009) p. 1074.

**Zwald, A.G.**, Ruegg, P.L., Kaneene, J.B., Warnick, L.D., Wells, S.J., Fossler C., Halbert L.B. Management practices and reported antimicrobial usage on conventional and organic dairy farms. *J. Dairy Sci.*, 87 (2004) p. 191.



*CAPÍTULO II*

*OBJETIVOS*

## **OBJETIVO GENERAL**

Aplicar la extracción en fase sólida magnética acoplada a sistemas de separación instrumentales para el análisis de residuos de antibióticos en leche

## **Objetivos específicos**

1. Desarrollar un sistema de análisis de Sulfamidas en leche mediante la combinación de extracción en fase sólida magnética y cromatografía de líquidos de alta resolución.
2. Desarrollar un sistema de análisis de Quinolonas en leche mediante la combinación de extracción en fase sólida magnética y electroforesis capilar de zona.
3. Desarrollar un sistema de análisis de Tetraciclinas en leche mediante la combinación de extracción en fase sólida magnética con electroforesis capilar de zona y cromatografía de líquidos de alta resolución.



*CAPÍTULO III*

*SULFAMIDAS*

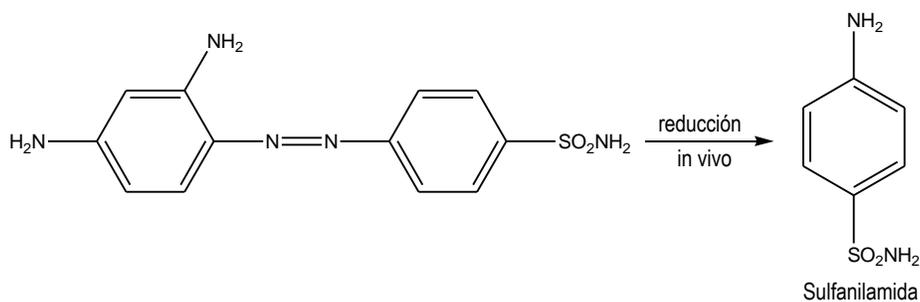
## **3.1 Historia de Sulfamidas**

Uno de los primeros antibióticos utilizados en medicina humana y medicina veterinaria para el tratamiento de las infecciones bacterianas fue la familia de las sulfamidas (SAs). La primera sulfamida fue sintetizada por Paul Gelmo en el año de 1908 denominada *p*-amino-benceno-sulfonamida. Poco tiempo después la I.G. Farbenindustrie como parte de una investigación en el desarrollo de colorantes, empleó este compuesto como producto intermediario en la producción de colorantes azo con sulfamidas y grupos sustituidos de ácidos sulfamidicos para encontrar un colorante capaz de teñir selectivamente las células bacterianas [Geissman, C.A. 1973; Parra-Salgado, J. 2002]. Sin embargo no fue hasta en 1930 cuando las sulfamidas se utilizaron como agentes quimioterapéuticos cuando Mietzsch completo los trabajos de síntesis de una sustancia denominada Atebrin, predecesora del Protosil el cual había sido descubierto en el año de 1923 por Foerster de Dusseldorf, trabajando en la producción de colorantes empleando derivados de benceno, a partir de los cuales elaboró un colorante rojo (Prontosil), el cual utilizó diez años después en un lactante de 10 meses de vida con septicemia estafilococcica, en quien se logró su curación [Vicente, D. 2010].

Sin embargo, no se prestó gran atención a estos procesos en la quimioterapia hasta que otros investigadores se interesaron en ésta molécula. No fue sino hasta en 1934 cuando Gerhard Domagk (director de investigación de la I.G. Farbenindustrie) basándose en las investigaciones de Klarer y Mietzsch quienes habían estudiado la actividad del Prontosil (clorhidrato de 4-sulfamida-2',4'-diaminoazobenzol), contra estreptococos. Los experimentos demostraron que el Prontosil ejercía una importante acción destructiva sobre estreptococos (específicamente contra el hemolítico) y estafilococos en tejidos animales en un plazo breve.

Domagk sugirió que esta sustancia no era bactericida, sino que atenuaba la actividad bacteriana permitiendo actuar a los mecanismos inmunológicos por lo que se le atribuyó haber descubierto el valor quimioterapéutico de este fármaco, por lo que en 1935 se llevaron a cabo diversas investigaciones que confirmaron la especificidad del Prontosil sobre enfermedades como: neumonía, meningitis, gonorrea, tromboflebitis, artritis, infecciones urinarias, entre otras infecciones producidas por los estreptococos in vivo, siendo completamente inocuo fuera del cuerpo [Domagk, G. 1935; Parra-Salgado, J. 2002].

De igual manera en 1935 algunos investigadores franceses (Tréfouel, Bovet, Fourneau) llegaron a la conclusión de que quizá la actividad de este compuesto no tenía nada que ver con sus propiedades como colorantes, sino que podía ser resultado de su conversión en p-aminobencensulfonamida (sulfanilamida) por reducción:

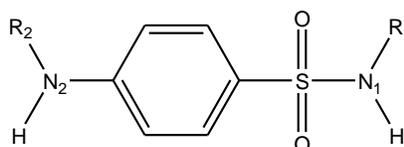


Este razonamiento condujo al ensayo de la sulfanilamida y permitió confirmar la hipótesis de que esta era la sustancia activa. A partir de ese momento la atención que se había dedicado a los azo-colorantes, se dirigió al estudio de sulfanilamidas sustituidas [Geissman, T.A: 1973; Korolcovas, A. 1983].

La sulfanilamida fue el origen de toda gran variedad de derivados. En 1938 se conoció la sulfapiridina, con un mayor espectro de actividad, e indicada en el tratamiento de neumonías, meningitis e infecciones estafilocócicas, pero presentó efectos adversos y fue rechazada. En 1940 surgieron nuevos fármacos como sulfatiazol (STZ), sulfacetamida (SAM), sulfadiazina (SDZ), y sulfametazina (SMZ), muchos de los cuales aparecieron ante la necesidad de salvar vidas durante la Segunda Guerra Mundial. La SDZ inducida en 1941 fue ampliamente utilizada por su escasa toxicidad. En años anteriores al surgimiento de las penicilinas, las sulfamidas fueron los agentes fundamentales de la quimioterapia antibacteriana, evitando millones de muertes. Actualmente existe una extensa lista de tales compuestos se aplican en medicina como agentes antibacterianos efectivos contra una gran variedad de enfermedades de origen bacteriano [García-Rodríguez, J.A].

## 3.2 Clasificación

La clasificación de las SAs puede presentarse mediante diversos criterios tales como su espectro de actividad, la duración de su acción, uso terapéutico y estructura química. Según este último criterio, existen numerosos compuestos derivados de las sustituciones de un átomo de hidrógeno en el nitrógeno del grupo anílico ( $N_1$ ) y en el nitrógeno del grupo sulfamidico ( $N_2$ ) o en ambos a la vez (Figura 3.1).



Derivados	$N_1$ - $R_2$	$N_2$ - $R_1$
p-aminobencensulfamida	H	H
Heterociclos Aromáticos	H	Heterociclos Aromáticos
	-R	-R
Derivados tipo azoico	$R_3$ -N= $N_1$ -	H

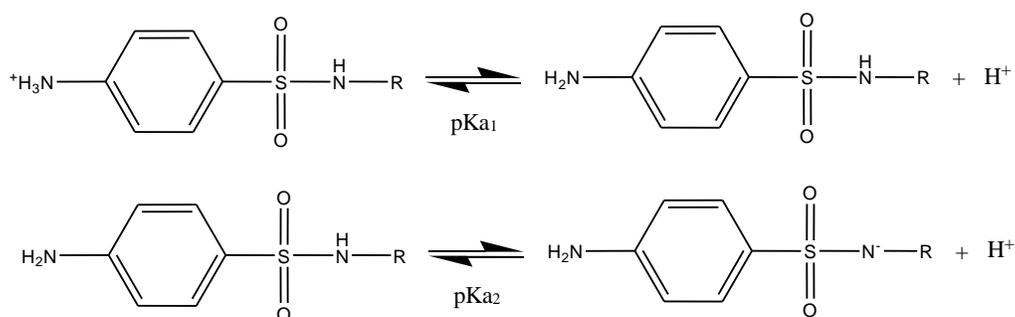
**Figura 3.1.** Estructuras Químicas derivados de sulfamidas.

Sin embargo cuando la clasificación se hace desde el punto de vista de su aplicación terapéutica, existen SAs sistémicas, intestinales, urinarias, oftalmológicas y de usos especiales. Por último, sus características farmacocinéticas permiten distinguir entre SAs de eliminación rápida, media, lenta y ultralenta.

## 3.3 Propiedades Físicoquímicas

La mayoría de las SAs por lo general se presentan en forma de sólidos cristalinos, blancos o amarillentos, de sabor amargo. La mayoría son poco solubles en agua, sin embargo estas suelen ser solubles en disolventes orgánicos polares como etanol, acetona y N-N'-dimetilformamida e insolubles en disolventes no polares como cloroformo y dietileter. Son sustancias de naturaleza anfótera ya que mientras el grupo amino les confiere un carácter básico, el grupo sulfonamido ( $SO_2NH_2$ ) les otorga características ácidas [Botsoglou, N.A. 2001].

La existencia de diversos grados de ionización para las SAs se relacionan con sus constantes de disociación ácidas (pKa) (Figura 3.2). Los valores de pKa de las SAs en solución acuosa son de 1.49 y 7.12. Para una sulfamida, el valor de la constante de disociación ácido-base influye sobre su actividad quimioterapéutica, que será máxima en aquellas con valores de pKa comprendidos entre 6.0 y 7.5. No obstante, esta hipótesis no es aplicable a todos estos fármacos, dado que muchos de ellos poseen una gran actividad encontrándose su pKa fuera del intervalo. También la actividad se ha relacionado con su capacidad de combinación con las proteínas plasmáticas por fuerzas de tipo hidrófobo y de atracción iónica, aunque es la parte sin combinar la importante desde el punto de vista de actividad [Korolkovas, A. 1983; Sanli, S. 2009].



**Figura 3.2.** Grados de ionización para Sulfamidas.

La estructura mínima para que una sulfamida presente actividad antimicrobiana se puede resumir en la propia sulfanilamida. El grupo p- $\text{NH}_2$  ( $\text{N}_2$ ) es esencial y puede sustituirse únicamente por radicales que se transformen en un grupo amino libre. La acetilación de este grupo produce la pérdida de la actividad antimicrobiana. EL grupo  $-\text{SO}_2-$  no es esencial en sí, pero la característica importante es que el azufre está ligado directamente al anillo bencénico. Las sustituciones en este grupo modifican las características farmacocinéticas, pero no la actividad antibacteriana. Las sustituciones en el grupo amida ( $\text{N}_1$ ) origina efectos variables en la actividad antibacteriana de la molécula. No obstante, la sustitución del núcleo aromático heterocíclico en  $\text{N}_1$  genera compuestos con actividad mayor [Goodman, A. 1993].

En cuanto a su actividad antimicrobiana, son consideradas como compuestos de amplio espectro de actividad en la mayoría abarca microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, aunque actualmente abundan cepas bacterianas que han desarrollado mecanismos de resistencia como resultado de los más de cincuenta años de uso.

Las SAs se metabolizan principalmente en el hígado, aunque también se dan procesos de transformación en otros órganos. Las reacciones mayoritarias que tienen lugar son la N-acetilación, glucuronidación e hidrocilación. La acetilación transforma la sulfamida en un compuesto más tóxico e inactivo; la glucuronidación también la inactiva, pero reduce su toxicidad por su mayor solubilidad [Botsoglou, N.A. 2001].

### **3.4 Mecanismo de Acción**

Las SAs presentan acción bacteriostática al actuar sobre bacterias en fase de crecimiento, como antimetabolitos por inhibición competitiva en la síntesis de ácido fólico. Las SAs son análogos estructurales competitivos del ácido p-aminobenzoico (PABA), impiden que la bacteria utilice de manera normal el PABA en la síntesis del ácido fólico (ácido pteroilglutamico) e inhiben la incorporación de este a la pteridina, para formar el ácido tetrahidropteroico, presentando una gran afinidad por la tetrahidropteroico-sintetasa. La consecuencia de esta alteración de la síntesis de ácido fólico es una disminución de nucleótidos, con inhibición del crecimiento bacteriano [Fildes, P.A. 1940; Vicente, D. 2010; Woods, D.D. 1940].

Son quimioterapéuticos de amplio espectro de actividad frente a cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, e inhiben las enzimas responsables de la condensación del pirofosfato de la 2-amino-4-oxo-6-hidrocimetildihidropteridina, con el ácido p-aminobenzoico (PABA).

Su efecto antimicrobiano para el PABA, compite por las mismas enzimas responsables de la síntesis del ácido fólico, o bien la disminución de la sensibilidad de estas enzimas por la sulfamida, son los mecanismos a los que se debe la resistencia de los microorganismos a estos fármacos. Estos mecanismos condicionan resistencia cruzada entre todas las SAs, pero no con el resto de antibióticos y quimioterapéuticos [Eliopoulos, G.M. 2001; Karpanoja, P. 2008].

Hoy en día la gran variedad de SAs existentes permiten el tratamiento de enfermedades infecciosas permitiendo mantener los niveles de salud. Sin embargo el empleo de SAs además de sus propiedades terapéuticas y profilácticas, en animales productores de alimentos estos son implementados como promotores de crecimiento en periodos de tiempo prolongados.

La determinación de residuos de SAs en productos de origen animal ha sido el principal objetivo en el desarrollo de estudios analíticos empleando diversas técnicas instrumentales entre las que se destacan los inmunoensayos, métodos espectrofotométricos, técnicas de separación como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detección ultravioleta y su acoplamiento con espectroscopía de masas (MS) y electroforesis capilar (CE).

## 3.5 Métodos de análisis para la determinación de sulfamidas

### 3.5.1 Métodos espectrofotométricos

Las SAs son compuestos que pueden ser determinados cuantitativamente mediante técnicas espectrofotométricas basadas en la formación de compuestos cromóforos. Uno de los métodos desarrollados en el análisis de SAs. El método se basa en la formación de un complejo SAs-7,7,8,8-tetracianoquinodimetano a pH 9.0-9.5 originando productos de color azul presentando un máximo a 578 nm. El método fue aplicado en la determinación de benzo-SAs en formulaciones farmacéuticas, alcanzando límites de detección en el orden de  $\text{mg ml}^{-1}$  [Am, M. 1998].

Uno de los métodos espectrofotométricos desarrollados en el análisis de SAs se ha empleado en la determinación de SAs en algunos fármacos. El método se basa en la diazotización de seis diferentes derivados de SAs y su acoplamiento con 8-hidroxiquinolina en medio básico para dar un cromóforo color rojo con un máximo de absorción a 500 nm. Los límites de cuantificación (LOQ) y límites de detección (LOD) se encuentran en el orden de 0.11-0.18 y 0.03-0.05  $\text{mg ml}^{-1}$ , respectivamente. El método es aplicado en la determinación de SAs en formulaciones farmacéuticas [Nagaraja, P. 2007].

Una de las estrategias para la determinación espectrofotométricamente de SAs en formulaciones farmacéuticas y en fluidos biológicos se basa en el acoplamiento de diazo-SAs con floroglucinol en un medio ácido produciendo un cromóforo color amarillo con un máximo de absorción a 420 nm permitiendo alcanzar concentraciones en el orden de  $\text{mg ml}^{-1}$  [Upadhyay, K. 2012].

## 3.5.2 Métodos electroanalíticos

El desarrollo de metodologías de detección de residuos de SAs ha motivado diversos estudios electroquímicos para esta clase de compuestos. De acuerdo a este desarrollo se ha descrito el uso de electrodos de grafito en el análisis de SAs en muestras de leche. El método se basa en la medida de la señal de oxidación de las SAs mediante amperometría, alcanzando límites de detección en el orden de  $\mu\text{mol l}^{-1}$  [Diez, R. 2008].

Recientemente se ha descrito el empleo de electrodos de grafito modificados con adsorbentes magnéticos donde se inmoviliza un anticuerpo (anti-sulfamida). El método permite cuantificar SAs en muestras complejas como leche con base en una reacción inmunológica selectiva. El método se aplicó al análisis de SAs en leche provenientes de diferentes marcas encontrando concentraciones en la muestra en el orden de 0.74-2.04  $\text{mmol l}^{-1}$  [Zacco, E. 2007]. Siguiendo la misma tendencia se han empleado electrodos serigrafiados para la detección amperométrica de residuos de SAs en muestras de leche. El anticuerpo es inmovilizado covalentemente al ácido 4-aminobenzoico, depositado en la superficie del electrodo. La metodología desarrollada muestra niveles de detección en el orden de los  $\mu\text{g l}^{-1}$  en la determinación de 6 SAs en muestras de leche [Conzuelo, F. 2012].

## 3.5.3 Electroforesis capilar

La técnica de electroforesis capilar (CE) ha sido una de las técnicas de mayor uso en la actualidad en el análisis de fármacos, entre los cuales se destaca la determinación de SAs en muestras complejas como leche, carne, pollo y agua, debido a que se le considera como una técnica eficiente, de alta resolución, automatizada, compatible con diversos detectores, y bajo consumo de solventes.

La CE es un método muy sensible que determina diversos tipos de SAs generalmente se utilizan electrolitos soporte que contienen iones fosfato, ácido bórico-alcohol polivinílico, acetato de amonio-ácido fórmico. Los voltajes de separación y sus longitudes de detección son variados. Entre los sistemas de detección más reportados en el análisis de SAs se encuentran detectores: ultravioleta-visible (UV-Vis), espectroscopía de masas (MS), y fluorescencia (FL). La Tabla 3.1 muestra ejemplos de la aplicación a diversas muestras.

**Tabla 3.1.** Determinación de sulfamidas en leche mediante CE.

Detector	Condiciones CE	Método Extracción	Límite de detección	Referencia
MS Carne	Voltaje separación: 25 kV Buffer: fosfato de sodio 35 mM pH 6.5	SPE: Oasis HLB, Sep-pak alumina	5-10 µg Kg <sup>-1</sup>	Ming-Ren, S.F. 2003
FL (404 nm) Leche	Voltaje separación: 30 Kv Buffer: ácido bórico 5mM-polivinil alcohol 1% (w/v)	Precipitación, Centrifugación, derivatización de SAs con fluorescamina	0.2-2.3 µg l <sup>-1</sup>	Wang, L. 2012
UV-Vis (270 nm) Pollo	Voltaje separación: 25 kV Buffer: fosfatos (HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) 100 mM pH 7.3	Microextracción polimérica monolítica	3.49-16.7 ng g <sup>-1</sup>	Li, T. 2008
MS Carne	Voltaje de separación: 25 kV. Buffer: acetato de amonio-ácido fórmico 50 mM pH 4.5	Extracción por líquidos presurizados, SPE: Oasis HLB	12.5 µg Kg <sup>-1</sup>	Font, G. 2007
UV-Vis (264 nm) Agua	Voltaje separación: 25 kV Buffer: Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 5 mM pH 7.3	SPE: Oasis HLB	0.3-0.6 µg l <sup>-1</sup>	Lara, F.J. 2009

## **3.5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución**

El análisis de SAs mediante cromatografía de líquidos de alta resolución ha sido una de las técnicas con mayor aplicación y es considerada como método de referencia en la determinación de residuos de SAs en muestras complejas como la leche. La separación de esta familia de antimicrobianos involucra el uso de columnas en fase reversa ( $C_{18}$  y  $C_8$ ) La fase móvil consta principalmente de mezclas de acetonitrilo, metanol y soluciones acuosas de ácido oxálico, ácido fórmico, acetato de amonio y fosfatos. La proporción adecuada de estos solventes permite una buena separación de las muestras.

Para el análisis de SAs en muestras de leche se realizan etapas de limpieza por extracción en fase sólida empleando cartuchos Oasis HLB, Sep-pak, de intercambio iónico (SampliQ SCX), sin embargo en todos los casos se requieren etapas de precipitación, centrifugación y filtración. Para la detección de esta familia de antimicrobianos se ha reportado el uso de la espectrofotometría de adsorción UV-Vis y espectrometría de masas (MS) principalmente. La Tabla 3.2 muestra ejemplos representativos del análisis de SAs en muestras de leche.

**Tabla 3.2.** Determinación de sulfamidas en leche mediante HPLC.

Detector	Condiciones HPLC	Método Extracción	Límite de detección	Referencia
UV-Vis (270 nm)	Columna: C <sub>18</sub> FM: Acetonitrilo: fosfato de potasio 0.1% (16:84).	Precipitación (acetonitrilo), Eliminación de grasas (Hexano), Centrifugación y filtración	4-11 µg Kg <sup>-1</sup>	Hyun-Hee, C. 2009
MS	Columna: Agilent ZORBAX Eclipse C <sub>18</sub> FM: ácido formico-acetonitrilo	SPE: Agilent SampliQ SCX (intercambio iónico polimérico)	0.2-2.0 ng ml <sup>-1</sup>	Gonzalez, C.A. 2009
Uv-Vis (264 nm)	Columna: Pelliguard LC-18 (Supelco) FM: metanol- acetato de amonio 40 mM (35:65)	SPE: Sep-pak C <sub>18</sub>	3.0 µg Kg <sup>-1</sup>	Zayas-Blanco, F. 2004
MS	Columna: SymmetryShield RP18, C <sub>18</sub> FM: 1 mM ácido oxálico	SPE: Oasis HLB	0.75-1.45 ng ml <sup>-1</sup>	Koesukwiwat, U. 2007
UV-Vis (260 nm)	Columna: Zorbax Eclipse XDS-C8 FM: acetonitrilo-fosfatos 0.01 MpH 4.0 (25:75)	Micro diálisis	0.002-0.15 µg l <sup>-1</sup>	Ching-Cherng, T. 2004

En el presente trabajo se pretende llevar a cabo la determinación de un grupo de antimicrobianos sintéticos frecuentemente empleado con propósitos clínicos, veterinarios y como promotores del crecimiento en leches mediante la combinación de extracción en fase sólida magnética y cromatografía de líquidos de alta resolución (MSPE-HPLC). Las SAs estudiadas en este capítulo son (Figura 3.3): sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ), sulfametoxipiridazina (SMPZ), sulfacloropiridazina (SCP), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX), sulfadimetoxina (SDM) y sulfaquinoxalina (SQX).

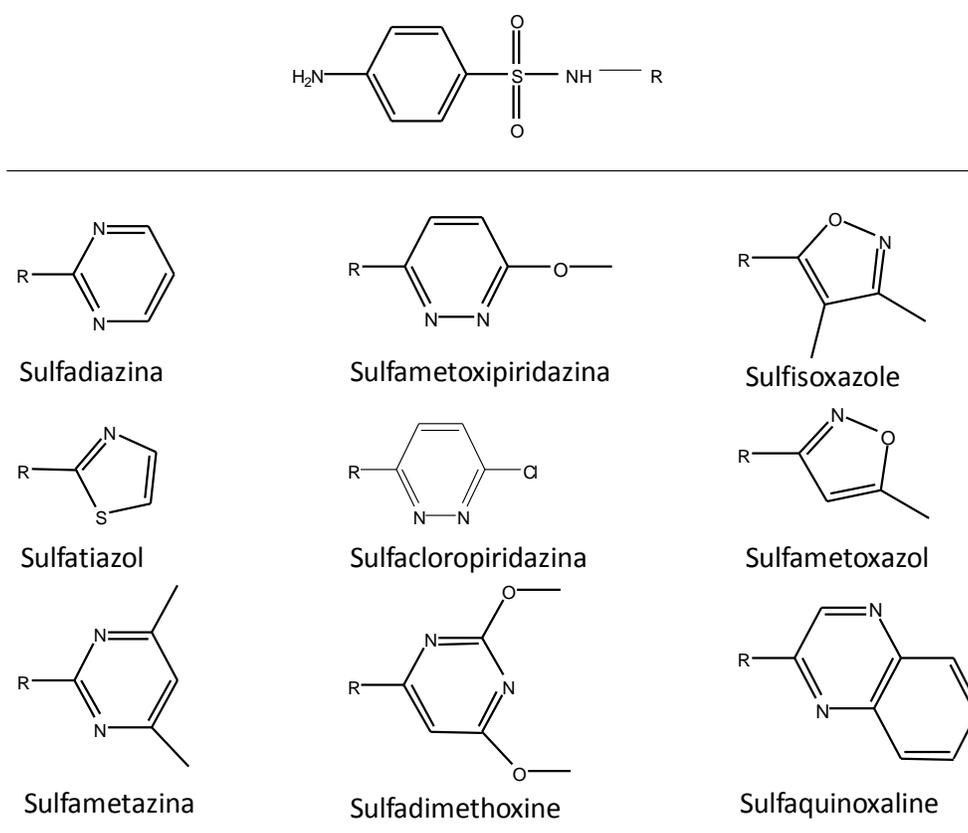


Figura 3.3. Estructuras químicas de las SAs usadas en ese estudio.

En animales de crianza, las SAs se añaden en los alimentos para la prevención y tratamiento de enfermedades gastrointestinales y respiratorias, sin embargo, además de los propósitos terapéuticos y profilácticos, las SAs se utilizan como promotores de crecimiento en animales productores de alimentos. La aplicación incontrolada de estos antimicrobianos puede generar que residuos de éstos estén presentes en alimentos de consumo humano.

La presencia de estos residuos, a pesar de sus cantidades mínimas, puede inducir efectos adversos en los seres humanos, tales como reacciones alérgicas en individuos hipersensibles. Otro efecto a largo plazo puede ser cancerígeno, y la exposición prolongada puede dar lugar a la selección de bacterias resistentes en el cuerpo humano [Koesukwiwat, U. 2007; Pereira, P. 2012; Wang, L. 2012, Wang, X. 2007].

Gracias a la problemática originada por esta clase de antimicrobianos se ha visto la necesidad de cuantificar estos residuos en concentraciones bajas en el orden de  $\mu\text{g l}^{-1}$  o  $\mu\text{g kg}^{-1}$  permitiendo el desarrollo de diversas metodologías analíticas. Una de las técnicas de mayor empleo en el análisis de antibióticos ha sido HPLC gracias a su alta eficiencia en la separación, a sus cortos tiempos de análisis, sin embargo la determinación directa de residuos de antibióticos a niveles traza resulta ser insuficiente por lo que se requiere de técnicas adicionales de preconcentración para su determinación [Gonzales, C.A. 2009; Hyun-Hee, C. 2009].

## 3.6 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 3.6.1 Materiales y reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas disolviendo el reactivo grado analítico en agua desionizada con una resistividad no menor que 18.0 MΩ cm, obtenida con un sistema Milli-Q. (Millipore). Hidróxido de sodio y ácido acético fueron obtenidos por J.T. Baker. Metanol fue de Sigma-Aldrich. La fase móvil empleada en los experimentos mediante HPLC consisten en dos soluciones, una solución de acetonitrilo con ácido fórmico 1% y la segunda solución consiste en ácido fórmico 1% en agua. Ambas soluciones se filtraron utilizando papel de 0.45 μm.

Sulfacloropiridazina (98%), sulfadiazina (99%), sulfadimetoxina (99%), sulfametazina (99%), sulfametoxazol (98%), sulfametoxipiridazina (98%), sulfaquinoxalina (99%), sulfatiazol (98%) y sulfisoxazol (98%) fueron obtenidos por Sigma. Las diferentes soluciones estándar fueron preparadas diariamente por dilución de una solución madre de SAs a una concentración de 0.6 g l<sup>-1</sup> de cada componente, disolviendo las sustancias puras en metanol. Esta solución fue conservada en ausencia de luz a 4°C. Una solución de sulfametoxidiazina (SMTD) a una concentración de 50 mg l<sup>-1</sup> fue usada como estándar interno (EI).

La síntesis de magnetita fue preparada a partir de sulfato ferroso heptahidratado (Sigma). El recubrimiento de sílice fue sintetizado utilizando feniltrimetoxilsilano (97%, PTMS), tetrametoxisilano (98%, TMOS) usando Triton X-100 y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) como surfactante (Sigma).

### 3.6.2 Equipos

La caracterización de los adsorbentes obtenidos fue determinada mediante difracción de rayos X (XRD) usando un difractómetro de polvo Philips equipado con una unidad de control Philips PW 1710, un goniómetro vertical Philips PW 1820/00 y un generador Enraf Nonius Philips FR 590, equipado con un monocromador de haz difractado de grafito con una radiación de ( $\lambda$  (K $\alpha$ 1) = 1,5406 Å), que opera a 40 kV y 30 mA. El patrón de difracción de polvos se recogió por medio de la respuesta de la radiación de CuK contra el valor de 2θ con un ángulo inicial (2θ), 5°, y un ángulo final (2θ), 70°.

Su caracterización también se realizó mediante infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en un equipo Perkin Elmer con transformada de Fourier (FTIR) modelo de espectrofotómetro IRDM. Las muestras se analizaron en pastilla de KBr (1%). El análisis morfológico del adsorbente magnético fue determinada en un equipo JEOL JEM-1011 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y un JEOL JSM-6360LV microscopía electrónica de barrido (SEM).

