



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

LICENCIATURA EN QUÍMICA

**TESIS**

**SÍNTESIS DE ÓXIDO DE GRAFENO DE ALTO CONTENIDO DE  
OXÍGENO Y SU APLICACIÓN EN EXTRACCIÓN EN FASE  
SÓLIDA MAGNÉTICA EN LA DETERMINACIÓN DE  
TETRACICLINAS EN MUESTRAS DE LECHE POR  
ELECTROFORESIS CAPILAR.**

Para obtener el título de Licenciada en Química

PRESENTA

Avila Cruz Valeria Miriel

Director

Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Mineral de la Reforma, Hidalgo, junio de 2025.



Mineral de la Reforma, Hgo., a 27 de junio de 2025

Número de control: ICBI-D/1171/2025  
Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO  
DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado a la egresada de la Licenciatura en Química **Valeria Miriel Avila Cruz**, quien presenta el trabajo de titulación **“Síntesis de óxido de grafeno de alto contenido de oxígeno y su aplicación en extracción en fase sólida magnética en la determinación de tetraciclinas en muestras de leche por electroforesis capilar”**, ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

**Presidente:** Dra. María Elena Páez Hernández

**Secretario:** Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

**Vocal:** Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

**Suplente:** Dra. Gabriela Islas Guerrero

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente  
“Amor, Orden y Progreso”

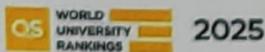
Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez  
Director del ICBI

GVR/YCC



Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001  
direccion\_icbi@uaeh.edu.mx, vergara@uaeh.edu.mx

“Amor, Orden y Progreso”



uaeh.edu.mx

## **Agradecimientos**

Al inicio de la carrera, hace un año e incluso hace unos meses, veía este momento como un evento lejano, como algo que eventualmente sucedería, pero que tardaría en llegar. Hoy me permito agradecer a todas las personas detrás de este logro.

A Dios, por acompañarme en cada decisión, importante o pequeña, y hacerme sentir un poco más segura de mis elecciones y de mí misma, por cuidarme y permitirme seguir adelante.

Agradezco infinitamente a mis padres, Miriam y José Guadalupe, por apoyarme siempre, por cuidarme, por nunca dudar de mí y darme más de lo que podían. Gracias por su amor incondicional, por los abrazos reconfortantes en cada momento donde dude de mí. No estaría aquí de no ser por ustedes.

A mis hermanas, Vania y Maria Jose, gracias por la compañía, las risas y las peleas, gracias por hacer mi vida menos solitaria y aburrida, por escucharme y aconsejarme. Siempre estaré para ustedes.

Agradezco a mis abuelos, Gloria y Nacho, por su amor y apoyo incondicional, por las palabras de aliento y las preocupaciones.

A mi tía, Maricela, gracias por apoyarme y quererme tanto, por los consejos y por siempre estar para mí. Te extraño mucho.

A mis abuelos, Fidencia y Manuel, gracias por el apoyo y el amor que me tienen.

Agradezco al Doctor Israel S. Ibarra Ortega, gracias por la oportunidad de trabajar con usted, por la confianza y por el apoyo que me brinda en cada paso. Por la paciencia, las enseñanzas y la excelente convivencia. Es una excelente persona y un gran profesor, lo admiro mucho y agradezco el placer de conocerlo.

También agradezco a mi comité: Dra. Gaby Islas, Dra. Elena Páez y Dr. José Antonio Rodríguez, gracias por el tiempo, el apoyo, los consejos y su disposición en la revisión de este trabajo.

A Hernán, gracias por el apoyo, por las enseñanzas, por la paciencia. Pero, sobre todo, gracias por la amistad que me brindaste desde que empecé a trabajar en el laboratorio.

A Alonso, gracias por escucharme siempre, por el apoyo y los consejos, por estar para mí y por las palabras de aliento. Eres un gran amigo, espero seguir compartiendo logros contigo.

A Isabel, gracias por el tiempo, los consejos, las risas y la increíble amistad que espero dure para siempre.

A Ilse y a Daniela, por estar presentes a pesar del tiempo y la distancia, gracias por el apoyo y amistad incondicional. Siempre tendrán un lugar especial en mi corazón.

A los doctores del laboratorio: Dra. Irma, Dr. Francisco, Dr. Giaan, gracias por el aliento, los consejos y el apoyo.

Agradezco a Alondra por los momentos compartidos, por ser mi apoyo y mi chicle en el laboratorio, por las risas y la amistad construida. Te mereces lo más bonito de la vida.

A Karen, Tane, Josue, Lalo, Yare y Jessi, gracias por el apoyo, las risas y la amistad que me brindaron durante este proceso. Espero conservarlos en mi vida siempre.

A David, gracias por el apoyo, la amistad y los consejos. Quédate siempre.

Gracias a todas las personas que forman parte de mi vida a este momento, no sería lo mismo sin ninguna.

# Índice

1.	Introducción .....	1
1.1.	Antibióticos .....	1
1.2.	Tetraciclinas .....	1
1.2.1.	Clasificación .....	2
1.2.2.	Mecanismo de acción .....	4
1.2.3.	Usos .....	5
1.2.4.	Efectos adversos .....	5
1.3.	Metodologías analíticas para la determinación de tetraciclinas.....	6
1.3.1.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	6
1.3.2.	Cromatografía de gases (GC).....	7
1.3.3.	Espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS).....	7
1.3.4.	Electroforesis capilar (CE) .....	8
1.4.	Pretratamiento de la muestra.....	9
1.5.	Adsorbentes .....	10
1.5.1.	Materiales carbonosos.....	11
1.5.2.	Oxido de grafeno (GO) .....	11
2.	Objetivo General.....	16
2.1.	Objetivos específicos.....	16
3.	Metodología.....	17
3.1.	Materiales y reactivos .....	17
3.2.	Equipos .....	17
3.3.	Condiciones de separación por Electroforesis capilar .....	18
3.4.	Síntesis de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	18
3.5.	Síntesis de GO .....	19
3.6.	Síntesis de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @.....	20
3.7.	Síntesis de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @GO. ....	20
3.8.	Caracterización.....	20
3.9.	Optimización de la metodología MSPE.....	23
4.	Resultados y discusión .....	24
4.1.	Síntesis y caracterización de GO.....	24
4.2.	Síntesis y caracterización de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @GO.....	26

<b>4.3.</b>	<b>Optimización de la metodología MSPE .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.1.</b>	<b>Evaluación de pH .....</b>	<b>34</b>
<b>4.3.2.</b>	<b>Evaluación de masa del adsorbente .....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.3.</b>	<b>Evaluación de tiempo de contacto .....</b>	<b>37</b>
<b>4.3.4.</b>	<b>Análisis de interferentes .....</b>	<b>39</b>
<b>4.3.5.</b>	<b>Fuerza iónica .....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.</b>	<b>Pruebas de Elución.....</b>	<b>40</b>
<b>4.5.</b>	<b>Parámetros analíticos .....</b>	<b>43</b>
<b>4.6.</b>	<b>Protocolo .....</b>	<b>44</b>
<b>4.6.1.</b>	<b>Pretratamiento de muestras de leche .....</b>	<b>44</b>
<b>4.6.2.</b>	<b>Extracción y preconcentración .....</b>	<b>44</b>
<b>4.6.3.</b>	<b>Análisis por electroforesis capilar.....</b>	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>47</b>
<b>6.</b>	<b>Perspectivas .....</b>	<b>48</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>49</b>

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Estructura del núcleo de naftaceno	<b>2</b>
<b>Figura 2.</b>	Estructura base de las tetraciclinas.	<b>2</b>
<b>Figura 3.</b>	Estructura química de las tetraciclinas naturales: a) clortetraciclina, b) oxitetraciclina, c) tetraciclina y d) desmetilclortetraciclina	<b>3</b>
<b>Figura 4.</b>	Estructura química de las tetraciclinas semisintéticas: a) metiaciclina, b) doxiciclina, c) minociclina	<b>4</b>
<b>Figura 5.</b>	Proceso de MSPE: 1) Carga de la muestra en el adsorbente, 2) dispersión mecánica de la muestra con el adsorbente (vortex) y 3) aislamiento de la muestra mediante la aplicación de un campo magnético externo (imán).	<b>10</b>
<b>Figura 6.</b>	Estructuras del GO resaltando grupos funcionales hidróxido, carboxilo y epóxido.	<b>12</b>
<b>Figura 7.</b>	Proceso de síntesis de óxido de grafeno mediante el método de Hummers	<b>13</b>
<b>Figura 8.</b>	Síntesis de $Fe_3O_4$ por oxidación parcial de Fe (II).	<b>18</b>
<b>Figura 9.</b>	Síntesis de GO mediante modificación del método de Hummers (método Tour)	<b>19</b>
<b>Figura 10.</b>	Síntesis de $Fe_3O_4@GO$ mediante metodología sol-gel.	<b>20</b>
<b>Figura 11.</b>	Metodología MSPE empleada en el análisis de tetraciclinas por electroforesis capilar.	<b>23</b>
<b>Figura 12.</b>	Imágenes SEM de GO a diferentes proporciones de mezcla $H_2SO_4/H_3PO_4$ a) 9:1 b) 1:1 c) 1:9	<b>25</b>
<b>Figura 13.</b>	Espectros FTIR $H_2SO_4/H_3PO_4$ GO a) 1:9, b) 1:1 y c) 9:1.	<b>26</b>
<b>Figura 14.</b>	Respuesta después de aplicar un campo magnético externo por 5 seg a 20 mg de $Fe_3O_4@$ TMOS:APTES a proporciones 1:2:3, 1:3:2, 1:4:6, 1:6:9 y 1:8:12, dispersados en 3.0 mL de $H_2O$	<b>27</b>
<b>Figura 15.</b>	Esquema general de la síntesis del adsorbente $Fe_3O_4@GO$ .	<b>28</b>
<b>Figura 16.</b>	Micrografía SEM de $Fe_3O_4@GO$	<b>29</b>

<b>Figura 17.</b>	Espectros FTIR de a) $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ y c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO	<b>30</b>
<b>Figura 18.</b>	a) Análisis termogravimétrico (TGA) para $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO y b) primera derivada de la pérdida de masa.	<b>31</b>
<b>Figura 19.</b>	Distribución del tamaño de las partículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO.	<b>32</b>
<b>Figura 20.</b>	Estructura de los antibióticos TCs (TC, CT, OT, DT).	<b>35</b>
<b>Figura 21.</b>	Evaluación del efecto del pH en la remoción de TCs con $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO.	<b>36</b>
<b>Figura 22.</b>	Evaluación del efecto de masa del adsorbente en la remoción de TCs con $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO.	<b>37</b>
<b>Figura 23.</b>	Evaluación tiempo de contacto e en la remoción de TCs con $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO.	<b>38</b>
<b>Figura 24.</b>	Electroferograma de a) solución estándar de TC, CT, OT y DT con EI ( $5.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y b) solución de TC, CT, OT y DT ( $5.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) después del proceso de MSPE a las condiciones óptimas de extracción (pH= 8.0, 10.0 mg de adsorbente y tiempo de contacto de 5.0 min).	<b>38</b>
<b>Figura 25.</b>	Evaluación del efecto de la fuerza iónica en la remoción de TCs con $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO.	<b>40</b>
<b>Figura 26.</b>	Porcentajes promedio de elución empleando soluciones etanólicas de HCl.	<b>42</b>
<b>Figura 27</b>	Porcentajes promedio de elución empleando solución Etanol/HCl $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ a diferentes tiempos de contacto.	<b>42</b>
<b>Figura 28</b>	Preparación de muestra de leche mediante MSPE para su análisis por CE.	<b>45</b>

## Índice de Tablas

<b>Tabla 1.</b>	Análisis EDS en la determinación del grado de oxidación GO.	<b>24</b>
<b>Tabla 2.</b>	Rendimiento para la Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @GO.	<b>27</b>
<b>Tabla 3.</b>	Parámetros de adsorción para TCs.	<b>33</b>
<b>Tabla 4.</b>	Estudio cinético de adsorción.	<b>34</b>
<b>Tabla 5.</b>	Valores de pK <sub>a</sub> de las TCs (TC, CT, OT, DT).	<b>35</b>
<b>Tabla 6.</b>	Porcentajes de remoción en la evaluación de interferentes.	<b>39</b>
<b>Tabla 7.</b>	Porcentaje de elución de TCs.	<b>41</b>
<b>Tabla 8.</b>	Parámetros analíticos.	<b>43</b>

# I. INTRODUCCIÓN

## **1. Introducción**

### **1.1. Antibióticos**

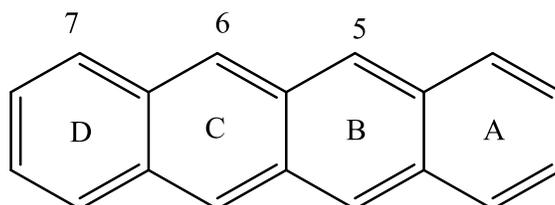
El término antibiótico hace referencia a una sustancia química, natural o sintética, con la capacidad de eliminar o impedir el crecimiento y la reproducción de bacterias y otros microorganismos patógenos. El descubrimiento de los antibióticos ha sido uno de los avances más importantes para la medicina moderna, permitiendo realizar procedimientos como el tratamiento de cáncer, trasplantes de órganos y cirugía a corazón abierto (Hutchings et al., 2019; Mohr, 2016). Por otro lado, además de emplearse en prevención de infecciones, en la ganadería suelen implementarse para acelerar el crecimiento de los animales y mejorar la producción de carne (Singer et al., 2003).

Sin embargo, el uso excesivo de estos antibióticos ha provocado resistencia bacteriana a los antibióticos debido a la alta presencia de estas sustancias en el ambiente, ya sea por desechos generados, producción de ingredientes activos, el desecho de antibióticos no utilizados o la excreción de residuos después de su consumo. A pesar de que algunos antibióticos como las penicilinas y cefalosporinas se degradan fácilmente, algunos otros son persistentes, lo que permite que se acumulen en el ambiente en concentraciones elevadas; ejemplo de estos son las fluoroquinolonas, sulfonamidas y las tetraciclinas (Mohr, 2016; Oka et al., 2000).

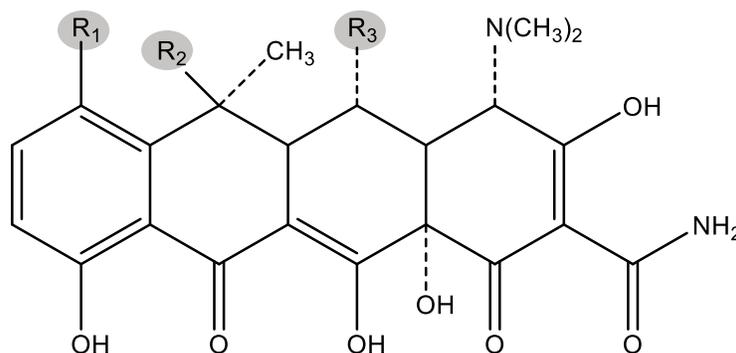
### **1.2. Tetraciclinas**

Las tetraciclinas (TCs) son un grupo de agentes bacteriostáticos, es decir, sustancias que impiden la reproducción de bacterias, con actividad antimicrobiana de amplio espectro. (Chopra y Roberts, 2001; Klein y Cunha, 1995). Estos antibióticos en medicina humana son aplicados en la prevención y tratamiento de enfermedades respiratorias, urinarias, en piel, ojos y enfermedades de transmisión sexual. Por otro lado, en el sector agrícola y ganadero, se usan comúnmente como tratamiento para enfermedades bacterianas que afectan a plantas (Chopra y Roberts, 2001) y como aditivos alimenticios para promover el crecimiento de animales (Daghrir y Drogui, 2013; Roberts, 2003).

La estructura básica de las tetraciclinas consiste en un núcleo de naftaceno, el cual contiene cuatro anillos fusionados (figura 1). Los compuestos análogos de la tetraciclina se modifican mediante sustituciones en la quinta, sexta y/o séptima posición (figura 2; Klein y Cunha, 1995).



**Figura 1.** Estructura del núcleo de naftaceno



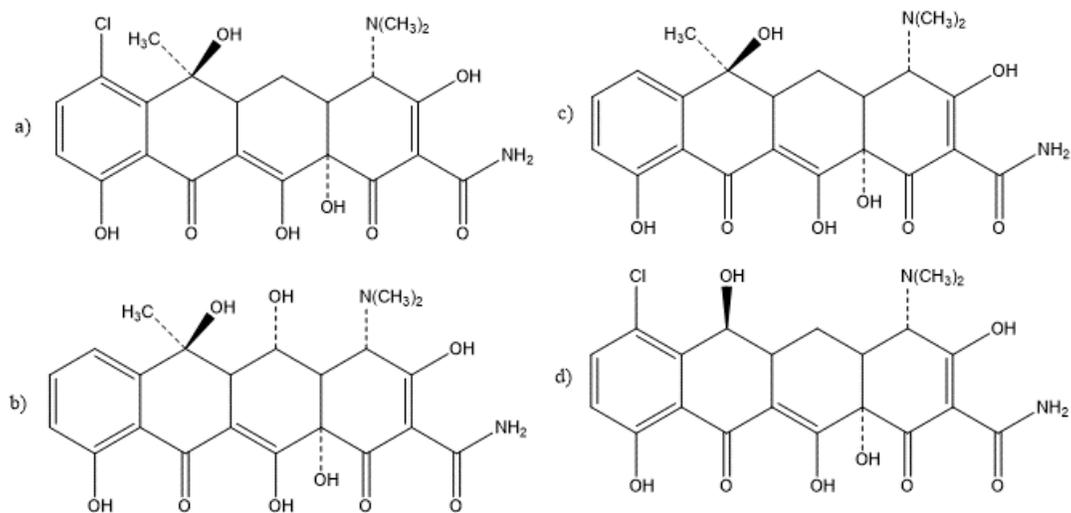
**Figura 2.** Estructura base de las tetraciclinas

### 1.2.1. Clasificación

Las tetraciclinas pueden ser clasificadas por su origen, en naturales, ya que pueden ser aisladas de especies de *Streptomyces spp.*, o semisintéticos, modificadas en el laboratorio para mejorar sus propiedades (Vicente y Pérez-Trallero, 2010).

