



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE TETRACICLINAS EN LECHE MEDIANTE
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA MAGNÉTICA ACOPLADA A UN SISTEMA DE
ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO**

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE:

QUÍMICO EN ALIMENTOS

PRESENTA:

JOHANAN DEL PINO ESPINOSA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA



Este trabajo de investigación se realizó en los laboratorios de Química Analítica y Electroquímica del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

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

Parte de este trabajo ha sido presentado en:

XI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos (2009), con el trabajo:

“Determinación de tetraciclinas en leche mediante análisis por inyección en flujo”

Primer foro estudiantil “Jóvenes en el desarrollo de la ciencia UAEH-2009” con el trabajo:

“Desarrollo de un sistema de análisis por inyección en flujo para la determinación simultánea de tetraciclinas”

AGRADECIMIENTOS

Con este proyecto culmina una de las etapas más importantes en mi vida, a lo largo de la cual he conocido a muchas personas sin quienes no hubiera sido posible llegar a este momento. Estas son algunas palabras que pretenden agradecer un poco de lo mucho que han aportado a mi vida.

En primer lugar, quiero dar gracias a Dios por las bendiciones que me ha dado, por la fortaleza para enfrentar problemas, y sobre todo por permitirme compartir cada día con mi familia, que ha sido mi sustento, motivación y la causa de mis más grandes alegrías.

Agradezco a mis padres por la mejor herencia que se puede dar a un hijo: una profesión. Doy gracias a mi madre por creer en mí y apoyar mis decisiones, por el esfuerzo que siempre ha hecho por sacarnos adelante, por sus palabras de aliento en el momento indicado y por enseñarme a aprender de mis errores. A ti dedico este éxito en mi vida, porque tu amor y enseñanzas, es lo que siempre me ha alentado a hacer mi mayor esfuerzo por ser una mejor persona.

A mis hermanos Iván, Marifer y Juan, por ser en cada etapa de mi vida mis compañeros de risas, travesuras y lágrimas, y por estar en cada momento importante de mi vida. Los quiero mucho.

A mi asesor de tesis, el Dr. José Antonio Rodríguez Ávila, por el apoyo que recibí siempre para la realización de este proyecto, por compartir sus conocimientos conmigo y sobre todo por brindarme su amistad y confianza.

Agradezco a mis compañeros de laboratorio quienes siempre me ayudaron cuando lo necesité, y por hacer más ameno el trabajo.

A mis amigos agradezco el cariño, apoyo incondicional y los momentos juntos que entre pláticas y risas se olvida cualquier problema. En especial quiero agradecer a Carlos por estar siempre a mi lado compartiendo alegrías, éxitos o tristezas, y sobre todo por no dejarme olvidar que con mi esfuerzo puedo lograr cualquier meta que me proponga.

Las palabras no podrían describir la alegría que siento al terminar esta etapa de mi vida, ni mi agradecimiento a todos ustedes por contribuir en mi formación y crecimiento como persona. Una vez más, gracias.

ÍNDICE

Abreviaturas	I
Índice de Figuras	II
Índice de Tablas	III
1. ANTECEDENTES	
1.1 Historia de los antibióticos	2
1.2 Clasificación de antibióticos	4
1.3 Tetraciclinas	5
1.4 Métodos de análisis de tetraciclinas	7
1.4.1 Espectrofotometría	7
1.4.2 Electroforesis capilar de zona	8
1.4.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución	9
1.5 Introducción a las técnicas de preconcentración	9
1.5.1 Extracción líquido-líquido	10
1.5.2 Extracción en fase sólida	11
1.5.3 Extracción en fase sólida magnética	12
1.6 Introducción a las técnicas de flujo	13
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo general	16
2.2 Objetivos particulares	16
3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	
3.1 Reactivos y soluciones	18
3.2 Preconcentración de las muestras	19
3.2.1 Extracción líquido-líquido	19
3.2.2 Extracción en fase sólida	19
3.2.3 Extracción en fase sólida magnética	20
3.2.3.1 Preparación del soporte magnético	20
3.2.3.2 Extracción	20
3.3 Construcción del sistema FIA	21
3.4 Ciclo analítico del sistema FIA	22
3.4.1 Sistema FIA optimizado empleando MBTH	22
3.4.2 Sistema FIA optimizado empleando AAP	22
3.5 Análisis mediante HPLC	23
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
4.1 Método en discontinuo	25
4.2 Optimización de las variables del sistema FIA	26
4.2.1 Optimización del sistema FIA empleando MBTH	26
4.2.1.1 Variables químicas	26

4.2.1.2 Caudal	28
4.2.1.3 Volumen de inyección	28
4.2.1.4 Longitud de R1	29
4.2.1.5 Longitud de R2	29
4.2.2 Optimización del sistema FIA empleando AAP	30
4.2.2.1 Variables químicas	30
4.2.2.2 Caudal	31
4.2.2.3 Volumen de inyección	32
4.2.2.4 Longitud de R1	33
4.2.2.5 Longitud de R2	33
4.2.3 Parámetros analíticos FIA	34
4.2.4 Evaluación del efecto matriz	35
4.3 Preconcentración de las muestras	36
4.3.1 Extracción líquido-líquido	36
4.3.2 Extracción en fase sólida	37
4.3.3 Extracción en fase sólida magnética	37
4.3.3.1 Caracterización del soporte magnético	37
4.3.3.2 Optimización de la metodología	39
4.3.3.3 Parámetros analíticos y recuperaciones	42
4.4 Análisis de muestras	44
5. CONCLUSIONES	48
6. BIBLIOGRAFÍA	50

ABREVIATURAS

IDA	Ingesta diaria admisible
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
SPE	Extracción en fase sólida
MSPE	Extracción en fase sólida magnética
FIA	Análisis por inyección en flujo
AAP	4-Aminoantipirina
MBTH	3-Metil-2-benzotiazolina hidrazona
E°	Potencial normal
u.a.	Unidades arbitrarias
nm	Nanómetro
µm	Micrómetro
mm	Milímetro
cm	Centímetro
µg	Microgramo
mg	Miligramo
g	Gramo
kg	Kilogramo
µl	Microlitro
ml	Mililitro
l	Litro
min	Minuto
h	Hora
Uv-Vis	Ultravioleta visible
TC	Tetraciclina
Abs	Absorbancia
BET	Brunauer-Emmett-Teller
BJH	Barrett-Joyner-Halenda
TPD	Diseño de parámetros de Taguchi

ÌNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de las principales tetraciclinas	6
Figura 2.	Elementos básicos de un sistema de análisis por inyección en flujo	13
Figura 3.	Esquema del sistema FIA utilizado	21
Figura 4.	Reacción cromófora entre el fragmento fenólico de las tetraciclinas y los diferentes agentes derivatizantes	22
Figura 5.	Espectro visible obtenido de las reacciones de acoplamiento	25
Figura 6.	Variación de la absorbancia en función de la concentración de Ce(IV)	27
Figura 7.	Variación de la absorbancia en función de la concentración de MBTH	27
Figura 8.	Variación de la absorbancia en función del caudal (empleando MBTH)	28
Figura 9.	Variación de la absorbancia en función del volumen de inyección (empleando MBTH)	29
Figura 10.	Variación de la absorbancia en función de la concentración de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$	30
Figura 11.	Variación de la absorbancia en función de la concentración de AAP	31
Figura 12.	Variación de la absorbancia en función del caudal (empleando AAP)	32
Figura 13.	Variación de la absorbancia en función del volumen de inyección (empleando AAP)	32
Figura 14.	Diagrama representativo obtenido para la tetraciclina utilizando MBTH como derivatizante	35
Figura 15.	(a) Isotherma de adsorción-desorción de N_2 y (b) distribución del tamaño del poro del soporte magnético	38
Figura 16.	Distribución del tamaño de partícula para el soporte magnético	38
Figura 17.	Efecto de la interacción de factores control en los valores de tetraciclinas	42
Figura 18.	FIAgrama correspondiente a la inyección de soluciones estándar de tetraciclina en leche	43
Figura 19.	Cromatograma de la solución estándar de oxitetraciclina, comparado con muestras de leche analizadas mediante SPE-HPLC y MSPE-HPLC	45

ÌNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Absorbancia en funci3n de la longitud de R1 (empleando MBTH)	29
Tabla 2.	Absorbancia en funci3n de la longitud de R2 (empleando MBTH)	30
Tabla 3.	Absorbancia en funci3n de la longitud de R1 (empleando AAP)	33
Tabla 4.	Absorbancia en funci3n de la longitud de R2 (empleando AAP)	33
Tabla 5.	Condiciones 3ptimas de las variables del sistema FIA	34
Tabla 6.	L3mites de detecci3n y sensibilidades anal3ticas obtenidos para las tetraciclinas evaluadas utilizando AAP y MBTH	34
Tabla 7.	Recuperaciones obtenidas mediante extracci3n l3quido-l3quido	36
Tabla 8.	Recuperaciones obtenidas mediante extracci3n en fase s3lida	37
Tabla 9.	Factores y niveles elegidos para la optimizaci3n	40
Tabla 10.	Matriz de dise1o ortogonal $L_9(3^4)$ utilizado para la optimizaci3n de la extracci3n en fase s3lida magn3tica y respuesta promedio obtenida de cada uno de los experimentos	40
Tabla 11.	An3lisis de varianza regular	41
Tabla 12.	Par3metros de regresi3n de las l3neas de calibrado, altura vs concentraci3n de tetraciclina	43
Tabla 13.	Recuperaci3n de tetraciclinas en muestras de leche dopadas	44
Tabla 14.	Contenido de tetraciclinas en muestras de leche	45
Tabla 15.	An3lisis de varianza de dos v3as del contenido de tetraciclinas	46

Antecedentes

1. ANTECEDENTES

1.1 Historia de los antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias y hongos) o sintetizados en laboratorio, capaces de suprimir el crecimiento de otros microorganismos y eventualmente destruirlos. Estos compuestos difieren marcadamente en sus propiedades físicas, químicas y farmacológicas, así como en su mecanismo de acción y espectro antimicrobiano, es decir, la gama de microorganismos sobre los cuales pueden actuar [1-2].

El empleo de estos compuestos comienza cuando los chinos, hace más de 2500 años, utilizaron la cáscara enmohecida de la soya en el tratamiento de forúnculos. En el año 1877, Pasteur y Joubert reconocen las potencialidades clínicas de los microorganismos como agentes terapéuticos. Ehrlich fue el primero en formular los principios de la toxicidad selectiva, es decir, cuando un antibiótico afecta a un grupo determinado de microorganismos, y estableció las relaciones químicas específicas entre los parásitos y los medicamentos, el desarrollo de resistencia a medicamentos en los parásitos y el papel de la terapéutica para combatir dicha resistencia [2-3].

La llamada “Edad de Oro” de los antibióticos comienza en 1941 con la producción de la penicilina, descubierta accidentalmente en 1928 por Alexander Fleming, y su utilización con buenos resultados en ensayos clínicos [4]. La producción de antibióticos a gran escala se debe a investigaciones realizadas por los ingenieros bioquímicos W. Dunn y colaboradores, quienes aportaron nuevas técnicas para el cultivo en gran escala, sustituyendo los cultivos superficiales por técnicas de fermentación profunda en grandes tanques. Simultáneamente con las penicilinas, han sido descubiertos y comercializados otros antibióticos. Además, se han realizado modificaciones químicas a estos compuestos con la finalidad de mejorar su actividad antimicrobiana o su absorción en el organismo [5].

El número de antibióticos ha aumentado considerablemente, particularmente de aquellos derivados de especies nuevas, o mutantes de organismos ya conocidos. Actualmente existen

reportados más de 2500, pero el número existente en el mercado es relativamente menor. Esto se debe a que no todos tienen un estudio completo, ya que algunos no tienen nombre ni estructura conocida y a otros les faltan pruebas clínicas. A pesar de esto, los antibióticos son los medicamentos más numerosos en el mercado [5].

En veterinaria, los antibióticos se emplean con fines terapéuticos y profilácticos, para tratar o para prevenir infecciones. Sin embargo, desde la década de los cincuenta, la adición de antibióticos en pequeñas dosis al pienso de los animales de abasto ha venido siendo una práctica habitual como promotores del crecimiento.

La propiedad de los antibióticos de mejorar las tasas de crecimiento animal se conoce desde finales de los años cuarenta, cuando se observó que las aves alimentadas con productos de la fermentación de *Streptomyces aureofaciens* mejoraban su desarrollo, identificándose a la clortetraciclina como el compuesto que influye en el crecimiento. Posteriormente se confirmó esta propiedad en múltiples antibióticos y para diversas especies animales.

Los antibióticos como promotores del crecimiento se han empleado en dosis subterapéuticas durante largos periodos de la vida del animal, produciendo una ganancia de peso estimada alrededor del 5%. El mecanismo por el cual los antibióticos favorecen el crecimiento no se conoce con exactitud. Básicamente actúan modificando cuantitativa y cualitativamente la flora microbiana intestinal, provocando una disminución de los microorganismos causantes de enfermedades subclínicas. Actúan también reduciendo la flora normal que compite con el huésped por los nutrientes. Todo ello conduce a una mejora en la productividad y reduce la mortalidad de los animales [6].

A pesar de los beneficios mencionados, la administración de antibióticos a animales de granja, aumenta el riesgo de presencia de residuos de antibióticos en alimentos derivados. Los alimentos que presentan mayor concentración de antibióticos son carne, leche y miel. Es por ello que, para la protección de los consumidores, se ha legislado el uso de estos medicamentos, incluyendo el establecimiento de límites máximos de residuos [7].

