



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS MULTIRESIDUO
DE ANTIBIÓTICOS EN PIENSOS MEDIANTE ELECTROFORESIS
CAPILAR

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN QUÍMICA

P R E S E N T A

Q. NANCY KAREN NIETO LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA

MINERAL DE LA REFORMA, HGO.

2018



Mineral de la Reforma, Hgo., a 12 de enero de 2018.

Número de control: ICBI-D/015/2018.

Asunto: Permiso de impresión de Tesis

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

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la candidata a Maestra en Química, **Q. Nancy Karen Nieto López**, quien presenta el trabajo "**Desarrollo de un método de análisis multiresiduo de antibióticos en piensos mediante electroforesis capilar**" después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido **autorizar la impresión** del mismo, una vez realizadas la correcciones que fueron acordadas.

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

PRESIDENTE: Dr. Julián Cruz Borbolla

SECRETARIO: Dra. María Elena Páez Hernández

VOCAL: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

SUPLENTE: Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

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

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"

Dr. Oscar Rodolfo Suárez Castillo
Director del ICBI



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
Colonia Carboneras
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts 2231, Fax 2109
direccion_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

Agradecimientos

A quienes me dieron dos grandes regalos: el primero, la vida y el segundo, la libertad para vivirla... quienes me hicieron aprender que el amor, el trabajo y el conocimiento deben de ser manantiales de mi existencia y el reflejo fiel del ejercicio de mi profesión, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida.

A quienes en mis momentos difíciles nunca claudicaron y siguieron fortaleciéndome hasta el último momento.

A quienes, con compromiso y entrega permanente estuvieron presentes en todo momento, que siempre me apoyaron, por su desinteresada ayuda, por echarme una mano cuando lo necesité. Gracias, no sólo por la ayuda brindada, sino por los buenos momentos en los que convivimos, las bromas y risas imparables, haciendo de mis días los mejores.

A quien me ha guiado en este complicado proceso, es cierto que no ha sido fácil, pero con su guía lo hemos logrado, gracias por su paciencia, su apoyo, cada llamada de atención, por la oportunidad de trabajar nuevamente en uno de sus proyectos, su amistad, por transmitirme un poco de sus conocimientos, gracias infinitas

A quienes me orientaron a lo largo de la realización de este proyecto, por brindarme su apoyo cada vez que lo necesité, por su tiempo dedicado y por su amistad.

A quienes directa o indirectamente han contribuido al cumplimiento de una de mis más importantes metas y porque han sido una fuente de estímulo y dedicación en esta etapa de preparación profesional.

... Mis papás, hermanos, abuelitos, Ale, Ray, Jessi, Benja, Richie, Edgar, Isa, Zita, César, José Luis, Lupita, Juan Francisco, Isa, Emma, Vicky, Jan, Dany, Erik, Abril, Dr. José Antonio, Dr. Israel, Dra. Elena, Dr. Julián, Dr. José Manuel, Dr. Alfredo.

“Ten menos curiosidad por la gente y más curiosidad por las ideas”.

-Marie Curie



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

La investigación se realizó gracias al financiamiento del proyecto PRODEP-PTC "Síntesis y aplicación de polímeros molecularmente impresos acoplados a sistemas de separación instrumentales en el análisis de residuos de iones metálicos y pesticidas en muestras de interés ambiental y alimenticio".

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

- XXX Congreso Nacional de Química Analítica (2017) con el trabajo "Evaluación de las condiciones de separación empleadas en el análisis de antibióticos mediante electroforesis capilar"
- 23rd Latin-American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical, and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis and Microchip Technology (LACE 2017) con el trabajo: "Determination of antibiotics in feedstuffs using fullerene as the pseudostationary phase in electrokinetic chromatography"

Índice

Lista de abreviaturas	i
Índice de figuras.....	II
Índice de tablas.....	IV
Resumen	V
1. ANTECEDENTES	2
1.1. Antibióticos en medicina veterinaria	2
1.1.1 Piensos medicados	6
1.2. Propiedades y características de los antibióticos	7
1.2.1. Quinolonas	7
1.2.2. Sulfonamidas.....	9
1.2.3. Tetraciclinas.....	11
1.3 Métodos de análisis de antibióticos.....	13
1.3.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución	13
1.3.2 Electroforesis capilar	15
1.3.2.1. Pseudofases estacionarias en electroforesis capilar.....	18
2. JUSTIFICACIÓN	22

3. OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo general.....	24
3.2 Objetivos específicos	24
4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	26
4.1. Reactivos y disoluciones.....	26
4.2. Análisis de muestras	27
4.2.1. Tratamiento de la muestra	27
4.2.2. Separación mediante MEKC.....	27
4.3. Interacción fulereno:antibiótico	28
4.3.1 UV/Vis	28
4.3.2 Método computacional	29
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
5.1. Optimización de la separación mediante electroforesis capilar.....	32
5.1.1. Estudio del efecto de pH de la disolución electrolito	32
5.1.2. Efecto de la concentración del electrolito	35
5.1.3 Efecto de la adición de disolvente orgánico en el electrolito	36
5.1.4. Efecto de la adición de un compuesto quiral al electrolito	37
5.1.5. Efecto de la adición de tensoactivos al electrolito	38
5.1.6 Efecto del voltaje en la separación de los analitos.	40
5.1.7. Efecto de la temperatura en la separación de los analitos	41

5.2. Cromatografía electrocinética micelar	43
5.2.1. Uso de fullereno como pseudofase estacionaria	43
5.2.2. Optimización de la composición del electrolito soporte	46
5.3. Interacción entre fullereno y los antibióticos.....	50
5.3.1 Determinación de la estequiometría de la interacción fullereno-antibiótico.....	50
5.3.2. Interacción fullereno-antibiótico. Método computacional. Teoría funcional de la densidad	51
5.4 Análisis de las muestras.....	56
5.4.1 Extracción de los antibióticos en muestras de piensos.....	56
5.5 Validación de metodología	57
5.5.1. Parámetros analíticos	57
5.5.2 Análisis de muestras de piensos.	60
6. CONCLUSIONES.....	62
7. BIBLIOGRAFÍA	64

Lista de abreviaturas

%RSD	Porcentaje de desviación estándar relativa
λ	Longitud de onda
CE	Electroforesis capilar
CP	Ciprofloxacino
CZE	Electroforesis capilar de zona
EI	Estándar Interno
FUL	Fulereo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
LOL	Intervalo lineal
LOQ	Límite de cuantificación
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
NOR	Norfloxacino
OTC	Oxitetraciclina
pKa	Constante de disociación ácida
PO ₄	Fosfatos
RSD	Desviación estándar relativa
SMX	Sulfametoxazol
T	Temperatura
T-80	Tween-80
TC	Tetraciclina
UA	Unidades arbitrarias
UV-Vis	Ultravioleta-visible
V	Voltaje

Índice de figuras

Figura 1. Estructura de algunas fluoroquinolonas	8
Figura 2. Quinolonas A. pH ácido, B. pH neutro y C. pH alcalino.....	9
Figura 3 Estructuras químicas de los derivados de sulfamidas.....	10
Figura 4. Estructura del sulfametoxazol.....	11
Figura 5. Oxitetraciclina A. pH ácido, B. pH neutro, C pH básico	13
Figura 6. Diagramas lineales de zonas de predominio de los antibióticos de interés.	33
Figura 7. Efecto de pH en la movilidad de los analitos, condiciones de CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): voltaje de separación (V) 14 kV, longitud de onda (λ): 214 nm; temperatura (T) 25°C.....	34
Figura 8. Efecto de la concentración del electrolito de fosfatos en la movilidad de los analitos. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: 14 kV, λ : 214 nm; T: 25°C.....	36
Figura 9. Electroferogramas obtenidos en el estudio de la separación de los analitos: a) disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ pH= 8.0, b) Disolución electrolito fosfatos 30 mmol L ⁻¹ con metanol 2.0 % v/v pH= 8.0 y c) Disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ con acetonitrilo 2.0 % v/v. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: 14 kV, λ : 214 nm; T: 25°C.....	37
Figura 10. Electroferogramas obtenidos del estudio de la adición de un selector quiral al electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ con: a) α -CD, pH= 8.0, b) β -CD, pH= 8.0 y c) γ -CD, pH=8.0. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: 14 kV, λ : 214 nm; T: 25°C.....	38
Figura 11. Electroferogramas obtenidos en el estudio de la separación de los analitos: a) disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ pH= 8.0, b) Disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ con SDS 10 mmol L ⁻¹ pH= 8.0 y c) Disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ con Tritón X-100 0.05 mmol L ⁻¹ pH=8.0. d) Disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ con T-80 0.1 mmol L ⁻¹ pH=8.0 Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: 14 kV, λ : 214 nm; T: 25°C.....	40
Figura 12. Efecto de voltaje en la separación de los analitos de interés, electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ . Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: 14 kV, λ : 214 nm; T: 25°C.....	41
Figura 13. Efecto de temperatura en la movilidad de los analitos, electrolito de fosfatos 30 mmol L ⁻¹ . Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: 14 kV, λ : 214 nm; T: 25°C.....	42

Figura 14 . Electroferogramas obtenidos del estudio de la adición de fullereno al electrolito de trabajo (30 mmol L ⁻¹ PO ₄ , pH 8.0) para la separación de los analitos de interés: a) 2 mg L ⁻¹ fullereno, b) 6 mg L ⁻¹ fullereno, c) 10 mg L ⁻¹ fullereno. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector); V: 14 kV, λ: 214 nm; T: 25°C.	44
Figura 15. Estudio de la adición de SDS a diferentes concentraciones para mejorar la solubilidad de los fullereno en el electrolito de fosfatos (30 mmol L ⁻¹ , pH=8.0) a) 10 mmol L ⁻¹ SDS, b) 20 mmol L ⁻¹ SDS, c) 30 mmol L ⁻¹ SDS y d) 40 mmol L ⁻¹ SDS. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector); V: 14 kV, λ: 214 nm; T: 25°C.	45
Figura 16. Estudio de la adición T-80 a diferentes concentraciones para mejorar la solubilidad de los fullereno en el electrolito de fosfatos (30 mmol L ⁻¹ , pH=8.0). a) 0.1 mmol L ⁻¹ , b) 0.3 mmol L ⁻¹ , c) 0.5 mmol L ⁻¹ y d) 0.7 mmol L ⁻¹ . Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector); V: 14 kV, λ: 214 nm; T: 25°C.	46
Figura 17. Efecto de los factores control en el número de platos teóricos. PO ₄ concentración de fosfato; T-80, concentración de Tween 80; concentración de fullereno.	48
Figura 18. Electroferogramas obtenidos del análisis multiresiduo de los analitos de interés. a) electrolito soporte (PO ₄ 20 mmol L ⁻¹ , T-80 0.05 mmol L ⁻¹ , pH 8.0), b) electrolito soporte (PO ₄ 30 mmol L ⁻¹ , T-80 0.05 mmol L ⁻¹ y fullereno 3 μmol L ⁻¹ , pH 8.0). Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector); V: 14 kV, λ: 214 nm; T: 25°C.	49
Figura 19. A) Espectro UV-vis de la valoración de una disolución de CP y FUL. B) gráfico de relaciones molares entre CP y FUL.	50
Figura 20. Geometrías más estables de las adsorciones de fullereno-antibióticos y sus puntos críticos de enlace y trayectorias de enlace de las interacciones intermoleculares de: a) CP, b) NOR, c) OTC, d) SMX, e) TC.	54
Figura 21. Electroferogramas obtenidos para la extracción de los analitos de interés. Disolventes: a) agua desionizada, b) mezcla metanol:agua (20:80 v/v) y c) metanol. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector); V: 14 kV, λ: 214 nm; T: 25°C.	57

Índice de tablas

Tabla 1. Usos de antibióticos en medicina veterinaria	3
Tabla 2. Antibióticos admitidos como aditivos en animales destinados al consumo humano	5
Tabla 3. Determinación de quinolonas, tetraciclinas y sulfamidas mediante HPLC	14
Tabla 4. Determinación de quinolonas, tetraciclinas y sulfamidas mediante electroforesis capilar	17
Tabla 5. Pseudofases estacionarias empleadas para la determinación de diversos analitos mediante electroforesis capilar	19
Tabla 6. Diseño de parámetros de Taguchi L ₉ (3 ³) con la variable optimizada (suma de los platos teóricos)	47
Tabla 7. Antibióticos y su respectiva estequiometría en la interacción con el fullereno y sus respectivos log β_3	51
Tabla 8. Parámetros topológicos de los BCPs intermoleculares de las adsorciones de fullereno-antibiótico calculadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G**. Todos los valores, excepto E _c , están en unidades atómicas (u.a.)	54
Tabla 9. Energías de adsorción y energías libres de adsorción de cada antibiótico calculado con el nivel de teoría B3LYP/6-31G**. ΔE es la energía de adsorción calculada a partir de energías electrónicas totales y ZPE es la corrección de la energía punto cero. Todos los valores se dan en kcal / mol	55
Tabla 10. Parámetros analíticos obtenidos del análisis de muestras dopadas de piensos	59

Resumen

Los antibióticos son utilizados en medicina veterinaria con dos fines, para el tratamiento de infecciones o como promotores de crecimiento. Estos pueden ser añadidos al pienso en dosis subterapéuticas para ser consumidos durante periodos relativamente prolongados. Este hecho requiere desarrollar un método eficaz para determinar simultáneamente estos compuestos en piensos.

La electroforesis capilar es una técnica de separación que permite el análisis de muestras complejas, sin embargo, el principal problema radica en la dificultad de separación de analitos similares y/o diferentes estructuralmente. Una alternativa que permite dar solución a este problema es el uso de formas alotrópicas de carbón como pseudofases estacionarias. El fulereno interactúa con compuestos aromáticos, pudiendo por tanto modificar la movilidad electroforética.

El presente trabajo está dividido en tres partes, la primera enfocada a la determinación de las condiciones de separación instrumentales y la evaluación de la interacción fulereno-antibiótico. En una segunda etapa se evalúan las condiciones de extracción de los analitos en muestras de pienso y posteriormente se realiza la validación de la metodología conforme a normativas internacionales. Por último, se presentan las conclusiones generales respecto al diseño de una metodología de análisis de multiresiduo de antibióticos (quinolonas, sulfamidas, tetraciclinas) en muestras de piensos mediante cromatografía electrocinética micelar basada en el uso de fulereno como pseudofase estacionaria.

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

A partir del uso de primer antibiótico sulfamídico en 1934 [1] se dio inicio a la era moderna de la terapéutica antimicrobiana, caracterizada por una disminución de la mortalidad asociada a diversas enfermedades infecciosas. La “Edad de Oro” de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina a gran escala y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos [2,3]. Estos compuestos constituyen uno de los agentes farmacológicos mal empleados, tanto a nivel médico como veterinario, siendo administrados en muchas ocasiones de forma irracional y en dosis inadecuadas.

El término “antibiótico” se refiere a compuestos químicos producidos por microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) o sintetizados en laboratorio, que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento o matar a la bacteria u otros microorganismos [4].

1.1. Antibióticos en medicina veterinaria

Los antibióticos se comenzaron a utilizar en medicina veterinaria poco después de su aplicación en medicina humana. Hoy en día, la gran variedad de antibióticos existentes permite el tratamiento de enfermedades infecciosas que afectan a animales que son destinados al consumo humano, ayudando a mantener la salud de la población.

En el ganado, el empleo de los antibióticos tienen fines diversos como se muestra en la Tabla 1.



Tabla 1 Usos de antibióticos en medicina veterinaria

Tipo de uso	Objetivo	Vía de administración
Terapéutico	Terapia	Inyección parenteral, alimentos, agua
Metafiláctico	Profilaxis, enfermedad, terapia	Inyección parenteral, alimentos, agua
Profiláctico	Prevención, enfermedad	Alimento
Subterapéutico	Promotor de crecimiento,	Alimento
	Eficacia alimentaria	Alimento
	Profilaxis enfermedad	Alimento

En la producción animal, los animales se pueden tratar individualmente, pero su tratamiento suele ser más eficaz si son tratados en grupos, medicándolos a través del alimento pienso o del agua. Para algunos animales, como las aves y peces, la medicación en masa es el único tratamiento factible. Ciertos procedimientos de medicación en masa, denominados metafiliaxis, tienen como objetivo tratar los animales enfermos y no enfermos, en la prevención de enfermedades. Otros tratamientos antimicrobianos profilácticos se usan durante el periodo de alto riesgo para una enfermedad infecciosa, por ejemplo, después del destete.

Un grupo amplio de antibióticos pueden formar parte de un pienso animal y pueden actuar con fines terapéutico, profiláctico y/o como promotores de crecimiento.



Desde el descubrimiento de que a bajas concentraciones de antibióticos mejora el índice de crecimiento en animales domésticos, en 1940, se han utilizado compuestos antibacterianos como promotores de crecimiento en la producción animal. En el año de 1950, Stokstad y Jukes, confirmaron que, en lechones y pollos, el crecimiento se promovía cuando el pienso se suplementaba con pequeñas cantidades de un antibiótico (clortetraciclina) [5].