La determinación mediante HPLC-DAD se realizó en un equipo Waters 2695 HPLC con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Los datos fueron recolectados y analizados con un software Waters Empower Pro. La separación de las SAs se realizó usando una columna Gemini C<sub>18</sub> (50 x 4.6 mm, 3 µm) de Phenomenex. La determinación cromatográfica se llevó a cabo con un detector UV-Vis a 260 nm. Las muestras fueron inyectadas automáticamente con un volumen de 10.0 µl. El gradiente de la fase móvil fue el siguiente: paso 1: 0-4 min, 2% B, Paso 2: 4-5 min, 2-10 % B, paso 3: 5-27 min, 10-30 % B, paso 4: 27-30 min, 30-55 % B, paso 5: 30-30.5 min, 55 % B, paso 6: 30.5-31 min, 55-2 % B, paso 7: 31-35 min, 2 % B. El flujo empleado se mantuvo a 0.5 ml min<sup>-1</sup> durante la separación.

### **3.6.3 Tratamiento de la muestra**

La metodología propuesta (MSPE) se realiza mediante la siguiente secuencia: 0.1 g de adsorbente magnético (con grupos fenilo) se añade a un matraz erlenmeyer de 50 ml. Las partículas se acondicionan con 5 ml de metanol en un baño de ultrasonido por 5 min. Posteriormente el adsorbente se aísla magnéticamente y se lava dos ocasiones con 10 ml de agua desionizada.

Subsecuentemente 10 ml de muestra de leche se añade al matraz que contiene el adsorbente magnético pre-activadas, la suspensión se mezcla en un baño de ultrasonido durante 10 min, transcurrido el tiempo de agitación se aplica un campo magnético externo aislando el adsorbente magnético junto con los analitos adsorbidos. La fase líquida se decanta y la fase sólida se lava tres ocasiones con 5 ml de agua desionizada. Las SAs adsorbidas se eluyen de los adsorbentes magnéticos por dispersión del sólido en 5 ml de una solución de metanol/NaOH 1x10<sup>-3</sup> M por 5 min. La solución resultante se evapora a sequedad en corriente de aire, posteriormente el residuo se reconstituye en 0.5 ml de una solución de 0.1 % Ac. fórmico con 5 mg l<sup>-1</sup> de estándar interno. Finalmente, la solución se hace pasar a través de un filtro de nylon 0.2 µm y se analiza por HPLC.

## 3.6.4 Síntesis de los adsorbentes magnéticos sílice-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

La ruta de síntesis propuesta incluye dos etapas. En una primera etapa se sintetiza magnetita mediante co-precipitación [Aguilar-Arteaga, K. 2010, Barrado, E. 1998]. Esta vía de síntesis genera partículas paramagnéticas con un tamaño de 10-50 nm [Gupta, A.K. 2005; Sushil, K. 2007]. Posteriormente en una segunda etapa las partículas magnéticas se recubren con sílice de diferente polaridad mediante polimerización en emulsión.

### 3.6.4.1 Síntesis de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Para la síntesis de magnetita se colocan 50 ml de una solución de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (1.25mM) en un vaso de precipitado para posteriormente adicionar NaOH (6.0 M) hasta alcanzar un pH 10.0, manteniendo una temperatura de 80°C durante la reacción. El precipitado obtenido se oxida parcialmente utilizando una corriente de oxígeno. Transcurrida una hora de reacción se obtiene un sólido color negro con propiedades paramagnéticas, el cual se aísla magnéticamente filtra y se lava con agua desionizada. El esquema de reacción se representa en la Figura 3.4.

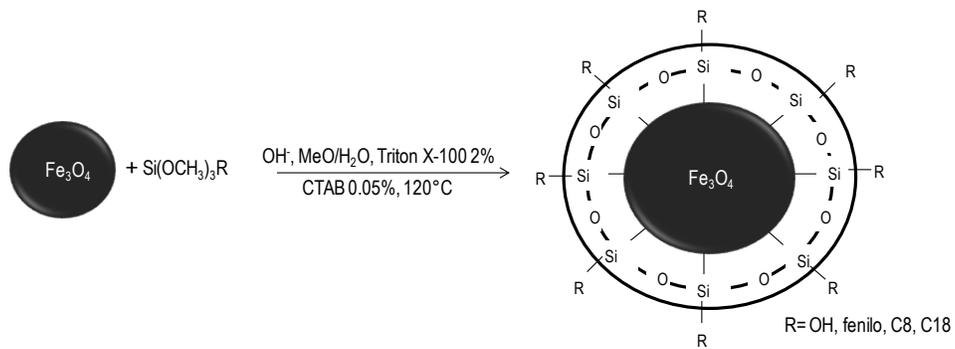


Figura 3.4. Reacción de síntesis de magnetita.

### 3.6.4.2 Obtención de las partículas sílice-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Sintetizada la magnetita ésta es embebida con sílice de acuerdo a la metodología sol-gel señalada en la Figura 3.5. El método sol-gel se realiza en medio hidro-alcohólico en presencia de un catalizador básico. La magnetita previamente sintetizada se adiciona dentro de un matraz balón con TMOS:PTMS a diferentes radios molares. La polimerización de los monómeros se llevó a cabo mediante polimerización en emulsión con la finalidad de disminuir el tamaño de partícula y obtener sólidos con morfología definida. La principal característica de este tipo de síntesis es el uso de medios de reacción que contengan surfactantes, permitiendo la solubilización de los monómeros.

La reacción se realizó utilizando 25 ml de una solución que contiene 2.0% (w/v) Triton X-100, 0.02% (w/v) CTAB, 12.5% (v/v) metanol, 200 µl de una solución de amoníaco al 28% como catalizador. La mezcla se coloca en reflujo a 120° durante 16 h.



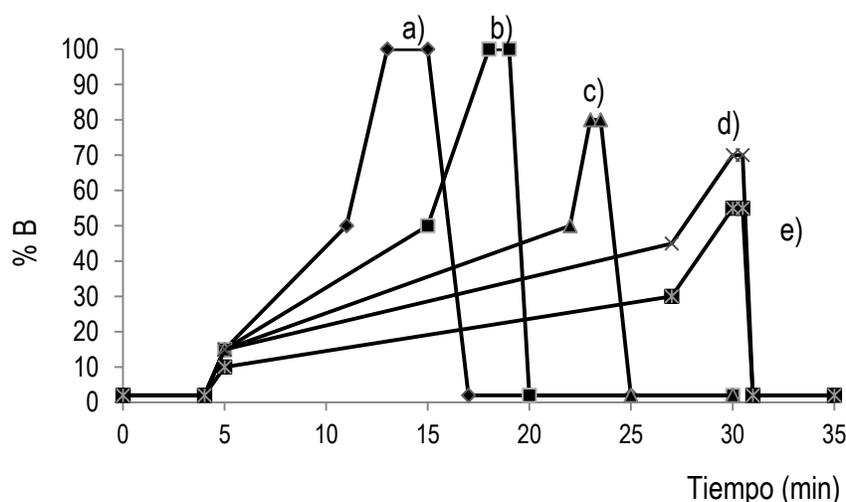
**Figura 3.5.** Polimerización de sílice sobre las partículas de magnetita (polimerización en emulsión)

## 3.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.7.1 Separación cromatografica

Con la finalidad de encontrar las condiciones óptimas en la separación de las SAs, la composición de la fase móvil fue estudiada con la finalidad de encontrar las condiciones adecuadas de separación para las nueve sulfonamidas así como del estándar interno. En este estudio, dos soluciones diferentes fueron evaluados en la composición del gradiente en la fase móvil: la primera solución se encuentra formada de 0.1% de solución acuosa de ácido fórmico (Fase A), mientras la segunda fase consiste en 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (fase B). De acuerdo a los cromatogramas obtenidos el porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil afecta significativamente a la resolución de las SAs de interés. Para evaluar este efecto se llevó a cabo la evaluación a tres niveles diferentes (30, 45 y 50%) en cuatro intervalos de tiempo (5-11, 5-15, 5-22 y 5-27 min). Según los experimentos realizados, cuando el porcentaje de acetonitrilo alcanza un 50% (Figuras. 3.6a, 3.6b, 3.6c), se observa una superposición de la señal entre cuatro analitos de interés (sulfacloropiridazina, sulfametoxazol, sulfadimetoxina y sulfisoxazol). Una mejor resolución de 8 SAs empleando un gradiente tal y como se muestra en la Figura 3.6d, pero la resolución de las últimas 2 señales no era adecuada. Sin embargo cuando se emplea una mezcla más lenta de ambas soluciones como fase móvil en un periodo de 27 min, seguido por un aumento del porcentaje de acetonitrilo al 50%, se observa una resolución adecuada de las SAs de interés así como la del estándar interno.

Durante los tres primeros pasos en el gradiente, la separación de ocho señales (es decir, sulfadiazina, sulfatiazol, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfacloropiridazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol y del estándar interno), mientras que los últimos pasos son necesarios para la separación e identificación de sulfadimetoxina y sulfaquinoxalina por lo que el último gradiente (Figura. 3.6e) se utilizó para el análisis de SAs con MSPE-HPLC.



**Figura 3.6.** Efecto de la composición del gradiente en la separación de SAs de interés. Solución (acuosa HCOOH 1%) y Solución B (HCOOH 1% en CH<sub>3</sub>CN).

### 3.7.2 Optimización del sistema MSPE

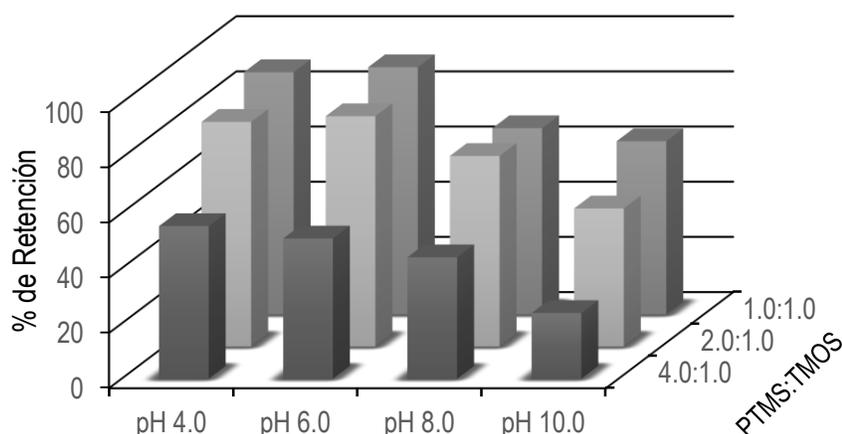
Para evaluar la retención de SAs una de las características más importantes de los adsorbentes magnéticos es su hidrofobicidad. Tres diferentes adsorbentes magnéticos fueron sintetizados y caracterizados. Los adsorbentes fueron obtenidos mediante la variación en la relación molar del monómero funcionalizado (TMFS) y el monómero entrecruzante (TMOS) en las siguientes proporciones 1:1, 2:1 y 4:1 (TMFS:TMOS). Una vez sintetizados los adsorbentes se evaluaron para la retención de SAs mediante MSPE tal y como se muestra en la Tabla 3.3.

La dependencia del pH juega un papel importante en la extracción y aislamiento de SAs en matrices complejas. La existencia de diversos grados de ionización para las SAs se relacionan con sus constantes de disociación ácidas (pKa). Los valores de pKa de las SAs en solución acuosa son de 1.49 y 7.12. Esto indica que a valores de pH por debajo de 1.49 las SAs se encuentran en su forma catiónica, su estado neutro (zwitterions) se encuentra comprendido entre 1.49-7.12, y a pH por arriba de 7.12 las SAs se encuentran en su forma aniónica [Sanli, S. 2009]. Para evaluar el efecto del pH y la hidrofobicidad, los experimentos de retención se llevaron a cabo en el intervalo de pH de 4.0 a 10.0. Todos los experimentos se realizaron en 10 ml de una solución estándar de SAs de 10 mg l<sup>-1</sup>. Una vez completada la extracción, las SAs remanentes en la solución fueron determinadas mediante HPLC. El % de retención y el % de recuperación fueron calculados en función de la concentración añadida y la concentración encontrada después de la extracción.

## Resultados y Discusión

**Tabla 3.3.** Porcentaje de retención de SAs a diferentes valores de pH vs Relación del adsorbente magnético (TMFS:TMOS).

PTMS:TMOS	SAs	pH			
		4.0 (RSD)	6.0 (RSD)	8.0 (RSD)	10.0 (RSD)
1.0:1.0	SDZ	77.74 (1.62)	79.10 (3.50)	52.56 (2.79)	47.66 (2.38)
	STZ	81.95 (2.34)	78.70 (1.69)	54.78 (2.47)	57.08 (3.09)
	SMZ	81.02 (2.64)	85.94 (2.67)	68.76 (2.31)	68.66 (2.49)
	SMPZ	79.45 (1.24)	84.75 (2.01)	68.94 (2.80)	64.39 (2.55)
	SCP	91.74 (1.20)	93.92 (1.95)	70.90 (2.14)	69.25 (2.37)
	SMX	85.54 (3.05)	87.16 (4.63)	69.50 (3.87)	68.69 (2.55)
	SFX	99.20 (2.56)	96.17 (3.62)	56.48 (3.07)	52.26 (3.14)
	SDM	96.07 (2.31)	99.57 (0.63)	73.54 (2.83)	74.76 (1.55)
	SQX	97.61 (2.01)	101.24 (3.59)	92.14 (3.24)	62.41 (3.02)
2.0:1.0	SDZ	71.19 (1.38)	73.36 (2.04)	51.05 (2.19)	26.92 (2.10)
	STZ	71.85 (1.56)	72.30 (3.22)	46.31 (2.53)	31.61 (2.03)
	SMZ	73.49 (2.37)	77.25 (1.63)	64.51 (3.51)	45.73 (2.24)
	SMPZ	69.47 (3.09)	74.73 (0.71)	60.49 (4.47)	47.33 (2.20)
	SCP	87.95 (1.06)	85.10 (1.62)	70.44 (3.15)	39.42 (1.32)
	SMX	66.27 (2.24)	75.48 (1.71)	68.49 (4.47)	35.35 (1.29)
	SFX	96.91 (0.95)	97.41 (1.58)	87.97 (2.57)	86.56 (2.79)
	SDM	95.99 (1.11)	97.10 (2.07)	77.09 (1.62)	66.20 (2.65)
	SQX	99.67 (3.98)	98.52 (1.52)	95.35 (1.18)	71.26 (2.52)
4.0:1.0	SDZ	23.71 (2.58)	23.80 (3.60)	19.12 (4.04)	7.86 (2.26)
	STZ	16.36 (1.92)	22.45 (2.97)	24.57 (2.84)	10.53 (2.77)
	SMZ	48.74 (2.40)	54.28 (4.02)	48.57 (3.69)	32.14 (4.05)
	SMPZ	48.73 (1.43)	48.68 (3.62)	44.64 (2.48)	27.65 (4.01)
	SCP	54.59 (3.66)	47.75 (1.67)	34.87 (3.47)	28.12 (3.01)
	SMX	57.12 (3.98)	51.77 (3.57)	44.26 (2.72)	28.53 (4.38)
	SFX	64.29 (2.60)	47.61 (3.73)	40.87 (2.89)	13.41 (2.94)
	SDM	86.78 (2.01)	86.14 (3.96)	68.31 (3.05)	31.11 (2.61)
	SQX	97.04 (2.44)	74.44 (3.70)	70.45 (1.49)	34.48 (3.95)



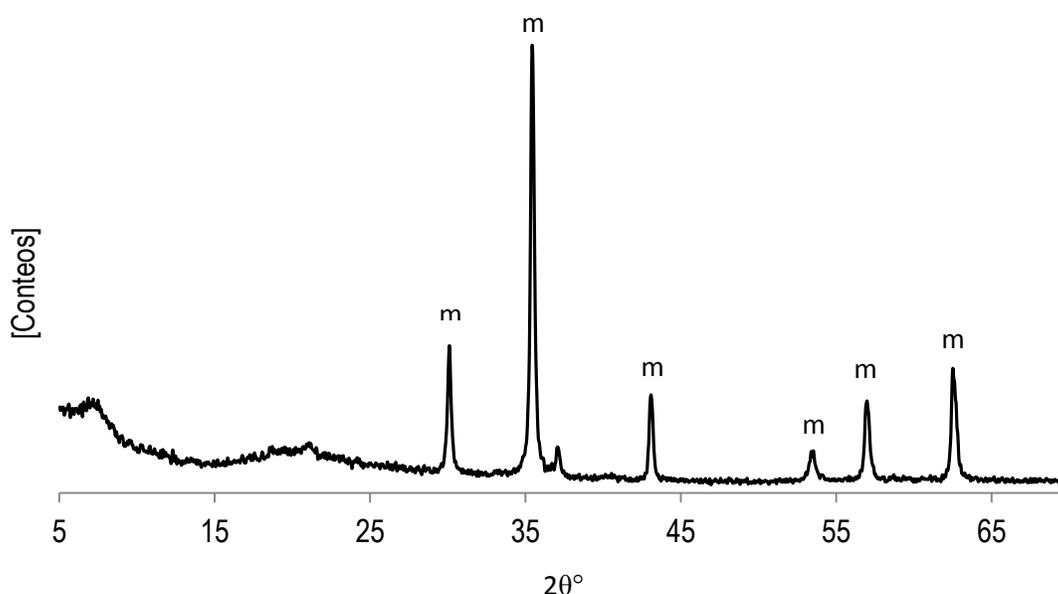
**Figura 3.7.** Porcentajes promedios de retención de SAs a diferentes valores de pH vs Relación del adsorbente magnético (TMFS:TMOS).

Los % de retención de SAs se incrementan conforme disminuye la hidrofobicidad del adsorbente magnético. En todo el intervalo de pH evaluado, la máxima retención es obtenida usando el adsorbente magnético con una relación 1:1 (TMFS:TMOS), sin embargo el uso de este adsorbente resulta ineficiente en la preconcentración de SAs debido a la elevada afinidad de los analitos hacia los adsorbentes lo que produce una baja re-extracción de los analitos. Por esta razón el adsorbente magnético más adecuado en la extracción de SAs es el adsorbente con una relación 2:1 (TMFS:TMOS), asegurando un re-extracción confiable de los analitos de interés.

El efecto del pH sobre la retención de SAs demuestra una elevada afinidad del adsorbente por las SAs en su estado neutro que por su forma protonada y desprotonada. Las condiciones óptimas en la retención de SAs son un pH de 6.0 y una proporción 2:1 en el adsorbente magnético. Bajo las condiciones óptimas se obtuvieron % de retención que van de 71.30% a 98.52% para todas las SAs determinadas. A valores de pH por debajo de 4.0 se produce la degradación de la magnetita presente en el adsorbente magnético, lo cual permite la formación de quelatos entre el Fe(III) y las SAs, produciendo la degradación de las mismas [Hassan, M.K. 1991]. A valores de pH por encima de 9.0 las partículas de magnetita adquieren carga negativa debido a los grupos hidroxilo, provocando una repulsión electrostática entre el adsorbente y las SAs en su forma aniónica. Este efecto explica el uso de una solución de metanol con NaOH  $1 \times 10^{-3}$  M como eluyente durante la preconcentración de SAs por MSPE.

### 3.7.3 Caracterización del adsorbente magnético óptimo

La morfología del adsorbente magnético óptimo fue estudiada por microscopía electrónica de barrido (SEM). El adsorbente presenta una morfología esférica. Determinando un tamaño de partícula de 50 a 150 nm. Los patrones de difracción de rayos X (XRD) de los adsorbentes magnéticos muestran las reflexiones correspondientes a la magnetita (m). Figura 3.7 muestra los patrones típicos de XRD de los adsorbentes. La presencia de dos bandas anchas en el ángulo  $2\theta$  de  $5^\circ$  a  $9^\circ$  y de  $15^\circ$  a  $25^\circ$  correspondientes a la fase amorfa del gel de sílice.

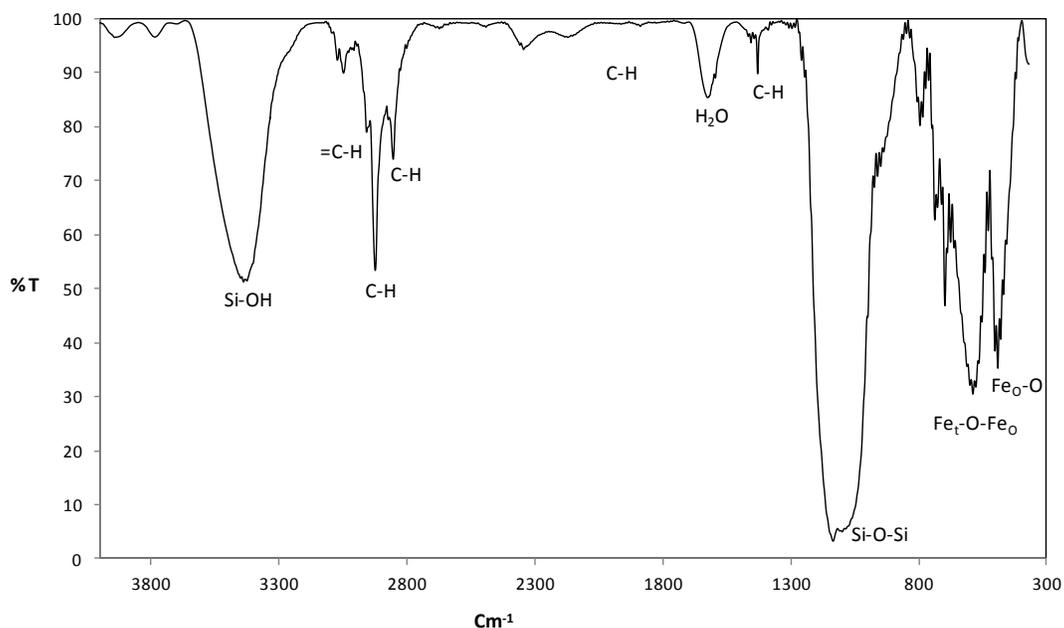


**Figura 3.8.** Difractograma obtenido del análisis del adsorbente magnético óptimo.

Los espectros infrarrojo FTIR (Figura 3.8) de los adsorbentes magnéticos presentan una banda vibracional característica para la magnetita entre  $600\text{-}550\text{ cm}^{-1}$ , correspondiente a las vibraciones del ion metálico que ocupan posiciones tetraédricas y octaédricas respectivamente. Una banda de estiramiento de  $3600\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$  atribuida a la vibración del grupo silanol (Si-OH). El carácter aromático de los adsorbentes es corroborado con una serie de bandas débiles alrededor de  $3000\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de los grupos =C-H del grupo fenilo, una serie de bandas débiles entre  $1700\text{ a }1550\text{ cm}^{-1}$  características a la vibración de los grupos C-H de grupos aromáticos. Una banda de flexión en  $1450\text{ cm}^{-1}$  atribuida al  $\text{H}_2\text{O}$  contenida en el adsorbente magnético. Una banda de estiramiento alrededor de  $1300\text{-}900\text{ cm}^{-1}$  perteneciente a la vibración del

## Resultados y Discusión

grupo siloxano (Si-O-Si), y una banda de deformación del grupo SiOH entre 850-750  $\text{cm}^{-1}$ . De acuerdo con los espectros FTIR las bandas de estiramiento del grupo SiOH disminuyen conforme la proporción del TMFS:TMOS incrementa, de manera que la hidrofobicidad de los adsorbentes magnéticos se incrementa de la misma manera.



**Figura. 3.9.** Espectro FTIR del adsorbente magnético obtenido bajo las condiciones óptimas.

La capacidad de adsorción y la afinidad del adsorbente magnético por los analitos de interés se determinaron mediante una isoterma de adsorción y el correspondiente análisis Scatchard. Las isotermas de adsorción se construyen determinando la concentración remanente (mM) de SAs obtenidas después de la dispersión de 0.1 g de adsorbente magnético en 25 ml de una solución de SAs en intervalos de concentración de 0.00004 a 0.07 mM. La cantidad de SAs enlazadas al adsorbente magnético en el equilibrio incrementa hasta una concentración de 0.05 mM.

En el análisis Scatchard, la cantidad de SAs enlazadas al adsorbente se obtiene restando la concentración libre de la concentración inicial de cada SAs. El análisis Scatchard fue obtenido de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{Q}{[\text{SAs}]} = \frac{(\text{Qmax}-Q)}{Kd}$$

## Resultados y Discusión

Donde  $Q$  ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) es la cantidad de cada SAs enlazadas sobre el adsorbente magnético en el equilibrio,  $[SAs]$  ( $\text{mM}$ ) es la concentración de SAs libre al equilibrio,  $K_d$  es la constante de disociación (la afinidad del adsorbente magnético por las SAs), y  $Q_{\text{max}}$  ( $\text{mmol g}^{-1}$ ) es la cantidad máxima de sitios activos [Chen, L. 2009; Gao, R. 2010].

Las ecuaciones lineales y los valores de  $K_d$  y  $Q_{\text{max}}$  corresponden a una afinidad de fuerza media entre el adsorbente y las SAs, por lo que no se requiere de la precipitación previa de las proteínas presentes en la muestra, lo que resulta ser adecuado en el proceso de elución. La linealidad de los datos indica la presencia de sitios activos homogéneos en el adsorbente magnético. De acuerdo a los resultados obtenidos los % de retención, % de re-extracción y la afinidad de los analitos por el adsorbente magnético la metodología MSPE demuestra ser una técnica útil en la determinación de SAs en muestras de leche.

**Tabla 3.4.** Resultados del análisis Scatchard.

SAs	Ecuación lineal	$K_d$ ( $\mu\text{M}$ )	$Q_{\text{max}}$ ( $\mu\text{mol g}^{-1}$ )
SDZ	$3.84 \pm 0.45 -17.32 \pm 0.05 Q$	$57.74 \pm 0.17$	$221.71 \pm 25.98$
STZ	$3.66 \pm 0.18 -17.27 \pm 2.38 Q$	$57.90 \pm 7.98$	$211.92 \pm 31.01$
SMZ	$3.51 \pm 0.10 -14.30 \pm 1.41 Q$	$69.93 \pm 6.89$	$245.45 \pm 25.19$
SMPZ	$4.23 \pm 0.19 -32.03 \pm 2.82 Q$	$31.22 \pm 2.75$	$132.06 \pm 13.05$
SCP	$3.64 \pm 0.17 -16.32 \pm 3.11 Q$	$61.27 \pm 11.67$	$223.04 \pm 43.76$
SMX	$3.10 \pm 0.14 -15.36 \pm 2.22 Q$	$65.10 \pm 9.41$	$201.82 \pm 30.56$
SFX	$3.38 \pm 0.08 -12.05 \pm 1.16 Q$	$82.99 \pm 7.99$	$280.49 \pm 27.80$
SDM	$3.00 \pm 0.14 -7.91 \pm 1.92 Q$	$126.42 \pm 30.69$	$379.26 \pm 50.26$
SQX	$3.14 \pm 0.08 -8.11 \pm 0.99 Q$	$122.10 \pm 14.90$	$384.61 \pm 47.96$

### 3.7.4 Validación y aplicación del método

Bajo las condiciones óptimas, los parámetros analíticos del método MSPE-HPLC fueron evaluados usando un volumen de muestra inicial de 10 ml de leche dopada con SAs en un intervalo de concentración de 0-800  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Cada estándar fue preparado y analizado por triplicado. Las soluciones estándar fueron homogenizadas y preconcentradas mediante la metodología propuesta (MSPE). Las áreas de los picos obtenidos fueron medidas, construyendo la línea de calibrado a partir de los promedios de las áreas. La línea de calibrado muestra una dependencia del área de

## Resultados y Discusión

pico y la concentración de SAs en la muestra de leche dopada. Los parámetros de regresión de la línea de calibrado se muestran en la Tabla 3.5.

**Tabla 3.5.** Parámetros de regresión de la curva de calibrado, área de pico (mAU) vs concentración de SAs ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en 10 ml de muestra.