1.2 Clasificación de los antibióticos

Aunque los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos. Una de las formas más comunes de clasificarlos es según el mecanismo de acción, es decir, la forma en que el fármaco actúa sobre la estructura de los microorganismos. En este caso, los antibióticos se clasifican en [8]:

1. Antibióticos que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana: Las bacterias son microorganismos muy complejos que al entrar en contacto con los tejidos de los mamíferos necesitan mantener su integridad, para lo cual, han desarrollado una pared celular rígida. La inhibición de la síntesis de la pared bacteriana generalmente tiene un efecto bactericida. La pared de las bacterias está constituida por una estructura denominada peptidoglicano, cuya síntesis se divide en tres etapas principales, cada una de éstas, inhibida por un grupo de antibióticos diferente. Los antibióticos que entran en este grupo son penicilinas, cefalosporinas, vancomicinas, fosfomicinas, tercoplaninas y bacitracinas.
2. Antibióticos que ejercen su acción a través de la membrana celular y afectan su permeabilidad: La membrana citoplasmática es fundamental para la regulación del medio intracelular de la bacteria. Esta membrana tiene una estructura particular en las bacterias y puede lesionarse por algunos productos, de esta forma, se obtiene una actividad antimicrobiana selectiva. Los antibióticos que entran en este grupo son polimixinas, colistinas, nistatinas y anfotericina C.
3. Antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas: Estos fármacos impiden que las bacterias sinteticen proteínas que son elementos indispensables para su supervivencia. En este grupo, los antibióticos se dividen en aquellos que actúan sobre la subunidad 30S, como aminoglucósidos, aminociclitolos y tetraciclinas, y los que actúan sobre la subunidad 50S, como macrólidos, lincosamidas y amfenicoles. Los antibióticos que actúan en el mismo nivel no deben asociarse, pues compiten por el sitio de unión y se antagonizan.

4. Antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos: Son los antibióticos que impiden que una bacteria sea capaz de producir los componentes fundamentales de su material genético como el ácido desoxirribonucleico. Entre estos antibióticos se encuentran las quinolonas y rifamicinas.
5. Antibióticos que antagonizan rutas metabólicas: Por ejemplo, fármacos que interfieren en la síntesis del ácido fólico como las sulfonamidas y trimetoprimas.

En la medicina veterinaria, uno de los antibióticos más empleados son las tetraciclinas debido a su amplio espectro y bajo costo. Además de la prevención y tratamiento de enfermedades de animales de granja, estos antibióticos también se emplean como aditivos en su alimento para promover el crecimiento [7,9].

1.3 Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos producidos por el género *Streptomyces*, utilizados con el fin de controlar el desarrollo de bacterias gram-positivas y gram-negativas, dentro de las cuales presentan un mayor efecto sobre *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pneumococcus*, *Gonococcus*, *Vibrio*, *Rickettsia*, *Chlamydia* y *Mycoplasma*. Estos antibióticos, al ser transportados al interior de las células de las bacterias, ejercen un efecto bacteriostático ya que inhiben la biosíntesis de proteínas al unirse a la subpartícula ribosomal 30S [10]. A pesar de que pueden establecerse diferencias específicas (origen o estructura química), sus características generales, como mecanismo de acción, espectro, y otras, permite describirlas como un solo grupo [11]. Las tetraciclinas adoptan su nombre en base a su estructura química compuesta por cuatro anillos, tal como se muestra en la Figura 1 [12].

Desde el punto de vista químico, las tetraciclinas son compuestos sólidos, cristalinos, inodoros, de color amarillo o amarillo pálido, comúnmente en forma de hidratos o clorhidratos. Son solubles en soluciones diluidas de ácidos y álcalis, ligeramente solubles en agua y metanol, y prácticamente insolubles en éteres y cloroformo. Su espectro ultravioleta muestra fuerte absorción a 270 y 350 nm. Estos compuestos tienen propiedades ácido-base; la constante de disociación del grupo hidroxilo del anillo A es de pK_{a1} 2.8-3.3, el grupo dimetil amino en el anillo A tiene un pK_{a2} de 7.3-8.3 y el grupo hidroxilo del anillo B tiene un pK_{a3} de 9.3-10.2. Las

tetraciclinas son relativamente inestables, la luz solar genera productos de degradación bajo condiciones ácidas, básicas o alta temperatura [13].

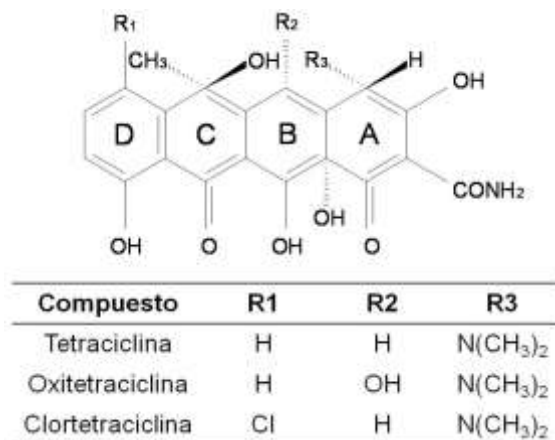


Figura 1. Estructura de las principales tetraciclinas

Existen diferentes tipos de tetraciclinas disponibles comercialmente, sin embargo, actualmente las únicas tetraciclinas usadas en reses, cerdos, ovejas, cabras, aves de corral y pescado son oxitetraciclina, clortetraciclina, tetraciclina y doxiciclina. Su administración puede ser por vía oral, a través de los piensos o disueltas en agua potable, parenteralmente o por infusión intramamaria. La persistencia de las tetraciclinas en la sangre seguida de su absorción, es un significativo contraste en comparación con otros antibióticos que son eliminados rápidamente. Dentro del organismo, sufren modificaciones metabólicas mínimas o nulas, y son excretadas en orina y heces en su forma microbiológicamente inactiva o sin modificaciones en su estructura. También son eliminadas en leche, alcanzando aproximadamente entre 50 y 60% de la concentración del antibiótico en el plasma sanguíneo y niveles aún mayores en leche mastítica. Las concentraciones más altas se alcanzan en leche ordeñada 6 horas después de dosis parenteral, sin embargo, aún se encuentran trazas de tetraciclinas en leche ordeñada después de 48 horas [9].

La ingesta diaria admisible (IDA) para el total de residuos de tetraciclinas, incluyendo clortetraciclina, oxitetraciclina y tetraciclina, es de 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal por día. Sin embargo, de la ingesta admisible de tetraciclinas el 60% proviene del consumo de leche y 40% de la ingesta de tejidos animales. Basándose en la IDA, la FDA (Food and Drug Administration) estableció una tolerancia de 300 $\mu\text{g l}^{-1}$ para la suma de residuos de tetraciclinas en leche

(expresada como tetraciclina), o bien, para cada una de las tetraciclinas mencionadas anteriormente [14].

1.4 Métodos de análisis de tetraciclinas

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

Los ensayos microbiológicos e inmunoensayos son los métodos de rutina para detectar residuos de tetraciclinas en alimentos, sin embargo, presentan ciertas desventajas como baja sensibilidad y selectividad, mediciones semicuantitativas de los residuos detectados y resultados falsos positivos. La confirmación y cuantificación de residuos de tetraciclinas requiere necesariamente métodos instrumentales de análisis, destacando las técnicas cromatográficas [13].

1.4.1 Espectrofotometría

Debido a que las tetraciclinas son compuestos fenólicos, su determinación cuantitativa se puede realizar mediante técnicas espectrofotométricas para lo cual se requiere la formación de compuestos cuya coloración sea proporcional a la concentración. Se han desarrollado 4 alternativas simples, rápidas y sensibles que cumplen con este requerimiento [15]:

- ☞ Método 1: Nitración mediante ácido nítrico y sulfúrico que resulta en la formación de derivados dinitro en la posición orto al grupo fenólico. Posteriormente se forma un complejo con un reactivo nucleofílico (carbanión) produciéndose un color intenso.

- ☞ Método 2: Nitrosación en la posición orto al grupo fenólico al reaccionar con ácido nitroso y una subsecuente quelación con cobre(II) que permite interconversiones tautoméricas formando un compuesto de color intenso.

- ☞ Método 3: Acoplamiento con compuestos diazo en las posiciones orto- y para- al grupo hidroxilo, la oxidación del derivado acoplado forma una quinona-imida, cuya conjugación de dobles enlaces permite detectar el compuesto cromóforo formado en la región visible del espectro electromagnético.

- ☞ Método 4: Acoplamiento con reactivos diazo y empleo de la molécula resultante como agente quelante del cobre(II) incluyéndolo en un anillo de 5 miembros. Una solución amarilla es el resultado de la extracción en cloroformo del quelato.

Dentro de las determinaciones en la región visible se ha descrito una forma rápida de detectar la presencia de tetraciclinas mediante un optosensor de fosforescencia a temperatura ambiente, el cual se basa en la reacción entre Europio(III) y los antibióticos buscados para formar un quelato metálico fosforescente que se inmoviliza en una resina de intercambio iónico (Amberlite XAD-4) empacada en la celda de flujo. La velocidad de análisis alcanzada con este método es de 20 muestras por hora, sin embargo, sólo sirve para discriminar entre muestras contaminadas y potencialmente contaminadas por uno o varios tipos de tetraciclinas, y no es posible su cuantificación [16].

1.4.2 Electroforesis capilar de zona

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

La electroforesis capilar de zona es un método muy sensible que determina ocho tipos de tetraciclinas: clortetraciclina, demeclociclina, doxiciclina, metaciclina, minociclina, oxitetraciclina, tetraciclina y rolitetraciclina. Generalmente se utilizan soluciones de borato de sodio y 2-propanol como electrolitos base; los voltajes de separación son variados y son comúnmente detectadas a 360 nm después de aproximadamente 15 minutos. Sus límites de detección se encuentran entre 20 y 50 µg/kg, dependiendo del analito y las condiciones específicas de análisis. La limpieza de la muestra se lleva a cabo mediante extracción en fase sólida con cartuchos C18 [17].

1.4.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía de líquidos de alta resolución es el método de referencia para la determinación de tetraciclinas. Se lleva a cabo en fase reversa, con una columna de gel de sílice modificado (C18) y fase móvil a base de mezclas de acetonitrilo, metanol y soluciones acuosas de ácido oxálico, el cual impide la formación de complejos con iones metálicos en un solvente orgánico. La proporción adecuada de estos solventes permite una buena separación de las muestras. El detector más común es UV, a longitudes de onda de 270 y 360 nm, sin embargo, debido a la fluorescencia que producen las tetraciclinas al formar complejos metálicos, se ha empleado esta técnica para detectar tetraciclinas después de su degradación en condiciones alcalinas y la formación de un quelato metálico. La espectrometría de masas es también un método de detección sensible en el caso del análisis de tetraciclinas [10].

Para el análisis de tetraciclinas en muestras de alimentos se utiliza el buffer EDTA–McIlvaine como medio para disolver los analitos, y se realiza una posterior limpieza por extracción en fase sólida empleando cartuchos C18 [18-19]. Los límites de detección promedio alcanzados con esta metodología están entre 50 y 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ para las tetraciclinas de mayor interés en leche [10].

1.5 Introducción a las técnicas de preconcentración

La determinación de trazas de residuos y contaminantes en matrices complejas, como los alimentos, frecuentemente requiere extracciones y tratamiento de la muestra antes del análisis instrumental. La preparación de las muestras es una etapa importante en el análisis y deben buscarse metodologías simples para minimizar el tiempo de análisis y las fuentes de error. El grado de preparación de la muestra depende de la matriz y de las propiedades y la concentración del analito que se desea determinar. Los pasos típicos que se incluyen en el tratamiento son: homogenización, extracción, limpieza y concentración.

Con el paso del tiempo, los límites máximos de contaminantes en alimentos establecidos por las normas han ido disminuyendo debido a que, tanto los clientes como las autoridades

sanitarias, exigen mayores estándares de calidad, lo que conduce a la necesidad de metodologías más sensibles y confiables para su determinación [20].

Para el análisis de alimentos contaminados con tetraciclinas, éstas deben extraerse de los tejidos o secreciones donde se encuentren mediante técnicas de extracción con solventes adecuados, seguido de una fase de purificación [13]. Sin embargo, debido a que los límites máximos permitidos por la norma para estos antibióticos en alimentos son bajos, se deben emplear técnicas de preconcentración que permitan el análisis de muestras reales en los casos en que la cantidad de analito se encuentre por debajo de los límites de detección del método instrumental elegido. La preconcentración es una operación cuyo objetivo es aumentar la proporción de la concentración o cantidad de microcomponentes (elementos traza) con respecto a los macrocomponentes (matriz) [21]. Además de su objetivo de enriquecimiento, las técnicas de preconcentración pueden servir para extraer al analito de una matriz compleja y para su limpieza, mejorando, por lo tanto, la selectividad y estabilidad [22].

Actualmente se busca que las técnicas de tratamiento sean, además de eficientes, amigables con el medio ambiente y que utilicen la menor cantidad de solvente posible, lo cual resulta conveniente cuando se tratan muestras reales [20]. Es importante señalar que, durante esta etapa, se debe tener mucho cuidado para evitar la pérdida de cantidades significativas de los analitos, de lo contrario, se podrían obtener resultados falsos negativos [23].

1.5.1 Extracción líquido-líquido

Los analitos en solución o muestras líquidas pueden ser extraídos por partición directa con un solvente inmiscible. La extracción líquido-líquido se basa en la solubilidad relativa de un analito en dos fases inmiscibles y está gobernada por el coeficiente de distribución/reparto. La extracción del analito se logra por la diferencia de solubilidad (polaridad) en las dos fases líquidas inmiscibles.

La extracción líquido-líquido es uno de los métodos de extracción más comunes, empleado particularmente para compuestos orgánicos de matrices acuosas. Típicamente se usa un embudo de separación y las dos fases inmiscibles se mezclan por agitación y después se deja en reposo para permitir la separación. Para asegurar la completa extracción de un analito en la

fase requerida se deben repetir las extracciones, lo cual representa una gran desventaja de esta técnica debido a que se emplea un gran volumen de solventes orgánicos, lo que la hace costosa e incompatible con el medio ambiente. Además, debido a la baja selectividad, especialmente en el análisis de niveles traza, la muestra debe limpiarse o concentrarse antes del análisis instrumental [20].