#### 1.2.1.1. Tetraciclinas naturales

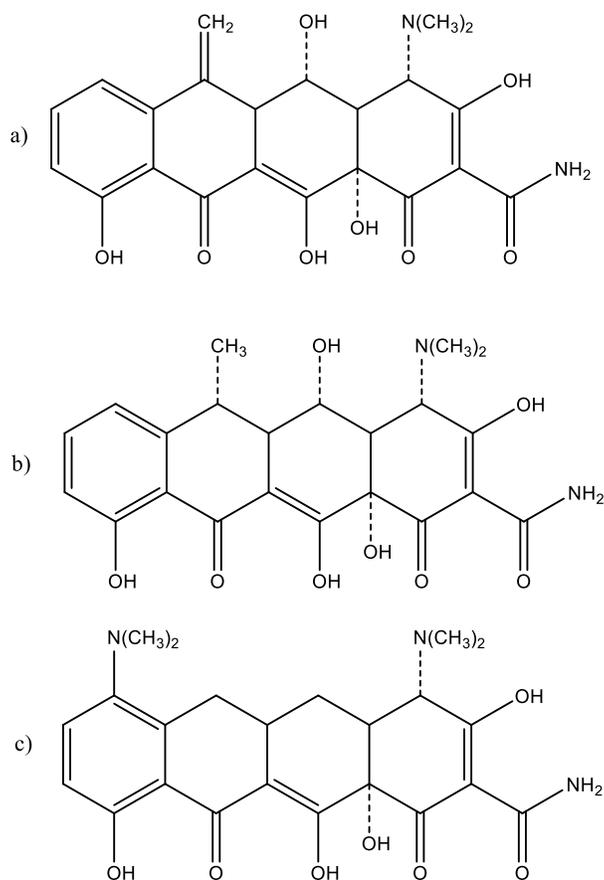
La clortetraciclina (CT) y oxitetraciclina (OT) fueron los primeros miembros del grupo de tetraciclinas aisladas, siendo productos de *Streptomyces aureofaciens* y *S. rimosus*, respectivamente. Posteriormente, se identificó la tetraciclina (TC), derivada de *S. aureofaciens*, *S. rimosus* y *S. viridofaciens*, y la desmetilclortetraciclina proveniente de la especie *S. aureofaciens* (figura 3; Chopra y Roberts, 2001; Klein y Cunha, 1995).



**Figura 3.** Estructura química de las tetraciclinas naturales: a) clortetraciclina, b) oxitetraciclina, c) tetraciclina y d) desmetilclortetraciclina

### 1.2.1.2. Tetraciclinas semisintéticas (Segunda generación)

A pesar de la buena actividad y amplio espectro de las tetraciclinas naturales, se buscó la síntesis de análogos que presentaran mejores propiedades, como una mayor solubilidad en agua, lo que facilita la absorción y permite la administración parenteral, y un mayor tiempo de vida media. Es así como surgen la metiaciclina (derivado de oxitetraciclina), doxiciclina (DT) y minociclina (figura 4), además de la rolitetraciclina, un derivado soluble de la tetraciclina. Las TCs sintéticas más recientemente son el grupo denominado gliciliclinas, las cuales poseen un sustituyente 9-glicilamido (Chopra y Roberts, 2001).



**Figura 4.** Estructura química de las tetraciclinas semisintéticas: a) metiaciclina, b) doxiciclina, c) minociclina

### 1.2.2. Mecanismo de acción

Como se menciona, las tetraciclinas son agentes bacteriostáticos que inhiben la síntesis proteica bacteriana al impedir la unión del aminoacil-ARNt con el ribosoma bacteriano. Esto ocurre porque las TCs se unen a la subunidad ribosómica 30S y bloquean la entrada del ARNt aminoacil en el sitio A del ribosoma. Sin embargo, para alcanzar las moléculas objetivo, estas moléculas necesitan atravesar uno o más sistemas de membrana. Las tetraciclinas acceden a los ribosomas bacterianos mediante un proceso en dos etapas: primero, por difusión pasiva a través de los poros hidrofílicos de la membrana celular externa; y posteriormente, mediante un transporte activo dependiente de la energía a través de la membrana citoplasmática interna (Chopra y Roberts, 2001; Klein y Cunha, 1995).

### **1.2.3. Usos**

Como se ha mencionado, las tetraciclinas son empleadas para el tratamiento de infecciones frente a una amplia gama de agentes, desde patógenos Gram-positivos y Gram-negativos, siendo especialmente eficaces contra estafilococos, estreptococos, neumococos, gonococos, cólera, bacilos de la disentería, tos ferina, rickettsias, clamidias y micoplasmas (Nelson y Levy, 2011; Oka et al., 2000). Por otro lado, dentro del sector agrícola, las TCs son comúnmente usadas para tratar infecciones en los cultivos causadas por bacterias como *Xanthomonas*, *Ralstonia* y *Pseudomonas* (Chopra y Roberts, 2001). En el área ganadera, además de tratar infecciones, estos son ampliamente usados como aditivos para promover el crecimiento y la producción animal, aunque este uso ha sido restringido en muchos países (Daghrir y Drogui, 2013; Roberts, 2003).

### **1.2.4. Efectos adversos**

Aunado al uso constante por las múltiples aplicaciones que presentan las tetraciclinas tanto en medicina humana y veterinaria, así como en la agricultura y ganadería, su alta solubilidad en agua y baja volatilidad, promueve su persistencia en el ambiente. Hay una gran variedad de fuentes de desecho, por ejemplo, de procesos de la producción en la industria farmacéutica, mala disposición de antibióticos o la excreción de residuos después de su uso en el organismo (ya que las TCs no son absorbidas completamente en el tracto gastrointestinal). Esto provoca que sean detectados en muestras de aguas residuales, depósitos de agua, ríos, lagos, pozos e incluso el océano, en suelos, lodos y sedimentos, así como en muestras de leche, carne y huevo. (Daghrir y Drogui, 2013; Klein y Cunha, 1995). Por esta razón, dichos antibióticos, pueden ingresar en la cadena trófica causando en los organismos el desarrollo de alteraciones endocrinas, toxicidad crónica y alteración de las poblaciones microbianas autóctonas (Andreozi et al. 2004). Estudios han demostrado que las TCs no presentan efectos carcinógenos en humanos o animales (como ratas, ratones y pescados) tras la exposición prolongada o las altas dosis de estos antibióticos; sin embargo, pueden causar daño en el hígado y el intestino (Dietz et al., 1991; Liu et al., 2022). Del mismo modo, su

persistencia en el medio ambiente puede alterar procesos importantes como la absorción de nutrientes del suelo, fijación de nitrógeno, respiración microbiana del suelo, reducción de Fe(III), nitrificación y la actividad enzimática de las fosfatasas (Gao et al., 2012; Larsson, 2014). Sin embargo, el principal efecto negativo de la persistencia de TCs es la resistencia bacteriana a estos antibióticos ya que las vuelve poco efectivas contra las infecciones (Andreozzi et al. 2004).

### **1.3. Metodologías analíticas para la determinación de tetraciclinas**

Debido a lo anterior surge la necesidad de desarrollar metodologías analíticas que permitan la detección de tetraciclinas, como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (GC), espectrofotometría de absorción atómica (AAS) y electroforesis capilar de zona (CZE; Kowalski, 2008; Shalaby et al., 2010; Abdulghani et al., 2013).

#### **1.3.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

Esta metodología es una de las más empleadas para la determinación e identificación de las distintas tetraciclinas en una gran variedad de matrices de muestras, siendo la fase reversa el modo comúnmente aplicado para la separación de dichos antibióticos. En este sistema destaca el uso de columnas C<sub>18</sub>, C<sub>8</sub>, y columnas de fenilo, así como el uso de fase móvil con ácido oxálico, tampones de oxalato, citrato y fosfato, los cuales ayudan a reducir ruido en las señales debido a la propensión que tienen las TCs a formar complejos. También destaca el uso de acetonitrilo, metanol y mezclas acetonitrilo-metanol como fase móvil. Para el análisis de TCs mediante HPLC se han empleado detectores UV de longitud de onda variable y de arreglo de diodos, los cuales han permitido obtener límites de detección en el intervalo de los ng g<sup>-1</sup> o mL<sup>-1</sup> de muestra. (Oka et al., 2000; Peres et al., 2010).

En el trabajo presentado por Shalaby et al. (2010) se valida y optimiza una metodología de HPLC para la determinación de residuos de TCs en carne e hígado de pollo, empleando un detector de arreglo de diodos, columna C<sub>18</sub> y elución en gradiente de varios pasos, lo que resultó en una mejor resolución de los picos

cromatográficos y límites de detección (LODs) de 0.0044, 0.005, 0.013 y 0.001  $\mu\text{g}$  para oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina y doxiciclina (OT, TC, CT y DT, respectivamente). Del mismo modo Tu et al. (2019) presenta un método para la detección de tetraciclina con LOD de 2.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , empleando una columna  $\text{C}_{18}$  y como fase móvil una mezcla de metanol-acetonitrilo-ácido oxálico-agua desionizada (5:25:1:69, v/v).

### **1.3.2. Cromatografía de gases (GC)**

Aunque se reportan pocos trabajos que hablen sobre el uso de esta metodología para el análisis de tetraciclinas Tsuji y Robertson (1973) exponen la formación de complejos de tetraciclina con trimetilsilanos para la obtención de derivados volátiles y estables para el análisis por cromatografía de gases con ionización de llama. En años posteriores se ha reportado la derivatización insitu de analitos que contienen grupos funcionales amino, hidroxilo y carboxilo utilizando hidróxido de trimetilfenilamonio (TMPAH) o N-metil-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) (Lin et al., 2008; Naing et al., 2015; Tsuji y Robertson, 1973).

### **1.3.3. Espectrofotometría de absorción atómica de llama (FAAS)**

En Abdulghani et al. (2013) se aplicaron técnicas de espectrofotometría UV-visible, FAAS y HPLC en la determinación de tetraciclina (TC) mediante complejación del fármaco con iones  $\text{Au(III)}$  y  $\text{Hg(II)}$ . Para el análisis de TC por espectrofotometría de absorción atómica de llama se empleó lámpara de cátodo hueco, lámpara  $\text{D}_2$ , autoamplificador de llama y llama de aire acetileno. Los resultados reportan límites de detección de 740.3, 99.7 y 2647.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para UV-visible, FAAS y HPLC respectivamente. Los Autores concluyen que el método FAAS, en la determinación indirecta de la TC, aunque representa un mayor costo, provee de mayor sensibilidad analítica, con límites de detección bajos en comparación con las técnicas de espectrofotometría UV-visible y HPLC (Abdulghani et al., 2013).

#### **1.3.4. Electroforesis capilar (CE)**

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que se basa en las diferencias de movilidad electroforética de los analitos bajo la influencia de un campo eléctrico aplicado en la que los compuestos se separan de acuerdo con su relación masa/carga a un pH controlado mediante el uso de electrolitos soporte (Castagnino, 2000). La similitud estructural que presentan las tetraciclinas, además de sus propiedades ácido-base pueden dificultar su análisis mediante metodologías cromatográficas. En cambio, su solubilidad en agua y los sitios de ionización que tienen estos antibióticos hacen que la separación electroforética sea satisfactoria. Esta metodología ha ganado relevancia en el análisis de fármacos debido su alta eficiencia, sensibilidad y compatibilidad con diversos tipos de detectores, siendo los detectores UV-Visible los más empleados en el análisis de antibióticos a longitud de onda de 360 nm para TCs (Ma et al., 2012; Tavares y McGuffin, 1994).

En el análisis de TCs se han empleado técnicas como la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), la electroforesis de zona capilar (CZE) y la electrocromatografía (CEC; Croubels et al., 1994; García-Campaña et al., 2009; Li et al., 1997).

Kowalski (2008) desarrolló una metodología para identificar y cuantificar tres tetraciclinas: tetraciclina, oxitetraciclina y doxiciclina en muestras de músculo de pescado mediante electroforesis capilar empleando detección UV. El método fue validado reportando LODs en el intervalo 0.0013-0.0018  $\mu\text{g g}^{-1}$  (Kowalski, 2008). De manera similar, Ibarra et al. (2011) propone un método de extracción en fase sólida magnética (MSPE) acoplado a electroforesis capilar para la determinación de tetraciclina, clortetraciclinas, oxitetraciclina y doxiciclina (TC, CT, OT y DT respectivamente) en muestras de leche, en el cual se obtuvieron LODs en el rango de 2.0 a 9.0  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Ibarra et al., 2011).

La electroforesis capilar ofrece ventajas sobre otras metodologías de análisis, como mayor facilidad y velocidad, alta eficiencia, automatización y compatibilidad con una variedad de esquemas de detección, además de ser catalogada como una técnica

amigable con el medio ambiente ya que disminuye el uso de grandes cantidades de solventes, requiere de un volumen de inyección de muestra y soluciones de acondicionamiento en el orden de microlitros y nanolitros volviéndola más económica (Kowalski, 2008; García-Campaña et al., 2009; Tavares y McGuffin, 1994).

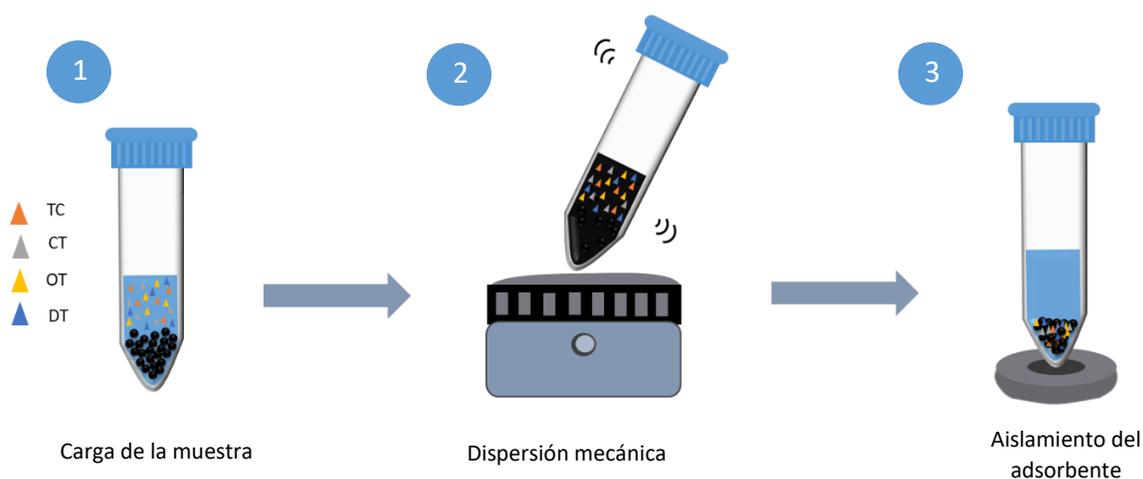
#### **1.4. Pretratamiento de la muestra**

El punto crítico de toda metodología analítica es el pretratamiento de la muestra ya que, además de ayudar a eliminar impurezas e interferentes en la matriz de la muestra, también ayuda a alcanzar límites de detección más bajos (Fontanals et al., 2006).

Técnicas de extracción con disolventes, como extracción líquido-líquido (LLE), extracción Soxhlet y extracción en fase sólida (SPE) son técnicas tradicionales populares debido a su gran aplicabilidad. Sin embargo, en LLE el uso de grandes cantidades de solventes orgánicos representa un impacto negativo para el medio ambiente (Hyötyläinen, 2009). La SPE es de las técnicas más utilizados en el análisis de muestras complejas debido a su versatilidad y selectividad, con la posibilidad de automatizarse. Esta técnica emplea diferentes tipos de adsorbentes que pueden ser adaptados a los analitos de interés mejorando la adsorción de estos. Sin embargo, presenta complicaciones que dificultan su uso ya que, además de ser una técnica costosa, incrementa el número de etapas, la manipulación de la muestra, y existe el riesgo de obstrucción del cartucho por la complejidad de la matriz analítica (C<sub>2</sub>, C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>) (Tsai et al., 2009).

La extracción en fase sólida dispersiva (DSPE) y extracción en fase sólida magnética (MSPE), son técnicas desarrolladas como alternativa a la SPE, las cuales se han utilizado ampliamente en la purificación y preconcentración de varios analitos a partir de matrices complejas, como muestras medioambientales y biológicas (Fontanals et al., 2006). La DSPE se caracteriza por usar un proceso mecánico de dispersión para mejorar el contacto entre el adsorbente y los analitos presentes en la muestra líquida, posteriormente la fase sólida se aísla mediante centrifugación.

La MSPE (figura 5), consiste en tres etapas principales 1) carga de la muestra, 2) dispersión mecánica, y 3) el aislamiento del adsorbente mediante la aplicación de un campo magnético externo. Esto facilita el procedimiento y evita el uso de elementos como bombas de vacío y cartuchos lo que la hace una técnica más económica. Esta técnica, emplea adsorbentes con partículas paramagnéticas dentro de su estructura y suelen ser modificados para garantizar una adecuada interacción entre la fase sólida y los analitos (Ibarra et al., 2011; Vázquez-Garrido et al., 2022).



**Figura 5.** Proceso de MSPE: 1) Carga de la muestra en el adsorbente, 2) dispersión mecánica de la muestra con el adsorbente (vortex) y 3) aislamiento de la muestra mediante la aplicación de un campo magnético externo (imán).

### 1.5. Adsorbentes

Conforme la matriz analítica en los diversos tratamientos para el aislamiento, remoción y pre-concentración. El uso de adsorbente destaca entre las opciones de aislamiento debido a su facilidad de manejo, bajo costo, flexibilidad y no ser agresiva con el ambiente, ya que los materiales empleados como adsorbentes pueden ser reutilizados, permitiendo el análisis de varias muestras (Dąbrowski, 2001; Tabrizian et al., 2019). Adsorbentes como polímeros impresos, geles de sílice, alúmina, óxidos metálicos, fullerenos, zeolitas y materiales carbonosos, han sido empleados como adsorbentes para su análisis.