Las primeras discusiones sobre el uso de los antibióticos como promotores del crecimiento tuvieron lugar en el Reino Unido en 1968 [6]; en este tiempo se percataron de que el uso de los antibióticos incrementaba la resistencia bacteriana de origen animal y humano, particularmente la resistencia de bacterias Gram-negativo (*Salmonella* spp. y *E. coli*).

A partir del año 1970, el uso de antibióticos utilizados como promotores de crecimiento, fue incrementando conforme aumentaba la producción animal. El uso de dosis subterapéuticas de antibióticos con estos fines en los piensos se hizo común y han formado una parte importante en las explotaciones ganaderas. Estos antibióticos comúnmente se adicionan en el pienso de pollos, pavos, cerdos y ganado vacuno, en concentraciones en el intervalo entre 2.5 y 125 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Las principales ventajas para los ganaderos que usan de forma regular los promotores de crecimiento incluyen beneficios económicos, mayor uniformidad de crecimiento, estabilización de la flora intestinal en los animales y mantenimiento de la salud en casos de estrés medioambiental.

Con el fin de evitar problemas de introducción de resistencias o de residuos en los alimentos, autoridades sanitarias de diversos países han establecido



antibióticos que pueden ser utilizados como aditivos en la alimentación animal (Tabla 2) [7,8].

Tabla 2. Antibióticos admitidos como aditivos en animales destinados al consumo humano

Antibiótico	Animal productor
Bacitracina de zinc	Aves, Cerdo, Cordero, Ternero
Espiramicina	Aves, Cerdo, Cordero, Ternero
Virginamicina	Aves, Cerdo, Cordero, Ganado vacuno, Ternero
Flavofosfolipol	Aves, Cerdo, Cordero, Ganado vacuno, Ternero
Fosfato de tiosina	Cerdo
Monesina sódica	Ganado vacuno
Sanilomicina sódica	Cerdo
Avilamicina	Aves, Cerdo

Existe la posibilidad de que residuos de antibióticos o sus metabolitos persistan en el animal y, por lo tanto, pasen a la cadena de alimentación humana, comportando una serie de riesgos que implican problemas de índole sanitaria como la toxicidad y aparición de resistencias. Los efectos tóxicos son poco probables, ya que los residuos estarán presentes en pequeñas cantidades, pero pueden producir reacciones alérgicas en individuos sensibles, desarrollo de resistencias bacterianas, que se pueden extender de unos microorganismos a otros pasando de los animales al hombre, ya que sus ecosistemas bacterianos no están separados.



1.1.1 Piensos medicados

De acuerdo con la Unión Europea, un pienso es cualquier sustancia o producto, incluidos los aditivos, destinado a la alimentación por vía oral de los animales, tanto si ha sido transformado entera o parcialmente como si no [9]. Los piensos contienen en su composición proteínas (17-20%), carbohidratos (5-10%), lípidos (2-4%) y fibras (4-6%) principalmente [10].

Un pienso medicado procede de mezclar un medicamento veterinario y el pienso previamente a su comercialización. Se administra a los animales sin transformación alguna, con fines terapéuticos y/o profilácticos en función de las propiedades del fármaco. Estos piensos contienen, en general, concentraciones relativamente elevadas de fármaco (del orden de 100 a 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$) y se administran durante periodos bastante cortos [11].

En la Directiva Europea 90/167/CEE [12], traspuesta a nuestra legislación mediante el Real Decreto 157/1999 [13], se establecen las condiciones de preparación, de puesta en el mercado y de utilización de los piensos medicados con el fin de garantizar un uso racional. En esta normativa, entre otros aspectos, exige que los piensos se elaboren con antibióticos autorizados, así como la adquisición de estos se efectúe bajo prescripción de un veterinario.

Dentro de los antibióticos más usados en la medicina veterinaria, con fines terapéuticos, así como promotores de crecimiento, son quinolonas (ciprofloxacino, norfloxacino), sulfamidas (sulfametoxazol), y tetraciclinas (oxitetraciclina y tetraciclina), cuyas características y propiedades se describen a continuación.



1.2. Propiedades y características de los antibióticos

1.2.1. Quinolonas

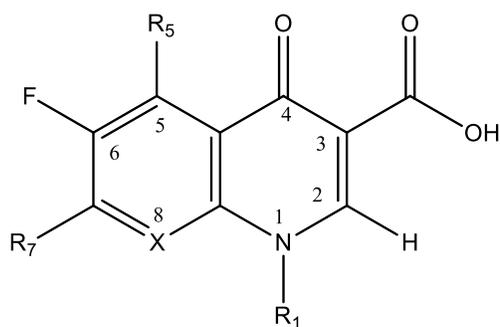
Las quinolonas son un grupo de agentes antimicrobianos sintéticos, que son usados tanto en la medicina humana como en la medicina veterinaria. Estructuralmente consisten de una parte constituida por un ácido 1-sustituido-1,4-dihidro-4-oxopiridin-3-carboxílico combinado con un anillo aromático o heteroaromático. En conjunto, podemos definir las como derivados de ácido 3-carboxílico-4-oxo de una naftiridina, quinolina, piridopirimidina o cinolina.

Durante los años ochenta, se introdujo un átomo de flúor a la quinolona, lo cual presentó mejoras tanto en actividad biológica como en propiedades farmacocinéticas (buena absorción oral), convirtiéndose estas quinolonas en un grupo de agentes antimicrobianos llamados fluoroquinolonas [14].

Las fluoroquinolonas son sustancias químicas que han recibido mucha atención de la industria farmacéutica desde hace varios años [15]. Algunas de éstas se han introducido recientemente a la práctica clínica, como son el ciprofloxacino, la enrofloxacin, el norfloxacino y la ofloxacina, puesto que son agentes de amplio espectro [16].

Como se observa en la Figura 1, las fluoroquinolonas que se utilizan en la práctica clínica contienen átomo de flúor en la posición seis de la quinolona. Actualmente la fluoroquinolona que más se utiliza en medicina veterinaria es el ciprofloxacino, siendo el norfloxacino su metabolito principal.





Nombre común	X	R ₁	R ₅	R ₇
Norfloxacinó	CH	Etilo	H	Piperazinil
Ciprofloxacino	CH	Ciclo propilo	H	Piperazinil

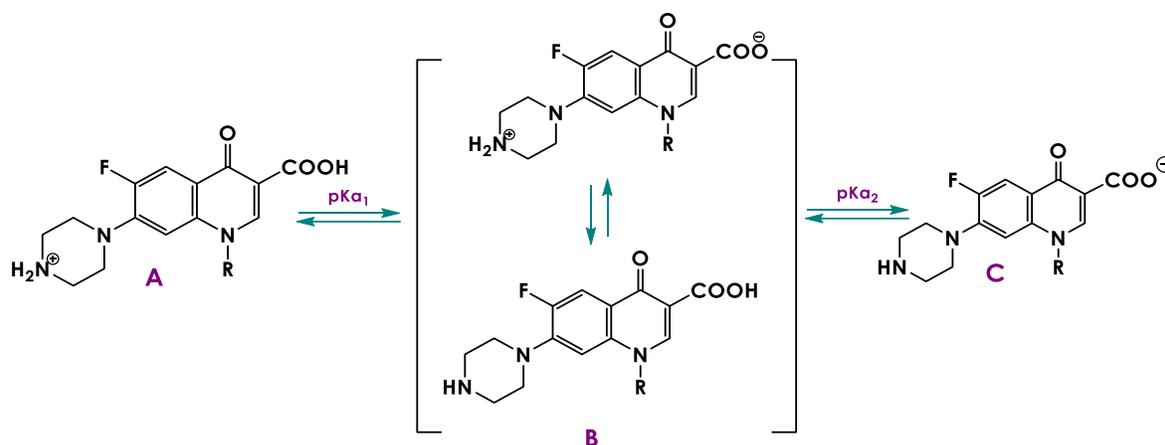
Figura 1. Estructura de algunas fluoroquinolonas

Tanto el ciprofloxacino (CP) o ácido 1-ciclopropil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-quinolin-3-carboxílico, como el norfloxacino (NOR) o ácido 1-etil-6-fluoro-4-oxo-7-(piperazin-1-il)-1,4-dihidroquinolina-3-carboxílico, son antimicrobianos cuya función es inhibir la replicación del ADN al unirse con la enzima ADN girasa. Tienen un amplio espectro bacteriano, ya que tienen actividad frente a los organismos Gram-positivos y gram-negativos (teniendo mayor actividad frente a estos últimos) tanto aeróbicas como anaeróbicas [17]. En medicina veterinaria, estos antimicrobianos, se utilizan para el tratamiento de pulmonía, infecciones urinarias e infecciones gastrointestinales [18].

CP y NOR son polvos cristalinos, de color amarillo pálido; con la presencia de dos sitios susceptibles a ser protonados en su estructura química, influyendo en su solubilidad [19,20]. La Figura 2, muestra la estructura general de las quinolonas, donde se observa que a pH ácido (A) se protona el grupo



amino, permitiendo en ambos casos presentar una razonable solubilidad en agua, a pH neutro (B) cercano a su punto isoeléctrico, la quinolona muestra dos estructuras en equilibrio, en forma de zwitterión y la forma no ionizada, que es la estructura mejor absorbida. Mientras que a pH alcalino (C), la quinolona se encuentra en forma de carboxilato.



Analito	R	pKa ₁	pKa ₂	Ref
CP	Ciclo propilo	5.9	8.9	[21]
NOR	Etilo	6.3	8.8	[21]

Figura 2. Quinolonas A. pH ácido, B. pH neutro y C. pH alcalino

1.2.2. Sulfonamidas

La familia de las sulfamidas, son de los primeros antibióticos utilizados tanto en la medicina humana como veterinaria, para el tratamiento de las infecciones bacterianas. En 1930, las sulfamidas se utilizaron como agentes quimioterapéuticos [22]. En 1934 Gerthard Domagk, demostró que el clorhidrato de 4-sulfamida-2',4'-diaminoazobenzol, ejercía una importante

acción destructiva sobre estreptococos, específicamente contra el hemolítico y estafilococos en tejidos animales en un plazo breve. En 1935 se realizaron diversas investigaciones que confirmaron la especificidad de 4-sulfamida-2',4'-diaminoazobenzol sobre enfermedades como neumonía, meningitis, gonorrea, infecciones urinarias, entre otras infecciones producidas por los estreptococos [23,24].

De acuerdo a la estructura química de las sulfamidas, existen numerosos compuestos derivados de las sustituciones de un átomo de hidrógeno en el nitrógeno del grupo anílico (N₁) y en el nitrógeno del grupo sulfamídico (N₂) o en ambos a la vez (Figura 3).

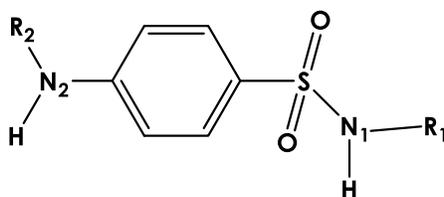


Figura 3 Estructuras químicas de los derivados de sulfamidas

Las sulfamidas en cuanto a su actividad antimicrobiana, son consideradas compuestos de amplio espectro de actividad, abarcan microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, aunque en la actualidad abundan cepas que han desarrollado mecanismos de resistencia como resultado de los más de cincuenta años de uso de estos compuestos.

Hoy en día la gran variedad de estos antibióticos, permiten el tratamiento de enfermedades infecciosas permitiendo mantener los niveles de salud. Sin embargo, el empleo de las sulfamidas además de sus propiedades profilácticas y terapéuticas, son implementados como promotores de

crecimiento en periodos de tiempo prolongados, en animales productores de alimentos, siendo el sulfametoxazol el más utilizado en medicina veterinaria.

El sulfametoxazol (SMX) o 4-amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) bencenosulfonamida, cuya estructura se muestra en la Figura 4, se presenta en forma de polvo cristalino de color blanco o amarillo, de sabor amargo, fácilmente soluble en disolventes polares como etanol, acetona e insoluble en disolventes no polares como cloroformo y dietiéter. Se disuelve en disoluciones diluidas de hidróxido de sodio. El grupo sulfonamido (SO_2NH_2) les otorga características ácidas [25]. La constante de acidez (pK_a) de sulfametoxazol es de 5.6 [26,27].

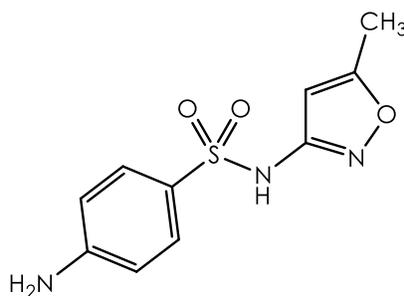


Figura 4. Estructura del sulfametoxazol

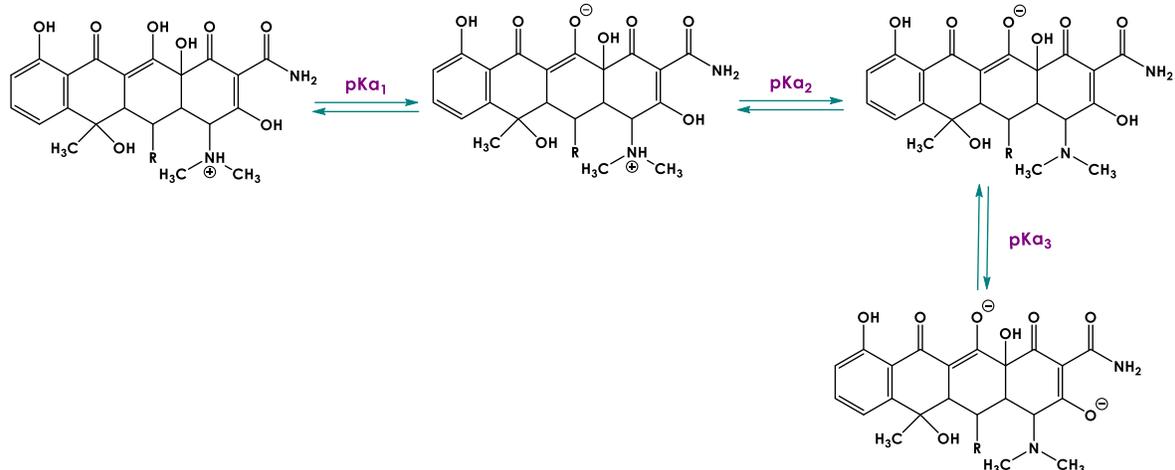
1.2.3. Tetraciclinas

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos ampliamente utilizados en medicina veterinaria, son generalmente antibióticos bacteriostáticos, aunque pueden tener acción bactericida a altas concentraciones o cuando se usan en contra de microorganismos susceptibles. Estos antibióticos, ejercen su acción mediante la inhibición de síntesis proteica

bacteriana. Actualmente se ha reducido su aplicación, sin embargo, se han encontrado concentraciones bajas de tetraciclina (TC) y oxitetraciclina (OTC) en alimentos de origen animal que pueden estar asociados a su aplicación en ganado [28,29]. Estos fármacos, en medicina veterinaria, se utilizan para prevenir o tratar mastitis o metitis [30]. Además, se utilizan con fines no terapéuticos: aumento de la velocidad de crecimiento de los animales de granja, conservación de alimentos, control microbiológico de fermentaciones, entre otros.

La OTC ó (4S,4aR,5S,5aR,6S,12aS)-4-(dimetilamino)-3,5,6,10,12,12a-hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidrotetraceno-2-carboxamida y la TC o también conocida como (4S,4aS,5aS,6S,12aS)-4-dimetilamino-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahidro-3,6,10,12,12a-pentahidroxi-6-metil-1,11-dioxonaftaceno-2-carboxamida, cuyas estructura se muestran en la figura 5, son polvos cristalinos de color amarillo solubles en disoluciones diluidas de ácidos o bases [31]. Los valores de las constantes de acidez de las tetraciclinas reportados se muestran en la figura 5. El pK_{a1} corresponde a la desprotonación del enol; el pK_{a2} es debido a la desprotonación del grupo dimetilamino y el pK_{a3} se deben al grupo OH del fenol [32].





Analito	R	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₃	Ref.
OTC	OH	3.3	7.3	9.1	[31]
TC	H	3.3	7.7	9.7	[31]

Figura 5 Oxitetraciclina A. pH ácido, B. pH neutro, C pH básico

1.3 Métodos de análisis de antibióticos

1.3.1 Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas con mayor aplicación y se considera un método de referencia para la determinación de residuos de antibióticos como las quinolonas, tetraciclinas y sulfamidias, sin embargo, la mayoría de los documentos reportados en la literatura se basa en el análisis de familias independientes.

Para el análisis de las familias de antibióticos de interés, la separación se realiza en fase inversa, empleando columnas C₁₈ o C₈; 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 inversa pueden originar señales cromatográficas con perfiles diferentes a la distribución normal [32,33].

Las fases móviles consisten principalmente en mezclas de disolventes como metanol, acetonitrilo y agua. El pH de las fases móviles se mantiene en un intervalo de 1-4 añadiendo ácido acético, fórmico, fosfórico u oxálico con el fin de reducir la ionización de los grupos silanol y minimizar de ese modo sus interacciones con los analitos. Para la detección se ha descrito el uso de la espectroscopía UV-Vis, fluorescencia (FL) y espectrometría de masas (MS). La Tabla 3 muestra ejemplos representativos del análisis de estas familias de antibióticos en muestras de alimentos de origen animal.