En el caso de las tetraciclinas, una primera etapa consiste en la precipitación de proteínas mayoritarias, utilizando una solución de HCl-Na₂EDTA, seguida de una centrifugación y filtración. Posteriormente se realiza una extracción líquido-líquido de la fase acuosa con diclorometano, el cual se evapora después de la extracción y el residuo se reconstituye generalmente en metanol. Esta metodología ha sido aplicada para muestras de leche y tejidos [24].

1.5.2 Extracción en fase sólida

La extracción en fase sólida (SPE) es una separación líquido-sólido, donde la fase extractante es un sorbente sólido, y ha sido usada ampliamente para eliminar y concentrar trazas de compuestos orgánicos de muestras sólidas y soluciones [20]. Esta técnica ha ido reemplazando gradualmente a la extracción líquido-líquido y se ha convertido en la técnica de preparación de muestras más común.

En la SPE, los analitos que se desean extraer se reparten entre una fase sólida y una líquida, por lo que los analitos deben tener mayor afinidad hacia la fase sólida que hacia la matriz de la muestra. Además de la extracción, esta técnica es ideal para la preconcentración y limpieza de muestras. La limpieza es un paso importante en la determinación de analitos a bajas concentraciones y depende, de la complejidad de la muestra y de la forma de detección.

La elección del sorbente es el punto clave en la SPE debido a que éste controla parámetros como la selectividad, afinidad y capacidad. Para elegirlo deben considerarse las interacciones del sorbente con los grupos funcionales de los analitos de interés, el tipo de matriz de la muestra y su interacción tanto con el sorbente como con el analito. Los sorbentes clásicos incluyen fases inmovilizadas en sílica de grupos orgánicos C8 y C18 entre otros, materiales de intercambio de iones o de carbono, materiales poliméricos (poliestireno-divinilbenceno

copolímero), inmunosorbentes, polímeros molecularmente impresos y tamices moleculares [25].

La extracción de tetraciclinas de la matriz de la muestra se realiza empleando soluciones de Na₂EDTA-buffer McIlvaine y una posterior centrifugación y filtración. La extracción en fase sólida de estos analitos se realiza generalmente en sílice modificada C18 [26].

1.5.3 Extracción en fase sólida magnética

La extracción en fase sólida magnética (MSPE) es una técnica de limpieza y preconcentración que tiene como base a la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) y a las separaciones asistidas magnéticamente. La MSPD es una técnica de limpieza en la cual se mezcla un sorbente con la muestra; a diferencia de la extracción en fase sólida, el sorbente es disperso en la muestra favoreciendo el contacto con los analitos. El soporte sólido puede adsorber los analitos contenidos en la matriz, los cuales son posteriormente eluidos con un disolvente adecuado. Las propiedades fisico-químicas del analito y de los componentes de la matriz determinan la elección del soporte. Entre los sorbentes reportados se encuentran los compuestos derivados de sílice y grafito, los cuales muestran gran eficiencia en la limpieza y recuperación de diferentes antibióticos. La principal desventaja de la dispersión de matriz en fase sólida radica en las etapas del procedimiento como lo son la filtración o la centrifugación necesarias para acumular el sorbente para el lavado y elución de los analitos. Estos procedimientos son particularmente complicados cuando se utilizan micro- o nano-partículas como soportes.

La separación química asistida magnéticamente ha sido una alternativa para la preparación de muestras desde la década pasada [27]. Su funcionamiento se basa en el uso de soportes magnéticos preparados por impregnación o polimerización de monómeros orgánicos o inorgánicos en presencia de magnetita. La MSPE se basa en la dispersión de un soporte magnético en la muestra. El soporte con los analitos adsorbidos, se colecta mediante el uso de un campo magnético externo sin necesidad de centrifugar o filtrar. Finalmente, los analitos son eluidos del adsorbente y el extracto obtenido se analiza mediante la metodología seleccionada. Las principales ventajas de utilizar una separación magnética son la facilidad y rapidez del pretratamiento de las muestras [28].

1.6 Introducción a las técnicas de flujo

Los sistemas de flujo se basan en la inserción de un volumen de muestra a una corriente de líquido en movimiento que contiene los reactivos necesarios para realizar el análisis. Después de un tiempo adecuado, la muestra, que ya ha reaccionado con los reactivos, llega al detector donde se registra la señal analítica [29].

Estos métodos presentan diversas ventajas, entre las que destacan: (1) mayor número de análisis por unidad de tiempo, (2) mejor tiempo de respuesta (con frecuencia menos de un minuto entre la inyección de la muestra y la respuesta del detector), (3) menores costos de disolventes, ya que se pierde muy poca cantidad de reactivo (debido al diámetro menor de los tubos) y (4) el equipo es más simple y flexible. Es útil en la realización de análisis simultáneos con el mínimo de trabajo humano. A pesar de que su uso comenzó en laboratorios clínicos, se ha extendido a los laboratorios de control de procesos industriales y a la determinación rutinaria de un amplio espectro de especies en aire, agua, suelo, productos farmacéuticos y agrícolas [30].

El análisis por inyección en flujo (FIA) es un método cuyo sistema (Figura 2) consta de manera general de una unidad de propulsión que es una bomba peristáltica, un sistema de inyección que consta de una válvula de 4 vías, un sistema de transporte y reacción, y un sistema de detección cuya respuesta es proporcional a la concentración inyectada [29].

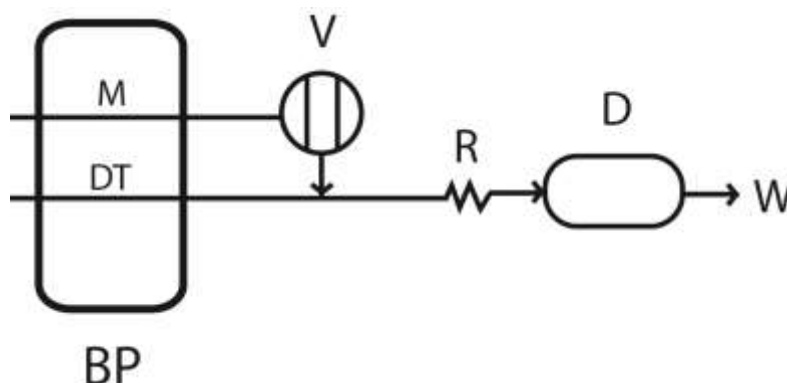


Figura 2. Elementos básicos de un sistema de análisis por inyección en flujo (BP, bomba peristáltica; M, muestra; DT, solución transportadora; V, válvula de inyección; R, reactor; D, detector; W, desechos)

El consumo involuntario de alimentos con tetraciclinas representa un riesgo para la salud humana, por lo que se han reportado diversas metodologías para su análisis, las cuales ya fueron mencionadas; sin embargo, la complejidad y el tiempo de análisis de la mayoría de ellas, crean la necesidad de diseñar un método rápido que permita obtener resultados exactos y precisos, por lo que los objetivos del presente trabajo se plantean en la siguiente sección.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Desarrollar y validar una metodología rápida, exacta y precisa, útil en la determinación simultánea de residuos de tetraciclinas en leche basada en análisis por inyección en flujo.

2.2 Objetivo particulares

- ☞ Implementar un sistema de análisis espectrofotométrico en discontinuo para la determinación de residuos de tetraciclinas en leche empleando aminoantipirina y metilbenzotiazolina como derivatizantes.
- ☞ Acoplar la metodología en discontinuo a un sistema de análisis por inyección en flujo con detección espectrofotométrica.
- ☞ Evaluar y optimizar los factores principales que contribuyen a la respuesta con el fin de obtener la mayor sensibilidad analítica.
- ☞ Evaluar técnicas de preconcentración para eliminar interferencias presentes en la muestra y lograr cuantificar las tetraciclinas en el límite que marca la norma ($300 \mu\text{g l}^{-1}$).
- ☞ Optimizar la técnica de preconcentración mediante extracción magnética en fase sólida para acoplarla al sistema de análisis por inyección en flujo.
- ☞ Validar la metodología diseñada mediante el método de referencia.

Metodología Experimental

3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

3.1 Reactivos y soluciones

Todas las soluciones fueron preparadas disolviendo el respectivo reactivo grado analítico en agua destilada. En el caso de las tetraciclinas, se utilizaron tres tipos (oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina) suministrados por la casa comercial Sigma-Aldrich. Las soluciones estándar se prepararon diariamente a partir de una solución patrón de 1.0 g l⁻¹. Las soluciones de los derivatizantes 3-metil-2-benzotiazolina hidrazona (MBTH) 0.10% p/v y 4-aminoantipirina (AAP) 1.75% p/v, fueron preparadas en agua destilada y solución tampón de boratos (pH 10.0, 1.0 M) respectivamente. Como agentes oxidantes se utilizaron sulfato de cerio (IV) y amonio 5.0x10⁻⁴ mol l⁻¹(disuelto en H₂SO₄ 0.1 mol l⁻¹) en el caso del MBTH y ferricianuro de potasio 0.80% p/v cuando se emplea AAP como derivatizante.

El suero lácteo se obtuvo mediante dos técnicas:

- a) Calentar 100 ml de leche a 50°C; y adicionar 2.0 ml de ácido acético 8 mol l⁻¹ agitando lentamente la mezcla hasta precipitar por completo la grasa y la caseína. El suero obtenido se separa por decantación y finalmente se centrifuga a 3000 rpm por 15 min o hasta eliminar los residuos sólidos para obtener un suero con menor turbidez [31]. Este suero se utilizó para evaluar el efecto matriz y para la extracción líquido-líquido.
- b) Mezclar 10 ml de leche con 30 ml de solución McIlvane/EDTA (pH 2.90) en un tubo para centrifuga. La solución se agita en Vortex por un minuto y posteriormente se centrifuga a 3000 rpm por 15 min o hasta la completa precipitación de la caseína. El suero obtenido con esta metodología se utilizó para la extracción en fase sólida (SPE), tal como se especifica en la bibliografía consultada [32].

La solución McIlvane-EDTA usada en la precipitación de caseína y extracción de las tetraciclinas de las muestras de leche se preparó adicionando 15.0 g de fosfato ácido de sodio dihidratado, 3.72 g de EDTA y 13.0 g de ácido cítrico monohidratado en 1.0 l de agua. El pH de esta solución se ajustó a 2.90 usando ácido fosfórico 1.0 mol l⁻¹ o hidróxido de sodio 1.0 mol l⁻¹ [32].

La leche utilizada para la evaluación del efecto matriz y de las técnicas de preconcentración fue entera de marca comercial. Para el análisis de muestras, se utilizó leche sin pasteurizar, pasteurizada y ultrapasteurizada. La leche sin tratamiento térmico se adquirió de establos cercanos a la ciudad. La leche tratada térmicamente era entera, semidescremada y descremada, de diferentes marcas y adquirida en establecimientos comerciales.

3.2 Preconcentración de las muestras

3.2.1 Extracción líquido-líquido

El suero lácteo se obtuvo como se menciona en la sección 3.1. A 100 ml de suero a temperatura ambiente contenido en un embudo de separación, se adicionaron 20 ml de diclorometano; las dos fases se mezclaron por agitación y el embudo se dejó en reposo para permitir la separación. Se recuperó la fracción orgánica y se repitió la operación. Posteriormente se evaporó el solvente y el extracto sólido se reconstituyó en 10 ml de buffer de boratos [24].

3.2.2 Extracción en fase sólida

Para esta extracción se emplearon cartuchos C18 (Sep-Pak Vac C18 1cc, Waters), los cuales se prepararon con 2.0 ml de metanol, seguido por 2.0 ml de la solución McIlvane/EDTA (pH 2.90). El suero obtenido como se menciona en la sección 3.1 se pasó por el cartucho y posteriormente se añadieron 2.0 ml de una solución al 2.0% de metanol en agua para disolver cualquier remanente de azúcares. La elución se realizó con 3.0 ml de metanol grado HPLC. Si el color amarillo característico permanece en el cartucho, debe eluirse con metanol extra para evitar pérdidas de tetraciclinas. Las muestras se secaron hasta un volumen aproximado de 0.2 ml y posteriormente se añadió 1.0 ml de buffer de boratos cuando se analizaron por el sistema FIA o con fase móvil cuando se analizaron por HPLC [32].

3.2.3 Extracción en fase sólida magnética

3.2.3.1 Preparación del soporte magnético

La magnetita (Fe_3O_4) se preparó por coprecipitación de la siguiente manera: 0.03 moles de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se disolvieron en 100 ml de agua. La mezcla se calentó con agitación hasta alcanzar 60°C . Se burbujeó aire en la mezcla mientras se ajustaba el pH a 10 con una solución de NaOH (2.0 mol l^{-1}). Después de 1 h, el precipitado magnético fue aislado del solvente con un imán y se lavó varias veces con agua desionizada [33]. La magnetita previamente sintetizada (1.5 g), se adicionó a un matraz que contenía 5.95 g de tetrametoxisilano disuelto en 24 ml de una solución compuesta por Triton X-100 (2.0% p/v), bromuro de cetiltrimetilamonio (0.2% p/v), metanol (12.5% v/v) y 200 μl de amoniaco (28% v/v). La mezcla se calentó y se puso en reflujo con agitación a 120°C durante 1 h. La caracterización físico-química de este soporte ha sido descrita previamente [28].