### 1.5.1. Materiales carbonosos

Los materiales carbonosos destacan como adsorbentes debido a su capacidad para retener compuestos orgánicos e inorgánicos, como pesticidas, antibióticos, colorantes y iones metálicos mediante SPE, DSPE y MSPE puesto que compuestos como el grafeno pueden ser funcionalizados con  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  para otorgar propiedades magnéticas al adsorbente (Vázquez-Garrido et al., 2022).

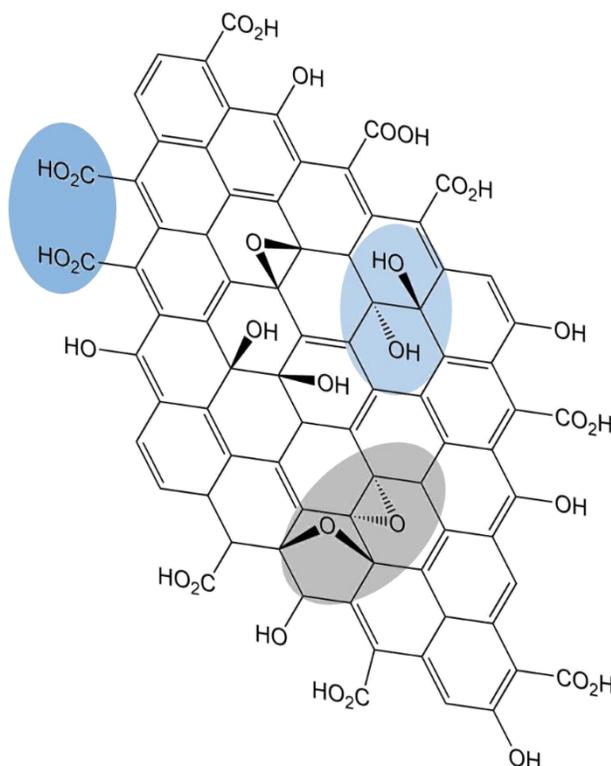
El carbón activado es uno de los materiales carbonosos más empleados debido a su versatilidad al poder adsorber compuestos orgánicos e inorgánicos gracias a sus grupos funcionales carbono-oxígeno y su gran área superficial (Egirani et al., 2020). El grafeno, posee una estructura plana (malla bidimensional de átomos de carbono), de elevada densidad electrónica y fácil modificación con una gran variedad de grupos funcionales. Por lo cual, se considera como un adsorbente destacado en el análisis o remoción de diversos compuestos (Vázquez-Garrido et al., 2022).

Los nanotubos de carbono son considerados láminas de grafeno enrolladas y divididos a escala nanométrica con propiedades como gran superficie específica, buena conductividad térmica y eléctrica, rigidez y alta resistencia mecánica lo que los convierte en excelentes adsorbentes. Sin embargo, el óxido de grafeno (GO) es el derivado principal del grafeno ya que los grupos funcionales con oxígeno en su estructura propician buenas interacciones con los analitos (Vázquez-Garrido et al., 2022).

### 1.5.2. Oxido de grafeno (GO)

Los óxidos de grafeno (GO) (figura 6) son materiales adsorbentes de gran interés debido al contenido de grupos funcionales con oxígeno en su estructura (hidróxido, carboxilo y epóxido), los cuales favorecen interacciones del tipo van der Waals, electrostáticas, puente de hidrógeno y/o interacciones  $\pi$ - $\pi$  con una gran variedad de analitos entre ellos las TCs. Los GO se pueden sintetizar a partir de la oxidación del grafito que, mediante modificaciones en la síntesis permite modificar el grado de oxidación (Chen et al., 2013). De esta manera, las proporciones de carbono  $\text{sp}^3/\text{sp}^2$

proveen propiedades específicas para cada GO y en consecuencia la interacción con los analitos de interés (Krishnamoorthy et al., 2013).

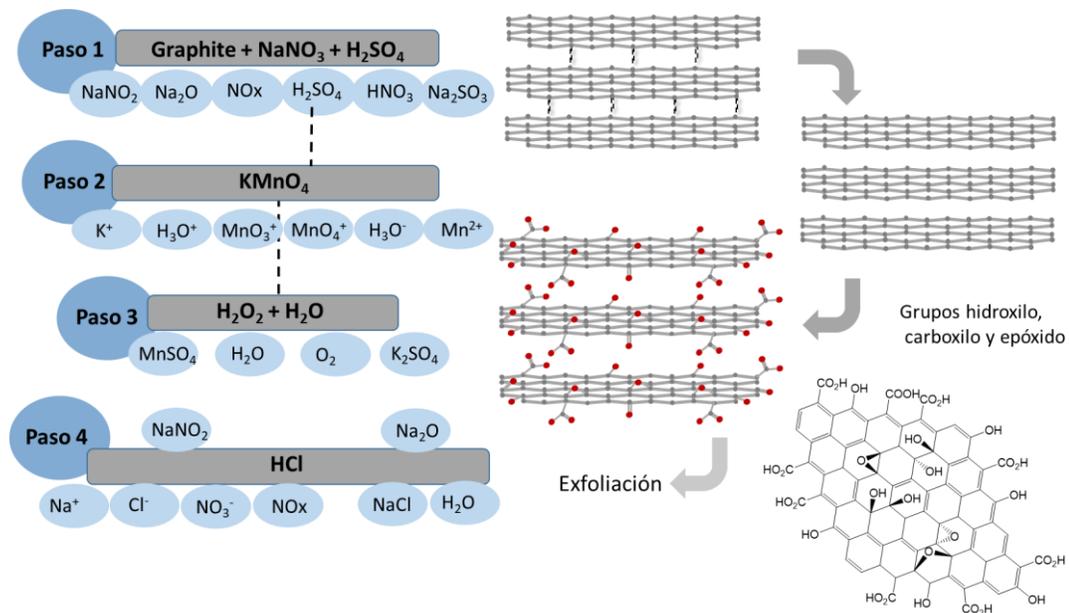


**Figura 6.** Estructuras del GO resaltando grupos funcionales hidróxido, carboxilo y epóxido.

### 1.5.2.1. Síntesis de GO

Existen diferentes procesos para la síntesis de óxido de grafeno entre los que destacan el método Brodie, Staudenmaier y método Hummers. Este último, además de ser el más empleado, cuenta con diversas modificaciones, como el método Tour, permitiendo en algunos casos la obtención de nuevos materiales (Gao, W 2015).

El método Hummers (figura 7) se basa en la oxidación de grafito, mediante la adición de ácido sulfúrico concentrado, nitrato de sodio y permanganato de potasio. Dicha mezcla se somete a una temperatura por debajo de 45.0 °C por 2.0 h. Sin embargo, procesos de oxidación incompletos y la generación de gases tóxicos: NO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> y/o ClO<sub>2</sub> representan riesgos de mayor atención (Islas et al., 2023; Marcano et al., 2010).



**Figura 7.** Proceso de síntesis de óxido de grafeno mediante el método de Hummers.

Con el paso de los años, el método de Tour evitó el uso de nitrato de sodio aumentando la cantidad de permanganato de potasio y empleando una mezcla de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) como medio ácido, evitando la formación de óxidos de nitrógeno. Aunque el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  no participa directamente en la oxidación del grafito, permite una oxidación más controlada y segura regulando la concentración de protones libres actuando como un tampón ácido, lo cual favorece la inserción controlada de grupos funcionales con oxígeno (principalmente en los bordes de las láminas de grafito, promoviendo la formación de grupos carboxilo) sin causar sobreoxidación o degradación de la estructura basal del grafito. (Marcano et al., 2010; Zhou et al., 2014). Mediante este método se reportó la obtención de GO con mayor grado de oxidación empleando seis equivalentes de  $\text{KMnO}_4$  por equivalente de grafito en una mezcla 9:1 de  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  (Gao, W. 2015).

Esto permite inferir que la proporción entre ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) empleada en la síntesis influye en el grado de oxidación del grafito y en la estructura del óxido de grafeno obtenido. Una mayor proporción de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  favorece un grado de oxidación elevado, pero también promueve la formación de defectos

estructurales o laminas más pequeñas. En cambio, un mayor contenido de  $H_3PO_4$  produce una menor oxidación, con menor densidad de defectos y láminas más grandes (Marcano et al., 2010).

#### **1.5.2.2. Aplicaciones**

El uso de óxido de grafeno como adsorbente para el análisis de contaminantes en el medio ambiente ha ganado relevancia, ya que investigaciones como la de Ghadim et al. (2013) demuestran que es un material no tóxico, biocompatible con ciertas nanopartículas, como metales nobles (nanopartículas de oro/plata) y los iones de tierras raras (nanocristales de conversión ascendente), y ofrecen una interacción adecuada con compuestos orgánicos, como en el caso de las TCs, por medio de interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$  y por puente de hidrógeno, debido los anillos aromáticos con grupos funcionales que incluyen fenol, alcohol, cetona y amino presentes en la estructura de las TCs.

En estudios recientes (Luo et al., 2011) se emplea grafeno como adsorbente en un proceso de MSPE para extraer seis antibióticos sulfonamidas de muestras de agua. Las láminas de grafeno se inmovilizan en microesferas magnéticas recubiertas de sílice lo que permite su separación de la solución de la muestra al aplicar un campo magnético externo. Del mismo modo Yu et al. (2017) estudia el comportamiento que presenta la adsorción de tetraciclina empleando óxido de grafeno magnético obteniendo resultados en los que se observa un aumento de hasta el 50 % en la capacidad de adsorción del sólido al volverse magnético (Yu et al., 2017).

Gao et al. (2012) presentan un estudio donde se utiliza óxido de grafeno como adsorbente para extraer tres antibióticos de tetraciclina, incluyendo: TC, OT y DT. Entre los resultados se encontró que la capacidad de adsorción del sólido disminuye con el aumento de pH y la concentración de  $Na^+$ . Estos antecedentes dieron paso a mejorar los procesos de síntesis de los GO, con la finalidad de ser empleados en tratamiento y extracción de una gran diversidad de analitos (Gao et al., 2012). El uso de GO magnético como adsorbente en el análisis de moléculas inorgánicas, en

este caso el mercurio, es estudiado en el trabajo de Mohammadnia et al. (2019), en el que reportan porcentajes de remoción de hasta 78.0 % y capacidades máximas de adsorción de 129.7 mg g<sup>-1</sup> (Mohammadnia et al., 2019).

Por lo anterior, el presente trabajo plantea el desarrollo de una metodología analítica de extracción en fase sólida magnética (MSPE) en el análisis de tetraciclina (TC), clortetraciclina (CT), oxitetraciclina (OT) y doxiciclina (DT) en muestras de leche por electroforesis capilar, empleando como adsorbente, óxido de grafeno de elevado contenido de oxígeno.

## II. OBJETIVOS

## **2. Objetivo General**

Sintetizar óxido de grafeno (GO) de elevado grado de oxidación como adsorbente en el análisis de tetraciclinas en muestras de leche por extracción en fase sólida magnética (MSPE) y electroforesis capilar.

### **2.1. Objetivos específicos**

- Sintetizar y caracterizar óxidos de grafeno con diferente grado de oxidación por el método de Hummers útiles como adsorbentes.
- Establecer las condiciones óptimas por MSPE en la extracción de tetraciclinas en muestras complejas.
- Aplicar el método analítico propuesto en el análisis de tetraciclinas en muestras de leche de interés comercial.

# III. METODOLOGÍA

### **3. Metodología**

#### **3.1. Materiales y reactivos**

Las soluciones estándares se prepararon usando una solución madre de Tetraciclina (TC, 95.0 %), Clortetraciclina (CT, 95.0 %), oxitetraciclina (OT, 95.0 %) y doxiciclina (DT, 98.0 %), obtenidos por Sigma Aldrich, a una concentración de 500.0 mg L<sup>-1</sup> de cada TC en metanol. Como estándar interno se empleó una solución de ácido pícrico (98.0 %) obtenida por Sigma a una concentración de 50.0 mg L<sup>-1</sup>.

El análisis de TCs mediante electroforesis capilar consiste en el uso de una solución electrolito de fosfato de sodio 30.0 mM, sal de EDTA disódica 2.0 mM y 2-propanol al 2.0 %, ajustada a un pH = 12.0 con NaOH 1.0 M (Ibarra et al., 2011).

La síntesis de magnetita se realizó a partir de sulfato de hierro (II) heptahidratado (Sigma). La síntesis de óxido de grafeno se realizó empleando Grafito, Permanganato de potasio, ácido sulfúrico (Reasol), ácido fosfórico (Meyer), peróxido de hidrogeno al 30.0 % y ácido clorhídrico (JT Baker). La funcionalización de GO con la magnetita se llevó a cabo usando 3-aminopropiltriethoxisilano (APTES), tetrametoxisilano (98.0 %, TMOS), Triton X-100 y bromuro de cetiltrimetil amonio (CTAB) (Sigma).

Las soluciones empleadas se prepararon disolviendo reactivo grado analítico en agua desionizada con resistividad no menor a 17.5 Ω mediante un sistema Milli-Q. (Millipore)

#### **3.2. Equipos**

La caracterización de cada material sintetizado se realizó utilizando un espectrofotómetro infrarrojo con transformada de Fourier Perkin Elmer (FITR). La morfología se evaluó con un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-820 (SEM). El grado de oxidación del óxido de grafeno se determinó mediante el uso de un Espectrómetro de Energía Dispersiva (EDS). La estabilidad térmica del adsorbente se evaluó utilizando un analizador TGA 200 con el software Universal

V4.7A. El tamaño de partícula se determinó utilizando un analizador de tamaño de partículas por difracción láser LS I3 320 de Beckman Coulter. El pH se ajustó usando un analizador de pH/iones modelo 450; Corning Science Products, Nueva. La separación electroforética se realizó utilizando un equipo Beckman Coulter P/ACE 5500-UV, empleando un capilar de sílice fundida (41.7 cm × 75.0 μm ID). Los datos se analizaron con un software Beckman P/ACE system MDQ versión 2.3.

### 3.3. Condiciones de separación por Electroforesis capilar

El análisis se realizó bajo las siguientes condiciones: capilar de sílice fundida, fase normal con voltaje de separación de 12.0 kV, longitud de onda del detector de 360 nm y electrolito soporte fosfato de sodio (30.0 mM) EDTA (2.0 mM) 2-propanol al 2.0 % (v/v) ajustado a pH= 12.0 con solución NaOH 1.0 M. El capilar se acondicionó entre cada análisis con NaOH 1.0 M (2.0 min), NaOH 0.1 M (1.0 min), agua desionizada (1.0 min) y electrolito soporte (2.0 min; Ibarra et al., 2011).

### 3.4. Síntesis de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

La síntesis de partículas de magnetita se llevó a cabo mediante la oxidación parcial y precipitación de hierro (II) en presencia de oxígeno en medio básico (pH 11.0) en agitación y calentamiento por 1.5 h. Los iones Fe (III) oxidados se combinan con los iones Fe (II) restantes para formar magnetita (Altan et al., 2015; figura 8).



Figura 8. Síntesis de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> por oxidación parcial de Fe (II).

### 3.5. Síntesis de GO

La síntesis del óxido de grafeno (GO) se realizó mediante una modificación del método de Hummers (Gao, W. 2015; figura 9) en la que se emplean tres proporciones de la mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  (9:1, 1:1, 1.9), con las que se evalúa el grado de oxidación. Para esto 0.5 g de grafito y 2.4 g de permanganato de potasio fueron disueltos en la mezcla de ácidos en baño de hielo para controlar la temperatura. Una vez la mezcla fue homogénea se llevó a una temperatura de 70.0 °C por 1.2 h con agitación constante. Finalizado ese tiempo se añadieron 25.0 mL de agua desionizada y la mezcla regresó a calentamiento (80.0 °C por 0.5 h). Finalmente se añadieron 10.0 mL de peróxido de hidrogeno con agitación constante hasta que la mezcla de reacción se atemperó. Al óxido de grafeno sintetizado fue lavado con 100.0 mL de HCl al 5.0 % y posteriormente con agua hasta alcanzar un pH de 5.0.

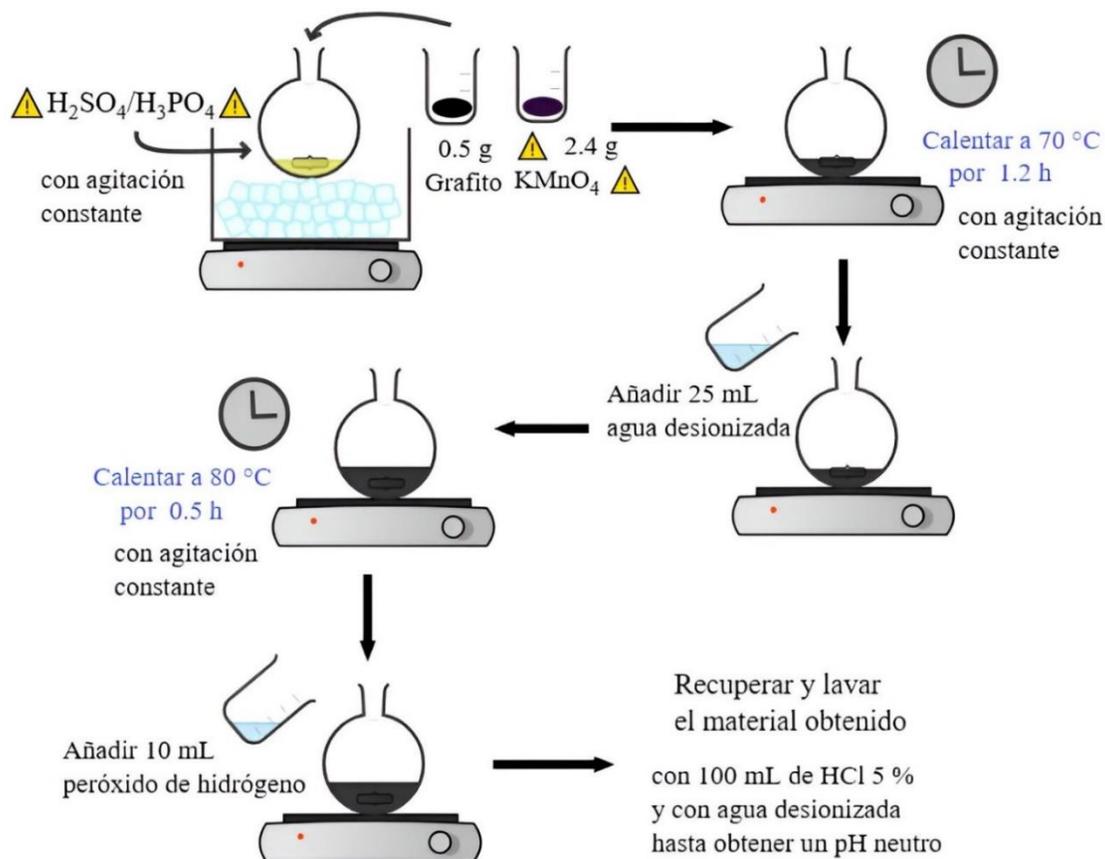


Figura 9. Síntesis de GO mediante modificación del método de Hummers (método Tour).