Tabla 3 Determinación de quinolonas, tetraciclinas y sulfamidas mediante HPLC

Familia de antibiótico	Muestra	Condiciones HPLC	Detector	Límite de detección	Ref.
Quinolonas	Leche	Columna: C ₁₈ FM: ácido fórmico-acetonitrilo Régimen: isocrático	FL	0.05-0.1 ng g ⁻¹	[34]
	Leche	Columna: C ₁₈ FM: ácido cítrico-acetonitrilo Régimen: gradiente	FL	0.4-6 µg Kg ⁻¹	[35]
	Carne de cerdo, huevo	Columna: C ₁₈ FM: ácido oxálico-acetonitrilo Régimen: gradiente	FL	0.1-5.0 µg Kg ⁻¹	[36]
	Carne de res y borrego	Columna: C ₁₈ FM: ácido fórmico-acetonitrilo Régimen: gradiente	MS	0.1 - 20.0 µg Kg ⁻¹	[37]
Sulfonamidas		Columna: C ₁₈	Uv-Vis		[38]



	Carne de pollo y cerdo	FM: ácido acético-acetonitrilo Régimen: gradiente		0.20 - 0.72 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	
	Huevo	Columna: C ₁₈ FM: ácido acético-acetonitrilo Régimen: gradiente	Uv-Vis	4.1 - 25.6 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	[39]
	Leche	Columna: C ₁₈ FM: ácido acético-acetonitrilo Régimen: gradiente	Uv-Vis	0.6 - 2.8 $\mu\text{g L}^{-1}$	[40]
	Carne de pollo	Columna: C ₁₈ FM: ácido oxálico-acetonitrilo Régimen: gradiente	MS	0.75-1.45 ng mL^{-1}	[41]
Tetraciclinas	Carne de cerdo, pollo y res	Columna: C ₁₈ FM: ácido oxálico-acetonitrilo Régimen: gradiente	MS	5.0 - 10.0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	[42]
	Pollo	Columna: C ₁₈ FM: ácido oxálico-acetonitrilo Régimen: gradiente	Uv-Vis	4.4- 12.0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$	[43]
	Huevo y carne de cerdo	Columna: C ₁₈ FM: ácido trifluoroacético-acetonitrilo Régimen: gradiente	Uv-Vis	20 - 40 ng g^{-1}	[44]

1.3.2 Electroforesis capilar

En años recientes, la electroforesis capilar (EC) se ha convertido en otra técnica de amplio uso en la determinación de antibióticos, debido a que presenta ventajas con respecto a técnicas como la HPLC, como su simplicidad operacional, versatilidad, capacidad en la separación de una gran variedad de especies, junto con el hecho de que se requiere un volumen pequeño de muestra. Por lo anterior, se genera una pequeña cantidad de residuos, lo que la caracteriza como una técnica ambientalmente amigable, así mismo que cuenta con diversas modalidades de separación que se ajustan a las necesidades del analista.



La electroforesis capilar se considera como una técnica de separación, la cual se define 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.

Se han desarrollado diferentes modalidades de separación en electroforesis capilar debido a la necesidad de optimizar las separaciones, con la ventaja de que se pueden realizar usando el mismo equipo. Entre las modalidades de separación encontramos a la electroforesis capilar de zona (CZE) y la cromatografía electrocinética micelar (MEKC).

La electroforesis capilar de zona es la más utilizada como modo de separación debido a que es la forma más simple de la EC porque el capilar es llenado sólo con un electrolito soporte y la migración de los analitos se da en zonas discretas y a diferentes velocidades. La separación de mezclas con analitos aniónicos y catiónicos es posible debido a la influencia del flujo electroosmótico (FEO). Los analitos neutros no migran por sí solos, pero son movidos por el FEO.

La cromatografía capilar electrocinética micelar fue introducida por Terabe y colaboradores [45], donde describen una modificación de la electroforesis que permite la separación de fenoles y nitrocompuestos aromáticos de bajo peso molecular por la adición de tensoactivos al electrolito soporte, en concentraciones tales que forman micelas, las cuales ayudan a la separación de especies neutras. Las micelas son esencialmente esféricas,



con los extremos hidrofóbicos orientados hacia el centro para evitar la interacción con el centro hidrofílico.

Se han reportado diversas metodologías para la determinación de familias independientes de los antibióticos de estudio, las cuales se presentan en la Tabla 4. La mayoría emplea electrolitos de trabajo de valor de $\text{pH} > 7.0$, el cual garantiza la formación de los analitos en su forma aniónica, empleando voltajes de separación en el intervalo de 14 a 30 kV y como detectores UV-Vis, electroquimioluminiscencia y espectroscopia de masas.

Tabla 4 Determinación de quinolonas, tetraciclinas y sulfamidias mediante electroforesis capilar

Familia de antibiótico	Muestra	Composición de electrolito	Voltaje de separación (kV)	pH	Modalidad de separación	Ref
Quinolonas	Leche	Citratos 24 mmol L ⁻¹ , y sulfato de sodio 10 mmol L ⁻¹	14	6.1	CZE	[46]
	Carne de pollo, leche, carne de cerdo	Fosfatos 30 mmol L ⁻¹	25	8.0	CZE	[47]
	Carne de pollo	Fosfatos 40 mmol L ⁻¹	16	8.5	CZE	[48]
	Leche	Boratos 10 mmol L ⁻¹ – SDS 20 mmol L ⁻¹ - 7.2 mg L ⁻¹ puntos cuánticos	20	8.8	MEKC	[49]
	Leche	Boratos 20 mmol L ⁻¹ -SDS 80 mmol L ⁻¹	14	9.6	MEKC	[50]
Tetraciclinas	Agua	Fosfatos 20 mmol L ⁻¹ - β -CD 20 mmol L ⁻¹	15	7.2	MEKC	[51]
	Leche	Fosfatos 27 mmol L ⁻¹ -Boratos 43 mmol L ⁻¹	18	8.0	CZE	[52]



	Leche	Boratos 20 mmol L ⁻¹	30	9.5	CZE	[53]
	Carne de pollo	Fosfatos 30 mmol L ⁻¹ , EDTA 2 mmol L ⁻¹ y 2.5 % 2-propanol	14	12.0	CZE	[27]
Sulfamidas	Leche	Fosfatos 30 mmol L ⁻¹	15	7.0	CZE	[54]
	Carne de pollo y leche	Boratos 5 mmol L ⁻¹	30	7.5	CZE	[55]
	Agua	Fosfatos 5 mmol L ⁻¹	25	7.3	CZE	[56,57]
	Leche	Fosfatos 20 mmol L ⁻¹ - SDS 40 mmol L ⁻¹	15	7.5	MEKC	[58]

1.3.2.1. Pseudofases estacionarias en electroforesis capilar

En los últimos años existe una tendencia creciente a desarrollar métodos multiresiduos que abarquen más de dos familias de antibióticos, sin embargo, el principal problema radica en que la separación de residuos de diferentes familias de antibióticos es compleja debido a la diferencia y/o similitud estructural de los compuestos.

Una alternativa para mejorar la separación en electroforesis capilar es el uso de pseudofases estacionarias (PSP), que involucra el uso de tensoactivos, polímeros molecularmente impresos, nanoesferas de oro o nanoestructuras de carbono. En la Tabla 5 se muestra las pseudofases estacionarias utilizadas en electroforesis capilar, así como los analitos determinados con el uso de estas PSP.



Tabla 5. Pseudofases estacionarias empleadas para la determinación de diversos analitos mediante electroforesis capilar

Pseudofase estacionaria	Analito	Referencia
Tensoactivos	Derivados quirales dinaftil	[59]
	β -bloqueadores	[60,61]
Nanopartículas de sílica	Ácidos aromáticos	[62]
	Compuestos aromáticos policíclicos	[63]
Nanopartículas de oro	Fragmentos de ADN	[64,65]
	Compuestos aromáticos policíclicos (tioures, naftaleno, bifenil)	[66]
Puntos cuánticos	Pesticidas (tiamethoxam, acetamiprid y imidacloprid)	[67]
	Pesticidas organofosforados (mevinphos, phosaline, methidathion, diazinon)	[68]
Nanopartículas poliméricas	Separación enantiómerica de efedrinas	[69]
	Aminas	[70]
Nanotubos de carbono	Antibióticos de uso veterinario (ciprofloxacino, enrofloxacino, florfenicol y cloranfenicol)	[71]
	Compuestos fenólicos	[72]
Fulereo	Antibióticos β -lactámicos (amoxicilina, penicilina G, oxacilina y cloxacilina)	[73]
	Antiinflamatorios no esteroideos (ibuprofeno, ketoprofeno, flurbiprofeno y fenbufeno)	[74]

En relación con las nanopartículas empleadas como PSP, el fulereo C_{60} es una nanoestructura de carbono que presenta aromaticidad capaz de interactuar con sus paredes por medio de interacciones π - π con compuestos aromáticos, como antibióticos β -lactámicos y anfenicoles. Su



uso como PSP en electroforesis capilar ha sido descrita para mejorar la resolución en la separación de moléculas, sin embargo, la principal dificultad del uso del fullereno como pseudofase estacionaria es su baja solubilidad en agua.

Las estrategias empleadas para solubilizar los fullereno implica una inversión de fases, una disolución saturada de fullereno en tolueno se pone en contacto agua, formándose dos fases líquidas. La mezcla se coloca en baño de ultrasonido hasta evaporar el tolueno, en este momento se produce la inversión de fases y tornándose la fase acuosa de coloración amarilla. Otra estrategia para disolver los fullereno en medio acuoso es el uso de tensoactivos aniónicos como SDS [75] y neutros como el Triton X-100 y el Tween 80 (T-80) [76].

El presente proyecto propone diseñar un método de separación mediante cromatografía electrocinética micelar, utilizando fullereno como pseudofase estacionaria para analizar CP, NOR, OTC, SMX y TC.



JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

En México se ha detectado la presencia de residuos como los medicamentos veterinarios, que se administran para el control de infecciones y los promotores de crecimiento. Así, el ciprofloxacino, norfloxacino, sulfametoxazol, tetraciclina y oxitetraciclina son antibióticos que pueden ser administrados en animales.

Para asegurar la inocuidad y la calidad de los alimentos de origen animal que se consumen dentro del país, la SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), a través del Servicio Nacional Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), ha establecido límites máximos de residuos. Debido a lo anterior, es necesario elaborar una técnica analítica que permita su detección y cuantificación. Las características físicas y químicas de las moléculas como los antibióticos antes mencionados, permiten proponer una metodología de análisis basada en el uso de electroforesis capilar que permita determinar residuos de antibióticos en muestras de interés en el sector ganadero.



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Desarrollar un método de análisis de multiresiduo de antibióticos mediante electroforesis capilar para su aplicación en muestras del sector ganadero.

3.2 Objetivos específicos

- ❖ Determinar las condiciones de separación instrumentales en electroforesis capilar para la mezcla de ciprofloxacino, norfloxacino, tetraciclina, oxitetraciclina y sulfametoxazol.
- ❖ Evaluar técnicas de extracción de los antibióticos de interés en muestras de piensos mediante el uso de extracción sólido-líquido.
- ❖ Validar el método para su aplicación en muestras de pienso, conforme a normas internacionales.



METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos y disoluciones

El acetonitrilo (99.5%), ácido pícrico (98%), α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, ciprofloxacino (CP) (98%), fosfato de sodio (99%), hidróxido de sodio (97%), norfloxacino (NOR) (98%), oxitetraciclina dihidratada (OTC) (95%), sulfametoxazol (SMX) (98%), tetraborato de sodio, tetraciclina hidroclicorada (TC) (95%) y Tritón X-100 fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El metanol y Tween-80 (T-80) se adquirieron de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA).

Las soluciones se prepararon disolviendo los respectivos reactivos de grado analítico en agua desionizada con resistividad de 18.2 $M\Omega\text{cm}$, obtenidas del sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA). Las soluciones estándar de ácido pícrico, CP, NOR, TC, OTC y SMX se prepararon a una concentración de 500 mg L⁻¹. El CP se disolvió en 0.5 ml de NaOH 0.01 mol L⁻¹ y posteriormente se aforó a 5 mL con agua desionizada. Las soluciones se mantuvieron en refrigeración (4°C) después de cada uso para evitar su posible descomposición; estas soluciones son renovadas cada 3 días. El ácido pícrico se utilizó como estándar interno (EI). Las disoluciones de trabajo se prepararon diariamente mediante la dilución de las soluciones estándar con agua desionizada.



4.2. Análisis de muestras

4.2.1. Tratamiento de la muestra

Se pesó 1.0 g de muestra de pienso (previamente pulverizado), se adicionaron 5.0 mL de metanol y se homogenizó por 15 min con ultrasonido. Posteriormente se centrifugó a 3000 rpm min⁻¹ por 10 min, reservando la fase líquida para su evaporación a sequedad en corriente de aire. El residuo se reconstituyó con 1.0 mL de electrolito soporte en ultrasonido por 5 min. La mezcla se filtró (nylon 0.2 µm) analizando la fase líquida mediante MEKC.

4.2.2. Separación mediante MEKC

Los análisis se realizaron en un equipo Beckman Coulter P/ACE 5500, con un detector de arreglo de diodos. Los datos obtenidos fueron adquiridos y analizados mediante el software P/ACE MDQ versión 2.3. La separación de los antibióticos se llevó a cabo en un capilar de sílice fundida (30 cm x 75 µm D.I), detectando la señal a una longitud de onda (λ) de 214 nm. Las muestras se inyectaron hidrodinámicamente bajo una presión de 0.5 psi por 5 segundos. El capilar se mantuvo a una temperatura de 25°C, se aplicó un voltaje de 14 kV para separar a los analitos. Las diferentes relaciones de áreas (analito o estándar interno) se utilizaron para la cuantificación de los antibióticos. Las diferentes señales se identificaron por los tiempos de migración de los analitos, en conjunto con el espectro UV.

El capilar se activó mediante el paso de NaOH 1 mol L⁻¹ a 25°C durante 15 min, seguido por NaOH 0.1 mol L⁻¹ a 25°C por 10 min, agua desionizada a



25°C por 10 min y finalmente el electrolito soporte a 25 °C durante 10 min. El capilar se lavó entre cada análisis haciéndole pasar: NaOH 1 mol L⁻¹ por 4 minutos, NaOH 0.1 mol L⁻¹ por 2 minutos, agua desionizada por 2 minutos y electrolito soporte por 4 minutos. Los lavados se realizaron a una presión de 20 psi.

Para el electrolito soporte, se preparó de manera inicial una disolución de fulereno 27.7 μmol L⁻¹, disolviendo en un tubo de vidrio 5.0 mg de fulereno en 1.0 mL de tolueno; posteriormente se adicionaron 25.0 mL de agua desionizada. La inversión de fases se produjo colocando el tubo de vidrio en un baño de ultrasonido en tres intervalos de 30 minutos para evaporar completamente el tolueno, hasta producirse la inversión de fases, obteniéndose una dispersión acuosa color amarillo.

Como electrolito soporte se preparó una disolución que contiene 30 mmol L⁻¹ de fosfatos (PO₄), 0.01 mmol L⁻¹ de T-80 y 3 μmol L⁻¹ de fulereno ajustando el valor de pH a 8.0.

4.3. Interacción fulereno:antibiótico

4.3.1 UV/Vis

Los análisis se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo lambda 40, acoplado a una celda de cuarzo de 2 mL de volumen interno y 1 cm de paso óptico. Se realizó una valoración espectrofotométrica en la cual a una disolución de antibiótico (1x10⁻⁵ mol L⁻¹) se le adicionaron alícuotas de 300 μL de una disolución de fulereno (2.78x10⁻⁵ mol L⁻¹). La



mezcla de fullereno-antibiótico se vertió en la celda de cuarzo y se obtuvieron los espectros UV en el rango de 240-320 nm, de cada una de las adiciones realizadas. Ambas soluciones se prepararon utilizando una disolución de PO_4 (30 mmol L^{-1}) y T-80 (0.05 mmol L^{-1}) a $\text{pH} = 8.0$.

4.3.2 Método computacional

Los estudios teóricos se realizaron para evaluar las posibles interacciones entre las moléculas de los antibióticos (CP, NOR, OTC, SMX and TC) y el fullereno como PSP. Inicialmente, se realizó la búsqueda estocástica de los conformeros de mínima energía de cada antibiótico adsorbido en la superficie del fullereno utilizando simulaciones de dinámica molecular. Analizada la superficie de energía potencial (PES) se seleccionaron los puntos que presentaron la menor energía relativa, ya que éstos representan aquellas estructuras cercanas a los mínimos locales. Posteriormente, las estructuras seleccionadas fueron optimizadas y se identificó al mínimo global comparando las energías relativas, realizando además análisis de frecuencias. Se realizaron las simulaciones de dinámica molecular para cada sistema antibiótico-fullereno a temperaturas constantes de 600, 900 y 1200 K con el software DFTB+ [77]. El tiempo total de la simulación fue de 40 ps con un paso de 2 fs, manteniendo la temperatura constante con el termostato de cadena de Nose-Hoover. Se calcularon las fuerzas de las dinámicas moleculares con el Funcional de Densidad basado en la aproximación del enlace fuerte con carga autoconsistente (DFTB) utilizando el conjunto de parámetros 3ob de Slater-Köster [78].