La isoterma de sorción de nitrógeno se realizó a 77°K en un analizador Micrometrics ASAP 2020. Las muestras se desgasificaron a 100°C por 10 h antes de las mediciones. El área superficial Brunauer-Emmett-Teller (BET) se calculó a partir de los datos de adsorción en el intervalo de presión relativa de 0.01 a 0.20. Las curvas de distribución del tamaño de poro se obtuvieron de la isoterma de adsorción, usando el método Barrett-Joyner-Halenda (BJH). La distribución del tamaño de partícula se determinó usando un analizador Beckman Coulter LS 13320 mediante dispersión de luz utilizando un láser de longitud de onda de 750 nm. La muestra se dispersó en una solución de Triton X-100 (0.2% p/v) a 25°C .

3.2.3.2 Extracción

Se pesaron 0.3 g del soporte magnético en un tubo para centrífuga y se adicionaron 50 ml de leche. Se dispersaron agitando mecánicamente durante 15 minutos. Con un imán se retuvo la fase sólida y se eliminó el exceso de leche. Se hizo un lavado con 30 ml de EDTA (0.01 mol l^{-1}) y otro con 30 ml de agua destilada. Las tetraciclinas se eluyeron con 5 ml de metanol acidificado con ácido acético ($1 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$). Durante los lavados y elución se emplea el imán como campo magnético externo para permitir la separación de la fase sólida y líquida. Para el análisis mediante FIA se tomaron 0.5 ml de extracto metanólico, se adicionaron 0.5 ml de

EDTA (0.01 mol l^{-1}) y se aforó a 10 ml con agua destilada; para el análisis mediante HPLC, el extracto metanólico se filtró a través de papel de $0.45 \mu\text{m}$ previo a su inyección.

3.3 Construcción del sistema FIA

El sistema FIA desarrollado para la determinación de tetraciclinas (Figura 3) consta de una bomba peristáltica (BP) de 4 canales (Gilson, Miniplus 3) con tubos de la misma marca. La introducción de las muestras y patrones en el flujo transportador se realizó utilizando una válvula de inyección de cuatro vías (V) Rheodyne. También cuenta con dos reactores, entendiéndose tales como la porción de tubo existente entre la válvula de inyección y el punto de confluencia (reactor 1) y del punto de confluencia al detector (reactor 2). Los diferentes componentes del montaje se unieron entre sí por tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno de la marca Omnifit, ligadores y terminales Gilson.

El registro de las señales analíticas se realizó utilizando un espectrofotómetro UV-Vis marca Perkin-Elmer modelo Lambda 40, acoplado a una celda de cuarzo de $18.0 \mu\text{l}$ de volumen interno y 1.0 cm de paso óptico, marca Hellma 178.710-QS.

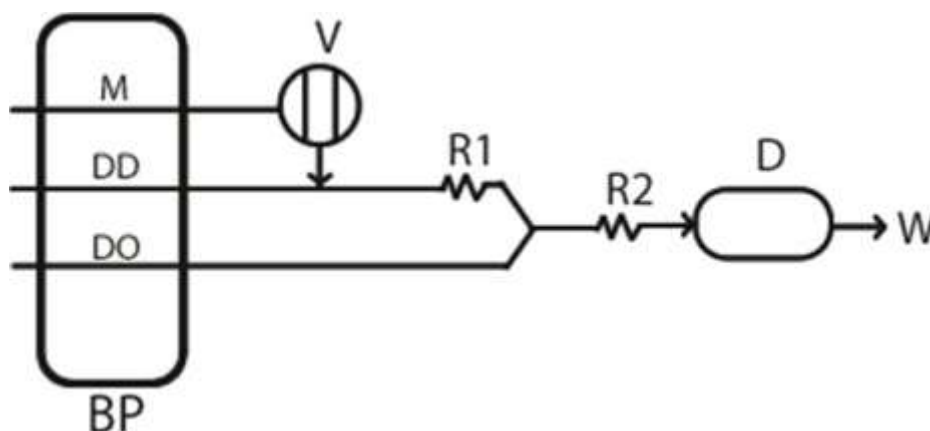


Figura 3. Esquema del sistema FIA utilizado (BP, bomba peristáltica; M, muestra; DD, solución derivatizante; DO, solución oxidante; V, válvula de inyección; R1 y R2, reactores; D, detector; W, desecho)

3.4 Ciclo analítico del sistema FIA

3.4.1 Sistema FIA optimizado empleando MBTH

El sistema de análisis en flujo optimizado comienza con la inyección de 250 μl de muestra en la solución derivatizante que fluye por el canal DD, la muestra reacciona con el MBTH en R1 con una longitud de 30 cm, posteriormente, la muestra confluye con el canal DO donde es oxidada con Ce(IV) en R2 con una longitud de 60 cm y adquiere un color rojo que es posteriormente detectado a 403 nm. El flujo de trabajo optimizado fue de 2.0 ml min^{-1} .

3.4.2 Sistema FIA optimizado empleando AAP

El sistema de análisis en flujo optimizado comienza con la inyección de 400 μl de muestra en la solución derivatizante que fluye por el canal DD, la muestra reacciona con la AAP en el reactor uno (R1) con una longitud de 30 cm, posteriormente, la muestra confluye con el canal DO donde es oxidada con ferricianuro en el reactor dos (R2) con una longitud de 90 cm y adquiriendo un color rojo que es posteriormente detectado a 540 nm. El flujo de trabajo optimizado fue de 2.0 ml min^{-1} .

Esta metodología se basa en que, tanto el MBTH como la AAP, son compuestos diazo que tienen la función de acoplarse en el anillo fenólico de las tetraciclinas para generar un derivado que al ser oxidado produce un cromóforo de color rojo, el cual es detectable en la región visible del espectro electromagnético. La reacción se muestra en la Figura 4.

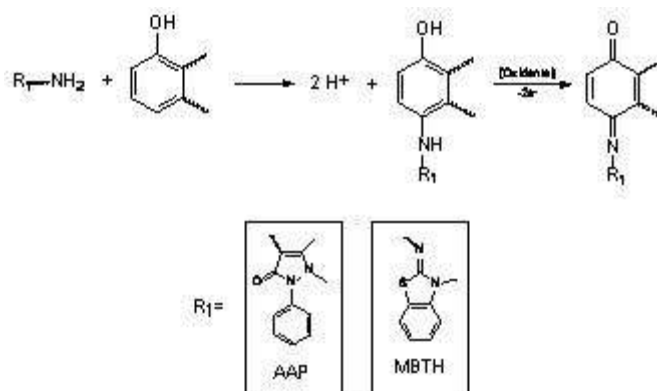


Figura 4. Reacción cromófora entre el fragmento fenólico de las tetraciclinas y los diferentes agentes derivatizantes

3.5 Análisis mediante HPLC

La concentración de tetraciclinas en las muestras analizadas mediante el sistema FIA se comparó usando HPLC, la técnica oficial de análisis. Se utilizó un equipo HPLC marca Perkin-Elmer Series 200 equipado con un detector UV-Vis a 360 nm, conectado a un inyector manual con un loop externo de 20 μ l; la separación cromatográfica se lleva a cabo en una columna Spheri-5 ODS column (5 μ m; 240x4.6 mm) de PerkinElmer a temperatura ambiente. La fase móvil utilizada consta de una mezcla ácido oxálico (0.010 mol l⁻¹)-acetonitrilo-metanol (66-17-17 v/v), a un flujo de 1.0 ml min⁻¹ [32].

Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Método en discontinuo

La elección de la longitud de onda de trabajo adecuada se determinó a partir del espectro visible de los componentes de la reacción en la cual se basa esta metodología (Figura 4). En la Figura 5a se muestran los espectros de la tetraciclina (TC; 30.0 mg l⁻¹), el blanco de reacción compuesto por Ce(IV) (0.2% p/v) y MBTH (0.01% p/v), y de la mezcla (TC+Ce(IV)+MBTH). La longitud de onda que presentó un aumento con la concentración de tetraciclinas fue la observada a 403 nm por lo que esta longitud se eligió para el análisis de tetraciclinas utilizando MBTH como derivatizante.

De la misma manera se determinó la longitud de trabajo para la AAP, comparando los espectros de la tetraciclina (TC; 30.0 mg l⁻¹), del blanco de reacción entre ferricianuro de potasio (0.05% p/v) y AAP (0.01% p/v), así como el de la mezcla (TC+ferricianuro+AAP), los cuales se muestran en la Figura 5b. La señal analítica que presenta un aumento mayor en función a la concentración de TC es la señal registrada a 540 nm.

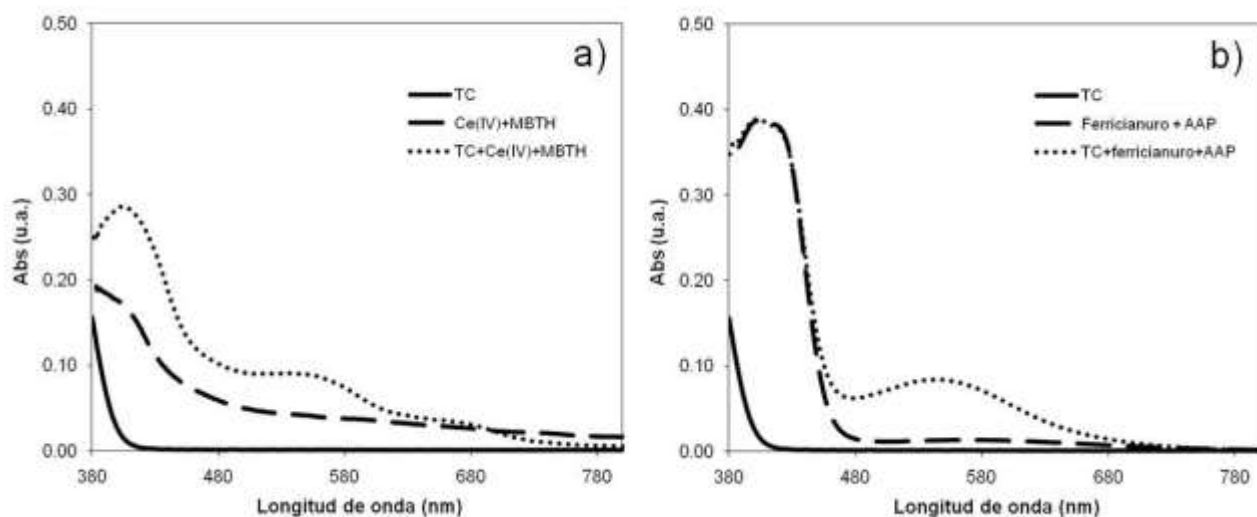


Figura 5. Espectro visible obtenido de las reacciones de acoplamiento entre a) tetraciclina (30.0 mg l⁻¹), MBTH (0.01% p/v) y sulfato de cerio (IV) (0.2% p/v); b) tetraciclina (30.0 mg l⁻¹), AAP (0.01% p/v) y ferricianuro (0.05% p/v)

403 nm

4.2 Optimización de las variables del sistema FIA

Las variables operacionales del sistema FIA se optimizaron para realizar la determinación de tetraciclinas en las concentraciones presentes en las muestras y para obtener la máxima sensibilidad analítica.

En un sistema FIA, es necesaria la optimización de dos tipos de variables: las primeras son las variables químicas involucradas en un sistema específico, tales como pH, fuerza iónica, composición de la solución transportadora y concentración de los diferentes reactivos; las segundas son aquellas inherentes al sistema que controlan la dispersión o dilución de la muestra, tal como caudal de la solución transportadora, el volumen de inyección y la longitud del tubo donde ocurren las reacciones (reactor).

La técnica de optimización tradicional es univariable, es decir, se varía por turno un parámetro mientras el resto permanecen constantes. Es común que como variable de optimización se utilice la altura de la señal analítica obtenida durante el análisis de cierta concentración de analito, tomando en cuenta que a mayor altura del pico, se obtiene una mayor sensibilidad analítica [34].

4.2.1 Optimización del sistema FIA empleando MBTH

4.2.1.1 Variables químicas

En la etapa inicial de la optimización, se evaluaron las concentraciones de los agentes derivatizantes y oxidantes que sirven como soluciones transportadoras. La primer variable en evaluarse fue la concentración de la solución oxidante, es decir, sulfato de cerio (IV) y amonio; para ello, los parámetros de flujo utilizados fueron: volumen de inyección, 100.0 μl ; caudal 1.0 ml min^{-1} ; longitud de R1, 30 cm; longitud de R2, 60 cm, y concentraciones de derivatizante de 0.10% p/v y de tetraciclina de 30 mg l^{-1} . Se probó el intervalo de concentraciones de 5.0×10^{-5} mol l^{-1} hasta 1.0×10^{-3} mol l^{-1} . Como se observa en la Figura 6, la señal aumenta con la concentración de oxidante, hasta alcanzar un punto máximo en 5.0×10^{-4} mol l^{-1} , posterior al cual disminuye la altura, por lo que esta concentración se seleccionó como la más adecuada. El Ce(IV) es un oxidante fuerte ($E^\circ=1.44$ V), por lo cual, aún a concentraciones bajas presenta

actividad óptima, mientras que a concentraciones elevadas, presenta un color con una longitud de onda cercana a la de detección, produciendo una interferencia.