### 3.6. Síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ .

En esta etapa el GO se funcionalizó a las partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  mediante la metodología Sol-gel (Ibarra et al., 2011; Niculescu et al., 2021), utilizando los precursores de sílice (3-aminopropil)triétoxisilano (APTES), y tetrametil ortosilicato (TMOS) que actúan como monómero funcional y agente entrecruzante respectivamente. Los precursores de sílice y la magnetita se incorporaron en 25.0 mL de una solución 25.0 % (v/v) metanol, 2.0% (p/v) Triton X-100, 0.02% (p/v) CTAB y con 1.0 mL de amoníaco como catalizador. Posteriormente la mezcla se colocó a reflujo por 2.0 h a 120.0 °C.

### 3.7. Síntesis de $\text{Fe}_3\text{O}_4@GO$ .

Después de 2.0 h se añadió el GO dispersado en 10.0 mL de agua desionizada y se dejó 6.0 h más a reflujo y agitación constante (figura 10). Se realizan lavados con agua desionizada al adsorbente hasta que alcance un pH neutro.

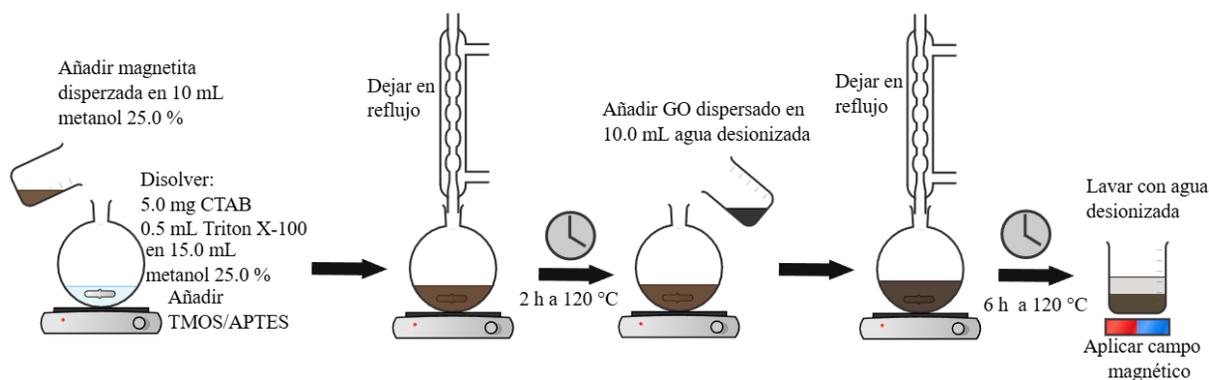


Figura 10. Síntesis de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GO$  mediante metodología sol-gel.

### 3.8. Caracterización

El material adsorbente se caracterizó mediante espectroscopia IR (FTIR), en el cual se observa bandas correspondientes a grupos funcionales C-O del óxido de grafeno, Fe-O de la magnetita y Si-O correspondientes a la funcionalización con APTES y TMOS.

La morfología del material se analizó con un microscopio electrónico de barrido. El grado de oxidación del óxido de grafeno se determinó mediante el uso de un

Espectrómetro de Energía Dispersiva (EDS) con el cual obtuvo información acerca de la relación O/C del material. Se evaluó la estabilidad térmica del adsorbente en el intervalo de temperaturas de 25.0 a 700.0 °C (10.0 °C min<sup>-1</sup>), así como el tamaño de partícula.

La capacidad de adsorción y la afinidad del adsorbente magnético por los analitos de interés se determinaron mediante isoterma de adsorción y análisis Scatchard. Empleando el modelo de adsorción de Langmuir (Ec. 1) se obtuvo la capacidad máxima de adsorción ( $q_{max}$  mg g<sup>-1</sup>) del adsorbente para cada analito, donde  $q_e$  es la cantidad de analito en el adsorbente al equilibrio (mg g<sup>-1</sup>),  $C_e$  es la concentración del analito en solución al equilibrio (mg L<sup>-1</sup>) y  $K_L$  la constante de Langmuir (L mg<sup>-1</sup>).

$$\text{Ec. 1} \quad \frac{1}{q_e} = \left( \frac{1}{K_L q_{max}} \right) \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_{max}}$$

El modelo de adsorción de Freundlich (Ec. 2) permitió conocer si el proceso de adsorción era favorable mediante los valores del parámetro  $1/n$ .

$$\text{Ec. 2} \quad \log q_e = \frac{1}{n} \log C_e + \log K_F$$

Para determinar si el proceso de adsorción es físico ( $E < 8$  kJ mol<sup>-1</sup>) o químico ( $8.0$  kJ mol<sup>-1</sup>  $< E < 16.0$  kJ mol<sup>-1</sup>) se empleó el modelo de Dubinin-Radushkevich (Ec. 3a) en el que para conocer el potencial de adsorción ( $\varepsilon$  kJ mol<sup>-1</sup>) se usa la expresión descrita en la ecuación 3b y para conocer la energía asociada al proceso de adsorción la ecuación 3c, donde  $\beta$  es la constante de energía de adsorción (mol<sup>2</sup> kJ<sup>-2</sup>).

$$\begin{aligned} \text{Ec. 3} \quad & \text{a)} \quad \ln q_e = -\beta \varepsilon^2 + \ln q_{max} \\ & \text{b)} \quad \varepsilon = RT \ln \left( 1 + \frac{1}{C_e} \right) \\ & \text{c)} \quad E = \frac{1}{\sqrt{2\beta}} \end{aligned}$$

El análisis Scatchard se describe con la ecuación 4 en donde los valores de  $K_d$  ( $\mu\text{M}$ ) indican el tipo de afinidad que presenta el adsorbente con los analitos (Davenport, 2005; Dada et al., 2012).

$$\text{Ec. 4} \quad \frac{q_e}{C_e} = -\frac{1}{K_d} q_e + \frac{q_{max}}{K_d}$$

Finalmente se estudió la cinética de adsorción empleando los modelos de pseudo primer y pseudo segundo orden, descritos por la ecuación 5 y 6 respectivamente, en donde  $q_e$  es la cantidad de analito en el adsorbente al equilibrio ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $q_t$  es la cantidad de analito en el adsorbente al tiempo  $t$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ) y  $K_1$  ( $\text{min}^{-1}$ ) y  $K_2$  ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) la constante de velocidad (Gao et al., 2012; Mohammadnia et al., 2019). Para ambos modelos se evaluaron tiempos de contacto en el intervalo de 0 – 60 min.

$$\text{Ec. 5} \quad \log(q_e - q_t) = \log q_e - \frac{K_1}{2.303} t$$

$$\text{Ec. 6} \quad \frac{t}{q_t} = \frac{1}{K_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$$

### 3.9. Optimización de la metodología MSPE

Las condiciones óptimas de extracción se determinarán mediante la evaluación de las variables críticas del sistema de extracción en fase sólida magnética (MSPE): efecto del pH (en un intervalo de 4.0 - 12.0), efecto del tiempo de contacto (1.0 - 20.0 min) y cantidad de adsorbente empleado (5.0 - 30.0 mg).

Para ello, se pesarán 20.0 mg del material sintetizado el cual se activa previamente con 1.0 mL de metanol y 2.0 mL de agua desionizada para posteriormente ponerlo en contacto con 1.0 mL de una solución de TCs (TC, CT, OT, DT), a una concentración de 5.0 mg L<sup>-1</sup>, de la cual se varían las condiciones a optimizar. La mezcla es dispersada por 5.0 min, para después aislar el adsorbente, mediante la aplicación de un campo magnético externo, y recuperar el sobrenadante al cual se adiciona ácido pícrico a una concentración de 5.0 mg L<sup>-1</sup> como estándar interno, para su posterior análisis por CE (figura 11).

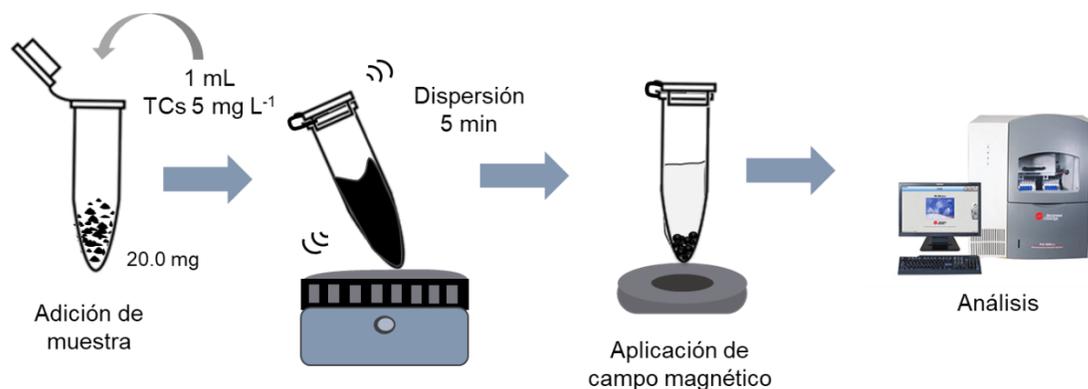


Figura 11. Metodología MSPE empleada en el análisis de tetraciclinas por electroforesis capilar.

# IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Síntesis y caracterización de GO

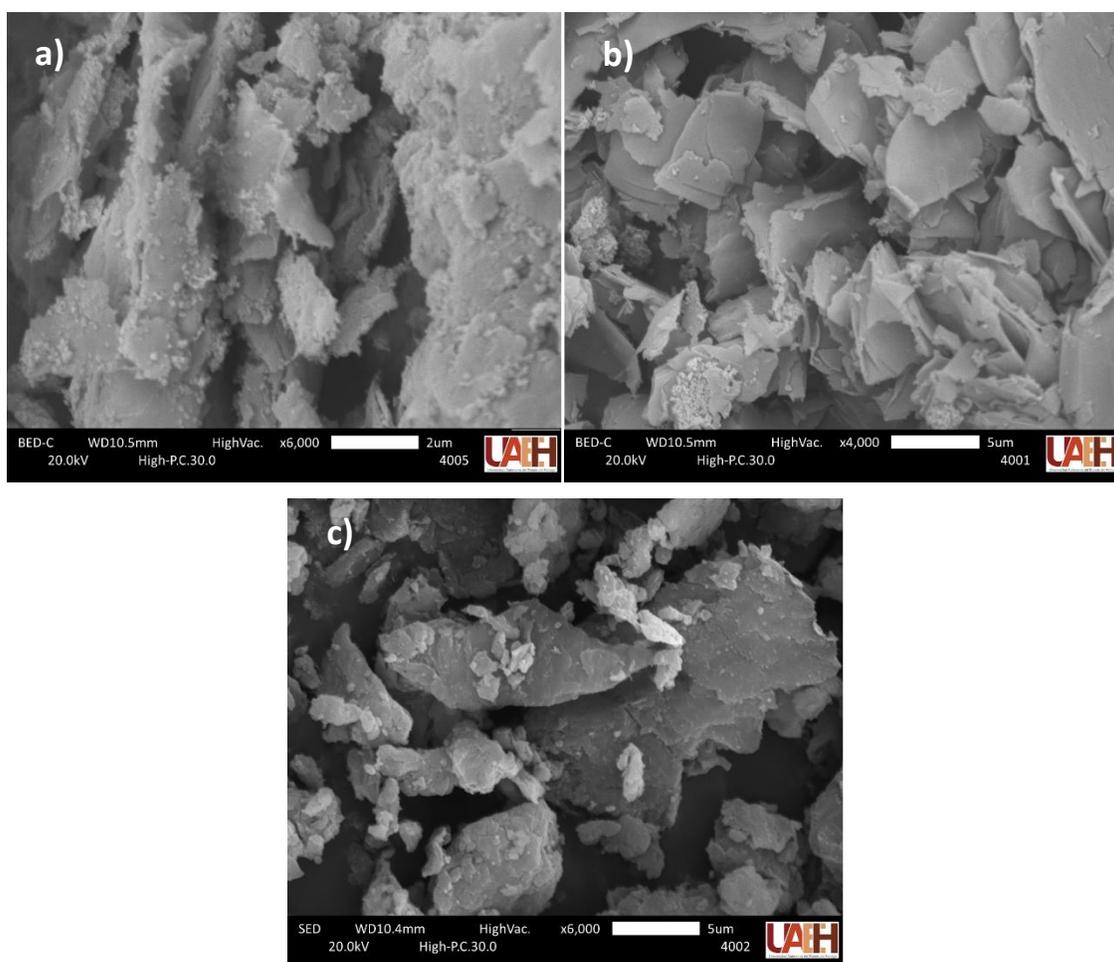
En una primera etapa, se evaluó el efecto de la proporción de la mezcla de  $H_2SO_4/H_3PO_4$  respecto al grado de oxidación en la síntesis de óxido de grafeno considerando tres proporciones diferentes 9:1, 1:1 y 1:9. Para confirmar la presencia de grupos funcionales con oxígeno se emplearon los datos del análisis EDS, los cuales permiten conocer la relación de proporciones de carbono y oxígeno (O/C) (Al-Gaashani et al., 2019). En la Tabla 1, se muestran los resultados obtenidos para los tres GO sintetizados.

**Tabla 1.** Análisis EDS para la determinación del grado de oxidación GO

Proporción ( $H_2SO_4/H_3PO_4$ )	%Peso		O/C
	C	O	
1:9	74.98	21.03	0.280
1:1	58.95	38.01	0.645
9:1	59.36	37.82	0.637

Como se observa, los adsorbentes que presentan un mayor grado de oxidación, es decir, una mayor cantidad de oxígeno en su estructura, son GO 1:1 y 9:1 con una relación de 0.645 y 0.637 respectivamente, caso contrario si se compara con el GO con proporción 1:9 (0.280). Esto se debe al uso de una mayor cantidad de ácido sulfúrico ya que al tener un medio más ácido propicia una oxidación más fuerte y por lo tanto un mayor grado de oxidación del grafito. Por otro lado, el ácido fosfórico, controla la reactividad del  $H_2SO_4$  lo que disminuye el grado de oxidación del adsorbente, por lo que, al tener una proporción mayor de  $H_2SO_4$ , se espera que el grado de oxidación sea mayor, mientras que a mayor cantidad de  $H_3PO_4$ , menor grado de oxidación (Gao, W 2015). A proporciones iguales de los ácidos se propicia una oxidación controlada lo que permite el equilibrio entre oxidación y la obtención de mejores estructuras laminares (Marcano et al., 2010).

La morfología del adsorbente fue caracterizada mediante espectroscopía electrónica de barrido obteniendo micrografías del GO a las diferentes proporciones de ácido empleadas (figura 12a, 12b y 12c), donde se puede observar la forma laminar (hojuelas) distintiva de los GO. Sin embargo, en la micrografía del adsorbente con proporción 1:9 de mezcla de ácidos se pueden distinguir laminas más grandes, lo que permite inferir que a menor grado de oxidación la estructura laminar tiende a ser de mayor tamaño, lo anterior coincide con lo reportado (Cao y Zhang, 2015; Zhang et al. 2009).



**Figura 12.** Imágenes SEM de GO a diferentes proporciones de mezcla H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> a) 9:1 b) 1:1 c) 1:9

Los espectros IR obtenidos para los adsorbentes con proporción 1:9, 1:1 y 9:1 (figura 13a, 13b y 13c), permiten corroborar la información previamente obtenida.

Como se observa, los espectros de los GO con mayor grado de oxidación presentan bandas a  $3360\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al enlace O–H,  $1580\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a enlaces de tipo C=O presentes en los grupos carboxilo, cercanas a  $1390\text{ cm}^{-1}$  indicativas de enlaces C–OH y bandas correspondientes a enlaces C–O a los  $1034\text{ cm}^{-1}$  las cuales indican la presencia de grupos funcionales epóxido, banda en el espectro del GO con proporción 1:9 (Cao y Zhang, 2015; Mohammadnia et al., 2019).