Se optimizaron las configuraciones más favorables de las trayectorias de cada interacción antibiótico-fulereno con la Teoría de los Funcionales de la Densidad (DFT) con el nivel de teoría B3LYP/6-31G** utilizando el software Gaussian 09 RevC.01 [79]. Posterior a su optimización, se hizo el cálculo de frecuencias de todos los sistemas para confirmar los mínimos, correspondiente a cero frecuencias imaginarias (NIMAG = 0). Se realizó el análisis termodinámico de las energías de enlace, todos los datos fueron corregidos con la energía de punto cero (ZPE). Para explorar la naturaleza de las interacciones se realizó el análisis de la densidad electrónica con el programa MultiWFN [80,81], graficando los puntos críticos de enlace (BCPs) y las trayectorias de enlace con Wolfram Mathematica.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Optimización de la separación mediante electroforesis capilar

5.1.1. Estudio del efecto de pH de la disolución electrolito

Los analitos de interés tienen diferentes valores de pK_a , lo cual permite realizar el estudio de la separación de estos a diferentes valores de pH. A continuación, en la Figura 6 se presentan algunos diagramas lineales de zonas de predominio representativos de cada una de las familias de los antibióticos de interés, elaborados de acuerdo a los valores de pK_a que se presentaron en los apartados 1.2.1 quinolonas, 1.2.2 sulfamidas y 1.2.3 tetraciclinas.

Como se puede observar a valores de pH mayores de 6.0 la sulfamida y a pH mayores a 7.0 las tetracilinas y a pH mayores de 8.0 las quinolonas se encuentran en forma aniónica, motivo por el cual se eligió realizar el estudio de la separación de los antibióticos en el intervalo de pH 7.0-10.0, para asegurar que la mayoría de los antibióticos se encuentren en forma aniónica.



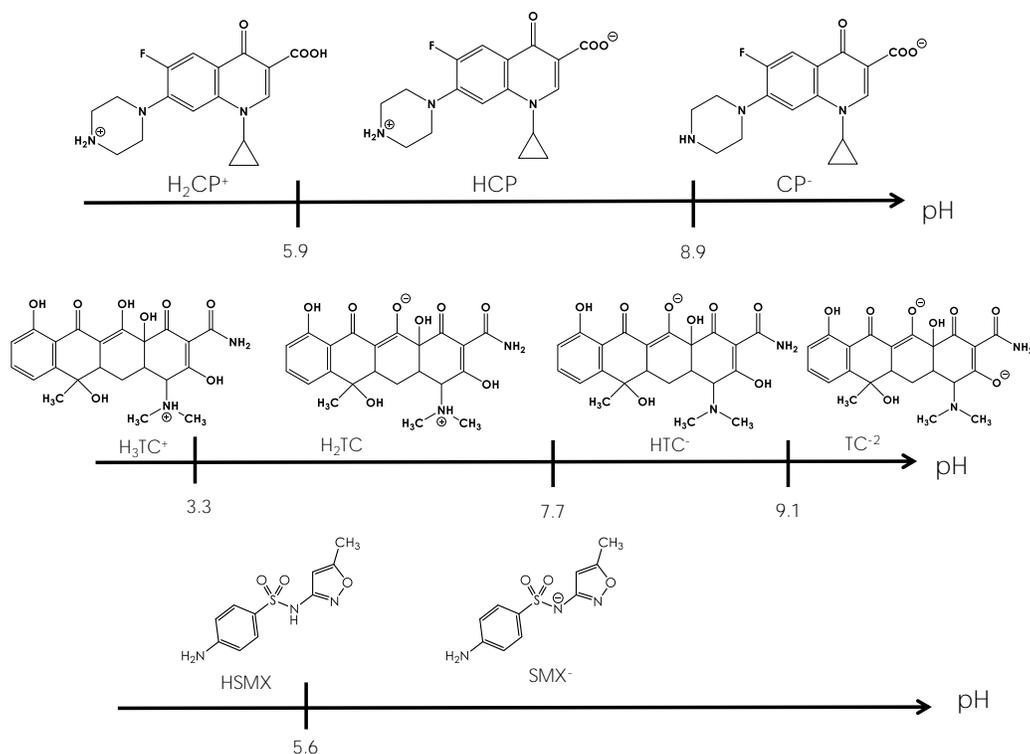


Figura 6. Diagramas lineales de zonas de predominio de los antibióticos de interés.

La selección de electrolito para la separación de los analitos, es una de las etapas básicas en esta técnica debido a que la sensibilidad del flujo electroosmótico al pH, requiere que la solución electrolito mantenga un pH constante. Un electrolito de trabajo empleado en electroforesis debe tener una buena capacidad de amortiguamiento en el intervalo de trabajo, una baja absorbancia en la longitud de onda empleada en la detección y debe tener una concentración iónica que permita la movilidad de los analitos.

El efecto del pH del electrolito de trabajo se estudió mediante las moviidades electroforéticas de los analitos. Dichos valores se obtuvieron a partir de los tiempos de migración de cada analito en una disolución que contenía 50 mg L^{-1} de cada antibiótico y el estándar interno. Los métodos de separación de quinolonas, sulfamidas y tetraciclinas, utilizan electrolitos

soporte de fosfatos y boratos a pH mayores a 6.0, por lo cual, para este estudio, se utilizaron disoluciones de fosfato (30 mmol L⁻¹, pH 7.0-8.0) y borato (30 mmol L⁻¹, pH 9.0-10.0).

El efecto de este parámetro en la movilidad de los analitos de interés se muestra en la Figura 7, en donde se puede observar que las movilidades electroforéticas del ciprofloxacino y el norfloxacino son iguales para todos los valores de pH estudiados debido a que tienen relación carga/masa semejante. Así mismo se puede observar que la separación se mejora a un pH= 8.0 por lo cual este valor de pH se seleccionó para experimentos posteriores. Estos resultados concuerdan con los trabajos descritos en la literatura en la separación de tetraciclinas y sulfamidas mediante electroforesis capilar donde se usan valores de pH mayores a 6.0 [52, 82]

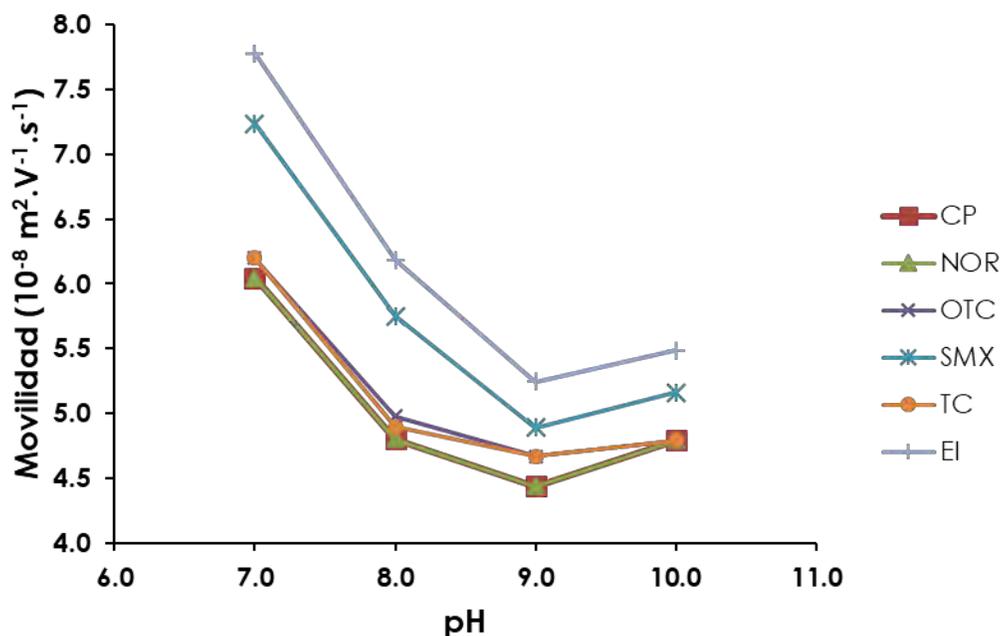


Figura 7. Efecto de pH en la movilidad de los analitos, condiciones de CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al

detector): voltaje de separación (V) 14 kV, longitud de onda (λ): 214 nm;
temperatura (T) 25°C.

5.1.2. Efecto de la concentración del electrolito

Una vez elegido el pH de trabajo, se llevó a cabo el estudio del efecto de la concentración del electrolito de trabajo en las movilidades de los analitos bajo las mismas condiciones que se describieron en el apartado anterior. El intervalo de concentración de electrolito seleccionado (20-50 mmol L⁻¹) es el más empleado en estudios de separación de quinolonas, sulfamidas y tetraciclinas mediante electroforesis capilar (tabla 4).

Al aumentar la fuerza iónica aumenta la viscosidad de la disolución y como consecuencia se reduce la velocidad de migración de los analitos.

En la Figura 8, se observa este efecto al utilizar una concentración >30 mmol L⁻¹. Se seleccionó la concentración de 30 mmol L⁻¹ debido a que se observa una buena separación de los analitos, sin embargo, aún no se observa el número de señales deseadas en los electroferogramas obtenidos.

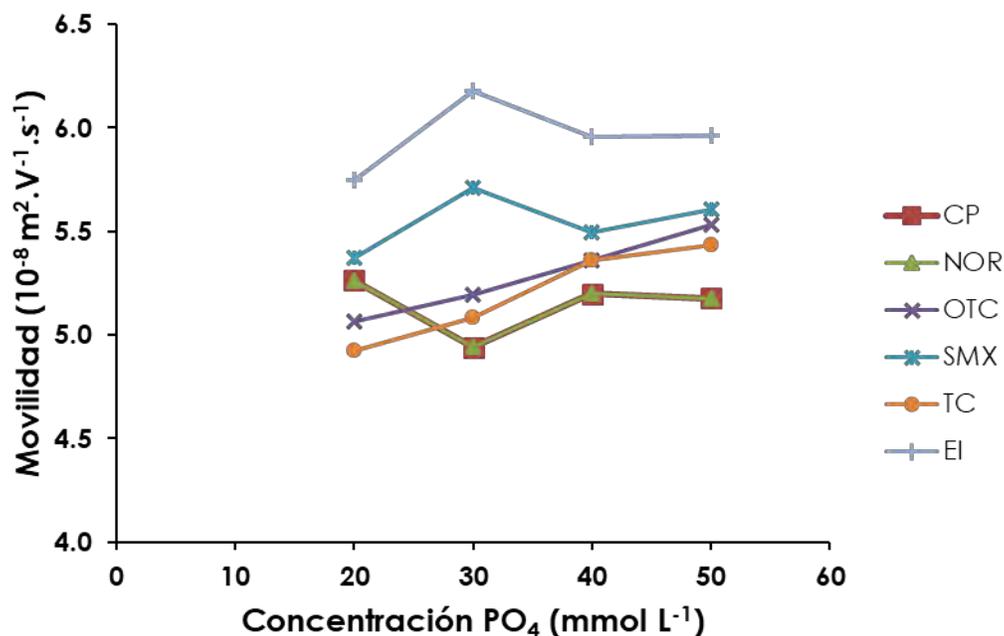


Figura 8. Efecto de la concentración del electrolito de fosfatos en la movilidad de los analitos. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, λ : **214 nm**; T: 25°C.

5.1.3 Efecto de la adición de disolvente orgánico en el electrolito

La adición de disolventes orgánicos juega un papel importante en la solubilidad de los analitos. Los disolventes más utilizados son el metanol y el acetonitrilo que se adicionan en concentraciones no mayores al 5.0% (v:v). Sin embargo, el adicionar compuestos orgánicos a la disolución electrolito no generó un cambio significativo en las señales obtenidas como se observan en los electroferogramas (Figura 9) ya que la señal de CP y NOR aún no se logran resolver. Por lo cual no se utilizaron en análisis posteriores.

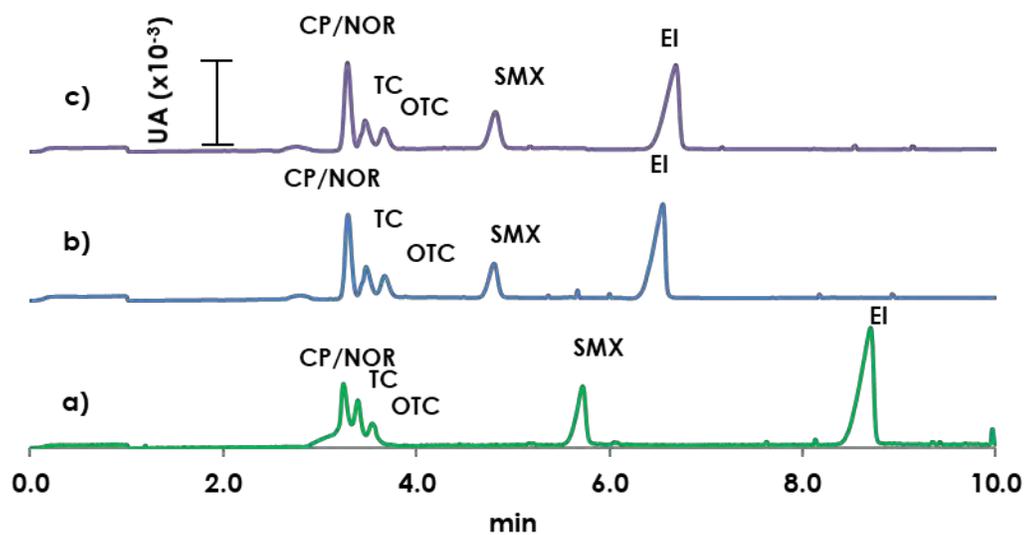


Figura 9. Electroferogramas obtenidos en el estudio de la separación de los analitos: a) disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹ pH= 8.0, b) Disolución electrolito fosfatos 30 mmol L⁻¹ con metanol 2.0 % v/v pH= 8.0 y c) Disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹ con acetonitrilo 2.0 % v/v. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, λ: **214 nm**; T: **25°C**.

5.1.4. Efecto de la adición de un compuesto quiral al electrolito

Las ciclodextrinas son compuestos utilizados como selectores quirales para separar compuestos ópticos, de posición y de estructura. Estos son polisacáridos, neutros y naturales, que contienen 6, 7 u 8 unidades de (+)-glucosa y son llamadas α, β y γ ciclodextrina (CD). La forma de estos compuestos es una cavidad hidrófoba con una superficie externa hidrofílica.

En los electroferogramas obtenidos del estudio de la adición de selector quiral (α, β y γ CD), Figura 10, se observan cinco señales, no lográndose el

número de señales esperadas. Por esta razón también se descartó la adición de un selector quiral al electrolito de trabajo, debido a que no se logran resolver las señales.

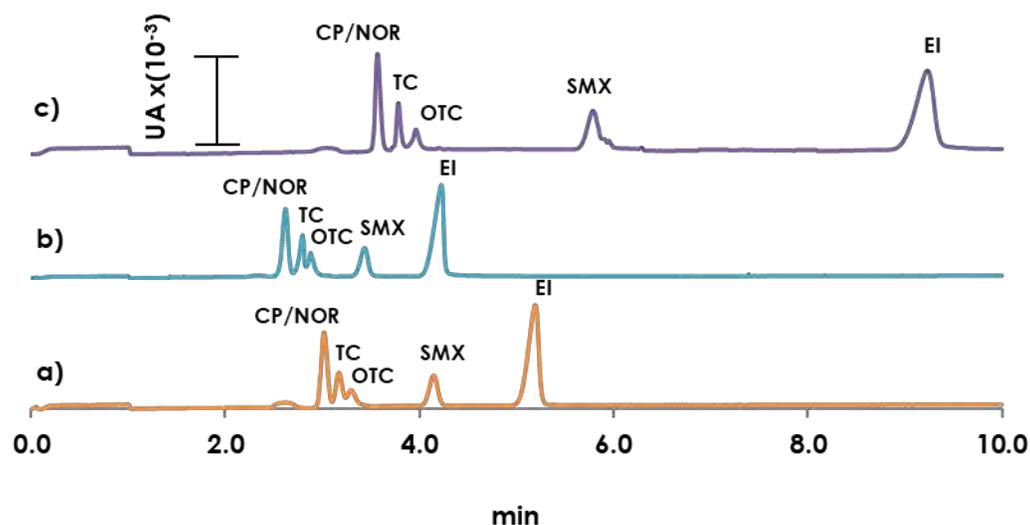


Figura 10. Electroferogramas obtenidos del estudio de la adición de un selector quiral al electrolito de fosfatos 30 mmol L^{-1} con: a) α -CD, pH= 8.0, b) β -CD, pH= 8.0 y c) γ -CD, pH=8.0. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud ($75 \mu\text{m}$ de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: 14 kV, λ : 214 nm; T: 25°C.

5.1.5. Efecto de la adición de tensoactivos al electrolito

Los tensoactivos actúan como agente de solubilización de analitos hidrófobos a través de la formación de micelas, como formadores de pares iónicos o como modificadores de pared en la electroforesis capilar.