Parametros de regresión					
Analitos	Ordenada $bo \pm ts$ (bo)	Pendiente $b1 \pm ts$ (b1)	Coefficiente de correlacion $r^2$	Limite de detección ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	Intervalo lineal ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
SDZ	-0.0021 $\pm$ 0.0009	0.9501 $\pm$ 0.0125	0.9991	24	72-800
STZ	-0.0014 $\pm$ 0.0014	1.6428 $\pm$ 0.0197	0.9993	25	75-800
SMZ	-0.0013 $\pm$ 0.0016	3.6945 $\pm$ 0.0233	0.9998	13	39-800
SMPZ	0.0079 $\pm$ 0.0056	5.7454 $\pm$ 0.0799	0.999	28	84-800
SCP	0.0001 $\pm$ 0.0016	1.7434 $\pm$ 0.0224	0.9992	27	81-800
SMX	-0.0036 $\pm$ 0.0018	2.0606 $\pm$ 0.0251	0.9993	23	69-800
SFX	0.0102 $\pm$ 0.0021	0.8620 $\pm$ 0.0298	0.9994	24	72-800
SDM	0.0079 $\pm$ 0.0049	5.2647 $\pm$ 0.0705	0.9991	27	81-800
SQX	0.0199 $\pm$ 0.0081	7.3368 $\pm$ 0.1160	0.9988	28	84-800

	Repetitividad						Reproducibilidad					
	50 $\mu\text{g l}^{-1}$		100 $\mu\text{g l}^{-1}$		150 $\mu\text{g l}^{-1}$		50 $\mu\text{g l}^{-1}$		100 $\mu\text{g l}^{-1}$		150 $\mu\text{g l}^{-1}$	
	[SAs]	%RSD	[SAs]	%RSD	[SAs]	%RSD	[SAs]	%RSD	[SAs]	%RSD	[SAs]	%RSD
SDZ	50.29	6.2	90.12	5.54	128.95	5.31	44.15	3.64	92.44	7.58	147.93	9.99
STZ	51.29	9.81	92.21	9.32	131.41	8.02	51.85	7.68	98.39	4.27	154.07	9.67
SMZ	55.39	3.93	109.64	1.79	158.68	5.14	54.86	1.2	115.36	2.05	151.77	5.67
SMPZ	45.57	5.06	99.45	8.02	135.22	3.07	51.07	8.4	92.67	4.14	142.43	7.18
SCP	46.22	11.09	94.57	8.23	134.81	2.15	46.68	7.42	105.49	4.7	135.91	5.22
SMX	44.14	3.98	95.04	8.57	159.89	2.12	47.47	6.41	96.55	2.12	156.1	9.14
SFX	49.44	7.58	99.13	6.14	128.37	1.02	48.72	6.75	90.18	1.88	142.57	8.9
SDM	42.89	2.62	107.38	5.9	153.88	7.1	51.77	3.4	104.88	8.71	161.01	5.92
SQX	55.12	3.31	105.91	4.72	162.64	4.85	47.66	4.39	100.22	5.38	151.59	3.87

## Resultados y Discusión

La exactitud del método se determinó mediante la recuperación absoluta de las SAs añadidas a una muestra de leche blanco a tres niveles de concentración con seis replicas para cada nivel (100 y 150  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). El promedio de las recuperaciones absolutas obtenidas para las nueve SAs, fueron encontradas en un intervalo de 81.71-114.51% con una desviación estándar relativa (RSD) menor al 10% en todos los casos usando la metodología propuesta de MSPE (Tabla 3.6).

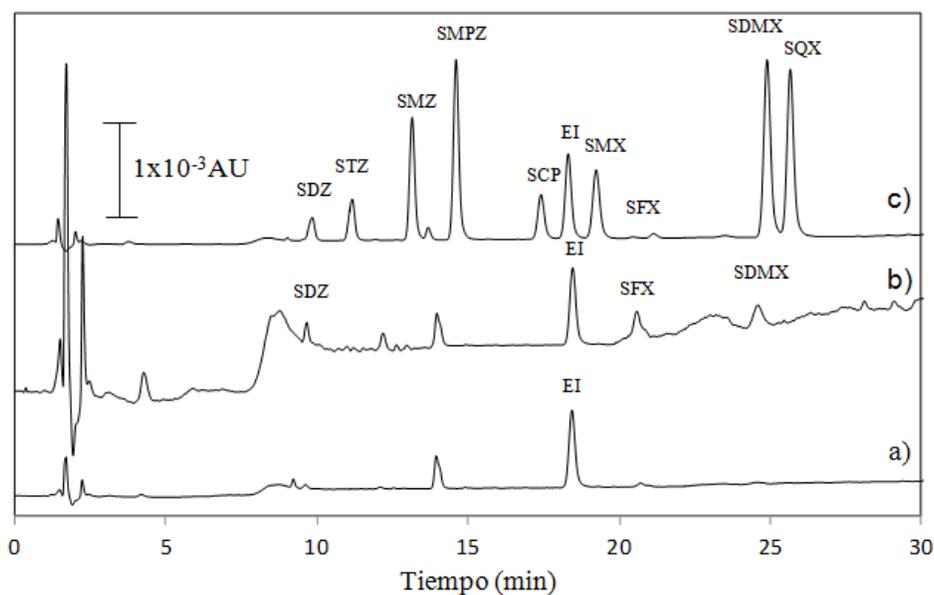
**Tabla 3.6.** Porcentaje de recuperación de sulfamidas y % RSD (n = 6) en muestras de leche dopadas mediante MSPE.

[ $\mu\text{g l}^{-1}$ ] Añadida	Analito	[ $\mu\text{g l}^{-1}$ ] Encontrada						% Recuperación	%RSD
100	SDZ	102.04	98.58	89.20	94.09	84.19	86.57	92.44	7.58
	STZ	102.36	103.58	96.69	93.89	93.91	99.92	98.39	4.27
	SMZ	119.00	114.63	114.92	114.75	112.00	116.87	115.36	2.05
	SMPZ	97.93	97.04	90.82	89.35	89.35	91.54	92.67	4.14
	SCP	101.16	110.66	110.31	106.41	106.15	98.23	105.49	4.70
	SMX	99.38	94.53	96.02	94.09	97.97	97.29	96.55	2.12
	SFX	91.49	89.70	90.58	86.99	90.88	91.44	90.18	1.88
	SDM	116.60	103.99	92.58	114.27	98.85	102.99	104.88	8.71
	SQX	99.56	96.12	97.93	96.89	100.06	110.78	100.22	5.38
150	SDZ	157.98	152.96	127.72	127.95	128.78	132.18	91.95	9.99
	STZ	170.44	149.86	145.15	156.62	170.20	132.18	102.72	9.67
	SMZ	177.75	182.40	164.85	162.61	161.66	181.35	114.51	5.67
	SMPZ	123.20	139.33	144.74	148.45	150.85	148.04	94.96	7.18
	SCP	136.94	149.39	130.22	130.63	133.09	135.17	90.60	5.22
	SMX	167.97	171.92	143.22	167.18	142.38	143.91	104.07	9.14
	SFX	137.91	134.69	113.40	119.85	114.81	114.74	81.71	8.90
	SDM	156.73	163.47	171.44	172.22	185.92	176.31	114.01	5.92
	SQX	154.04	153.77	145.58	147.31	147.69	161.17	101.06	3.87

## Resultados y Discusión

La metodología propuesta se aplicó en la determinación de SAs en 27 muestras de leche comercial de diferentes marcas, realizando el análisis por triplicado de cada muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de SAs en leche, trece muestras analizadas fueron positivas a la presencia de SAs, las cuales fueron identificadas por su tiempo de migración, doce muestras fueron positivas para la SDZ, ocho para la SMP, dos para la SDMX y una muestra para SQX con concentraciones de 42.18-119.80  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 36.64-107.53  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 82.35-120.64  $\mu\text{g l}^{-1}$ , y 96.59  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente. La desviación estándar relativa (RSD) fue menor a un 10% en todos los casos.

Los cromatogramas obtenidos en la determinación de SAs en muestras de leche se muestran en la Figura 3.9; análisis de muestras de leche blanco (Figura 3.9a), una muestra de leche real (Figura 3.9b) y una muestra de leche enriquecida (200  $\mu\text{g l}^{-1}$ ) y analizada por MSPE-HPLC (Figura 3.9c), demostrando la selectividad del adsorbente magnético por las SAs.



**Figura 3.10.** Cromatogramas obtenidos en el análisis de sulfamidas mediante MSPE: (A) muestra blanco, (B) muestra de leche real y (C) muestra de leche dopada (200  $\mu\text{g l}^{-1}$ ); sulfadiazina (SDZ), sulfatiazol (STZ), sulfametazina (SMZ), sulfametoxipiridazina (SMPZ), sulfacloropiridazina (SCP), sulfametoxazol (SMX), sulfisoxazol (SFX), sulfadimetoxine (SDM), sulfaquinoxalina (SQX) y estándar interno (EI).

### **3.8 CONCLUSIONES**

La metodología propuesta MSPE demostró ser una metodología eficiente en la pre-concentración de residuos de SAs en muestras complejas como la leche, posee selectividad, mínima manipulación de muestra en comparación con los métodos clásicos de pre-concentración clásicos como la SPE.

De acuerdo con los parámetros analíticos obtenidos, los límites de detección son adecuados para el análisis de SAs de acuerdo con las normativas internacionales. La metodología diseñada es una alternativa respetuosa con el medio ambiente en comparación a aquellas que utilizan grandes cantidades de soluciones, con la ventaja de no disminuir la sensibilidad y la precisión en los análisis.

El método desarrollado fue aplicado como un procedimiento de rutina para la identificación y cuantificación de SAs en muestras de leche real, con resultados satisfactorios.

## 3.9 BIBLIOGRAFÍA

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

**Am, M.** Spectrophotometric determination of some benzene sulfonamides with 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 (1998) p. 885.

**Barrado, E.**, Prieto, F., Vega, M., Polanco, F.F. Optimization of the operational variables of a medium-scale reactor for metal-containing wastewater purification by ferrite formation. *Water Res.* 32 (1998) p. 3055.

**Botsoglou, N.A.**, Fletouris, D.J. Drug residues in foods, Pharmacology, Food Safety, and Analysis. ed Marcel Dekker, Inc. New York (2001) p. 569.

**Chen, L.**, Zhang, X., Sun, L., Xu, Y., Zeng, Q., Wang, H., Xu, H., Yu, A., Zhang, H., Ding, L. Fast and selective extraction of sulfonamides from honey based on magnetic molecularly imprinted polymer. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) p. 10073.

**Ching-Cherng, T.**, I-Lun, Y., Li-Jen, L. Determination of Sulfonamide Residues in Milk by On-Line Microdialysis and HPLC. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 27 (2004) p. 501.

**Conzuelo, F.**, Gamella, M., Campuzano, S., Pinacho, D.G., Reviejo, A.J., Marco, M.P., Pingarro, J.M. Disposable and integrated amperometric immunosensor for direct determination of sulfonamide antibiotics in milk. *Biosens. Bioelectron.* 36 (2012) p.81.

**Díez, R.**, Sarabia, L.A., Sánchez, M.S., Ortiz, M.C. Application to a flow system with electrochemical detection for the determination of sulfonamides in milk. *Chemometr. Intell. Lab.* 92 (2008) p. 71.

**Domagk, G.** Ein Beitrag zur Chemetherapie der Bakteriellen Infektionen. *Dtsch. Med. Wochensch* 61 (1935) p. 250.

**Eliopoulos, G.M.**, Huovinen, P. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. Clin. Infect. Dis. 32 (2001) p. 1608.

**Fildes, P.A.** Rational approach to research in chemotherapy. Lancet. 1 (1940) p. 955.

**Font, G.**, Juan-Garcia, A., Pico, Y. Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat. J. Chromatogr A, 1159 (2007) p. 233.

**Gao, R.**, Zhang, J., He, X., Chen, L., Zhang, Y. Selective extraction of sulfonamides from food by use of silica-coated molecularly imprinted polymer nanospheres. Anal. Bioanal. Chem 398 (2010) p. 451.

**García-Rodríguez, J.A.**, Gomis, M., González, J., Prieto, J. Historia de la Antibioterapia. <http://www.sepeap.org/archivos/libros/antibioticos/1.pdf>

**Geissman, T.A.** Principios de química orgánica. 3ª edición. Ed. Reverte S.A (1973) p. 720.

**Gonzalez, C.A.**, Usher, K.M. Determination of Sulfonamides in Milk Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Agilent Technologies, Inc. 2009 p. 1.

**Goodman, A.**, Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. Las bases farmacológicas de la terapéutica, Editorial Médica Panamericana, México D.F. (1993).

**Gupta, A.K.**, Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials. 26 (2005) p. 3995.

**Hassan, M.K.**, Hassan, R.M., & Abdalla, M.A. Synthesis and characterization of high-spin iron(III)-sulpha drug complex and their biological-activity. Monatshefte fur Chemie, 122 (1991) p. 829.

**Hyun-Hee, C.**, Jung-Bin, L., Yun-Hee, C., Kwang-Geun, L. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food. Chem.* 113 (2009) p. 297.

**Karpanoja P.**, Nyberg S.T., Bergman M., Voipo T., Paakkari P., Huovinen P. Connection between trimethoprim-sulfamethoxazole use and resistance in *Streptococcus pneumonia*, *Haemophilus influenza*, and *Moraxella catarrhais*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) p. 2480.

**Koesukwiwat, U.**, Jayanta, S., Leepipatpiboon, N. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. *J. Chromatogr. A.*, 1140 (2007) p. 147.

**Korolkovas, A.**, Burckhalter, J.H. Agentes quimioterapicos. Sulfamidas. Compendio esencial de química farmacéutica. Parte V, Ed reverté S. A. Barcelona 31 (1983) p. 587.

**Lara, F.J.**, García-Campana, A.M., Neusüss, C., Alés-Barrero, F. Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) p. 3372.

**Li, T.**, Zhi-Guom, S., Ming-Ming, Z., Yu-Qi, F. Multiresidue determination of sulfonamides in chicken meat by polymer monolith microextraction and capillary zone electrophoresis with field-amplified sample stacking. *J. Chromatogr. A.* 1205 (2008) p.163.

**Ming-Ren, S.F.**, Su-Yi, C. Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Anal. Chim. Acta* 499 (2003) p.215.

**Nagaraja, P.**, Naik, S.D., Shrestha, A.K. Shivakumar, A. A sensitive spectrophotometric method for the determination of sulfonamides in pharmaceutical preparations. *Acta Pharm.* 57 (2007) p. 333.

**Parra-Salgado, J.**, Torres-Martínez, M.B. Desarrollo histórico y estado actual de las sulfamidas. *Lab-acta* 14 (2002) p. 85.

**Pereira, P.**, Eustáquia de Freitas, E., Fabiano de Alkimim, E., Azevedo, E., Vasconcellos, D., Augusti, R. Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis. *Food Control* 28 (2012) 192.

**Sanli, S.**, Altun, Y., Sanli, N., Alsancak, G., Beltran, J.L. Solvent Effects on pKa values of Some Substituted Sulfonamides in Acetonitrile-Water Binary Mixtures by the UV-Spectroscopy Method. *J. Chem. Eng.* 54 (2009) p. 3014.

**Sushil, K.**, Collins, K., Collins, T. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment: A Challenge to Green Chemistry. *Chem. Rev.* 2007, 107, 2319-2364

**Upadhyay, K.**, Asthana, A., Tiwari, N. Solid phase extractive spectrophotometric determination of some sulfa drugs. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 5 (2012) p. 222.

**Vicente, D.**, Perez-Trallero, E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enferm Infecc. Microbiol. Clin.* 28 (2010) p. 122.

**Wang, L.**, Wu, J., Wang, Q., He, C., Zhou, L., Wang, J., Pu, Q. Rapid and Sensitive Determination of Sulfonamide Residues in Milk and Chicken Muscle by Microfluidic Chip Electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) p 1613.

**Wang, X.**, Li, K., Shi, D., Xiong, N., Jin, X., Yi, J., Bi, D. Development of an immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. *J. Agric. Food Chem.* 55(2007), 2072.

**Woods D.D.** Relation of p-aminobenzoic acid the mechanism of action of sulphanilamide. *Br. J. Exp. Pathol.* 21 (1940) p. 74.

**Zacco, E.,** Galve, R., Adrian, J., Sánchez, F., Marco, M.P., Alegret, S., Pividori, M.I. Procedure 34 Electrochemical determination of sulfonamide antibiotics in milk samples using a class-selective antibody. *Compr. Anal. Chem.* 49 (2007) p. e237.

**Zayas-Blanco, F.,** Garcia-Falcon, M.S., Simal-Gandara, J. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection. *Food Control* 15 (2004) p. 375.



*CAPÍTULO IV*

*QUINOLONAS*

## 4.1 Historia y clasificación de las Quinolonas

Las quinolonas (QNs) son uno de los grupos de antimicrobianos sintéticos de mayor uso tanto en medicina humana como en medicina veterinaria. A principios de la década de los años 60, Lescher puso a disposición la primer QN, denominada ácido nalidíxico, obtenida mediante la síntesis de la cloroquina de manera accidental [Lescher, G.Y. 1962]. La sustancia encontrada fue útil en el tratamiento de infecciones urinarias. Sin embargo con el paso del tiempo se encontró que este antibiótico generaba resistencia bacteriana en periodos cortos de tiempo, dicha resistencia fue confundida con el efecto bactericida que presentaba este antimicrobiano en dosis terapéuticas. A concentraciones mayores perdía la mayoría de su acción antibacteriana, inhibiendo además de la síntesis de ácidos nucleicos, la síntesis protéica y produciéndose un efecto autotóxico [Jameson, J.R. 1965; Lescher, G.Y. 1962].

Posteriormente en los años 80, se incorporaron a la molécula uno o varios átomos de flúor en el núcleo básico de la QN lo que dio lugar a la aparición de las primeras fluoroquinolonas o también conocidas como QNs de segunda generación. La introducción de estos átomos dio origen a un aumento en su espectro de actividad haciéndolas útiles para el tratamiento de una gran variedad de infecciones entre las cuales se encuentran: respiratorias, de tipo sistemático y aquellas que presentan una actividad contra bacterias Gram-negativas [Neu, H.C. 1993; Oates, J.A. 1991; Piddock, L.J. 1994; Sheehan, G.J. 1988].

A partir de los años 90 se ha originado el desarrollo en la síntesis de varios derivados de esta familia, presentando mejoras importantes en su biodisponibilidad, vida media y espectro de actividad. A estos derivados se les conoce como QNs de tercera generación entre las cuales se encuentran la tosufloxacin, levofloxacin y esparfloxacin.

En años recientes han sido desarrolladas y aprobadas nuevas QNs (moxifloxacin, gatifloxacin, clinafloxacin, trovafloxacin, sitafloxacin) también conocidas como QNs de cuarta generación, las cuales incluyen en su espectro gérmenes anaerobios. Es por ello que el avance en el desarrollo de antimicrobianos de esta familia la ha situado como una de las familias principales en el tratamiento de enfermedades infecciosas [Andriole, V. 1998; Rubistein, E. 2001].

Las QNs representan una clase de antibióticos homogénea desde el punto de vista químico. Aunque no tienen una estructura química básica, si comparten un esqueleto tipo 4-oxo-1,4-dihidroquinolona. Las diferencias en su estructura radican en el número y posición de los átomos de nitrógeno y flúor, así como en las cadenas laterales presentes en cada molécula. Sin embargo todas ellas se derivan de ácidos carboxílicos heterocíclicos clasificándose en cuatro grupos (Figura 4.1): a) 8-N-quinolonas (con un núcleo naftiridinico), b) 2-N-quinolonas (con un anillo cilonina), c) derivados de la quinoleína y d) 6,8-N,N-quinolonas (piridopirimidinas) [Andriole, V. 1998; Ball, P. 2000; Neuman, M. 1988, Suman, H. 1999].

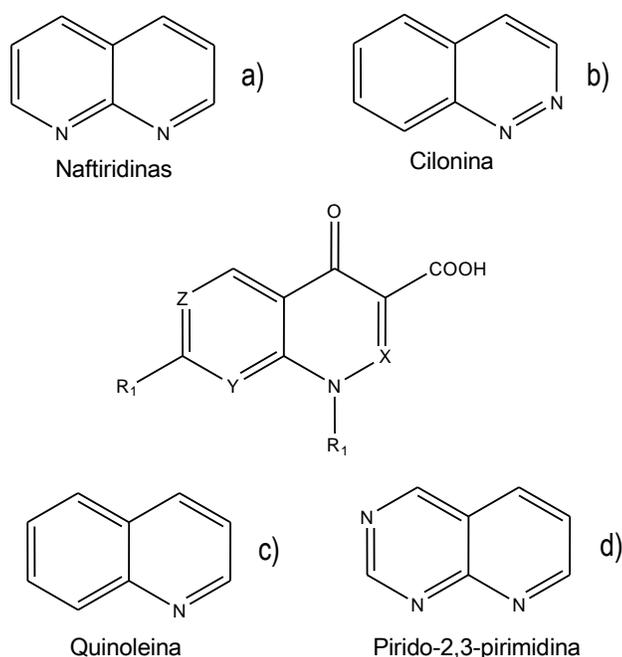
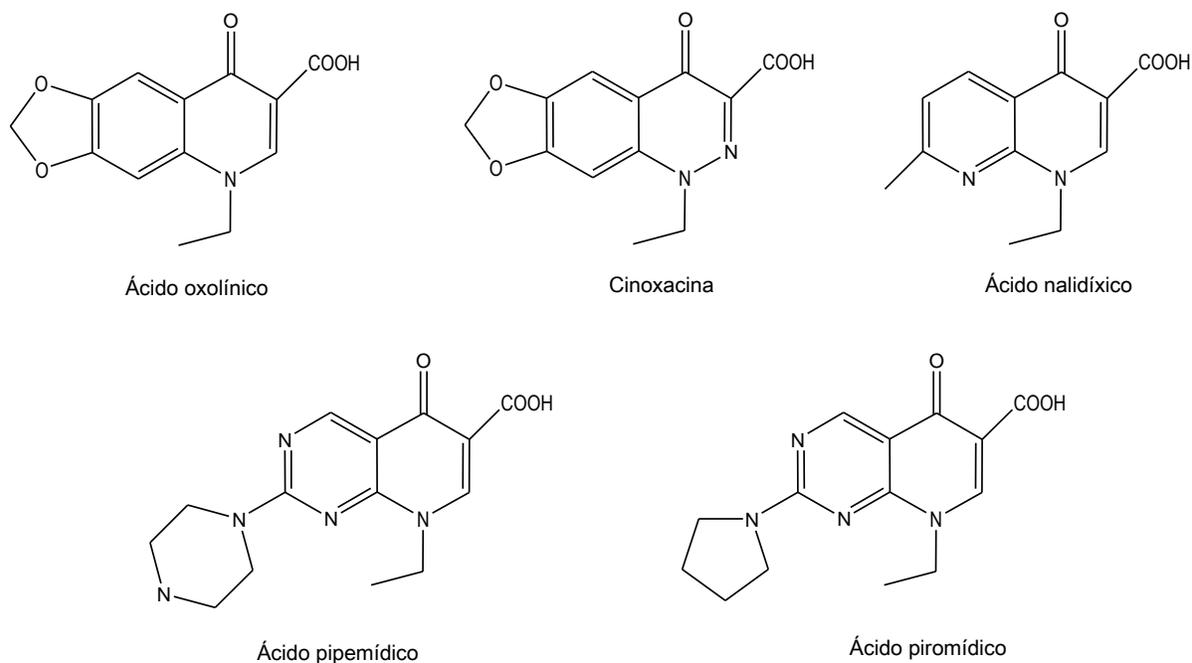


Figura 4.1. Estructuras básicas de los cuatro grupos de quinolonas.

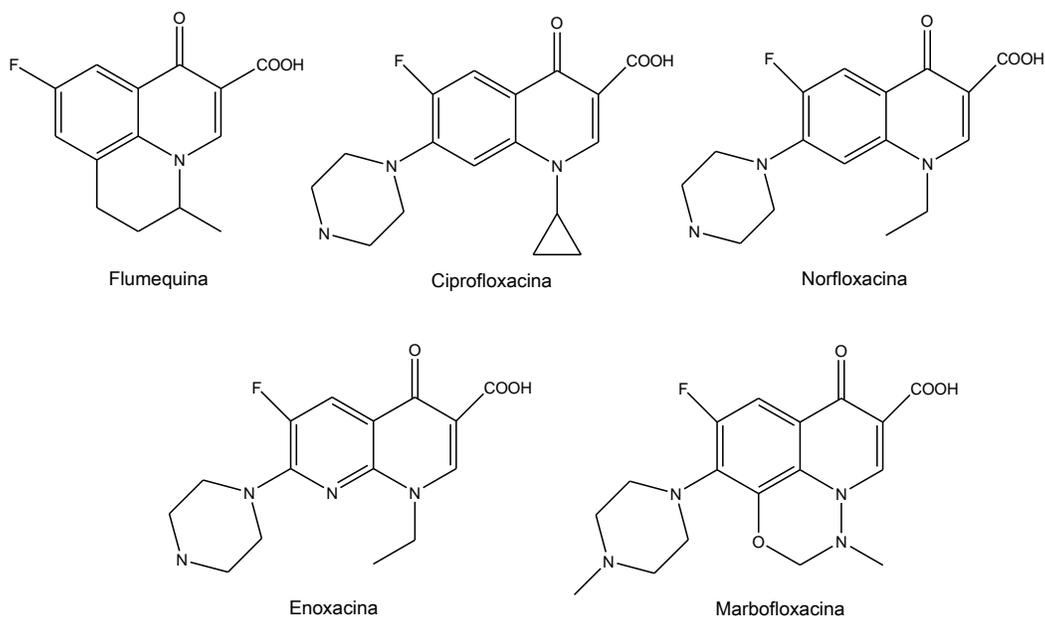
Otra posible clasificación de estas sustancias se establece por generaciones, conforme su desarrollo. De acuerdo a esto se encuentran diversas clasificaciones:

- a) **Primera generación:** Las primeras QNs que se originaron a partir del descubrimiento del ácido nalidixico pero con un espectro de actividad similar entre sí tales como: ácido pipemídico, ácido piromídico, ácido oxolinico y la cinoxacina entre otros Figura 4.2. Estas QNs son empleadas primordialmente en el tratamiento de infecciones urinarias.



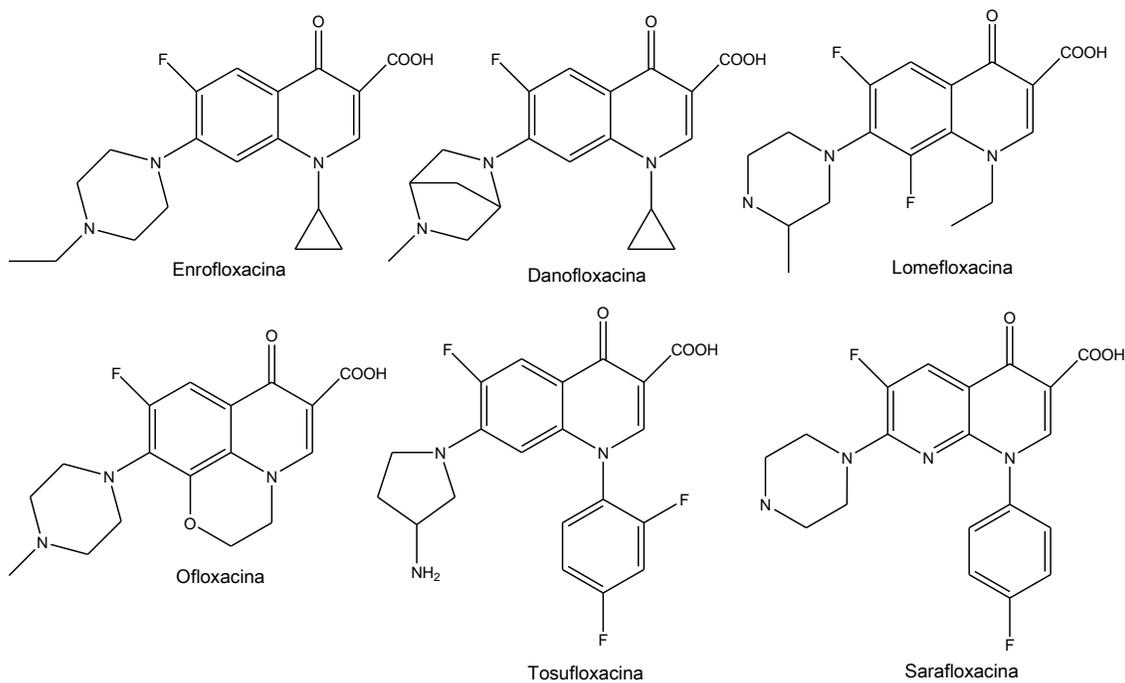
**Figura 4.2.** Estructuras químicas de QNs de primera generación.

- **Segunda generación:** surgen con la aparición de las fluoroquinolonas al incorporar un átomo de flúor en la posición 4 y un grupo piperacínilo en la estructura base de las QNs. Estas fluoroquinolonas fueron reconocidas como un grupo de antimicrobianos con propiedades terapéuticas importantes en función de: poseer un amplio espectro de actividad, inducir una baja frecuencia de mutaciones, elevada biodisponibilidad y buena distribución tisular (Figura 4.3).



**Figura 4.3.** Estructuras químicas de QNs de segunda generación.

b) **Tercera generación:** Engloba nuevas QNs aparecidas a partir de modificaciones de las anteriores, como la incorporación de átomos de flúor a la molécula, originando un aumento en el espectro antimicrobiano (Figura 4.4).



**Figura 4.4.** Estructuras químicas de QNs de tercera generación.

c) **Cuarta generación:** Se le llama así al desarrollo de nuevos derivados a lo largo de los últimos años originados mediante modificaciones estructurales respecto a las QNs de tercera generación tales como grepafloxacina, clinafloxacina y trovafloxacina (Figura 4.5). El rasgo más notorio de estos antibacterianos es una mayor actividad antibacteriana y mayor disponibilidad oral que sus antecesores.