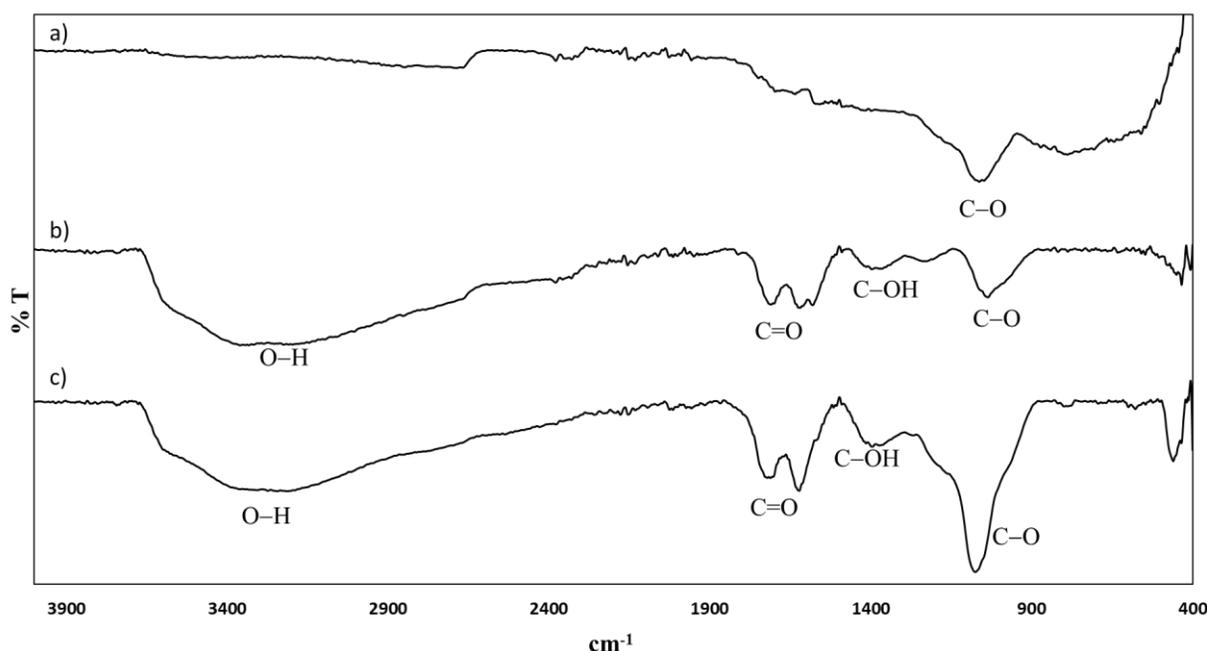
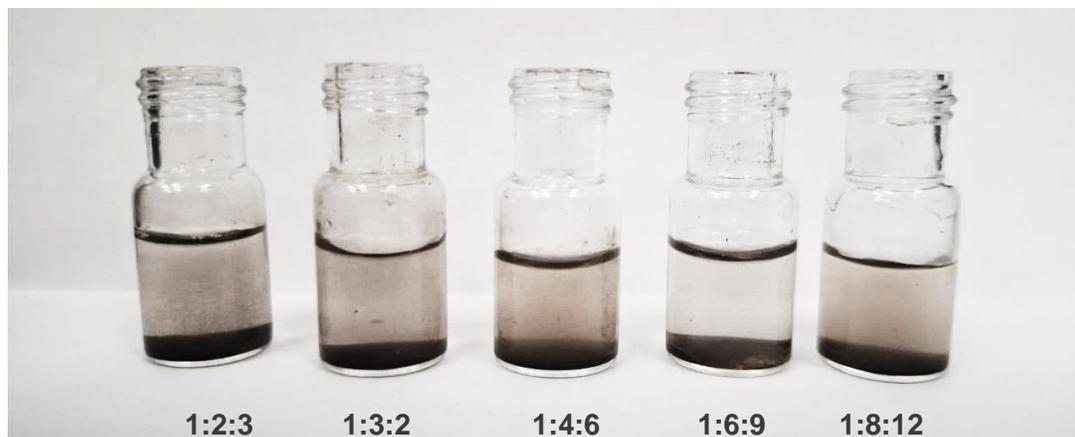


Figura 13. Espectros FTIR  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  GO a) 1:9, b) 1:1 y c) 9:1.

#### 4.2. Síntesis y caracterización de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$

En una segunda etapa, se realizó una evaluación del grado de recubrimiento de la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$  empleando TMOS:APTES evitando la pérdida de paramagnetismo al aplicar un campo magnético externo, puesto que, a pesar de que el recubrimiento no elimina el comportamiento paramagnético de la magnetita, puede reducir la magnetización del compuesto final debido al aumento en el grosor del recubrimiento (Mahdavi et al., 2013). Para ello, se sintetizaron sólidos con las siguientes proporciones  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ :TMOS:APTES 1:2:3, 1:3:2, 1:4:6, 1:6:9 y 1:8:12.

Conforme los resultados obtenidos, la proporción 1:6:9 presentó mejor respuesta al campo magnético aplicado, tal y como se muestrea en la figura 14.



**Figura 14.** Respuesta después de aplicar un campo magnético externo por 5 s a 20 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$  TMO:APTES a proporciones 1:2:3, 1:3:2, 1:4:6, 1:6:9 y 1:8:12, dispersados en 3.0 mL de  $\text{H}_2\text{O}$

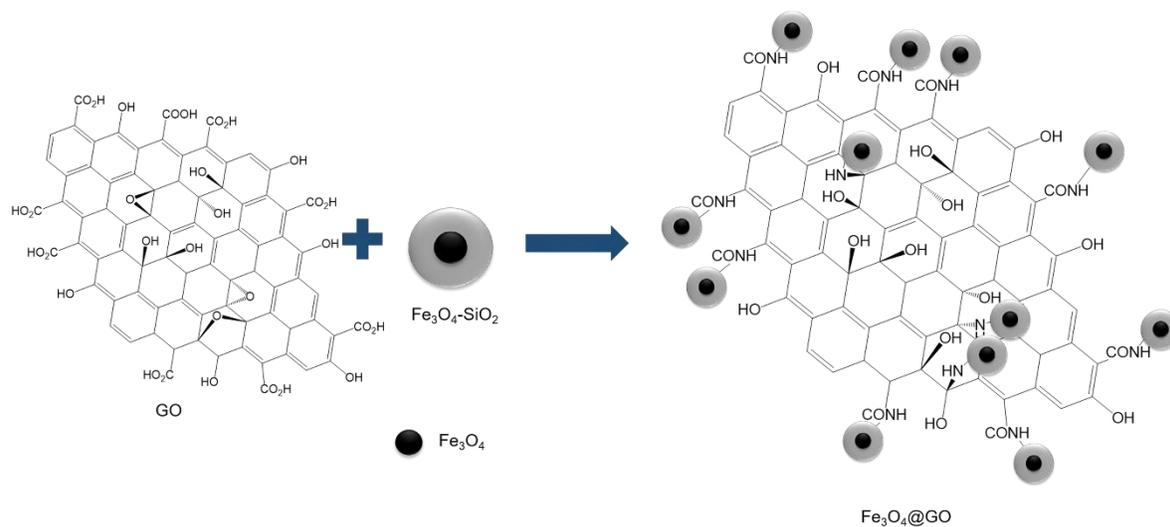
Basado en los resultados anteriores, se evaluó la cantidad de óxido de grafeno en proporciones 1:2, 1:3 y 1:4 en peso con respecto a  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ . Para ello, se hizo uso del óxido de grafeno sintetizado con una proporción de  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_3\text{PO}_4$  de 1:1 debido a su grado de oxidación. La Tabla 2 muestra que el mejor rendimiento en peso se obtiene usando una proporción de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO 1:3 lo que puede garantizar que la mayor parte de los grupos aminos del monómero funcional interactúen con los grupos funcionales del GO. Además, presenta buena respuesta al aplicar un campo magnético externo.

**Tabla 2.** Rendimiento para la  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ GO.

Proporción ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ :GO)	Rendimiento	
	g	%R
1:2	0.320	43.5
1:3	0.421	52.3
1:4	0.346	39.5

La funcionalización del GO con la magnetita se da principalmente por la formación de enlaces covalentes que presenta el grupo amino terminal (-NH<sub>3</sub>) del APTES y los grupos funcionales del óxido de grafeno, principalmente con los grupos carboxilo, generando enlaces tipo amida mediante una reacción de condensación, que puede ocurrir espontáneamente en presencia de grupos silanol o ser facilitada por activadores como EDC/NHS. Además, los grupos epóxidos presentes sobre la superficie del GO pueden sufrir apertura de anillo por ataque nucleofílico del grupo amino, formando enlaces C–N covalentes y grupos hidroxilo adyacentes (figura 15) (Kasprzak et al., 2018; Marques et al., 2011).

Una vez obtenidos los datos sobre la caracterización a las diferentes proporciones de ácido, la síntesis se continuó empleando el adsorbente GO 1:1; conforme al grado de oxidación, por lo que mediante la metodología sol-gel se obtuvo el adsorbente magnético **Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GO** (figura 15) a la proporción **1:3**.



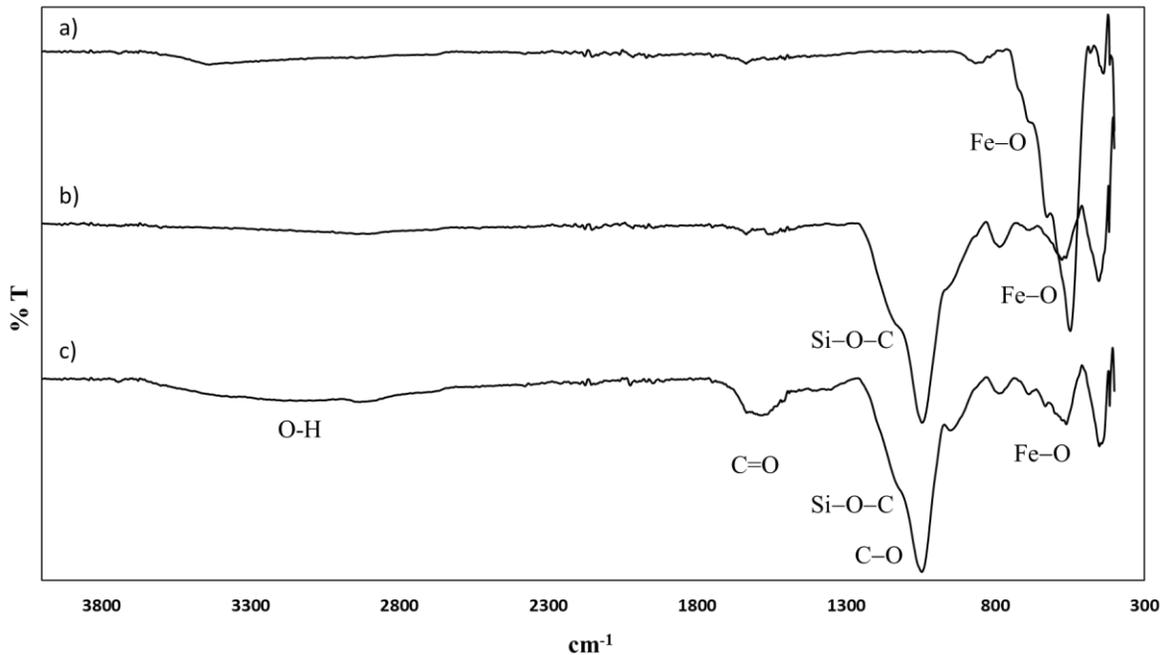
**Figura 15.** Esquema general de la síntesis del adsorbente  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ .

La micrografía obtenida mediante espectroscopia electrónica de barrido, además de mostrar una morfología de tipo hojuelas (pertenecientes al GO), demostró la presencia de cúmulos de partículas correspondientes a la magnetita y a los precursores de sílice utilizados en la síntesis (He et al., 2021; figura 16).



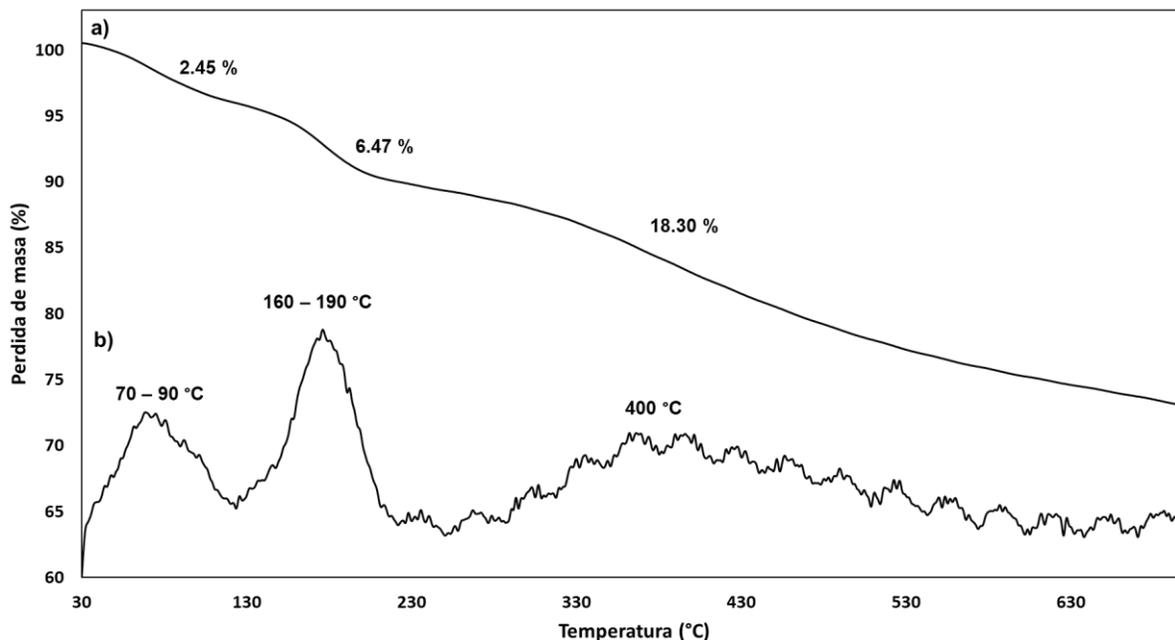
**Figura 16.** Micrografía SEM de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GO

Los espectros FTIR obtenidos para Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ y Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GO (figura 17) presentan bandas con longitudes de onda de: 550 cm<sup>-1</sup> correspondientes a enlaces de estiramiento de tipo Fe–O, lo que confirma la presencia de magnetita. y de 1050 cm<sup>-1</sup> indicativas de enlaces Si–O–C atribuidas a los precursores de sílice (APTES y TMOS). El espectro para Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GO muestra bandas a 2930 cm<sup>-1</sup> correspondientes a enlace O–H, 1584 cm<sup>-1</sup> correspondientes a enlaces C=O de los grupos carboxilo y bandas propias a enlaces C–O a los 1046 cm<sup>-1</sup> de grupos funcionales de tipo epóxido, lo que confirma la funcionalización del GO con la magnetita funcionalizada. Sin embargo, si se compara con el espectro obtenido para su precursor GO 1:1, se aprecia una disminución en la intensidad de la banda O–H, así como la pérdida de la señal alusiva a la presencia de enlaces C–OH (Mohammadnia et al., 2019).



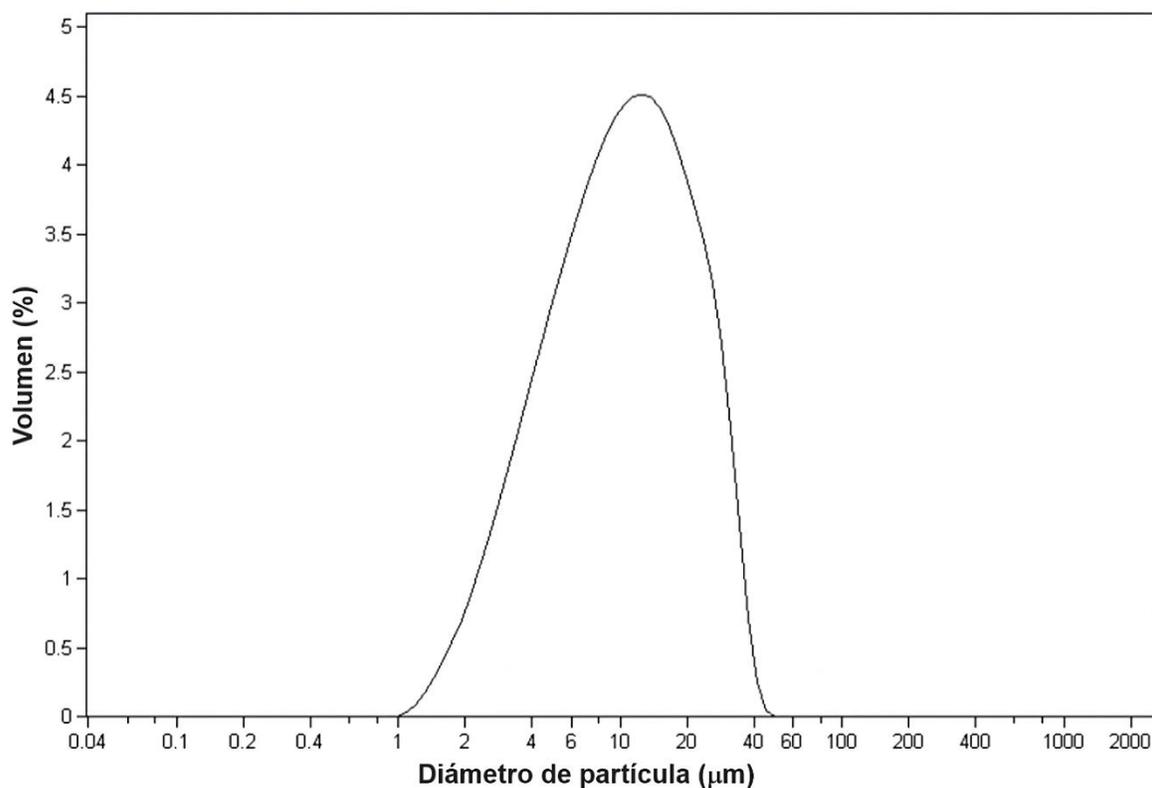
**Figura 17.** Espectros FTIR de a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$  y c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GO$

El análisis termogravimétrico (TGA) y deriva de pérdida de peso del adsorbente  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GO$  se muestran en la figura 18a y 18b respectivamente. En esta se observa una ligera pérdida de masa (2.45 %) a una temperatura de 70 - 90 °C, correspondiente al proceso de deshidratación del adsorbente. A temperaturas de entre 160 - 190 °C se observa otro decrecimiento en la masa del adsorbente (6.47 %) debido a la pérdida de grupos funcionales lábiles del óxido de grafeno (grupos epóxido, carboxilo e hidróxido) en forma de  $\text{CO}_2$ , CO y vapor de agua. La última etapa de degradación del adsorbente se da después de los 400 °C perdiendo 18.3 % de masa correspondiente a la degradación de las láminas de carbono y de las partículas del recubrimiento, obteniendo como residuo final óxidos de hierro y remanente de  $\text{SiO}_2$ . La primera derivada del análisis termogravimétrico permite conocer la temperatura donde la pérdida de masa es más rápida, por lo que se infiere que la mayor descomposición térmica ocurre a temperaturas de entre 160 - 190 °C, mientras que a temperaturas superiores a 400 °C la pérdida de masa es más lenta lo que indica una mayor estabilidad térmica del material remanente (Gao, 2015; Li et al., 2016; Rudolph et al., 2012).