Se llevó a cabo el estudio de la adición de tensoactivos como dodecilsulfato de sodio (10 - 30 mmol L^{-1}), Tritón X-100 (0.03 , 0.05 y 0.08 mmol L^{-1}) y Tween 80 (0.1 , 0.3 , 0.5 , 0.7 mmol L^{-1}), al electrolito de trabajo (fosfatos 30 mmol L^{-1} , pH

8.0). En los electroferogramas obtenidos (Figura 11) se puede observar que el adicionar tensoactivos no mejoró la separación de las señales.

En la Figura 11.a se muestra el electroferograma obtenido del electrolito de fosfatos 30 mmol L^{-1} , el seleccionado en estudios anteriores; el electroferograma obtenido de la adición de SDS al electrolito de soporte se observa en la Figura 11.b, donde se observa que en estos dos electroferogramas no se obtienen las señales esperadas, por lo cual se descartaron el uso de los electrolitos de fosfatos y fosfatos-SDS 10 mmol L^{-1} .

Cuando se adiciona Tritón x-100 a una concentración de 0.05 mmol L^{-1} , se observó la presencia de seis señales (Figura 11.c), sin embargo, al realizar la identificación de estas al adicionar solución estándar de los analitos, se observó que la presencia de la sexta señal se debe al Tritón X-100 el cual contiene en su estructura un anillo bencénico que absorbe a la misma longitud de onda que los analitos. Por otra parte, se realizó el estudio de la adición de Tween 80 (T-80) a una concentración de 0.01 mmol L^{-1} , debido a que este compuesto no presenta grupos aromáticos que puedan interferir en la detección de los analitos, como en el caso del Tritón X-100, al adicionar este tensoactivo, se observa la presencia de seis señales, poco resueltas, correspondientes a los antibióticos de interés (Figura 11.d)



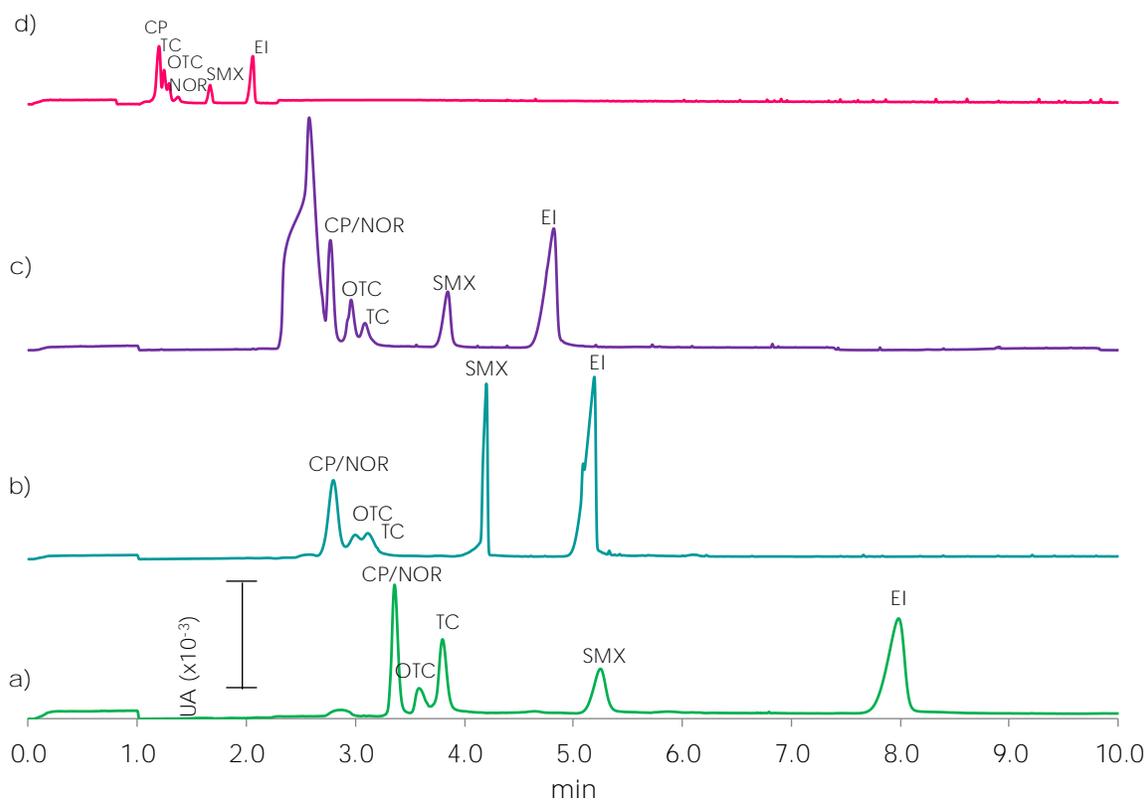


Figura 11. Electroferogramas obtenidos en el estudio de la separación de los analitos: a) disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹ pH= 8.0, b) Disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹ con SDS 10 mmol L⁻¹ pH= 8.0 y c) Disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹ con Tritón X-100 0.05 mmol L⁻¹ pH=8.0. d) Disolución electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹ con Tween-80 0.1 mmol L⁻¹ pH=8.0. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 µm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, **λ: 214 nm**; T: 25°C.

5.1.6 Efecto del voltaje en la separación de los analitos.

Una vez obtenidas las condiciones del electrolito de trabajo, se realizó el estudio del efecto del voltaje para la separación de los antibióticos, ya que este regula la corriente y, por lo tanto, la velocidad de migración.

Los valores de las movilidades electroforéticas se obtuvieron a partir de los tiempos de migración de cada analito en una disolución que contenía 50 mg L⁻¹ de cada antibiótico y el estándar interno. En la Figura 12 se puede observar que al aumentar el voltaje la velocidad de migración disminuye. Sin embargo, la resolución de las señales mejora con un voltaje de 14 kV, motivo por el cual se seleccionó este valor para llevar a cabo la separación de los antibióticos.

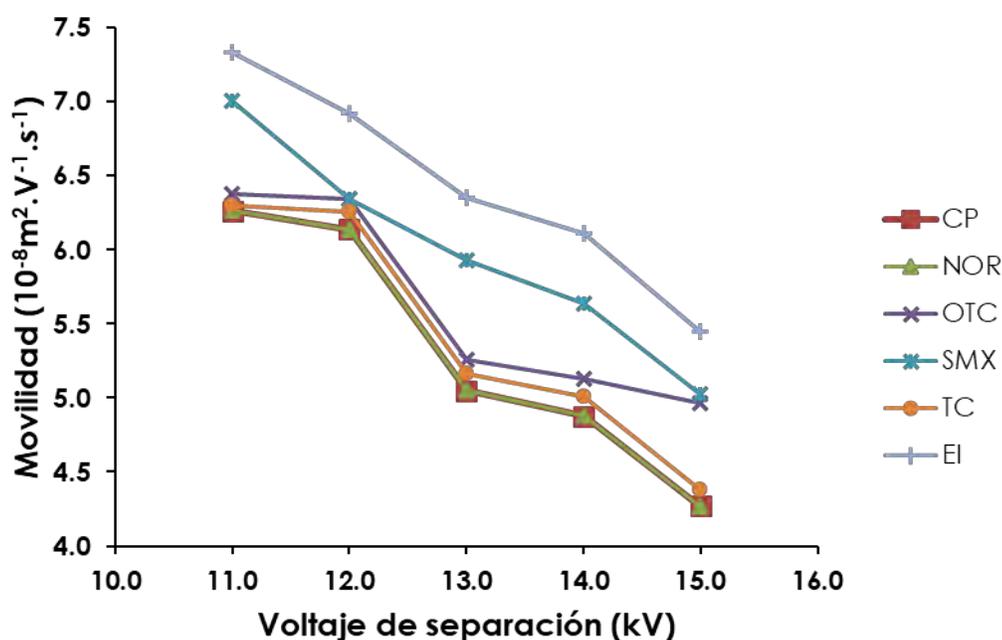


Figura 12. Efecto de voltaje en la separación de los analitos de interés, electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μ m de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: 14 kV, λ : 214 nm; T: 25°C.

5.1.7. Efecto de la temperatura en la separación de los analitos

Una vez realizados los estudios de los efectos de pH, concentración del electrolito, adición de compuesto orgánico, tensoactivo o selector quiral al



electrolito de trabajo, se llevó a cabo el estudio del efecto de la temperatura en las movilidades de los analitos, las cuales se obtuvieron a partir de los tiempos de migración de cada analito en una disolución que contenía 50 mg L⁻¹ de cada antibiótico y el estándar interno. Como se observa en la Figura 13, al aumentar la temperatura las movilidades de los analitos son iguales, por lo que se elige mantener la temperatura de separación en 25 °C.

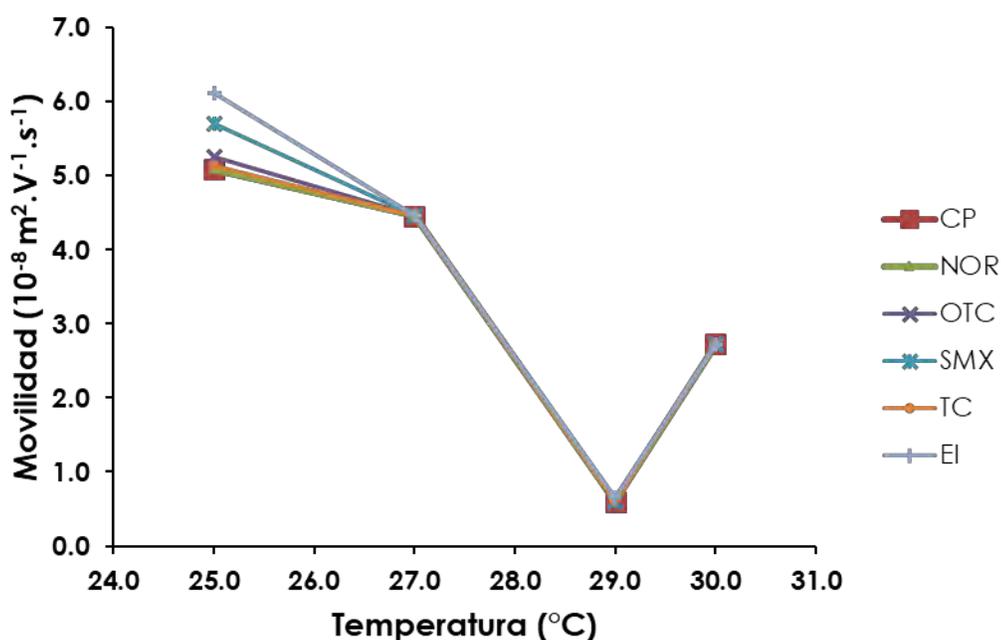


Figura 13. Efecto de temperatura en la movilidad de los analitos, electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 µm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, λ: **214 nm**; T: **25°C**.

5.2. Cromatografía electrocinética micelar

5.2.1. Uso de fullereno como pseudofase estacionaria

Como alternativa para la mejorar la resolución de las señales en electroforesis capilar, se ha llevado el estudio de pseudofases estacionarias (PSP), seleccionándose el uso de fullereno (FUL), ya que este compuesto ha sido utilizado para la mejora de resolución en antibióticos. El fullereno es un compuesto aromático que puede interactuar con antibióticos de interés y así mejorar la movilidad de los analitos [83].

En una primera etapa se realizó el estudio de la separación utilizando fullereno como PSP, en la cual se añadieron diferentes concentraciones de fullereno (2.0-10.0 mg L⁻¹) al electrolito soporte de fosfatos (30 mmol L⁻¹, pH 8.0), donde se observó que no se mejoró la resolución de las señales (Figura 14), debido a que al aumentar la concentración de fullereno al electrolito, no se observó el número de señales deseadas, lo anterior se debe a la baja solubilidad del fullereno en medio acuoso, afectando la detección de los analitos. Sin embargo, para seguir con el estudio del uso del fullereno como pseudofase estacionaria, se seleccionó una concentración de 2.0 mg L⁻¹ debido a que observamos un mayor número de señales (Figura 11.a) en comparación con las demás concentraciones añadidas de este compuesto (Figura 11.b y 11.c).



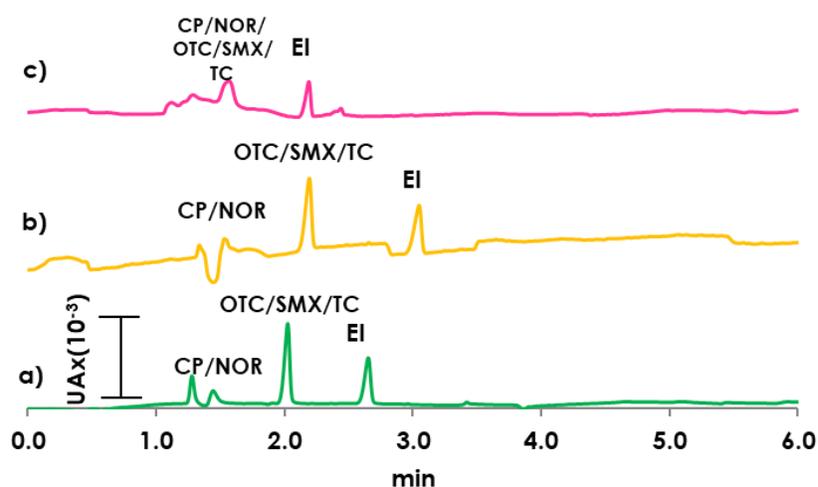


Figura 14 . Electroferogramas obtenidos del estudio de la adición de fulereno al electrolito de trabajo ($30 \text{ mmol L}^{-1} \text{ PO}_4$, pH 8.0) para la separación de los analitos de interés: a) 2 mg L^{-1} fulereno, b) 6 mg L^{-1} fulereno, c) 10 mg L^{-1} fulereno.

Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud ($75 \mu\text{m}$ de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, λ : **214 nm**; T: **25°C**.

Para resolver el problema de la baja solubilidad del fulereno en medio acuoso, se probó la adición de tensoactivo. En una primera evaluación, se realizó el estudio adicionando SDS ya que se han encontrado estudios en la literatura que demuestran que la adición de éste tensoactivo mejora la resolución de las señales de compuestos β -lactámicos [75]. Se probaron diferentes concentraciones de SDS ($10, 20, 30, 40 \text{ mmol L}^{-1}$) sin embargo no mejoró en la solubilidad del fulereno, ni tampoco en la separación de los antibióticos (Figura 15).

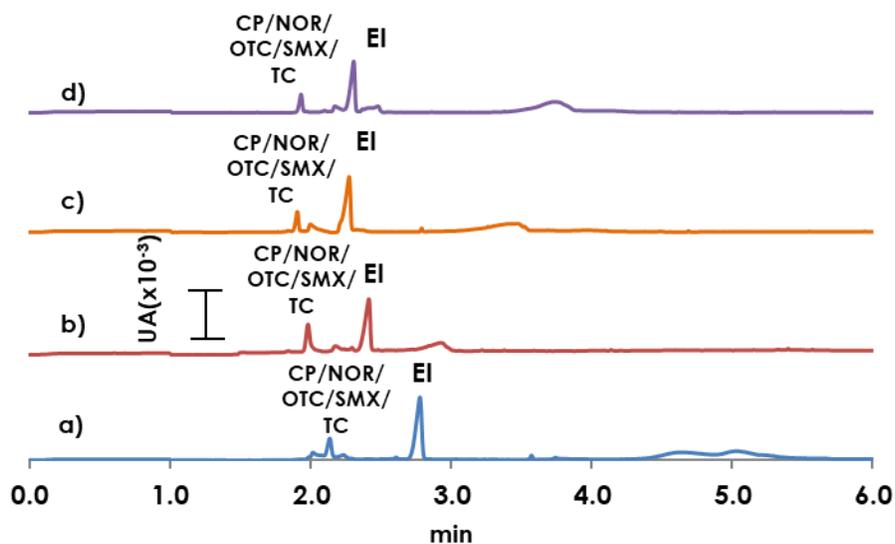


Figura 15. Estudio de la adición de SDS a diferentes concentraciones para mejorar la solubilidad de los fullereno en el electrolito de fosfatos (30 mmol L^{-1} , $\text{pH}=8.0$) a) 10 mmol L^{-1} SDS, b) 20 mmol L^{-1} SDS, c) 30 mmol L^{-1} SDS y d) 40 mmol L^{-1} SDS. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud ($75 \mu\text{m}$ de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, λ : **214 nm**; T: **25°C**.

De manera adicional, se realizó el estudio de la adición de T-80 a diferentes concentraciones (0.1 , 0.5 , 0.7 mmol L^{-1}), observándose la presencia de las seis señales (Figura 16). Esto nos indica que el T-80 mejora la solubilidad del fullereno, así mismo la mezcla de fullereno-T-80 mejora la resolución de las señales. Se han realizado estudios de la solubilidad del fullereno y se ha descrito que en medios acuosos es mejor utilizando un tensoactivo neutro como el T-80 [76]. Además, es posible observar que existe una relación estrecha en la concentración de los componentes del electrolito soporte, por lo cual debe ser optimizado.