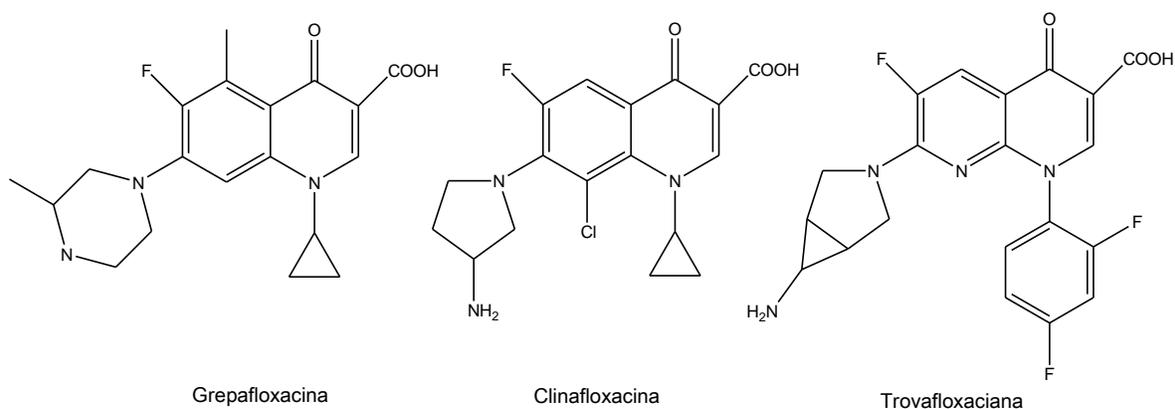
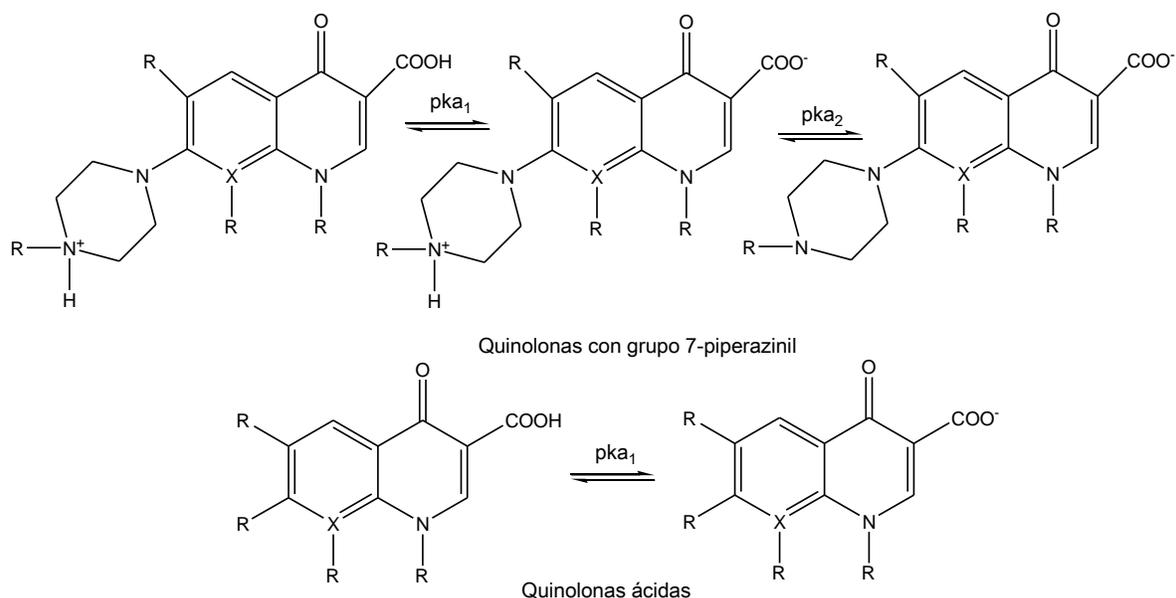


Figura 4.5. Estructuras químicas de QNs de cuarta generación.

## 4.2 Comportamiento ácido-base

De acuerdo a las estructuras químicas, la mayoría de las QNs que forman esta familia de antimicrobianos contienen un grupo carboxílico en su estructura, lo que les confiere un carácter ácido, mientras que el grupo piperazinil origina la presencia de un carácter básico, como consecuencia las QNs pueden presentar especies catiónicas, zwitteriónica y aniónicas. Los equilibrios ácido-base para las QNs se muestran en la Figura 4.6. Los valores referenciados de pKa para las QNs de carácter ácido están entre 6.0-6.9, mientras que en el caso de las QNs con un grupo piperazinil, los valores encontrados oscilan entre 5.5-6.6 y 7.2-8.9 para pKa<sub>1</sub> y pKa<sub>2</sub> respectivamente [Hernandez-Arteseros, J.A. 2002]



**Figura 4.6.** Estructuras y reacciones de disociación ácido-base de QNs.

### 4.3 Análisis de quinolonas

La gran variedad de usos de las QNs en medicina humana y veterinaria ha incrementado en los últimos años, el interés en esta clase de antimicrobianos ha originado el desarrollo de métodos analíticos para su cuantificación en diversas matrices analíticas.

El análisis de quinolonas en muestras complejas requiere primordialmente una serie de etapas con la finalidad de extraer y concentrar los analitos presentes en la matriz analítica. Los procedimientos requeridos incluyen varias etapas adicionales como precipitación o centrifugación, en las que se pretende eliminar la máxima cantidad de interferentes previo a la determinación de los mismos mediante una técnica analítica.

### 4.4 Etapa de extracción

Las QNs son solubles en medios polares orgánicos, como acetonitrilo y metanol. Su solubilidad en agua está limitada al pH de la disolución, de manera general son fácilmente disueltas en medio ácido o básico. La mayoría de los procedimientos de extracción de QNs en muestras de alimentos se basan en SPE utilizando cartuchos de C<sub>18</sub> y poliméricos. La muestra requiere de un ajuste del valor del pH previo a su extracción y el uso de disolventes orgánicos como metanol para eluir los analitos [Roybal, J.E. 1997].

Existen otras alternativas para la extracción de muestras de alimentos (sólidas), como la extracción sólido-líquido utilizando como disolventes ácido acético 5%, acetonitrilo, acetato de etilo, cloroformo y diclorometano [Christodoulou, E.A. 2007; Evaggelopoulou, E.N. 2013; Pecorelli, I. 2003; Samanidou, V.F. 2005; Turiel, E: 2006; Yorke, J.C. 2000, Zhao, L. 2012]. Su aplicación está limitada debido a que utiliza volúmenes elevados de disolventes orgánicos. En muestras líquidas se utiliza la LLE, sin embargo se requiere de una etapa de limpieza en la eliminación de grasas [Vera-Candioti, L. 2010].

El análisis de QNs en leches requiere de una etapa de precipitación de proteínas previo a su extracción, lo cual se ha logrado mediante la adición de un disolvente orgánico como etanol o acetonitrilo [Aguilera-Luiz, M.M. 2008; Marazuela, M.D. 2004; Roybal, J.E. 1997] o a través de la disminución del pH utilizando ácido tricloroacético, ácido acético o ácido fosfórico [Ho, C. 2004; Idowu 2004; Marazuela, M.D. 2004; Vera-Candioti, L. 2010].

## **4.5 Métodos de análisis para la determinación de quinolonas**

La importancia en el análisis de residuos de antibióticos en muestras de alimentos de origen animal ha generado la necesidad en el desarrollo de metodologías analíticas para éste fin. La mayoría de los métodos de análisis de QNs otorgan una serie de ventajas e inconvenientes para la determinación en diferentes tipos de matrices. La metodología más reportada para el análisis de residuos de antibióticos se basa en el empleo de técnicas de separación instrumentales como cromatografía de líquidos de alta resolución. Sin embargo existen otras técnicas como métodos espectrofotométricos, la espectrofluorimetría, técnicas electroanalíticas y electroforesis capilar.

### **4.5.1 Métodos espectrofotométricos**

La espectrofotometría se refiere a los métodos cuantitativos de análisis químicos que utilizan la luz para medir la concentración de los analitos de interés. Se conoce como métodos espectrofotométricos y según sea la radiación utilizada como espectrofotometría de absorción visible (colorimetría), ultravioleta e infrarrojo.

De acuerdo a las características físico-químicas de las QNs, estas especies presentan dos bandas de adsorción en la región UV: una banda entre 245-290 nm específica para cada quinolona y una segunda banda en el intervalo de 300-350 nm la cual es común para todas las QNs. Estos máximos de adsorción han sido utilizados cuando se utiliza detección UV en sistemas de separación.

Así mismo las QNs pueden formar cromóforos mediante reacciones con diversos iones metálicos y pares iónicos que presentan una coloración característica. Los límites de detección alcanzados con estas metodologías están en orden de  $\text{mg l}^{-1}$ .

Un ejemplo es la determinación de ciprofloxacina y norfloxacina en muestras farmacéuticas. El método es basado en la formación de un complejo con Pd(II), en presencia de metil celulosa, como agente tensoactivo. Los complejos muestran un máximo de absorción a 545 nm para ambas especies [Fattah, A. 1996]. De igual manera se ha reportado la determinación de ofloxacina mediante su complejación con Fe(III) en medio ácido a una longitud de onda de 420 nm, el método se aplicó al análisis de productos farmacéuticos y orina humana [Soledad, M. 2005].

El análisis de la fracción parcialmente retenida en resinas de intercambio iónico mediante espectroscopía UV se denomina espectrofotometría en fase sólida. Esta técnica se ha aplicado al análisis de ciprofloxacina en muestras farmacéuticas mediante el uso de una resina Sephadex C-25, midiendo de manera directa a 277 y 380 nm [Pascual-Reguera, M.I. 2004].

### 4.5.2 Métodos espectrofluorimétricos

La familia de las QNs se caracteriza por presentar fluorescencia nativa, con longitudes de onda de excitación alrededor de 250-300 nm, obteniendo un máximo de su espectro de emisión entre 440-550 nm. Una de las ventajas principales en este tipo de determinaciones radica en la obtención de una mayor sensibilidad y selectividad con respecto a los métodos espectrofotométricos permitiendo alcanzar límites de detección en concentraciones a niveles traza ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en diversos tipos de muestra como orina, leche y muestras farmacéuticas [Cañada-Cañada, F. 2009; Navalon, A. 2000; Vilchez, J.L. 2001].

Aún cuando esta familia de antimicrobianos tiene características fluorescentes por naturaleza se han desarrollado métodos de análisis basándose en la formación de complejos altamente fluorescentes, entre los cuales se destacan la formación de complejos con Tb(III) y Pd(II) [Fattah, A. 1996; Kaura, K. 2012] así como reacciones de derivatización mediante el uso de 4-cloro-7-nitrobenzofurazano, produciendo de esta forma un aumento en la sensibilidad del método [Tatar, S. 2009].

### 4.5.3 Métodos electroanalíticos

Las QNs sufren reacciones de oxidación-reducción, lo que ha motivado el desarrollo de diversos estudios electroquímicos para esta clase de compuestos. La modificación de un electrodo de carbón vítreo con nanotubos de carbono permite determinar ciprofloxacina en muestras de fluidos biológicos. La modificación del electrodo mejora la oxidación electrocatalítica del analito permitiendo obtener límites de detección del orden de  $\mu\text{M}$  cuando se utiliza voltamperometría cíclica y cronoamperometría. [Fotouhi, L. 2010].

El uso de sensores planos de grafito pirolítico se han descrito para el análisis de norfloxacina en preparaciones farmacéuticas y muestras de orina. El método se basa en la medida de la señal de oxidación utilizando voltamperometría de onda cuadrada. El análisis se realiza a pH 7.2, obteniendo un límite de detección en el orden de  $\mu\text{M}$  [Goyal, R.N. 2012].

Recientemente se ha descrito el empleo de electrodos de pasta de carbono modificados con ácido cítrico, éste permite determinar simultánea ofloxacina y gatifloxacina en medio micelar. El método propuesto se aplicó en formulaciones farmacéuticas y en muestras de suero sanguíneo mediante voltamperometría diferencial de pulsos (DPV) alcanzando límites de detección en el orden de  $\mu\text{M}$  para ambos analitos [Zhang, F. 2013].

### 4.5.4 Cromatografía líquida de alta resolución

De acuerdo a las propiedades físico-químicas que presenta esta familia de las QNs, la separación de este grupo de antimicrobianos ha sido posible mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Usualmente la separación involucra el uso de columnas de fase reversa, principalmente  $\text{C}_{18}$  y  $\text{C}_8$ , sin embargo, en algunas ocasiones se han empleado fases fenilo, esto debido a que la presencia de grupos silanol libres residuales en columnas de fase reversa pueden originar la obtención de señales cromatográficas con colas [Idowu, O.R. 2004; Marazuela, M.D. 2004; Mitani, K. 2006; Nemutlu, E. 2007; Roybal, J.E. 1997].

Las fases móviles consisten principalmente de mezclas como metanol-ácido fórmico, acetonitrilo-ácido ortofosfórico y acetonitrilo-ácido acético. En la mayoría de los casos el pH de las fases móviles se mantienen en un intervalo de 1-4 con el propósito de reducir la ionización de los grupos silanol y minimizar de ese modo sus interacciones con las QNs. Para la detección se ha reportado el uso de la espectrofotometría de adsorción UV-Vis, fluorescencia (FL) y espectrometría de masas (MS). La Tabla 4.1 muestra ejemplos representativos del análisis de QNs en muestras de leche.

**Tabla 4.1.** Determinación de quinolonas en leche mediante HPLC.

Detector	Condiciones HPLC	Método Extracción	Límite de detección	Referencia
FL (278, 450 nm)	Columna: Intersil phenyl. FM: 2% ácido acético- acetonitrilo (85:15)	Precipitación, SPE: Intercambio catiónico	10 µg l <sup>-1</sup>	Roybal, J.E 1997
MS	Columna: Capcell Pak C <sub>8</sub> FM: formiato de amonio (pH 3.0, 5 mM)- acetonitrilo (85/15, v/v)	Microextracción en fase solida	7 - 29 µg ml <sup>-1</sup>	Mitani, K. 2006
MS	Columna: C <sub>18</sub> FM: metanol-0.1% ácido formico	QuEChERS	1 - 4 µg kg <sup>-1</sup>	Aguilera-Luiz, M.M 2008
MS	Columna: C <sub>18</sub> FM: 25% metanol-75% (v/v) acetato de amonio (10 mM, pH 2.5)	SPE: C <sub>18</sub>	0.2 ng g <sup>-1</sup> .	Tang, Q. 2009
FL (340, 545 nm)	Columna: C <sub>18</sub> FM: 82:18 ac. acético (30 mM, pH 3.0)/acetonitrile	SPE: C <sub>18</sub> Derivatización: terbio(III)	1.9 - 60 ng ml <sup>-1</sup>	Rodriguez- Diaz, R.C. 2005
FL (278, 455 nm)	Columna: C <sub>18</sub> FM: Agua (0.4% trimetilamina, 85% ac. fosfórico): metanol: acetonitrilo (85:7:8)	SPE: C <sub>18</sub>	1.1 - 11.3 µg kg <sup>-1</sup>	Hyun-Hee, C. 2009

## 4.5.5 Electroforesis capilar

Otra de las técnicas de mayor uso en años recientes en la determinación de antimicrobianos es la electroforesis capilar (CE) esto gracias a su simplicidad operacional, versatilidad, capacidad en la separación de una gran variedad de especies, junto con el hecho que se requiere un menor volumen de muestra. Esta es considerada como una técnica de separación, la cual es definida como la diferencia en la velocidad de migración de partículas o moléculas cargadas en un medio líquido, generalmente acuoso, producido por la influencia de un campo eléctrico en el interior de una columna capilar.

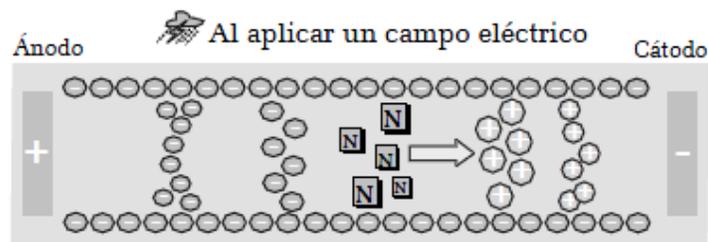


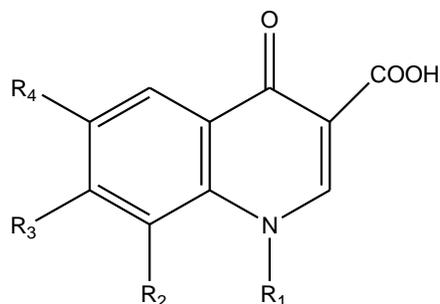
Figura. 4.7. Proceso de separación electroforético.

Entre los sistemas de detección más reportados en el análisis de antibióticos en se encuentran detectores UV-Vis, electroquimioluminiscencia (ECL) y espectroscopia de masas (MS). La Tabla 4.2 muestra ejemplos de la aplicación a muestras de leche.

**Tabla 4.2.** Determinación de quinolonas en leche mediante CE.

Detector	Condiciones CE	Método Extracción	Límite de detección	Referencia
MS	Voltaje separación: 25			
UV-visible (275 nm)	kV Buffer: 70 mM acetato de amonio pH 9.1.	SPE: Oasis MAX, HLB	6 - 24 $\mu\text{g l}^{-1}$	Lara, F.J. 2006
UV-visible (200 nm)	Voltaje separación: 30 kV Buffer: Borato de sodio pH 9.50.	SPE: C <sub>18</sub> , Oasis HLB polimerico	12 - 29 $\mu\text{g l}^{-1}$	Vera-Candioti, L. 2010
ECL	Voltaje separación: 14 kV Buffer: 15Mm Fosfatos pH 8.50.	SPE: Oasis HLB	10 - 15 $\text{ng ml}^{-1}$	Zhou, X. 2008
FL (240, 400 nm)	Voltaje de separación: 20 kV. Buffer: 50 mM H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 7.55-acetonitrilo (60:40, v/v)	SPE: alquil, fenil (sílice)	Orden $\mu\text{g l}^{-1}$	Ferding, M. 2004
ECL	Voltaje separación: 14 kV Buffer: 20 mM citrato de sodio, 4 mM ácido cítrico y 10 mM sulfato de sodio pH 6.1 Solución CL: 2 mM cerio(IV), 4 mM Tb(III) y 1.1 mM HCl.		0.06 - 0.08 $\mu\text{g ml}^{-1}$	Yang, Z. 2008

En el presente trabajo se pretende la determinación de un grupo de antimicrobianos con propósitos veterinarios y en medicina humana, su uso permite el tratamiento de infecciones bacterianas, sin embargo suelen ser empleados en dosis subterapéuticas en la industria ganadera en animales productores de alimento como promotores del crecimiento [Grande, C. 2000; Prescott, J.F. 1991; Visek, W.J. 1978]. Las QNs estudiadas en este capítulo se muestran en la Tabla 4.3: Danofloxacin (DAN), Ciprofloxacina (CIP), Marbofloxacina, (MAR), Enrofloxacin (ENR), Difloxacina (DIF), Ácido Oxalínico (Ac. OXA) y Flumequina (FLU) [Nemutlu, E. 2007; Pecorelli, I. 2003; Sun, H. 2008]. Sin embargo su aplicación incontrolada representa un riesgo potencial en la salud humana ya que se conduce inevitablemente a la presencia de residuos en alimentos de consumo humano provocando el desarrollo de resistencia antibacteriana, alergias y reacciones de hipersensibilidad [Beltran, J.L. 2004; Ruiz, T.P. 1999; Sun, H. 2008; Tang 2009].



**Tabla 4.3.** Estructura química general para las QNs de estudio.

Nombre Común	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
Danofloxacina		H		F
Ciprofloxacina		H		F
Enrofloxacina		H		F
Marbofloxacina				F
Difloxacina		H		F
Ac. Oxalínico	---	H		
Flumequina			H	F

## 4.6 METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 4.6.1 Materiales y reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas disolviendo el reactivo grado analítico en agua desionizada con una resistividad no menor que 18.0 M $\Omega$  cm, obtenida con un sistema Milli-Q. (Millipore). La solución amortiguadora McIlvaine pH 5.5 fue preparada mediante una mezcla de ácido cítrico (0.1 M), fosfato de sodio (2.0 M) y EDTA (0.05 M), ajustando el valor del pH con NaOH 0.1 M.

DAN (99%), ENR (99%), CIP (98%), MAR (99%), DIF (99%), Ac. OXA (98%), FLU (99%) y ácido (S)-(+)-6-metoxi- $\alpha$ -metil-2-naftalenacético (Naproxeno, 98%) fueron obtenidos por Sigma. Las diferentes soluciones estándar fueron preparadas diariamente por dilución de una solución madre de QNs (preparada en NaOH 0.01 M) a una concentración de 1.0 g l<sup>-1</sup> de cada componente. Esta solución fue conservada en ausencia de luz a 4°C y renovada semanalmente. Una solución de naproxeno a una concentración de 50 mg l<sup>-1</sup> fue usada como estándar interno.

La síntesis de magnetita fue preparada a partir de sulfato ferroso heptahidratado (Sigma). El recubrimiento de sílice fue sintetizado utilizando feniltrimetoxilsilano (97%, PTMS), tetrametoxisilano (98%, TMOS) y octiltrimetoxisilano (98%, C<sub>8</sub>) usando Triton X-100 y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) como surfactante (Sigma).

### 4.6.2 Equipos

La caracterización de las estructuras obtenidas fue determinada mediante difracción de rayos X (XRD) usando un equipo PHILIPS PW1710 equipado con un ánodo de Cu, con apertura automática divergente, con un monocromador de grafito bajo las siguientes condiciones experimentales: radiación CuK $\alpha$  1.54 Å, tensión del generador 40 kV; corriente de generador 30 mA; relación de intensidad ( $\alpha_2/\alpha_1$ ), 0.500, apertura de divergencia 1° apertura receptora 0.1, con un ángulo inicial (2 $\theta$ ), 5°, y un ángulo final (2 $\theta$ ), 70°. El análisis morfológico del adsorbente magnético se realizó en un equipo JEOL JSM-820 microscopía electrónica de barrido (SEM), Los análisis FTIR se realizaron en un equipo Perkin Elmer, modelo IRDM. Las muestras se analizaron en pastilla de KBr (1%).

La determinación mediante electroforesis se realizó en un equipo Beckman Coulter P/ACE 5500 con un detector de arreglo de diodos. Los datos fueron recolectados y analizados con un software BeckmanP/ACE systemMDQversion 2.3. La separación de las QNs se realizó en un capilar de sílice fundida (41.7 cm x 50  $\mu$ m id).

Un pHmetro modelo 450 de Corning (Corning Science Products) fue usado para medir el pH del electrolito con una precisión de 0.01 unidades de pH. Un sistema de ultrasonido Branson modelo 3510 fue empleado en la dispersión de los adsorbentes magnéticos y en la elución de los analitos.

### **4.6.3 Tratamiento de la muestra**

En un primer paso se adiciona 1.0 ml de la muestra de leche a un tubo de polipropileno de 15.0 ml. Una vez adicionada la muestra, se llevó a cabo la precipitación de proteínas presentes en la matriz analítica mediante la adición de 5.0 ml de metanol. La mezcla obtenida se agita mediante un vórtex durante 2 min y centrifugada a 4000 rpm por 10 min. El sobrenadante obtenido se diluye hasta alcanzar un volumen de 50.0 ml con una solución amortiguadora McIlvaine pH 5.5. La solución amortiguadora McIlvaine fue empleada en la metodología de extracción con la finalidad de prevenir la formación de complejos entre los iones metálicos y las QNs, la solución resultante fue sometida a MSPE en la retención de las QNs de interés.

La metodología MSPE propuesta se realizó mediante la siguiente secuencia experimental. Inicialmente se pesan 0.13 g del adsorbente magnético y se adicionan dentro de un tubo de polipropileno de 50.0 ml. Las partículas magnéticas se activan mediante la adición de 5.0 ml de metanol y se agita la mezcla en un baño de ultrasonido durante 5 min. Una vez terminado el tiempo de activación el adsorbente se aísla magnéticamente y se lava en dos ocasiones con 10.0 ml de agua desionizada, posteriormente la muestra pre-tratada se adiciona en el tubo de polipropileno con el adsorbente previamente activado. La suspensión resultante se mezcla en un baño de ultrasonido por 15 min.

Transcurrido el tiempo de dispersión se aíslan el adsorbente con los analitos mediante la aplicación de un campo magnético. La fase líquida se decanta y la fase sólida se lava tres ocasiones con 5 ml de agua desionizada. Las QNs adsorbidas se eluyen del adsorbente magnético por dispersión del mismo en 5 ml de una solución de metanol basificada con NaOH  $1 \times 10^{-3}$  M durante 5 min. La solución resultante fue evaporada a sequedad bajo corriente de aire y reconstituida en 1.0 ml de la solución electrolito con 50 mg l<sup>-1</sup> de estándar interno. Finalmente la solución se hace pasar a través de un filtro de nylon 0.2  $\mu$ m y se guarda para ser analizada mediante CE.

## 4.6.4 Síntesis del adsorbente

La síntesis de los adsorbentes magnéticos se llevó a cabo en dos etapas. En una primera etapa la magnetita fue obtenida mediante oxidación parcial y precipitación de Fe(II) en presencia de oxígeno en medio básico [Aguilar-Arteaga, K. 2010]. Sintetizada la magnetita los adsorbentes magnéticos fueron obtenidos mediante polimerización en emulsión de los monómeros con 1 mM de TMOS y PTMS:C<sub>8</sub> en diversas relaciones molares mezclados con la magnetita previamente sintetizada. Los monómeros funcionalizados fueron añadidos con una concentración total de 3mM. Los precursores de sílice fueron previamente solubilizados en 25 ml de una solución que contiene 2.0% (w/v) Triton X-100, 0.02% (w/v) CTAB, 12.5% (v/v) metanol, 200 µl de una solución de amoníaco al 28% como catalizador. La mezcla se coloca en reflujo a 120° durante 16 h. Una vez terminado el tiempo de reacción el adsorbente obtenido se lava en repetidas ocasiones con agua destilada y secado a 60°C durante 24 h [Aguilar-Arteaga, K. 2010].

## 4.6.5 Análisis mediante Electroforesis Capilar

Al inicio de cada día de trabajo el capilar se activa mediante la siguiente secuencia: 15 min con NaOH 1.0 M a 25°C, seguido de 10 min NaOH 0.1 M, 10 min agua desionizada y por último 10 min de la solución electrolito. El capilar se lava entre cada análisis con: 2 min NaOH 1.0 M, 1 min NaOH 0.01 M, 1 min agua desionizada y 1 min de la solución electrolito, las condiciones de separación encontradas fueron:

Una longitud del detector ( $\lambda$ ) de 260 nm. Las muestras son inyectadas en modo hidrodinámico con una presión de 0.5 psi durante 5 s. El capilar se mantiene a 25°C, voltaje de separación de 15 kV. La relación de área de pico analito/estándar interno (EI) fue empleada en la cuantificación. Los diferentes picos fueron identificados por sus tiempos de migración, por su espectro UV y por co-inyección con solución estándar. El electrolito empleado en la separación de las siete QNs seleccionadas para este estudio consiste en una solución amortiguadora de fosfatos (40 mM, pH 8.1). [Benavente, F. 2010; Solangi, A. 2009].

## 4.7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.7.1 Separación Electroforética

La composición del electrolito soporte es un factor importante para la separación de las QNs, conforme a reportes bibliográficos y de acuerdo a los valores de pKa, una adecuada separación entre las QNs y el estándar interno puede ser logrado con una solución básica. Por este motivo, se estudiaron las siguientes soluciones  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  y  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  a una concentración 40 mM, seleccionando la primera debido a que proporciona una adecuada separación de cada una de las QNs de interés.

Posteriormente se realizó un estudio sistemático del efecto del pH en un intervalo de 7.0-10.0. Un pH de 8.1 fue seleccionado debido a que a este valor se obtenía la mejor resolución de las 7 QNs de estudio y el estándar interno (EI).

De igual manera el voltaje de separación fue evaluado, seleccionando como el más adecuado a 15 kV ya que a voltajes mayores se observa un incremento en la intensidad de corriente sin mostrar mejoras en el tiempo de análisis y en la resolución de los analitos. La adición de solventes orgánicos en la solución electrolito, como son acetonitrilo y metanol de igual manera no mejoró la resolución entre las QNs, por lo que se descartó su uso.

Se evaluó el uso de naproxeno, sarafloxina y ácido benzoico como estándar interno (EI) en la cuantificación, seleccionando naproxeno gracias a que su tiempo de migración no afecta la resolución de las QNs de estudio.

### 4.7.2 Optimización del método MSPE

El desarrollo de una nueva metodología analítica implica un paso importante que es la optimización de las variables. Éste involucra la selección de factores que contribuyen a la señal analítica y los niveles de trabajo de las variables para obtener la mejor respuesta en el sistema.

Un diseño Simplex-Reticular (SLD) fue seleccionado como método de optimización ya que provee de la información necesaria con el menor número de experimentación [Bruns, R.E. 2006]. El SLD permite la evaluación de los factores de control que tienen una influencia significativa en la extracción y elución de QNs. El diseño experimental indica la combinación de factores en cada experimento y permite la evaluación simultánea de un gran número de variables con el menor número de experimentos [Dejaegher, B. 2011].