**Figura 18.** a) Análisis termogravimétrico (TGA) para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  y b) primera derivada de la pérdida de masa.

El tamaño de partícula del adsorbente  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  (figura 19) mostró un diámetro promedio centrado de  $12.46 \mu\text{m}$ , con un perfil unimodal, lo que puede indicar que el adsorbente es homogéneo. La mayor parte del volumen de partículas se concentra entre  $1.0 - 50.0 \mu\text{m}$ , lo que indica una distribución relativamente estrecha. Lo anterior concuerda con trabajos como Zhang et al. (2009) en el que se obtienen tamaños de partícula de entre  $5 - 590 \mu\text{m}$  para las láminas de GO y se comprueba que a medida que se utilizan tiempos de oxidación más largos y más oxidantes, el tamaño medio de las láminas de GO disminuye (Pan y Aksay, 2011; Zhang et al., 2009).



**Figura 19.** Distribución del tamaño de las partículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GO.

Para evaluar la capacidad de adsorción, afinidad y modo de interacción del adsorbente Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@GO con las tetraciclinas se realizaron isotermas de adsorción basadas en los modelos de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich y análisis Scatchard. Para ello se puso en contacto 10.0 mg del adsorbente magnético con 1.0 mL de una solución estándar de TCs, en intervalo de concentración de 1.00-30.0 mg L<sup>-1</sup> para TC, OT y DT, y de 20.0 - 60.0 mg L<sup>-1</sup> para CT, por 5 min.

Los resultados obtenidos para cada modelo se muestran en la Tabla 3, en la que se exponen valores de capacidad máxima de adsorción ( $q_{max}$ ) de 1.16 - 7.66 mg g<sup>-1</sup> para cada TCs según el modelo de Langmuir y de 1.05 - 8.00 mg g<sup>-1</sup> basado en el análisis Scatchard. Del mismo modo basado en el modelo de Freundlich, ya que los valores del parámetro  $1/n < 1.0$  se demuestra que el proceso de adsorción es favorable, lo que se puede comprobar mediante el valor de  $K_d$  (análisis Scatchard) el cual indica que los analitos tienen una afinidad de buena a moderada con el

adsorbente (Dada et al., 2012; Davenport, 2005). El modelo Dubinin-Radushkevich proporciona información para determinar si el proceso de adsorción es físico ( $E < 8.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) o químico ( $8.0 \text{ kJ mol}^{-1} < E < 16.0 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) dependiendo de los valores de energía (E) obtenidos. Al obtener valores de E de entre  $0.12 - 0.88 \text{ kJ mol}^{-1}$  para cada TCs se puede inferir que el adsorbente lleva a cabo una fisisorción con los analitos (Dada et al., 2012).

**Tabla 3.** Parámetros de adsorción para TCs

	Datos	TC	OT	DT	CT
Langmiur	$q_{\max} \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$	1.80	1.20	1.17	7.66
	$r^2$	0.992	0.983	0.984	0.997
Freundlich	$1/n$	0.442	0.555	0.552	0.712
	$r^2$	0.989	0.992	0.984	0.999
D-R	$E \text{ (kJ/mol)}$	0.880	0.480	0.682	0.127
	$r^2$	0.914	0.963	0.990	0.960
Scatchard	$q_{\max} \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$	1.87	1.99	1.05	8.00
	$K_d \text{ (}\mu\text{M)}$	7.81	15.2	7.87	114.8
	$r^2$	0.917	0.903	0.930	0.967

Para estudiar la cinética de adsorción de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  con las cuatro TCs se utilizaron los modelos de pseudo primer y pseudo segundo orden. Para ello se puso en contacto 10.0 mg del adsorbente magnético con 1.0 mL de una solución estándar de TCs, a una concentración de  $10.0 \text{ mg L}^{-1}$  variando el tiempo de contacto en un intervalo de 0 - 60 min. El estudio se realizó a dos temperaturas diferentes: 20.0 y 35.0 °C. Los resultados obtenidos (Tabla 4) muestran que los datos experimentales presentan un mejor ajuste al modelo de pseudo segundo orden con coeficientes de determinación ( $r^2$ ) mayores a 0.998, lo que indica que el proceso de adsorción entre  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  y las TCs se basa en interacciones de tipo  $\pi - \pi$ , fuerzas de Van der Waals o enlaces covalentes, además el modelo explica que la velocidad de adsorción depende de la disponibilidad de sitios activos en el adsorbente y no de la concentración del analito (Gao et al., 2012; Ho y McKay, 1999). Empleando este

modelo, se calcularon valores de capacidad de adsorción ( $q_e$ ) obteniendo valores de entre 0.6954 - 1.005  $\text{mg g}^{-1}$  y constantes de velocidad de adsorción de 2.432 - 5.884  $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$  para TC, CT, OT y DT a una temperatura de 20.0 °C mientras que al incrementar la temperatura se obtienen valores de  $q_e$  entre 0.5579 - 1.005  $\text{mg g}^{-1}$  lo que podría indicar que cuando la temperatura incrementa la capacidad de adsorción disminuye. En ambos casos, los valores de  $q_e$  son muy parecidos a los valores de capacidad de adsorción experimental  $q_{e \text{ exp}}$  lo que demuestra que modelo de pseudo segundo orden se ajusta a los datos experimentales obtenidos (Gao et al., 2012; Mohammadnia et al., 2019).

**Tabla 4.** Estudios cinéticos de adsorción

		20.0 °C				35.0 °C			
		TC	CT	OT	DT	TC	CT	OT	DT
1er orden	$r^2$	0.5394	0.6982	0.1915	0.2221	0.2470	0.4840	--	0.4440
	$q_{e \text{ exp}}$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	0.8747	1.000	0.7322	0.7079	0.8110	1.000	0.6040	0.5621
2do orden	$q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	0.8650	1.005	0.7200	0.6954	0.8051	1.005	0.6014	0.5579
	$k_2$ ( $\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$ )	2.432	3.252	3.919	5.884	12.37	3.071	-3.372	-2.486
	$r^2$	0.9990	0.9999	0.9987	0.9986	0.9998	0.9998	0.9987	0.9987

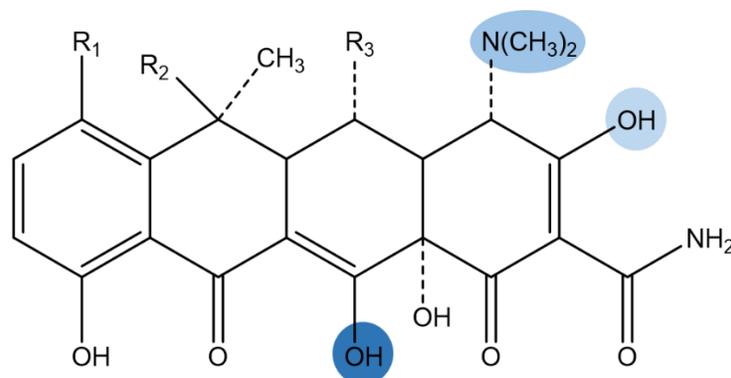
### 4.3. Optimización de la metodología MSPE

#### 4.3.1. Evaluación de pH

Para garantizar la obtención de porcentajes de extracción competitivos es necesario considerar variables como el pH ya que de este depende la especie a la que se encuentren los analitos en solución y la carga que poseen los grupos funcionales presentes en el adsorbente. Por lo tanto, el pH condiciona el tipo de interacción que presenta el adsorbente con los analitos.

Las TCs poseen tres constantes de disociación a valores aproximados a 3, 7 y 9 (figura 20; Tabla 5), por lo que a pH superiores a 9 la especie se encuentra en su

forma negativa, a pH menores a 3 se encuentran cargadas positivamente y en un rango de 3-7 se encuentran en su forma de zwitterion.



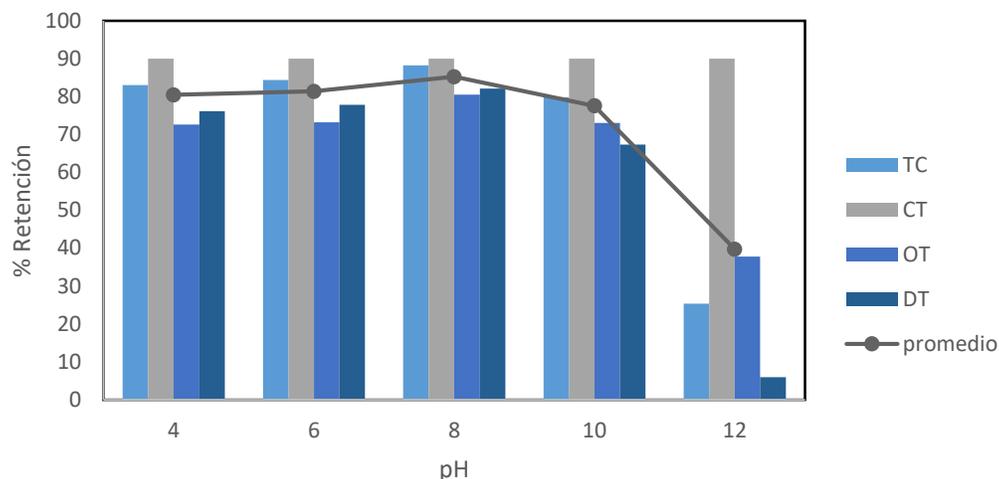
**Figura 20.** Estructura de los antibióticos TCs (TC, CT, OT, DT).

**Tabla 5.** Valores de pK<sub>a</sub> de las TCs (TC, CT, OT, DT) (Ibarra et al., 2011).

Nombre	Simb	Grupos funcionales			pK <sub>a</sub>		
		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	1	2	3
<b>Tetraciclina</b>	TC	-H	-OH	-H	3.2	7.5	8.9
<b>Clortetraciclina</b>	CT	-Cl	-OH	-H	3.3	7.6	9.3
<b>Oxitetraciclina</b>	OT	-H	-OH	-OH	3.3	7.8	9.6
<b>Doxiciclina</b>	DT	-H	-H	-OH	3.0	8.0	9.2

Considerando la anterior se evaluó la retención que presenta el adsorbente al poner en contacto 20.0 mg de este con 1.0 mL de la solución de TCs a una concentración de 5.0 mg L<sup>-1</sup>, un tiempo de contacto de 5 min y a valores de pH de 4, 6, 8, 10 y 12. En la figura 21 se observa como a un pH de 12.0 los porcentajes de retención disminuyen un 50 % para TC, OT y DT. Si bien se explica que la principal interacción entre el GO y las TCs se da por interacciones del tipo  $\pi$ - $\pi$ , debido a que, a pH altos tanto los analitos como los grupos funcionales del GO se encuentran cargados negativamente, la repulsión entre ambas especies dificulta que las TCs sean retenidas. De este modo se explica como a valores de pH 4.0, 6.0 y 8.0, se presenta una mejor retención ya que al estar a un pH más neutro, además de las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$ , se favorecen las interacciones electrostáticas entre las

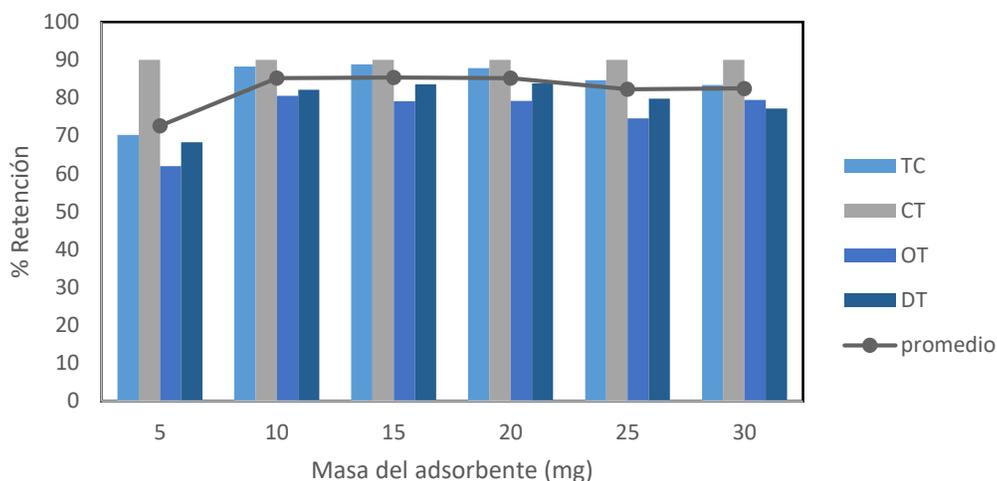
especies positivas y las negativas. Se toma pH 8 como pH óptimo de extracción debido a que presenta los valores de retención más altos (Gao et al., 2012).



**Figura 21.** Evaluación del efecto del pH en la remoción de TCs con  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GO$ .

#### 4.3.2. Evaluación de masa del adsorbente

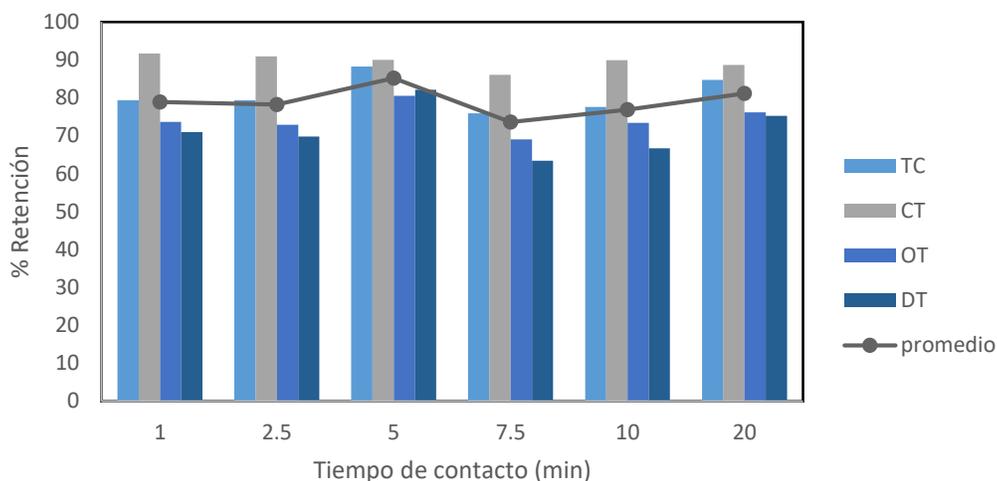
La cantidad de adsorbente empleada durante el proceso de MSPE condiciona la cantidad de sitios activos que hay disponibles para que el adsorbente interactúe con las TCs. Por ello, se realizó la evaluación de masa de adsorbente en un intervalo de 5.0 - 30.0 mg con 1.0 mL de la solución de TCs a  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  a un pH de 8, con un tiempo de contacto de 5 min. La figura 22 muestra como los mayores porcentajes de extracción se dan cuando se usan 15.0 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@GO$  (85.4 % de retención en promedio). Sin embargo, la diferencia entre este valor y el obtenido al emplear 10.0 mg de adsorbente (85.2 % de retención en promedio) no es relevante por lo que se toma 10.0 mg como masa óptima para reducir el gasto de adsorbente.



**Figura 22.** Evaluación del efecto de masa del adsorbente en la remoción de TCs con  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ .

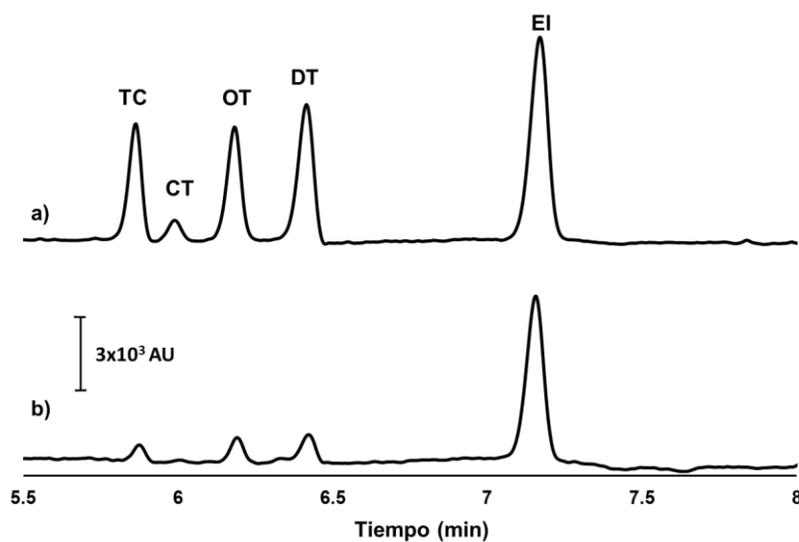
#### 4.3.3. Evaluación de tiempo de contacto

Para evaluar el tiempo de contacto entre  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  y la solución de TCs a una concentración de  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  a pH 8 se colocaron 10.0 mg del adsorbente con 1.0 mL de la solución de TCs en un intervalo de tiempo de 1.0 – 20.0 min. Los resultados obtenidos (figura 23) muestran que mejores porcentajes de retención se logran empleando un tiempo de contacto de 5.0 min con un porcentaje promedio de 85.2 %, mientras que a mayores tiempos de contacto se observa una variación de un 4 hasta un 11.3% en la retención de los analitos de interés. Es por ello, se toman 5.0 min como tiempo de contacto óptimo.



**Figura 23.** Evaluación tiempo de contacto e en la remoción de TCs con  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ .