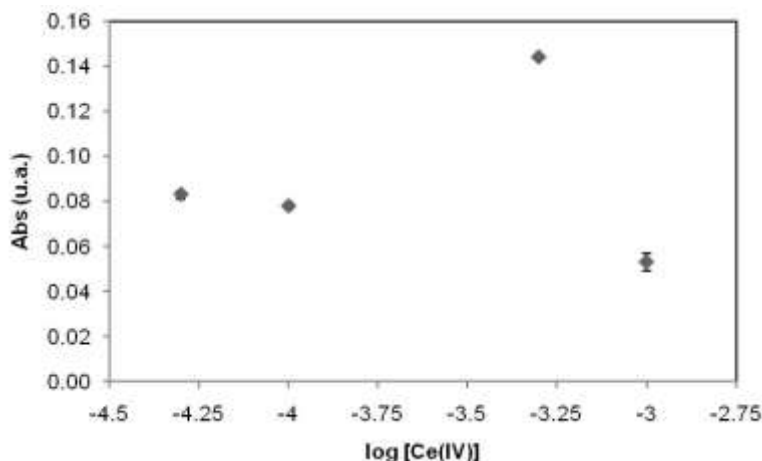


Figura 6. Variación de la absorbancia en función de la concentración de Ce(IV)

Una vez fijada la concentración de oxidante, se evaluó el derivatizante MBTH. En este caso se probaron concentraciones de 0.10 a 0.50% p/v. La señal analítica no presenta cambios significativos en el intervalo de concentraciones evaluadas, como se observa en la Figura 7, por lo que se seleccionó la concentración más baja con la finalidad de minimizar el gasto de reactivo. Por lo tanto, durante la optimización de los parámetros del sistema de flujo, las concentraciones de la solución de MBTH y de Ce(IV) fueron 0.10% p/v y 5.0×10^{-4} mol l⁻¹, respectivamente.

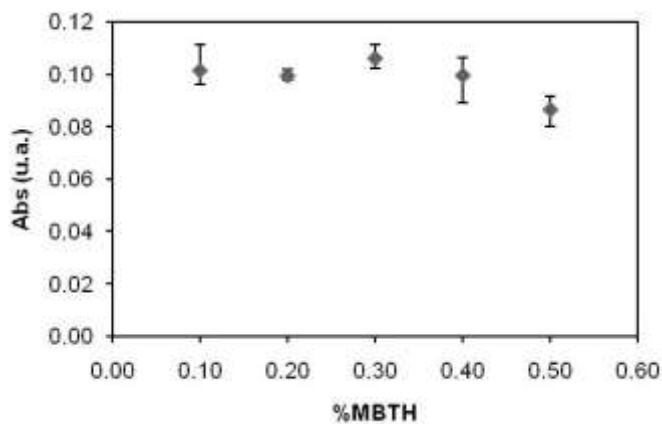


Figura 7. Variación de la absorbancia en función de la concentración de MBTH

4.2.1.2 Caudal

Se evaluó el cambio en la altura de la señal analítica al variar el caudal de 0.25 a 2.75 ml min⁻¹. Se obtuvo el promedio de las absorbancias registradas al inyectar, por triplicado, una solución de tetraciclinas de 30 mg l⁻¹. Los parámetros de flujo utilizados fueron: volumen de inyección, 100.0 µl; longitud de R1, 30 cm; longitud de R2, 60 cm, y las variables químicas optimizadas, mencionadas en la sección 4.2.1.1. El promedio del tamaño de la señal analítica a los diferentes caudales se muestra en la Figura 8, donde se observa el aumento en el tamaño de la señal analítica al aumentar el caudal, sin embargo, se eligió el caudal a 2.0 ml min⁻¹ porque a partir de éste no se observó un incremento significativo en el tamaño de la señal y para no incrementar considerablemente el consumo de reactivos y muestra, lo que pasaría con caudales más altos. La tendencia observada es característica de cinéticas de reacción elevadas. Los caudales de trabajo bajos favorecen la dispersión de la muestra, haciendo que la señal se vuelva más ancha y de menor altura [29].

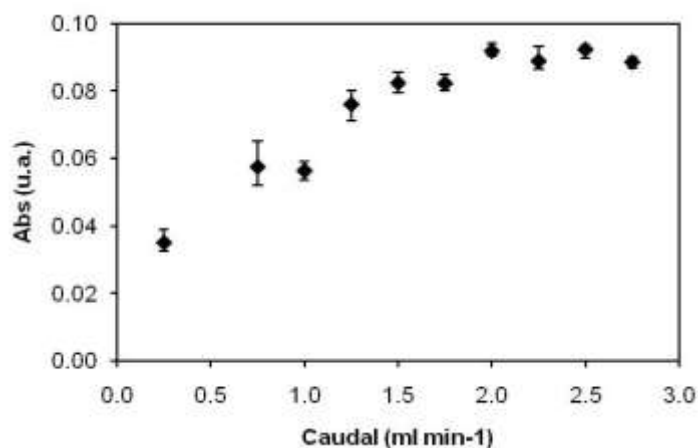


Figura 8. Variación de la absorbancia en función del caudal (empleando MBTH)

4.2.1.3 Volumen de inyección

El volumen de inyección se evaluó utilizando el caudal a 2.0 ml min⁻¹, longitud de R1, 30 cm y longitud de R2, 60 cm. Se probaron volúmenes de 100, 150, 200 y 250 µl (Figura 9) y se comparó el tamaño de la señal analítica para cada valor, obteniéndose una señal máxima con 250 µl. Al aumentar el volumen de inyección, se incrementa la cantidad de analito y, por lo tanto, se producen señales analíticas más altas [29].

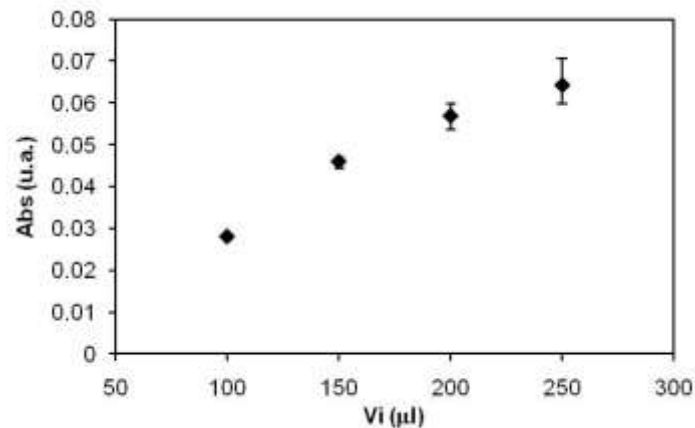


Figura 9. Variación de la absorbancia en función del volumen de inyección (empleando MBTH)

4.2.1.4 Longitud de R1

La longitud de R1, o reactor de derivatización, se evaluó en 30, 60, 90 y 120 cm. Para ello, se mantuvieron los valores de los parámetros optimizados hasta el momento y una longitud de R2 de 60 cm. En la Tabla 1 se observa que el reactor que presentó una mayor señal analítica fue el de 30 cm; a longitudes mayores, la señal disminuyó y se mantuvo constante. La reacción de derivatización es rápida, por lo tanto, se requieren reactores cortos para completarla. A longitudes mayores, se favorece la difusión de la muestra, disminuyendo la señal analítica [29].

Tabla 1. Absorbancia en función de la longitud de R1 (empleando MBTH)

Longitud del R1 (cm)	Abs	%DER (n=3)
30	0.061	4.4
60	0.053	3.7
90	0.053	3.5
120	0.053	1.4

4.2.1.5 Longitud de R2

Con el resto de los parámetros optimizados, se evaluó la longitud de R2, o reactor de oxidación. Se probaron longitudes de reactor de 30, 60, 90 y 120 cm. La señal analítica más alta se obtuvo con un reactor de 60 cm, tal como se muestra en la Tabla 2. Reactores más cortos no permiten la completa oxidación del compuesto, y, por lo tanto, la señal es menor y la

variación entre señales es alta; a longitudes mayores a 60 cm, se favorece la difusión de la muestra y la señal analítica disminuye [29].

Tabla 2. Absorbancia en función de la longitud de R2 (empleando MBTH)

Longitud de R2 (cm)	Abs	%DER (n=3)
30	0.047	9.7
60	0.061	4.3
90	0.036	5.7
120	0.037	4.1

4.2.2 Optimización del sistema FIA empleando AAP

4.2.2.1 Variables químicas

Como en el caso anterior, la etapa inicial de la optimización consiste en evaluar las concentraciones del agente derivatizante y oxidante. Los parámetros de flujo utilizados durante la evaluación de la concentración del oxidante ferricianuro de potasio fueron: volumen de inyección, 100.0 μl ; caudal 1.0 ml min^{-1} ; longitud de R1, 30 cm; longitud de R2, 60 cm, y concentraciones de derivatizante de 2.0% p/v y de tetraciclina de 30 mg l^{-1} . Se probó el intervalo de concentraciones desde 0.2 hasta 1.0% p/v. Como se muestra en la Figura 10, la señal aumenta con la concentración de oxidante, sin embargo, a partir de 0.6% p/v no se observan cambios significativos, pero se elige la concentración de 0.8% para garantizar el exceso de oxidante. El ferricianuro es un oxidante medio ($E^\circ=0.36\text{ V}$), sin embargo, esto presenta una ventaja pues impide que otros componentes de la muestra también se oxiden.

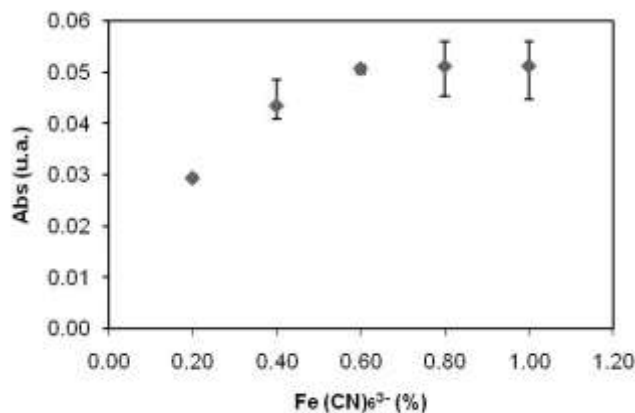


Figura 10. Variación de la absorbancia en función de la concentración de Fe(CN)_6^{3-}

Posteriormente se evaluó la concentración del derivatizante AAP, manteniendo el resto de los parámetros constantes, y utilizando la concentración de oxidante optimizada en la etapa anterior. Se probaron concentraciones de 0.25 a 2.00% p/v. En la Figura 11 se observa que el tamaño de la señal aumenta con la concentración de AAP, hasta obtener un máximo en 1.75% p/v. Las concentraciones de las soluciones de AAP y ferricianuro durante la optimización de los parámetros del sistema de flujo, fueron 1.75% p/v y 0.80% p/v, respectivamente.

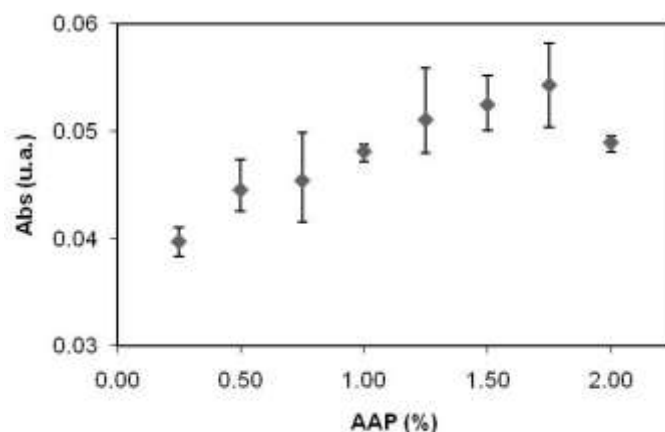


Figura 11. Variación de la absorbancia en función de la concentración de AAP

4.2.2.2 Caudal

Se evaluaron valores del caudal entre 0.25 a 2.75 ml min⁻¹ utilizando como parámetros de flujo: volumen de inyección, 100.0 µl; longitud de R1, 30 cm; longitud de R2, 60 cm, y las variables químicas optimizadas en la sección 4.2.2.1. Al comparar las señales obtenidas al inyectar, por triplicado, una solución de tetraciclinas de 30 mg l⁻¹ (Figura 12), se observa que, al aumentar la velocidad del flujo, el tamaño de las señales analíticas también aumenta. A pesar de no ser el valor máximo, se eligió un valor de caudal de 2.0 ml min⁻¹ para no incrementar el consumo de reactivos, y a la vez tener una velocidad de análisis adecuada. Como en el caso del MBTH, las reacciones que se presentan son rápidas, por lo que el caudal debe ser alto para impedir la difusión de la mezcla reaccionante y con ello, la disminución de la señal analítica [29].

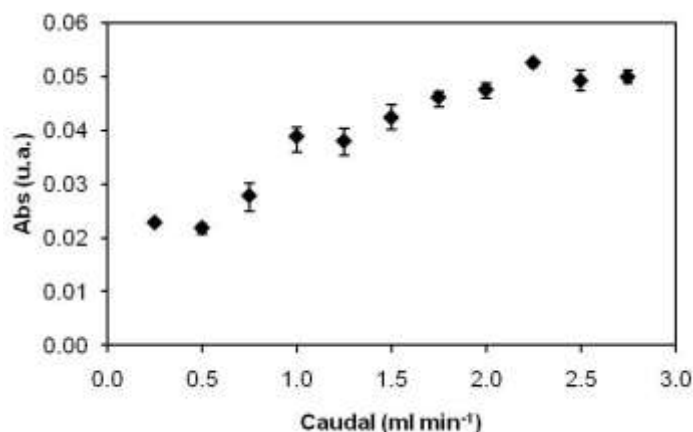


Figura 12. Variación de la absorbancia en función del caudal (empleando AAP)

4.2.2.3 Volumen de inyección

Utilizando los valores optimizados hasta el momento, y longitud de R1, 30 cm y longitud de R2, 60 cm, se evaluó el volumen de inyección probando volúmenes de 50, 100, 150, 200, 250, 325, 400 y 500 μl que se compararon con el tamaño de la señal analítica correspondiente. Como se observa en la Figura 13, el valor máximo se obtiene con un volumen de inyección de 400 μl . A mayor volumen de inyección, mayor cantidad de analito reaccionando, lo cual se refleja en un aumento de la señal analítica [29]. Sin embargo, el crecimiento de la señal no es indefinido pues también depende de la concentración de los otros reactivos (derivatizante y oxidante).