## *Resultados y Discusión*

---

La optimización del sistema con SLD involucra 5 etapas, I) identificar la variable de salida por optimizar, II) identificar y seleccionar los factores que afectan el sistema, III) seleccionar las restricciones de cada factor, IV) analizar los datos y determinar las condiciones óptimas, y V) realizar experimento confirmatorio bajo las condiciones óptimas obtenidas.

En MSPE, la respuesta deseada es la máxima recuperación de las siete QNs (suma de recuperaciones/desviación estándar). Las variables optimizadas son el valor de pH en la solución inicial (4.0-9.0); los valores fueron seleccionados con la finalidad de evaluar la dependencia del pH en la retención de QNs. La polaridad del adsorbente en fracción molar (0.0-1.0), 0.0 para el adsorbente no polar (octil) y 1.0 para el adsorbente de polaridad media (fenil), con la finalidad de estimar la afinidad de las QNs por el adsorbente (interacción hidrofóbica o  $\pi$ - $\pi$ ) durante los procesos de retención y elución. Finalmente la relación entre el volumen de muestra (ml) y la cantidad de adsorbente magnético (g) (160:500), la cual tiene que ser suficiente para permitir la adsorción máxima de los analitos en el sólido.

La Tabla 4.4 muestra los resultados obtenidos durante la optimización del método. Los experimentos fueron realizados usando 50 ml de una solución estándar con una concentración de QNs de 100  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Una vez completada la extracción, las QNs retenidas fueron eluidas, y determinadas bajo las condiciones previamente descritas en la sección experimental. Los porcentajes de recuperación fueron calculados en función de la concentración añadida y la concentración encontrada en la solución eluida después del tratamiento por MSPE.

## *Resultados y Discusión*

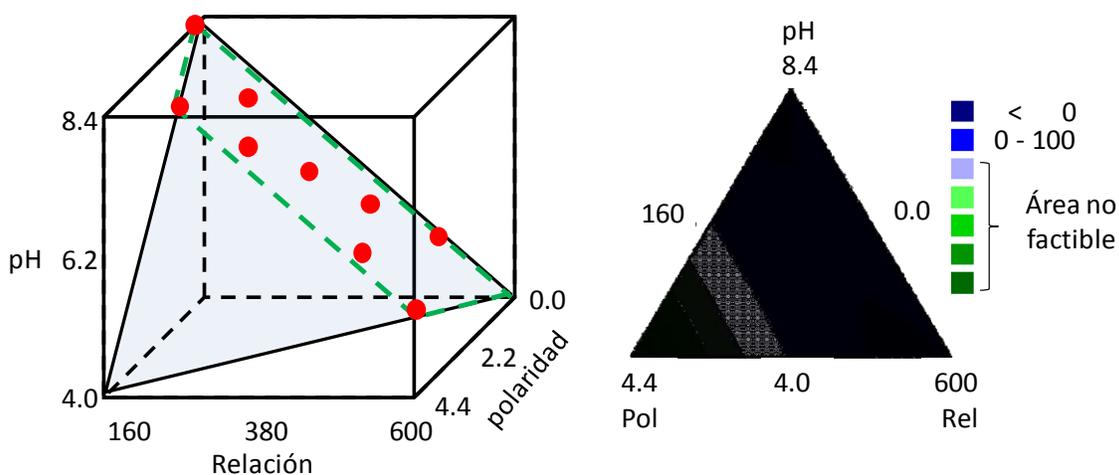
**Tabla 4.4.** Resultados obtenidos con el diseño Simplex-Reticular bajo las condiciones óptimas.

Exp	Polaridad			% Recuperación							Variable de Salida
	pH	Polaridad	V:peso proporción	DAN	CIP	ENR	MAR	DIF	Ac. OXA	FLU	Suma/Desviación estándar
1	5.00	0.00	500	22.12	24.22	29.95	16.39	28.35	12.59	11.57	19.69
2	8.40	0.00	160	15.15	17.22	19.48	9.94	11.35	1.68	0.63	10.28
3	7.30	0.25	245	67.48	21.88	30.63	29.92	24.46	30.25	11.16	12.28
4	7.40	1.00	160	99.13	44.58	37.84	46.27	47.39	18.80	28.07	12.55
5	6.20	0.50	330	96.69	27.52	34.69	42.16	40.46	20.46	31.79	11.64
6	5.10	0.75	415	30.24	36.90	40.75	36.90	48.74	29.72	38.86	40.39
7	6.80	0.75	245	84.33	48.91	38.87	41.59	44.61	12.83	21.96	12.88
8	5.60	0.25	415	12.36	8.20	16.28	11.75	16.47	14.48	2.22	16.13
9	4.00	1.00	500	8.10	7.90	29.50	31.13	39.60	34.60	27.00	14.18

Usando los resultados obtenidos, los datos fueron analizados usando MINITAB. Los datos fueron ajustados a un modelo cuadrático, de acuerdo con el análisis ANOVA. El coeficiente de correlación ( $r^2$ ) obtenido es de 0.975, la ecuación de la superficie de respuesta fue:

$$Y1 = -6.25X1 + 1041.42X2 - 33.75X3 - 109.50X1X2 + 8.78X1X3 - 122.13X2X3$$

Donde Y1 es la suma/desviación estándar, X1 es el valor de pH, X2 es la polaridad del adsorbente, y X3 es la proporción entre volumen de muestra y la cantidad de adsorbente (ml):peso del adsorbente (g). De acuerdo a los resultados obtenidos mediante el análisis de datos, la variable crítica durante el tratamiento mediante MSPE es la polaridad del adsorbente, así como cada término que contenga esta variable. La Figura 4.8 muestra la representación gráfica del diseño de experimentos y la superficie de respuesta obtenida en la extracción-elución de QNs. El área experimental factible es limitada de acuerdo a las restricciones seleccionadas.



**Figura 4.8.** Gráfico del área factible y de superficie en el diseño de experimento.

Los resultados muestran una dependencia en el pH sobre la extracción y aislamiento de cada QNs. La existencia de diversos grados de ionización en las estructuras QNs se relaciona con sus constantes de disociación ( $pK_a$ ). Los valores de  $pK_a$  en solución acuosa se encuentran desde 5.66 hasta 8.56. A valores de pH por encima de 8.56 las QNs adquieren carga negativa [Ferding, M. 2004; Jimenez-Lozano, E. 2002; Su, S.C. 2003].

La retención de las QNs incrementa conforme el valor de pH disminuye, demostrando una alta afinidad de las QNs por el adsorbente en su forma protonada. A valores de pH por debajo de 4.0 la absorción de las QNs se ve afectada debido a la degradación de la magnetita presente en el adsorbente magnético, lo que puede originar a la formación de complejos entre el Fe(III) y las QNs [Turel, I. 2002]. De otra manera a valores de pH por encima de 9.0 las partículas de magnetita adquieren carga negativa debido a los grupos hidroxilo, provocando una repulsión electrostática entre el adsorbente y las QNs en su forma aniónica. [Jordan, N. 2007]. Este efecto explica el uso de una solución de metanol con NaOH  $1 \times 10^{-3}$  M como eluyente durante la pre-concentración de QNs por MSPE.

El modo de interacción entre las QNs y el adsorbente muestra dos tendencias. El adsorbente magnético que contiene cadenas  $C_8$  (Tabla 4.4, Experimento 1) muestra altos % de recuperación para DAN, CIP, ENR, MAR y DIF, éstas en su estructura están compuestas por dos ciclos. Mientras que para las QNs tricíclicas (Ac. OXA, FLU) se muestra un mayor % de recuperación aplicando un adsorbente recubierto con grupos fenilos pre-concentradas mediante interacciones  $\pi$ - $\pi$ . [Croes, K. 2005; Reubsaet, J.E. 1999].

Es por ello que se requiere de un adsorbente de polaridad mixta para asegurar una homogeneidad durante la retención y elución de QNs. La proporción muestra:volumen (ml):peso de adsorbente (g) tiene que ser suficiente baja para garantizar la máxima cantidad de adsorbente y la máxima adsorción del analito sobre la superficie del adsorbente magnético.

De acuerdo a los resultados obtenidos mediante SLD, las condiciones óptimas en el tratamiento de la muestra son: pH 5.85, polaridad del adsorbente (0.64), y la proporción muestra:volumen de muestra (ml):peso del adsorbente magnético (g) de 387.

### 4.7.3 Caracterización del adsorbente magnético óptimo

El sólido de funcionalidad mixta fue caracterizado mediante diversas técnicas instrumentales. Mediante DRX se pueden observar los patrones de difracción para el adsorbente magnético, la Figura 4.9 presenta reflexiones correspondientes a la magnetita ("m"). Así mismo se observa una banda ancha en un ángulo  $2\theta$  de  $15^\circ$  a  $25^\circ$  consistente con la fase amorfa de gel de sílice [Aguilar-Arteaga, K. 2010].

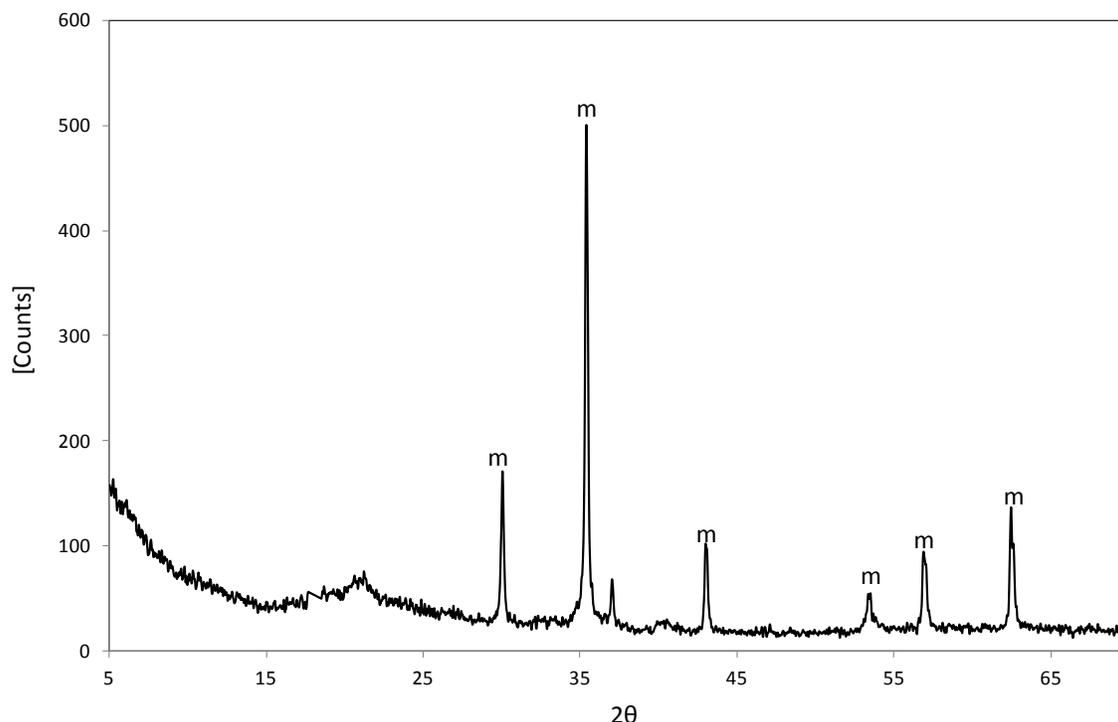


Figura 4.9. Difractograma obtenido del análisis del adsorbente magnético óptimo.

## Resultados y Discusión

El espectro FTIR (Figura 4.10) para el adsorbente magnético muestra una banda de estiramiento de 3600-3250  $\text{cm}^{-1}$  atribuida a la vibración del grupo silanol (Si-OH). Una banda alrededor de 3000  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de los grupos =C-H del grupo fenilo, dos bandas en 2950 y 2850  $\text{cm}^{-1}$  asignadas a la vibración de enlace C-H. Una serie de bandas débiles desde 1650-1950  $\text{cm}^{-1}$  características a las vibraciones C-H de grupos aromáticos. Una banda de flexión en 1625  $\text{cm}^{-1}$  atribuida al  $\text{H}_2\text{O}$  contenida en el adsorbente magnético. Una banda de flexión alrededor de 1400  $\text{cm}^{-1}$  atribuida a la vibración del grupo C-H del grupo metoxido (MeO-), Una banda de estiramiento entre 900-1250  $\text{cm}^{-1}$  es asignada al grupo siloxano (Si-O-Si), así mismo el espectro muestra una banda de estiramiento en 589  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo  $\text{Fe}_T\text{-O-Fe}_O$  y una banda en 492  $\text{cm}^{-1}$  asignada al grupo  $\text{Fe}_O\text{-O}$ .

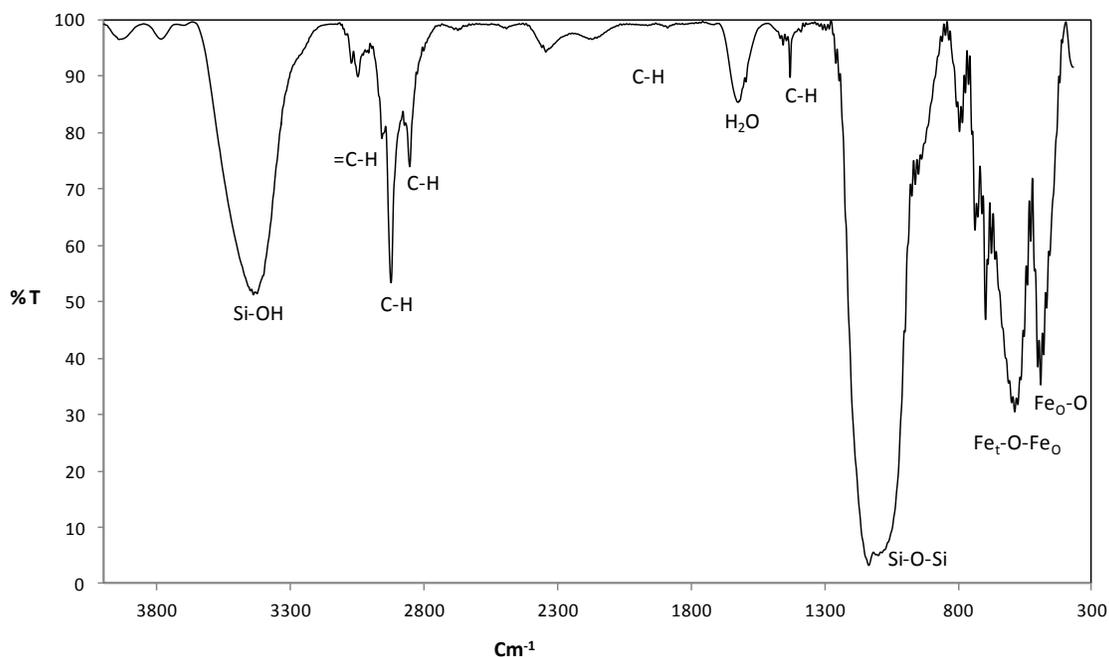


Figura. 4.10. Espectro FTIR del adsorbente magnético obtenido bajo las condiciones óptimas.

## Resultados y Discusión

La morfología del adsorbente magnético fue estudiada por microscopía electrónica de barrido (SEM). El adsorbente presenta una morfología esférica (Figura 4.11). Así mismo se estudió la distribución del tamaño de partícula, para ello previamente se deseco a 100° C durante 24 h, determinando un tamaño de partícula de 50 a 150 nm. El análisis elemental SEM-EDS del adsorbente magnético confirma la relación molar Fe:Si de 1:2 (Figura 4.12)

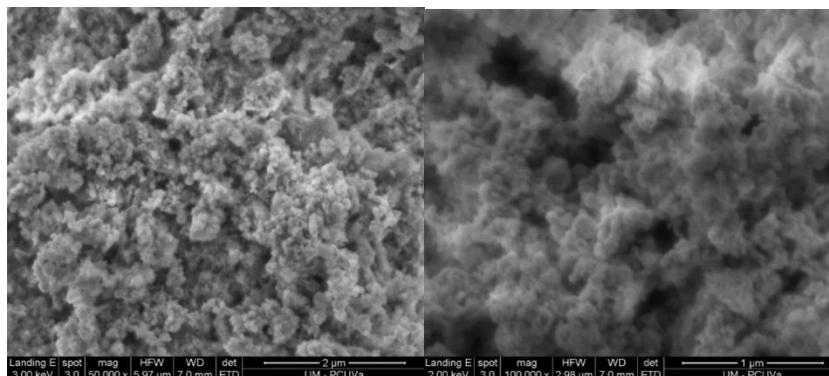


Figura 4.11. Microscopia Electrónica de Barrido del adsorbente magnético óptimo.

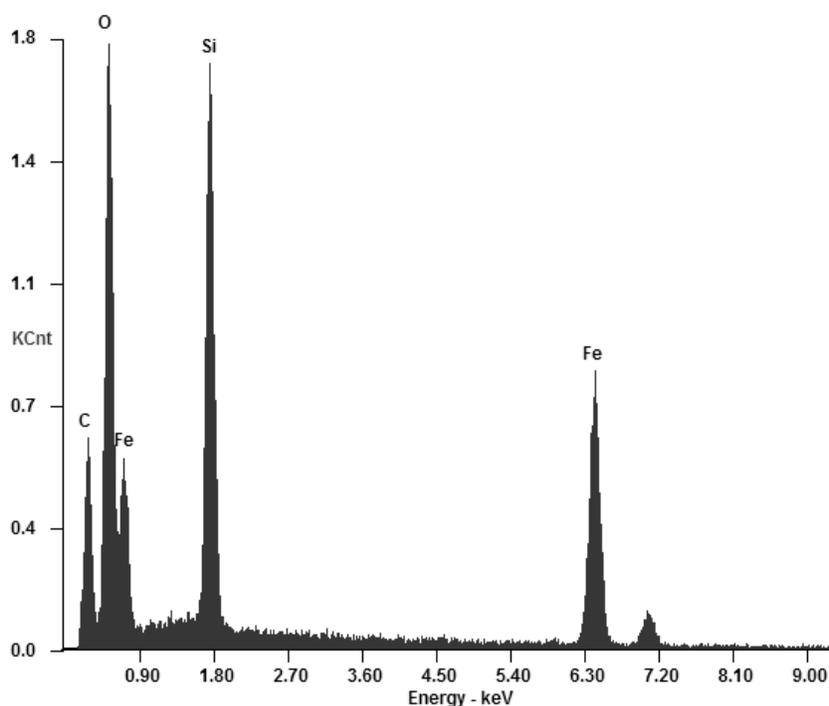


Figura 4.12. SEM-EDS análisis elemental para del adsorbente magnético.

## Resultados y Discusión

La capacidad de adsorción y la afinidad del adsorbente magnético por los analitos de interés se determinaron mediante una isoterma de adsorción y el correspondiente análisis Scatchard. La isoterma de adsorción se construye determinando la concentración remanente (mM) de QNs obtenidas después de la dispersión de 0.13 g de adsorbente magnético en 25 ml de una solución de QNs en intervalos de concentración de 0.0002 a 0.15 mM. La cantidad de QNs enlazadas al adsorbente magnético en el equilibrio incrementa hasta una concentración de 0.09 mM [Sun, H. 2008; Yan, H. 2008].

Las ecuaciones lineales de regresión para cada analito se muestran en la Tabla 4.5. Los valores de  $K_d$  y  $Q_{max}$  corresponden a una baja afinidad entre el adsorbente y las QNs, lo que resulta ser adecuado en el proceso de elución [Davenport, A.P. 2005].

**Tabla 4.5.** Resultados del análisis Scatchard.

[QNs]	Ecuación lineal	$K_d$ (mM)	$Q_{max}$ (mmol g <sup>-1</sup> )
DAN	36.92±0.21 - 1.45±0.09 Q	0.69±0.04	25.46±1.59
CIP	39.59±0.12 - 1.28±0.04 Q	0.78±0.02	30.92±0.97
MAR	41.24±0.28 - 4.05±0.13 Q	0.25±0.03	10.18±0.33
ENR	36.43±0.21 - 1.51±0.09 Q	0.66±0.04	24.13±1.44
DIF	42.16±0.20 - 1.52±0.09 Q	0.66±0.04	27.73±1.65
Ac. OXA	28.19±0.37 - 1.91±0.16 Q	0.52±0.04	14.76±1.25
FLU	25.77±0.15 - 0.80±0.06 Q	1.25±0.09	32.21±2.42

De acuerdo al análisis Scatchard la interacción entre el adsorbente magnético y las QNs es menor que la interacción entre las QNs y las proteínas de la leche. Es por ello que en un análisis de una muestra real, la interacción de las QNs y las proteínas de la leche causa una disminución en los % de recuperación usando MSPE. Con la finalidad de reducir dichas interferencias, las proteínas contenidas en la muestra de leche se precipitan previamente usando una solución de metanol en una proporción 1:5 (leche:metanol).

### 4.7.4 Validación y aplicación del método

Bajo las condiciones óptimas, los parámetros analíticos del método MSPE-CE fueron evaluados usando un volumen de muestra inicial de 1.0 ml de leche dopada con QNs en un intervalo de concentración de 0-1000  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Cada estándar fue preparado y analizado por triplicado. Una vez homogenizada cada una de las muestras se llevó a cabo la precipitación de las proteínas y la fase líquida fue pre-concentrada usando la metodología propuesta (MSPE) tal y como se describe en la sección experimental. Las alturas de los picos obtenidos en unidades arbitrarias (AU) fueron medidas, construyendo la línea de calibrado a partir de los promedios de las relaciones de área. La línea de calibrado muestra una dependencia de dicha relación y la concentración de QNs en la muestra de leche dopada. Los parámetros de regresión de la línea de calibrado se muestran en la Tabla 4.6. Los LODs fueron calculados mediante la relación señal/ruido igual a 3.29 conforme las recomendaciones de IUPAC [Currie, L.A. 1995].

La exactitud del método se determinó mediante las recuperaciones absolutas de las QNs añadidas a una muestra de leche blanco (previamente analizada por el método propuesto) a tres niveles de concentración con tres replicas para cada nivel (50, 150, and 400  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). El promedio de las recuperaciones obtenidas para las siete QNs en muestras de leche dopadas, se encontraron en un intervalo de 74-98% con una desviación estándar relativa (RSD) menor a un 10% en todos los casos usando la metodología propuesta MSPE (Tabla 4.6). Estos son similares a los reportados empleando SPE-CE aplicando cartuchos Oasis-HLB con recuperación (70-90%) [Qingfa, T. 2009]. Las metodologías SPE reportadas involucran una etapa de limpieza usando LLE previo la extracción por SPE. La principal ventaja del procedimiento MSPE es la reducción de etapas en el tratamiento de la muestra ya que sólo requiere de la precipitación de proteínas y la dilución del suero láctico. La precisión del método propuesto MSPE fue determinado en términos de repetitividad y reproducibilidad por sus tiempos de migración y el área de pico. Los resultados fueron determinados como la desviación estándar relativa (%RSD) obtenidas usando tres adsorbentes magnéticos de manera individual sintetizados a las condiciones óptimas y aplicados en el análisis de muestras de leche blanco dopadas con QNs a tres niveles de concentración (50, 150, and 400  $\mu\text{g l}^{-1}$ ). Basados en los resultados y tomando en cuenta los límites permisibles establecidos MRLs por la Unión Europea (EU), este método resulta ser adecuado para el análisis de QNs en muestras de leche.

## Resultados y Discusión

**Tabla 4.6.** Parámetros de regresión de la curva de calibrado, adsorbancia (mAU) vs concentración de QNs ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en 50 ml de muestra.

Analito	Parámetros de Regresión		
	Ordenada $b_0 \pm ts (b_0)$	Pendiente $b_1 \pm ts (b_1)$	Coefficiente de correlación, $r^2$
DAN	$0.01 \pm 0.02$	$7.03 \pm 0.23$	0.998
CIP	$0.01 \pm 0.01$	$37.59 \pm 0.49$	0.998
MAR	$0.01 \pm 0.01$	$61.58 \pm 0.51$	0.999
ENR	$0.01 \pm 0.01$	$34.17 \pm 0.41$	0.999
DIF	$0.01 \pm 0.03$	$85.10 \pm 1.08$	0.999
Ac. OXA	$0.01 \pm 0.01$	$44.92 \pm 0.38$	0.999
FLU	$0.01 \pm 0.01$	$56.61 \pm 0.55$	0.999

	Intervalo lineal	Límite de detección	Límite de cuantificación
	( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	( $\mu\text{g l}^{-1}$ )
DAN	36-1000	12	36
CIP	30-1000	10	30
MAR	27-1000	9	27
ENR	27-1000	9	27
DIF	33-1000	11	33
Ac. OXA	33-1000	11	33
FLU	30-1000	10	30

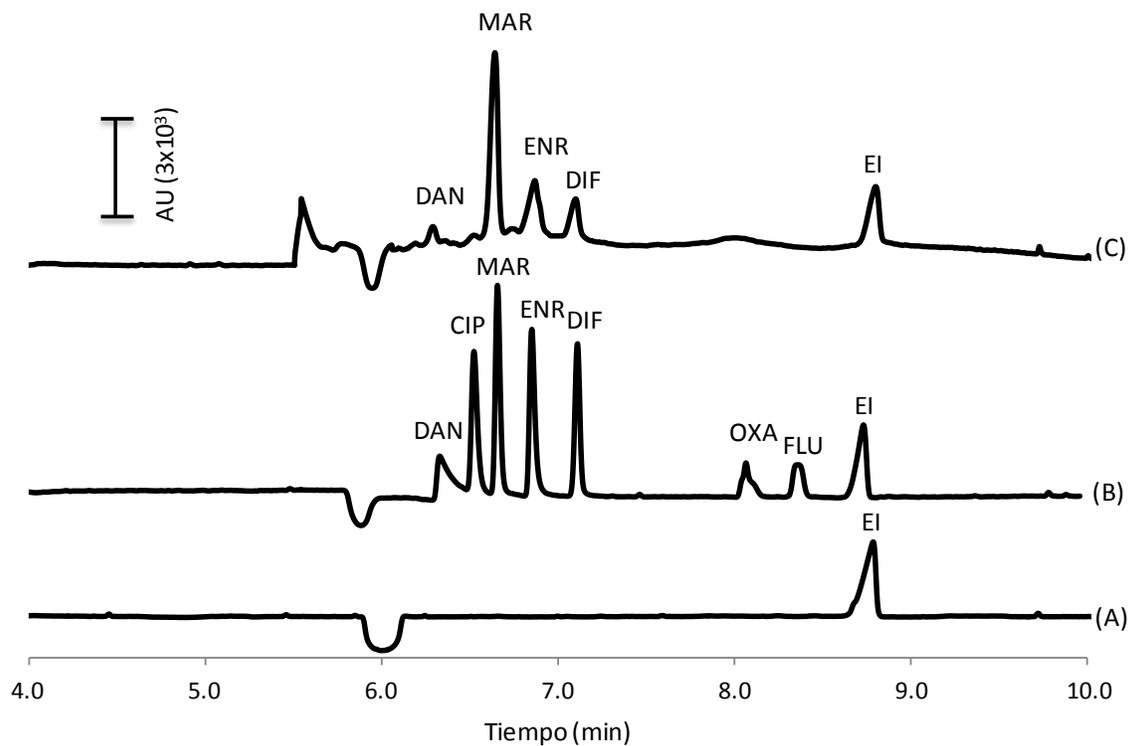
	Repetitividad, mismo día			Repetitividad, diferente día		
	(%RSD, n = 3)					
	50 $\mu\text{g l}^{-1}$	150 $\mu\text{g l}^{-1}$	400 $\mu\text{g l}^{-1}$	50 $\mu\text{g l}^{-1}$	150 $\mu\text{g l}^{-1}$	400 $\mu\text{g l}^{-1}$
DAN	5.99	4.17	1.92	6.99	3.24	4.48
CIP	3.70	1.36	2.68	8.18	5.42	7.40
MAR	5.02	2.26	3.21	9.87	5.24	3.34
ENR	4.43	3.45	1.03	8.60	8.35	5.26
DIF	7.97	4.16	4.34	7.73	4.25	3.82
Ac. OXA	7.01	5.18	4.08	4.43	2.22	4.06
FLU	7.46	2.46	2.97	7.66	3.99	9.14

## *Resultados y Discusión*

---

La metodología propuesta se aplicó en la determinación de QNs en 20 muestras de leche comercial de diferentes marcas, realizando el análisis por triplicado de cada muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de QNs en leche, las 20 muestras analizadas fueron positivas a la presencia de QNs, las cuales fueron identificadas por su tiempo de migración y su espectro UV. Con el fin de confirmar la presencia de cada analito, se llevó a cabo una adición estándar en el extracto de la muestra observándose un incremento en el área de pico confirmando la presencia del residuo de cada antibiótico. Quince muestras fueron positivas para la DAN, trece para la CIP, diecisiete para la MAR, diecisiete para ENR, dieciocho para DIF y una muestra para el Ac. OXA con concentraciones de 104.8-5047.3  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 39.4-656.9  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 31.1-3078.0  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 37.1-4720.3  $\mu\text{g l}^{-1}$ , 39.2-586.5  $\mu\text{g l}^{-1}$  y 161.7  $\mu\text{g l}^{-1}$ , respectivamente. El valor de RSD fue menor a un 5% en todos los casos. Las muestras con una concentración de QNs mayor a la del intervalo lineal superior se diluyeron con electrolito soporte. Las concentraciones encontradas en el análisis de leche resultaron ser mayores que las reportadas en otros países [Yongbo, L. 2011].