La figura 24a muestra el electroferograma de una solución estándar de TC, CT, OT y DT con estándar interno a una concentración de  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$ , mientras que la figura 24b expone el electroferograma de la misma solución estándar de TCs pero después del proceso de MSPE a las condiciones óptimas ( $\text{pH}= 8$ ,  $10 \text{ mg}$  de adsorbente y tiempo de contacto de  $5.0 \text{ min}$ )



**Figura 24.** Electroferograma de a) solución estándar de TC, CT, OT y DT con EI ( $5.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) y b) solución de TC, CT, OT y DT ( $5.0 \text{ mg L}^{-1}$ ) después del proceso de MSPE a las condiciones óptimas de extracción ( $\text{pH}= 8.0$ ,  $10.0 \text{ mg}$  de adsorbente y tiempo de contacto de  $5.0 \text{ min}$ ).

#### 4.3.4. Análisis de interferentes

Al trabajar con muestras complejas, como lo es la leche, la presencia de interferentes dentro de la matriz de muestra puede afectar la eficiencia de remoción de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  debido a que estos compuestos pueden ocupar sitios activos del adsorbente y disminuir la extracción de los analitos de interés. Por ello, se evaluó el proceso de remoción de las tetraciclinas con  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  en presencia de AINEs (Naproxeno y Acetaminofén), y sales de calcio y magnesio ( $\text{CaCO}_3$  y  $\text{MgCl}$ ) en concentraciones de 5.0, 10.0 y 20.0  $\text{mg L}^{-1}$ . Para ello, se puso en contacto (por 5 min) 10.0 mg del adsorbente magnético con 1.0 mL de la solución de AINEs/TCs,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ /TCs manteniendo la concentración de las TCs constante (5.0  $\text{mg L}^{-1}$ ).

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos en cada caso. Como se observa, al aumentar la concentración de AINEs en la muestra los porcentajes de remoción disminuyen, lo que permite inferir que la presencia de estos compuestos interfiere en el proceso de remoción de tetraciclinas. Caso contrario, al aumentar la concentración de las sales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  los porcentajes de remoción incrementan lo que indica que la presencia de iones favorece la remoción por efecto de salting-out.

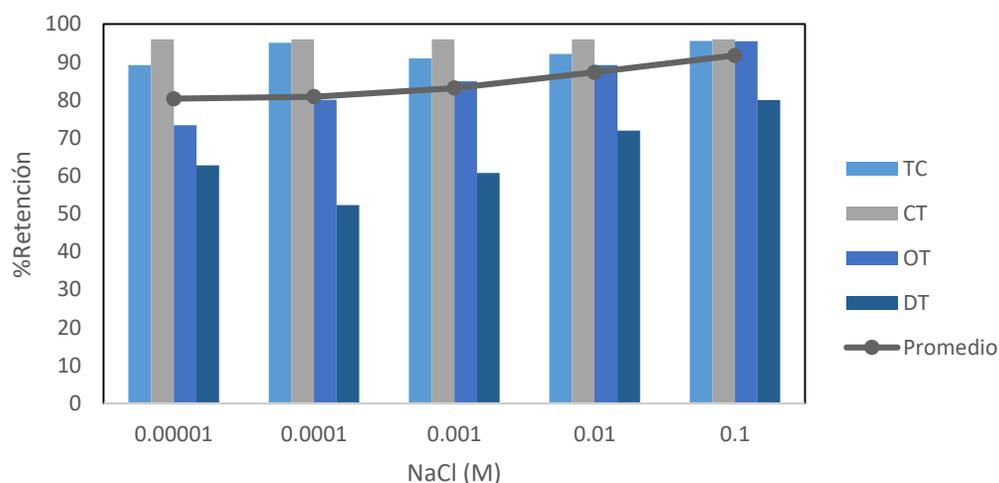
**Tabla 6.** Porcentajes de remoción en la evaluación de interferentes

Interferente	$\text{mg L}^{-1}$	TC	CT	OT	DT	Promedio
Naproxeno y Acetaminofén	5	78.6	98.7	67.2	68.7	78.6
	10	69.2	98.7	41.4	43.6	63.6
	20	51.1	98.7	27.1	27.6	51.5
$\text{Ca}^{2+}$ y $\text{Mg}^{2+}$	5	96.1	98.7	89.6	79.5	91.3
	10	98.7	98.7	94.9	88.0	95.4
	20	98.9	98.7	98.2	88.5	96.7

#### 4.3.5. Fuerza iónica

Para evaluar el efecto de la fuerza iónica en el proceso de remoción se prepararon soluciones estándar de TCs (5.0  $\text{mg L}^{-1}$ ) las cuales contenían  $\text{NaCl}$  a diferentes concentraciones (en un intervalo de  $1 \times 10^{-5}$  -  $1 \times 10^{-1}$  M). En la figura 25 se ilustran

los resultados obtenidos. En estos se observa cómo la eficiencia de remoción de TCs aumenta al incrementar la concentración de NaCl logrando obtener porcentajes promedio de remoción de hasta 91.8 % para los cuatro analitos con la mayor concentración de la sal. Este efecto, conocido como salting-out, se da debido a que la sal en solución puede aumentar el coeficiente de actividad de las TCs lo que disminuye su solubilidad en agua y promueve su adsorción (Li et al., 2016).



**Figura 25.** Evaluación del efecto de la fuerza iónica en la remoción de TCs con  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ .

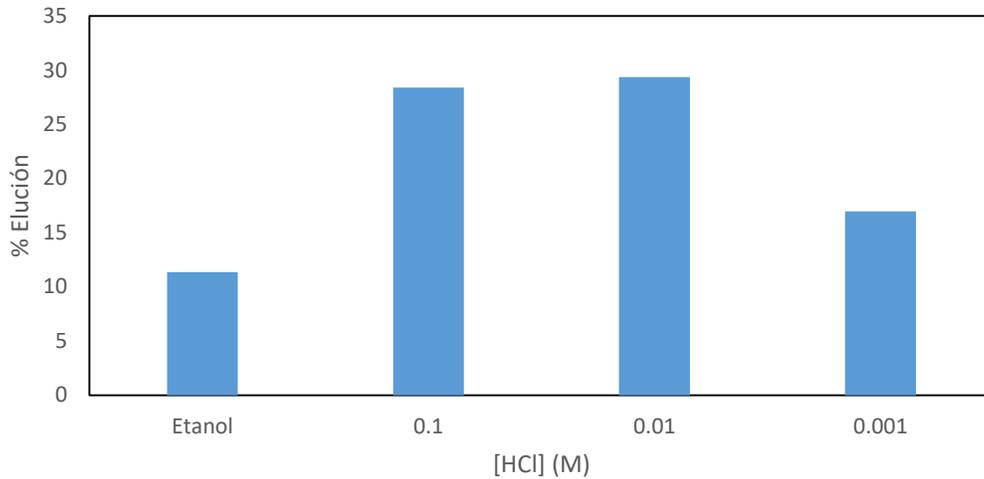
#### 4.4. Pruebas de Elución

Dentro de la adsorción, algunos de los materiales empleados como adsorbentes presentan características que permiten su reutilización ya que son capaces de liberar los analitos adsorbidos. Por ello, se realizaron pruebas de elución para el  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ . Para esta etapa, se comenzó realizando pruebas con cuatro eluyentes diferentes: acetona, metanol, acetonitrilo y etanol. Para cada prueba se puso en contacto 10.0 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  cargado con TCs a una concentración de  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  con 1.0 mL de cada disolvente manteniendo en contacto por 5.0 min. Posteriormente el solvente fue evaporado a sequedad para después reconstituir en 1.0 mL de agua, filtrar y analizar por CE. En la Tabla 7 se muestran los porcentajes de elución obtenidos para los cuatro solventes utilizados con respecto al porcentaje de retención del adsorbente a las condiciones óptimas.

**Tabla 7.** Porcentaje de elución de TCs

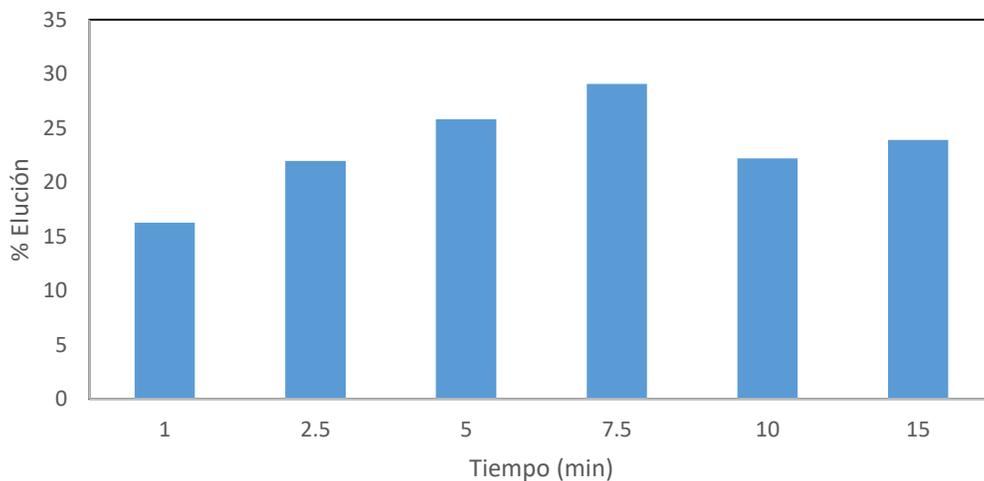
	<b>TC</b>	<b>CT</b>	<b>OT</b>	<b>DT</b>
<b>Acetona</b>	13.32	0	6.03	7.72
<b>Metanol</b>	13.04	0	8.79	6.55
<b>Acetonitrilo</b>	9.59	0	2.37	4.94
<b>Etanol</b>	23.75	8.10	18.99	17.57

Debido a la polaridad que presentan las TCs, por los grupos funcionales en su estructura, los solventes polares son capaces de disminuir las interacciones que tienen con el GO lo que propicia su elución. Basándose en los datos obtenidos, el etanol es el eluyente que muestra mejores porcentajes de recuperación de las TCs. Por otro lado, y conforme a las interacciones adsorbente-analito, ya que la forma química de las tetraciclinas está condicionada por el pH del sistema, se realizaron pruebas con el eluyente a pH ácidos. Para ello se prepararon soluciones de HCl en etanol a tres concentraciones diferentes ( $1 \times 10^{-1}$ ,  $1 \times 10^{-2}$  y  $1 \times 10^{-3}$  M). La figura 26 muestra que la elución se mejora de forma moderada con una solución de Etanol/HCl  $1 \times 10^{-2}$  M con la cual se obtiene un porcentaje de recuperación promedio de TCs de casi 29.0 %. A estas condiciones la solución se encuentra a un pH aproximado de 3.0 por lo que se espera que las TCs presenten cargas positivas en su estructura lo que genere repulsión con el GO que, a pH ácidos, posee sus grupos funcionales protonados (Gao et al., 2012).



**Figura 26.** Porcentajes promedio de elución empleando soluciones etanólicas de HCl.

Finalmente se realizaron pruebas de tiempo de contacto para optimizar el proceso de elución y garantizar los mejores porcentajes de recuperación. Para ello se evaluó un intervalo de tiempo de 1 - 15 min empleando la solución Etanol/HCl  $1 \times 10^{-2}$  M como eluyente. Los porcentajes de elución promedio para cada tiempo se presentan en la figura 27, la cual muestra que a un tiempo de 7.5 min se alcanza un porcentaje promedio de elución de 29.0 %.



**Figura 27.** Porcentajes promedio de elución empleando solución Etanol/HCl  $1 \times 10^{-2}$  M a diferentes tiempos de contacto.

#### 4.5. Parámetros analíticos

Los parámetros analíticos de la metodología MSPE-CE se evaluaron bajo las condiciones óptimas. Para ello, se prepararon soluciones de 200.0 mL de TC, OT y DT a concentraciones en un intervalo de 75.0 – 350.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Cada solución se puso en contacto con 150.0 mg de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  (previamente activado) por 0.5 h en agitación constante para después eliminar interferentes con tres lavados con agua desionizada y finalmente eluir con 5.0 mL de etanol/HCl  $1 \times 10^{-2}$  M. los resultados obtenidos se exponen en la Tabla 8. La relación lineal en el intervalo de concentración estudiado presenta un  $r^2 > 0.99$  para las tres TCs. Los límites de detección (LOD; S/N = 3.29) se encuentran en un intervalo de 32.3 - 44.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ , mientras que los límites de cuantificación (LOQ; S/N = 10) van de 98.2 - 135.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  para TC, OT y DT.

Finalmente se evaluó la repetitividad intra e inter-día a una concentración de 10.0  $\text{mg L}^{-1}$  obteniendo valores de desviación estándar relativa (% RSD) inferiores a 10.0 % en todos los casos.

**Tabla 8.** Parámetros analíticos

		TC	OT	DT
<b>Coefficiente de correlación (<math>r^2</math>)</b>		0.995	0.992	0.996
<b>Ordenada</b>	<b><math>b_0 \pm ts(b_0)</math></b>	0.00754 $\pm$ 0.0121	0.00928 $\pm$ 0.0248	0.0365 $\pm$ 0.0628
<b>Sensibilidad analítica</b>	<b><math>b_1 \pm ts(b_1)</math></b>	0.0004 $\pm$ 0.00005	0.0003 $\pm$ 0.00009	0.0012 $\pm$ 0.00023
<b>LOD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>		32.98	44.45	32.30
<b>LOQ (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>		100.25	135.13	98.17
<b>Repetitividad (%RSD n=3 5.0 <math>\text{mg L}^{-1}</math>)</b>	<b>Intra día</b>	6.18	7.81	2.22
	<b>Inter día</b>	7.14	8.03	3.27

#### **4.6. Protocolo**

El consumo de alimentos contaminados de residuos de TCs representa un riesgo para la salud pública, por lo que organismos internacionales como la FDA y el Codex Alimentarius han establecido límites máximos de residuos (MRLs) para estos compuestos en productos lácteos.

La FDA fija un límite combinado de  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$  para TC, CT y OT, mientras que la Unión Europea establece un MRL individual de  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  (Rodríguez et al., 2010). La metodología desarrollada permite la detección de estos antibióticos en concentraciones menores a las normadas por lo que se propone su empleo en la determinación de TCs en muestras de leche comercial bajo las condiciones optimizadas.

##### **4.6.1. Pretratamiento de muestras de leche**

Las muestras de leche se recolectan, se almacenan a  $4.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  y analizan dentro de los 3 días posteriores a su recolección o apertura del tetra pak. Como primer paso de pretratamiento se eliminan de proteínas presentes en la matriz láctea en medio ácido.

Para esto, a  $300.0 \text{ mL}$  de leche se adicionan  $1.5 \text{ mL}$  de ácido acético concentrado. La mezcla se calienta a  $60.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$  durante  $20.0$  minutos con agitación constante para inducir la precipitación de las proteínas. Posteriormente, se realiza una centrifugación a  $4000.0 \text{ rpm}$  durante  $5.0$  minutos para separar el suero, cuidadosamente decantado y reservado para el proceso de extracción.

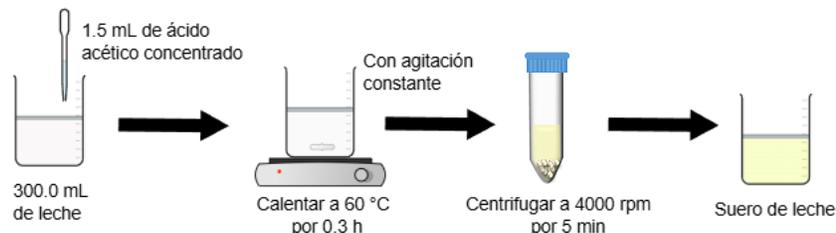
##### **4.6.2. Extracción y preconcentración**

La extracción y preconcentración de las TCs se realiza mediante MSPE empleando  $150.0 \text{ mg}$  del adsorbente  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$  previamente activado con  $15.0 \text{ mL}$  de metanol y  $15.0 \text{ mL}$  de agua desionizada (tres lavados de  $5.0 \text{ mL}$  de cada disolvente). Posteriormente, el adsorbente se aísla magnéticamente y se decanta el sobrenadante.

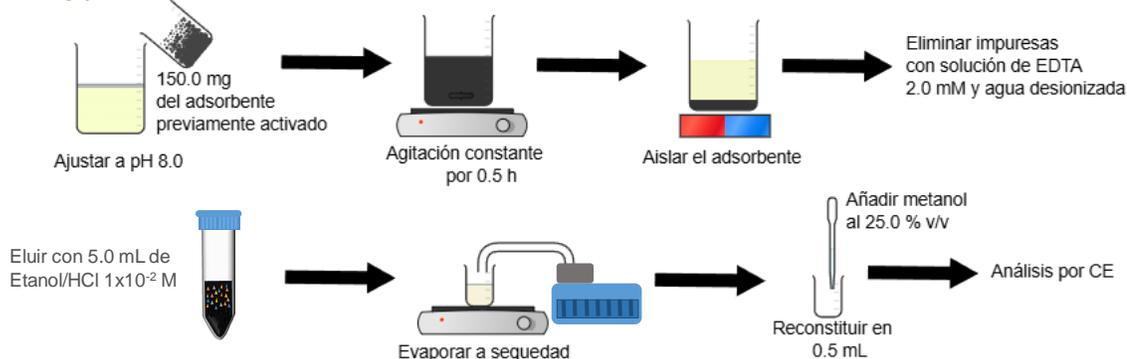
Posteriormente se ajusta el pH al óptimo de extracción a 200.0 mL del suero previamente obtenido (pH = 8.0) y se coloca en contacto con el adsorbente activado en un vaso de precipitados de 600.0 mL. La mezcla se agita durante 0.5 h a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de contacto, el adsorbente se aísla magnéticamente y se eliminan interferentes presentes en la matriz mediante lavados con dos alícuotas de 5.0 mL de una solución de EDTA 2.0 mM y tres alícuotas de 5.0 mL de agua desionizada.