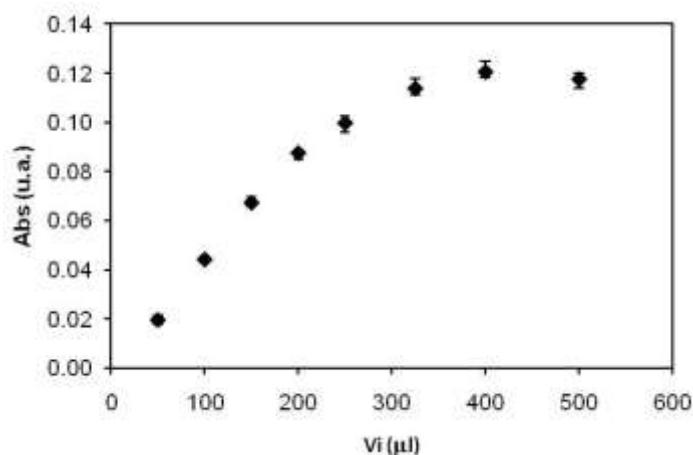


Figura 13. Variación de la absorbancia en función del volumen de inyección (empleando AAP)

4.2.2.4 Longitud de R1

Para la evaluación de la longitud de R1, se utilizaron las condiciones optimizadas para este derivatizante y una longitud de R2 de 60 cm. Como en todos los casos, se inyectó por triplicado una solución de 30 mg l⁻¹ de tetraciclina para probar reactores con longitudes de 30, 60, 90 y 120 cm. En la Tabla 3 se muestran las absorbancias medias de las señales analíticas para cada caso, y se puede observar que la señal disminuye al aumentar la longitud del reactor, debido a que la reacción de derivatización es rápida y requiere una longitud corta que permite que se complete la reacción y evita la difusión de la mezcla reaccionante [29]. Es por ello que se eligió como reactor de trabajo el de 30 cm.

Tabla 3. Absorbancia en función de la longitud de R1 (empleando AAP)

Longitud de R1 (cm)	Abs	%DER (n=3)
30	0.124	0.4
60	0.110	12.9
90	0.111	0.9
120	0.114	3.0

4.2.2.5 Longitud de R2

Con el resto de parámetros optimizados, se evaluó la longitud de R2. Se probaron longitudes de 30, 60, 90 y 120 cm. En la Tabla 4 se muestran las absorbancias para cada longitud de reactor, obtenidas al inyectar una solución de tetraciclina de 30 mg l⁻¹, siendo el reactor de 90 cm el que presenta una mayor señal analítica pues a longitudes menores no se completa la reacción de oxidación, y por lo tanto, la señal es menor, y a longitudes mayores, se favorece la difusión de la muestra, disminuyendo también la señal analítica [29].

Tabla 4. Absorbancia en función de la longitud de R2 (empleando AAP)

Longitud de R2 (cm)	Abs	%DER (n=3)
30	0.101	6.4
60	0.103	0.6
90	0.124	2.9
120	0.119	5.2

4.2.3 Parámetros analíticos FIA

Las líneas de calibrado de los analitos de interés (tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina), a partir de soluciones estándar en el intervalo de concentraciones de 30 a 500 mg l⁻¹, se realizaron en las condiciones óptimas encontradas, las cuáles se muestran en la Tabla 5. La altura de la señal obtenida para cada concentración se midió por triplicado, y la línea de calibrado se obtuvo con las alturas medias. Los parámetros analíticos para la AAP y el MBTH, los cuales se muestran en la Tabla 6, se obtuvieron a partir del FIagrama (Figura 14) de cada analito.

Tabla 5. Condiciones óptimas de las variables del sistema FIA

Parámetro	MBTH		AAP	
	Intervalo evaluado	Valor óptimo	Intervalo evaluado	Valor óptimo
Caudal (ml min ⁻¹)	0.25 a 2.75	2.0	0.25 a 2.75	2.0
Volumen de inyección (μL)	100.0 a 250.0	250.0	50.0 a 500.0	400.0
Longitud de R1 (cm)	30.0 a 120.0	30.0	30.0 a 120.0	30.0
Longitud de R2 (cm)	30.0 a 120.0	90.0	30.0 a 120.0	60.0
[Derivatizante] (%p/v)	0.05 a 0.50	0.10	0.25 a 2.00	1.75
[Oxidante]	5x10 ⁻⁵ a 1x10 ⁻³ mol l ⁻¹	5x10 ⁻⁴ mol l ⁻¹	0.2 a 1.0% p/v	0.8% p/v

Tabla 6. Límites de detección y sensibilidades analíticas obtenidos para las tetraciclinas evaluadas utilizando AAP y MBTH. Unidades: concentración, mg l⁻¹; sensibilidad analítica, Abs l mg⁻¹

Analito	AAP		MBTH	
	Límite de detección	Sensibilidad analítica (x10 ⁻³)	Límite de detección	Sensibilidad analítica (x10 ⁻³)
Tetraciclina	19.46	1.63 ± 0.44	29.34	1.23 ± 0.12
Clortetraciclina	18.04	1.51 ± 0.21	73.98	2.01 ± 0.50
Oxitetraciclina	21.49	1.59 ± 0.27	34.00	0.90 ± 0.10

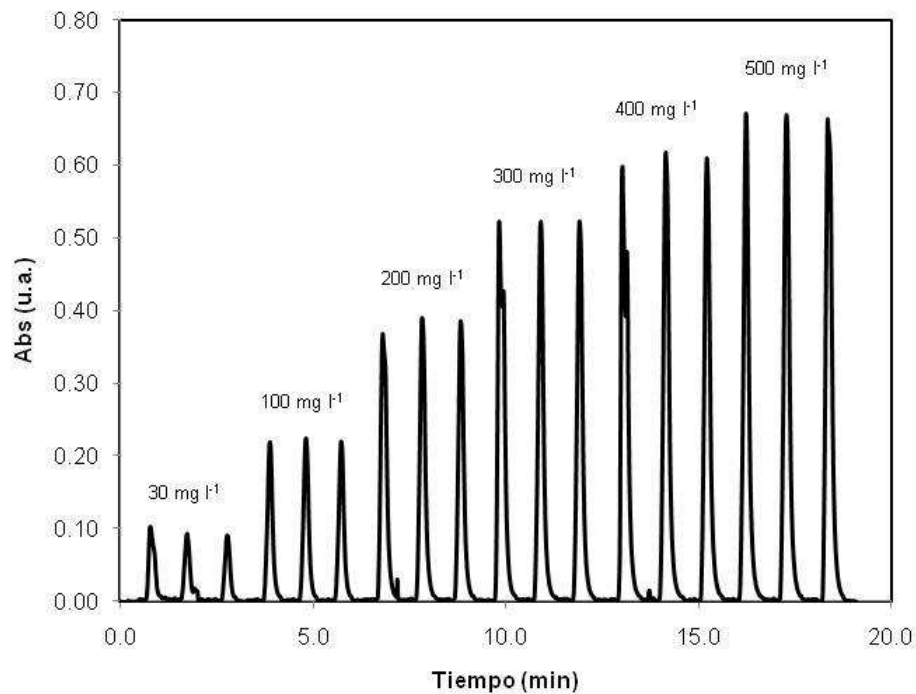


Figura 14. FIAGrama representativo obtenido para la tetraciclina utilizando MBTH como derivatizante

Las sensibilidades obtenidas a partir de la reacción con AAP son estadísticamente similares debido a que sus intervalos de confianza se traslapan, permitiendo el análisis global de las especies. Además, el límite de detección para el análisis con este derivatizante se encuentra en torno a los 20.0 mg l⁻¹, el cual es inferior y más homogéneo que el obtenido con MBTH. Por lo tanto, el análisis global de las tetraciclinas de interés es más conveniente utilizando AAP como derivatizante.

4.2.4 Evaluación del efecto matriz

Antes de comenzar con el análisis de muestras, se evaluó el efecto matriz. Para ello, se doparon muestras de suero de leche (ver sección 3.1) a tres niveles de tetraciclinas (100, 200 y 300 mg l⁻¹) para determinar su concentración y posteriormente, determinar el grado de recuperación. Las muestras dopadas se analizaron empleando la metodología optimizada con AAP como derivatizante. Las recuperaciones obtenidas en todos los casos fueron mayores al 200%, lo que indica que el efecto matriz es positivo. Este efecto únicamente se eliminó al diluir

10 veces el suero dopado, lo cual limita su aplicación en muestras reales. Sin embargo, otro método para eliminar el efecto matriz, consiste en un pretratamiento de la muestra que permita simultáneamente, eliminar las interferencias contenidas en la matriz y concentrar los analitos contenidos en la muestra, de manera que puedan cuantificarse y detectarse, con el método diseñado, las concentraciones máximas permitidas por la norma.

4.3 Preconcentración de las muestras

Debido al efecto matriz y a los límites de detección y cuantificación altos, comparándose con los límites máximos que exige la norma para las tetraciclinas ($300 \mu\text{g l}^{-1}$), se emplearon técnicas de preconcentración de las muestras para aumentar la proporción de tetraciclinas en relación con el líquido que las disuelve y así permitir su análisis mediante el sistema FIA optimizado. Los resultados obtenidos para cada una de las técnicas evaluadas se describen en las siguientes secciones.

4.3.1 Extracción líquido-líquido

Para la extracción líquido-líquido se doparon muestras de suero de leche (ver sección 3.1) a tres niveles de tetraciclinas (6.0, 12.0 y 18.0 mg l^{-1}); para ello, se adicionó cada tetraciclina de interés (clortetraciclina, tetraciclina y oxitetraciclina) en una tercera parte de la concentración, para que su suma alcanzara la concentración final añadida. Las recuperaciones obtenidas después de la extracción y análisis mediante el sistema FIA optimizado con AAP se muestran en la Tabla 7, donde se observan recuperaciones bajas en todos los casos. Otra desventaja es el alto consumo de solventes, en este caso organoclorados, lo que hace a esta técnica costosa e incompatible con el medio ambiente. Debido a esto, la extracción líquido-líquido no es adecuada para la preconcentración de tetraciclinas.

Tabla 7. Recuperaciones obtenidas mediante extracción líquido-líquido

Concentración añadida (mg l^{-1})	Concentración recuperada (mg l^{-1})	Recuperación (%)
6.00	3.85	64.1
12.00	3.85	32.0
18.00	5.59	31.1

4.3.2 Extracción en fase sólida

Para evaluar la extracción en fase sólida, tres muestras de leche se doparon con tetraciclinas de la misma forma que para la extracción líquido-líquido. Los porcentajes de recuperación se muestran en la Tabla 8, donde se observa que las recuperaciones son adecuadas a concentraciones altas, sin embargo, a concentraciones bajas el porcentaje de recuperación es doble. Esto se debe a que una porción de las proteínas del suero de leche son retenidas en el cartucho C18 y por lo tanto, se eluyen junto con las tetraciclinas. Estas proteínas poseen un color amarillo que afecta positivamente el porcentaje de recuperación a concentraciones bajas de analito. Debido a que la concentración máxima de tetraciclinas permitida por la norma es menor a las evaluadas, y a que a estas concentraciones se presenta un error positivo en las recuperaciones, la extracción en fase sólida no es adecuada para la preconcentración de tetraciclinas en muestras de leche para su determinación mediante el sistema FIA propuesto.

Tabla 8. Recuperaciones obtenidas mediante extracción en fase sólida

Concentración añadida (mg l ⁻¹)	Concentración recuperada (mg l ⁻¹)	Recuperación (%)
6.00	10.93	182.2
12.00	11.91	99.3
18.00	15.03	83.5

4.3.3 Extracción en fase sólida magnética

4.3.3.1 Caracterización del soporte magnético

La isoterma de adsorción-desorción de N₂ y el correspondiente BJH de distribución del tamaño de poro del soporte magnético se muestran en la Figura 15. El material muestra una isoterma tipo IV característica de materiales mesoporosos con distribución de tamaño de poro uniforme. El tipo de histéresis es H1, lo cual se atribuye a poros cilíndricos abiertos por ambos extremos. El área superficial BET, volumen de poro y diámetro de poro fueron 346 m² g⁻¹, 0.6 cm³ g⁻¹ y 7.0 nm, respectivamente. El área BET de sílice pura es mayor que la obtenida en el soporte magnético, sin embargo, la incorporación de la magnetita disminuye la porosidad y el área superficial de los sólidos, pero presenta características adecuadas para su uso como sorbente en MSPE [35].

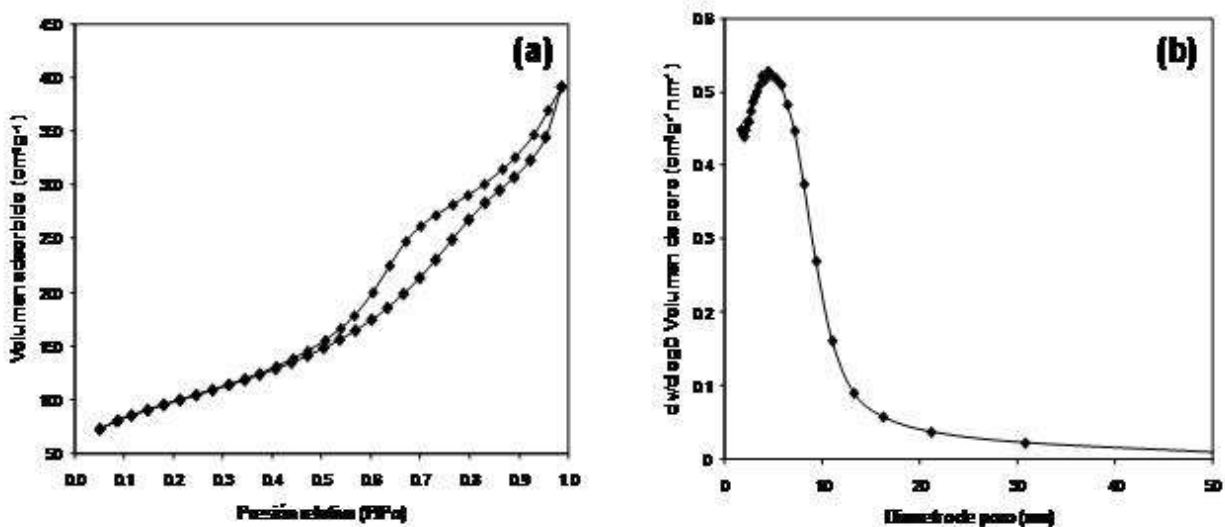


Figura 15. (a) Isotherma de adsorción-desorción de N_2 y (b) distribución del tamaño del poro del soporte magnético

La distribución del tamaño de partícula para el soporte magnético se muestra en la Figura 16. El polvo sintetizado presenta un intervalo de tamaño de partícula entre 1.1 a 10.0 μm con un diámetro promedio de 2.0 μm . La síntesis del soporte magnético por polimerización en emulsión juega un papel importante en la formación de materiales de mesoestructura homogénea con respecto al proceso sol-gel sin surfactante [36].