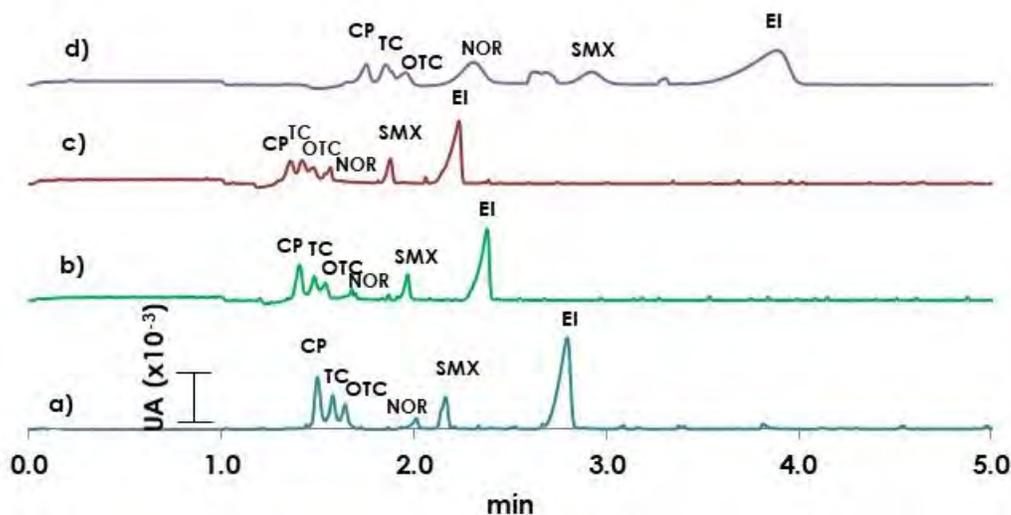


Figura 16 Estudio de la adición T-80 a diferentes concentraciones para mejorar la solubilidad de los fulereno en el electrolito de fosfatos (30 mmol L^{-1} , $\text{pH}=8.0$). a) 0.1 mmol L^{-1} , b) 0.3 mmol L^{-1} , c) 0.5 mmol L^{-1} y d) 0.7 mmol L^{-1} . Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud ($75 \mu\text{m}$ de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, λ : **214 nm**; T: **25°C**.

5.2.2. Optimización de la composición del electrolito soporte

Como ya se mencionó, la composición del electrolito de trabajo resulta crítico en la separación de los analitos de interés, por lo que se realizó una optimización robusta empleando un diseño de parámetros de Taguchi L_9 (3^3), que involucra la evaluación de tres variables de control a tres niveles. Se seleccionaron como variables de control las concentraciones de fosfato (PO_4), T-80 y fulereno. La variable a optimizar es la sumatoria de platos teóricos (N), la cual debe ser máxima. La Tabla 6, muestra la matriz de diseño de experimentos utilizada durante la optimización. El voltaje de separación (14 kV), longitud de onda (214 nm) y la temperatura (25 °C) fueron constantes en todos los experimentos.

Tabla 6. Diseño de parámetros de Taguchi L_9 (3^3) con la variable optimizada (suma de los platos teóricos)

Experimento	[PO ₄] ['] mmol L ⁻¹	[T-80] mmol L ⁻¹	[Fulereno] μmol L ⁻¹	Respuesta (N)
1	20	0.05	0	63957
2	20	0.10	3	24488
3	20	0.15	6	37972
4	30	0.05	3	183704
5	30	0.10	6	108921
6	30	0.15	0	38186
7	40	0.05	6	90350
8	40	0.10	0	45297
9	40	0.15	3	86840

El análisis de varianza de la Tabla 6 demuestra que las variables de control son significantes ($p > 0.05$) con contribuciones a la respuesta de 39.4, 36.4 y 21.3% para la concentración de PO₄['], T-80 y fulereno, respectivamente. El error residual tiene una contribución de 2.9%, lo que indica que se llevó a cabo una correcta selección de los niveles de las variables evaluadas en el diseño de experimentos.

En la Figura 17 se muestran los efectos de las variables de control en la variable de respuesta (N), en donde se seleccionaron como óptimos los valores máximos de cada una de las variables obtenidas. A partir del gráfico de medias, se seleccionaron como la composición más adecuada del electrolito de trabajo 30 mmol L⁻¹ PO₄['], 0.05 mmol L⁻¹ Tween 80 y 2 μmol L⁻¹ fulereno.



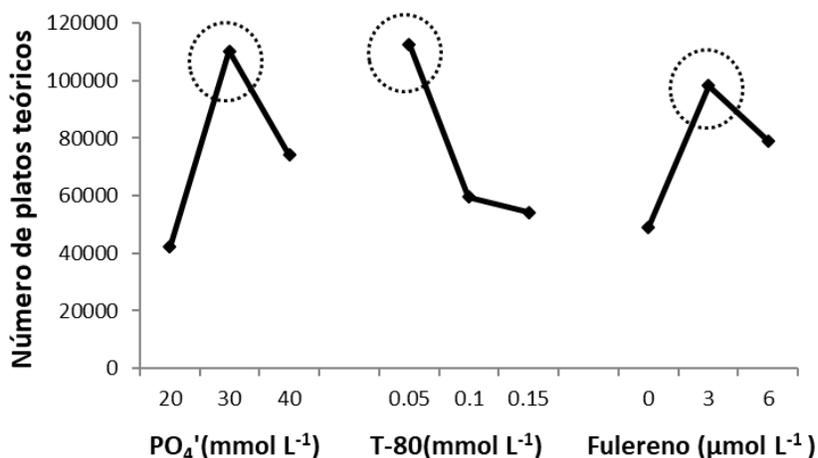


Figura 17. Efecto de los factores control en el número de platos teóricos. PO₄ concentración de fosfato; T-80, concentración de Tween 80; concentración de fullereno

La concentración de los componentes en el electrolito soporte es importante ya que tiene una relación entre la conductividad y la viscosidad. En el caso de la conductividad, si el electrolito tiene una baja concentración, este no conduce y por lo tanto los analitos no se separan. Por otro lado, al aumentar la concentración del electrolito, aumenta la viscosidad y por lo tanto la movilidad de los analitos disminuye. Además, la adición de T-80 a una baja concentración en el electrolito de separación mejora la solubilidad del fullereno en medio acuoso [76].

Adicionalmente, la presencia de fullereno en el electrolito soporte modifica las movilidades de los analitos, esto mejora la resolución de las señales de CP y NOR, sin embargo, al tener concentraciones de fullereno mayores a 6 μmol L⁻¹, este compuesto precipita afectando la detección de las señales.

En la Figura 18 muestra el electroferograma obtenido sin la adición de fulereno al electrolito soporte (Experimento 1, tabla 6), en el que se observa que las quinolonas (CP y NOR) no se separan a estas condiciones. Por otro lado, en la figura 18 (experimento 4, tabla 6) se observa la mejora de la resolución de los analitos al adicionar fulereno al electrolito soporte. Además, hay una disminución en el tiempo de análisis (de 8 a 6 min) cuando el fulereno es adicionado como PSP debido a que hay un aumento en el tamaño del compuesto debido a las interacciones del fulereno y los antibióticos [84]. Un comportamiento similar se observó al analizar antibióticos β -lactámicos con fulereno-dodecilsulfato de sodio como PSP [76].

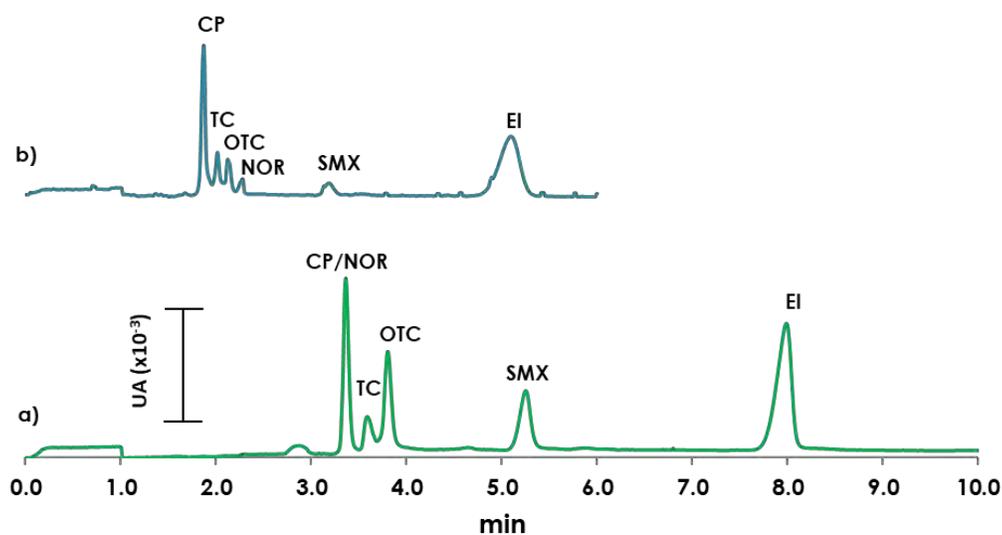


Figura 18. Electroferogramas obtenidos del análisis multiresiduo de los analitos de interés. a) electrolito soporte (PO_4 20 mmol L^{-1} , T-80 0.05 mmol L^{-1} , pH 8.0), b) electrolito soporte (PO_4 30 mmol L^{-1} , T-80 0.05 mmol L^{-1} y fulereno 3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, pH 8.0). Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, λ : **214 nm**; T: **25°C**.

5.3. Interacción entre fullereno y los antibióticos

5.3.1 Determinación de la estequiometría de la interacción fullereno-antibiótico

Se realizó una valoración espectrofotométrica en la que a una disolución de antibiótico (CP, NOR, OTC, SMX y TC) 1×10^{-5} mol L⁻¹, se le adicionaron alícuotas de 300 μ L de fullereno 2.78×10^{-5} mol L⁻¹, y se obtuvieron los respectivos espectros de UV-Vis (Figura 19.A) en el que se puede ver un efecto batocrómico debido al aumento de la concentración de fullereno, así mismo el comportamiento hipsocrómico evidencia la formación de la interacción entre el fullereno y las moléculas de antibióticos.

En la Figura 19 se muestran los espectros de CP y Ful debido a que los espectros de los demás antibióticos presentan el mismo comportamiento. Un comportamiento similar se observó en estudios de interacciones de fullereno con azul de metileno [85], dioxorubicin [86] y proflavina [87].

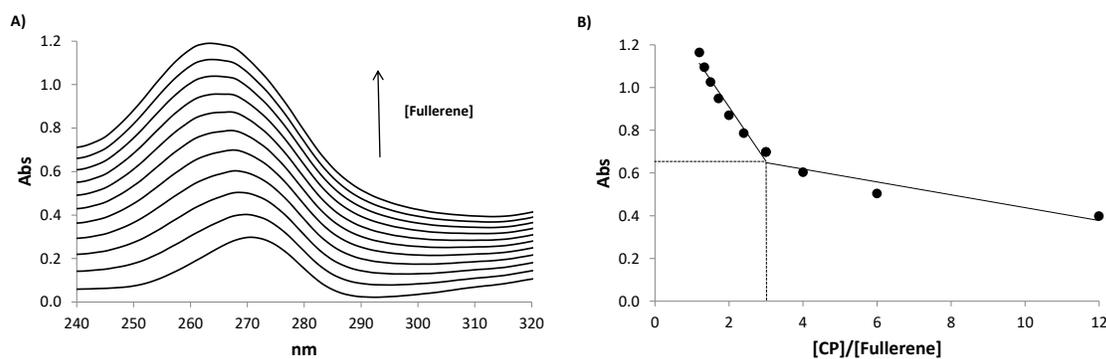


Figura 19. A) Espectro UV-vis de la valoración de una disolución de CP y FUL. B) gráfico de relaciones molares entre CP y FUL



Una vez obtenido los espectros UV-Vis de los antibióticos se realizó un gráfico de relaciones molares (Figura 19.B) para encontrar la estequiometría de la interacción, encontrándose una estequiometría de 3:1 (antibiótico:ful) en todos los casos. Por medio del método de variaciones continuas se calculó el $\log \beta_3$ de la interacción entre el antibiótico y el fullereno, las cuales se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Antibióticos y su respectiva estequiometría en la interacción con el fullereno y sus respectivos $\log \beta_3$

Antibiótico	Estequiometría (Ant:Ful)	Log β_3
CP	3:1	17.80 \pm 0.03
NOR	3:1	17.32 \pm 0.04
OTC	3:1	18.24 \pm 0.03
SMX	3:1	16.78 \pm 0.05
TC	3:1	17.17 \pm 0.04

5.3.2. Interacción fullereno-antibiótico. Método computacional. Teoría funcional de la densidad

En la figura 20 se muestran las configuraciones de adsorción más estables de cada antibiótico absorbidas en la superficie del fullereno obtenidas del método descrito en el apartado de detalles computacionales. Así mismo, se



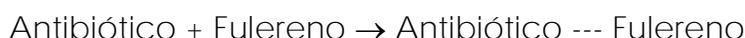
muestran los puntos críticos y trayectorias de enlace de las interacciones moleculares calculadas a partir de la densidad electrónica correspondiente. La presencia de trayectorias de enlace entre los átomos de hidrógeno y fullereno, son indicativos de las interacciones Van der Waals, como se ve en los cinco antibióticos (4a-4e). En el caso de la TC, una trayectoria de enlace entre el carbón aromático del antibiótico y el fullereno, indica la presencia de una interacción π (4e).

En la tabla 2 se presentan los parámetros topológicos de la densidad electrónica calculados de cada punto crítico de enlace. Estos parámetros incluyen la densidad electrónica (ρ), el laplaciano de la densidad electrónica ($\nabla^2 \rho$), la densidad de energía cinética (G), la densidad de energía potencial (V), la densidad de energía total (H) y la energía de contacto (E_c).

Todos los BCPs que se muestran en la Tabla 8, exhiben valores muy bajos de densidad electrónica $\rho \approx 0.002 - 0.004$ y valores positivos de $\nabla^2 \rho \approx 0.01 - 0.02$, que de acuerdo a la teoría AIM [88, 89] son características de las interacciones de capa cerrada. Se puede obtener información adicional de la naturaleza de la interacción a partir de la relación $-G/V$ que ha sido propuesto como un indicador auxiliar de la naturaleza del enlace en un determinado punto crítico [90-92]. Los valores que se encuentran debajo de 0.5 son interacciones covalentes, mientras que si tienen valores entre 0.5 y 1.0 indica que presenta un carácter electrostático parcialmente covalente y los valores mayores de 1.0 son indicativos de interacciones electrostáticas. En este sentido, de acuerdo con la Tabla 8, todas las interacciones antibiótico-fullereno intermoleculares tienen relaciones $-G/V$ mayores a la unidad, lo que indica la presencia de enlaces de hidrógeno débiles [91].



Por otro lado, se calcularon la energía termodinámica de adsorción (ΔE), la energía punto cero (ZPE) y la energía libre de Gibbs (ΔG) a partir de la siguiente ecuación química:



Además, la energía de interacción entre los antibióticos y el fulereo puede estimarse a partir de la suma de las energías de contacto E_c asociadas a cada BCP. Los valores resultantes de ΣE_c , ΔE , $\Delta E + \text{ZPE}$ y ΔG se reportan en la Tabla 9 para cada antibiótico. Es importante mencionar que ΣE_c se correlaciona con la termodinámica de la energía de absorción ΔE . Los valores negativos de las energías de adsorción nos indican que la adsorción es espontánea a 0K. Sin embargo, la energía libre de Gibbs ΔG la cual incluye la energía de punto cero, entropía y otras correcciones de temperatura se obtuvieron con valores positivos, mostrando que la adsorción de los antibióticos en el fulereo es un fenómeno reversible. Las diferentes magnitudes de energía de adsorción nos indican que las interacciones formadas entre el fulereo y los antibióticos producen una diferencia de migración de los analitos, permitiendo su separación mediante MEKC.

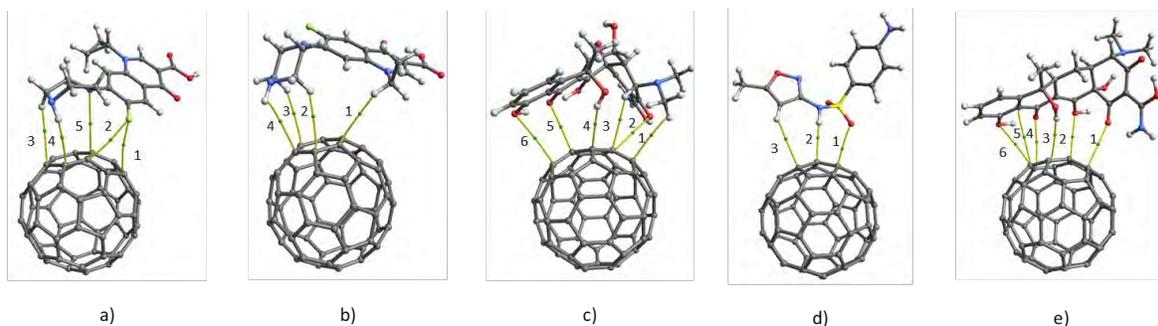


Figura 20. Geometrías más estables de las adsorciones de fullereno-antibióticos y sus puntos críticos de enlace y trayectorias de enlace de las interacciones intermoleculares de: a) CP, b) NOR, c) OTC, d) SMX, e) TC

Tabla 8. Parámetros topológicos de los BCPs intermoleculares de las asociaciones de fullereno-antibiótico calculadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G**. Todos los valores, excepto E_c , están en unidades atómicas (u.a.)