La Figura 4.13 muestra los electroferogramas representativos obtenidos del análisis de muestras de leche. No observando interferencias de la matriz posterior a su extracción por MSPE-CE en una muestra de leche blanco (Figura 4.13a) y una muestra de leche dopada (Figura 4.13b), demostrando la selectividad de la metodología propuesta MSPE-CE en el análisis de QNs y una muestra de leche real analizadas por MSPE-CE (Figura 4.13c).



**Figura 4.13.** Electroferogramas obtenidos en el análisis de quinolonas: (A) muestra de leche blanco analizada mediante MSPE-CE, (B) una muestra de leche dopada ( $200 \mu\text{g l}^{-1}$ ) analizada por MSPE-CE, (C) análisis de una muestra de leche real analizada por MSPE-CE. Danofloxacin (DAN), ciprofloxacino (CIP), marbofloxacino (MAR), enrofloxacin (ENR), difloxacino (DIF), ácido oxalínico (Ac. OXA) y flumequina (FLU), y como estándar interno (EI).

### 4.8 CONCLUSIONES

Una estrategia simple y selectiva fue desarrollada para la extracción y análisis selectivo de siete QNs usadas en muestras de leche. Los límites de detección alcanzados permiten dar seguimiento a las concentraciones normadas por instituciones internacionales. La técnica propuesta MSPE se basa en la síntesis de adsorbentes magnéticos de polaridad mixta ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-Fenil-C}_8$ ), los cuales son eficientes en la pre-concentración de residuos de QN en matrices complejas tales como la leche.

El método descrito es más rápido en comparación con los procedimientos de tratamiento clásicos tales como SPE, requiriendo de una manipulación mínima de la muestra, exhibe selectividad homogénea. El método de MSPE-CE posee ventajas en comparación con otras técnicas de separación; estas ventajas incluyen la simplicidad, bajo costo, y mejora del tiempo de análisis. Adicionalmente, esta técnica proporciona buenos resultados en términos de sensibilidad y precisión. El método desarrollado se puede aplicar como un procedimiento de rutina para identificar y cuantificar QNs en muestras de leche reales con resultados satisfactorios.

## 4.9 BIBLIOGRAFÍA

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

**Aguilera-Luiz, M.M.**, Martínez Vidal, J.L., Romero-González, R., Garrido Frenich. A. Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1205 (2008) p. 10.

**Andriole, V.** Classification of Quinolones. *J. Infection*, 26 (1998) p 64.

**Ball, P.** Quinolone generations: natural history or natural selection?. *J. Antimicrob. Chemother.* 46 (2000) p. 17.

**Beltrán, J.L.**, Jiménez-Lozano, E., Barrón, D. Determination of quinolone antimicrobial agents in strongly overlapped peaks from capillary electrophoresis using multivariate calibration methods. *Anal. Chim. Acta* 501, (2004) p. 137.

**Benavente, F.**, Giménez, E., Barrón, D., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V. Modeling the electrophoretic behavior of quinolones in aqueous and hydroorganic media. *Electrophoresis* 31 (2010) p. 965.

**Bruns, R.E.**, Scarminio, I.S., Neto, BDB. *Statistical Design Chemometrics*. Ed. Elsevier B.V. (2006) p. 321.

**Cañada-Cañada, F.**, Espinosa-Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., Jiménez Girón, A., González-Gómez, D. Determination of danofloxacin in milk combining second-order calibration and standard addition method using excitation-emission fluorescence data. *Food. Chem.* 113 (2009) p. 1260.

**Christodoulou, E.A.**, Samanidou, V.F., Papadoyannis, I.N. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *J. Chromatogr. B* 859 (2007) p. 246.

**Croes, K.**, Steffens, A., Marchand, D.H., Snyder, L.R. Relevance of  $\pi$ - $\pi$  and dipole-dipole interactions for retention on cyano and phenyl columns in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) p. 123.

**Currie, L.A.** Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure Appl. Chem.* 67 (1995) p. 1699.

**Davenport, A.P.**, *Receptor Binding Techniques*, 2nd Ed. Humana Press, New Jersey (2005) p. 105.

**Dejaegher, B.**, Vander Heyden, Y. Experimental designs and their recent advances in set-up, data interpretation, and analytical applications. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 (2011) p. 141.

**Evangelopoulou, E.N.**, Samanidou, V.F. HPLC confirmatory method development for the determination of seven quinolones in salmon tissue (*Salmo salar* L.) validated according to the European Union Decision 2002/657/EC. *Food. Chem.* 136 (2013) p. 479.

**Fattah, A.**, Walily, E., Belal, S.F., Bakry, R.S. Spectrophotometric and spectrofluorimetric estimation of ciprofloxacin and norfloxacin by ternary complex formation with eosin and palladium(II). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 14 (1996) p. 561.

**Ferding, M.**, Kaleta, A., Thanh Vo, T.D., Buchberger, W. Improved capillary electrophoretic separation of nine (fluoro) quinolones with fluorescence detection for biological and environmental samples. *J. Chromatogr. A* 1047 (2004) p. 305.

**Fotouhi, L.**, Alahyari, M. Electrochemical behavior and analytical application of ciprofloxacin using a multi-walled nanotube composite film-glassy carbon electrode. *Colloid Surface B: Biointerfaces* 81 (2010) p. 110.

**Goyal, R.N.**, Singh, A.R., Chasta, H. Electrochemical sensor for the sensitive determination of norfloxacin in human urine and pharmaceuticals. *Bioelectrochemistry* 83 (2012) p. 46.

**Grande, C.,** García, B., Simal, F. The use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 3 (2000) p. 39.

**Hernandez-Arteseros J A,** Barbosa J, Compano R, Prat M D. Analysis of quinolone residues in edible animal products. *J. Chromatogr. A* 945 (2002) p 1.

**Ho, C.,** Sin, D.W.M., Tang, H.P.O., Chung, L.P.K., Siu, S.M.P. Determination and on-line clean-up of (fluoro)quinolones in bovine milk using column-switching liquid chromatography fluorescence detection. *J. Chromatogr. A* 1061 (2004) p. 123.

**Hyun-Hee, C.,** Jung-Bin, L., Yun-Hee, C., Kwang-Geun L. Analysis of sulfonamide and quinolone antibiotic residues in Korean milk using microbial assays and high performance liquid chromatography. *Food. Chem.* 113 (2009) p. 297.

**Idowu, O.R.,** Peggins, J.O. Simple, rapid determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in bovine milk and plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35, (2004) p. 143.

**Jameson, R. M.** Tissue concentration of nalidixic acid and its use in pyelonephritis. *BMJ* 2 (1965) p. 621.

**Jimenez-Lozano, E.,** Marques, I., Barron, D., Beltran, J. L., Barbosa. Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector *Anal. Chim. Acta* 464 (2002) p. 37.

**Jordan, N.,** Marmier, N., Lomenech, C., Giffaut, E. Sorption of silicates on goethite, hematite, and magnetite: Experiments and modeling. *J. Colloid Interface Sci.* 312 (2007) p. 224.

**Kaura, K.,** Singh, S., Kumar, A., Singh, B. Micelle enhanced and terbium sensitized spectrofluorimetric determination of danofloxacin in milk using molecularly imprinted solid phase extraction. *Spectrochim Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc.* 96 (2012) p. 790.

**Lara, F.J.**, Garcia-Campana, A.M., Ales-Barrero, F., Bosque-Sendra, J.M., Garcia-Ayuso, L.E. Multiresidue Method for the Determination of Quinolone Antibiotics in Bovine Raw Milk by Capillary Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 78 (2006) p. 7665.

**Lescher G.Y.**, Froelich, E.D., Gruet, M.D., Bailey, J.H. 1-8 naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J. Med. Pharm.* 5 (1962) p. 1063.

**Marazuela, M.D.**, Moreno-Bondi, M.C. Multiresidue determination of fluoroquinolones in milk by column liquid chromatography with fluorescence and ultraviolet absorbance detection. *J. Chromatogr. A.* 1034 (2004) p. 25.

**Mitani, K.**, Kataoka, H. Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) p. 16.

**Navalón, A.**, Ballesteros, O., Blanc, R., Vílchez, J.L. Determination of ciprofloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry. *Talanta* 52 (2000) p. 845.

**Nemutlu, E.**, Kir, S., Ozyuncu, O., Oeksac, M.S. Simultaneous Separation and Determination of Seven Quinolones Using HPLC: Analysis of Levofloxacin and Moxifloxacin in Plasma and Amniotic Fluid. *Chrom. Supple.* 66 (2007) p. S15.

**Neu, H.C.** Synergy and antagonism of fluoroquinolones with other classes of antimicrobial agents. *Drugs* 45 (1993) p. 54.

**Neuman M.** Clinical pharmacokinetics of the newer antibacterial 4-quinolones. *Clin. Pharmacokinet.* 14 (1988) p. 96.

**Oates, J.A.**, Wood, A. J. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N. Engl. J. Med.* 324 (1991) p. 384.

**Pascual-Reguera, M.I.**, Pérez, G., Molina, A. Solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ciprofloxacin. *Microchem. J.* 77 (2004) p. 79.

**Pecorelli, I.**, Galarini, R., Bibi, R., Floridi, A., Casciarri, E., Floridi, A. Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) p. 81.

**Piddock, L.J.** New quinolones and gram-positive bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38 (1994) p. 163.

**Prescott, J.F.**, Baggot, J.D. "Incorporación de antibióticos a los piensos como estimulantes del crecimiento", en *Terapéutica antimicrobiana veterinaria*, Acibia, Zaragoza (España), (1991) p. 297.

**Qingfa, T.**, Tongtong, Y., Xiaomei, T., Jiabo, L. Simultaneous determination of fluoroquinolone antibiotic residues in milk sample by solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) p. 4535.

**Reubsaet, J.E.**, Vieskar, R. Characterisation of p-p interactions which determine retention of aromatic compounds in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 841 (1999) p. 147.

**Rodríguez-Díaz, R.C.**, Fernández-Romero, J.M., Aguilar-Caballo, M.P., Gomez-Hens, A. Determination of Fluoroquinolones in Milk Samples by Postcolumn Derivatization Liquid Chromatography with Luminescence Detection. *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) p 9670.

**Roybal, J.E.**, Pfenning, A.P., Turnipseed, S.B., Walker, C.C., Hurlbut, J.A. Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 80 (1997) p. 982.

**Rubinstein, E.** History of Quinolones and Their Side Effects. *Chemotherapy* 47 (2001) p. 3.

**Ruiz, T.P.**, Martínez-Lozano, C., Sanz, A., Bravo, E. Separation and Simultaneous Determination of Quinolone Antibiotics by Capillary Zone Electrophoresis. *Chrom.* 49 (1999) p. 419.

**Samanidou, V.F.**, Christodoulou, E.A., Papadoyannis, I.N. Determination of fluoroquinolones in edible animal tissue samples by high performance liquid chromatography after solid phase extraction. *J. Sep. Sci.* 28 (2005) p. 555.

**Sheehan, G.J.**, Harding, G.K., Haase, D. A., Thomson, M. J., Urias, B., Kennedy, J. K., Ronald, A. R. Double-blind, randomized comparison of 24 weeks norfloxacin and 12 weeks of norfloxacin followed by 12 weeks of placebo in the therapy of complicated urinary tract infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32 (1988) p. 1292.

**Solangi, A.**, Bhangar, M., Saima, M., Khuhawar, M., Arfana, M. A Capillary Zone Electrophoretic Method for Simultaneous Determination of Seven Drugs in Pharmaceuticals and in Human Urine. *J. AOAC Int.* 92 (2009) p. 1382.

**Soledad, M.**, Albero, I., Sánchez-Pedreño, C., Abuherba, M.S. Flow injection spectrophotometric determination of ofloxacin in pharmaceuticals and urine. *Eur. J. Pharma. Biopharm.* 61 (2005) p. 87.

**Su, S.C.**, Chang, M.H., Chang, P.C., Chou, S.S. Simultaneous Determination of Quinolones in Livestock and Marine Products by High Performance Liquid Chromatography. *J. Food Drug. Anal.* 11 (2003) p. 114.

**Suman H.**, Ocampo, L. *Farmacología Veterinaria*, McGraw-Hill Interamericana, 2da Ed. Mexico 1999

**Sun, H.**, Zhao, W., He, P. Effective Separation and Simultaneous Determination of Four Fluoroquinolones in Milk by CE with SPE. *Chrom.* 68 (2008) p. 425.

**Tang, Q.**, Yang, T., Tan, X., Luo, J. Simultaneous Determination of Fluoroquinolone Antibiotic Residues in Milk Sample by Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57 (2009) p. 4535.

**Tatar, S.** Spectrofluorimetric determination of fluoroquinolones in pharmaceutical preparations. *Spectrochimica Acta Part A* 72 (2009) p. 138.

**Turel, I.**, The interactions of metal ions with quinolone antibacterial agents. *Coordination Chem, Rev.* 232 (2002) p. 27.

**Turiel, E.**, Martín-Esteban, A., Tadeo, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) p. 30.

**Vera-Candiotti, L.**, Olivieri, A.C., Goicoechea, H.C. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. *Talanta*. 82 (2010) p. 213.

**Vílchez, J.L.**, Ballesteros, O., Taoufiki, J., Sánchez-Palencia, G., Navalón A. Determination of the antibacterial norfloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta*. 444 (2001) p. 279.

**Visek, W.J.** The Mode of Growth Promotion by Antibiotics, *J. Anim. Sci.* 46 (1978) p. 1447.

**Yan, H.**, Ho, R. K. Novel molecularly imprinted monolithic column for selective on-line extraction of ciprofloxacin from human urine. *Biomed. Chromatogr.* 22 (2008) p. 487.

**Yang, Z.**, Wang, X., Qin, W., Zhao, H. Capillary electrophoresis-chemiluminescence determination of norfloxacin and prulifloxacin. *Anal. Chim. Acta*. 623 (2008) p. 231.

**Yongbo, L.**, Zhujun, Z., Jinsong, L., Hongguang, L., Yan, C., Zhaohui, L. Simple, stable and sensitive electrogenerated chemiluminescence detector for high-performance liquid chromatography and its application in direct determination of multiple fluoroquinolone residues in milk. *Talanta*. 84 (2011) p. 690.

**Yorke, J.C.**, Froc, P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A*. 882 (2000) p. 63.

**Zhang, F.**, Gu, S., Ding, Y., Li, L., Liu, X. Simultaneous determination of ofloxacin and gatifloxacin on cysteine acid modified electrode in the presence of sodium dodecyl benzene sulfonate. *Bioelectrochemistry*. 89 (2013) p. 42.

**Zhao, L.**, Stevens, J. Determination of quinolone antibiotics in bovine liver using Agilent bond elut QuEChERS kits by LC/MS/MS. Agilent Technologies, Inc. (2012)

**Zhou, X.**, Xing, Da., Zhu, D., Tang, Y., Jia, L. Development and application of a capillary electrophoresis-electrochemiluminescent method for the analysis of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in milk. *Talanta*. 75 (2008) p. 1300.



*CAPÍTULO V*

*TETRACICLINAS*

## **5.1 Historia y clasificación de tetraciclinas**

A principios de los años 1940 el descubrimiento de antibióticos estaba progresando rápidamente, era evidente que el mundo microbiano produjo una gran cantidad de productos naturales y antibióticos capaces de combatir las enfermedades microbianas. Gracias a su potencial en la aplicación médica y financiera, se observó la expansión de muchas compañías farmacéuticas en la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos.

Uno de los pioneros en el desarrollo de laboratorios con esta finalidad fue Cyanamid en Pearl River, Nueva Jersey, el cual se dio a la tarea de buscar un antibiótico con la finalidad de competir con la estreptomina. El grupo de investigación liderado por Duggar, conocido por su amplio conocimiento y estudio de los hongos del suelo, recogió muestras de tierra de todo el mundo, las cuales fueron sometidas a ensayos de dilución de cultivo, para su posterior aplicación en actividad antibiótica contra un panel de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas [Dubos, J.R. 1941].

Una de las muestras denominada A-377, la cual fue obtenida en el campo Sanborn, produjo una inusual colonia de color amarillo que inhibía el crecimiento de todas sus cepas en un panel de bacterias, produciendo zona grandes de inhibición del crecimiento en agar. Esta era una característica inusual en comparación con los pocos antibióticos disponibles. Se constató además que incluso los extractos crudos de la colonia mantuvo notable actividad antibacteriana contra tífus (conjunto de enfermedades infecciosas producidas por varias especies de bacteria del género *Rickettsia*), así como la fiebre de las Montañas Rocosas y efectividad contra agentes patógenos letales. Poco tiempo después Duggar llamó a dicho compuesto aureomicina en referencia a su color amarillo y la cepa de *Streptomyces* de color dorado de la que se extrajo [Dubos, J.R. 1941].

Sin embargo dicho compuesto fue estudiado a profundidad en el año de 1948 en la academia de ciencias de Nueva York con el objetivo de conocer su microbiología médica, taxonomía, fisiología, recibiendo el nombre de *Streptomyces aureofaciens*. Lo que la estableció como un nuevo antibiótico de amplio espectro de actividad, seguro y eficaz, aunque su estructura química exacta aún no se había decidido, por lo que el medicamento fue aprobado por la FDA para uso clínico, salvando innumerables vidas contra un amplio espectro de enfermedades infecciosas [Duggar, B.M. 1948].

# Tetraciclinas

Poco tiempo después en 1950 empresas químicas anunciaron el descubrimiento de nuevos antibióticos, provenientes de muestras de suelo de todo el mundo aislando la bacteria *Streptomyces rimosus* [Finlay, A.C. 1950] lo que produjo un compuesto con similitud en color a aureomicina, pero era ligeramente más soluble en agua, con una mejor bioactividad, dándole una ventaja competitiva en el tratamiento de enfermedades infecciosas.

El compuesto fue nombrado Terramicina en referencia a terra, que en latín significa tierra, y tal vez su origen, Terre Haute, Indiana, compitiendo directamente con aureomicina [King, E.Q. 1950]. Sin embargo las estructuras químicas de ambos compuestos se conocieron hasta el año 1952-1954 por los laboratorios Pfizer (Figura 5.1) confirmando que ambos compuestos poseían un núcleo de naftaceno con grupos similares con pequeñas diferencias entre sí, la terramicina (oxitetraciclina) poseía un grupo OH adicional en C5, careciendo de un átomo de cloro C7, en comparación con aureomicina (clortetraciclina). El núcleo para esta nueva familia de antibióticos se denominó como tetraciclinas [King, E.Q. 1950; Stephens, C.R. 1952].

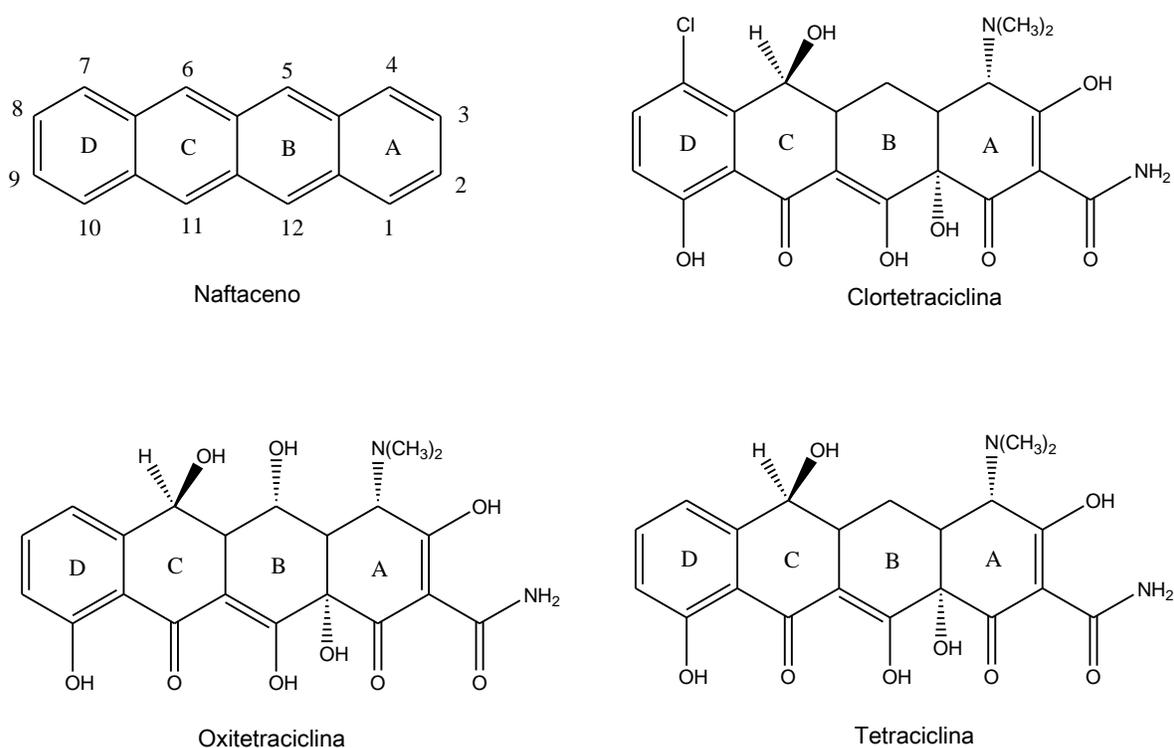


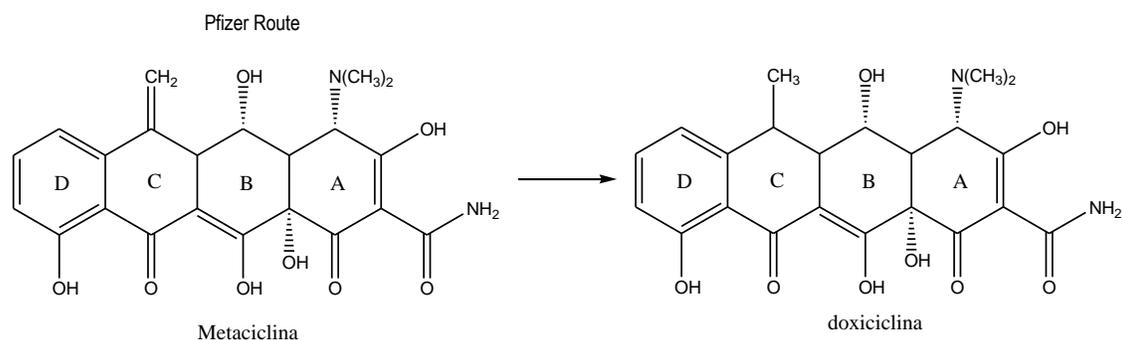
Figura 5.1. Estructura química del naftaceno y tetraciclinas de primera generación.

Lloyd Pfizer predijo que el cloro en la posición C7 en aureomicina no era el responsable de su actividad, y que podría ser eliminado o modificado para producir un análogo más activo con mejores características farmacológicas y antimicrobianas, por lo que llevo a cabo una hidrogenación catalítica de aureomicina, usando paladio e hidrógeno en la reacción. El derivado sintetizado sin el átomo de cloro en C7 originó un compuesto de mayor eficacia, mayor solubilidad y con una actividad farmacológica favorable, nombrado tetraciclina el cual fue aprobado por la FDA para uso clínico en 1954. A mediados de la década de 1950 había ya tres tetraciclinas utilizadas clínicamente, el orden de su descubrimiento fue: clortetraciclina (aureomicina), oxitetraciclina (terramycin), y tetraciclina [Conover, L.H. 1953].

## 5.1.1 Segunda generación de tetraciclinas (semisintéticas)

De acuerdo a las características estructurales de las tetraciclinas (TCs), Lederle y Pfizer realizaron reacciones sintéticas por separado con el fin de lograr modificaciones en las propiedades de las TCs para producir antibióticos más eficaces y con un mayor espectro de actividad.

Una de las primeras reacciones fue la modificación el anillo aromático de la oxitetraciclina con la finalidad de proporcionar estabilidad química, donde la halogenación y deshidratación en en anillo C originó un nuevo antibiótico denominado metaciclina (Figura. 5.2) [Blackwood, R.K. 1961]. Esta utilizada como material de partida en la síntesis de un análogo con una notable actividad, estabilidad y eficacia farmacológica llamada doxiciclina y aprobada en 1967, ampliamente utilizada como un antimicrobiano contra un amplio espectro de infecciones [Dahl, E.L. 2007; Hoerauf, A. 2001; Stephens, C.R.1963].



**Figura 5.2.** Segunda generación de tetraciclinas.

Estos antibióticos se utilizan también con fines terapéuticos en la industria ganadera: aumentando la velocidad de crecimiento de los animales, en conservación de alimentos y en el control microbiológico de fermentaciones [Chopra, I. 2001].

## 5.2 Propiedades fisicoquímicas

Las TCs son compuestos anfóteros por poseer en su estructura un grupo fenol (-OH) en la posición 10 que le confiere el carácter ácido a la estructura y un grupo amino terciario que le confiere un carácter básico en la posición 4. Muchas de ellas forman sales solubles en agua, tanto con ácidos como bases fuertes. Las sales ácidas se forman por protonación del grupo dimetilamonio unido al átomo de carbono 4; son estables (Figura 5.1). Las sales básicas formadas con hidróxido de sodio e hidróxido de potasio; son inestables. El sistema cromóforo común les confiere color amarillo. En cada tetraciclina existen tres grupos ionizables distinguibles. Los valores aproximados de pKa son: 3.3, 7.0, 9.0 El pKa<sub>1</sub> corresponde a la desprotonación del OH, el pKa<sub>2</sub> es debido a la desprotonación del grupo dimetilamino, el pKa<sub>3</sub> se deben al grupo OH (Figura 5.3) [Anderson, C.R. 2005].

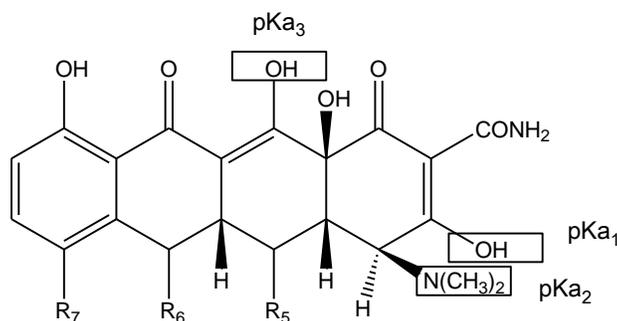


Figura 5.3. Grupos ionizables de las tetraciclinas.

Debido a la presencia de grupos que pueden formar varios puentes de hidrogeno intramoleculares, las TCs tienen propiedades quelantes y forman complejos insolubles con sales de hierro, calcio, magnesio o aluminio. Por tanto para una mejor adsorción no deben administrarse con leche o productos lácteos, antiácidos u otros productos que contengan estos iones [Delgado, A. 2004; Lippincott, W. 2003,].

En soluciones con valores de pH (2 a 6) las TCs experimentan epimerización en el átomo de carbono 4, alcanzándose el equilibrio cuando se han formado aproximadamente cantidades iguales de ambos isómeros. Las epitetraciclinas son mucho menos activas que los isómeros naturales. Este hecho explica la disminución de actividad que se observa en soluciones envejecidas [Rivas de Lopez, L.C. 1983].

### **5.3 Mecanismo de Acción**

Las TCs son generalmente antibióticos bacteriostáticos, aunque pueden tener acción bactericida a altas concentraciones o cuando se usan en contra de microorganismos susceptibles. Estos antibióticos, al parecer, ejercen su acción mediante la inhibición de la síntesis proteica bacteriana, por su unión reversible en la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y, de esta forma, bloquean la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo ribosoma-RNA. Adicionalmente las TCs parece que también se unen reversiblemente a la subunidad 50S. Existe también evidencia preliminar que sugiere que las TCs alteran la membrana citoplasmica de organismos susceptibles, permitiendo la salida de componentes intracelulares. A altas concentraciones, las TCs también inhiben la síntesis de proteínas en las células de los mamíferos.

Las TCs son agentes bacteriostáticos de amplio espectro. Son efectivas en el tratamiento de las infecciones causadas por numerosas especies de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, espiroquetas, micoplasmas, clamidia entre otras, sin embargo sus reacciones adversas y el desarrollo de cepas resistentes y de otros agentes antimicrobianos han reducido su aplicación [Delgado, A. 2004; Limppicott, W. 2003].

La determinación de residuos de TCs en productos de origen animal es de gran importancia y ha sido el objetivo de diversos estudios analíticos empleando diversas técnicas entre las que destacan los ensayos microbiológicos, espectrofotometría y las técnicas de separación como cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y electroforesis capilar (CE).