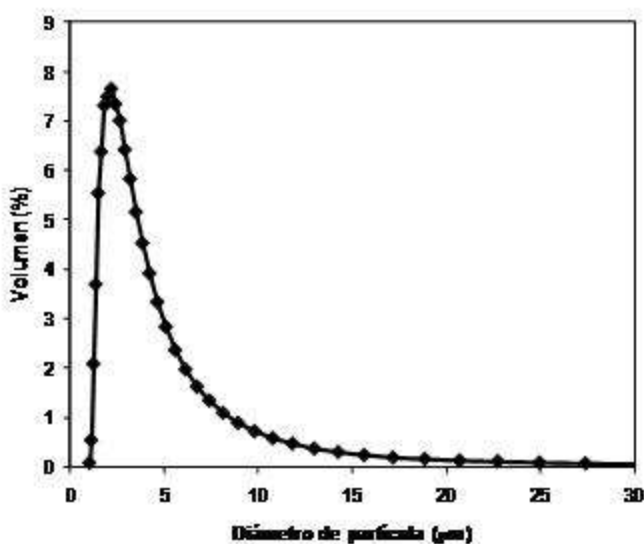


Figura 16. Distribución del tamaño de partícula para el soporte magnético

4.3.3.2 Optimización de la metodología

Las variables de la extracción en fase sólida magnética se optimizaron para permitir la mayor eficiencia en la preconcentración de tetraciclinas presentes en las muestras de leche. Para ello se utilizó un diseño de parámetros de Taguchi (TPD) que proporciona la información necesaria utilizando un mínimo de experiencias. El TPD utiliza una serie de matrices de diseño especiales (arreglos ortogonales), en las cuales, las columnas (los factores y sus interacciones) y las filas (experiencias) son colocadas de manera adecuada, indicando la combinación de factores y niveles de cada experimento, permitiendo además la evaluación de distintos parámetros con un número bajo de experiencias [37].

La optimización de sistemas mediante TPD involucra 5 pasos básicos:

1. La elección de la variable de salida a optimizar
2. La identificación y selección de los factores que afectan al sistema
3. La elección del arreglo ortogonal adecuado y de los niveles de los factores
4. El análisis de los resultados para encontrar los valores óptimos
5. La confirmación del valor óptimo mediante la realización de la curva de calibración en las condiciones óptimas predichas

Como factor objetivo o respuesta, se seleccionó el porcentaje de recuperación, el cual se desea que adquiera un valor máximo y que se relacione con la obtención de parámetros analíticos adecuados.

En la extracción en fase sólida magnética, los principales parámetros operacionales son:

- pH de la muestra
- Cantidad del soporte magnético
- Tiempo de dispersión entre el soporte y la muestra
- Concentración de ácido acético en el eluyente (metanol)

El pH de la muestra es un factor a controlar debido a la naturaleza anfotérica de las tetraciclinas; con la cantidad del soporte magnético se varía la superficie de contacto que tendrán los analitos para adsorberse; el tiempo de dispersión debe ser suficiente para completar la adsorción de los analitos en el soporte magnético, y finalmente la acidificación del

solvente permite evaluar el efecto que tiene la ionización en la elución de las tetraciclinas del soporte magnético [25].

El arreglo ortogonal que permite el análisis de cuatro factores es el $L_9(3^4)$, esto involucra elegir 3 niveles para cada uno de ellos, los cuales fueron elegidos mediante experimentos previos. Los valores seleccionados para los distintos factores se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Factores y niveles elegidos para la optimización

Factor	Notación	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
pH	A	6.0	7.0	8.0
Cantidad de soporte (g)	B	0.1	0.2	0.3
Tiempo de dispersión (min)	C	5	10	15
Acidificación (mol l ⁻¹)	D	0.000	0.001	0.010

En la Tabla 10 se muestra la matriz de diseño y los resultados obtenidos. Cada una de las experiencias se realizó por triplicado, para calcular el valor residual, de modo que se hicieron 27 experiencias (9 experimentos X 3 réplicas). Durante el proceso de optimización se usó una solución de 9 mg l⁻¹ de las tetraciclinas de interés (oxitetraciclina, clortetraciclina y tetraciclina), es decir, 3 mg l⁻¹ de cada una de ellas.

Tabla 10. Matriz de diseño ortogonal $L_9(3^4)$ utilizada para la optimización de la extracción en fase sólida magnética y respuesta promedio obtenida de cada uno de los experimentos (n=3)

Exp	Control factores y niveles				Recuperación promedio
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	56.51
2	1	2	2	2	74.94
3	1	3	3	3	95.00
4	2	1	2	3	82.31
5	2	2	3	1	75.55
6	2	3	1	2	90.70
7	3	1	3	2	75.14
8	3	2	1	3	64.70
9	3	3	2	1	69.41

Los resultados obtenidos fueron analizados estadísticamente para ajustar el valor de cada variable a su nivel óptimo. Todos los cálculos fueron realizados utilizando el programa Minitab v15.0. Los resultados del análisis de varianza (ANOVA) regular se muestran en la Tabla 11. Las variables críticas del sistema fueron identificadas a través del valor de la varianza proporcional (F) y el valor crítico $F_{2,18}$ (3.55 para un 95% de nivel de confianza), deduciéndose que todas las variables son críticas en el sistema ($F_{cal} > F_{critica}$). Todos los factores tienen una contribución similar, por lo tanto, todos tienen gran influencia en la metodología de preconcentración [37].

Tabla 11. Análisis de varianza regular

Origen de la varianza	Varianza promedio (F)	Contribución (%)
A	13.09	25.4
B	13.61	26.4
C	11.32	21.9
D	13.56	26.3

En la Figura 17 se muestran los niveles óptimos encontrados, los cuales son: pH de la muestra, 7.0; gramos de soporte magnético, 0.3; tiempo de dispersión entre la muestra y el soporte, 15 min, y grado de acidificación del eluyente, 0.01 mol l^{-1} . El pH indica el grado de disociación de las tetraciclinas, siendo un valor neutro el que mejora la adsorción; por otro lado, la cantidad de soporte y el tiempo de dispersión indican que deben situarse en su valor máximo con la finalidad de intentar alcanzar el equilibrio durante la adsorción de las tetraciclinas presentes en la muestra, finalmente, se demuestra que los analitos son eluidos en su forma ionizada, sin embargo, se selecciona una concentración de 0.001 mol l^{-1} debido a que a concentraciones mayores de ácido se disuelve la magnetita contenida en el soporte.

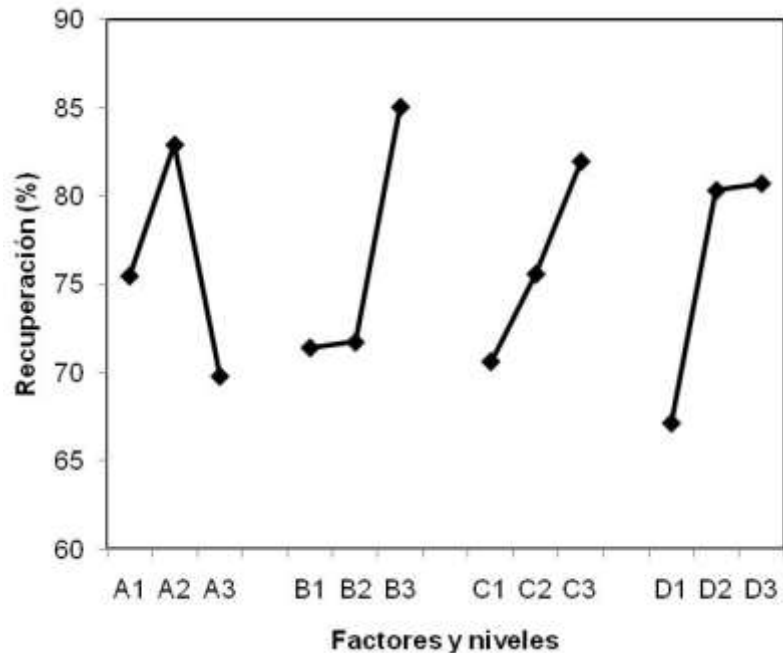


Figura 17. Efecto de la interacción de factores control en los valores de tetraciclinas. A, pH de la muestra; B, gramos de soporte magnético polar; C, tiempo de dispersión, y D, grado de acidificación del eluyente

4.3.3.3 Parámetros analíticos y recuperaciones

Bajo las condiciones óptimas encontradas se realizó la línea de calibrado utilizando muestras de leche dopada con concentraciones de tetraciclina entre 200 y 800 mg l⁻¹. Las soluciones estándar se analizaron mediante el sistema FIA optimizado, utilizando AAP como derivatizante. La altura de la señal obtenida (u.a.) se midió por triplicado, construyéndose la línea de calibrado a partir de las alturas medias. La línea de calibrado muestra una dependencia lineal entre la intensidad media de la señal y la concentración de analito presente en la solución estándar. El FIAgrama obtenido en condiciones de preconcentración óptimas y los parámetros de regresión de la línea de calibrado se muestran en la Figura 18 y la Tabla 12, respectivamente.

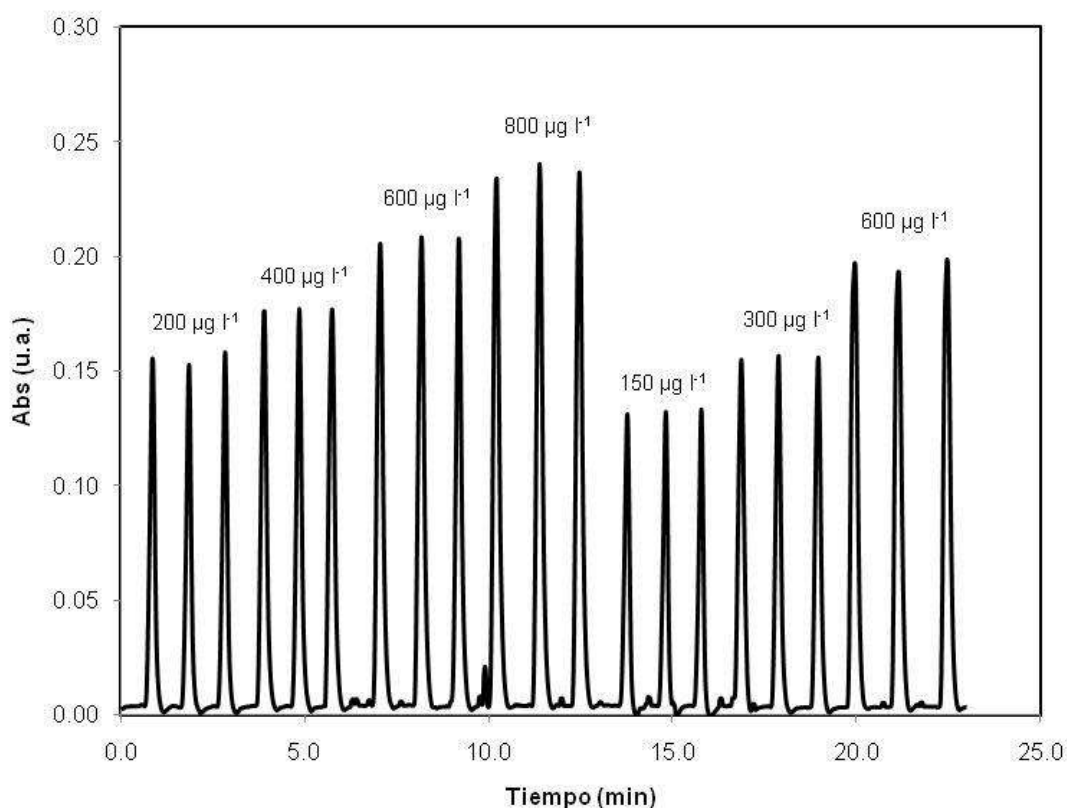


Figura 18. FIograma correspondiente a la inyección de soluciones estándar de tetraciclina en leche

Tabla 12. Parámetros de regresión de la línea de calibrado, altura (u.a.) vs concentración de tetraciclina (mg l^{-1})

Parámetro	Valor
Raíz cuadrada de la varianza residual, s_e	0.0012
Ordenada en el origen, $b_0 \pm ts(b_0)$	0.001 ± 0.003
Pendiente, $b_1 \pm ts(b_1)$ (Abs l mg^{-1})	0.156 ± 0.006
Intervalo lineal ($\mu\text{g l}^{-1}$)	75.0 - 800.0
Límite de detección ($\mu\text{g l}^{-1}$)	25.0
Repetitividad (%DER, $n=3$, $400 \mu\text{g l}^{-1}$)	0.28
Reproducibilidad (%DER, $n=3$, $600 \mu\text{g l}^{-1}$)	2.56
Velocidad de muestreo (muestras h^{-1})	54
Coefficiente de correlación (r^2)	0.999

Antes de aplicar la metodología de análisis a muestras de leche, se realizó el análisis de muestras dopadas de manera simultánea con las tres tetraciclinas de interés a 3 diferentes niveles. La concentración se expresa como la sumatoria de las concentraciones individuales de

acuerdo a la normativa de la FDA [14]. Los valores seleccionados corresponden a 0.5, 1.0 y 2.0 veces el límite máximo permisible. Los resultados obtenidos de la recuperación se presentan en la Tabla 13, los cuales permiten afirmar que la preconcentración de tetraciclinas en muestras de leche es posible mediante el método propuesto, ya que la recuperación fue mayor al 80% [9]. Además de la adecuada recuperación, esta técnica de preconcentración presenta diversas ventajas sobre las otras metodologías evaluadas tales como facilidad y rapidez del pretratamiento, así como una eficiente limpieza de la muestra.