Antibiótico	BCPs	ρ (u.a.)	$\nabla^2\rho$ (u.a.)	G (u.a.)	V (u.a.)	H (u.a.)	ϵ (u.a.)	E_c (kcal/mol)
CP	1	0.00431	0.02020	0.00389	-0.00272	0.00116	5.55420	-0.85465
	2	0.00437	0.02046	0.00393	-0.00275	0.00118	3.57220	-0.86211
	3	0.00217	0.00639	0.00121	-0.00082	0.00039	0.85285	-0.25748
	4	0.00565	0.01664	0.00328	-0.00239	0.00088	0.28296	-0.75033
	5	0.00201	0.00745	0.00141	-0.00096	0.00045	2.13361	-0.30038
NOR	1	0.00302	0.00842	0.00162	-0.00113	0.00049	0.91844	-0.35402
	2	0.00384	0.01097	0.00215	-0.00156	0.00059	1.19938	-0.48923
	3	0.00328	0.00886	0.00173	-0.00124	0.00049	0.37439	-0.38794
	4	0.00275	0.00895	0.00167	-0.00110	0.00057	0.13068	-0.34606
OTC	1	0.00258	0.00794	0.00151	-0.00104	0.00047	0.30397	-0.32757
	2	0.00337	0.01284	0.00253	-0.00184	0.00068	1.78279	-0.57846
	3	0.00273	0.00823	0.00156	-0.00105	0.00050	0.21838	-0.33075
	4	0.00606	0.01761	0.00353	-0.00265	0.00088	0.38127	-0.83150
	5	0.00501	0.01730	0.00355	-0.00277	0.00078	0.07629	-0.86898
	6	0.00234	0.00932	0.00177	-0.00121	0.00056	0.18024	-0.38048



SMX	1	0.00194	0.00574	0.00106	-0.00069	0.00037	0.74644	-0.21512
	2	0.00849	0.02466	0.00514	-0.00412	0.00102	0.20903	-1.29280
	3	0.00320	0.01251	0.00244	-0.00175	0.00069	2.30124	-0.54959
TC	1	0.00411	0.01599	0.00322	-0.00244	0.00078	2.24254	-0.76678
	2	0.00313	0.01199	0.00233	-0.00166	0.00067	0.26380	-0.52147
	3	0.00644	0.01958	0.00390	-0.00290	0.00100	0.54848	-0.90870
	4	0.00344	0.01283	0.00252	-0.00182	0.00069	1.52225	-0.57153
	5	0.00295	0.00851	0.00168	-0.00124	0.00044	1.53756	-0.38812
	6	0.00228	0.00920	0.00175	-0.00120	0.00055	2.57135	-0.37526

Tabla 9. Energías de adsorción y energías libres de adsorción de cada antibiótico calculado con el nivel de teoría B3LYP/6-31G **. ΔE es la energía de adsorción calculada a partir de energías electrónicas totales y ZPE es la corrección de la energía punto cero. Todos los valores se dan en kcal / mol.

Antibiótico	ΣE_c	ΔE	$\Delta E + ZPE$	ΔG (298 K)
CP	-3.0	-2.1	-1.9	7.2
NOR	-1.6	-1.5	-1.3	5.6
OTC	-3.3	-2.4	-2.3	7.9
SMX	-2.1	-2.1	-1.9	6.4
TC	-3.5	-3.0	-2.6	8.8



5.4 Análisis de las muestras

5.4.1 Extracción de los antibióticos en muestras de piensos

Una vez encontradas las condiciones de separación de los analitos mediante MEKC, se procedió a evaluar técnicas de extracción en muestras de piensos. Los piensos contienen en su composición proteínas (17-20%), carbohidratos (5-10%), lípidos (2-4%) y fibras (4-6%) [10]. Para ello se proponen una extracción sólido-líquido [93], evaluando como disolventes en la extracción de los analitos: a) agua desionizada [94], b) mezcla metanol: agua (20:80 v/v) [95] y c) metanol [96], para ellos se utilizan muestras de pienso blanco dopada.

En la Figura 21, se observan los electroferogramas obtenidos en la evaluación del disolvente para la extracción de los analitos, se puede observar que al realizar una extracción con agua desionizada y metanol: agua (20:80 v/v) (Figura 21.a y 21.b), se co-extraen algunos interferentes lo que afecta en la determinación de los analitos de interés.

El metanol es un disolvente adecuado de los antibióticos de interés (Figura 21.c), además de que las proteínas y los carbohidratos presentan una baja solubilidad en este disolvente. El resultado concuerda con otros estudios en donde las mejores recuperaciones de antibióticos se han observado cuando se ha utilizado al metanol como extractante en proporciones >50 % [97].



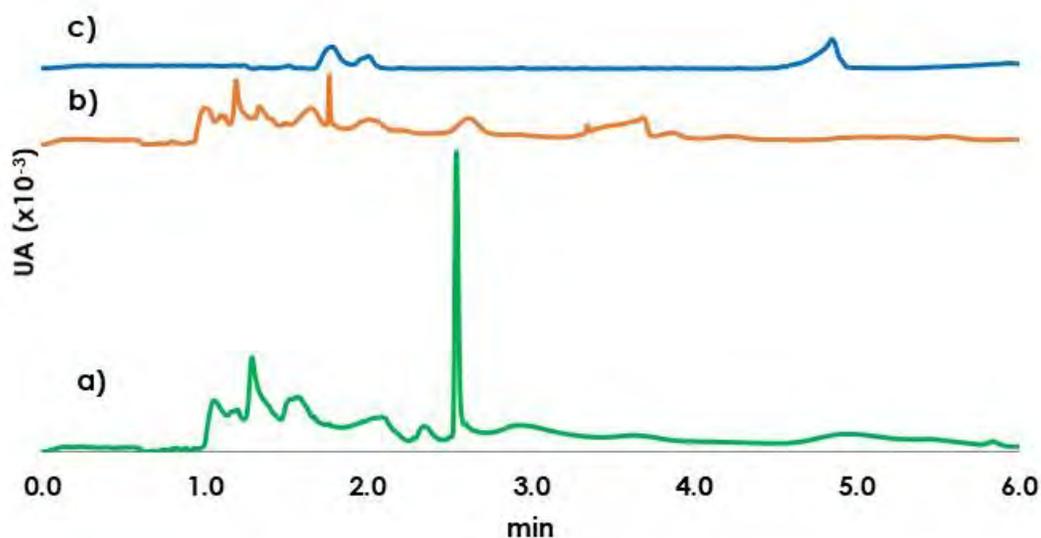


Figura 21. Electroferogramas obtenidos para la extracción de los analitos de interés. Disolventes: a) agua desionizada, b) mezcla metanol:agua (20:80 v/v) y c) metanol. Condiciones CE: capilar de sílice de 30 cm de longitud (75 μm de diámetro interno, 20 cm longitud al detector): V: **14 kV**, λ : **214 nm**; T: **25°C**.

5.5 Validación de metodología

5.5.1. Parámetros analíticos

Bajo las condiciones óptimas que se describieron anteriormente, se estimaron los parámetros analíticos que se evaluaron mediante la preparación de muestras dopadas con los antibióticos (CP, NOR, OTC, SMX, TC y E.I.) en un intervalo de concentraciones de 50-250 $\mu\text{g g}^{-1}$. Cada punto de la curva de calibración corresponde a la relación de áreas de las señales y concentraciones de cada uno de los antibióticos y el estándar interno. El

método se validó en términos de linealidad, límites de detección (LODs), límites de cuantificación (LOQs), precisión (inter- e intra-día) y exactitud de acuerdo con la IUPAC [98, 99], cuyos valores se muestran en la Tabla 9.

Los límites de detección (LODs) se calcularon como $3.29 S_e/b_1$ donde S_e es la raíz cuadrada de la varianza residual de la curva y b_1 es la sensibilidad analítica. De acuerdo con los valores de sensibilidades obtenidos, el CP es el que presenta una mayor sensibilidad analítica, mientras que OTC presenta la menor sensibilidad analítica. Por otro lado, los valores de la ordenada al origen de cada uno de los analitos pasan por cero, lo que nos indica que no hay un efecto matriz.

Los LODs obtenidos se encuentran en el intervalo de $0.7-1.5 \mu\text{g g}^{-1}$ y los LOQs se encuentran en el intervalo de $2.7-3.7 \mu\text{g g}^{-1}$. Los antibióticos son adicionados en piensos en concentraciones entre 100 y $1000 \mu\text{g g}^{-1}$ [9]. por lo que la metodología propuesta resulta adecuada para el análisis de éste tipo de muestras.

La precisión y exactitud del método se midió en términos de repetitividad intra e inter-día y recuperaciones, respectivamente. Para ello se doparon muestras de pienso blanco a tres niveles de concentración ($10-30 \mu\text{g g}^{-1}$). La precisión se determinó a través de la desviación estándar relativa (%RSD) obtenida de tres mediciones de las muestras el mismo día y en tres días diferentes. Por otro lado, la exactitud se evaluó determinando la concentración en muestras dopadas que se compara con la concentración añadida. La Tabla 10 muestra valores que los valores de %RSD son inferiores al 5% en todos los casos, mientras que las recuperaciones oscilan entre 95.8 y 99.2% aplicando la técnica completa (preparación y análisis). Dichos



valores indican que se tienen precisiones y exactitudes aceptables en este intervalo de concentraciones [25].

Tabla 10. Parámetros analíticos obtenidos del análisis de muestras dopadas de piensos

Antibiótico	Sensibilidad analítica (b_1)	Ordenada (b_0)	R^2	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOL ($\mu\text{g g}^{-1}$)
CP	0.3139 ± 0.0178	-0.0084 ± 0.0295	0.9905	1.5	4.5	4.5 - 250
NOR	0.3073 ± 0.0143	-0.0037 ± 0.0238	0.9935	1.2	3.7	3.7 - 250
OTC	0.1007 ± 0.0045	-0.0224 ± 0.0074	0.9941	1.1	3.5	3.5 - 250
SMX	0.1292 ± 0.0044	-0.0021 ± 0.0073	0.9965	0.9	2.7	2.7 - 250
TC	0.2076 ± 0.0059	-0.0038 ± 0.0099	0.9975	0.7	2.3	2.3 - 250

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Concentración encontrada ($\mu\text{g g}^{-1}$)	%RSD intra-día	%RSD inter-día	% recuperación
CP	10.0	9.6	0.8	1.1	96.2
	20.0	19.4	0.2	1.0	96.5
	30.0	29.1	0.5	0.7	96.9
NOR	10.0	9.9	0.8	1.1	99.1
	20.0	19.9	0.2	1.0	99.3
	30.0	29.8	0.5	0.7	99.2
OTC	10.0	9.8	0.9	1.7	97.9
	20.0	19.7	0.3	1.6	98.3
	30.0	29.4	1.0	1.2	98.1
SMX	10.0	9.8	1.2	1.3	98.1
	20.0	19.7	0.5	1.1	98.4
	30.0	29.6	0.7	0.8	98.6
TC	10.0	9.8	0.5	1.0	98.4
	20.0	19.6	0.6	1.1	98.4
	30.0	29.6	0.2	0.8	98.7



5.5.2 Análisis de muestras de piensos.

El objetivo del trabajo fue determinar CP, NOR, OTC, SMX y TC en muestras de pienso. La metodología para la extracción de estos antibióticos se realizó conforme al apartado 5.4.1 y su preparación conforme al apartado 4.2.1. Cinco muestras de piensos para pollo, res y cerdo fueron analizadas para encontrar los antibióticos presentes en estas muestras.

Con el fin de confirmar la presencia de un antibiótico en particular, se realizó una adición estándar al extracto de la muestra. Un aumento en el área de la señal analítica confirmó la presencia del residuo de antibiótico. Dos muestras fueron positivas para CP y una para TC y SMX. Los antibióticos más comunes encontrados fueron CP (40% de un total de muestras, con concentraciones de $163.4 \mu\text{g g}^{-1}$ y $23.4 \mu\text{g g}^{-1}$ respectivamente), TC (20% de las muestras totales con una concentración de $13.4 \mu\text{g g}^{-1}$) y SMX (20% del total de muestras con una concentración de $5.4 \mu\text{g g}^{-1}$). No se encontraron muestras positivas para NOR y OTC.

La presencia de dos o más antibióticos en una muestra está asociada a la presencia de contaminación cruzada debida a la mala limpieza de los equipos utilizados para la elaboración de los piensos [100].



CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

Las quinolonas (ciprofloxacino y norfloxacino) no se logran resolver mediante electroforesis capilar de zona debido a que el presentan relaciones carga/masa semejantes.

La separación de los analitos de interés se logró mediante cromatografía capilar electrocinética micelar utilizando como pseudofase estacionaria Tween-80 y fulereno.

Las condiciones óptimas seleccionadas para la separación de los antibióticos fueron: electrolito de fosfatos 30 mmol L⁻¹, Tween 80 0.05 mmol L⁻¹, fulereno 3 μmol L⁻¹, ajustado a pH= 8.00; voltaje de separación: 14 kV, temperatura 25 °C, tiempo de separación de 6 min y longitud de onda del detector de 214 nm.

La separación de los analitos se basa en la diferencia entre las interacciones fulereno:antibiótico, las cuales pueden ser de tipo Van Der Waals y π-π. El método de variaciones continuas y el gráfico de relaciones molares permite proponer una estequiometría 1:3 fulereno:antibiótico.

La extracción de los antibióticos en las muestras de piensos es adecuada cuando se utiliza metanol.

La metodología propuesta es precisa y exacta, además de ser adecuada para el análisis de los antibióticos de interés en el intervalo de concentración encontrados en piensos medicados. El método propuesto en este trabajo, es un método rentable y sencillo para la determinación de multiresiduos de antibióticos en muestras de piensos.



BIBLIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Young, L. (1994). Tratamiento antimicrobiano. En: Wyngaarden, J., Lloyd, H.S., Bennett, J., eds. Cecil: tratado de Medicina Interna. 19 ed. México, DF; Nueva Editorial Interamericana. p. 1859.
2. Appleton A. (2001). Bacterial Resistance. A worldwide problem. Clin. Lab. Intern. 25. p. 22.
3. Chambers H.S., Merle A.S. (1996). 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. p. 1095.
4. Goodman, A., Rall, T.W., Nies, A.S., Taylor, P. (1993). Las bases farmacológicas de la terapéutica, Editorial Médica Panamericana, México D.F. (México).
5. Feighner, S. D., & Dashkevicz, M. P. (1987). Subtherapeutic levels of antibiotics in poultry feeds and their effects on weight gain, feed efficiency, and bacterial cholytaurine hydrolase activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(2), 331-336.
6. Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279(5353), 996-997.
7. 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)
8. Butaye, P., Devriese, L. A., & Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 175-188.



-
-
9. Reglamento (UE) 2017/625 del Reglamento Europeo y del Consejo de 15 de marzo de 2017.
 10. Boscher, A., Guignard, C., Pellet, T., Hoffmann, L., & Bohn, T. (2010). Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feedingstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217(41), 6394-6404.
 11. Grande, B. C., Falcón, M. G., & Gándara, J. S. (2000). The use of antibiotics in animal feeds: an actual perspective. *CYTA-Journal of Food*, 3(1), 39-47.
 12. Directiva del Consejo 90/167/CEE relativa a la preparación, puesta en el mercado y utilización de los piensos medicamentosos
 13. Real Decreto 157/1995 sobre piensos medicamentosos: condiciones de preparación, puesta en el mercado y utilización
 14. Koga, H., Itoh, A., Murayama, S., Suzue, S., & Irikura, T. (1980). Structure-activity relationships of antibacterial 6, 7-and 7, 8-disubstituted 1-alkyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *Journal of medicinal chemistry*, 23(12), 1358-1363.
 15. Hooper, D. C., & Wolfson, J. S. (1991). Fluoroquinolone antimicrobial agents. *New England Journal of Medicine*, 324(6), 384-394.
 16. Just, P. M. (1993). Overview of the fluoroquinolone antibiotics. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 13(2P2).
 17. Gouvêa, R., dos Santos, F. F., & de Aquino, M. H. C. (2015). Fluoroquinolones in industrial poultry production, bacterial resistance and food residues: a review. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 17(1), 1-10.