Los ensayos microbiológicos e inmunoensayos son los métodos de rutina para detectar residuos de tetraciclinas en alimentos, sin embargo presentan ciertas desventajas como baja sensibilidad y selectividad, mediciones semicuantitativas de los residuos detectados y pueden presentar falsos positivos. Recientemente la confirmación y cuantificación de residuos de TCs requiere necesariamente métodos instrumentales de análisis, entre los que se destacan las técnicas como los métodos espectrofotométricos, CE y HPLC.

## 5.4 Metodos de análisis para la determinación de Tetraciclinas

### 5.4.1 Métodos espectrofotométricos

Debido a que las TCs son compuestos que presentan bandas de absorción en UV, su determinación cuantitativa se puede realizar mediante técnicas espectrofotométricas en la cual se requieren la formación de compuestos cromóforos siendo su coloración proporcional a la concentración. Se han descrito una serie de alternativas simples, rápidas y sensibles las cuales cumplen con los requerimientos conforme normativas internacionales, entre las que se destacan:

Una de las estrategias de formación de cromóforos es a través de la formación de un complejo molibdato-oxitetraciclina, el cual presenta un máximo en 404 nm (pH = 5.50;  $\mu$  = 0.1 M y 20°C). El complejo formado permite ser detectado hasta alcanzar un límite de detección entre 2.48-34.78  $\mu\text{g ml}^{-1}$  [Jelikić-Stankov 1989].

Las reacciones de complejación han permitido la detección. Un ejemplo es la determinación de doxiciclina basado en la reacción con iones de cobre, el cual forma un complejo con un máximo a 395 nm. El método fue aplicado en la determinación de doxiciclina en diferentes formulaciones farmacéuticas. El límite de detección alcanzando está en el orden de  $\text{mg ml}^{-1}$  [Lopez, J.L 1993].

Uno de los métodos desarrollados en el análisis de TCs se ha empleado para la determinación de tetraciclina y doxiciclina en muestras farmacéuticas, basado en el empleo de una técnica de inyección en flujo el cual consiste en una reacción de oxidación de estos analitos mediante la adición de T-cloramida en medio alcalino, produciendo un producto de reacción de color rojizo que se determina a 525-535 nm. Los límites de detección alcanzados están en el orden de  $\text{mol l}^{-1}$  [Rufino, J.N. 2009].

La determinación simultánea de clortetraciclina, tetraciclina y oxitetraciclina mediante espectrofotometría se ha descrito utilizando técnicas cinéticas. El método propuesto se basa en una reacción cinética que involucra la oxidación de los analitos en medio alcalino utilizando permanganato de potasio a 40°C. El método presenta un incremento de absorbancia a 526 nm y una disminución a 608 nm causada por la formación de manganato y pérdida del permanganato, respectivamente. La diferencia entre las velocidades de reacción y el análisis multivariante de los datos permite la determinación simultánea de TCs en muestras de carne. Los límites de detección encontrados están en el intervalo de 0.01 a 0.75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  [Ni, Y. 2010].

## 5.4.2 Métodos espectrofluorimétricos

La familia de las TCs son compuestos que presentan fluorescencia nativa, a diversas longitudes de onda de excitación y emisión dependiendo de la metodología empleada. Una de las ventajas principales en este tipo de determinaciones es su bajo costo, la simplicidad del método, elevada sensibilidad y selectividad con respecto a los métodos cromatográficos permitiendo alcanzar límites de detección en concentraciones a niveles traza ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) [Jelikić-Stankov, M. 2007].

La determinación de TCs por espectrofotometría de fluorescencia en matrices complejas presenta ciertas dificultades gracias a la presencia de otros componentes en la matriz analítica afectando la señal. La emisión de fluorescencia puede mejorar en presencia de diversos iones metálicos especialmente con cargas divalentes y mediante la formación de complejos con un ión metálico en presencia de un polímero orgánico tal es el caso de Zn(bix) [bix: 1,4-bis(imidazol-1-metil)benceno] el cual permite alcanzar límites de detección en el orden de  $\mu\text{g l}^{-1}$  y nM. Este tipo de metodologías se han aplicado al análisis de muestras complejas como la leche y en fármacos [Rodríguez, N., 2009, Leng, F. 2013]

## 5.4.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución

La HPLC es el método de referencia para la determinación de TCs. de acuerdo sus propiedades físico-químicas, la separación de esta familia de antimicrobianos involucra el uso de columnas en fase reversa, principalmente  $\text{C}_{18}$  y  $\text{C}_8$ . La fase móvil consta principalmente de mezclas de acetonitrilo, metanol y soluciones acuosas de ácido oxálico y ácido fosfórico. La mezcla impide la formación de complejos con iones metálicos en un solvente orgánico y minimiza la ionización del grupo silanol. La proporción adecuada de estos solventes permite una buena separación de las muestras.

Para el análisis de TCs en muestras de leche se realizan etapas de limpieza por extracción en fase sólida empleando principalmente cartuchos Oasis HLB, sin embargo en todos los casos se requieren etapas de precipitación, centrifugación y filtración. Para la detección de esta familia de antimicrobianos se ha reportado el uso de la espectrofotometría de absorción UV-Vis y fluorescencia principalmente. La Tabla 5.1 muestra ejemplos representativos del análisis de TCs en muestras de leche.

**Tabla 5.1.** Determinación de tetraciclinas en leche mediante HPLC.

Detector	Condiciones HPLC	Método Extracción	Límite de detección	Referencia
FL (321, 327 nm)	Columna: (Symmetry Shield™ C8  FM: a) ácido oxálico 0.01 M, b) acetonitrilo.  Derivatización post- columna con una solución de acetato de magnesio 0.1M en dimetilformamida	SPE: Oasis HLB	5-35 µg Kg <sup>-1</sup>	Ferraz 2007
UV-Vis (355nm)	Columna: PRLP-S, C18 FM: acetonitrilo-ácido fosfórico pH = 2.3	Precipitación, centrifugación, evaporación, el remanente es reconstituido en acetonitrilo	10 µg l <sup>-1</sup>	Fletouris, D.J. 1998
Uv-Vis (360 nm)	Columna: C8, Intersil ODS-2 FM: ácido oxálico- acetonitrilo	SMPE dispersiva Adsorbente: [etilendiamina- N-propilamina (PSA)]	0.7-3.5 ng ml <sup>-1</sup>	Wen-Hsien, T. 2009
UV-Vis (350 nm)	Columna: C18 FM: ácido oxálico- acetonitrilo	SPE: Oasis HLB	33-50 ng g <sup>-1</sup>	Zhou, J. 2009

### **5.4.4 Electroforesis capilar**

Las propiedades fisicoquímicas de las TCs, particularmente su naturaleza iónica, múltiples sitios de ionización y solubilidad en agua, facilitan su análisis mediante electroforesis capilar, la cual es una técnica eficiente, de alta resolución, automatizada, compatible con diversos detectores y bajo consumo de solventes.

La electroforesis capilar de zona es un método muy sensible que determina diversos tipos de TCs generalmente se utilizan soluciones de borato de sodio y 2-propanol como electrolitos base; los voltajes de separación son variados y son detectadas a una longitud de onda de 200 nm para mezclas de antimicrobianos y 360 nm en TCs. Entre los sistemas de detección más reportados en el análisis de antibióticos en leche se encuentran detectores UV-Vis. La Tabla 5.2 muestra ejemplos de la aplicación a muestras de leche.

**Tabla 5.2.** Determinación de tetraciclinas en leche mediante CE.

Detector	Condiciones CE	Método Extracción	Límite de detección	Referencia
UV-visible (200 nm)	Voltaje separación: 30 kV Buffer: borato de sodio 0.02 M pH 9.52	SPE: Oasis HLB	0.24 mg l <sup>-1</sup>	Vera-Candioti, L. 2010
UV-visible (210 nm)	Voltaje separación: 18 kV Buffer: tetraborato de sodio pH 8.0.	SPE: C18	0.78 µg ml <sup>-1</sup>	Santos, S.M. 2007
UV-Vis (195 nm)	Voltaje separación: 18 kV Buffer: carbonato de sodio-EDTA pH =10.	Dilución de la muestra en solución electrolito	0.52 µg ml <sup>-1</sup>	Yi-Min, H. 2001
UV-Vis (200 nm)	Voltaje de separación: 20 kV. Buffer: ácido bórico 20 mM- fosfato monosódico 10 mM y ácido ortofosforico pH= 2.7	Extracción sólido-líquido	1.3-1.8 ng g <sup>-1</sup>	Kowalski, P. 2008
UV-Vis (360 nm)	Voltaje separación: 14 kV Buffer: fosfato de sodio 30 mM, EDTA 2 mM y 2.5 % 2-propanol pH = 12	SPE: C18	61 - 89 µg kg <sup>-1</sup>	Miranda, J.M. 2009

La combinación de MSPE y la CE no ha sido evaluada al análisis de TCs por lo que el presente trabajo pretende llevar a cabo el estudio de esta familia de antimicrobianos ya que son una de las familias con mayor aplicación como promotores de crecimiento en animales productores de alimento. Dentro de las TCs aplicadas con esta finalidad existen más de 20 TCs comercializadas, sin embargo la tetraciclina (TC), clortetraciclina (CT), oxitetraciclina (OT) y doxiciclina (DT) son las más utilizadas en medicina veterinaria. Sin embargo su aplicación incontrolada provoca que residuos de éstos persistan y pasen a la cadena de alimentación humana originando problemas de hipersensibilidad, alteraciones de la flora gastrointestinal y desarrollo de resistencias bacterianas [Errecalde, J.O. 2004; Grande, C. 2000].

La creciente necesidad de cuantificar estos residuos en concentraciones bajas en el orden de  $\mu\text{g l}^{-1}$  o  $\mu\text{g kg}^{-1}$  ha permitido el desarrollo de diversas metodologías analíticas, siendo la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la electroforesis capilar (CE) las técnicas más utilizadas en la actualidad [Kowalski, P. 2008; Miranda, J.M. 2009; Vera-Candioti, L. 2010; Zhou, J. 2009]. El objetivo de este trabajo es extraer los residuos de TCs mediante extracción en fase sólida magnética utilizando adsorbentes magnéticos. La metodología propuesta para la extracción de residuos de TCs se basa en la dispersión de los adsorbentes sintetizados en la muestra y su posterior aislamiento mediante la aplicación de un campo magnético externo. Los analitos adsorbidos se eluyen y analizan mediante CE y HPLC.

## 5.5 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

### 5.5.1 Materiales y reactivos

Todas las soluciones fueron preparadas disolviendo el reactivo grado analítico en agua desionizada con una resistividad no menor que 18.0 MΩ cm, obtenida con un sistema Milli-Q. (Millipore). La solución electrolito consiste de fosfato de sodio 30 mM, sal de EDTA disódica 2 mM y 2-propanol 2%, la solución fue ajustada a un pH = 12 con NaOH 0.1M.

Tetraciclina (95%), Clortetraciclina (95%), oxitetraciclina (95%) doxiciclina (98%) y ácido pícrico (98%) obtenidos por Sigma. Las diferentes soluciones estándar fueron preparadas diariamente por dilución de una solución madre de TCs a una concentración de 1.0 g l<sup>-1</sup> de cada componente preparada disolviendo las sustancias puras en ácido clorhídrico 0.01M. Esta solución fue conservada en ausencia de luz a 4°C y renovada semanalmente. Una solución de ácido pícrico a una concentración de 50 mg l<sup>-1</sup> fue usada como estándar interno. En extracción en fase solida se aplicó un cartucho Sep-Pack Vac C<sub>18</sub> (Waters).

La síntesis de magnetita fue preparada a partir de sulfato ferroso heptahidratado (Sigma). El recubrimiento de sílice fue sintetizado utilizando feniltrimetoxilsilano (97%, PTMS), tetrametoxisilano (98%, TMOS) usando Triton X-100 y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) como surfactante (Sigma).

### 5.5.2 Equipos

La caracterización de las estructuras obtenidas fue determinada mediante infrarrojo las cuales se realizaron en un equipo Perkin Elmer con transformada de Fourier (FTIR) modelo de espectrofotómetro IRDM. Las muestras se analizaron en pastilla de KBr (1%). La distribución del tamaño de partícula fue determinada en un equipo Beckman Coulter LS 133320 con dispersión de luz (LS) con un analizador de tamaño de partícula con un láser de diodos a una longitud de onda de 750 nm. 0.1 g del adsorbente es magnético inicialmente es dispersado en 5.0 ml de metanol, posteriormente la suspensión orgánica fue diluida a 500.0 ml en agua para dispersar el adsorbente magnético en una matriz acuosa. El análisis morfológico del adsorbente magnético se realizó en un equipo JEOL JSM-820 microscopia electrónica de barrido (SEM).

La determinación mediante electroforesis se realizó en un equipo Beckman Coulter P/ACE 5500 con un detector de arreglo de diodos. Los datos fueron recolectados y analizados con un software BeckmanP/ACE systemMDQ versión 2.3. La separación de las TCs se realizó en un capilar de sílice fundida (41.7 cm x 75  $\mu$ m id). Un pHmetro modelo 450 de Corning (Corning Science Products) fue usado para medir el pH del electrolito con una precisión de 0.01 unidades de pH. Un sistema de ultrasonido Branson modelo 3510 fue empleado en la dispersión de los adsorbentes magnéticos y en la elución de los analitos.

La determinación cromatografica se realizó en un sistema de cromatografía de líquidos Perkin Elmer series 200 (Perkin Elmer) con un detector UV-Vis a 360 nm y un inyector manual de 20  $\mu$ l. La separación se realizó en una columna Spheri-5-ODS (5  $\mu$ m; 240x4.6 mm) de Perkin Elmer, utilizando como fase móvil ácido oxálico (0.01 M):metanol:acetonitrilo (64:18:18, v/v) a un flujo de 1.0 ml min<sup>-1</sup>.

### **5.5.3 Tratamiento de la muestra**

La metodología MSPE propuesta se realizó mediante la siguiente secuencia experimental. Inicialmente se pesan 0.1 g del adsorbente magnético y se adicionan dentro de un vaso de precipitado. Las partículas magnéticas se activan mediante la adición de 5 ml de metanol en un baño de ultrasonido durante 5 min. Una vez terminado el tiempo de activación el adsorbente se aísla magnéticamente y se lava en dos ocasiones con 10.0 ml de agua desionizada. Subsecuentemente un volumen adecuado (50.0-200.0 ml) de una muestra de leche y 12.0 ml de una solución electrolito de boratos (0.1M, pH 10.0) se mezclan con el adsorbente magnético previamente activado. La suspensión resultante se mezcla en un baño de ultrasonido por 15 min.

Transcurrido el tiempo de dispersión se aíslan el adsorbente con los analitos mediante la aplicación de un campo magnético. La fase líquida se decanta mientras que la fase sólida se lava tres ocasiones con 5.0 ml con la solución electrolito de boratos. Las TCs adsorbidas se eluyen del adsorbente magnético por dispersión del mismo en 3.0 ml de una solución de metanol acidificada con 0.5% (v/v) de ácido acético durante 5 min. La solución resultante se evapora a sequedad bajo corriente de aire y se reconstituye en 1.0 ml de la solución 0.01M HCl/50 mg l<sup>-1</sup> de ácido pícrico como estándar interno. Finalmente la solución se hace pasar a través de un filtro de nylon 0.2  $\mu$ m y se guarda para ser analizada mediante CE.

Las condiciones de extracción en fase sólida se realizaron mediante el uso de un cartucho C<sub>18</sub> mediante la siguiente secuencia: a 10.0 ml de una muestra de leche se le adicionaron 30.0 ml de una solución Mcllvine/EDTA, la mezcla se agita durante 1.0 min y se centrifuga por 15 min (4000 rpm). El precipitado obtenido se desecha mientras que la solución resultante se pasa a través de un cartucho C<sub>18</sub> SPE previamente activado con 2.0 ml de metanol seguido de 2.0 ml de una solución Mcllvine/EDTA a un flujo de 5.0 ml min<sup>-1</sup>. Después de preconcentrar los analitos, el cartucho se lava con 2.0 ml de una solución de metanol 5.0%. Las TCs retenidas se eluye con 3.0 ml de metanol, evaporado a sequedad y se reconstituye en una solución de 0.01 M HCl/50 mg l<sup>-1</sup> de ácido pícrico [Fritz, J.W. 2007].

#### 5.5.4 Síntesis de los adsorbentes magnéticos silice-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

La síntesis de los adsorbentes magnéticos se llevó a cabo en dos etapas. En una primera etapa la magnética fue obtenida mediante oxidación parcial y precipitación de Fe(II) en presencia de oxígeno en medio básico [Aguilar-Arteaga, K. 2010]. Sintetizada la magnetita se adiciona dentro de un matraz balón con TMOS:PTMS a diferentes radios molares, los adsorbentes magnéticos fueron obtenidos mediante polimerización en emulsión. Los precursores de sílice fueron previamente solubilizados en 25 ml de una solución que contiene 2.0% (w/v) Triton X-100, 0.02% (w/v) CTAB, 12.5% (v/v) metanol, 200 µL de una solución de amoníaco al 28% como catalizador. La mezcla se coloca en reflujo durante 16 h. Una vez terminado el tiempo de reacción el adsorbente obtenido se lava en repetidas ocasiones con agua destilada y secado a 60°C durante 24 h [Aguilar-Arteaga, K. 2010].

Una vez obtenidos los adsorbentes magnéticos se llevó a cabo el bloqueo superficial de los grupos silanol (-Si-OH) presentes en los mismos mediante la adición de una mezcla de solventes que consiste en 0.9 g de clorotrimetilsilano (CTMS) y 1.0 ml de piridina por gramo de adsorbente magnético en 25.0 ml de tolueno. La adición de piridina tiene la finalidad de neutralizar el HCl producido durante la derivatización. Concluido el bloqueo de los grupos silanol los adsorbentes magnéticos fueron lavados secuencialmente con porciones de 20.0 ml de tolueno, etanol y agua desionizada, hasta que los solventes remanentes del lavado no presenten coloración. Terminada esta etapa los adsorbentes magnéticos fueron secados a 60°C durante 24 h [Aguilar-Arteaga, K. 2010].

## **5.5.5 Análisis mediante Electroforesis Capilar**

Al inicio de cada día de trabajo el capilar se activa mediante la siguiente secuencia: 15 min de NaOH 1.0 M a 35°C, seguido de 10 min NaOH 0.1 M, 10 min agua desionizada y por ultimo 10 min de la solución electrolito. El capilar se lava entre cada análisis con: 1 min NaOH 1.0 M, 2 min NaOH 0.01 M, 2 min agua desionizada y 2 min de la solución electrolito, las condiciones de separación encontradas fueron:

Todos los análisis de determinación de TCs se detectaron a una longitud del detector ( $\lambda$ ) de 360 nm. Las muestras son inyectadas en modo hidrodinámico con una presión de 0.5 psi durante 5 s. El capilar se mantiene a 25°C, voltaje de separación de 14 kV. La relación de área de pico analito/estándar interno (EI) se emplea para la cuantificación. Los diferentes picos fueron identificados por sus tiempos de migración y co-inyección de las soluciones estándar [Miranda, J.M. 2009].

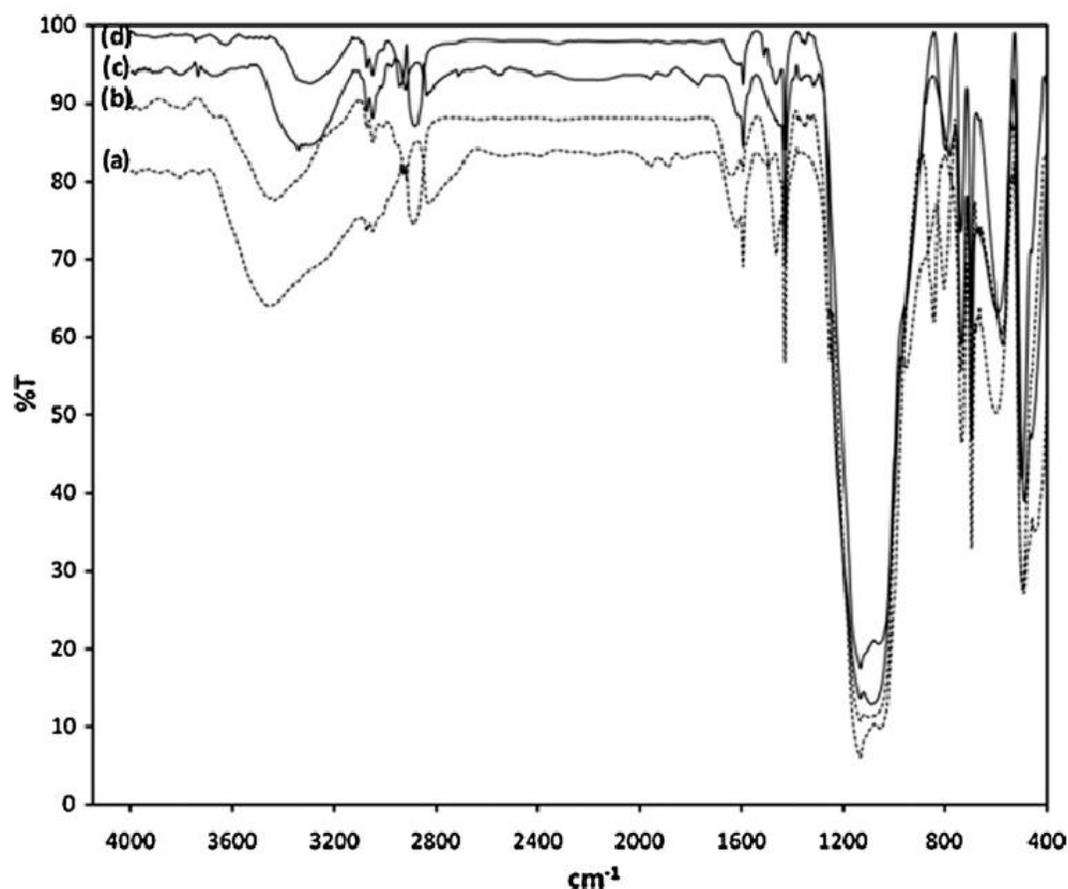
## 5.6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.6.1 Caracterización de los adsorbente magnéticos

En una primera etapa se evaluó el efecto de la hidrofobicidad en la retención de TCs. Cinco diferentes adsorbentes magnéticos fueron sintetizados y caracterizados. Los adsorbentes magnéticos fueron obtenidos variando la relación molar del monómero funcionalizado (PTMS) y el monómero entrecruzante (TMOS) siendo 0.5:1.0, 1.0:1.0, 2.0:1.0, 4.0:1.0 y 5.0:1.0 (PTMS:TMOS) obteniendo adsorbentes con una elevada área superficial para los primeros cuatro adsorbentes mientras el adsorbente con relación (5.0:1.0) se formó un gel con característica viscosa y con una baja área superficial, por lo que se descartó su posible aplicación mediante MSPE empleando a los adsorbentes con relación molar menor a (4.0:1.0) para el estudio de la retención de TCs mediante MSPE.

Los espectros (Figura. 5.4) FTIR para los adsorbentes magnéticos muestran una banda de estiramiento de 3250-3600  $\text{cm}^{-1}$  atribuida a la vibración del grupo silanol (Si-OH). Dos bandas alrededor de 3100  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a la vibración de los grupos =C-H del grupo fenilo, dos bandas en 2900 asignadas a la vibración de enlace C-H. Una serie de bandas débiles desde 1600-1900  $\text{cm}^{-1}$  características a las vibraciones C-H de grupos aromáticos. Una banda de flexión en 1450  $\text{cm}^{-1}$  atribuida al  $\text{H}_2\text{O}$  contenida en el adsorbente magnético. Una banda de estiramiento entre 950-1250  $\text{cm}^{-1}$  asignada al grupo siloxano (Si-O-Si), y una banda de deformación alrededor de 750-850  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo Si-OH.

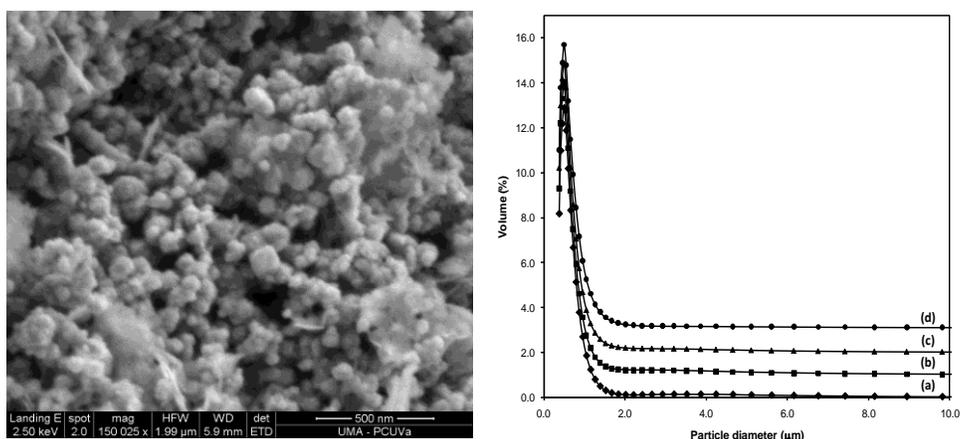
El espectro FTIR muestra que la banda de estiramiento a 3250-3600  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo silanol (Si-OH) disminuye conforme la relación molar PTMS:TMOS incrementa. La hidrofobicidad del adsorbente magnético incrementa de la misma manera. Lo anterior se corrobora al observar una disminución de la intensidad de la banda correspondiente al  $\text{H}_2\text{O}$  a 1450  $\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 5.4.** Espectro FTIR de los adsorbentes magnéticos (PTMS:TMOS) a diferentes ratios molares:  
a) 0.5:1.0, b) 1.0:1.0, c) 2.0:1.0, d) 4.0:1.0.

La morfología del adsorbente magnético fue estudiada por microscopía electrónica de barrido (SEM). Como se muestra en la Figura 5.5, los adsorbentes presentan una morfología esférica. La distribución del tamaño de partícula de los adsorbentes magnéticos se llevó previamente una etapa de secado a 100° C durante 24 h, determinando un tamaño de partícula de 60 a 100 nm, de acuerdo a ello dichos adsorbentes tienen una morfología homogénea.

El tamaño de partícula de los adsorbentes magnéticos se llevó a cabo en solución acuosa y fue analizado mediante LS. La Figura 5.5 B muestra los resultados obtenidos para todos los adsorbentes sintetizados. El tamaño de partícula es uniforme en todos los casos, con un tamaño medio de alrededor de 500 nm. El aumento del tamaño de partícula es atribuido a la hidratación característica de la aglomeración de sílice.



**Figura 5.5.** (A) Microscopía electrónica de barrido y (B) Distribución de tamaño de partícula de los adsorbentes magnéticos (PTMS:TMOS) a diferentes radios molares: a) 0.5:1.0, b) 1.0:1.0, c) 2.0:1.0, d) 4.0:1.0.

## 5.6.2 Retención y Elución de TCs en muestras de leche

Los resultados muestran una dependencia en el pH sobre la extracción y aislamiento de TCs en matrices complejas. La existencia de diversos grados de ionización en las estructuras TCs se relaciona con sus constantes de disociación ( $pK_a$ ). Los valores de  $pK_a$  en solución acuosa se encuentran alrededor de 3.3, 7.5, 9.0 y 13.0. Para evaluar el efecto del pH y la hidrofobicidad, los experimentos de retención se llevaron a cabo en un intervalo de pH de 4.0 a 12.0. Todos los experimentos se realizaron a 25 ml de muestras dopadas de leche con TCs a  $10 \text{ mg l}^{-1}$  con 0.1 g del adsorbente magnético. Una vez completada la extracción, las TCs remanentes en la solución fueron determinadas mediante SPE-CE [Fritz, J.M. 2007].

Los % de retención y % de recuperación fueron calculados como función de la concentración añadida y la concentración encontrada después de la extracción. La Tabla 5.3 muestra los % de retención obtenidos en cada experimento. Los resultados obtenidos muestran que los % de retención incrementan con la hidrofobicidad de las TCs. Para el intervalo de pH evaluado, la máxima retención obtenida es mediante el uso del adsorbente magnético con una relación molar 4.0:1.0 PTMS:TMOS.