Finalmente, la elusión de las tetraciclinas se realiza utilizando 5.0 mL de una mezcla etanol/HCl  $1 \times 10^{-2}$  M con un tiempo de contacto de 7.5 min. La fracción eluida se lleva a sequedad por evaporación y el residuo se reconstituye con 0.5 mL de agua desionizada y se añade metanol al 25 % (v/v) para su análisis posterior. La figura 28 esquematiza el proceso de pretratamiento, extracción y preconcentración de la muestra.

#### Pretratamiento de la muestra



#### Extracción y preconcentración



**Figura 28.** Preparación de muestra de leche mediante MSPE para su análisis por CE.

#### **4.6.3. Análisis por electroforesis capilar**

El análisis se realiza mediante electroforesis capilar de zona con detección UV. Las condiciones experimentales se optimizaron previamente, estableciendo los parámetros de separación y detección más adecuados para lograr una buena resolución entre los analitos de interés.

El análisis se realiza bajo las siguientes condiciones: capilar de sílice fundida, fase normal con voltaje de separación de 13.0 kV, longitud de onda del detector de 360 nm y electrolito soporte fosfato de sodio (30.0 mM), EDTA (2.0 mM), 2-propanol al 2.0 % (v/v) y metanol al 10 % (v/v) ajustado a pH= 12.0 con solución NaOH 1.0 M. El capilar se acondicionó entre cada análisis con NaOH 1.0 M (4.0 min), NaOH 0.1 M (2.0 min), agua desionizada (2.0 min) y electrolito soporte (4.0 min).

## V. CONCLUSIONES

## 5. Conclusiones

- El grado de oxidación en partículas de GO está relacionada de forma directa con proporción de ácido sulfúrico en la mezcla  $H_2SO_4/H_3PO_4$  durante la síntesis por el método de Hummers.
- El grado de oxidación del material más alto fue de 0.645 para GO con proporción 1:1. El análisis por SEM permitió observar la forma en hojuela característica del adsorbente.
- La capacidad de adsorción, afinidad y tipo de interacción entre el adsorbente  $Fe_3O_4@GO$  y TCs fue determinado mediante los modelos de Langmuir, Freundlich, Dubinin-Radushkevich y análisis Scatchard. Conforme los valores obtenidos se determinó un proceso de adsorción favorable, afinidad de buena a moderada, y un proceso mediante fisorción en la que participan interacciones de Van der Waals, electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones  $\pi - \pi$ .
- En el estudio cinético, los datos mostraron un ajuste al modelo de pseudo segundo orden ( $R^2 > 0.998$ ), lo que sugiere que el proceso depende de la cantidad de sitios activos disponibles.
- Bajo las condiciones óptimas para MSPE (pH= 8, 10.0 mg de adsorbente y tiempo de contacto de 5 minutos) se alcanzó un porcentaje promedio de extracción de 85.2 % para 1.0 mL de una solución a  $5.0 \text{ mg L}^{-1}$  de TC, CT, OT y DT.
- La metodología MSPE-CE propuesta demuestra ser una alternativa viable en la determinación de residuos de TC, OT y DT en muestras complejas como es el caso de muestras de leche, confirme los LODs de  $32.3 - 44.5 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  y LOQs de  $98.2 - 135.1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ , los cuales permiten detectar TCs en concentraciones menores a las establecidas por la normatividad.
- La metodología propuesta es comparable con las técnicas analíticas reportadas cumpliendo con normativas internacionales (FDA y *Codex Alimentarius*) con MRL menores a  $0.3 \text{ mg L}^{-1}$ , para EUA y  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$  para la Unión Europea

## **6. Perspectivas**

Conforme a los resultados obtenidos es necesaria la evaluación del porcentaje de recuperación en muestras de leche blanco dopadas a dos niveles de concentración, lo que permitirá valorar la exactitud del método.

La metodología propuesta será validada en el análisis de residuos de TC's en 8 muestras de leche comercial conforme los parámetros analíticos obtenidos cumpliendo con normativas internacionales (FDA y *Codex Alimentarius*).

## 7. Bibliografía

- Abdulghani, A. J., Jasim, H. H., y Hassan, A. S. (2013). Determination of Tetracycline in Pharmaceutical Preparation by Molecular and Atomic Absorption Spectrophotometry and High Performance Liquid Chromatography via Complex Formation with Au(III) and Hg(II) Ions in Solutions. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2013, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2013/305124>
- Al-Gaashani, R., Najjar, A., Zakaria, Y., Mansour, S., y Atieh, M. (2019). XPS and structural studies of high quality graphene oxide and reduced graphene oxide prepared by different chemical oxidation methods. *Ceramics International*, 45(11), 14439-14448. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.04.165>
- Altan, C. L., Lenders, J. J. M., Bomans, P. H. H., De With, G., Friedrich, H., Bucak, S., y Sommerdijk, N. A. J. M. (2015). Partial Oxidation as a Rational Approach to Kinetic Control in Bioinspired Magnetite Synthesis. *Chemistry - A European Journal*, 21(16), 6150-6156. <https://doi.org/10.1002/chem.201405973>
- Andreozzi R, Campanella L, Frayse B, Garric J, Gonnella A, Lo Giudice R, Marotta R, Pinto G, Pollio A (2004) Effects of Advanced oxidation processes (AOPs) on the toxicity of a mixture pharmaceuticals. *Water Science and Technology* 50, 23-28.
- Cao, N., y Zhang, Y. (2015). Study of Reduced Graphene Oxide Preparation by Hummers' Method and Related Characterization. *Journal Of Nanomaterials*, 2015, 1-5. <https://doi.org/10.1155/2015/168125>
- Castagnino, J. M., (2000). Electroforesis capilar. *Bioquimia*, 25(1), 13-32.
- Chen, J., Yao, B., Li, C., y Shi, G. (2013). An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon*, 64, 225-229. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.07.055>
- Chopra, I., y 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. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.2.232-260.2001>

- Croubels, S., Baeyens, W., Dewaele, C., y Van Peteghem, C. (1994). Capillary electrophoresis of some tetracycline antibiotics. *Journal of Chromatography A*, 673(2), 267-274. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(94\)85043-7](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)85043-7)
- Dąbrowski, A. (2001). Adsorption — from theory to practice. *Advances in Colloid and Interface Science*, 93(1-3), 135-224. [https://doi.org/10.1016/s0001-8686\(00\)00082-8](https://doi.org/10.1016/s0001-8686(00)00082-8)
- Dada, A. O., Olalekan, A. P., Olatunya, A. M., y Dada, O. J. I. J. C. (2012). Langmuir, Freundlich, Temkin and Dubinin-Radushkevich isotherms studies of equilibrium sorption of Zn<sup>2+</sup> unto phosphoric acid modified rice husk. *IOSR Journal of applied chemistry*, 3(1), 38-45.
- Daghrir, R., y Drogui, P. (2013). Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 11(3), 209-227. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0404-8>
- Davenport, A. P. (Ed.). (2008). *Receptor binding techniques* (Vol. 306). Springer Science & Business Media. <https://doi.org/10.1385/1592599273>
- Dietz, D. D., Abdo, K. M., Haseman, J. K., Eustis, S. L., y Huff, J. E. (1991). Comparative toxicity and carcinogenicity studies of tetracycline and oxytetracycline in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 17(2), 335-346.
- Egirani, D. E., Poyi, N. R., y Shehata, N. (2020). Preparation and characterization of powdered and granular activated carbon from *Palmae* biomass for cadmium removal. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(4), 2443-2454. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02652-w>
- Fontanals, N., Marcé, R., y Borrull, F. (2006). New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal Of Chromatography A*, 1152(1-2), 14-31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.11.077>
- García-Campaña, A. M., Gámiz-Gracia, L., Lara, F. J., Del Olmo Iruela, M., & Cruces-Blanco, C. (2009). Applications of capillary electrophoresis to the determination of antibiotics in food and environmental samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(4), 967-986. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2867-9>

- Gao, Y., Li, Y., Zhang, L., Huang, H., Hu, J., Shah, S. M., y Su, X. (2012). Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*, 368(1), 540-546. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2011.11.015>
- Gao, W. (2015). The chemistry of graphene oxide. *Graphene oxide: reduction recipes, spectroscopy, and applications*, 61-95
- Ghadim, E. E., Manouchehri, F., Soleimani, G., Hosseini, H., Kimiagar, S., y Nafisi, S. (2013). Adsorption Properties of Tetracycline onto Graphene Oxide: Equilibrium, Kinetic and Thermodynamic Studies. *PLoS ONE*, 8(11), e79254. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079254> (Luo et al., 2011)
- He, Y., Yi, C., Zhang, X., Zhao, W., y Yu, D. (2021). Magnetic graphene oxide: Synthesis approaches, physicochemical characteristics, and biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 136, 116191. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116191>
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current opinion in microbiology*, 51, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Hyötyläinen, T. (2009). Critical evaluation of sample pretreatment techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(3), 743-758. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2772-2>
- Ibarra, I. S., Rodriguez, J. A., Miranda, J. M., Vega, M., y Barrado, E. (2011). Magnetic solid phase extraction based on phenyl silica adsorbent for the determination of tetracyclines in milk samples by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2196-2202. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.046>
- Islas, G., Rodríguez, J. A., Perez-Silva, I., Flores-Aguilar, J. F., Santos, E. M., y Ibarra, I. S. (2023). Simple and efficient removal of azo dyes from water samples by dispersive solid-phase micro-extraction employing graphene oxide with high oxygen content. *International Journal of Environmental and Analytical Chemistry*, 105(5), 1172-1184. <https://doi.org/10.1080/03067319.2023.2286306>

- Kasprzak, A., Zuchowska, A., y Poplawska, M. (2018). Functionalization of graphene: does the organic chemistry matter? *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 14, 2018-2026. <https://doi.org/10.3762/bjoc.14.177>
- Klein, N. C., y Cunha, B. A. (1995). Tetracyclines. *Medical Clinics of North America*, 79(4), 789-801. [https://doi.org/10.1016/s0025-7125\(16\)30039-6](https://doi.org/10.1016/s0025-7125(16)30039-6)
- Kowalski, P. (2008). Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47(3), 487-493. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.01.036>
- Krishnamoorthy, K., Veerapandian, M., Yun, K., y Kim, S. (2013). The chemical and structural analysis of graphene oxide with different degrees of oxidation. *Carbon*, 53, 38-49. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2012.10.013>
- Larsson, D. G. J. (2014). Antibiotics in the environment. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 119(2), 108-112. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.896438>
- Li, M., Liu, Y., Zeng, G., Liu, S., Hu, X., Shu, D., Jiang, L., Tan, X., Cai, X., y Yan, Z. (2016). Tetracycline absorbed onto nitrilotriacetic acid-functionalized magnetic graphene oxide: Influencing factors and uptake mechanism. *Journal of Colloid and Interface Science*, 485, 269-279. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2016.09.037>
- Li, Y., Van Schepdael, A., Roets, E., y Hoogmartens, J. (1997). Optimized methods for capillary electrophoresis of tetracyclines. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15(8), 1063-1069. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(96\)01995-4](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(96)01995-4)
- Lin, D., Wang, S., Wu, C., Chen, B., y Liu, R. (2008). Chemical derivatization for the analysis of drugs by GC-MS - A conceptual review. *Journal of Food and Drug Analysis*, 16(1). <https://doi.org/10.38212/2224-6614.2373>
- Liu, S., Yan, L., Zhang, Y., Junaid, M., y Wang, J. (2022). Polystyrene nanoplastics exacerbated the ecotoxicological and potential carcinogenic effects of tetracycline in juvenile grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Science of The Total Environment*, 803, 150027.

- Ma, T., Vickroy, T. W., Shien, J., y Chou, C. (2012). Improved nonaqueous capillary electrophoresis for tetracyclines at subparts per billion level. *Electrophoresis*, 33(11), 1679-1682. <https://doi.org/10.1002/elps.201100485>
- Marques, P., Goncalves, G., Cruz, S., Almeida, N., Singh, M., Grcio, J., y Sous, A. (2011). Functionalized Graphene nanocomposites. En *InTech eBooks*. <https://doi.org/10.5772/18209>
- Mahdavi, M., Ahmad, M. B., Haron, J., Gharayebi, Y., Shamel, K., & Nadi, B. (2013). Fabrication and Characterization of SiO<sub>2</sub>/(3-Aminopropyl)triethoxysilane-Coated Magnetite Nanoparticles for Lead(II) Removal from Aqueous Solution. *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, 23(3), 599-607. <https://doi.org/10.1007/s10904-013-9820-2>
- Mohammadnia, E., Hadavifar, M., y Veisi, H. (2019). Kinetics and thermodynamics of mercury adsorption onto thiolated graphene oxide nanoparticles. *Polyhedron*, 173, 114139. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.114139>
- Mohr, K.I. (2016). History of Antibiotics Research. In: Stadler, M., Dersch, P. (eds) *How to Overcome the Antibiotic Crisis. Current Topics in Microbiology and Immunology*, vol 398. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/82\\_2016\\_499](https://doi.org/10.1007/82_2016_499)
- Naing, N. N., Li, S. F. Y., y Lee, H. K. (2015). Graphene oxide-based dispersive solid-phase extraction combined with in situ derivatization and gas chromatography–mass spectrometry for the determination of acidic pharmaceuticals in water. *Journal of Chromatography A*, 1426, 69-76. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.11.070>
- Nelson, M. L., y Levy, S. B. (2011). The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1241(1), 17-32.
- Niculescu, A., Chircov, C., y Grumezescu, A. M. (2021). Magnetite nanoparticles: Synthesis methods - A comparative review. *Methods*, 199, 16-27. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.018>
- Oka, H., Ito, Y., y Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2), 109-133. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(99\)01316-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(99)01316-3)

- Pan, S., y Aksay, I. A. (2011). Factors Controlling the Size of Graphene Oxide Sheets Produced via the Graphite Oxide Route. *ACS Nano*, 5(5), 4073-4083. <https://doi.org/10.1021/nn200666r>
- Peres, G. T., Rath, S., y Reyes, F. G. R. (2010). A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. *Food control*, 21(5), 620-625.
- Roberts, M. C. (2003). Tetracycline therapy: Update. *Clinical Infectious Diseases*, 36(4), 462-467. <https://doi.org/10.1086/367622>
- Rodriguez, J. A., Espinosa, J., Aguilar-Arteaga, K., Ibarra, I. S., y Miranda, J. M. (2010). Determination of tetracyclines in milk samples by magnetic solid phase extraction flow injection analysis. *Microchimica Acta*, 171(3-4), 407-413. <https://doi.org/10.1007/s00604-010-0428-8>
- Rudolph, M., Erler, J., y Peuker, U. A. (2012). A TGA-FTIR perspective of fatty acid adsorbed on magnetite nanoparticles-Decomposition steps and magnetite reduction. *Colloids and Surfaces a Physicochemical and Engineering Aspects*, 397, 16-23. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2012.01.020>
- Shalaby, A., Salama, N. A., Abou-Raya, S., Emam, W. H., y Mehaya, F. (2010). Validation of HPLC method for determination of tetracycline residues in chicken meat and liver. *Food Chemistry*, 124(4), 1660-1666. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.048>
- Singer, R. S., Finch, R., Wegener, H. C., Bywater, R., Walters, J., y Lipsitch, M. (2003). Antibiotic resistance—the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *The Lancet Infectious Diseases*, 3(1), 47-51. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(03\)00490-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(03)00490-0)
- Tavares, M. F., y McGuffin, V. L. (1994). Separation and characterization of tetracycline antibiotics by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 686(1), 129-142. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(94\)820109014-5](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(94)820109014-5)

- Tabrizian, P., Ma, W., Bakr, A. R., y Rahaman, M. S. (2019). pH-sensitive and magnetically separable Fe/Cu bimetallic nanoparticles supported by graphene oxide (GO) for high-efficiency removal of tetracyclines. *Journal of Colloid and Interface Science*, 534, 549-562. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2018.09.034>
- Tsai, W., Huang, T., Huang, J., Hsue, Y., y Chuang, H. (2009). Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, 1216(12), 2263-2269. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.034>
- Tsuji, K., y Robertson, J. H. (1973). Formation of trimethylsilyl derivatives of tetracyclines for separation and quantitation by gas-liquid chromatography. *Analytical Chemistry*, 45(12), 2136-2140. <https://doi.org/10.1021/ac60334a037>
- Tu, C., Dai, Y., Xu, K., Qi, M., Wang, W., Wu, L., y Wang, A. (2019). Determination of Tetracycline in Water and Honey by Iron (II, III)/Aptamer-Based Magnetic Solid-Phase Extraction with High-Performance Liquid Chromatography Analysis. *Analytical Letters*, 52(10), 1653-1669. <https://doi.org/10.1080/00032719.2018.1560458>
- Vázquez-Garrido, I., Flores-Aguilar, J., Miranda, J., Santos, E., Jardinez, C., y Ibarra, I. (2022). Carbonaceous materials in sample treatment techniques in the determination of pesticides in food and environmental analysis. A review. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 104(16), 4797-4831. <https://doi.org/10.1080/03067319.2022.2115892>
- Vicente, D., y Pérez-Trallero, E. (2010). Tetraciclina, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(2), 122-130. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2009.10.002>
- Yu, B., Bai, Y., Ming, Z., Yang, H., Chen, L., Hu, X., Feng, S., y Yang, S. (2017). Adsorption behaviors of tetracycline on magnetic graphene oxide sponge. *Materials Chemistry and Physics*, 198, 283-290. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2017.05.042>

- Zhang, L., Liang, J., Huang, Y., Ma, Y., Wang, Y., y Chen, Y. (2009). Size-controlled synthesis of graphene oxide sheets on a large scale using chemical exfoliation. *Carbon*, 47(14), 3365-3368. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.07.045>
- Zhou, Y., Bao, Q., Tang, L. A. L., Zhong, Y., & Loh, K. P. (2014). Hydrothermal dehydration for the “green” reduction of exfoliated graphene oxide to graphene and demonstration of tunable optical limiting performance. *Chemistry of Materials*, 21(13), 2950–2956. <https://doi.org/10.1021/cm9006607>