Tabla 13. Recuperación de tetraciclinas (media y %DER, n=3) en muestras de leche dopadas. Unidades de concentración $\mu\text{g l}^{-1}$

Concentración Añadida	Concentración encontrada	Recuperación (%)
150.0	123.9 (5.3)	82.6
300.0	275.6 (2.0)	91.9
600.0	531.1 (2.4)	88.5

4.4 Análisis de muestras

La metodología optimizada, es decir, la preconcentración mediante extracción en fase sólida magnética acoplada al sistema FIA, se aplicó a muestras de leche disponibles en el mercado (pasteurizadas y ultrapasteurizadas), así como leche sin pasteurizar adquirida en establos. Se analizaron un total de 22 muestras: 13 de leche ultrapasteurizada, de las cuales 2 sobrepasan los límites máximos permitidos por la norma con concentraciones de 355 y 322 $\mu\text{g l}^{-1}$; 4 de leche pasteurizada, resultando positivas 2 de ellas con concentraciones de 358 y 433 $\mu\text{g l}^{-1}$, y 5 muestras sin pasteurizar, de las cuales ninguna sobrepasó los límites de la norma (300 $\mu\text{g l}^{-1}$).

La concentración de las muestras positivas de leche ultrapasteurizada también fue determinada por el método de referencia (SPE-HPLC). Para la validación de la técnica de preconcentración, se realizó el pretratamiento propuesto a las muestras y posteriormente se analizaron mediante HPLC. En la Tabla 14 se muestra la media de las concentraciones obtenidas por estas tres metodologías. Se realizó un análisis de varianza de dos vías a los resultados obtenidos mediante las diversas metodologías, los resultados se muestran en la Tabla 15. Los valores de $F_{\text{calculada}}$ fueron comparados con los de $F_{\text{crítica}}$. Este análisis reveló que existen diferencias significativas entre las muestras, mientras que para las metodologías no hay diferencia significativa entre los resultados provenientes de cada una de ellas, lo que demuestra que la

metodología propuesta proporciona resultados exactos, y que la técnica de preconcentración es robusta ya que permite acoplarse a diferentes metodologías de análisis.

Tabla 14. Contenido de tetraciclinas (media y %DER, n=3) en muestras de leche determinado por el método de análisis propuesto y comparación con SPE-HPLC y MSPE-HPLC. Unidades de concentración $\mu\text{g l}^{-1}$

Muestra	MSPE-FIA	SPE-HPLC	MSPE-HPLC
1	358.4(2.0)	355.9(0.7)	359.4(1.7)
2	433.4(1.9)	435.2(1.3)	436.0(0.4)

Mediante el análisis por HPLC se pudo identificar cada una de las tetraciclinas presentes en las muestras positivas. El cromatograma obtenido del análisis de leche mediante la metodología de preconcentración propuesta y la de referencia se muestra en la Figura 19, donde se observa que la oxitetraciclina es la tetraciclina que predomina. Además, al comparar mediante este cromatograma las técnicas de preconcentración, se observa que la MSPE es una metodología más eficiente que la SPE en la limpieza de las muestras, disminuyendo la interferencia de otros componentes de la muestra que afectan las señales analíticas.

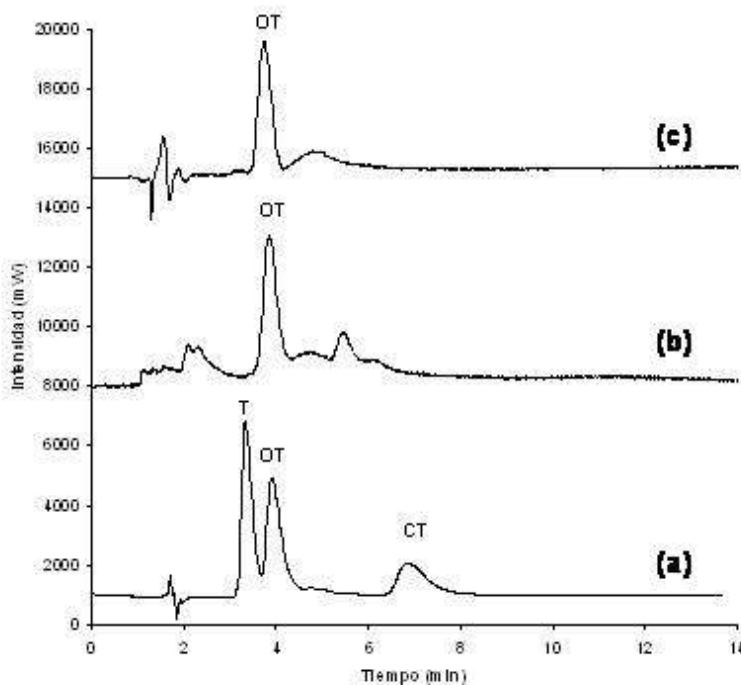


Figura 19. Cromatograma de la (a) solución estándar de tetraciclinas, comparado con muestras de leche analizadas mediante (b) SPE-HPLC y (c) MSPE-HPLC

Tabla 15. Análisis de varianza de dos vías del contenido de tetraciclinas determinado por el método de análisis propuesto y comparación con SPE-HPLC y MSPE-HPLC

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Varianza	F _{calculada}	F _{crítica}
Muestra	1	26665.1	26665.1	817.61	4.75
Método	2	15.7	7.9	0.24	3.89
Interacción	2	14.1	7.1	0.22	3.89
Residual	12	391.4	32.6		
Total	17	27086.3			

El método diseñado (MSPE-FIA) presenta diversas ventajas sobre el de referencia (SPE-HPLC), entre las que destacan la rapidez tanto del pretratamiento de la muestra, debido a la eliminación de etapas como la precipitación de la caseína, así como del análisis, en el cual se obtuvo una velocidad de muestreo de 54 muestras h⁻¹. Adicionalmente, esta técnica es más sencilla y el equipo es de menor costo.

Conclusiones

5. CONCLUSIONES

1. El sistema FIA con detección espectrofotométrica desarrollado es un método sencillo basado en el uso de 4-aminoantipirina como derivatizante y ferricianuro como oxidante que permite el análisis de 54 muestras h^{-1} proporcionando resultados exactos y precisos.
2. La extracción en fase sólida magnética permitió la limpieza y concentración, con recuperaciones adecuadas, de residuos de tetraciclinas presentes en muestras de leche, demostrando ser un método rápido y robusto al poder acoplarse a otras metodologías de análisis.
3. Se desarrolló una metodología de análisis basada en la extracción en fase sólida magnética acoplada a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) con detección espectrofotométrica para la determinación simultánea de residuos de las tetraciclinas de mayor interés (tetraciclina, clortetraciclina y oxitetraciclina) en muestras de leche, el cual no había sido reportado en el análisis de este tipo de antibiótico.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Cordiés, L., Vázquez, A. (1990) Principios generales de la terapéutica antimicrobiana: Revisión bibliográfica. *Acta Médica*, 4, 165-192.
- [2] Madigan, M., Martinko, J., Parker, J. Brock. (2000). *Biología de los microorganismos*. España:Prentice Hall.
- [3] Wyngaarden J., Lloyd, H.S., Bennet, J. (1994). *Tratado de Medicina Interna*. México:Nueva Editorial Interamericana.
- [4] Appleton, A. (2001). Bacterial Resistance. A worldwide problem. *Clinical Laboratory International*, 25, 22-23.
- [5] Sanjurjo, M. (1997). La penicilina, pionera de la era de los antibióticos. *Educación química*, 8, 68-74.
- [6] Torres, C., Zarazaga, M. (2002). Antibióticos como promotores del crecimiento en animales: ¿Vamos por el buen camino?, *Gaceta Sanitaria* 16(2), 109-112.
- [7] Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Prat, M.D. (2009). Review: Antibiotics in food: Legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395, 877-891
- [8] Patiño, D. (2003). ¿Por qué las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos? *Umbral científico*, 48-56.
- [9] Botsoglou, N. y Fletouris, D. (2001). *Drug residues in foods: Pharmacology, food safety and analysis*. EUA:Marcel and Dekker, Inc.
- [10] Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H. (2000). Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2), 109-133.
- [11] Rodríguez, M.A., Gundián, J., Barreto, J., Lim, N., Areu, A., Pardo, A. (1998). Tetraciclinas. *Acta Médica*, 8(1), 75-79.
- [12] Al-Momani, I.F., Kanan, S.J. (2008). Flow-Injection Spectrophotometric and LC Determination of Doxycycline, Oxytetracycline and Chlortetracycline in Biological Fluids and Pharmaceutical Preparations. *Journal Flow Injection Analysis*, 25(1), 29-34.
- [13] Samanidou, V.F., Nikolaidou, K.I., Papadoyannis, I.N. (2007). Advances in Chromatographic Analysis of Tetracyclines in Foodstuffs of Animal Origin: A Review. *Separation & Purification Reviews*, 36, 1–69.
- [14] FDA (Food and Drug Administration). (1998). Tolerances established for tetracyclines in milk. USA.

-
- [15] Salem, H. (2004). Selective spectrophotometric determination of phenolic β -lactam antibiotics in pure forms and in their pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta*, 515, 333–341.
- [16] Traviesa-Alvarez, J.M., Costa-Fernández, J.M., Pereiro, R., Sanz-Medel, A. (2007). Direct screening of tetracyclines in water and bovine milk using room temperature phosphorescence detection. *Analytica Chimica Acta*, 589(1), 51-58.
- [17] Casado-Terrones, S., Segura-Carretero, A., Busi, S., Dinelli, G., Fernández- Gutiérrez, A. (2007). Determination of tetracycline residues in honey by CZE with ultraviolet absorbance detection. *Electrophoresis*, 28, 2882–2887.
- [18] Oka, H., Uno, K., Harada, K.I., Suzuki, M., Zasshi, Y. (1983). Improvement of the chemical analysis of antibiotics. Simple method for the analysis of tetracyclines on silica gel high-performance thin-layer plates. *Journal of Chromatography*, 260, 457.
- [19] Brandsteterová, E., Kubalec, P. (1999). SPE and MSPD as pre-separation techniques for HPLC of tetracyclines in meat, milk and cheese. *European Food Research and Technology*, 205, 311-315.
- [20] Ridgway, K., Lalljie, S., Smith, R. (2007). Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods. *Journal of Chromatography A*, 1153, 36–53.
- [21] IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). (1997). Compendium of Chemical Terminology.
- [22] Kissinger, P.T., Heineman, W.R. (1996). *Laboratory techniques in Electroanalytical Chemistry*. EUA:Dekker.
- [23] Mitra, S. (2003). *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Nueva York: Wiley&Sons.
- [24] Ashwoth, R.B. (1985) Liquid chromatographic assay of tetracyclines in tissues of food producing animals. *AOAC*, 68(5), 1013–1018.
- [25] Mutavdz'ic', D., Babic', S., Horvat, A., Kas'telan-Macan, M. (2007). Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1062-1075.
- [26] Oka, H., Matsumoto, H., Uno, K., Harada, K., Kadowaki, S., Suzuki, M. (1985) Improvement of chemical analysis of antibiotics: VIII. Application of prepacked C18 cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver. *Journal of Chromatography A*, 325, 265–274.
- [27] Yavuz, C.T., Prakash, A., Mayo, J.T., Colvin V.L. (2009). Magnetic separations: From steel plants to biotechnology. *Chemical Engineering Science*, 64, 2510-2521.

-
- [28] Aguilar-Arteaga K., Rodríguez J.A., Miranda J.M., Medina J., Barrado, E. (2010). Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in wastewaters by magnetic matrix solid phase dispersion–HPLC. *Talanta*, 80, 1152–1157.
- [29] Ruzicka, J., Hansen, E.H. (1988). *Flow Injection Analysis*. Nueva York: Wiley&Sons.
- [30] Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. (1997). *Fundamentos de Química Analítica*. Barcelona:Reverté.
- [31] Kirk, R.S., Sawyer, R., Egan, H. (2005). *Composición y análisis de alimentos de Pearson*. México:CECSA.
- [32] Fritz, J.W., Zuo, Y. (2007). Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 105, 1297–1301.
- [33] Barrado, E., Rodríguez, J.A., Prieto, F., Medina, J. (2005). Characterization of iron oxides embedded in silica gel obtained by two different methods. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 351, 906–914.
- [34] Bosque-Sendra, J.M., Gámiz-Gracia, L., García-Campaña, A.M. (2003). An overview of qualimetric strategies for optimisation and calibration in pharmaceutical analysis using flow injection techniques. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377, 863–874.
- [35] Leofanti, G., Padovan, M., Tozzola G., Venturelli, B. (1998). Surface area and pore texture of catalysts. *Catalysis Today*, 41, 207-219.
- [36] Barrado, E., Rodríguez, J.A., Castrillejo, Y. (2006). Renewable stationary phase liquid magnetochromatography: determining aspartame and its hydrolysis products in diet soft drinks. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 1233–1240.
- [37] Kuehl, R.O. (2001). *Diseño de experimentos*. México:Thomson.