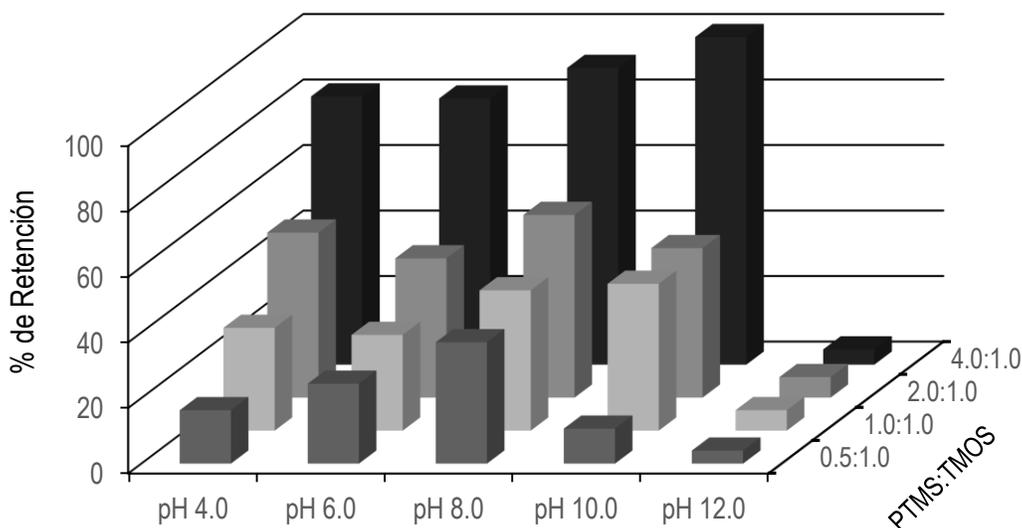
El efecto del pH en la retención de TCs demuestra una mayor afinidad del adsorbente por las TCs en su forma desprotonada que en su forma protonada.

## Resultados y Discusión

Las condiciones óptimas seleccionadas en la retención de TCs son: pH de 10.0 y una relación molar del adsorbente magnético de 4.0:1.0, bajo estas condiciones se obtienen % de retención en un intervalo de 99.6 a 101.2% para todas las TCs determinadas. A valores de pH por encima de 9.0 la adsorción de las TCs disminuye debido a que el adsorbente magnético adquiere una carga negativa debido a los grupos hidroxilo, provocando una repulsión electrostática entre el adsorbente y las TCs en su forma aniónica. [Jordan, N. 2007].

**Tabla 5.3.** Porcentaje de retención (promedio y %RSD, n = 3) a diferentes valores de pH y adsorbentes magnéticos a diferentes relaciones molares (PTMS:TMOS).

PTMS:TMOS		pH				
		4.0 (RSD)	6.0 (RSD)	8.0 (RSD)	10.0 (RSD)	12.0 (RSD)
0.5:1.0	TC	17.7 (0.8)	23.4 (0.7)	35.8 (0.6)	11.2 (0.5)	3.2 (1.8)
	CT	18.0 (0.2)	25.9 (0.6)	39.9 (0.9)	10.2 (0.1)	2.9 (1.0)
	OX	12.1 (0.3)	23.5 (0.5)	35.4 (1.1)	10.1 (0.5)	5.5 (1.3)
	DX	17.4 (0.7)	24.8 (0.3)	37.1 (0.5)	11.2 (0.7)	4.3 (2.2)
1.0:1.0	TC	30.7 (1.1)	30.6 (0.7)	43.4 (0.8)	43.2 (0.8)	5.8 (1.9)
	CT	31.3 (0.9)	29.9 (0.9)	41.9 (0.1)	44.2 (1.3)	6.9 (1.5)
	OX	32.3 (1.5)	28.4 (0.5)	43.1 (0.1)	48.4 (0.4)	4.4 (0.8)
	DX	31.2 (0.7)	28.0 (0.4)	42.9 (0.1)	43.5 (0.7)	7.9 (2.7)
2.0:1.0	TC	50.8 (0.4)	41.2 (0.2)	55.3 (0.6)	44.6 (0.8)	6.7 (2.3)
	CT	47.1 (0.3)	40.4 (0.6)	56.9 (1.3)	47.1 (1.3)	5.9 (1.8)
	OX	50.1 (0.9)	40.9 (0.6)	57.4 (1.1)	40.2 (0.6)	4.7 (2.2)
	DX	53.5 (0.3)	47.6 (0.8)	53.5 (0.1)	50.7 (0.9)	7.8 (2.1)
4.0:1.0	TC	82.6 (0.4)	80.4 (1.0)	90.7 (0.4)	99.6 (0.5)	6.9 (2.1)
	CT	80.8 (0.5)	81.8 (1.4)	91.9 (1.2)	100.5 (1.3)	3.4 (1.4)
	OX	83.3 (1.1)	82.9 (1.1)	91.8 (0.3)	100.1 (1.2)	5.9 (1.0)
	DX	80.8 (0.3)	79.9 (1.4)	87.9 (0.1)	101.2 (1.5)	2.4 (0.6)



**Figura 5.6.** Porcentajes promedio de retención de TCs a diferentes valores de pH vs Relación del adsorbente magnético (TMFS:TMOS).

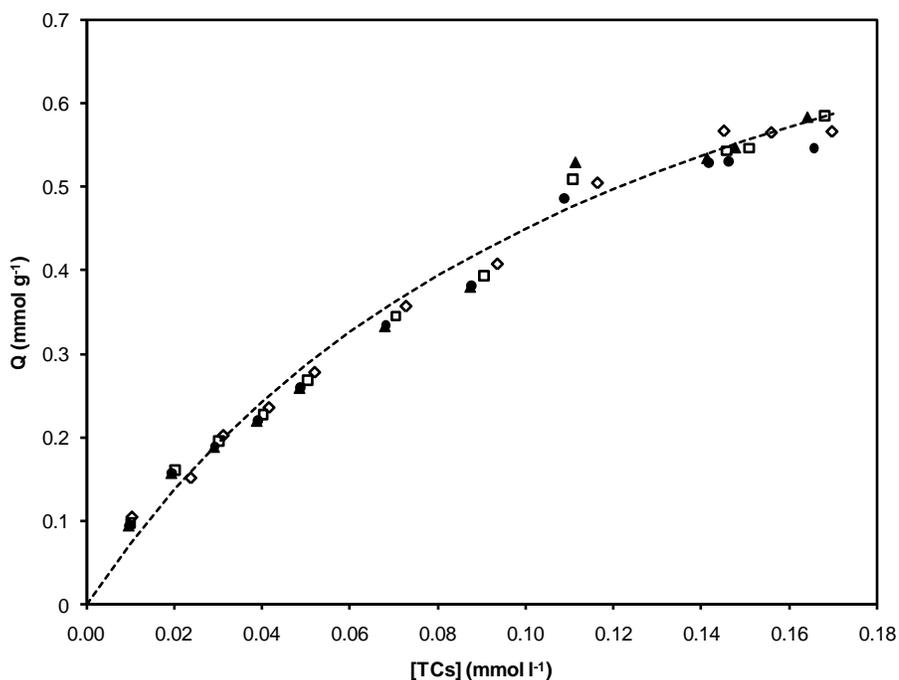
Una vez seleccionadas las condiciones de retención, se evaluaron tres diferentes soluciones para la etapa de elución de las TCs [Oka, H. 2000]. Utilizando las siguientes soluciones, 5 ml de: metanol-ácido acético ( $1 \times 10^{-3}$  M), metanol-acetato de etilo (1:1, v/v) y metanol-ácido clorhídrico ( $1 \times 10^{-3}$  M). Posteriormente a su elución, la solución orgánica fue evaporada, y el residuo fue reconstituido y filtrado para su análisis mediante CE. La Tabla 5.4 muestra los resultados obtenidos mediante el uso de las tres diferentes soluciones, de acuerdo a ello las soluciones de metanol acidificadas proveen de los mejores % de recuperación (82.6-99.8%) en comparación con la solución de metanol-acetato de etilo. Sin embargo la solución constituida por metanol-ácido acético resulta ser menos reactiva con la magnetita contenida en el adsorbente inhibiendo la formación de complejos entre las TCs y Fe(III) originando como resultado el incremento en los % de recuperación [Oka, H. 2000; Miranda, J.M. 2009]. Por lo que la solución metanol-ácido acético ( $1 \times 10^{-3}$  M) fue seleccionada para la subsecuente etapa de elución en el análisis.

## Resultados y Discusión

**Tabla 5.4.** % de recuperación (promedio y %RSD, n = 3) en la re-extracción de TCs.

Soluciones de Elución	% Recuperación			
	CT (RSD)	TC (RSD)	OT (RSD)	DT (RSD)
MeOH-CH <sub>3</sub> COOH (1x10 <sup>-3</sup> M)	94.2 (3.0)	99.4 (1.8)	99.8 (4.3)	97.1 (3.2)
MeOH-etil acetato (1:1, v/v)	29.5 (1.4)	34.9 (3.5)	34.5 (3.2)	32.7 (4.3)
MeOH-HCl (1x10 <sup>-3</sup> M)	82.6 (3.4)	87.1 (2.1)	87.2 (4.9)	85.3 (3.7)

Para determinar la capacidad de adsorción y la afinidad del adsorbente magnético por los analitos de interés se determinaron mediante una isoterma de adsorción y el correspondiente análisis Scatchard. La isoterma de adsorción se construye mediante un set de muestras de 25 ml con un intervalo de concentración de 0.01 a 0.17 mM de TCs determinando la concentración remanente (mM) de TCs obtenidas después de la dispersión de 0.1 g de adsorbente magnético. La Figura 5.6 muestra que la cantidad de TCs enlazadas en el adsorbente magnético en el equilibrio incrementa cuando la concentración inicial de TCs incrementa.



**Figura 5.7.** Isoterma de adsorción y análisis Scatchard.

La ecuación de regresión lineal de esta curva es  $Q/[TCs] = -7.60Q + 7.92$ . Los valores de  $K_d$  y  $Q_{max}$  fueron calculados  $131.6 \text{ mmol l}^{-1}$  y  $104 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1}$ , respectivamente. Estos valores corresponden a un grado de interacción media entre el adsorbente y las TCs, lo que resulta ser adecuado en el proceso de retención-elución.

La linealidad observada en el análisis Scatchard indica la presencia de sitios activos homogéneos en el adsorbente magnético. El adsorbente magnético con relación molar 4.0:1.0 PTMS:TMOS muestra una afinidad selectiva por las TCs similar a las reportadas mediante el empleo de polímeros molecularmente impresos [Chen, L. 2009].

Los experimento de retención, elución y afinidad, demuestran la utilidad del adsorbente magnético en la determinación de tetraciclinas en matrices complejas como la leche mediante extracción en fase sólida magnética.

### 5.6.3 Validación y aplicación del método

Los límites de detección (LODs) del método MSPE-CE se evaluaron empleando diferentes volúmenes (50, 100 y 200 ml) de muestras de leche dopadas con TCs en concentraciones de 50-250  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Los LODs fueron calculados mediante la relación señal ruido ( $S/N=3.29$ ). La Tabla 5.5 muestra que de acuerdo a los resultados, los LOD disminuyen cuando se utilizan un volumen de muestra más grande. Los menores LODs se encuentran en un intervalo de 2 a 9  $\mu\text{g l}^{-1}$  con un volumen de muestra inicial de 200 ml. Basados en los resultados y tomando en cuenta las límites máximos residual (MRLs) establecidos por regulaciones de la EU (100  $\mu\text{g l}^{-1}$ ), un volumen de muestra de 200 ml es seleccionada como la más adecuada para el análisis en muestras reales [European Union Council Regulation No. 508/99].

**Tabla 5.5.** Límites de detección obtenidos a diferentes volúmenes de leche mediante MSPE.

Volumen (ml)	Límites de detección (LODs) [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]			
	CT	TC	OX	DX
200	6	9	2	5
100	63	91	64	77
50	187	210	165	158

## Resultados y Discusión

Bajo las condiciones óptimas, los parámetros analíticos del método MSPE-CE fueron evaluados usando muestras de leche dopadas con TCs. Alicuotas de 200 ml de muestra de leche blanco fueron dopadas con TCs en un intervalo de concentración de 25-250  $\mu\text{g l}^{-1}$ . Cada estándar fue preparado y analizado por triplicado. Una vez homogenizada cada una de las muestras se llevó a cabo la pre-concentración de las TCs usando la metodología propuesta (MSPE) tal y como se describe en la sección experimental. Las alturas de los picos obtenidos en unidades arbitrarias (AU) fueron medidas, construyendo la línea de calibrado a partir de los promedios de las relaciones de área. La línea de calibrado muestra una dependencia entre la relación de áreas y la concentración de TCs en la muestra de leche dopada. Los parámetros de regresión de la línea de calibrado se muestran en la Tabla 5.6. [Danzer, K. 1998]

**Tabla 5.6.** Parámetros de regresión de la curva de calibrado, área de pico (mAU) vs concentración de TCs ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en 200 ml de muestra.

Parametros	CT	TC	OT	DT
Coefficiente de correlación	0.992	0.996	0.999	0.997
Ordenada, $b_0 \pm ts(b_0)$	118 $\pm$ 218	124 $\pm$ 256	124 $\pm$ 215	101 $\pm$ 217
Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$	85716 $\pm$ 1457	99690 $\pm$ 2865	81366 $\pm$ 615	79264 $\pm$ 1182
Reproducibilidad				
100 $\mu\text{g l}^{-1}$	2.3	1.7	2.2	2.7
(%RSD, n = 3)				
150 $\mu\text{g l}^{-1}$	1.7	1.6	2.0	2.3
Repetitividad				
100 $\mu\text{g l}^{-1}$	1.2	3.2	1.9	1.9
(%RSD, n = 3)				
150 $\mu\text{g l}^{-1}$	1.8	2.2	2.3	0.8
Intervalo lineal ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	18-250	27-250	4-25	25-250
Limites de detección ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	6	9	2	5
Limites de cuantificación ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )	18	27	6	15

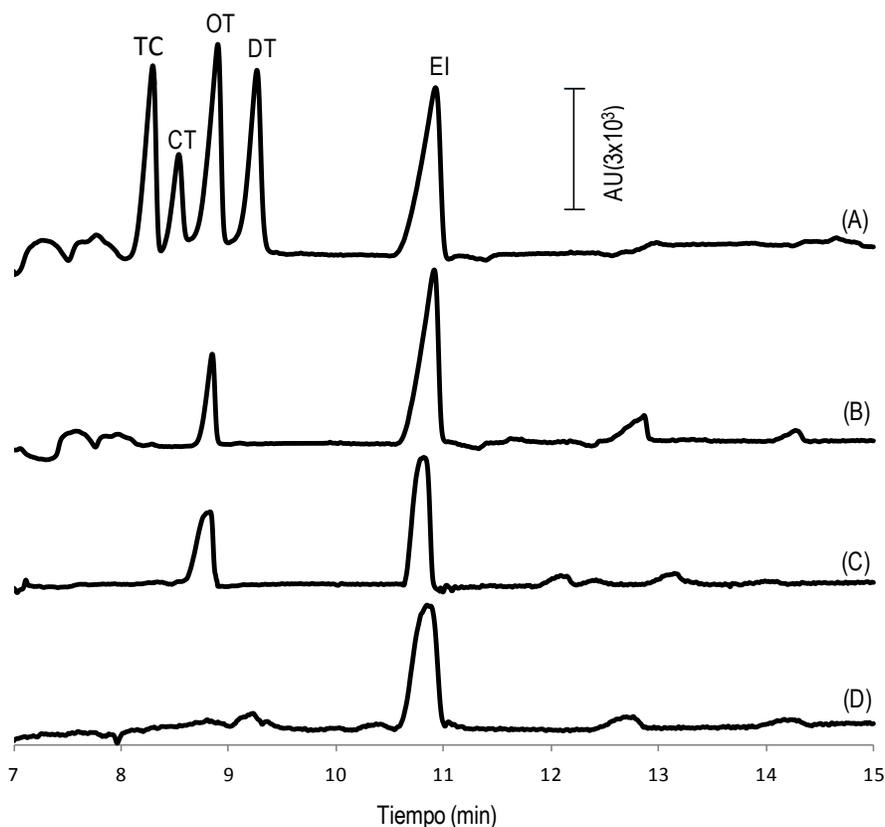
La exactitud del método se determinó mediante las recuperaciones absolutas de las TCs añadidas a una muestra de leche blanco a tres niveles de concentración con tres replicas para cada nivel. El promedio de las recuperaciones obtenidas para las cuatro TCs en muestras de leche dopadas, se encontraron en un intervalo de 92-103% con una desviación estándar relativa (RSD) menor a un 5% en todos los casos usando la metodología propuesta MSPE (Tabla 5.7).

## *Resultados y Discusión*

**Tabla 5.7.** Porcentaje de recuperación de tetraciclinas (TCs) y %RSD (n = 3) en muestras de leche dopadas mediante MSPE.

Añadida [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]	TCs	Encontrada [ $\mu\text{g l}^{-1}$ ]			% Recuperación	% RSD
100	CT	91.3	93.7	92.4	92.5	1.3
	TC	104.1	103.7	102.9	103.6	0.6
	OT	98.1	96.6	92	95.6	3.3
	DT	96.1	94.5	91.8	94.1	2.3
150	CT	143.7	141.8	142.6	95.1	0.7
	TC	149.8	153.4	155.3	101.9	1.8
	OT	147.6	148.8	151.4	99.5	1.3
	DT	148.1	152	148.6	99.7	1.4
200	CT	189.4	192.9	190.5	95.5	0.9
	TC	198.7	199.3	197.3	99,2	0.5
	OT	200.7	211.5	210.1	103.7	2.8
	DT	200.8	209.5	201.5	103.3	2.1

La metodología propuesta se aplicó en la determinación de TCs en 25 muestras de leche comercial de diferentes marcas, realizando el análisis por triplicado de cada muestra. De acuerdo a los resultados obtenidos del análisis de TCs en leche, 5 muestras de las 25 analizadas fueron positivas a la presencia de OT, la cual fue identificada por su tiempo de migración La Figura 5.7 muestra los electroferogramas obtenidos del análisis de muestras de leche. Muestra de leche dopada (Figura 5.7A, muestra de leche real (Figura 5.7B), muestra de leche real analizadas por SPE-CE (Figura 5.7C), y una muestra de referencia (Figura 5.7D).



**Figura 5.8.** Electroferogramas obtenidos en el análisis de tetraciclina mediante MSPE: (A) muestra de leche dopada ( $250 \mu\text{g l}^{-1}$ ), (B) muestra de leche real, (C) muestra de leche real por SPE-CE y (D) muestra blanco, CT, clortetraciclina, OT, oxitetraciclina, TC, tetraciclina, DT, doxiciclina, ES, estándar interno, condiciones CE: capilar de sílice fundida (41.7 cm x 75  $\mu\text{m}$  I.D), electrolito soporte, fosfato de sodio 30 mM, sal disódica de EDTA 2mM y 2-propanol 2% a pH 12.0, voltaje de separación 14 kV; inyección a 0.5 psi 5s.

La exactitud del método MSPE-CE, las muestras positivas también fueron analizadas mediante SPE-CE y MSPE-HPLC. Los resultados obtenidos por el método propuesto (Tabla 5.8) fueron comparados con los obtenidos mediante el método de pre-tratamiento clásico (extracción por solvente, centrifugación, etapa de limpieza y concentración por SPE). Para evaluar las diferencias entre los métodos, se llevó a cabo una comparación mediante un ANOVA de una vía.

## Resultados y Discusión

El valor F calculado ( $p = 0.5$ ) no excedió el valor de F crítica ( $F_{2,42} = 3.22$ ,  $p = 0.05$ ), lo que indica que no hay diferencias significativas en los resultados obtenidos empleando los diferentes métodos de análisis, por lo tanto se confirma que MSPE es una técnica robusta y precisa, la cual puede ser acoplada a HPLC o CE en la determinación de TCs en leche.

**Tabla 5.8.** Contenido de oxitetraciclina ( $\mu\text{g l}^{-1}$ ) en muestras de leche real obtenidas de diferentes marcas.

Muestra	Concentración de oxitetraciclina ( $\mu\text{g l}^{-1}$ )		
	EC	HPLC	SPE-CE
1	142.0	141.2	129.1
	141.9	134.5	133.8
	142.0	137.7	132.0
2	127.0	135.4	129.1
	136.9	136.9	133.8
	131.9	131.4	132.0
3	97.3	98.9	93.5
	98.8	102.2	97.4
	98.1	99.6	94.7
4	137.5	139.1	139.6
	143.2	136.9	137.9
	139.7	136.4	141.4
5	207.6	204.8	199.2
	218.9	211.8	208.2
	212.5	208.5	205.6

### **5.7 CONCLUSIONES**

La técnica MSPE propuesta basada en la síntesis de adsorbente magnético ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-fenil}$  modificada) ha demostrado ser una estrategia eficaz en la preconcentración rápida de residuos de TCs en matrices complejas como la leche. La metodología descrita es más rápida que los procedimientos de preparación clásicos como SPE, con una mínima manipulación de muestra, menor consumo de solventes, y por consiguiente bajo costo. Esta técnica proporciona buenos resultados en términos de sensibilidad y precisión. Cuando se acopla a CE, el método MSPE proporciona LODs de 2-9  $\mu\text{g l}^{-1}$ , cumpliendo con las normativas internacionales en el análisis de residuos de TCs, además la técnica de preconcentración MSPE es una buena alternativa para el acoplamiento a otros métodos analíticos, tales como HPLC.

## 5.8 BIBLIOGRAFÍA

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

**Anderson, C.R.**, Rupp, H.S., Wu, W.H. Complexities in tetracycline analysis-chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1075 (2005) 23.

**Ferraz, B.**, Oliveira, A.L., Goncalves, M.A., Monteiro, M.A. Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk. *Anal. Chim. Acta* 581 (2007) p. 108.

**Blackwood, R.K.**, Beereboom, J.J., Rennhard, H.H. 6-Methylenetetracyclines. I. A new class of antibiotics. *J. Am. Chem. Soc.* 83 (1961) p. 2773.

**Chen, L.**, Liu, J., Zeng, Q., Wang, H., Yu, A. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymer for the separation of tetracycline antibiotics from egg and tissue samples. *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) p. 3710.

**Chopra I**, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 65 (2001) p. 232.

**Conover, L.H.**, Moreland, W.T., English, A.R. Terramycin. XI. Tetracycline. *J. Am. Chem. Soc.* 75 (1953) p 5455.

**Dahl, E.L.**, Rosenthal, P.J. Multiple antibiotics exert delayed effects against the *Plasmodium falciparum* apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) p. 3485.

**Danzer, K.**, Currie, L.A. Guidelines for calibration in analytical chemistry. *Pure Appl. Chem.* 70 (1998) p. 993.

**Delgado, A.**, Minguillón, C., Joglar, J. Introducción a la Química Terapéutica, 2ª ed. ED. Diaz de Santos, Madrid España (2004) p. 456.

**Dubos, R.J.**, Hotchkiss, R.D. The production of bacteriocidal substances by aerobic sporulating bacilli. J. Exp. Med. 78 (1941) p. 629.

**Duggar, B.M.** Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51 (1948) p. 177.

**Errecalde, J.O.** Uso de Antimicrobianos en Animales de Consumo, FAO Producción y Sanidad Animal, 162 (2004) p. 4.

**European Union Council Regulation No. 508/99**, Off. J. Eur. Commun. L60 (1999) p. 16.

**Finlay, A.C.**, Hobby, G.L., Pan, S.Y. Terramycin, a new antibiotic. Science 111 (1950) p. 85.

**Fletouris, D.J.**, Psomas, J.E., Botsoglou, N.A. Trace Analysis of Oxytetracycline and Tetracycline in Milk by High-Performance Liquid Chromatography. J. Agric. Food Chem. 38 (1998) p. 1913.

**Fritz, J.W.**, Zuo, Y. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. Food Chem. 105 (2007) p. 1297.

**Grande, C.**, García, B., Gándara, F.S. The use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective. Cienc. Tecnol. Aliment. 3 (2000) p. 39.

**Hoerauf, A.**, Mand, S., Adjei, O. Depletion of wolbachia endobacteria in *Onchocerca volvulus* by doxycycline and microfilaridermia after ivermectin treatment. Lancet. 357 (2001) p. 1415.

**Jelikić-Stankov, M.**, Veselinović, D., Malešev, D., Radović, Z. Spectrophotometric determination of oxytetracycline in pharmaceutical preparations using sodium molybdate as analytical reagent. Journal of Pharmaceut Biomedical Anal. 7, (1989) p. 1565.

**Jordan, N.**, Marmier, N., Lomenech, C., Giffaut, E. Sorption of silicates on goethite, hematite, and magnetite: Experiments and modeling. *J. Colloid Interface Sci.* 312 (2007) p. 224.

**King, E.Q.**, Lewis, C.N., Welch, H. Clinical observations on the use of Terramycin hydrochloride. *J. Am. Med. Assoc.* 143 (1950) p. 1.

**Kowalski, P.** Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples. *J. Pharma. Biomed. Anal.* 47 (2008) p. 487.

**Leng, F.**, Zhao, X.J., Wang, J., Li, Y.F. Visual detection of tetracycline antibiotics with the turned on fluorescence induced by a metal-organic coordination polymer. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.01.039>

**Limpincott, W.** Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>th</sup> Ed. ED. medica panamericana, España. (2003) p. 2097

**Lopez, J.L.**, Martinez, J. Copper carbonate as a solid-bed reactor for spectrophotometric determination of doxycycline and oxytetracycline in an unsegmented continuous flow assembly. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) p. 1093.

**Miranda, J.M.**, Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A. Simultaneous determination of tetracyclines in poultry muscle by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* 1216 (2009) p. 3366.

**Oka, H.**, Ito, Y., Matsumoto, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr. A.* 882 (2000) p. 109.

**Rivas de Lopez, L.C.** Estabilidad de Medicamentos: Breves consideraciones generales y Estudio particular de Algunas Drogas constituyentes de Medicamentos. *Acta Farm, Bonaerense.* 2 (1983) p. 3745.

**Rodríguez, N.**, Real, B.D., Cruz, M., Sarabia, L.A., Herrero, A. Usefulness of parallel factor analysis to handle the matrix effect in the fluorescence determination of tetracycline in whey milk. *Anal. Chim. Acta.* 632 (2009) p. 42.

**Rufino, J.N.**, Weinert, P.L., Pezza, H.R., Pezza, L. Flow-injection spectrophotometric determination of tetracycline and doxycycline in pharmaceutical formulations using chloramine-T as oxidizing agent. *Quím. Nova.* 32 (2009) p.7.

**Santos, S.M.**, Henriques, M., Duarte, A.C., Esteves, V.I. Development and application of a capillary electrophoresis based method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta.* 71 (2007) p. 731.

**Stephens, C.R.**, Beereboom, J.J., Rennhard, H.H. 6-Deoxytetracyclines. IV. Preparation, C-6 stereochemistry, and reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) p. 2643.

**Stephens, C.R.**, Conover, L.H., Hochstein, F.A. Terramycin. VIII. Structure of Aureomycin and Terramycin. *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) p. 4976.

**Vera-Candiotti, L.**, Olivieri, A.C., Goicoechea, H.C. Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. *Talanta.* 82 (2010) p. 213.

**Wen-Hsien, T.**, Tzou-Chi, H., Joh-Jong, H., Yi-Huu, H., Hung-Yi, C. Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *J. Chromatogr A.* 1216 (2009) p. 2263.

**Yi-Min, H.**, Jiunn-Liang, K., Chi-Chu, L. Determination of Tetracycline and Streptomycin in Mixed Fungicide Products by Capillary Zone Electrophoresis. *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) p. 1669.

**Ni, Y.,** Deng, N., Kokot, S. A simple kinetic spectrophotometric method for simultaneous determination of tetracyclines by use of chemometrics. *Anal. Methods.* 2 (2010) p.1302.

**Zhou, J.,** Xue, X., Li, Yi., Zhang, J., Chen, F., Wu, L., Chen, L., Zhao, J. Multiresidue determination of tetracycline antibiotics in propolis by using HPLC-UV detection with ultrasonic-assisted extraction and two-step solid phase extraction. *Food Chem.* 115 (2009) p. 1074.



*Conclusiones Generales*

### CONCLUSIONES GENERALES

La técnica MSPE propuesta ha demostrado ser una estrategia eficaz en la preconcentración de residuos de antibióticos en matrices complejas como la leche, el cual realiza la pre-concentración de los analitos de interés, seguido de su cuantificación mediante HPLC-DAD y CE.

Mediante el desarrollo de la MSPE se sintetizaron diferentes adsorbentes magnéticos de polaridad variable, funcionalizados con grupos fenilos a diferentes radios molares ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-fenil}$  modificada) así como un adsorbente de polaridad mixta ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-Fenil-C}_8$ ) en la preconcentración de residuos de sulfamidas, quinolonas y tetraciclinas en leche.

De acuerdo a los resultados obtenidos el pH es una variable determinante en la retención y extracción de los analitos de interés, siendo específico para cada familia de antimicrobianos, de igual manera la polaridad del adsorbente magnético resulta ser crítico en el proceso de pre-concentración debido a las interacciones entre cada analito y el adsorbente, determinando su afinidad y selectividad del adsorbente.

Los % de retención y los % de re-extracción obtenidos para cada una de las familias de estudio fueron elegidos con % mayores al XXX bajo las condiciones óptimas de cada sistema.

La técnica MSPE comparada con otras técnicas convencionales como SPE, demostró requerir de una menor manipulación de la muestra y por tanto disminuir los tiempos de análisis, bajo costo, adicionalmente, esta técnica proporciona buenos resultados en términos de sensibilidad y precisión, por lo que se le considera como una técnica de extracción confiable en su aplicación en muestras de leche real alcanzando niveles de concentración en el orden de trazas lo que lo hace adecuado en el análisis de residuos de antibióticos de acuerdo a las normativas internacionales.