-
-
18. Macinga, D. R., Renick, P. J., Makin, K. M., Ellis, D. H., Kreiner, A. A., Li, M., & Morris, T. W. (2003). Unique biological properties and molecular mechanism of 5, 6-bridged quinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(8), 2526-2537.
 19. Chu, D. T., Fernandes, P. B., Claiborne, A. K., Shen, L., & Pernet, A. G. (1988). Structure-activity relationships in quinolone antibacterials: design, synthesis and biological activities of novel isothiazoloquinolones. *Drugs under experimental and clinical research*, 14(6), 379-383.
 20. Fresta, M., Spadaro, A., Cerniglia, G., Roperio, I. M., Puglisi, G., & Furneri, P. M. (1995). Intracellular accumulation of ofloxacin-loaded liposomes in human synovial fibroblasts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1372-1375.
 21. Hernández-Arteseros, J. A., Barbosa, J., Compano, R., & Prat, M. D. (2002). Analysis of quinolone residues in edible animal products. *Journal of Chromatography A*, 945(1), 1-24.
 22. Vicente, D., & Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 28(2), 122-130.
 23. Domagk, G. (1935). Ein beitrage zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 61(07), 250-253.
 24. Parra-Salgado, J., Torres-Martínez, M.B. Desarrollo histórico y estado actual de las sulfamidas. *Lab-acta* 14 (2002) p. 85.
 25. Botsoglou, N. A. F., & Dimitrios, J. (2001). *Drug residues in foods: pharmacology, food safety, and analisis*. Editorial Dekker (Nueva York)



-
-
26. Korolkovas, A., & Burckhalter, J. H. (1983). *Compendio esencial de química farmacéutica*. Reverté.
 27. Şanli, S., Altun, Y., Şanli, N., Alsancak, G., & Beltran, J. L. (2009). Solvent Effects on pK_a values of Some Substituted Sulfonamides in Acetonitrile– Water Binary Mixtures by the UV-Spectroscopy Method. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 54(11), 3014-3021.
 28. Miranda, J.M., Rodríguez, J.A., Galán-Vidal, C.A. J. *Chromatogr.* 2009. A. 1216. 3366.
 29. Ibarra, I. S., Rodríguez, J. A., Miranda, J. M., Vega, M., & Barrado, E. (2011). Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2196-2202.
 30. Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), 232-260.
 31. Anderson, C. R., Rupp, H. S., & Wu, W. H. (2005). Complexities in tetracycline analysis—chemistry, matrix extraction, cleanup, and liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1075(1), 23-32.
 32. Nemutlu, E., Kir, S., Özyüncü, Ö., & Beksac, M. S. (2007). Simultaneous separation and determination of seven quinolones using HPLC: analysis of levofloxacin and moxifloxacin in plasma and amniotic fluid. *Chromatographia*, 66(1), 15-24.
 33. Mitani, K., & Kataoka, H. (2006). Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled



-
-
- with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 562(1), 16-22.
34. Zhang, X., Wang, C., Yang, L., Zhang, W., & Li, C. (2017). Determination of eight quinolones in milk using immunoaffinity microextraction in a packed syringe and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 1064, 68-74.
35. Lombardo-Agüí, M., Gámiz-Gracia, L., Cruces-Blanco, C., & García-Campana, A. M. (2011). Comparison of different sample treatments for the analysis of quinolones in milk by capillary-liquid chromatography with laser induced fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(30), 4966-4971.
36. Yao, K., Zhang, W., Yang, L., Gong, J., Li, L., Jin, T., & Li, C. (2015). Determination of 11 quinolones in bovine milk using immunoaffinity stir bar sorptive microextraction and liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 1003, 67-73.
37. Kang, J., Fan, C. L., Chang, Q. Y., Bu, M. N., Zhao, Z. Y., Wang, W., & Pang, G. F. (2014). Simultaneous determination of multi-class veterinary drug residues in different muscle tissues by modified QuEChERS combined with HPLC-MS/MS. *Analytical methods*, 6(16), 6285-6293.
38. Xu, Z., Song, C., Hu, Y., & Li, G. (2011). Molecularly imprinted stir bar sorptive extraction coupled with high performance liquid chromatography for trace analysis of sulfa drugs in complex samples. *Talanta*, 85(1), 97-103.
39. Huertas-Pérez, J. F., Arroyo-Manzanares, N., Havlíková, L., Gámiz-Gracia, L., Solich, P., & García-Campana, A. M. (2016). Method optimization and validation for the determination of eight sulfonamides in chicken muscle and eggs by modified QuEChERS and

-
-
- liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 124, 261-266.
40. ChiaoChan, C., Koesukwiwat, U., Yudthavorasit, S., & Leepipatpiboon, N. (2010). Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle. *Analytica chimica acta*, 682(1), 117-129.
41. Arroyo-Manzanares, N., Gámiz-Gracia, L., & García-Campaña, A. M. (2014). Alternative sample treatments for the determination of sulfonamides in milk by HPLC with fluorescence detection. *Food chemistry*, 143, 459-464.
42. Tölgyesi, Á., Tölgyesi, L., Békési, K., Sharma, V. K., & Fekete, J. (2014). Determination of tetracyclines in pig and other meat samples using liquid chromatography coupled with diode array and tandem mass spectrometric detectors. *Meat science*, 96(3), 1332-1339.
43. Shahbazi, Y., Ahmadi, F., & Karami, N. (2015). Screening, determination and confirmation of tetracycline residues in chicken tissues using four-plate test, ELISA and HPLC-UV methods: comparison between correlation results. *Food and Agricultural Immunology*, 26(6), 821-834.
44. Pereira, A. P., Oliveira, J. M., Mendes-Ferreira, A., Estevinho, L. M., & Mendes-Faia, A. (2016). Mead and Other Fermented Beverages. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, 407.
45. Schmutz, A., & Thormann, W. (1994). Assessment of impact of physico-chemical drug properties on monitoring drug levels by micellar electrokinetic capillary chromatography with direct serum injection. *Electrophoresis*, 15(1), 1295-1303.



-
-
46. Lombardo-Agüí, M., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A. M., & Cruces-Blanco, C. (2010). Sensitive determination of fluoroquinolone residues in waters by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(4), 1551-1557.
47. Liu, C., Feng, X., Qian, H., Fang, G., & Wang, S. (2015). Determination of norfloxacin in food by capillary electrophoresis immunoassay with laser-induced fluorescence detector. *Food analytical methods*, 8(3), 596-603.
48. Zhao, S., Zhao, H., Zhu, H., Li, C., Lu, X., & Bi, S. (2014). Determination of norfloxacin and ciprofloxacin in chicken meat based on matrix solid-phase dispersion extraction and capillary zone electrophoresis. *Journal of Chemistry*, 2014.
49. Meng, H. L., Chen, G. H., Guo, X., Chen, P., Cai, Q. H., & Tian, Y. F. (2014). Determination of five quinolone antibiotic residues in foods by micellar electrokinetic capillary chromatography with quantum dot indirect laser-induced fluorescence. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 406(13), 3201-3208.
50. Sun, H., Zhao, W., & He, P. (2008). Effective separation and simultaneous determination of four fluoroquinolones in milk by CE with SPE. *Chromatographia*, 68(5-6), 425-429.
51. Zhou, C., Deng, J., Shi, G., & Zhou, T. (2017). β -cyclodextrin-ionic liquid polymer based dynamically coating for simultaneous determination of tetracyclines by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 38(7), 1060-1067.
52. Santos, S. M., Henriques, M., Duarte, A. C., & Esteves, V. I. (2007). Development and application of a capillary electrophoresis based



- method for the simultaneous screening of six antibiotics in spiked milk samples. *Talanta*, 71(2), 731-737.
53. Vera-Candioti, L., Olivieri, A. C., & Goicoechea, H. C. (2010). Development of a novel strategy for preconcentration of antibiotic residues in milk and their quantitation by capillary electrophoresis. *Talanta*, 82(1), 213-221.
54. Font, G., Juan-García, A., & Picó, Y. (2007). Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis–mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat. *Journal of Chromatography A*, 1159(1), 233-241.
55. Islas, G., Rodríguez, J. A., Páez-Hernández, M. E., Corona-Avenidaño, S., Rojas-Hernández, A., & Barrado, E. (2016). Dispersive solid-phase extraction based on butylamide silica for the determination of sulfamethoxazole in milk samples by capillary electrophoresis. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(14), 658-665.
56. Lara, F. J., García-Campaña, A. M., Neusüss, C., & Alés-Barrero, F. (2009). Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1216(15), 3372-3379.
57. Wang, L., Wu, J., Wang, Q., He, C., Zhou, L., Wang, J., & Pu, Q. (2012). Rapid and sensitive determination of sulfonamide residues in milk and chicken muscle by microfluidic chip electrophoresis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(7), 1613-1618.
58. Font, G., Ruiz, M. J., Fernández, M., & Picó, Y. (2008). Application of capillary electrophoresis-mass spectrometry for determining organic food contaminants and residues. *Electrophoresis*, 29(10), 2059-2078.



-
-
59. Lamba, S., Sanghi, S. K., Asthana, A., & Shelke, M. (2005). Rapid determination of sulfonamides in milk using micellar electrokinetic chromatography with fluorescence detection. *Analytica chimica acta*, 552(1), 110-115
60. Rizvi, S. A. A., Simons, D. N., & Shamsi, S. A. (2004). Polymeric alkenoxy amino acid surfactants: III. Chiral separations of binaphthyl derivatives. *Electrophoresis*, 25(4-5), 712-722.
61. Rizvi, S. A., Akbay, C., & Shamsi, S. A. (2004). Polymeric alkenoxy amino acid surfactants: II. Chiral separations of β -blockers with multiple stereogenic centers. *Electrophoresis*, 25(6), 853-860.
62. Akbay, C., Rizvi, S. A., & Shamsi, S. A. (2005). Simultaneous enantioseparation and tandem UV- MS detection of eight β -blockers in micellar electrokinetic chromatography using a chiral molecular micelle. *Analytical chemistry*, 77(6), 1672-1683.
63. Neiman, B., Grushka, E., Gun, J., & Lev, O. (2002). Organically modified silica sol-mediated capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 74(14), 3484-3491.
64. Göttlicher, B., & Bächmann, K. (1997). Investigation of the separation efficiency of hydrophobic compounds in suspension electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 768(2), 320-324.
65. Tseng, W. L., Huang, M. F., Huang, Y. F., & Chang, H. T. (2005). Nanoparticle-filled capillary electrophoresis for the separation of long DNA molecules in the presence of hydrodynamic and electrokinetic forces. *Electrophoresis*, 26(16), 3069-3075.
66. Yang, L., Guihen, E., Holmes, J. D., Loughran, M., O'Sullivan, G. P., & Glennon, J. D. (2005). Gold nanoparticle-modified etched capillaries



-
-
- for open-tubular capillary electrochromatography. *Analytical chemistry*, 77(6), 1840-1846.
67. Chen, G. H., Sun, J., Dai, Y. J., & Dong, M. (2012). Determination of nicotiny pesticide residues in vegetables by micellar electrokinetic capillary chromatography with quantum dot indirect laser-induced fluorescence. *Electrophoresis*, 33(14), 2192-2196.
68. Chen, Q., & Fung, Y. (2010). Capillary electrophoresis with immobilized quantum dot fluorescence detection for rapid determination of organophosphorus pesticides in vegetables. *Electrophoresis*, 31(18), 3107-3114.
69. Spégel, P., Schweitz, L., & Nilsson, S. (2001). Molecularly imprinted microparticles for capillary electrochromatography: studies on microparticle synthesis and electrolyte composition. *Electrophoresis*, 22(17), 3833-3841.
70. Spégel, P., Schweitz, L., & Nilsson, S. (2003). Selectivity toward multiple predetermined targets in nanoparticle capillary electrochromatography. *Analytical chemistry*, 75(23), 6608-6613.
71. Na, N., Hu, Y., Ouyang, J., Baeyens, W. R., Delanghe, J. R., & De Beer, T. (2004). Use of polystyrene nanoparticles to enhance enantiomeric separation of propranolol by capillary electrophoresis with Hp-beta-CD as chiral selector. *Analytica chimica acta*, 527(2), 139-147.
72. Springer, V. H., Aprile, F., & Lista, A. G. (2014). Determination of sulfonylureas in cereal samples with electrophoretic method using ionic liquid with dispersed carbon nanotubes as electrophoretic buffer. *Food chemistry*, 143, 348-353.
73. Moreno, M., Sánchez Arribas, A., Bermejo, E., Zapardiel, A., & Chicharro, M. (2015). Amperometric detection in the presence of



- carbon nanotubes dispersed in background electrolyte: Evaluating its suitability for capillary electrokinetic chromatography separations of polyphenolic compounds. *Electrophoresis*, 36(16), 1945-1952.
74. Treubig, J. M., & Brown, P. R. (2000). Novel approach to the analysis and use of fullerenes in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 873(2), 257-267.
75. Moliner-Martínez, Y., Cárdenas, S., & Valcárcel, M. (2007). Surfactant coated fullerenes C₆₀ as pseudostationary phase in electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1167(2), 210-216.
76. Torres, V. M., Posa, M., Srdjenovic, B., & Simplício, A. L. (2011). Solubilization of fullerene C₆₀ in micellar solutions of different solubilizers. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 82(1), 46-53.
77. Aradi, B.; Hourahine, B.; Frauenheim, T. *The journal of physical chemistry. A*, 2007, 111, 5678–84.
78. Gaus M, Goez A, Elstner M. (2013) Parametrization and benchmark of dftb3 for organic molecules. *J. Chem. Theory Comput.* 9, 338-354.
79. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman R, Scalmani G, Barone V, Mennucci B, Petersson, et al. (2016) Gaussian 09, Rev. 2A. Gaussian, Inc., Wallingford, CT.
80. Lu T, Chen F, (2012). Multiwfn: a multifunctional wavefunction analyzer. *J. Comp. Chem.* 33, 580
81. Multiwfn version 3.3.9, available from: <http://sobereva.com/multiwfn>.
82. Ackermans, M. T., Beckers, J. L., Everaerts, F. M., Hoogland, H., & Tomassen, M. J. H. (1992). Determination of sulphonamides in pork meat extracts by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 596(1), 101-109.



-
-
83. Moliner-Martinez, Y., Barrios, M., Cardenas, S., Valcarcel, M., J. *Chromatogr. A*. 2008, 1194, 128-233
84. Baena, J. R., Gallego, M., & Valcarcel, M. (2002). Fullerenes in the analytical sciences. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(3), 187-198.
85. Buchelnikov, A. S., Kostyukov, V. V., Yevstigneev, M. P., & Prylutskyy, Y. I. (2013). Mechanism of complexation of the phenothiazine dye methylene blue with fullerene C60. *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 87(4), 662-667.
86. Prylutskyy, Y. I., Evstigneev, M. P., Pashkova, I. S., Wyrzykowski, D., Woziwodzka, A., Gołuński, G., Ritter, U. (2014). Characterization of C60 fullerene complexation with antibiotic doxorubicin. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 16(42), 23164-23172.
87. Evstigneev, M. P., Buchelnikov, A. S., Voronin, D. P., Rubin, Y. V., Belous, L. F., Prylutskyy, Y. I., & Ritter, U. (2013). Complexation of C60 fullerene with aromatic drugs. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 14(3), 568-578.
88. Bader RFW (2000) AIM2000 Program v 1.0 Mc. Master University, Hamilton.
89. Bader RFW, A quantum theory of molecular structure and its applications. *Chem. Rev.* 1991, 91, 893.
90. Ziolkowski M, Grabowski SJ, Leszczynski J, Cooperativity in Hydrogen-Bonded interactions: Ab Initio and "Atoms in Molecules" Analyses. *J. Phys. Chem. A*, 2006, 110, 6514.
91. Mohajeri A, Alipour M, Mousae M. Halogen-hydro interaction between Z-X (Z=CN, NC; X= F, Cl, Br) and H-Mg-Y (Y= H,F, Cl, Br,CH₃). *J. Phys. Chem. A* 201, 1115, 4457.



-
-
92. Shahi A, Arunan E. Hydrogen bonding, halogen bonding and lithium bonding: an atoms in molecules and natural bond orbital perspective towards conservation of total bond order, inter- and intra- molecular bonding. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2014, 16, 22935.
93. Douša, M., Sikač, Z., Halama, M., & Lemr, K. (2006). HPLC determination of lincomycin in premixes and feedstuffs with solid-phase extraction on HLB OASIS and LC-MS/MS confirmation. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(4), 981-986.
94. Benito-Peña, E., Urraca, J. L., & Moreno-Bondi, M. C. (2009). Quantitative determination of penicillin V and amoxicillin in feed samples by pressurised liquid extraction and liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 49(2), 289-294.
95. McCaughey, W. J., Elliott, C. T., & Crooks, S. R. H. (1990). Determination of sulphadimidine in animal feedstuffs by an enzyme-linked immunoassay. *Food additives & contaminants*, 7(2), 259-264.
96. Injac, R., Kocevar, N., & Kreft, S. (2007). Precision of micellar electrokinetic capillary chromatography in the determination of seven antibiotics in pharmaceuticals and feedstuffs. *Analytica chimica acta*, 594(1), 119-127.
97. Fierens, C., Hillaert, S., & Van den Bossche, W. (2000). The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 22(5), 763-772.
98. Currie LA (1998) International recommendations offered on analytical detection and quantification concepts and nomenclature. *Analytica chimica acta* 391:103-134
-
-



99. Currie LA (1998) Presentation of the results of chemical analysis (Chap. 2) and Quality assurance of analytical processes (Chap. 18). In: Inczédy J, Ure AM, Lengyel T, Gelencsér A, Hulanicki A (eds) IUPAC compendium of analytical nomenclature. Blackwell, Oxford
100. McEvoy, J. D. G. (2002). Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Analytica Chimica Acta*, 473(1), 3-26.

